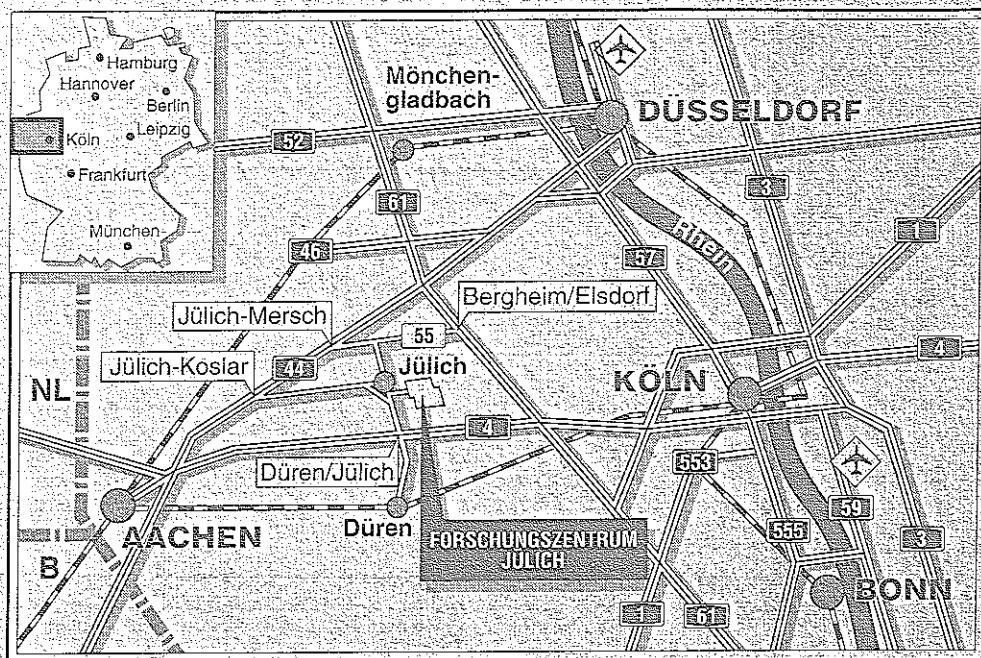


Institut für Biotechnologie

**Zur Bakterienflora denitrifizierender Biofilme
unter besonderer Berücksichtigung einer
selektierenden Wirkung der Eisenversorgung**

Antonette Deffur



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3043

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3043

D82 (Diss. RWTH Aachen)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon : 02461/61-6102 · Telefax : 02461/61-6103 · Telex : 833556-70 kfa d

**Zur Bakterienflora denitrifizierender Biofilme
unter besonderer Berücksichtigung einer
selektierenden Wirkung der Eisenversorgung**

Antonette Deffur

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Trinkwasser - ein kostbarer Rohstoff	1
1.2	Die Nitratelimination im Zuge der Trinkwasseraufbereitung	4
1.2.1	Physikalisch-chemische Verfahren	5
1.2.2	Biologische Verfahren	7
1.3	Die Denitrifikation - ein Schritt im natürlichen Stickstoffkreislauf	8
1.3.1	Die mikrobiologischen Grundlagen der Denitrifikation	9
1.3.2	Zur Taxonomie der Denitrifikanten	13
1.4	Mikrobielle Aggregate und Biofilme	16
1.4.1	Aggregate und Mikrokolonien	16
1.4.2	Biofilme auf Festkörpern	17
1.4.3	Die Aktivität von Bakterien auf Oberflächen	19
1.4.4	Zusammensetzung der Exopolymere	21
1.4.5	Zeitpunkt der Exopolymerbildung	21
1.5	Siderophore bei Bakterien	22
1.5.1	Mikroorganismen und Eisen	22
1.5.2	Chemie des Eisens	24
1.5.3	Biogene Transformationen des Eisens	26
1.5.4	Die Chemie der Siderophore	27
1.5.5	Siderophore bei Pseudomonaden - Biologische Eigenschaften	29

2	Material und Methoden	32
2.1	Der Roto-Bio-Reaktor zur Denitrifikation von Trinkwasser	32
2.1.1	Reaktoren mit undefinierten Bakterienmischpopulationen	34
2.1.2	Der sterilisierbare Roto-Bio-Reaktor - Axenische Kulturen im RBR	34
2.2	Kulturmedien	36
2.2.1	Medien zur Anzucht von heterotrophen Bakterien	36
2.2.2	Medien zum Nachweis der Denitrifikation	38
2.2.3	Medien zum Nachweis der Siderophorbildung	40
2.3	Chemisch-Physikalische Messungen	41
2.3.1	Redoxpotential	41
2.3.2	pH-Wert	41
2.3.3	Bestimmung der Nitrat-und Nitrit-Konzentration	42
2.3.4	Ethanol-Test	42
2.3.5	Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs	43
2.4	Homogenisierungsmethoden	44
2.4.1	Mechanische Methoden	44
2.4.2	Entwicklung einer kombinierten enzymatischen und mechanischen Methode zur Aggregatauflösung bzw. Biofilmlösung	45
2.5	Quantifizierung der Population	47
2.5.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	47
2.5.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen	48
2.5.3	MPN-Tests	48
2.5.4	Koloniebildung	49

2.6	Identifizierung der Bakterien	50
2.6.1	Herkömmliche morphologische und physiologische Tests zur Bakterienidentifizierung	50
2.6.2	Charakterisierung/Identifizierung mit kommerziellen Testsystemen	53
2.6.3	Zusatztests	56
2.7	Analyse der Exopolysaccharide (EPS)	64
3	Ergebnisse	69
3.1	Eignungstest verschiedener Nährmedien zur Bestimmung der Lebendzellzahl	69
3.2	Eignungstest verschiedener Nährmedien zur Bestimmung der "most probable number" (MPN) an Denitrifikanten	72
3.3	Homogenisierung der Bakterienaggregate im Auslauf des RBR und Biofilmablösung auf den Füllkörpern	73
3.3.1	Mechanische Methoden	73
3.3.2	Einfluß von Ultra Turrax bzw. Ultraschallbehandlung auf die Aktivität von Bakterien aus einem Denitrifikationsreaktor	75
3.3.3	Zuckeranalyse der Exopolysaccharide von <i>Pseudomonas fluorescens</i> nach saurer Hydrolyse	79
3.3.4	Einsatz von Cellulase zur Auflösung von Bakterienaggregaten und Biofilm-Ablösung	80
3.4	Bakterienanalysen	84
3.4.1	Die Eignung des BIOLOG- Systems zur Bakterienanalyse	84
3.4.2	Bakterienanalyse an der halbtechnischen RBR-Pilotanlage Königschaffhausen	104
3.4.3	Bakterienanalyse an der Pilotanlage in Wyhl	106

3.4.4	Identifizierung der häufigsten Bakterienart in einer Laboranlage des RBR bei hoher Eiseneingangskonzentration	109
3.5	Zusammenhang zwischen Eisenkonzentration im Einlaufwasser des Denitrifikationsreaktors und der Bakterienzusammensetzung	109
3.6	Siderophorproduktion von ausgewählten Isolaten unter Denitrifikationsbedingungen	111
3.7	Betrieb des RBR mit axenischen Kulturen	115
3.7.1	Betrieb des RBR mit axenischen Startbedingungen und <i>Ps. fluorescens</i> ATCC 17563 als Startkultur	115
3.7.2	Betrieb des RBR mit axenischen Startbedingungen und <i>Ps. MS1</i> als Startkultur	120
3.7.3	Betrieb des RBR mit axenischen Startbedingungen und <i>Ps. fluorescens</i> DSM 50108 als Startkultur	123
3.8.	Beschreibung des Isolats <i>Pseudomonas MS1</i>	124
4	Diskussion	130
4.1	Homogenisierung von Bakterienaggregaten und Biofilmablösung von den Füllkörpern	130
4.2	Quantifizierung der Population	132
4.3	Kommerzielle Bakterienanalysesysteme	136
4.4	Populationsanalysen an verschiedenen Denitrifikationsreaktoren	137

4.5	Die Populationsdynamik im Hinblick auf verschiedene selektierende Faktoren	137
4.6	Das mögliche Auftreten von Pilzen im RBR und anderen Denitrifikationsreaktoren	139
4.7	Vergleich des Isolats <i>Pseudomonas</i> MS1 mit anderen Arten der selben RNA-Gruppe	141
4.8	Axenische Kulturen in Denitrifikationsreaktoren	143
I	Zusammenfassung	146
II	Danksagung	148
III	Literaturverzeichnis	149
IV	Abbildungsverzeichnis	159
V	Tabellenverzeichnis	164
VI	Anhang	167

1 Einleitung

1.1 Trinkwasser - ein kostbarer Rohstoff

Trinkwasser ist ein Rohstoff, der nur in begrenzter Menge durch die Ökosysteme der Welt zirkuliert. Wieviel Wasser in einer bestimmten Gegend dieser Welt für Mensch und Natur verfügbar ist, hängt zunächst vom regionalen, sodann vom globalen Wasserkreislauf ab (Abb.I.1). In diesem Kreislauf verteilt sich das Wasser sehr ungleichmäßig über die Erde. Von den schätzungsweise 1,4 Milliarden km^3 Wasser sind 97% Meerwasser, das ohne aufwendige Aufarbeitung nicht trinkbar ist. Zu Eis und Gletschern gefroren sind weitere 2,3%. Flüsse, Süßwasserseen, Grundwasser und Bodenfeuchtigkeit machen nur 0,7% der Gesamtwassermenge der Welt aus [Vogl et al., 1988].

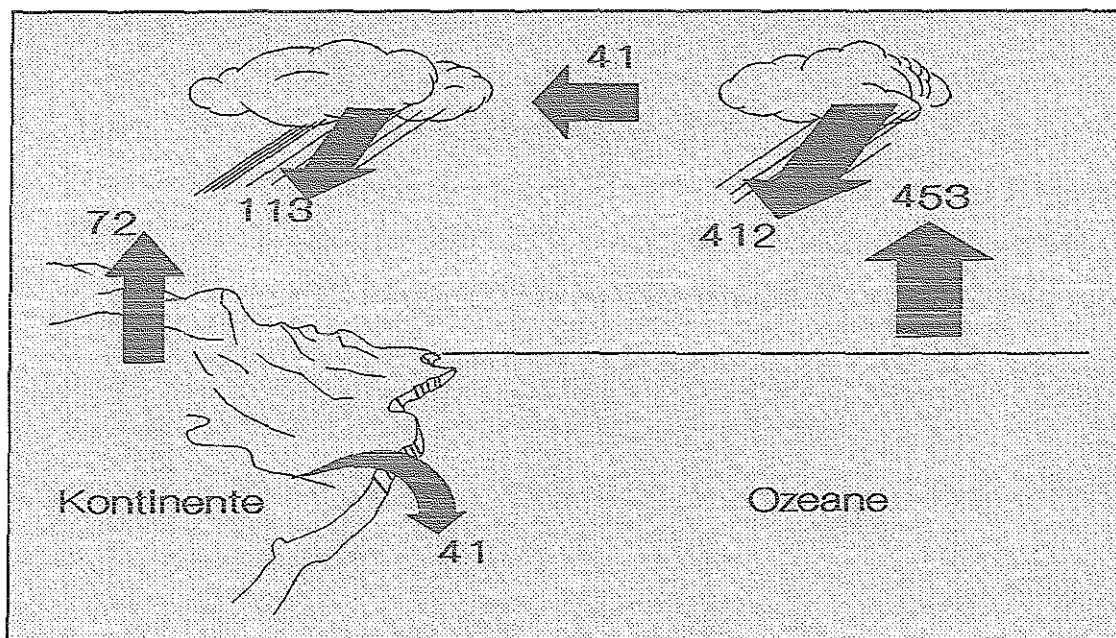


Abb.I.1 Globaler Wasserkreislauf (in Tausend km^3 pro Jahr) [Vogl et al., 1988]

Der Mensch greift seit Urzeiten in den natürlichen Wasserzyklus ein, indem er be- und entwässert, Leitungen legt, Kanäle und Dämme baut. Diese Eingriffe blieben bis in das industrielle Zeitalter ohne schwerwiegende Folgen. Mit zunehmender Industrialisierung

und steigender Weltbevölkerung gelangten jedoch immer mehr Schadstoffe in die Gewässer, ihre Selbstreinigungskraft wurde überschritten. Die Verschmutzung der Ströme und Seen durch Industrie und Fäkalien kennzeichnet unser ganzes Jahrhundert. Täglich sterben weltweit 25.000 Menschen aufgrund von verseuchtem Wasser [Vogl et al., 1988]. 80% der Kindersterblichkeit in Entwicklungsländern wird durch Krankheiten verursacht, die mit "schlechtem" Trinkwasser zusammenhängen [Vogl et al., 1988]. Dabei bezieht sich "schlecht" zum einen auf chemische Parameter, zum anderen auf mikrobielle.

Bei den im Wasser auftretenden pathogenen Bakterien und Viren handelt es sich um Mikroorganismen, die relativ widerstandsfähig sind. Aus diesem Grunde spielen Gonokokken, Luesspirochäten oder Masernviren keine Rolle. Eine Übertragung von Infektionskrankheiten durch Trinkwasser ist vorzugsweise zu befürchten bei *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, Choleravibrien, Leptospiren, Ruhramöben, Polioviren und Hepatitisserregern [Borneff, 1991].

Als chemische Verunreinigungen des Wassers treten häufig, besonders in der Nähe von Industrieanlagen, Kohlenwasserstoffe auf. Die kanzerogene Wirkung von Benzol ist bewiesen. Viele andere Kohlenwasserstoffe einschließlich Toluol, Xylol, Ethylendibromid und Ethylendichlorid sind als giftig anerkannt, jedoch muß ihre kanzerogene Wirkung auf Menschen noch überprüft werden [Borneff, 1991].

Da die toxische Wirkung - mit Ausnahme der der kanzerogenen Verbindungen - dosisabhängig ist, hat man für die einzelnen Wasserinhaltsstoffe Grenzwerte aufgestellt. Zur Zeit gelten nach den Festlegungen der WHO folgende Werte:

Tab.I.1		Durch die EG-Richtlinie über die Qualität von Wasser [1980], die Empfehlungen der WHO [1984] und die Trinkwasserverordnung [1986] festgelegte Höchstkonzentration bzw. Grenzwerte für Trinkwasserinhaltsstoffe (ausgewählte Beispiele), PSM= Pflanzenschutzmittel			
Eisen	0,2	mg/l	Arsen	40,0	µg/l
Fluorid	1,5	mg/l	Cadmium	5,0	µg/l
Kupfer	0,1	mg/l	Magnesium	50,0	mg/l
Mangan	0,05	mg/l	Kalium	12,0	mg/l
Nitrat	50,0	mg/l	Cyanide	50,0	µg/l
Nitrit	0,1	mg/l	PSM	0,5	µg/l
Ammonium	0,50	mg/l	Atrazin	0,1	µg/l
Sulfat	240,0	mg/l	Phenole	0,5	µg/l

Aus medizinischer Sicht verdienen Fluor, Sulfat und Nitrat besondere Beachtung. Die Hauptschwierigkeit beim Fluor besteht darin, daß es sich einerseits um eine Substanz mit Giftwirkung handelt (Fluorose), andererseits deren Zudosierung zum Trinkwasser zur Kariesprophylaxe gefordert wird. Der natürliche Fluorgehalt der Gewässer ist toxikologisch nur bedingt von Interesse, mit der Trinkwasserfluorierung kann aber ein künstliches Problem geschaffen werden. Dies kann verstärkt werden durch andere Wasserinhaltsstoffe, die die Fluorwirkung fördern, wie z.B. das Phosphat [Borneff, 1991].

Hohe Konzentrationen an Sulfat führen zu Magen-Darm-Störungen. Dabei üben jedoch die im selben Wasser auftretende Calcium-, Magnesium- und Natriumkonzentrationen einen wichtigen Einfluß auf die Toxizität des Sulfat aus. Nur Glaubersalz (Na_2SO_4) und Bittersalz (MgSO_4) wirken abführend, Gips (CaSO_4) dagegen nicht [Borneff, 1991].

Die Primärtoxizität des Nitrat ist gering. Die Sekundär- und Tertiärtoxizität gehen vom Reduktionsprodukt des Nitrat, dem Nitrit, aus. Die Reduktion zu Nitrit erfolgt im Verdauungstrakt oder außerhalb des Körpers in mit Mikroorganismen kontaminierten Lebensmitteln. Der Schwellenwert des typischen Konzentrationsgiftes Nitrit ist stark altersabhängig.

Säuglinge mit fetalem Hämoglobin reagieren auf Nitrit mit Methämoglobinämie. Die erhöhte Anfälligkeit von Säuglingen ist auch darauf zurückzuführen, daß das methämoglobinreduzierende Enzym (Diaphorase) beim jungen Säugling noch nicht voll aktiv ist [Rohmann u. Sontheimer, 1985]. Wegen der mikrobiellen Reduktion des Nitrats zu Nitrit sind Säuglinge mit Infektionen des Verdauungstraktes besonders gefährdet.

Die chemische - nicht enzymatische - Reaktion zwischen Nitrit und im Körper vorhandenen Aminen führt zur Bildung von Nitrosaminen. Die Nitrosamine müssen nach den vorliegenden Tierversuchen zu den potentesten krebserzeugenden Stoffen gezählt werden [Borneff, 1991].

Wegen der unzweifelhaften Gefahr, die vom Nitrat ausgeht (Abb.I.2), war eine Limitierung dringend erforderlich. 1980 wurde vom Rat der Europäischen Gemeinschaft über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch ein Grenzwert für Nitrat im Trinkwasser von 50 mg/l festgelegt. Diese Richtlinie wurde

am 22.5.1986 in deutsches Recht überführt, womit der bis dahin gültige Grenzwert von 90 mg/l deutlich herabgesetzt wurde. Der neue Grenzwert und die häufig durchbruchartige Zunahme der Nitratkonzentration im Grundwasser stellen die Wasserversorgungsunternehmen immer häufiger vor die Aufgabe, wirksame Nitrateliminationstechniken einzusetzen [Wagner, 1989].

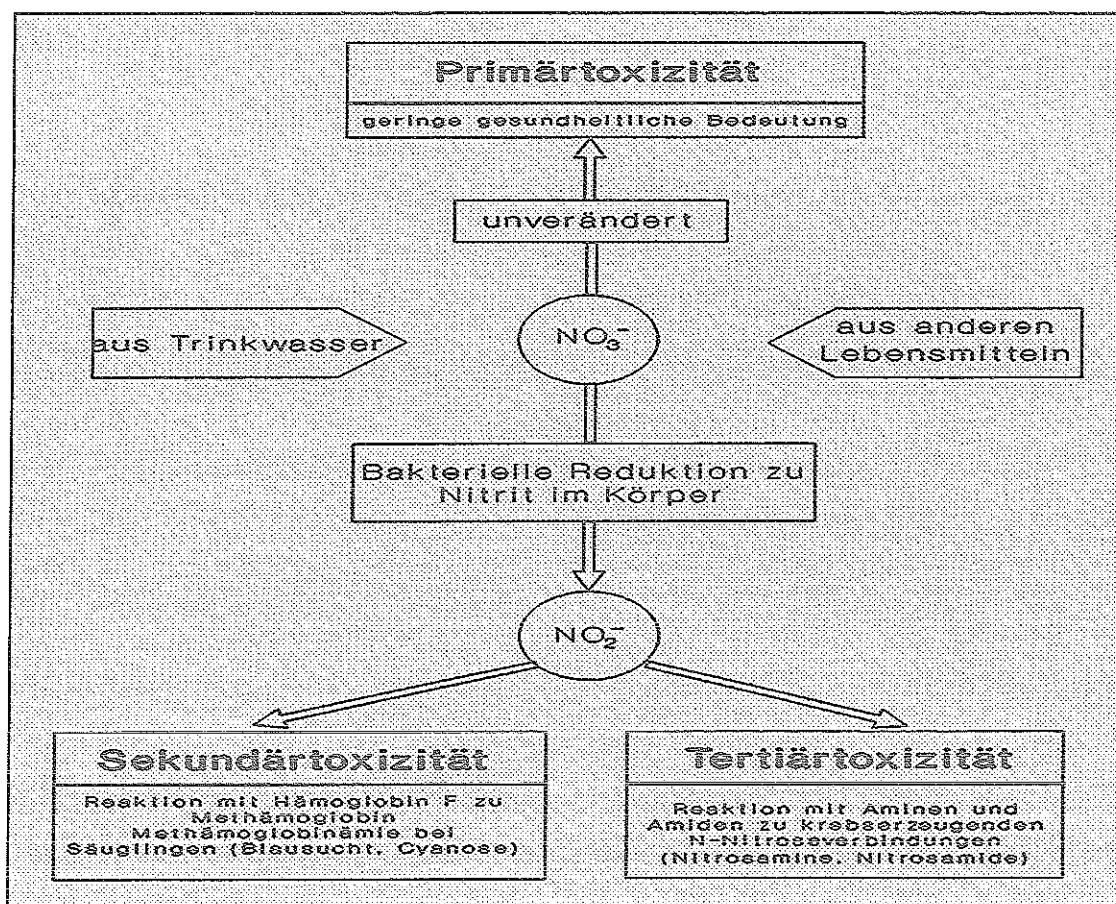


Abb.I.2 Toxizität von Nitrat [Rohmann u. Sontheimer, 1985]

1.2 Die Nitratelimination im Zuge der Trinkwasseraufbereitung

Nitrat ist die Endstufe der Stickstoffumsetzung im Boden. Nitrifizierende Bakterien überführen das beim Proteinabbau entstehende Ammoniak über Nitrit zu Nitrat. Pflanzen nehmen das Nitrat auf und bauen daraus wieder ihre Proteine auf.

In den natürlichen Kreislauf greift der Mensch mit der Stickstoffdüngung ein, denn die begrenzenden Elemente der Biomasseproduktion auf dem Land, ebenso wie in den

Ozeanen, sind Stickstoff und Phosphor [Schlegel, 1992]. Durch Humusverarmung verlieren die oberen Bodenschichten ihre Sorptionsfähigkeit für Nitrat. Die daraus resultierende Auswaschung versuchen die Landwirte mit noch mehr Kunstdünger zu kompensieren, was schließlich zu immer höheren Nitratkonzentrationen im Grundwasser führt [Borneff, 1991].

Um hier mittel- oder längerfristig Abhilfe zu schaffen, sind landwirtschaftliche Maßnahmen, wie eine angepaßte Stickstoffdüngung, unerläßlich. Zur Lösung akuter Problemfälle ist jedoch nur eine wirksame Nitratelimination einsetzbar. Schnelle Abhilfe bietet auch die Förderung nitratärmeren Wassers aus tieferen Brunnen oder der Anschluß an Fernversorgungsnetze. Jedoch muß man dabei beachten, daß die Verbesserung der Nitratwerte im so gewonnenen Trinkwasser unter Umständen nur von kurzer Dauer ist.

Für die großtechnische Entfernung von Nitrat bei der Trinkwasseraufbereitung kommen sowohl physikalisch-chemische als auch biologische Verfahren in Betracht.

1.2.1 Physikalisch-chemische Verfahren

Bei einer physikalisch-chemischen Nitratelimination werden gleichzeitig auch die Konzentrationen anderer Wasserinhaltsstoffe verändert. Kein Verfahren entfernt Nitrat selektiv. Deshalb ist es wichtig, das so aufbereitete Wasser im Hinblick auf alle Wasserinhaltsstoffe stets zu kontrollieren. Aus Gründen der Elektroneutralität des Wassers muß entferntes Nitrat durch andere Ionen ersetzt werden, oder es müssen gleichzeitig andere Kationen entfernt werden, was einer Teilentsalzung gleichkommt. Als physikalisch-chemische Verfahren, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, kommen die folgenden Verfahren in Frage:

- Teilentsalzung durch Umkehrosmose
- Teilentsalzung durch Elektrodialyse
- Teilentsalzung durch Ionenaustausch
- reiner Anionenaustausch

In Abbildung I.3 wird die Veränderung der Wasserzusammensetzung bei der

Nitratelimination durch die oben erwähnten Verfahren wiedergegeben.

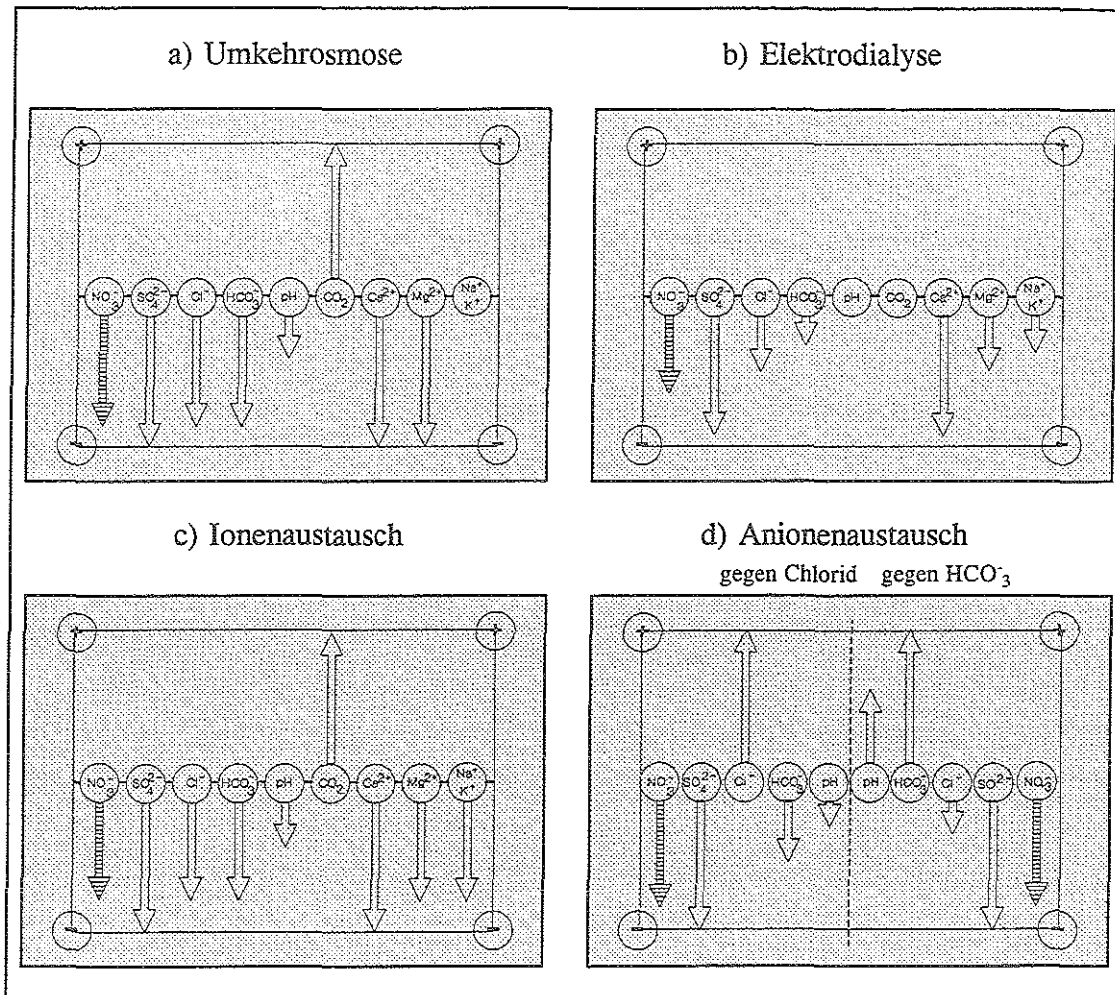


Abb.I.3 Änderung der Ionenzusammensetzung des Wassers nach physikalisch-chemischer "Nitratelimination" [a,c,d: verändert nach Rheinheimer et al., 1988; b: nach Angaben von Rautenbach u. Kopp, 1988].

Der Nachteil aller physikalisch-technischer Verfahren ist, daß sie das Nitratproblem nur vordergründig lösen. Als Abfallprodukt fällt immer hochsulfat- und nitratbelastetes Konzentrat an, so daß das Nitratproblem vom Trinkwasser auf das Abwasser verlagert wird. Als günstig ist bei diesen Verfahren sicher zu beurteilen, daß primär keine mikrobiologischen Aktionen stattfinden, die zu einem Wachstum von Mikroorganismen im aufzubereitenden Wasser führen. Eine Besiedelung der Harze oder Membranen kann jedoch im nachhinein zu einer mikrobiologischen Gefährdung führen.

1.2.2 Biologische Verfahren

Allen biologischen Verfahren ist gemeinsam, daß Bakterien eingesetzt werden, die auf speziellen Trägermaterialien Biofilme bilden und das Nitrat zu gasförmigem Stickstoff umsetzen. Die Abtrennung von überschüssiger Biomasse erfolgt in einer der Denitrifikation folgenden Nachreinigung. Grundsätzlich kann man die Verfahren danach unterscheiden, ob es sich um autotrophe oder heterotrophe Denitrifikation handelt (s. auch das folgende Kapitel).

Erste Grundlagen zur autotrophen Denitrifikation mit Wasserstoff in einem Labor-Festbett-Reaktor wurden von Bringmann und Kühn [1963] erarbeitet.

Ein Verfahren, bei dem die autotrophe Denitrifikation großtechnisch angewendet wird, ist das Denitropur-Verfahren der Firma Sulzer. Als Energiequelle für die Bakterien wird Wasserstoff eingesetzt, mit dem das zu denitrifizierende Wasser versetzt wird, bevor es in den Denitrifikationsreaktor kommt. Außerdem wird, wie bei allen biologischen Denitrifikationsverfahren, Phosphat zugesetzt, das die Bakterien für den Energiestoffwechsel und Zellaufbau benötigen. Das installierte Trägermaterial aus Polypropylen bietet eine große, gut zugängliche Oberfläche (ca. $250 \text{ m}^2/\text{m}^3$) zur Ansiedlung der Mikroorganismen. Nach Abschluß der Denitrifikation fließt das Wasser zur Sauerstoffanreicherung und Entfernung von restlichem Stickstoff und Wasserstoff über eine Gegenstrombelüftungskolonne. Eine Großanlage mit einer Kapazität von $50 \text{ m}^3/\text{h}$ wurde Anfang 1986 beim Wasserwerk Rasseln der Stadtwerke Mönchengladbach in Betrieb genommen [Rheinheimer et al., 1988; Wagner, 1989].

Dieser einzigen großtechnischen Anwendung eines autotrophen Denitrifikationsverfahrens stehen eine Reihe von Anwendungen heterotropher Verfahren gegenüber.

Beim Denipor-Verfahren der Firma Preussag werden Styroporkugeln als schwimmendes Festbett eingesetzt. Die Reaktoren werden im Aufstrom betrieben. Als Substrat wird Ethanol verwendet. Die erreichten Abbauleistungen liegen zwischen $0,5$ und $1 \text{ kg N/m}^3\text{d}$. Abfließende Mikroorganismen werden zum größten Teil in den Bioreaktoren der ersten Nachreinigungsstufe zurückgehalten und eliminieren dort nach Zugabe von Sauerstoff in einem aerob-biologischen Prozeß die Reste der dosierten Nährstoffe. Zur Feinfiltration dienen die Aktivkornkohlefilter der zweiten Nachrei-

nigungsstufe.

Seit 1987 versorgt eine Großanlage beim Wasserwerk Langenfeld-Monheim 90.000 Einwohner mit nitratarmem Trinkwasser. Der Durchsatz beträgt $300 \text{ m}^3/\text{h}$ [Rheinheimer et al., 1988; Wagner, 1989].

Beim Nitrazur-Verfahren der Firma Degremont ist das Trägermaterial ein blähtonartiges Produkt. Auch hier wird Ethanol als Substrat verwendet. Wie im Denipor-Verfahren werden die offenen Stahlbetonreaktoren im Aufwärtsstrom betrieben. Nach einer dreistufigen Belüftungskaskade wird das Wasser über Aktivkohle filtriert.

Dieses Verfahren wird in den französischen Wasserwerken Chateau Landon/Dep. Seine et Marne ($30\ldots 50 \text{ m}^3/\text{h}$) und in Champfleury ($35\ldots 70 \text{ m}^3/\text{h}$) eingesetzt [Rheinheimer et al., 1988; Wagner, 1989].

Neben diesen auch großtechnisch eingesetzten Denitrifikationsverfahren sind zahlreiche Verfahren entwickelt worden, die noch nicht über den halbtechnischen Maßstab hinausgekommen sind [Wagner, 1989] und deshalb hier in der kurzen Übersicht nicht berücksichtigt werden.

An dieser Stelle soll auf die detaillierte Beschreibung des Roto-Bio-Reaktors als weiteres Beispiel einer heterotrophen Denitrifikationsanlage hingewiesen werden (Kap.2.1), auf deren Betrieb die hier vorgelegten Untersuchungen fußen.

1.3 Die Denitrifikation - ein Schritt im natürlichen Stickstoffkreislauf

Der Kreislauf des Stickstoffs wird durch eine Reihe von mikrobiellen Prozessen bestimmt. Im Mittelpunkt des Stickstoffkreislaufs steht Ammonium, ein Abbauprodukt von Proteinen, die mit abgestorbenen Tieren oder Pflanzen in den Boden gelangen. Sauerstoff ist von entscheidender Bedeutung für das weitere Schicksal des Ammoniums, das durch Nitrifikation über Zwischenprodukte zu Nitrat oxidiert werden kann. Liegt Nitrat unter Sauerstoffabschluß in Gegenwart geeigneter reduzierter Substanzen vor, so

kommt es zur mikrobiellen Nitratreduktion und/oder zur Denitrifikation. Dabei wird Nitrat als Elektronen-Akzeptor anstelle von Sauerstoff genutzt, und N_2 oder N_2O werden freigesetzt. Das Stickstoffgas kann von anderen Mikroorganismen, die entweder frei im Boden oder in Symbiose mit Pflanzen leben, wieder fixiert werden [Schlegel, 1992]. Wie man unschwer erkennen kann, sind Bakterien die Hauptakteure im Stickstoffkreislauf der Natur.

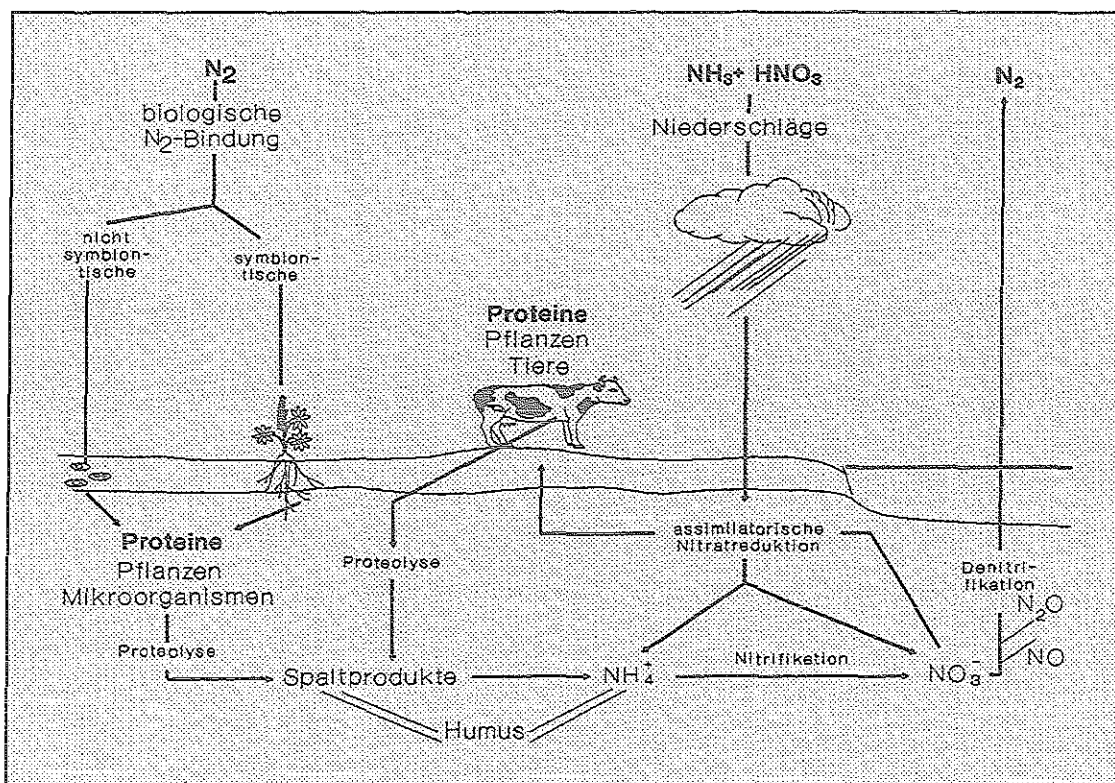


Abb. I.4 Der Stickstoffkreislauf [Schlegel, 1992]

1.3.1 Die mikrobiologischen Grundlagen der Denitrifikation

Gayon & Dupetit [1886] führten den Terminus "Denitrifikation" ein. Sie beschrieben damit die Stoffwechselleistung eines nitratreduzierenden Bakteriums, das sie *Bacterium denitrificans* nannten. Zehn Jahre später isolierten Ampola & Garino [1896] *Bacterium denitrificans agilis*. Heutzutage ist die Definition von Knowles [1982] allgemein anerkannt. Danach ist Denitrifikation die Reduktion von Nitrat oder Nitrit zu den gasförmigen Produkten, N_2O und N_2 , unter Energiegewinn.

Bei der Denitrifikation kann man im Hinblick auf die Wasserstoff- und Kohlenstoffquelle zwei Stoffwechselarten unterscheiden [Rohmann u. Sontheimer, 1985]:

- Die organotrophe Denitrifikation mit einem organischen Wasserstoff-Donator (z.B. Methanol, Ethanol, Acetat). Hierbei dient der Wasserstoff-Donator auch als Kohlenstoffquelle; es handelt sich also auch um einen heterotrophen Prozeß.

Methanol	
<u>Theoretische Stöchiometrie</u>	
$5 \text{ CH}_3\text{OH} + 6 \text{ NO}_3^-$	$\longrightarrow 5 \text{ HCO}_3^- + \text{OH}^- + 7 \text{ H}_2\text{O} + 3 \text{ N}_2$
<u>Gesamtstöchiometrie</u>	
$1,083 \text{ CH}_3\text{OH} + \text{NO}_3^-$	$\longrightarrow 0,065 \text{ C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 0,758 \text{ HCO}_3^- + 0,242 \text{ OH}^- + 1,439 \text{ H}_2\text{O} + 0,468 \text{ N}_2$
Ethanol	
<u>Theoretische Stöchiometrie</u>	
$5 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH} + 12 \text{ NO}_3^-$	$\longrightarrow 10 \text{ HCO}_3^- + 2 \text{ OH}^- + 9 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ N}_2$
<u>Gesamtstöchiometrie</u>	
$0,613 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{NO}_3^-$	$\longrightarrow 0,102 \text{ C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 0,714 \text{ HCO}_3^- + 0,286 \text{ OH}^- + 0,980 \text{ H}_2\text{O} + 0,449 \text{ N}_2$
Essigsäure	
<u>Theoretische Stöchiometrie</u>	
$5 \text{ CH}_3\text{COOH} + 8 \text{ NO}_3^-$	$\longrightarrow 8 \text{ HCO}_3^- + 2 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ N}_2$
<u>Gesamtstöchiometrie</u>	
$0,819 \text{ CH}_3\text{COOH} + \text{NO}_3^-$	$\longrightarrow 0,068 \text{ C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + \text{HCO}_3^- + 0,301 \text{ CO}_2 + 0,902 \text{ H}_2\text{O} + 0,466 \text{ N}_2$

Abb.I.5 Stöchiometrische Verhältnisse bei der heterotrophen Denitrifikation
[Rohmann u. Sontheimer, 1985]

- Die lithoautotrophe Denitrifikation erfordert H_2 oder reduzierte Schwefelverbindungen als Wasserstoff-Donator. Die Kohlenstoffquelle ist in diesem Fall CO_2 (s. Abb.I.6).

Denitrifikation mit Wasserstoff	
<u>Theoretische Stöchiometrie</u>	
$5 H_2 + 2 H^+ + 2 NO_3^- \longrightarrow N_2 + 6 H_2O$	
<u>Gesamtstöchiometrie</u>	
$3,36 H_2 + H^+ + NO_3^- + 0,38 CO_2 \longrightarrow 0,075 C_5H_7O_2N + 3,6 H_2O + 0,46 N_2$	
<u>Spezifischer Wasserstoffbedarf</u>	0,108 kg H_2 /kg NO_3^-
Denitrifikation mit Schwefel	
<u>Theoretische Stöchiometrie</u>	
$1,67 S + 2 NO_3^- + 0,67 H_2O \longrightarrow N_2 + 1,67 SO_4^{2-} + 1,34 H^+$	
<u>Gesamtstöchiometrie</u>	
$1,1 S + NO_3^- + 0,76 H_2O + 0,4 CO_2 + 0,08 NH_4^+ \longrightarrow 0,08 C_5H_7O_2N + 0,5 N_2 + 1,1 SO_4^{2-} + 1,28 H^+$	
<u>Spezifischer Schwefelbedarf</u>	0,567 kg S/kg NO_3^-

Abb.I.6 Stöchiometrische Verhältnisse bei der autotrophen Denitrifikation

[Rohmann u. Sontheimer, 1985]

Lange Zeit wurde die Denitrifikation als ein Prozeß betrachtet, der nur unter anoxischen Bedingungen abläuft. Jedoch wurden in den letzten Jahren vermehrt Beobachtungen über aerobe Denitrifikation oder Co-Respiration von Nitrat und Sauerstoff geschildert. Die Denitrifikation ist dabei energetisch ungünstiger als die Sauerstoffatmung, was jedoch nicht heißt, daß sie unmöglich ist [Robertson u. Kuenen, 1984a]. Einige Bakterienarten haben Denitrifikationssysteme, die sehr empfindlich auf Sauerstoff reagieren (z.B. *Ps. stutzeri*) [Robertson u. Kuenen, 1984a]. Weniger empfindliche Systeme scheinen bei *Paracoccus halodenitrificans* und *Bacillus licheniformis* u.a. zu existieren [Robertson u. Kuenen, 1984a]. *Thiosphaera pantotropha* ist sogar ein Beispiel für einen Organismus mit konstitutiver Enzymausstattung, was diesem Bakterium hilft, Engpässe im Reaktionsgeschehen durch Denitrifikation zu umgehen [Robertson u. Kuenen, 1984b; Ferguson, 1987].

Der gesamte Energiegewinn bei der Denitrifikation bis zum molekularen Stickstoff ist um etwa 5% niedriger als bei der aeroben Oxidation organischer Verbindungen [Ferguson, 1987].

Ein Schema der enzymkatalysierten Elektronenübertragung bei den einzelnen Reaktionsschritten der Denitrifikation ist in Abbildung I.7 wiedergegeben.

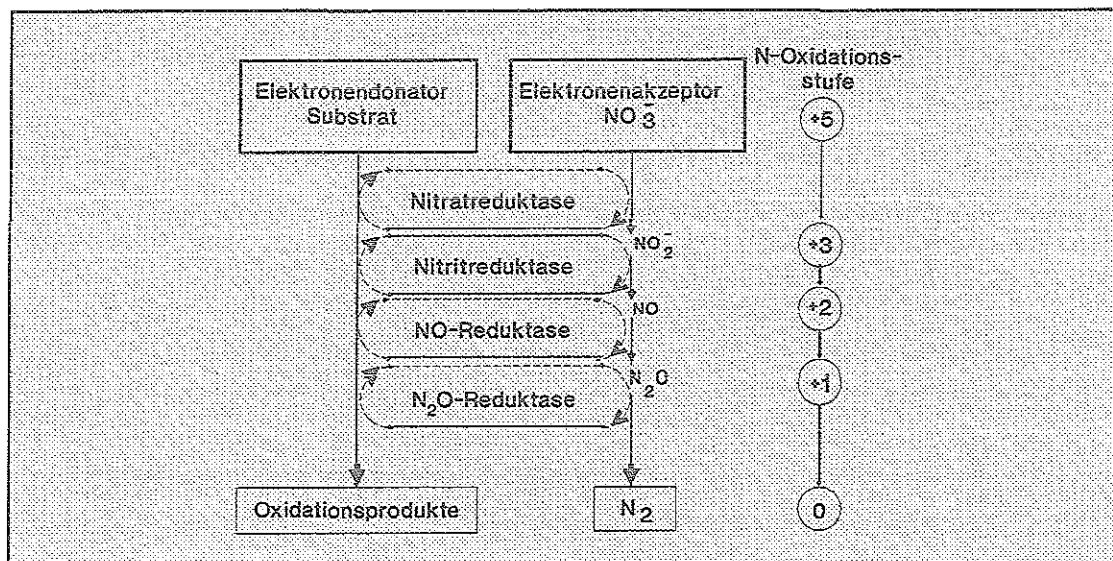


Abb.I.7 Schema der enzymkatalysierten Elektronenübertragung bei den einzelnen Reaktionsschritten der Denitrifikation [Rohmann u. Sontheimer, 1985]

Die dissimilatorische Nitratreduktase enthält Eisen, Sulfid und Molybdän. Sie ist in der inneren Membran lokalisiert und steht in Verbindung mit Cytochrom b der Atmungskette [Ferguson, 1987].

Die Nitritreduktase ist im Periplasma lokalisiert. Sie überträgt zwei Elektronen, wobei NO gebildet wird. Bisher sind zwei unterschiedliche Nitritreduktasen nachgewiesen worden: ein Hämoprotein-Cytochrom cd-Typ und ein Kupfer-Metallofluoroprotein [Ferguson, 1987].

Die Existenz einer Stickstoffmonoxid-Reduktase ist bisher nicht eindeutig geklärt [Ferguson, 1987].

Die Distickstoffoxidreduktase ist im Periplasma lokalisiert und mit Cytochrom b und c gekoppelt. N_2O kann auch bei verschiedenen Bakterien als einziger Elektronenakzeptor fungieren. Kupfer ist ein möglicher Co-Faktor des Enzyms [Ferguson, 1987].

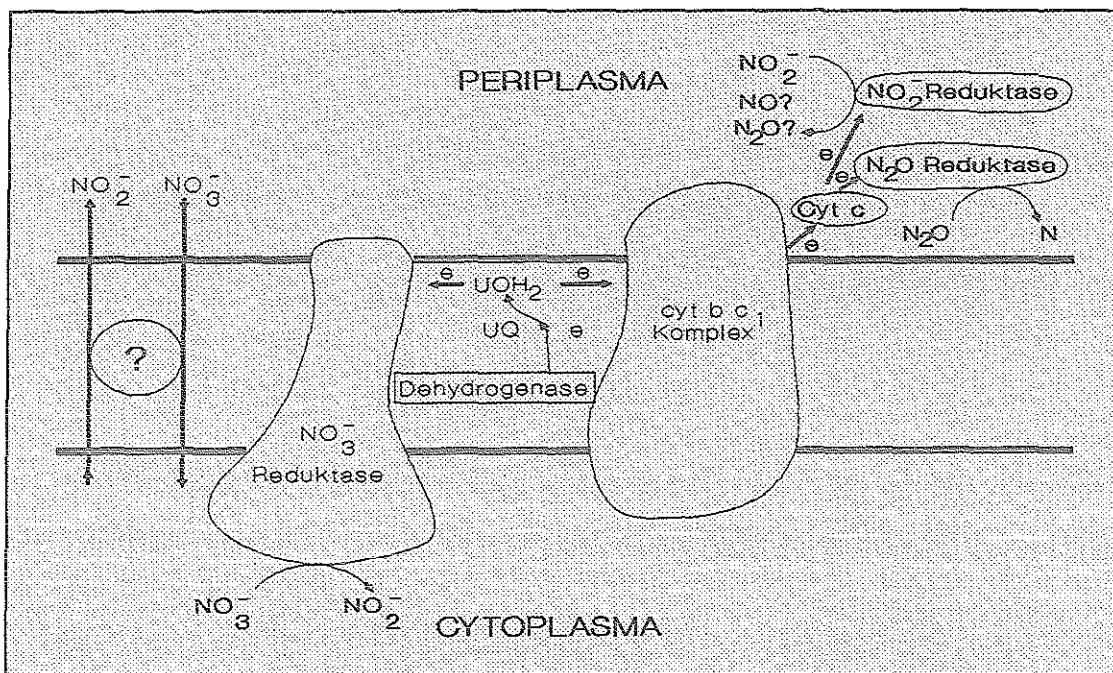


Abb.I.8 An der Denitrifikation beteiligte Enzyme am Beispiel der Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* [Ferguson, 1987]

1.3.2 Zur Taxonomie der Denitrifikanten

Fast die gesamten bekannten Denitrifikanten sind fakultative Anaerobier. Die einzige bisher bekannte Ausnahme ist das obligat anaerobe *Thiomicrospira denitrificans*, das obligat denitrifizierend ist. Die Denitrifikanten sind biochemisch und taxonomisch sehr heterogen. Die meisten sind zur heterotrophen Lebensweise fähig. Nur wenige wachsen

autotroph mit H_2O und CO_2 oder reduzierten Schwefelverbindungen.

Denitrifikation wird bei Angehörigen einiger Gruppen nicht gefunden, z.B. den Enterobacteriaceen [Jeter u. Ingraham, 1981]. Demgegenüber enthält die Gattung *Pseudomonas* die am häufigsten gefundenen und aktivsten Denitrifikanten, die aus Böden oder aquatischen Biotopen isoliert wurden [Dott, 1986].

Die weite Verbreitung der Denitrifikationsfähigkeit unter Prokaryonten wirft interessante Fragen auf. Daß sich ein solch komplexes Multienzymsystem mehrmals unabhängig in der Evolution entwickelt haben soll, scheint unwahrscheinlich. Dagegen ist eine Plasmidcodierung einiger der entsprechenden Enzyme schon eher möglich, besonders wenn man die Beobachtung berücksichtigt, daß die Denitrifikationsfähigkeit von Populationen ohne entsprechenden Selektionsdruck rasch verloren geht [Jeter u. Ingraham, 1981].

Im folgenden ist eine Liste von denitrifizierenden Prokaryonten abgedruckt.

Tab.I.2	Denitrifizierende Prokaryonten [Jeter & Ingraham, 1981]:
A.	Phototrophe Bakterien 1. Rhodospseudomonas sphaeroides
B.	Gleitende Bakterien 2. Cytophaga johnsonae 3. Lysobacter antibioticus 4. Simonsiella muelleri
C.	Knospende Bakterien 5. Hyphomicrobium spp.
D.	Spirillen 6. Aquaspirillum itersonii 7. Aquaspirillum psychrophilum 8. Aquaspirillum dispar 9. Spirillum lipoferum 10. Campylobacter sputorum
E.	Gram-negative Bakterien 11. Pseudomonas aeruginosa 12. Pseudomonas fluorescens 13. Pseudomonas chlororaphis 14. Pseudomonas aureofaciens 15. Pseudomonas stutzeri 16. Pseudomonas mendocina 17. Pseudomonas mallei 18. Pseudomonas pseudomallei 19. Pseudomonas caryophylli 20. Pseudomonas lemoignei 21. Pseudomonas solanacearum 22. Pseudomonas pickettii 23. Pseudomonas pseudoalva 24. Pseudomonas denitrificans 25. Pseudomonas perfectomarinus 26. Pseudomonas nautica 27. Gluconobacter spp. 28. Alcaligenes faecalis 29. Alcaligenes eutrophus 30. Agrobacterium tumefaciens 31. Agrobacterium radiobacter
F.	Gram-negative, fakultativ anaerobe Bakterien 32. Chromobacterium violaceum 33. Chromobacterium lividum 34. Flavobacterium spp.
G.	Gram-negative Kokken und Kokkobacilli 35. Neisseria sicca 36. Neisseria subflava 37. Neisseria flavescens 38. Neisseria mucosa 39. Neisseria animalis 40. Neisseria caviae 41. Neisseria denitrificans 42. Branhamella catarrhalis 43. Acinetobacter spp. 44. Kingella denitrificans

Tab.I.2 (-Fortsetzung-)	
H.	45. <i>Paracoccus denitrificans</i> 46. <i>Paracoccus halodenitrificans</i> Gram-negative, chemolithotrophe Schwefelbakterien 47. <i>Thiobacillus denitrificans</i> 48. <i>Thiomicrospira denitrificans</i> 49. <i>Thermothrix thioparus</i>
I.	Gram-positive, sporenbildende Bakterien 50. <i>Bacillus licheniformis</i> 51. <i>Bacillus cereus</i> 52. <i>Bacillus polymyxa</i> 53. <i>Bacillus macerans</i> 54. <i>Bacillus stearothermophilus</i> 55. <i>Bacillus laterosporus</i> 56. <i>Bacillus pasteurii</i> 57. <i>Bacillus panthothenticus</i> 58. <i>Bacillus pulvifaciens</i> 59. <i>Bacillus nitritollens</i> 60. <i>Bacillus azotoformans</i>
J.	Gram-positive nicht sporenbildende Bakterien 61. <i>Corynebacterium nephridii</i> 62. <i>Propionibacterium acidipropionici</i>
K.	Andere 63. <i>Halobacterium</i> sp.

Aus den bisher dargelegten Tatsachen ist ersichtlich, daß die ständige mikrobiologische Kontrolle einer Denitrifikationsanlage aus hygienischen und verfahrenstechnischen Gründen erforderlich ist. Hier stößt man jedoch direkt zu Beginn, nämlich bei der Quantifizierung der Bakterien und beim Anlegen von Reinkulturen, auf Schwierigkeiten. Die Bakterien bilden in Denitrifikationsreaktoren Aggregate und Biofilme. Die Auflösung eines solchen Verbandes ohne Schädigung der Bakterien ist immer mit Problemen verbunden. Im folgenden soll deshalb auf einige grundsätzliche Aspekte der Biofilmbildung eingegangen werden.

1.4 Mikrobielle Aggregate und Biofilme

1.4.1 Aggregate und Mikrokolonien

Das Wachstum in einer Mikrokolonie, die von einer Schleimhülle umgeben ist, bietet Bakterien vielfältigen Schutz gegen Chemikalien, Detergenzien, Antikörper und Phagozytose. Von diesen Mikrokolonien werden Schwärmer ausgeschiedt, die an anderen günstigen Standorten neue Mikrokolonien bilden.

Untersuchungen in den letzten Jahren mit verbesserten Methoden erlauben den Schluß, daß in natürlichen Ökosystemen alle Bakterien von einer Glycocalyx umgeben sind.

Dagegen sind in vitro Reinkulturen nicht dem gleichen Selektionsdruck ausgesetzt, da sie gewöhnlich keine antibakteriellen Faktoren im Medium enthalten. Deshalb können in solchen Kulturen die schnellwachsenden Schwärmer ohne Glycocalyx rasch die Oberhand gewinnen [Savage, 1977]. Doch auch in Laborreinkulturen kann die Bildung einer Glycocalyx gefördert werden, indem man dem Medium oberflächenaktive Substanzen [Govan, 1975] und/oder Antibiotika [Govan u. Fyfe, 1978] zusetzt.

Die Tatsache, daß die Glycocalyx-Bildung unter bestimmten Bedingungen verloren gehen kann, weist auf chromosomale Mutationen oder den Verlust eines Plasmids hin. Sowohl die chromosomale Kontrolle als auch die Kontrolle durch Plasmide konnte bei der Adhäsion von *Agrobacterium tumefaciens* an Pflanzen nachgewiesen werden [Whatley, 1978; Matthysse, 1978]. Die Möglichkeit der Kontrolle von adhäsiven Eigenschaften durch Plasmide mit einem weiten Wirtsspektrum kann von außergewöhnlicher Wichtigkeit für mikrobielle Gemeinschaften sein. Detaillierte genetische Studien fehlen jedoch bis jetzt.

1.4.2 Biofilme auf Festkörpern

Natürliche Biofilme bestehen in der Regel aus schichtförmig aggregierten Mikrokolonien verschiedener Arten und abiotischen Materialien, die in extrazelluläre polymere Substanz (EPS) eingebettet sind und eine physiologische Kooperation fördern. Substrattransfer ist die Regel.

Reversible Adhäsion an Festkörper

Bakterien besitzen eine Oberfläche, die bei pH-Werten, wie sie natürlicherweise vorkommen, insgesamt negativ geladen ist. Die Ladungen sind jedoch nicht gleichmäßig über die Oberfläche verteilt. Die unregelmäßige Verteilung von hydrophoben Stellen auf einem Bakterium führt häufig zu einer bevorzugten Anheftungsorientierung an ein Substrat.

Für den Transport der Mikroorganismen an ein Substrat spielen die folgenden Mechanismen eine Rolle: Sedimentation, Chemotaxis, Aerotaxis, Thermotaxis,

Geotaxis, Phototaxis, Brown'sche Molekularbewegung und die Hydrophobie der Zelloberfläche.

Die meisten in der Natur vorkommenden Substrate besitzen ebenso wie die Bakterien eine negativ geladene Oberfläche. Befindet sich ein Bakterium nun in der Nähe eines möglichen Substrats, erfolgt zunächst die reversible Adhäsion. Aus dem wäßrigen Medium werden Gegenionen angezogen, die eine Doppellage um den betreffenden Festkörper bilden. Ob sich nun Festkörper und Bakterium anziehen oder abstoßen, ist alleine eine Frage der Dicke dieses Kationenmantels. Im Falle einer Adhäsion bleibt das Bakterium jedoch immer in einer gewissen Distanz zum Trägermaterial. Während der Phase der reversiblen Adhäsion ist das Bakterium noch zur Brown'schen Molekularbewegung fähig [Marshall et al., 1971]. Dies führt dazu, daß viele Bakterien, als Resultat der inhomogenen Verteilung von hydrophoben Stellen auf der Bakterienoberfläche eine polare Orientierung einnehmen [Marshall u. Cruickshank, 1973].

Sind keine zu großen Scherkräfte vorhanden, befindet sich das Bakterium nunmehr in der idealen Position um die irreversible Adhäsion einzuleiten. Bei motilen Bakterien spielen auch die Geißeln eine Rolle. Nach einem Modell von Belas und Colwell [1982], das für *Vibrio* entwickelt wurde, überbrücken die lateralen Geißeln den Zustand der reversiblen und der irreversiblen Bindung.

Irreversible Adhäsion an Festkörper

Die irreversible Bindung zeichnet sich nach Marshall et al. [1971] dadurch aus, daß keine Brown'sche Molekularbewegung mehr möglich ist. Das Hinzufügen von Chloramphenicol zu einer Seewasserprobe verhindert das Anheften von fast allen Bakterien an Glasoberflächen [Marshall u. Cruickshank, 1973]. Das läßt den Schluß zu, daß durch Inhibierung der Proteinsynthese Enzyme, die für die Bildung von Exopolysacchariden verantwortlich sind, nicht vorhanden sind. Bakterien, die trotz Chloramphenicols noch an Oberflächen haften, müssen demnach konstituelle Enzyme für die Exopolymerproduktion besitzen.

Der Besitz von Exopolysacchariden ist nicht notwendigerweise mit Adhäsion gleichzusetzen. Z.B. fanden Brown et al. [1977] bei Mischkulturen, die sich in einer kohlenstofflimitierten Kultur befanden, starke Adhäsion, obwohl keine Exopolymerproduktion nachgewiesen wurde. Dagegen war in einer stickstofflimitierten Kultur eine

Exopolymerproduktion zu verzeichnen, jedoch nur geringe Adhäsion. Eine exzessive Polymerproduktion dispergiert die Bakterien im Medium und verhindert eine effektive Anheftung an das Substrat.

Es kann angenommen werden, daß Bakterien bestimmte Polymere bilden, die speziell für die Anheftung an einen Festkörper dienen, und daß sie daneben andere Exopolymere bilden, die in einer der irreversiblen Adhäsion folgenden Phase für andere Aufgaben gebraucht werden [Fletcher und Floodgate, 1973].

Während der Entstehung eines Biofilms dominieren bestimmte Bakterienspecies zu verschiedenen Zeiten. Die Dominanz einer Art ist nur kurzfristig, da Stoffwechselprodukte anfallen, die von anderen Arten abgebaut werden oder beispielsweise da Übergänge von aerob zu anaerob entstehen und aus vielen anderen Gründen mehr.

1.4.3. Die Aktivität von Bakterien auf Oberflächen

Weil es sich bei den mikrobiellen Exopolysacchariden um Polyanionen handelt, funktionieren diese als Ionen-Austauscher. Dies verursacht eine bedeutend höhere Nährstoff- und Ionenkonzentration innerhalb des Biofilms als im umgebenden Medium. Da die tiefer liegenden Schichten des Biofilms von der Oberfläche versorgt werden, sind Bakterien, die näher an der Oberfläche des Biofilms liegen, besser versorgt mit Ionen, die nur in geringer Konzentration im Medium vorkommen. Bakterien im "Gewebe" Biofilm unterscheiden sich in wichtigen Punkten (Wachstumsraten, Morphologie und Raten von lebenswichtigen Prozessen) von ihren nichtsessilen Artgenossen.

Seit langem ist bekannt, daß durch Zugabe von Feststoffen zu Bakteriensuspensionen die Aktivität der Bakterien erhöht werden kann. Besonders sind in diesem Zusammenhang die grundlegenden Arbeiten von ZoBell in den 40-er Jahren hervorzuheben [ZoBell u. Grant, 1943].

Bei der Beschreibung der Aktivitäten muß man bedenken, daß es Wechselwirkungen zwischen der Bakterienart, dem zu verwertenden Substrat und der Aufwuchsfläche gibt, die je nachdem die Aktivität verschieden beeinflussen. Z.B. wird der Abbau eines höhermolekularen Substrats, das durch Exoenzyme zerlegt wird, besser in einem Biofilm vonstatten gehen.

Obwohl die meisten Untersuchungen eine Aktivitätssteigerung durch Adsorption an Oberflächen nachweisen konnten, ist auch in einigen Fällen das Gegenteil beschrieben worden [Gordon et al., 1983].

Ist das Substratangebot in einem Biofilm niedrig, so teilen die Zellen sich weiter, ohne an Biomasse zu gewinnen. Das führt zur Bildung von "Zwergformen". Zwergformen haben im Vergleich zu ihren größeren Artgenossen eine relativ größere Oberfläche, wodurch die Nährstoffaufnahme gefördert wird. Daneben erhöht sich die Hydrophobie durch Verkleinerung der Zellen. Dadurch wird die Adsorption an einen Festkörper gefördert. Normalisiert sich das Nahrungsangebot wieder, kehren die Zellen zu ihrer ursprünglichen Größe zurück.

In aquatischen Lebensräumen, in denen kein Nährstoffmangel herrscht, sind die Bakterien des Biofilms nicht zwergwüchsig, sondern größer als die frei suspendierten Bakterien. Die Gründe dafür liegen wieder in der erhöhten Verfügbarkeit von Substrat im Biofilm.

Kommen Substrate nur in geringer Konzentration im Medium vor, kann durch Adsorption der Substrate an Makromoleküle des Biofilms ihre Verfügbarkeit für Bakterien im Biofilm größer sein, als für im Medium suspendierte Zellen. Dieser Unterschied ist bei hohen Substratkonzentrationen zu vernachlässigen. Man muß jedoch noch zwischen nieder- und hochmolekularen Substraten unterscheiden. Zwischen niedermolekularen Stoffen und den Makromolekülen des Biofilms stellt sich ein Adsorptionsgleichgewicht ein. Dagegen haben Makromoleküle eine große Zahl von möglichen Bindungsstellen, und obwohl sich für jede einzelne Stelle ebenfalls ein Adsorptionsgleichgewicht einstellt, gibt es zu jeder Zeit Stellen am Molekül, die am Biofilm gebunden sind. Im Gegensatz zu den niedermolekularen Substraten sind die hochmolekularen Substrate also permanent gebunden. Exoenzyme, die diese hochmolekularen Substrate angreifen, können in ihrer Wirkung behindert werden, wenn die Angriffsstelle des Enzyms am Substrat durch die Bindung an den Festkörper blockiert wird. Andererseits kann durch die Adsorption die Konfiguration des Makromoleküls verändert werden, so daß es von dem Enzym nicht mehr als Substrat akzeptiert wird.

Auch die physikalisch-chemischen Bedingungen werden durch Adsorption an Festkörper verändert. Durch Adsorption von oxidierenden oder reduzierenden Stoffen wird das Redoxpotential und der Sauerstoffpartialdruck innerhalb eines Biofilms beträchtlich verändert.

1.4.4 Zusammensetzung der Exopolymere

Die meisten Untersuchungen bezüglich der extrazellulären Polysaccharide wurden bisher an Organismen gemacht, die entweder eine industrielle Bedeutung haben (*Xanthomonas*) oder von medizinischem Interesse sind (*Klebsiella*, *Escherichia coli* u.s.w.).

Ein Beispiel dafür ist das Polysaccharid von *Xanthomonas campestris*, das Xanthan. Es hat, ebenso wie das Dextran, große industrielle Bedeutung erlangt. Zusammengesetzt ist es aus sich wiederholenden Pentasaccharideinheiten, die in verschiedenem Maße mit Pyruvat substituiert sind [Kenne u. Lindberg, 1983].

Verschiedene Stämme von *Ps. aeruginosa* und *Azotobacter vinelandii* produzieren Alginate. Wie bei den Braunalgen wird zuerst ein Polymer aus β -1-4-verknüpften β -D-mannopyranosyluronsäure-Resten gebildet, von denen dann einige epimerisiert werden [Kenne u. Lindberg, 1983].

Auch im Belebtschlamm der Kläranlagen bilden die Mikroorganismen Polymere als Stoffwechselendprodukte. Diese Polymere enthalten als Bestandteile Zucker, Aminosucker, Uronsäuren und Aminosäuren, was auf ihren Charakter als Heteropolysaccharide schließen läßt. Genau wie für *Ps. putida* und *Ps. fluorescens* beschrieben [Read u. Costerton, 1987], werden diese Polymere sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Phase gebildet. Sie sind biologisch extrem schwer abzubauen [Hejzlar u. Chudoba, 1986].

1.4.5 Zeitpunkt der Exopolymerbildung

Zellen von *Pseudomonas putida* und *Ps. fluorescens* sind von einer fibrösen Glycocalyx umgeben, die, wie bereits beschrieben, bei der Anheftung an Substrate eine wichtige Rolle spielt. Die Verbindung zwischen einzelnen Ketten dieser Polymere geschieht unter anderem über Komplexbildung von polyvalenten Ionen und funktionellen Gruppen des Moleküls. In Batch-Versuchen mit *Ps. putida* und *Ps. fluorescens* konnte gezeigt werden, daß diese Exopolysaccharide während aller Phasen des Wachstums einer Kultur gebildet werden. Andere Stämme von *Pseudomonas* bilden die Exopolysaccharide nur in der stationären Phase [Read u. Costerton, 1987]. In diesen Fällen erinnert der

Zeitraum der Synthese an die Bildung sekundärer Metabolite durch industriell wichtige Mikroorganismen. Im Gegensatz zu stickstofflimitierten Kulturen wird unter kohlenstofflimitierten Bedingungen die Produktion der Polysaccharide sofort gestoppt [Read u. Costerton, 1987].

Anders als bei vielen anderen Bakterien sind bei *Ps. putida* und *Ps. fluorescens* die Polysaccharide weniger an die Zellen selbst gebunden, sondern vielmehr frei gelöst im wäßrigen Medium. Trotzdem nimmt die Konzentration an Exopolysacchariden im Überstand einer solchen Kultur bei Kohlenstoffmangel nicht ab, was die Tatsache nochmals unterstreicht, daß diese Moleküle eine Funktion als Strukturmolekül haben und keine Kohlenstoffquelle darstellen [Read u. Costerton, 1987].

1.5 Siderophore bei Bakterien

1.5.1 Mikroorganismen und Eisen

Eisen ist ein essentielles Element, ohne das weder Pro- noch Eukaryonten leben könnten.

Die sehr wahrscheinlich einzige Ausnahme sind die Milchsäurebakterien, die in Molkereiprodukten leben [Subcommittee on Iron, 1978]. Molkereiprodukte enthalten nur wenig frei verfügbares Eisen. Milchsäurebakterien besitzen keine Cytochrome oder Hydroperoxidasen. Die normalerweise vorkommende eisenhaltige Ribotidreduktase wird durch ein funktionell äquivalentes Vitamin B12-System ersetzt. Selbst die DNA-Synthese läuft ohne eisenhaltige Enzyme ab [Subcommittee on Iron, 1978].

Die Eisenassimilation kann auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen erfolgen: Dem "low-affinity"-Weg und dem "high-affinity"-Weg. Die Mechanismen der Eisenaufnahme über den "low-affinity"-Weg sind noch relativ unbekannt, da bis heute keine Methode der Untersuchung existiert. Dagegen ist das "high-affinity"-Aufnahmesystem, das die Bildung von bestimmten Eisenkomplexbildnern und entsprechenden Rezeptormolekülen beinhaltet, gut untersucht. Dieses System existiert nicht bei obligaten Anaerobiern [Subcommittee on Iron, 1978].

Unter den aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien bewirkt Eisenmangel, daß der gesamte Stoffwechsel einen mehr anaeroben Charakter annimmt. Die Glycolyse läuft ohne eisenhaltige Enzyme ab. Eisen spielt erst im Tricarbonsäurezyklus eine Rolle.

Eisenhaltige Enzyme sind dabei die Aconitase und die Succinatdehydrogenase. Deshalb hat ein fakultativ anaerobes Bakterium einen höheren Eisenbedarf, wenn es mit Succinat anstelle von Glukose wächst. Die Produktion vieler pharmazeutischer Produkte geschieht durch Mikroorganismen bei niedrigen Eisenkonzentrationen. Zitronensäure (*Aspergillus niger*) und Riboflavin (*Erremothecium ashbyii*) sind Beispiele dafür. Eisen unterdrückt die Bildung einer Vielzahl bakterieller Toxine. Ein Beispiel dafür ist die Unterdrückung der Bildung von *Corynebacterium diphtheriae*-Toxin [Murphy et al., 1974].

Tab.I.3 Eisenhaltige Enzyme und Proteine in Mikroorganismen
[Subcommittee on Iron, 1978]

Substanz	Quelle
sauerstoffbindende Proteine	
hämoglobin-ähnliche Proteine	begrenzte Verbreitung
Leghämoglobin	Rhizobia
Eisenspeicherung	
Ferritin	<i>Phycomyces blakesleeana</i>
Phosphoproteine	unbekannt
Hydroperoxidasen	
Katalase	weit verbreitet bei Aerobiern
Peroxidase	begrenzte Verbreitung
Superoxiddismutase ^a	weit verbreitet bei Aerobiern
Elektronentransport-Proteine	
Hämaproteine	
Cytochrome	weit verbreitet
Nicht-Hämaproteine	
Eisen-Schwefel-Proteine	weit verbreitet
Nitrogenase	Stickstoff-Fixierer
Glutamat-Synthase	<i>Escherichia coli</i>
Eisen-Flavo-Proteine	
Dihydroorotat - Dehydrogenase	<i>Zymobacterium oroticum</i>
Bernsteinsäure - Dehydrogenase	weit verbreitet
Nitratreduktase	<i>Micrococcus denitrificans</i>
Xanthinoxidase	<i>Micrococcus lactilyticus</i>
NADH ^b - Dehydrogenase	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Malat - Vitamin K - Reduktase	<i>Mycobacterium phlei</i>
Adenylsulfat - Reduktase	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
NADPH ^c - Sulfat - Reduktase	Enterobacteriaceen
Format - Dehydrogenase	<i>Pseudomonas oxalaticus</i>
Oxygenasen	
Hämartige	
Tryptophan - Deoxygenase	weit verbreitet
Nichthämartige	
Diverse	weit verbreitet
durch Eisen aktivierte Enzyme	
Aconitase	abhängig vom Tricarbonsäure-Zyklus
L(+)-Tartrat - Dehydrase	<i>Pseudomonas spec.</i>
Nichtklassifizierte Eisenenzyme	
Enzyme, die auf Amine, Aminosäuren und andere Substrate wirken	weit verbreitet
Phosphodiesterase	abhängig vom cAMP

a Zink, Kupfer und Mangan wurden ebenso wie Eisen in Superoxiddismutasen aus verschiedenen Organismen nachgewiesen

b Nicotinamid Adenin Dinucleotid, reduziert

c Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat, reduziert

1.5.2 Chemie des Eisens

Eisen ist nach Sauerstoff, Silicium und Aluminium das vierthäufigste Element in der Erdkruste. In den meisten Erzen und Böden liegt Eisen als Kristall des zweiwertigen

oder dreiwertigen Ions vor. In wäßrigen Lösungen kommt Eisen als Eisen(II), Eisen(III) oder als anorganischer und organischer Komplex dieser Ionen vor [Subcommittee on Iron, 1978].

Das chemische Verhalten des Eisens hängt ab von seinen vier Hauptcharakteristika:

- Eisen reagiert als gutes Oxidations- und Reduktionsmittel.
- Eisen bildet anorganische und organische Komplexe, die seine Löslichkeit bestimmen.
- Oberflächen von hydratisiertem Eisen(III)-oxid absorbieren andere Moleküle und wirken häufig als Katalysatoren.
- Eisen ist für biologische Prozesse essentiell und in fast allen lebenden Systemen zu finden.

In gut durchlüfteten Böden kommt Eisen meist als oxidiertes Mineral, dem Eisenhydroxid, vor. Die Löslichkeit von Eisenhydroxid ist sehr begrenzt, die Konzentration an Fe^{3+} -Ionen beträgt nur 10^{-18} mol/l. Die Aufnahme des Eisen(III) durch Organismen setzt die Ausscheidung von Säuren oder die Bildung von Siderophoren voraus. Nur in Böden, die zeitweise überschwemmt werden oder/und hohe Substratkonzentrationen aufweisen, tritt die zweiwertige Form des Eisens auf. Große Mengen des Eisens in Böden sind in Tonmineralien gespeichert, wo sie als isomorphe Ionen teilweise Magnesium(II) oder Aluminium(III) in ihren Kristallgittern ersetzen [Subcommittee on Iron, 1978].

Im Gegensatz zu Böden kommt in Sedimenten meist das zweiwertige Eisen vor, da die Sedimente mehr oder weniger wassergesättigt und damit anoxisch sind. Eisen(II)-Komponenten bilden sich normalerweise dort, wo durch die Oxidation von organischem Material reduzierende Bedingungen auftreten.

Die Eigenschaften des Eisens in wäßriger Lösung werden am besten in einem Eh-pH-Diagramm deutlich. Eh ist das Redoxpotential in Volt, berechnet für Gleichgewichtsbedingungen nach der Nernst'schen Gleichung. Steigende positive Werte für Eh bedeuten eine höhere Oxidationsbereitschaft. Das folgende Diagramm gilt für ein wäßriges System mit Eisenionen, Schwefel (10^{-4} M) und CO_2 (10^{-3} M) bei 25°C und 1 bar [Subcommittee on Iron, 1979].

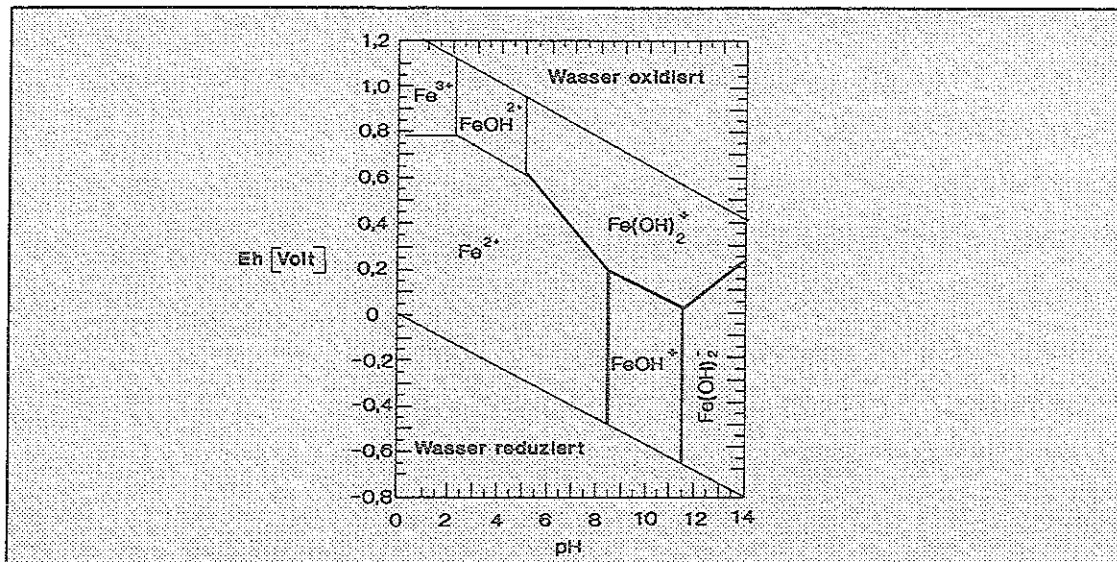


Abb.I.9 Bereiche der Eisen(II) - bzw. Eisen(III) - Dominanz bei 25°C und 1 bar [Subcommittee on Iron, 1979].

Die wichtigsten Verbindungen des Eisens sind die in wässriger Lösung blaßgrün gefärbten Eisen(II)-Salze, sowie die in kristallwasserhaltigem Zustand verschieden gefärbten Eisen(III)-Salze, die in Lösung unter Bildung des farblosen Hexaaquaeisen(III)-Ions dissoziieren. Die gelbe Farbe von Eisen(III)-Salzlösungen rührt von Hydrolyseprodukten oder Komplexsalzen her. Wenig beständig und für die Analyse unwichtig sind die violettroten, vom sechswertigen Eisen abgeleiteten Ferrate. Bei pH-Werten unter 5 ist Eisen(II) relativ stabil, jedoch findet bei pH-Werten über 5 eine chemische Autoxidation zu Eisen(III) statt. Eisen(II)-hydroxid ist ein außerordentlich starkes Reduktionsmittel.

Eisen spielt im Wettbewerb zwischen Lebewesen vielfach eine große Rolle. Den Kampf gewinnt der Partner, der einen Chelatbildner mit hoher Bindungsstärke für Eisen produziert (=Siderophor), da die Löslichkeit unter oxidischen Verhältnissen bei neutralen oder alkalischen pH-Werten und verbunden damit die Verfügbarkeit von Eisen für Organismen sehr beschränkt ist.

1.5.3 Biogene Transformationen des Eisens

Durch die Einwirkung von Bakterien ist auch in sauren Medien eine Oxidation des Eisen(II) möglich. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Gram-negative bewegliche Stäbchen *Thiobacillus ferrooxidans* (vormals *Ferrobacillus ferrooxidans* und

F. sulfoxidans), das durch die Oxidation des Eisen(II) sowohl Energie als auch Reduktionsäquivalente gewinnt [Paul u. Clark, 1988].

Bevor Eisen(II) mikrobiologisch oxidiert wird, wird ein Chelat mit organischen Ausscheidungen des Bakteriums gebildet, um die biologische Verfügbarkeit zu erhöhen. Bei der Oxidation werden die Elektronen über eine Elektronentransportkette mit Cytochrom c als Startpunkt dieser Kette transportiert. Gleichzeitig, so wird angenommen, passieren Protonen die Zellmembran, woraus zusätzliche Energie gewonnen wird [Paul u. Clark, 1988].

In Brunnen oder Eisenleitungen trifft man immer wieder auf filamentöse, scheidenbildende Bakterien, wie z.B. *Leptotrix* oder *Crenotrix*. Diese Scheiden werden von Eisenhydroxid inkrustiert. *Crenotrix* wächst in Gewässern mit geringem Eisen(II)-Gehalt und einer niedrigen Sauerstoffkonzentration. Unter diesen Bedingungen akkumuliert es Fe(III)hydroxid [Paul u. Clark, 1988].

In der Natur führten Oxidations-Reduktionsprozesse zur Bildung von Mineralen, wie Geolit und Pyrit. In Gegenwart von Sulfat und sulfatreduzierenden Bakterien, reagierte das reduzierte Eisen mit H_2S zum Mineral Hydrotrilit, welches in geologischen Zeiten dann zur Bildung des Pyrits (FeS_2) beigetragen hat. Da der Sulfat-Gehalt des Meerwassers sehr hoch ist, hält dieser Prozeß den Eisengehalt der Ozeane auf einem niedrigen Niveau [Paul u. Clark, 1988].

Genau wie die Oxidation des Eisens kann auch die Reduktion auf vielfältigem Weg vonstatten gehen. Eisen(III) kann als Elektronenakzeptor in der Atmungskette genutzt werden. Es kann auch durch die Reaktion mit mikrobiellen Endprodukten, wie Formiat oder Schwefelwasserstoff, reduziert werden. Zu den Eisen(III)-Reduzierern gehören Pilze (*Alternaria*, *Fusarium* u.a.) und Bakterien (*Bacillus* u.a.). Das Enzym Nitratreduktase ist wahrscheinlich in diese Prozesse involviert, wobei denitrifizierende Verhältnisse ein Redoxpotential einstellen, das hoch genug ist, um die Eisenreduktion zu inhibieren [Paul u. Clark, 1988]. Diese Tatsache ist vor allem für Denitrifikationsreaktoren von Bedeutung.

1.5.4 Die Chemie der Siderophore

Siderophore sind niedermolekulare Substanzen (500...1000 Dalton), die in allen aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten, in denen sie gesucht wurden, außer wie bereits erwähnt in Milchsäurebakterien.

Man unterscheidet dem Aufbau nach zwei verschiedene Siderophor-Typen: Die Hydroxamate und die Catechole. Die Siderophore von *E. coli* und fast allen Enterobacteriaceen gehören zur Catechol-Gruppe. Der Prototyp dieser Siderophor-Klasse ist das Enterobactin.

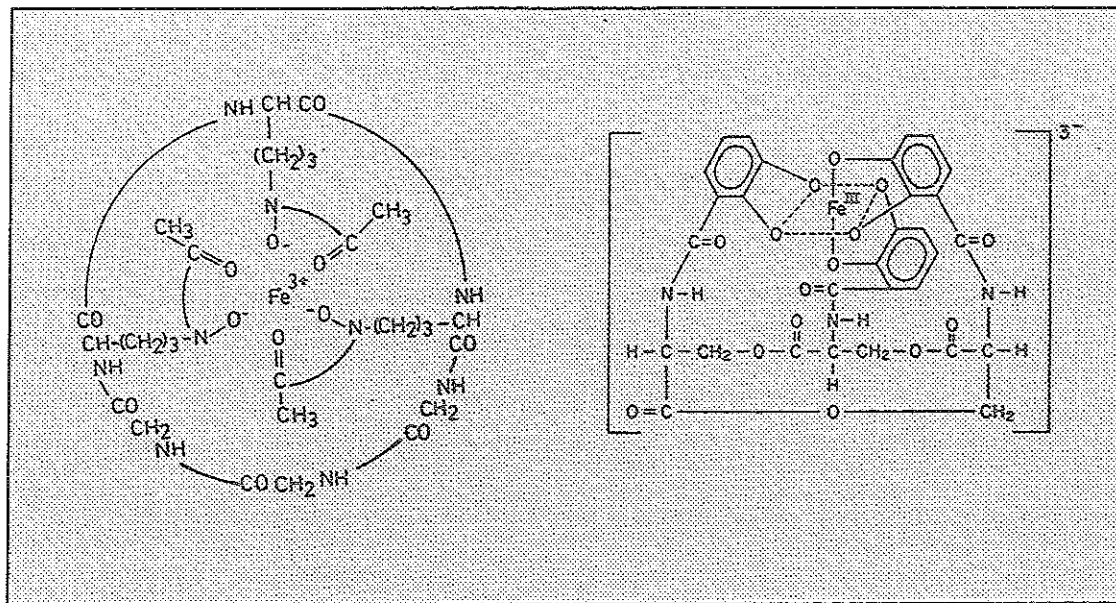


Abb.I.10 Struktur von Ferrichrom und von Enterobactin [Keller-Schierlein et al., 1964; Pollack u. Neilands, 1970]

Die Hydroxamate sind weit verbreitet unter Pilzen, werden aber auch von Bakterien synthetisiert. Der Prototyp dieser Klasse von Siderophoren ist Ferrichrom. Die Siderophore der Pseudomonaden gehören zu den Hydroxamaten.

Hydroxamatsiderophore sind Moleküle mit drei Hydroxamatgruppen pro Molekül, wodurch eine Sexadentat-metall-chelatierende Stelle geschaffen wird, die eine besonders hohe Affinität für Eisen(III) hat. Die meisten Eisen-Siderophor-Chelate sind sehr stabil und haben ein Adsorptionsmaximum bei 420 bis 440 nm. Dies ist der Grund dafür, daß viele Siderophore als Eisenchelat isoliert werden.

An das Chromophor ist kovalent eine Peptidkette von 6 bis 10 Aminosäuren gebunden. Die meist hydrophile Peptide enthaltende Kette enthält neben den üblichen Aminosäuren auch einige ungewöhnliche, wie z.B. β -Hydroxyasparaginsäure und N-Hydroxyornithin [Murphy, 1974].

Hydroxamat-Siderophore können an der orangen bis braunroten Färbung des Fe(III)-Trihydroxamat-Komplexes erkannt werden.

Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, daß die Aktivität der Siderophore als

Antibiotika sich hauptsächlich auf Gram-positive Bakterien erstreckt. Desferri-ferrioxamin B inhibiert die Mobilität von *E. coli* und verwandelt den stimulierenden Effekt von cAMP in das Gegenteil. Das N-Methansulfonylderivat (Desferal) wird bei Eisenvergiftungen und Eisenstoffwechselkrankheiten (Haemochromatosis, Haemosiderosis) eingesetzt [Weinstein u. Wagman, 1978].

1.5.5 Siderophore bei Pseudomonaden - Biologische Eigenschaften

Pyoverdin

Pyoverdine waren die ersten Siderophore, die bei Pseudomonaden entdeckt wurden. Diese gelbgrünen, fluoreszierenden, wasserlöslichen Farbstoffe werden unter bestimmten Bedingungen von einer Reihe von Pseudomonaden gebildet, die alle zur selben innerartlichen genetischen Homologiegruppe gehören [Meyer u. Abdallah, 1978]. Pyoverdine bilden mit Eisen(III) einen 1:1-Komplex.

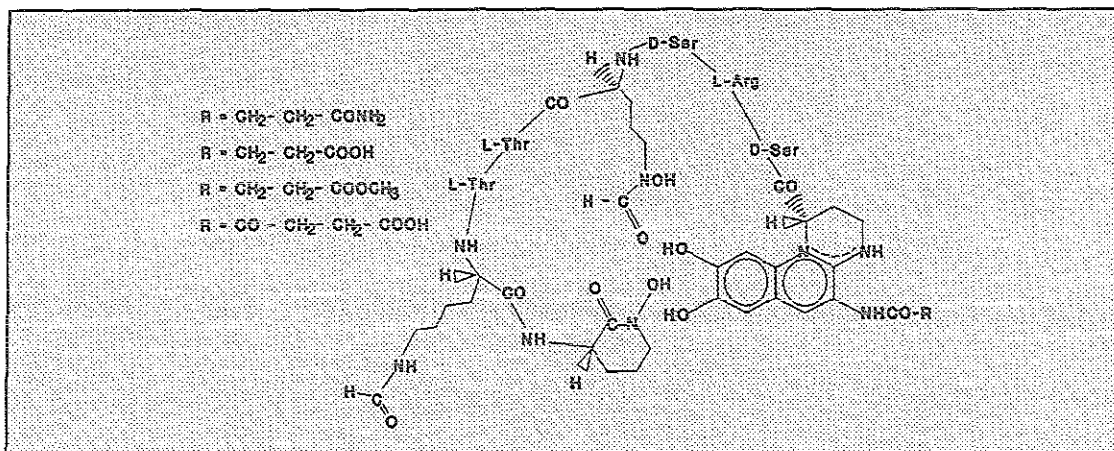


Abb.I.11 Pyoverdin von *Ps. aeruginosa* [Buyer, 1990]

Beziehung zwischen Eisen und Pyoverdin

Das Wachstum von Pseudomonaden in Medium ohne zusätzlichem Eisen wird durch die Bildung von Pyoverdin oder anderen Siderophoren begleitet. Mit Erreichen der stationären Phase wird die Pyoverdinproduktion eingestellt. Die Zugabe von Eisen zum Medium ermöglicht die Erhöhung der Zellausbeute, verursacht aber gleichermaßen den Stop der Pyoverdinproduktion. Ein früher in der Literatur beschriebenes Phänomen, das der "chromogenen" bzw. "antichromogenen" Substrate [Gouda u. Chodat, 1963;

Meyer u. Abdallah, 1978], kann durch Eisenverunreinigungen erklärt werden. Eisen in seiner dreiwertigen Form ist der einzige Faktor, der die Siderophorproduktion bestimmt, wobei allerdings ein substratabhängiges spezifisches Eisenbedürfnis nachgewiesen konnte [Meyer u. Abdallah, 1978]. Vergleichende Studien mit verschiedenen *Pseudomonas*-Arten zeigten, daß die Grenze, ab der Eisen inhibitorisch auf die Siderophorbildung wirkt, zwischen 0,1 und 2 mg/l liegt.

Pyoverdin ist ein starker Eisen(III)-Chelator ($K_f=10^{32}$), hat jedoch keine meßbare Affinität für Eisen(II). Der Eisen-Pyoverdin-Komplex ist nicht fluoreszierend und braunrot. Der Transport von Eisen durch die Membran bei *Ps. fluorescens* ist aktiv, d.h. es wird Energie verbraucht. Die Eisenaufnahme ist stark temperaturabhängig [Meyer u. Hornsperger, 1978].

Die Siderophore der einzelnen *Pseudomonas*arten unterscheiden sich im Hinblick auf ihre Peptidseitenketten, die nicht an der Chelatbildung beteiligt sind. In Eisenmangelzellen konnte bei vier verschiedenen *Pseudomonas*arten jeweils mindestens ein äußeres Membranprotein nachgewiesen werden, das in Bakterien, die mit ausreichendem Eisen versorgt waren, nicht vorhanden war. Für diese Proteine nimmt man eine Siderophor-Rezeptor-Funktion an [Cornelis et al., 1989; Meyer et al., 1990]. Es besteht eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Spezifität der *Pseudomonas*arten für die jeweiligen Ferripyoverdine [Hohnadel u. Meyer, 1988].

Tab.I.4	Aminosäure-Bestandteile von verschiedenen Siderophoren [Buyer, 1990]
Pseudomonade	Aminosäuresequenz ^a
Ps. putida B10	Chr-L-Lys-D-threo-β-OH-Asp-L-Ala-D-allo-Thr-L-Ala-D-cyclo-N-OH-Orn
Ps. fluorescens-putida 7SR1	Chr-cyclo-(Ser-Ser-threo-β-OH-Asp-Thr-Ser-N-OH,N-Ac-Orn-L-Ala-Gly)
Ps. fluorescens-putida A214	Chr-Ser-Ala-Gly-Ser-Ala-threo-β-OH-Asp-L-allo-Thr-N-OH,N-Ac-Orn
Ps. aeruginosa ATCC 15692 ^b	Chr-D-Ser-L-Arg-D-Ser-L-N-OHOrn-L-Thr-L-Thr-L-Lys-L-cyclo-N-OH-Orn
Ps. aeruginosa ATCC 15692 ^b	Chr-D-Ser-L-Arg-D-Ser-L-N-OHOrn-cyclo-(L-Lys-L-Thr-L-Thr-L-N-OHOrn)
Ps. chlororaphis ATCC 9446	Chr-Ser-Lys-Gly-N-OHOrn-Ser-Lys-cyclo-N-OH-Orn
Ps. fluorescens ATCC 13525	Chr-Ser-Lys-Gly-N-OHOrn-Ser-Lys-cyclo-N-OH-Orn
Ps. fluorescens ATCC 17400	Chr-Ala-Lys-Gly-Gly-L-threo-β-OH-Asp-Gln-Ser-Ala-L-cyclo-N-OH-Orn
Ps. putida ATCC 12633	Chr-Asp-Lys-D-threo-β-OH-Asp-Ser-Thr-Ala-Glu-Ser-L-cyclo-N-OH-Orn
a Chr = Chromophor; Ac = Acetyl; N-OHOrn, N-OH, N-acyl (Formyl oder Acetyl) - Ornithin	
b zwei verschiedene Strukturen werden für dieses Siderophor vorgeschlagen	

Beispiele für andere Siderophore bei Pseudomonaden

Pyochelin

Neben Pyoverdin bilden *Ps. aeruginosa* PAO und *Ps. cepacia* noch ein anderes Siderophor, das Pyochelin, das strukturell keine Beziehung zum Pyoverdin hat [Winkelmann et al., 1987]. Pyochelin ist weniger effektiv in der Fe(III)-Komplexierung als Pyoverdin.

Nocardamin

Unter Eisenmangel bildet *Ps. stutzeri* eine farblose Komponente, das Nocardamin (= Desferri-ferrioxamin E). Nocardamin ist auch als sekundärer Metabolit der Actinomyceten bekannt. Die Synthese von Nocardamin wird durch Eisen unterbunden [Winkelmann et al., 1987]. Das Norcardamin, das aufgrund seines antibiotischen Wirkens entdeckt wurde, ist spezifisch wirksam gegen Mycobakterien. Die antibiotische Wirkung des Norcardamin ist hauptsächlich eine bakteriostatische Wirkung [Weinstein u. Wagman, 1978].

Cepabactin (BN 227)

Ps. cepacia bildet ein Antibiotikum, das Cepabactin. Cepabactin bildet einen 3:1-Komplex mit Fe(III). Die Wirksamkeit als Antibiotikum steht in engem Zusammenhang mit der Eisenkomplexierung. Cepabactin wird auch von *Ps. alcaligenes* gebildet, wobei hier jedoch noch genauere Untersuchungen fehlen [Winkelmann et al., 1987].

2 Material und Methoden

2.1 Der Roto-Bio-Reaktor zur Denitrifikation von Trinkwasser

Im Institut für Biotechnologie III des Forschungszentrums Jülich wurde unter maßgeblicher Beteiligung von H. Overath, N. Salhani und C.J. Soeder ein Reaktor entwickelt, der vor allem zur Denitrifikation von Trinkwasser in kleineren Wasserwerken oder zur Denitrifikation von Abwässern aus der physikalisch-chemischen Nitratelimination geeignet ist [Overath et al., 1989].

Der Prozeßgestaltung liegt die Überlegung zugrunde, den Denitrifikationsvorgang nicht, wie bei Festbettreaktoren notwendig, durch einen Rückspülvorgang zu unterbrechen. Diese Rückspülung, die Verstopfungserscheinungen durch nachwachsende Bakterienbiomasse und entstehendes Gas verhindern oder wieder aufheben soll, wird beim Roto-Bio-Reaktor (RBR) überflüssig, da eine langsame ständige Rotation (1 U/15 min bei den halbtechnischen Anlagen) des Reaktors das Festbett bewegt und so überschüssige Biomasse kontinuierlich ausgetragen wird.

Der Reaktor selbst ist ein waagrecht oder schräg gelagertes Drehrohr, das stirnseitig mit Deckelplatten verschlossen ist. Das Festbett nimmt 90 bis 95% des Reaktorvolumens ein. Bisher wurden verschiedene Materialien als Füllkörper getestet, z.B. Lavagranulat, Sinter-Glas und Blähton. Unter Einbeziehung sämtlicher Beurteilungskriterien (Anwuchsverhalten, Abbauleistung, spezifisches Gewicht, Geometrie, Verschleiß und Abrieb) sind Blähton-Kugeln sowie keramische Füllkörper mit porösem Außenbereich am besten geeignet für das RBR-Verfahren (Reich-Walber, 1990). Aus wirtschaftlichen Gründen hat man sich bei den halbtechnischen Anlagen für den Einsatz von Blähton-Kugeln entschieden.

Im Scheitel des Reaktors verbleibt ein Gasraum, in dem sich die bei der Denitrifikation entstehenden Gase ansammeln können. Sie werden über eine vom Wasserstrom getrennte Leitung gesondert abgeführt. Das zu denitrifizierende Wasser wird vor dem Eintritt in den Reaktor mit einer Kohlenstoff-Quelle und Phosphat versetzt. Es gelangt über eine Hohlachse in den Reaktor, wo besonders konstruierte Einbauten

Kurzschlußströmungen verhindern. Diese Einbauten unterteilen den Reaktor in drei aufeinanderfolgende Kammern, die durch Öffnungen in den Einbauten miteinander verbunden sind. Erst unmittelbar vor Eintritt in den Reaktor wird als Substrat Ethanol zugemischt. Der im Wasser vorhandene Sauerstoff wird im ersten Abschnitt des Reaktors rasch verbraucht, so daß fast im gesamten Reaktor anoxische Verhältnisse herrschen, die die Denitrifikation ermöglichen.

Wie bei anderen Verfahren auch, wird auf Grund mikrobiologischer Überlegungen zur Förderung einer denitrifizierenden Flora im Reaktor Ethanol als Kohlenstoff-Quelle und Elektronen-Donator verwendet. Bei der Verwendung von Kohlenhydraten oder komplexeren Substraten könnten sich zum Teil auch andere Mikroorganismen unter den gegebenen Voraussetzungen halten und den Ablauf der Denitrifikation stören [Blaszcyk et al., 1980].

Das denitrifizierte Wasser verläßt mit der überschüssigen Biomasse den Reaktor nach einer Verweilzeit von 0,1 bis 0,5 Stunden auf der der Eintrittsstelle gegenüberliegenden Seite. In einer Belüftungsstufe wird das Wasser wieder mit Sauerstoff gesättigt.

Danach fließt das Wasser in einen Reaktionsbehälter, wo Flockungsmittel zugesetzt werden. Die Flocken werden in einer Flotationsstufe abgetrennt. Das zu 90-95 % von der Biomasse befreite Wasser wird über eine Mehrschichtfiltration oder einen Langsamsandfilter geleitet, um Bakterien soweit zu eliminieren, daß die für Trinkwasser zulässigen Werte erreicht werden.

Zwei halbtechnische Anlagen zur Denitrifikation von Trinkwasser wurden bisher getestet, eine davon befand sich in Königschaffhausen und die andere in Wyhl am Kaiserstuhl. Neben der Einsatzmöglichkeit bei der Trinkwasseraufbereitung wird in letzter Zeit auch zunehmend die Problematik der Denitrifikation von Salzkonzentraten aus physikalisch-chemischen Anlagen zur Denitrifikation im RBR bearbeitet.

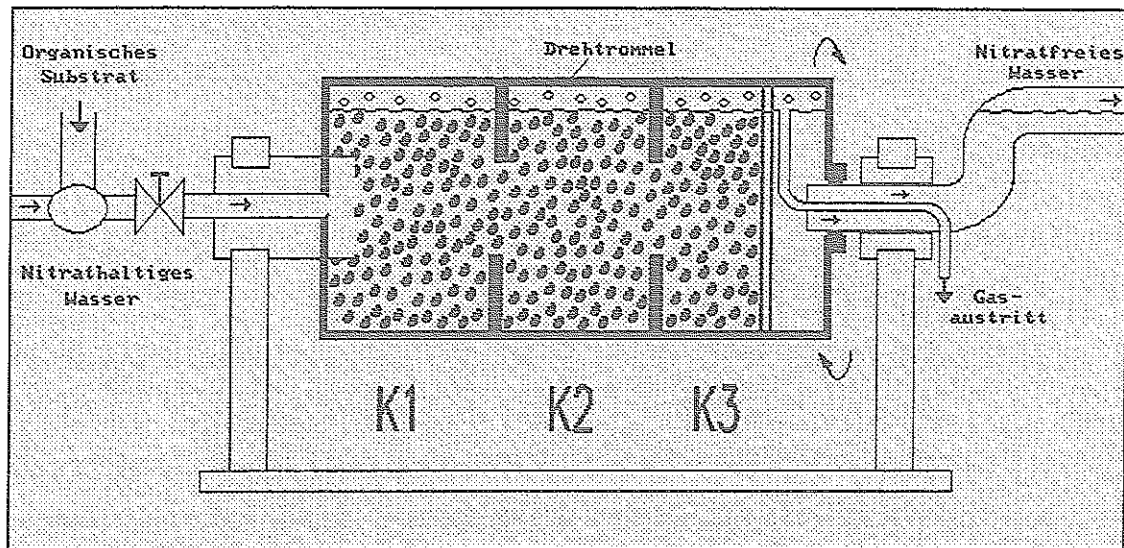


Abb.II.1 Schematische Darstellung des Roto-Bio-Reaktors (K1 = 1. Kammer, K2 = mittlere Kammer, K3 = 3. Kammer)

2.1.1 Reaktoren mit undefinierten Bakterienmischpopulationen

Aus den beiden halbertechnischen Anlagen in Königschaffhausen und Wyhl stammten die Proben, an denen die Bakterienanalysen durchgeführt wurden. Weitere Proben, insbesondere für die Homogenisierungsexperimente, wurden von Labormodellen genommen.

2.1.2 Der sterilisierbare Roto-Bio-Reaktor

- Axenische Kulturen im RBR

Die Anlage bestand aus einem Roto-Bio-Reaktor, der aus V2A-Edelstahl gefertigt war. Das Volumen betrug 17,95 Liter und wurde zu 90 % von Blähtonkugeln (Durchmesser 5 mm) ausgefüllt. Der Reaktor war in drei Kammern unterteilt, die mit jeweils einem Septum zur Probenahme und einem Magnetventil zur Entgasung versehen waren. Die Drehzahl des RBR betrug ca. 9 U/h, und das Flüssigkeitsvolumen war auf 6,5 l eingestellt.

Außerdem war der RBR mit den üblichen Meßgeräten ausgestattet.

Zum Autoklavieren wurde der Reaktor mit 16 Litern Blähton und 5 l Nährmedium nach Meyer & Abdallah (s. 2.2.1) ohne Eisenzusatz gefüllt.

Zur Überprüfung der Sterilität wurde an jedem Septum ein Glasröhrchen mit Schraubverschluß in den Reaktor gehängt. In zwei dieser Röhrchen befand sich Indikatorpapier, das sich bei Erreichen der entsprechenden Temperatur verfärbt. In dem dritten Röhrchen wurden 2 ml suspendierte Pseudomonaden gegeben, die nach dem Autoklavieren auf Nähragar ausplattiert wurden. Außerdem wurde die Sterilität des Reaktors an Blähtonkugeln überprüft.

Zum Animpfen wurde eine Vorkultur der gewünschten Bakterienart in 1 l Meyer & Abdallah-Medium ohne Eisenzusatz angesetzt. Die Inkubation erfolgte aerob für 5 Tage. Mit dieser Vorkultur wurde der Reaktor angeimpft.

Nach dem Animpfen konnte man den Versuch in drei Teilbereiche untergliedern:

- I. Etablierung eines Biofilms
- II. kontinuierlicher Betrieb unter Teillast
- III. kontinuierlicher Betrieb unter Vollast

I. Etablierung eines Biofilms

Zur Biofilmetablierung wurde der RBR bis zum vollständigen Verbrauch von Nitrat und Nitrit unter Batch-Bedingungen gehalten und mit 9 U/h gedreht. Die Probenahme erfolgte täglich unter der Cleanbench. Dabei wurden 5 ml Flüssigkeit zur genauen DOC- und Nitrat/Nitrit-Bestimmung entnommen. Ferner wurde täglich die Keimzahl der Flüssigkeit bestimmt. Alle zwei Tage wurden Bakterienanalysen der Blähtonkugeln durchgeführt.

II. Kontinuierlicher Betrieb des RBR unter Teillast

Nach dem vollständigen Verbrauch von Nitrat und Nitrit wurde der RBR auf kontinuierlichen Betrieb umgestellt. Der Durchsatz an zu denitrifizierendem Wasser betrug 9 l/h, entsprechend einer Aufenthaltszeit von 45 Minuten, mit

einem durchschnittlichen Nitratgehalt von 65 ppm. Die Ethanoldosierung erfolgte in einem Verhältnis von:

$$\text{Ethanol [mg/l]} : \text{Nitrat [mg/l]} = 0,45.$$

Die Untersuchungen waren im wesentlichen die gleichen wie unter I. beschrieben. Die Probenahme erfolgte nun aber nicht mehr unter der Cleanbench, außerdem wurden noch Proben vom Zu- und Auslauf gezogen.

III. Kontinuierlicher Betrieb unter Vollast

Im Vollastbetrieb flossen ca. 20 Liter des zu denitrifizierenden Wassers durch die Anlage, was einer Aufenthaltszeit von ca. 20 Minuten entspricht. Die Untersuchungen entsprechen denen von Punkt II.

2.2 Kulturmedien

2.2.1 Medien zur Anzucht von heterotrophen Bakterien

Casein-Pepton-Stärke-Agar (CPS) [Collins, 1963]

Casein	0,5 g/l
Proteose-Pepton	0,5 g/l
Stärke	0,5 g/l
Glycerin	1,0 ml
K ₂ HPO ₄	0,2 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 g/l
4 Tr. einer 0,01 %-igen FeCl ₃ x 6 H ₂ O-Lösung	
pH 7,4	

Nährbouillon (NB) (Merck 5443)

Fleischextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
pH 7,2	

Nähragar (NA) (Merck 5450)

Fleischextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
Agar	12,0 g/l
pH 7,2	

Dieser Agar wurde, wenn nicht anders beschrieben, wie alle anderen Nährböden oder Bouillons mit Reinstwasser aus einer Anlage der Firma Millipore (Milli Q) angesetzt. Zur Steigerung der Ausbeute an koloniebildenden Einheiten wurde aber auch Nähragar mit Reaktorauslauf anstelle des Aqua bidest. angesetzt. Der Reaktorauslauf war zuvor bei 8000 g abzentrifugiert worden.

Nährbouillon und Nähragar sind Medien, die sich für die Anzucht weniger anspruchsvoller Mikroorganismen aus aquatischen Biotopen eignen [Merck, 1990]. Nährbouillon wurde außerdem in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt, um auch solche Bakterien zu erfassen, die durch höhere Nährstoffangebote in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Reasoner 2 Agar (R2A) [Reasoner u. Geldreich, 1985]

Hefeextrakt	0,5 g/l
Proteose-Pepton	0,5 g/l
Casamino Säuren	0,5 g/l
D-Glukose	0,5 g/l
Stärke	0,5 g/l
Pyruvat	0,3 g/l
K ₂ HPO ₄	0,3 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 g/l
Agar	15,0 g/l
pH 7,2	

Nach Zufügen aller Bestandteile mit Ausnahme des Agars wurde der pH-Wert mit K_2HPO_4 eingestellt.

Dieses Medium eignet sich laut Reasoner besonders zur Anzucht oligocarbophiler Bakterien [Reasoner u. Geldreich, 1985], obwohl die darin enthaltenen Nährstoffe sicher den Schluß zulassen, daß es sich nicht um ein oligotrophes Medium entsprechend der Definition von Kuznetsov et al. [1979] handelt.

Pepton-Medium [Litchfield et al., 1975]

Proteose-Pepton	1,0 g/l
Hefeextrakt	1,0 g/l
Glycerin	5,0 ml
Na-glycerophosphat	0,5 g/l
pH 7,4	

Pepton-Agar [Wolters u. Schwarz, 1956]

Pepton aus Fleisch	1,0 g/l
D-Glukose	0,1 g/l
$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	0,1 g/l
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	0,02 g/l
Agar	13,0 g/l
pH 7,4	

Der P-Agar wurde mit Leitungswasser angesetzt.

2.2.2 Medien zum Nachweis der Denitrifikation

Nitratnährbouillon (NNB) [Focht und Joseph, 1973]

Fleischextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
KNO_3	5,0 g/l
pH 7,2	

Dieses Medium wurde sowohl unverdünnt als auch in zehnfacher Verdünnung eingesetzt.

Medium nach Tomlinson & Hochstein [1972]

vitaminfreie Casamino-säuren	5,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	2,0 g/l
KNO ₃	5,0 g/l
pH 7,2	

Giltay's Medium [Bollag et al., 1970]

A: L-Asparagin	1,0 g/l
KNO ₃	1,0 g/l
B: tri-Natriumcitrat-2-hydrat	8,5 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g/l
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,05 g/l

Die Lösungen A und B wurden getrennt angesetzt, gemischt, und der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Als pH-Indikator wurde 0,5 ml/l 1%-ige Bromthymolblaulösung in Ethanol zugegeben.

Standard-I-Bouillon [Schmider u. Ottow, 1981]

Pepton	2,0 g/l
Hefeextrakt	2,8 g/l
NaCl	5,6 g/l
KNO ₃	6,0 g/l
pH 7,2	

Dieses Medium diente der Erfassung von Sporen von *Bacillus spec.*. Das inokulierte Medium wurde dazu bei 80°C 10 Minuten pasteurisiert, um vegetative Zellen abzutöten.

Mineralmedium nach Fabig und Ottow [1979]

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	11,2	g/l
KH_2PO_4	0,8	g/l
KNO_3	6,0	g/l
NH_4Cl	1,0	g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2	g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,001	g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,001	g/l
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,001	g/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,001	g/l
Eisen(II)-citrat	0,002	g/l
Na(DL)-lactat	2,0	g/l
pH 7,2		

2.2.3 Medien zum Nachweis der Siderophorbildung**Meyer & Abdallah-Medium [1978]**

K_2HPO_4	6,0	g/l
KH_2PO_4	3,0	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0	g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2	g/l
Bernsteinsäure	4,0	g/l

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Dem Standard-Medium wurde kein Eisen zugesetzt. Für bestimmte Versuche wurde Eisen jedoch in Form von FeCl_3 (0...2000 mg/l FeCl_3) zugegeben. Für Denitrifikationsversuche wurde diesem Medium 1 g/l KNO_3 zugesetzt.

Die Produktion fluoreszierender Pigmente kann photometrisch quantifiziert werden. Dazu wurden die Bakterien aus dem Medium abzentrifugiert und die Extinktion des Überstands bei 405 nm gemessen [Meyer u. Abdallah, 1978].

Cetrimid-Agar (Merck 5284)

[Lowbury u. Collins, 1955]

Pepton aus Gelatine	20,0 g/l
MgCl ₂	1,4 g/l
K ₂ SO ₄	10,0 g/l
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid	0,3 g/l
Agar	13,0 g/l
Glycerin	10,0 ml/l

2.3 Chemisch-Physikalische Messungen

2.3.1 Redoxpotential

Das Redoxpotential wurde in den Abläufen der Roto-Bio-Reaktoren kontinuierlich mit einer Platin-Einstabmeßkette Pt61 (pH-Meter CG 817 T) gemessen. Die Redoxspannungen wurden auf die Standardwasserstoffelektrode bezogen. Die gemessene Redoxspannung (U) wird zu der temperaturabhängigen Standardspannung der Bezugselektrode (U_{Bez}) addiert. Man erhält die tatsächliche Redoxspannung (U_{H}):

$$U_{\text{H}} = U + U_{\text{Bez}}$$

2.3.2 pH-Wert

Die pH-Messung im Zu- und Ablauf erfolgte kontinuierlich über eine pH-Elektrode mit einem pH-Meßverstärker.

2.3.3 Bestimmung der Nitrat-und Nitrit-Konzentration

Eine schnelle Überprüfung, ob in einem Medium noch Nitrat oder Nitrit vorhanden war, erfolgte mit Merckoquant-Teststäbchen 10200.

Eine genaue Analyse der Nitrat- und Nitritkonzentrationen wurde mittels Ionenaustauscher-Chromatographie durchgeführt.

Die Messungen erfolgten mit der HPLC-Anlage der Fa. DIONEX (Typ 2000i). Es lassen sich die Anionen Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} und SO_4^{2-} mit einem Leitfähigkeitsdetektor und NO_2^- und NO_3^- zusätzlich mit einem UV-Detektor bestimmen.

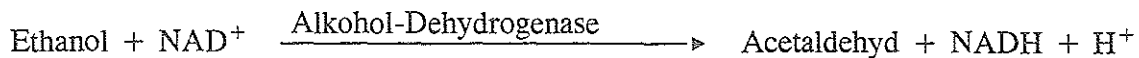
Die Trennung erfolgte über eine Anionenaustauscher-Säule, wobei Carbonatpuffer als Eluent diente. Aufgrund der verschieden starken ionischen Bindung traten die Anionen nach unterschiedlich langen Retentionszeiten aus der Trennsäule aus und konnten spezifisch in den nachfolgenden Detektoren bestimmt werden. Da die Retentionszeiten für Nitrit und Chlorid nahe beieinander liegen, wurde Nitrit über die UV-Detektion bei 205 nm mit einem Spektrometer (Fa. KNAUER) detektiert. Die Auswertung der Leitfähigkeitsmessung erfolgte über Integration der Peakflächen, während bei der UV-Detektion die Peakhöhe entscheidend war.

Vorsäule:	AG4a
Anionenaustauschersäule:	HPLC-AS4a
mobile Phase = Carbonatpuffer:	0,75 mM NaHCO_3 2,00 mM Na_2CO_3
Flußrate:	1,5 ml/min
Probenvolumen:	10 μl

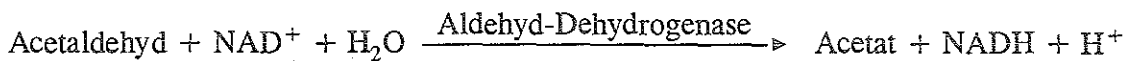
Zur Eichung diente eine Lösung mit 50 mg/l NO_3^- und 5 mg/l NO_2^- .

2.3.4 Ethanol-Test

Ethanol wurde enzymatisch nachgewiesen (BOEHRINGER MANNHEIM). Dabei wurde das Ethanol reduziert:



Durch ein alkalisches Milieu und dem Abfangen des gebildeten Acetaldehyds wurde das Gleichgewicht auf die rechte Seite verschoben:



Die gebildete Menge NADH war Meßgröße und wurde photometrisch aufgrund der Absorption bei 340 nm bestimmt. Mit der Extinktionsdifferenz ΔE von Leerwert und Probe ließ sich die Ethanolkonzentration nach der Formel:

$$C_{\text{EtOH}} = \frac{0,7256}{6,3} \Delta E \text{ [g/l]}$$

berechnen.

2.3.5 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs

Die Bestimmung der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs erfolgte mit dem Dohrmann Carbon Analyzer DC80 der Fa. Xertex. In einem photochemischen Oxidationsverfahren werden die im Wasser gelösten organischen Verbindungen in einem mit Sauerstoff begasten UV-Reaktor zu CO_2 oxidiert, das mittels Infrarot-Detektion quantifiziert wird.

Filtrierte Proben wurden mit konzentrierter H_2SO_4 angesäuert (pH 2...3). Durch das Ansäuern wurde das im Wasser vorliegende $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Verhältnis zugunsten des CO_2 verschoben. Mit synthetischer Luft wurde das CO_2 ausgegast. Das Einspritzen der Proben erfolgte manuell mit einer gasdichten Spritze (Unimetrix).

Als Katalysator für die photochemische Oxidation diente Kaliumperoxidisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Zur Eichung wurde Kaliumhydrogenphthalat ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) verwendet.

Die Messung erfolgte im Konzentrationsbereich von 0...160 mg C/l. Die Konzentration des verwendeten Standards lag bei 10 mg C/l. Der lineare Meßbereich lag zwischen 5 und 100 mg C/l.

2.4 Homogenisierungsmethoden

2.4.1 Mechanische Methoden

Die optimale Homogenisierungsmethode mußte im Rahmen dieser Arbeit noch gefunden werden. Deshalb wurden eine Vielzahl mechanischer Methoden auf ihre Eignung zur Zerstörung von Aggregaten in der flüssigen Phase getestet.

Hierbei kam unter anderem auch der Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Typ TP 18/10) zum Einsatz, der nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeitet. Aufgrund der hohen Drehzahl des Rotors wird das zu verarbeitende Medium selbständig axial in den Dispergierkopf gesaugt und anschließend radial durch die Schlitze der Rotor-Stator-Anordnung gepreßt. Durch die großen Beschleunigungskräfte wird das Material von sehr starken Scher- und Schubkräften beansprucht. Im Scherspalt zwischen Rotor und Stator tritt zusätzlich eine große Turbulenz auf, die zu einer optimalen Durchmischung der Suspension führt. Maßgebend für den Dispergierwirkungsgrad ist das Produkt aus Schergradient und der Verweilzeit der Partikel im Scherfeld. Beim Ultra Turrax wird im Scherspalt zwischen Rotor und Stator etwa 1000-mal mehr Energie als beim Bearbeiten mit Rührwerken in das Medium eingebracht. Dispergierzeiten von wenigen Minuten sind meist ausreichend. Längere Bearbeitungszeiten verbessern das erreichbare Ergebnis nur unwesentlich, sie erhöhen aber die Temperatur des Mediums durch die eingebrachte Scherenergie.

Für alle folgenden Homogenisierungen galt: 50 ml Probenvolumen (d.h. Auslauf) in 200 ml Kolben.

- 30 Minuten (300 UpM) schütteln nach Zusatz von 0,1 Vol.-% Lubrol W
- 30 Minuten schütteln (300 UpM) mit 0,18 Gew.-% Natriumpyrophosphat (NPP)
- Ultraschall (Braun Labsonic, Typ 1510) 50 W, unter Zusatz von 0,18 Gew.-% NPP: 30, 60, 90, 120 und 180 Sekunden
- Ultraschall (Braun Labsonic, Typ 1510) 100 W, unter Zusatz von 0,18 Gew.-% NPP: 30, 60, 90, 120 und 180 Sekunden

- Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Typ TP 18/10), unter Zusatz von 0,18 Gew.-% NPP: 30, 60, 120 und 180 Sekunden

Bei der folgenden Methode war das Probenvolumen gegenüber den vorherigen Methoden auf 10 ml reduziert, wobei aber noch mit 90 ml sterilem Leitungswasser verdünnt wurde.

- 30 Minuten schütteln (100 UpM) mit 10 g Glasperlen (ϕ 2 mm) [Weller, 1984].

Zur Bewertung der Effektivität der einzelnen Methoden wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) auf Nähragar (7 Tage Inkubation bei 21°C) ausgezählt. Daneben wurde die Größe der Aggregate im Lichtmikroskop nach Coomassie-Färbung ausgemessen.

Zur Biofilmauflösung von den Blähtonkugeln wurde die Ultraschallsonde bei 50 W verwendet. Jeweils 40 Füllkörper wurden in 50 ml Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7,4) [Rauscher et al., 1972] aufgenommen und für 30, 60, 90, 120, 150 oder 180 Sekunden beschallt. Der Ultra Turrax kam bei der Biofilmauflösung nicht zum Einsatz, da die Füllkörper den Stab zerstört hätten.

Die Bewertung der Ultraschallzeiten erfolgte wie für die Aggregatauflösung beschrieben, jedoch kam hier noch ein anderes Kriterium hinzu. Die mehr oder weniger vom Biofilm befreiten Füllkörper und das mit Bakterien angereicherte Medium wurden in der modifizierten Warburg-Apparatur (s. Kapitel 2.6.3/5) auf die verbliebene Denitrifikationsaktivität hin untersucht, die dann als Maß für die Ablöserate herangezogen wurde.

2.4.2 Entwicklung einer kombinierten enzymatischen und mechanischen Methode zur Aggregatauflösung bzw. Biofilmauflösung

Da die Ergebnisse der mechanischen Methoden alle unbefriedigend waren (große Aggregate waren noch zu Zeiten zu sehen, in denen bereits ein gehäuftes Maß an Zerstörung zu bemerken war), wurde die Kombination einer solchen Methode mit einer enzymatischen Methode in Erwägung gezogen. Um geeignete Enzyme für diese Aufgabe auswählen zu können, war eine vorherige Analyse der Polymere notwendig, die

in diesem speziellen Fall zur Aggregatbildung beitrugen. Diese Analyse wurde wie in Kapitel 2.7 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis der Polysaccharidanalyse ließ den Einsatz von Cellulasen sinnvoll erscheinen (s. Kapitel 3). Wie bei Ülker und Sprey [1990] für *Trichoderma reesei* beschrieben, besteht die Rohpräparation von Cellulasen aus vielen verschiedenen cellulolytisch wirksamen Enzymen, z.B. 1,4- β -glucan--cellobiohydrolasen (E.C. 3.2.1.91.), 1,4- β -glucan-glucanohydrolasen (E.C. 3.2.1.4.), β -glucosidasen (E.C. 3.2.1.21.) und Xylanasen (E.C. 3.2.1.8.)

Auslauf

Jeweils 40 ml des Reaktorablaufes wurden mit 50 mg einer Cellulase-Rohpräparation von *Basidiomyces spec.* (Merck 2312) bei 21 °C unter Rühren inkubiert. Der pH-Wert des Auslaufs lag bei 7,5. Die Enzymaktivität dieses Präparats betrug 20 mU/mg (30 °C, pH 4,8). Nach jeweils 30, 60, 90 und 120 Minuten Inkubation wurden Proben genommen und in zwei Portionen geteilt, wovon eine mit und eine ohne Ultra Turrax-Behandlung (2 Minuten) in 25%-iger Ringerlösung verdünnt wurde. Der Ausstrich erfolgte auf Nähragar und die Inkubation bei 21 °C für 7 Tage.

Als Kontrolle wurde eine in keiner Weise behandelte Probe nach den oben aufgeführten Zeiten ebenfalls ausgestrichen. Außerdem wurde eine Probe ohne Cellulase bei 21 °C stehen gelassen, aber nach den zu untersuchenden Zeiten mit dem Ultra Turrax homogenisiert.

Biofilm

Aus jeder der drei Kammern des Labormodells des Roto-Bio-Reaktors wurden 40 Blähtonkugeln entnommen. Sie wurden zweimal in sterilem Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 6,8) gewaschen, um Bakterien, die nicht zum Biofilm gehören, zu entfernen. Anschließend wurden sie in exakt 40 ml frischem Phosphatpuffer aufgenommen und mit 100 mg der Cellulase-Rohpräparation bei 21 °C auf dem Rührer inkubiert.

Nach 2 Stunden wurde der Biofilm mit der Ultraschallsonde (Braun Labsonic, Typ 1510) (50 W, 120 Sekunden) von den Blähtonkugeln abgelöst. Dann wurde eine

Verdünnungsreihe in 25%-iger Ringerlösung auf Nähragar ausgestrichen. Der gesamte Überstand wurde verworfen, die Blähtonkugeln zweimal mit sterilem Phosphatpuffer gewaschen und in 50 ml frischem Puffer erneut mit Cellulase inkubiert. Insgesamt wurde die Prozedur dreimal durchgeführt. Das Resultat war demnach eine Ablösung des Biofilms in drei Schichten.

Die Ergebnisse dieser Homogenisierungs- bzw. Ablöseexperimente sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

2.5 Quantifizierung der Population

2.5.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Fixierung

Die Probe wird mit 2,5%-igem Glutardialdehyd überschichtet und je nach Größe des Objekts 2-24 Stunden fixiert. Anschließend wird die Probe mehrmals mit Aqua bidest. gewaschen, um auch die Reste des Glutardialdehyds zu entfernen.

Entwässerung

40, 60, 80 und 96% Ethanol, Einwirkzeit je 1 Stunde

96% Ethanol, Einwirkzeit 1 Tag

96% Ethanol, Einwirkzeit 1 Stunde

Kritische Punkttrocknung

Die Trocknung erfolgte in einem Trocknungsgerät der Firma Balzer Union Typ 11120. Bei der kritischen Punkttrocknung wird die Eigenschaft von Flüssigkeiten ausgenutzt, daß bei einem bestimmten Druck und einer bestimmten Temperatur die Dichte oberhalb des kritischen Punktes für Gas- und Flüssigphase gleich ist. Die kritischen Werte für Wasser ($T_{kr}=374^{\circ}\text{C}$, $P=221\text{ bar}$) liegen bei ungünstigen Werten, weshalb man flüssiges CO_2 ($T_{kr}=31^{\circ}\text{C}$, $P=71\text{ bar}$) vorzieht.

Vergoldung

Die Proben wurden leitend gemacht, indem sie in einem Besputterungsgerät der Firma Balzer Union Typ 871204 mit einer dünnen Goldschicht überzogen wurden. Die Bedampfung erfolgte durch Kathodenzerstäubung unter Argonatmosphäre für 2 Minuten bei 200 V, 35 mA und 0,1 bar.

Die in der oben beschriebenen Weise vorbereiteten Proben wurden in einem Elektronenmikroskop der Fa. Leitz AMR 1600T untersucht. Das maximale Auflösungsvermögen liegt bei etwa 200 nm.

2.5.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Coomasie-Färbung

Die Coomasie-Färbung erleichtert das Erkennen von Bakterien unter dem Lichtmikroskop [Poszich, 1988].

1 ml Probe wurde mit 1 ml Coomasiereagenz 2 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Probe in 100 ml sterilfiltriertem Aqua dest. verdünnt. Der gesamte Ansatz wurde filtriert (Sartorius, Cellulose-Nitrat-Filter, Porengröße 0,2 μm). Der Filtration folgte eine 10-minütige Trocknung bei 100°C. Im getrockneten Zustand wurde der Filter durch Immersionsöl durchsichtig gemacht.

Die exakte Auszählung der Bakterien basiert auf einem definierten Volumen und den definierten Ausmaßen des Filterausschnittes, auf dem die Probe betrachtet wird. Als Ergebnis der Auszählung wurde der Mittelwert von mindestens 5 Auszählungen verwendet.

2.5.3 MPN-Tests

Die Zellzahlbestimmung durch Zählen von koloniebildenden Einheiten wurde mit Zellzahlanalogwerten (MPN = Most probable number) verglichen. Als Grundlage hierfür dienten Flüssigkulturen. In Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe und der jeweiligen Anzahl der Parallelansätze, in denen Wachstum stattgefunden hatte, konnte

mit Hilfe von statistischen Berechnungen auf die wahrscheinlichste Zellzahl in der Probe geschlossen werden [De Man, 1975]. Folgende Kriterien wurden für die Auswertung zugrunde gelegt:

- Trübung sowie Bildung einer Kahmhaut (positives Kriterium für Wachstum)
- Gasbildung (Bildung von N_2O oder N_2)
- Nitratreduktion im Medium wurde mit Nitratteststäbchen (Merck 10020) nachgewiesen, gleichzeitig konnte Nitritbildung mit diesen Stäbchen verfolgt werden

500 μl der homogenisierten Probe wurden zu 4,5 ml Flüssigmedium in Schraubverschlußröhrchen (Schott, GI 14) gegeben. Diese wurden vor dem Animpfen mit Gasauffangröhrchen nach Durham bestückt. Aus der ersten Parallelreihe erfolgte die Verdünnung in den nächsten Verdünnungsstufen in 10-er Schritten; d.h. von dem gut durchmischten ersten Ansatz wurde 500 μl zum Animpfen der zweiten Verdünnungsstufe genommen und so weiter. Von jedem Verdünnungsschritt wurden 5 Parallelen angesetzt. Die Röhrchen wurden 14 Tage bei 21 °C inkubiert.

Neben Röhrchen wurden auch Mikrotiterplatten zur Bestimmung der MPN verwendet. Hierbei konnte dann die Zahl der parallelen Ansätze auf 10 erhöht werden.

2.5.4 Koloniebildung

Nach Verdünnung der homogenisierten Proben in 25%-iger Ringerlösung wurde 200 μl der Verdünnungen auf Agarplatten mit einem Drigalskyspatel ausgestrichen. Die Auszählung erfolgte nach 7 und 14 Tagen Inkubation bei 21 °C. Im Fall von Wasserproben mit einer großen Anzahl von Schwärmern war die Auszählung schon nach 2 Tagen erforderlich.

2.6 Identifizierung der Bakterien

Die gleichzeitige Identifizierung einer großen Anzahl von Isolaten je Probe erforderte eine rationelle Durchführung, die im folgenden kurz skizziert werden soll.

- Die Isolate wurden aufgrund einer Reihe von Taxon-spezifischen Tests vorsortiert: PRIMARY TESTS
- Das Alter und die Dichte des Inokulums wurden ebenso standardisiert, wie die Inkubationsbedingungen.
- Die Ergebnisse des BIOLOG-Identifizierungssystems wurden nur als Hinweis herangezogen, jedoch nie als tatsächliches Resultat.

2.6.1 Herkömmliche morphologische und physiologische Tests zur Bakterienidentifizierung

Koloniemorphologie

Bereits beim Abimpfen der Keime wurden einige Eigenschaften der Kolonien erfaßt: die Form, Größe und Konsistenz der Kolonie. Desgleichen wurde die Koloniefarbe auf Nähragar festgehalten, wobei nur Endopigmente berücksichtigt wurden.

Primary Tests

Unter diesem Namen werden folgende klassische Tests der Bakterienidentifizierung zusammengefaßt, die eine Zuordnung zu größeren Taxa (Familien oder Gattungen) erlauben.

Die Tests wurden mit 2 Tage alten Kulturen durchgeführt, die auf Nähragar angezogen worden waren.

Tab.II.1	Durchgeführte Primary Tests	
1.	Gram-Reaktion	Merck-Teststäbchen KOH Schnelltest [Gegersen, 1978]
2.	Zellmorphologie	mikroskopisch
3.	Beweglichkeit und Begeißelung	[Mayfield u. Inniss, 1977]
4.	Oxidase (Test auf Cytochrom c)	Merck-Teststäbchen
5.	Katalase (Spaltung von H_2O_2)	[Reichardt, 1978]
6.	Sporenbildung	mikroskopisch u. mit Standard-I-Bouillon
7.	O/F-Test	[Hugh u. Leifson, 1953]

Da die entsprechenden Methoden in zahlreichen Methodenbüchern beschrieben sind, soll an dieser Stelle nicht weiter auf sie eingegangen werden.

Tab.II.2	Einteilung der Isolate aufgrund der Primary Tests						
Taxon	Gram	Form	Bew	Oxi	Kat	Spo	O/F
<i>Streptococcus</i>	+	c	-	-	-	-	F
<i>Lactobacillus</i>	+	s	D	-	-	-	F
<i>Agromyces</i>	+	s	-	-	-	-	O
<i>Sporolactobacillus</i>	+	s	+	-	-	+	F
<i>Bacillus</i>	+	s	D	D	+	+	D
<i>Sporosarcina</i>	+	c	-	+	+	+	N
<i>Staphylococcus</i>	+	c	-	D	+	-	F
<i>Micrococcus, Deinococcus</i>	+	c	D	D	+	-	O
<i>Corynebacterium, Kurthia</i>	+	s	D	-	+	-	N
<i>Corynebacterium, Rothia</i>	+	s	D	-	+	-	F
<i>Arthrobacter, Nocardia</i>	+	s	D	-	+	-	O
<i>Acetobacter</i>	-	s	D	-	-	-	O
<i>Aceto-Gluconobacter</i>	-	s	+	-	+	-	O
<i>Pasteurella</i>	-	s	-	D	D	-	F
<i>Eikenella</i>	-	D	-	+	-	-	O
<i>Acinetobacter</i>	-	D	D	-	+	-	N
<i>Enterobacter</i>	-	s	D	-	+	-	N
<i>Azotobacter armeniacus</i>	-	c	+	D	+	-	O
<i>Pseudomonas</i>	-	s	+	+	+	-	O
<i>Moraxella, Neisseria</i>	-	D	-	+	+	-	N
<i>Neisseria</i>	-	c	-	+	+	-	O
<i>Flavobacterium</i>	-	s	-	+	+	-	O
<i>Alcaligenes, Zoogloea</i>	-	s	+	+	+	-	A
<i>Vibrio, Aeromonas</i>	-	s	+	+	+	-	F

Gram: Gram-Reaktion Oxi: Oxidase Spo: Endosporen
 s: Stäbchen Kat: Katalase O/F: OF-Test
 c: Kokken Bew: Beweglichkeit N: keine Reaktion
 O: oxidativ F: fermentativ A: alkalisierend
 D: "different reaction"; d.h. das Merkmal variiert innerhalb eines Taxons

2.6.2 Charakterisierung/Identifizierung mit kommerziellen Testsystemen

Kommerzielle Testsysteme sind bisher hauptsächlich für klinische Anwendungsbereiche entwickelt worden. Dementsprechend ist das mit diesen Systemen abgedeckte Artenspektrum beschränkt auf klinisch relevante Organismen. Auch die Durchführung der Tests (Inkubation bei 30°C u.a.) und schließlich die Auswertung mittels der häufig mitgelieferten Software berücksichtigt eher die Bakterien, die humanpathogen von Interesse sind. Eine einfache Übertragung dieser Systeme auf umweltrelevante Organismen ist nicht möglich.

Durch die in den letzten Jahren verstärkten Anstrengungen auf dem Umweltschutzsektor eröffnete sich hier jedoch für die Firmen ein Markt, der zur Entwicklung von Identifizierungssystemen für umweltrelevante Organismen führte.

Eines dieser Systeme ist das Biolog-System GN Microplate™, das von der kalifornischen Firma Biolog auf den Markt gebracht wird. Neben den Identifizierungsplatten bietet die Firma eine komplette Station mit automatischem Datentransfer vom Mikrotiterplattenlesegerät zum Rechner an.

Verwendet wurden Biolog GN microplates™ zur Identifikation Gram-negativer Bakterien. Sie enthalten 95 verschiedene Medien zur Aufnahme eines Substratverwertungsspektrums und eine Kontrolle mit Wasser.

Als Indikatorfarbstoff dient farbloses 2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid, das bei Substratverwertung reduziert wird und irreversibel ein tiefrotes Formazan bildet [Bochner u. Savageau, 1977]. Dadurch ist es möglich die Platten mit dem bloßen Auge oder auch im Mikrotiterlesegerät auszuwerten.

Die Datenbank enthält Daten über 434 Species/Gruppen Gram-negativer, aerober Bakterien. Dabei werden 80 pflanzen- und 50 tierpathogene Arten, nahezu alle humanpathogenen Bakterien und umweltrelevante Arten berücksichtigt.

Der Computerbefund enthält die wahrscheinlichsten Identifikationsmöglichkeiten, die zugehörigen Wahrscheinlichkeiten, und gibt die Qualität der Identifikation an. Zusätzlich wird das Distanzmaß DIS angegeben, sowie einige statistische Werte, die sich von diesem Maß herleiten.

Entscheidungshilfen im Biolog-System:

Similarity (SIM) =: W'beob, d.h. Wahrscheinlichkeit für diese Art, das beobachtete Profil zu zeigen.

Distanz (DIS) =: ungefähre Anzahl Tests, die anders hätten ausfallen müssen, um das typische Profil dieser Art zu ergeben.

Average (AVG) =: durchschnittliche Anzahl Tests, bei denen die zur Aufstellung der Datenbank getesteten Referenzstämme vom typischen Profil abweichen.

Maximum (MAX) =: ungefähre Anzahl der vom typischen Profil abweichenden Tests, die maximal bei den untersuchten Referenzstämmen auftraten.

Zur Durchführung des Tests wurden 2-5 Tage alte Bakterienkulturen in 20 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, bis eine vom Hersteller definierte Dichte erreicht war. Je 150 μ l wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 30°C.

Positiv wurde ein violetter Farbumschlag bewertet. Auf Platten mit insgesamt schwachen Reaktionen wurde jeglicher Farbumschlag, auf Platten mit starker Reaktion wurden nur stark positive Tests als positiv bewertet.

In Bochner [1990] findet sich eine genaue Abhandlung über die Bestimmbarkeit und Einordnung der verschiedenen Taxa anhand des Testsystems, sowie ein Vergleich mit der momentanen Taxonomie. Arten, die schlecht differenzierbar sind, gehören primär zu den *Pasteurellaceae* und den *Neisseriaceae* (letztere umfassen nach der letzten Auflage des Bergey's Manual auch noch *Moraxella* und *Acinetobacter*). Ebenso wie *Neisseria* und *Kingella* nutzten sie nur wenige Kohlenstoffquellen.

Tab.II.3		Tests im BIOLOG-System			
Monosaccharide:		Disaccharide:		Trisaccharide:	
9	L-Arabinose	11	Cellobiose	27	D-Raffinose
13	D-Fruktose	16	Gentiobiose		
14	L-Fucose	19	α -Laktose	Polysaccharide:	
15	D-Galaktose	20	Lactulose	1	α -Cyclodextrin
17	α -D-Glukose	21	Maltose	2	Dextrin
23	D-Mannose	24	Melibiose	3	Glycogen
26	Psicose	30	Saccharose		
28	L-Rhamnose	31	D-Trehalose	Glycoside:	
		32	Turanose	25	β -Methylglycosid
Aminosäuren:		Monocarbonsäuren:		Hydroxy-/Oxosäuren:	
64	D-Alanin	36	Acetat	45	α -Hydroxy-Butyrat
65	L-Alanin	39	Formiat	46	β -Hydroxy-Butyrat
66	L-Alanyl-Glycin	55	Propionat	47	γ -Hydroxy-Butyrat
67	L-Asparagin	56	Chinolincarbon- säure	48	p-Hydroxy-Phenyl- Acetoacetat
68	L-Asparatinsäure	61	Succinaminsäure	50	α -Keto-Butyrat
69	L-Glutaminsäure	84	Urocaninsäure		
70	Glycyl-L- Aspartinsäure	Discarbonsäuren:		Alkohole:	
71	Glycyl-L-Glu- taminsäure	49	Itaconsäure	8	Adonitol
72	L-Histidin	51	α -Keto-Glutarat	10	Arabitol
73	Hydroxy-L-Prolin	54	Malonat	12	I-Erythrit
74	L-Leucin	58	Sebacinsäure	18	M-Inositol
75	L-Ornithin	59	Succinat	22	D-Mannitol
76	L-Phenylalanin	60	Bromo-Succinat	29	D-Sorbitol
77	L-Prolin			33	Xylit
78	L-Pyro-Glutamins.	Tricarbonsäuren:		91	2,3-Butandiol
79	D-Serin	37	Cis-Aconitsäure	92	Glycerol
80	L-Serin	38	Citrat		
81	L-Threonin	41	D-Galacturons.	Amide/Amine:	
82	D,L-Carnitin	42	D-Gluconsäure	6	N-Acetyl- D-Galaktosamin
83	γ -Aminobuttersäure	43	D-Glucosamins.	7	N-Acetyl- D-Glukosamin
85	Inosin	44	D-Glucuronsäure	62	Glucuronamid
86	Uridin	57	D-Saccharonsäure	63	Alaninamid
87	Thymidin	52	α -Keto-Valerinat	88	Phenyl-Ethylamin
		53	D,L-Laktat	89	1,4-Diaminobutan (Putrescin)
		Phosphate:		90	2-Amino-Ethanol
		93	D,L- α -Glycerol- Phosphat		
		94	Glukose-1- Phosphat		
		95	Glukose-6- Phosphat		

Anmerkung:

Die Testnummer entspricht der Anordnung in den Ergebnistabellen.

2.6.3 Zusatztests

Wie bereits erwähnt, zeigten Vorversuche mit Referenzstämmen, daß die Ergebnisse im BIOLOG-Testsystem nur als Hinweis auf eine bestimmte Identifizierung zu werten sind. Der Anspruch der Firma, ein Identifizierungssystem für umweltrelevante Mikroorganismen entwickelt zu haben, ist nur bedingt erfüllt worden. Um aufgrund der Hinweise eine endgültige Identifizierung zu erhalten, wurden folgende Tests zusätzlich durchgeführt:

1 Entwicklung fluoreszierender Farbstoffe auf Cetrimid-Agar

Die Entwicklung fluoreszierender gelb-grüner Farbstoffe (=Siderophore) auf Cetrimid-Agar unter aeroben Bedingungen kennzeichnet eine ganze Reihe von Pseudomonaden. Diese Siderophore sind gut wasserlöslich.

2 Entwicklung nicht-fluoreszierender Farbstoffe auf Cetrimid-Agar

Einige Bakterienarten produzieren braune Siderophore, die nicht fluoreszieren, jedoch ebenfalls gut wasserlöslich sind. *Ps. cepacia* ist ein Beispiel hierfür.

3 Entwicklung von farblosen Siderophoren

Es gibt auch Bakterien, die farblose Siderophore bilden. Wachsen Bakterien in Meyer und Abdallah-Medium ohne Eisenzusatz und auf Cetrimid-Agar, kann man davon ausgehen, daß Siderophore gebildet werden. Ein Beispiel für einen solchen Fall ist *Ps. stutzeri*.

4 Polyhydroxybuttersäure-Speicherung

Der Speicherstoff Polyhydroxybuttersäure wurde durch Anfärbung mit Sudanschwarz-B-Lösung im mikroskopischen Bild sichtbar [Burdon, 1946].

5 Denitrifikation

Die Denitrifikation wurde mit den in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Medien untersucht. Dazu wurden Schraubverschlußröhrchen (Schott, GI 14) mit Gasauffangröhrchen nach Durham versehen und randvoll mit dem Medium gefüllt. Die Inkubation erfolgte 7 Tage bei 21°C. Die Auswertung erfolgte nach dem folgenden Schema:

	Trübung	Gas	Nitrat	Nitrit
Denitrifikanten	+	+	-	+/-
Nitratreduzierer	+	-	+/-	+

Diesem qualitativen Denitrifikationsnachweis steht der quantitative Denitrifikationsnachweis mittels Acetylenblockade gegenüber. Unter Standardbedingungen ($T=37^{\circ}\text{C}$, 1,61 mM NO_3^- , 1000 ppm Phosphatpuffer) wird die N_2O -Produktion nach Acetylenblockade mit der modifizierten Warburgapparatur quantitativ gemessen, wodurch Aktivitätsbestimmungen möglich sind [Hajirezaei, 1989; Schultz-Hock, 1989; Schultz-Hock u. Hajirezaei, 1990].

Die modifizierte Warburgapparatur ist mit einem Gaschromatographen kombiniert. Bei den modifizierten Warburggefäßen handelt es sich um Rundkolben mit einem seitlich angebrachten Glasstutzen, der für die Acetylenzudosierung mit einem Septum versehen war. Der Rundkolben wurde mit einem Schliffstopfen verschlossen und mit einer Schraubkappe gesichert, um dem Druck des Trägergases von 2 bar standzuhalten. Der Schliffstopfen besaß zwei Bohrungen. Die eine Bohrung diente dem Einleiten von Trägergas. Über die zweite Bohrung wurden die ausgestrippten Gase abgeführt und in die U-Schleife abgeleitet, wo sie mit flüssigem Stickstoff ausgefroren wurden. Nach 15 Minuten wurde die U-Schleife für eine Minute mit vorgewärmten Wasser (80°C) erwärmt und das N_2O mittels Integrator (Hitachi D-2000) detektiert. Alle Proben besaßen ein Gesamtvolumen von 50 ml und wurden bei 37°C im Wasserbad der Warburgapparatur inkubiert. Die Vorteile der Apparatur liegen in der Möglichkeit, unter kontinuierlichem Schütteln gleichzeitig mehrere Proben untersuchen zu können, sowie verlustfreie Messungen, exakte Temperatureinstellungen und Nullpunkt-Kontrollen durchführen zu können.

Eichung und Linearitätsmessungen

Das Eichgas wurde in die Warburggefäße appliziert, dann wurde das Gefäß entgast und das Gas in die Entgasungszelle überführt. Zur Eichung mit N_2O wurden abgestufte Probevolumina (0...100 bzw. 200 μ l) in die Gefäße eingespritzt. Die Nachweisgrenze für N_2O lag bei 2,5 ppb.

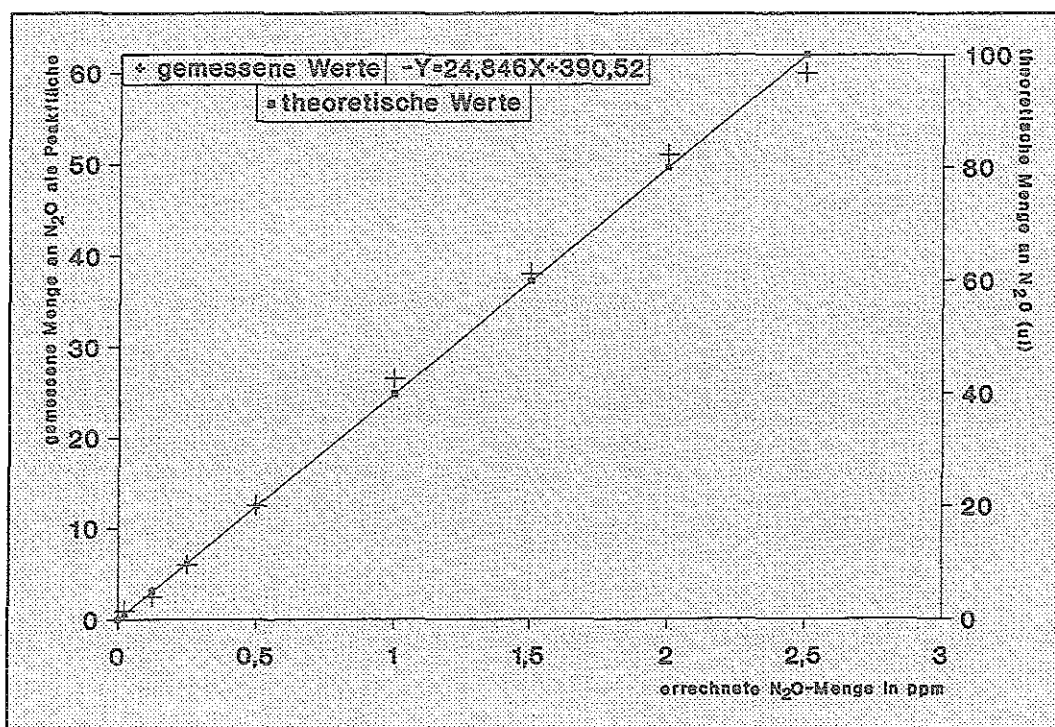


Abb.II.2 N_2O -Eichkurve für die modifizierte Warburgapparatur

6 Gelatinase-Test [Lelliott et al., 1966]

Durch die Produktion von Exoproteinasen wird Gelatine verflüssigt.

Hefeextrakt	3 g/l
Pepton	5 g/l
Gelatine	12 g/l
pH 7,2	

Das Medium wurde in Glasfläschchen abgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 20°C bis zu 2 Wochen. Vor der Auswertung wurden die Proben in den Kühlschrank gesetzt, um nicht hydrolysierte Gelatine wieder zu verfestigen.

7 Arginin-Dehydrolase-Test [Thornley, 1960]

Ursprünglich wurde dieser Test zur Abgrenzung von Arten der Gattung *Pseudomonas* von anderen Gram-negativen Bakterien angewendet. Mittlerweile wird er auch zur Identifizierung anderer Bakterien eingesetzt. Die Originalbeschreibung dieses Tests findet sich bei Thornley [1960].

Pepton aus Fleisch	1 g/l
NaCl	5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,3 g/l
Phenolrot	10 mg/l
Arginin-HCl	10 g/l
Agar	3 g/l
pH 6,8	

Das in Glasfläschchen abgefüllte Medium wurde stichinokuliert und mit sterilem Paraffinöl überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 20°C für bis zu 2 Wochen. Das durch die Arginin-Dehydrogenase freigesetzte Ammoniak führte zum Farbumschlag des Indikators von orange nach dunkelrot.

8 Urease-Nachweis [Christensen, 1946]

Harnstoff	20 g/l
Pepton	1 g/l
NaCl	5 g/l
KH ₂ PO ₄	2 g/l
Glukose	1 g/l
Phenolrot	12mg/l
Agar	10 g/l
pH 6,8	

Alle Substanzen außer Agar wurden in 900 ml Wasser gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes erfolgte die Sterilfiltration. Der in 100 ml Wasser gelöste Agar wurde autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wurden beide Medien zusammengegeben und in 8 ml Portionen in sterile Glasfläschchen gefüllt.

Nach der Beimpfung wurde der Ansatz 10 Tage bei 20°C inkubiert.

Freigesetztes NH_3 bewirkt einen Farbumschlag von gelb nach rot, was als positives Ergebnis gewertet wurde.

9 Tween 80-Lipase-Medium [Misaghi u. Grogan, 1969]

Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l
Agar	15 g/l
Tween 80	10 ml/l

Tween 80 wurde separat autoklaviert. Durch die Aktivität lipolytischer Enzyme werden Fettsäuren freigesetzt, die mit Calciumionen des Mediums getrübe Verseifungszonen um die positiven Kolonien bilden.

10 Wachstum bei 4°C bzw. 41°C

Zur Unterscheidung von *Pseudomonas spec.* diente die Untersuchung des Wachstums bei 4°C und 41°C im NB-Flüssigmedium. Die Auswertung erfolgte nach 14 Tagen.

11 Kohlenstoffquellen

Da der Nachweis des Wachstums bei gewissen Temperaturen sehr fehleranfällig ist, wurde zur Abgrenzung zwischen *Ps. fluorescens* und *Ps. aeruginosa* der bei Poszich [1988] beschriebene Substrat-Verwertungstest in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dieser Test wurde auch bei anderen Isolaten angewandt, wobei die

untersuchten C-Quellen (Kohlenhydrate oder Aminosäuren) entsprechend den Anforderungen ausgewählt wurden.

Der Nachweis des Kohlenhydratabbaus wird nicht, wie üblich, über die Änderung des pH-Wertes im Testmedium erbracht, sondern durch einen qualitativen Nachweis des verbliebenen Kohlenhydrats im Medium mit einem spezifischen Reagenz.

Eine gängige Nachweismethode für Kohlenhydrate in der Dünnschichtchromatographie basiert auf einer Farbreaktion mit Orcein-Schwefelsäure. Um diese Methode für die bakteriologischen Serientests in Mikrotiterplatten zu verwenden, wurden Kohlenhydratkonzentrationen in dem Testmedium gewählt, die mit dem Orceinreagenz gut nachweisbar sind, die jedoch so niedrig sind, daß die gesamte Kohlenhydratmenge von den Bakterien verwertet werden kann. Dadurch ist ein eindeutig positives oder negatives Ergebnis erzielbar. Das Medium (0,01% Proteose Pepton) wurde stark gepuffert (0,005 M Phosphat-Puffer), damit eine Hemmung der Kohlenhydratverwertung durch ein Absinken des pH-Wertes verhindert wurde.

Die zu testenden Substrate wurden in Phosphatpuffer mit Proteose Pepton hergestellt und danach sterilfiltriert. Von den sterilen Lösungen wurden jeweils 200 μ l in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte gefüllt. Danach erfolgte die Beimpfung durch Stichinokulation. Die Inkubation erfolgte 2 Tage bei 21°C auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 540 nm. Danach erfolgte der Zuckernachweis mit Orcein-Schwefelsäure-Reagenz bzw. der Aminosäure-Nachweis mit Ninhydrin. Zur Probennahme von 96 Proben aus einer Mikrotiterplatte wurde eine von L. Webb entwickelte Vorrichtung verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Stempeleinheit, bestehend aus 96 Pipettierstäbchen von einheitlicher Länge, die exakt in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte passen. Jedes Pipettierstäbchen besitzt am unteren Rand ein Kapillarkreuz. Mit Hilfe der Stempeleinheit wurden die Proben aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatten genommen (5 μ l) und auf eine Dünnschichtchromatographie-Kieselgelfertigplatte punktförmig aufgetragen. Nach vollständiger Trocknung der aufgetragenen Probe erfolgt die weitere Bearbeitung. Unter dem Abzug wurden die Dünnschichtchromatographie-Platten mit dem entsprechenden Reagenz behandelt. Danach wurden die Platten 10 Minuten bei 121°C auf einer unter dem Abzug stehenden Heizplatte erhitzt, um die

Farbreaktion hervorzurufen.

Zusammensetzung von Orcein-Schwefelsäure-Reagenz:

Lösung a: 1 g FeCl_3 in 100 ml 10%-iger H_2SO_4 lösen

Lösung b: 0,237 g Orcein-3,5-Dihydroxytoluol in 5 ml Ethanol

Für den Gebrauch werden 10 ml der Lösung a und 1 ml der Lösung b gemischt. Der Aminosäurenachweis erfolgte nach dem gleichen Prinzip; anstelle des Orcein-Reagenz für die Behandlung der DC-Platten wurde Ninhydrin verwendet.

Zusammensetzung von Ninhydrin-Reagenz:

0,3 g Ninhydrin in 100 ml Butanol

3,0 ml Eisessig

Die Ninhydrinreaktion ist die bedeutendste Nachweis- und Bestimmungsmethode der Aminosäuren. Die Aminosäure wird zum nächstniedrigen Aldehyd und CO_2 abgebaut, der blaue Farbstoff bildet sich aus dem Reagenz und dem freiwerdenden Ammoniak.

Die Auswertung erfolgt nach Beurteilung der Farbflecke auf den DC-Platten. Die nicht abgebauten Zucker und Aminosäuren erscheinen als farbige Flecke auf der Nachweisplatte. Das Verschwinden eines Fleckes zeigt den Abbau des jeweiligen Zuckers bzw. der jeweiligen Aminosäure.

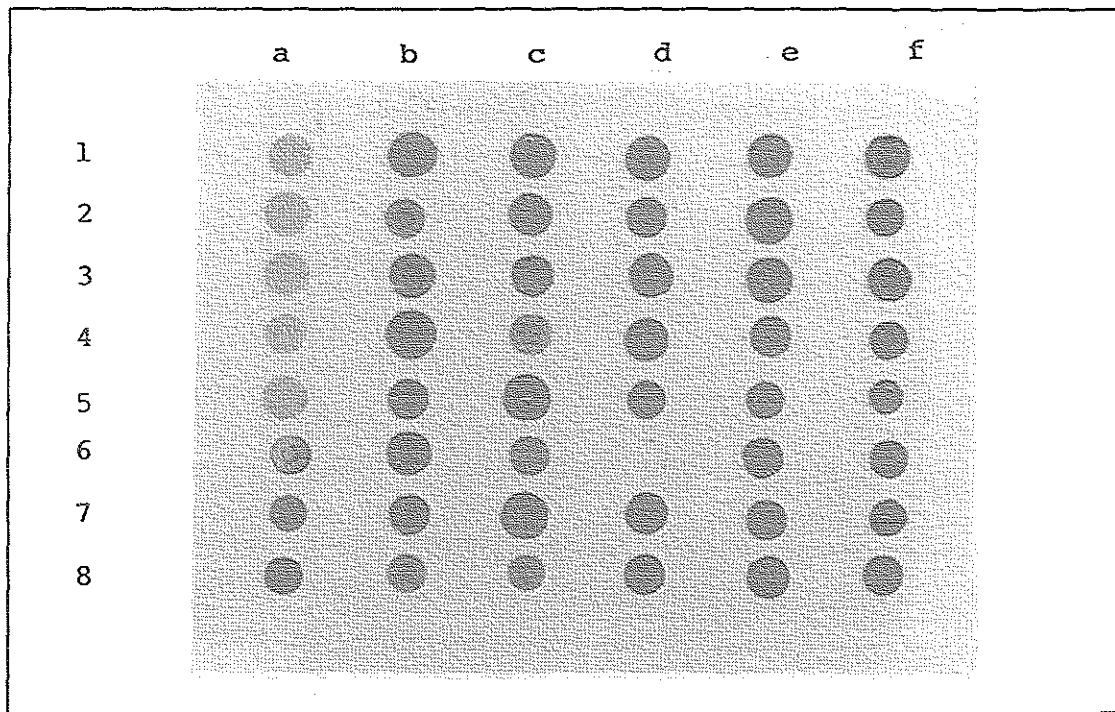


Abb.II.3 Beispiel einer Dünnschichtchromatographieplatte mit aufgetragenen Proben nach Orcein-Reagenz-Behandlung. Es sind Proben mit abgebautem (6d) und nicht abgebautem Zucker sichtbar.

2.7 Analyse der Exopolysaccharide (EPS)

Zur EPS-Analyse wurde der zu untersuchende Stamm in folgendem Medium angezogen [Hejzlar u. Chudoba, 1986]:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,7 g/l
KH_2PO_4	0,15 g/l
NaHCO_3	0,3 g/l
CaCl_2	0,036 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,41 g/l
Na-acetat	4,08 g/l
(= 2000 mg/l DOC)	
Spurenelemente	
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 mg/l
Na_2MoO_4	0,1 mg/l
CoCl_2	0,1 mg/l
Mn(II)-sulfat	0,1 mg/l
Fe(II)-citrat	0,2 mg/l

Kulturbedingungen

Von zwei Ansätzen des zu untersuchenden Stammes wurde ein Ansatz mit Lavalit durchgeführt und ein Ansatz ohne Lavalit. Die Kultur erfolgte jeweils in 2 l Kolben mit 800 ml Medium. Die Inkubierung erfolgte im 30°C-Brutraum für 3 Tage auf dem Schüttler bei 120 UpM.

Abtrennung der extrazellulären Polymere von den Pseudomonaden

Es wurde davon ausgegangen, daß nach 3-tägiger Inkubation genügend Schleim produziert worden war.

Zur Abtrennung der Polymere wurde das Kulturmedium in der Ultrazentrifuge bei 5000 g 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet, das hauptsächlich aus den Bakterien bestand, mit Natriumpyrophosphat (1,6 g/l) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand dem der ersten Zentrifugation hinzugefügt. Die gesammelten Überstände enthalten die zu untersuchenden Polymere.

Ausfällung der Exopolysaccharide

Die durch den vorherigen Schritt erhaltenen Lösungen wurden auf 60°C erhitzt. Unter Rühren wurde den Lösungen schrittweise Ethanol zugefügt bis ein Verhältnis von 1 Teil Probe zu 2 Teilen Ethanol erreicht war. Das Ethanol verursacht eine Agglutination der Polymere, da die Wasserstoffbrücken zwischen dem Wasser und den Polymeren aufgehoben werden.

Durch erneute Zentrifugation bei 5000 g wurden die gefällten Polymere abgetrennt. Das Pellet der Zentrifugation, das aus den Polymeren besteht, wurde nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes mechanisch ausgekratzt und in Porzellengefäße gesammelt.

Trocknung der Polymere

Die Proben wurden im Mikrowellenherd getrocknet. Der Vorgang wurde im Zweiminutentakt insgesamt 30 mal wiederholt, was einer Trocknungszeit von 60 Minuten entspricht.

Nach der Trocknung im Mikrowellenherd war das Trockenprodukt noch für eine Stunde in den Exsikkator über KOH-Tabletten zu stellen, um zu vermeiden, daß sich während des Abkühlens wieder Feuchtigkeit in der Probe ansammelt.

Saure Hydrolyse [Hejzlar u. Chudoba, 1986]

Die saure Hydrolyse erfolgte in Gläschen mit Drehverschluß und Teflondichtung. 5 ml 1 N HCl wurde zu 0,05 g der Probe pipettiert. Die Hydrolyse fand unter Stickstoffatmosphäre im Trockenschrank bei 100°C über einen Zeitraum von 7 Stunden statt.

Destillation

Das resultierende Hydrolysat wurde in einer Destillationsanlage bei 50°C im Wasserbad destilliert. Das Produkt wurde zweimal mit Aqua dest. gewaschen, um Reste der Schwefelsäure zu entfernen und anschließend erneut destilliert. Nach den drei Destillationen füllte man wieder mit Aqua dest. auf 100 ml Volumen auf.

Rotationsverdampfung

Die nach der Destillation vorliegende Lösung wurde im Rotationsverdampfer bei 45°C eingengt. Nach der ersten Einengung im Rotationsverdampfer lag der pH-Wert im stark sauren Bereich und wurde durch Zugabe von 1 NaOH auf pH 7 eingestellt.

Die Einengung der Proben wurde je Ansatz dreimal durchgeführt. Die Einengungsprodukte wurden in je 2 ml Aqua dest. aufgenommen, in ein Eppendorfhütchen pipettiert und abschließend eingefroren.

Nelson-Somogyi-Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker

[Nelson, 1944; Somogyi, 1952]

Benötigte Lösungen:

Lösung A 25 g/l Na_2CO_3 (wasserfrei)

25 g/l K-Na-Tartrat

20 g/l NaHCO_3

200 g/l Na_2SO_4 (wasserfrei)

Lösung B 15 g/100 ml $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

Lösung C 25 g $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ werden in 450 ml Aqua dest. gelöst. Nach Zugabe von 21 ml konz. H_2SO_4 werden 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, die vorher in 25 ml Aqua dest. gelöst wurden, zugegeben. Den Ansatz inkubiert man in einer geschlossenen dunklen Flasche 48 Stunden bei 37°C .

Vor Beginn der Analyse werden 25 ml Lösung A mit 1 ml Lösung B gemischt.

Zum Nachweis der reduzierenden Zucker versetzt man 200 μl der zu untersuchenden Lösung mit 200 μl der Mischung aus Lösung A und B. Nach 20 Minuten im kochenden Wasser werden 200 μl Lösung C zugesetzt und mit Aqua dest. auf 5 ml aufgefüllt. Die Extinktion wird bei 520 nm gemessen.

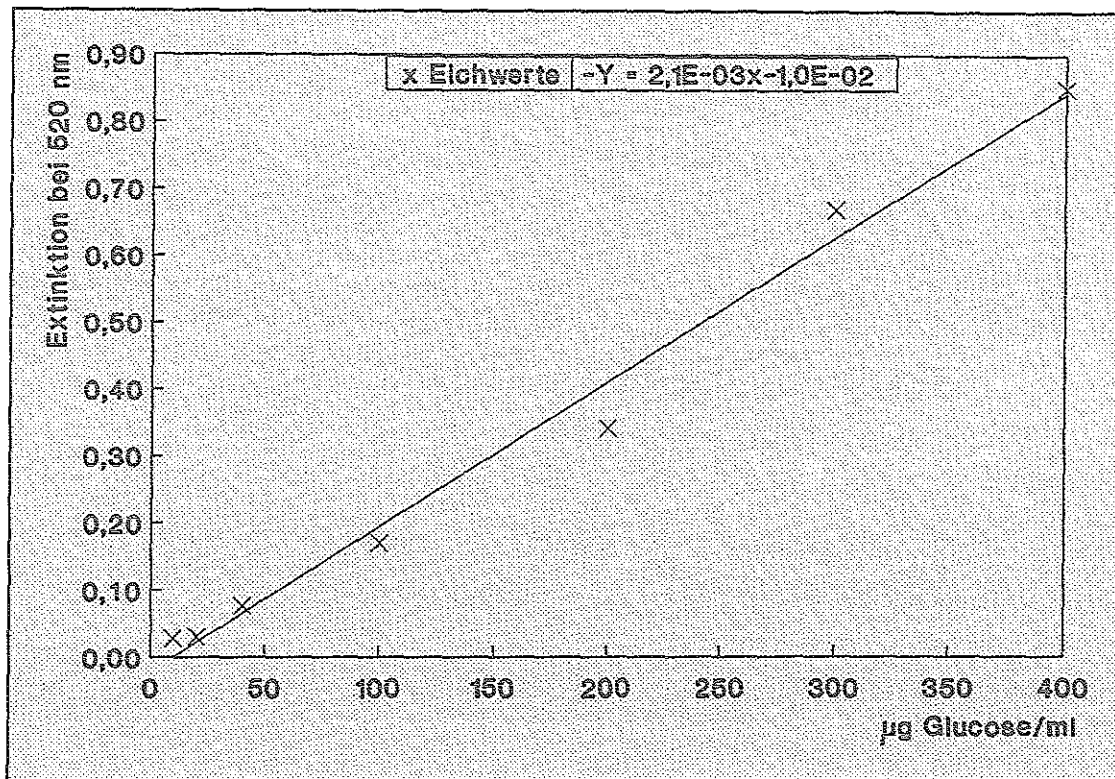


Abb. II.4 Glukose-Eichgerade nach Nelson-Somogyi

Anionen-Austauscher-Chromatographie von Kohlenhydrat-Borat-Komplexen

[Schimz et al., 1985]

Die Anionenaustauscher-Chromatographie wurde in einem LC 2000-Zuckeranalysator durchgeführt.

Gel:	Durrum DA-X-4-20
Probe:	50 nmol red. Zucker
Säule:	6 x 300 mm
Elutionspuffer:	0,2 M Kaliumborat, pH 8,15 (1h) 0,4 M Kaliumborat, pH 9,45 (2h)
Regenerationspuffer:	10 % (G/V) Kaliumtetraborat (45min)
Equilibrierungspuffer:	0,1 M Kaliumborat, pH 8 (45 min)
Fließrate:	60 ml/h

Das Eluat wurde mit gleichen Teilen Cu^{2+} -Bicinchoninat-Reagenz umgesetzt. Reagenz und Eluat fließen mit einer Fließgeschwindigkeit von 60 ml/h in eine Schleife (20 x 0,7 mm), wo die Reaktion bei 100°C im Wasserbad stattfindet. Die Detektion erfolgt photometrisch bei 570 nm.

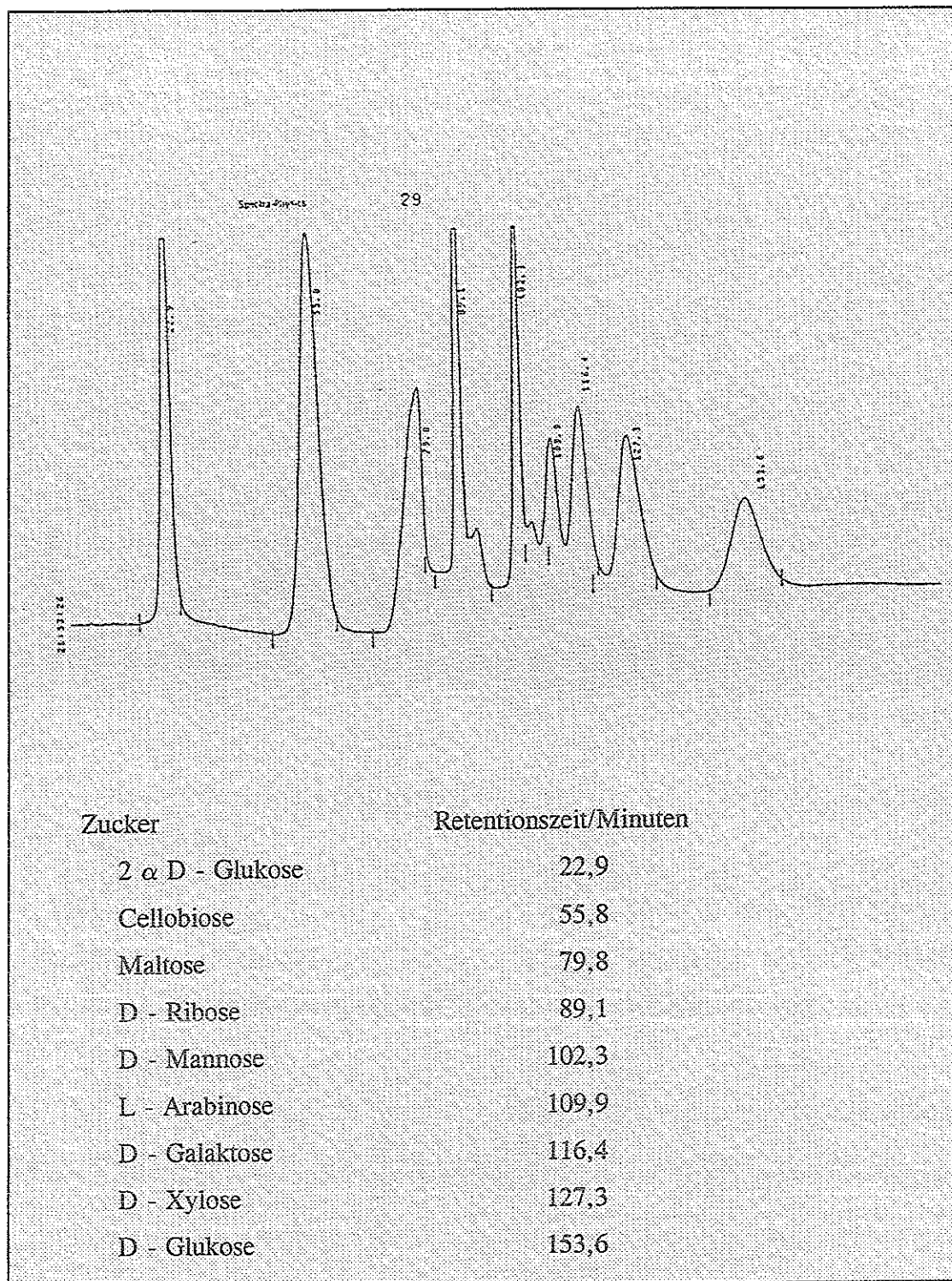


Abb. II.5. Chromatogramm einer Eichlösung mit verschiedenen Zuckern. Die Feststellung der Retentionszeiten für die einzelnen Zucker erfolgte mit 75 μ l Eichlösung, die je 37,5 nmol der aufgeführten Zucker enthält.

3 Ergebnisse

3.1 Eignungstest verschiedener Nährmedien zur Bestimmung der Lebendzellzahl

Es wurden vier verschiedene Festmedien zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) getestet und zwei Flüssigmedien zur Bestimmung der "most probable number" (MPN) der Lebendzellzahl. Die Untersuchungen wurden mit Proben aus einem Labormodell des RBR ausgeführt. Zwischen Probenahme und Verarbeitung der Probe lagen 15 Minuten. Der Reaktor arbeitete bei Raumtemperatur (20°C), der gleichen Temperatur, bei der auch der Proben transport durchgeführt wurde. Die Proben wurden 2 Minuten mit dem Ultra Turrax homogenisiert, bevor eine Verdünnungsreihe in 25%-iger Ringerlösung angelegt wurde. Die Inkubation der beimpften Agarplatten erfolgte bei 21°C. Die Bestimmung der MPN-Lebendzellzahl erfolgte in Mikrotiterplatten, die ebenfalls bei 21°C inkubiert wurden. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm verschlossen. Folgende Medien wurden verwendet:

Nähragar [Merck 5450]	NA fest
Standard I-Agar [Merck 7881]	StI fest
Reasoner 2-Agar [Reasoner, 1985]	R2A fest
Pepton-Agar [Wolters & Schwarz, 1956]	PA fest
Casein-Pepton-Stärke-Medium [Collins, 1963]	CPS flüssig
Pepton-Medium [Litchfield et al., 1975]	PP flüssig

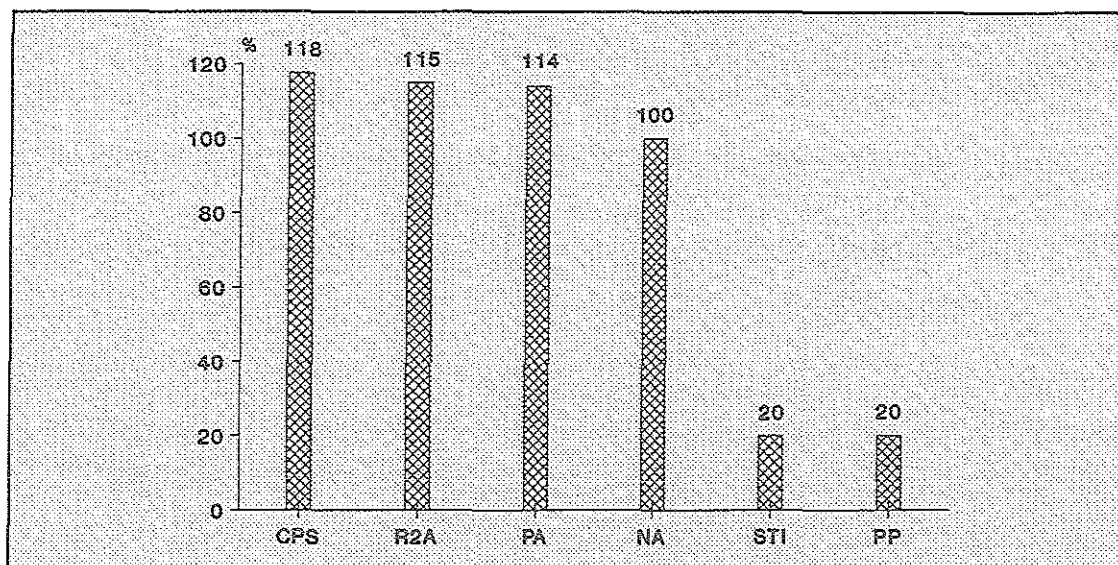


Abb.III.1 Koloniebildende Einheiten bzw. MPN der Lebendkeimzahl auf/in verschiedenen Medien nach 14-tägiger Inkubation bei 21°C. Das Ergebnis auf Nähragar wurde gleich 100% gesetzt. Medien mit größerer Ausbeute als Nähragar erhielten deshalb Werte über 100%. (CPS= Casein-Pepton-Stärke-Medium; R2A= Reasoner 2-Agar; PA= Pepton-Agar; NA= Nähragar; StI= Standard I-Agar; PP= Pepton-Medium)

Eine anaerobe Inkubation der Platten bei 21°C ergab deutlich niedrigere Koloniezahlen. Hierbei wurden die Platten in einer Anaerob-Box der Fa. Becton, Dickinson & Co. (BBL Microbiology Systems, Cockeysville) mit einer Wasserstoff-Kohlendioxid-Atmosphäre (Gas-Pak; Anaerobic System; Becton, Dickinson & Co.) bei 21°C inkubiert.

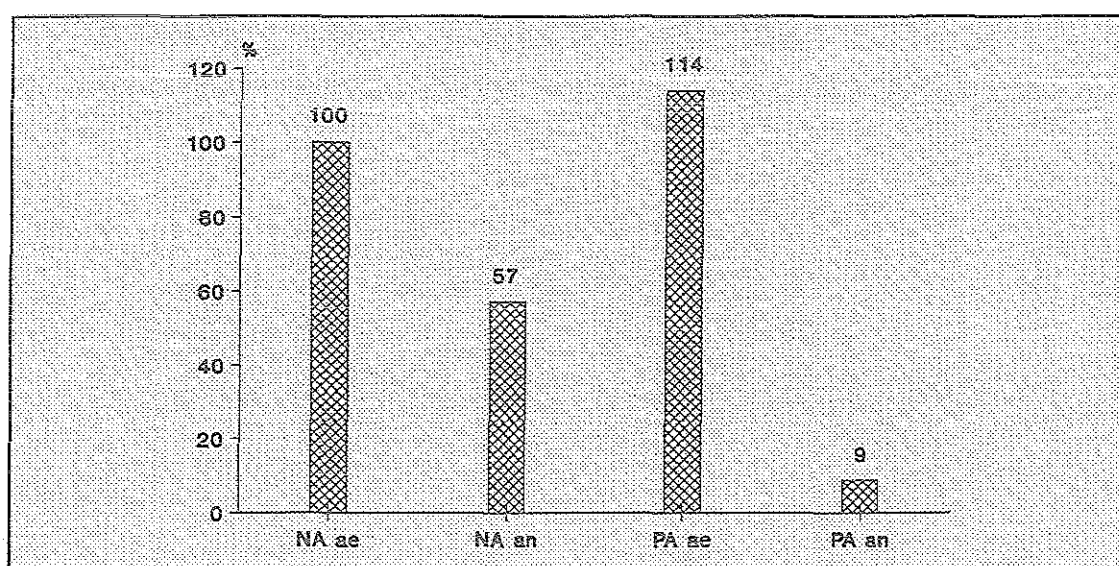


Abb.III.2 Vergleich aerobe (ae) und anaerobe (an) Inkubation auf verschiedenen Medien nach 14-tägiger Inkubation bei 21°C. Das Ergebnis der aeroben Inkubation auf Nähragar wurde gleich 100% gesetzt. (NA= Nähragar; PA= Pepton-Agar; ae= aerob; an= anaerob)

Ebenfalls niedrigere Werte ergaben sich, wenn anstatt bei 21°C bei 10°C inkubiert wurde.

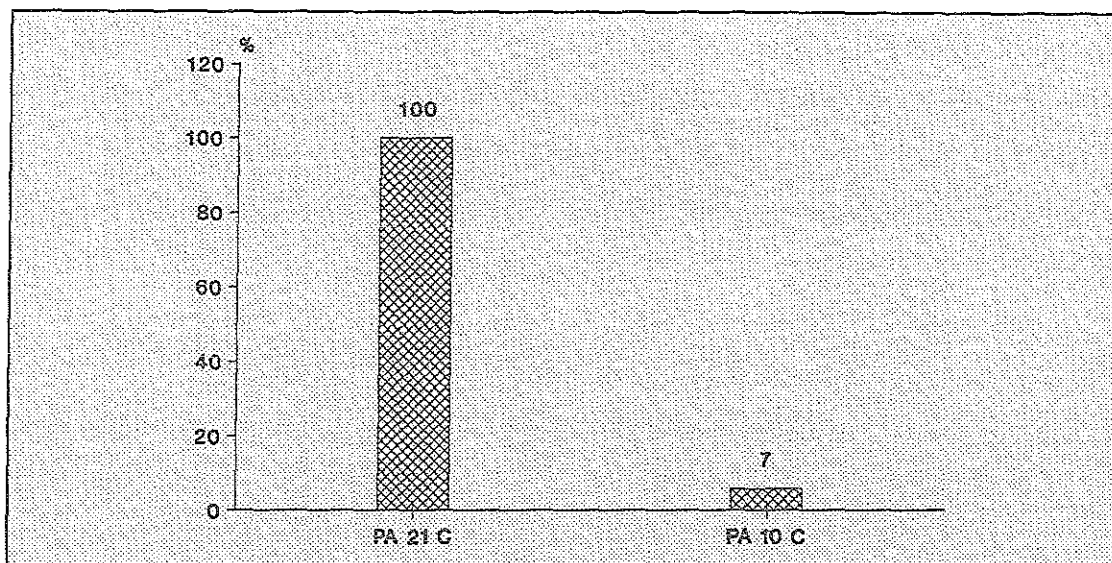


Abb. III.3 14-tägige Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (10°C/21°C). Das mit Peptonagar bei 21°C erzielte Ergebnis wurde gleich 100% gesetzt.

Insgesamt ergab die aerobe Inkubation bei 21°C mit CPS, R2A, PA und NA die höchsten KBE-Zahlen. Während unter diesen Bedingungen von der ersten zur zweiten Woche noch eine deutliche Steigerung der Anzahl an Kolonien festgestellt werden konnte, war von der zweiten zur dritten Woche kein Anstieg festzustellen.

Die mikroskopisch ermittelte Gesamtzellzahl nach Coomassie-Färbung war stets eine Zehnerpotenz höher als die KBE, die mit CPS, NA, PA und R2A ermittelt wurden. Gegenüber der KBE auf den weniger geeigneten Medien betrug der Faktor sogar zwei Zehnerpotenzen.

Die Ergebnisse mit CPS, R2A, PA und NA waren so ähnlich, daß aufgrund der leichteren Handhabung von NA (Merck 5450) dieses Medium bei allen weiteren Primärisolierungen, soweit nicht anders angegeben, verwendet wurde. Primärisolierungen unter anaeroben Bedingungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.2 Eignungstest verschiedener Nährmedien zur Bestimmung der "most probable number" (MPN) an Denitrifikanten

Diese Versuche wurden mit Auslaufproben eines drei Monate ohne Unterbrechung arbeitenden Labor-RBR durchgeführt. Der Reaktor hatte eine Denitrifikationseffektivität von $0,33 \text{ kg N/m}^3 \cdot \text{d}$. Es wurden folgende Nährmedien auf ihre Eignung hin getestet:

Thomlinson u. Hochstein (1972)
Giltay's Medium nach Bollag (1970)
Fabig u. Ottow (1979)
Nitratnährbouillon nach Focht und Joseph (1973)
Nitratnährbouillon 1:10 verd.

Im vorangegangenen Kapitel 2.6.3 sind die für die Denitrifikation zugrundegelegten Kriterien beschrieben. Es wurden Schraubverschlußröhrchen mit jeweils 5 Parallelen pro Verdünnungsstufe und Medium benutzt. Die Auswertung der MPN für die einzelnen Nährmedien erfolgte nach den bei De Man [1975] angegebenen Tabellen. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, daß die mit Nitratnährbouillon 1:10 angesetzten Proben die höchste MPN lieferten. Dieses Ergebnis stimmt mit der Empfehlung Prof. Dotts (TU Berlin)[1986] überein, für die Anzucht von oligocarbophilen Bakterien ein komplexes, aber stark verdünntes Nährmedium zu verwenden.

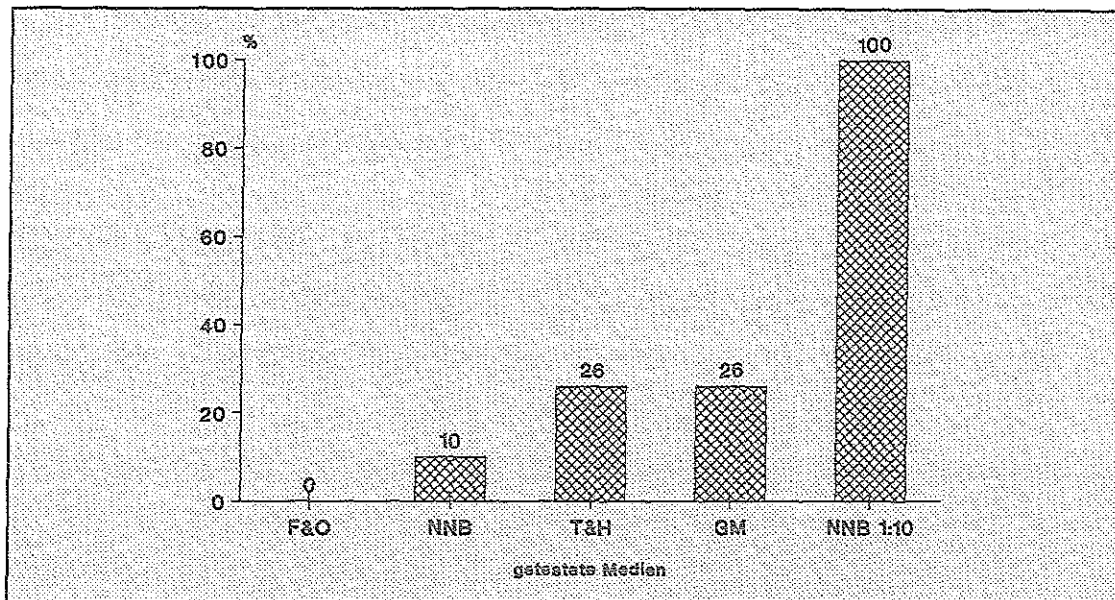


Abb.III.4 "Most probable number" für Denitrifikanten in verschiedenen Medien nach 14-tägiger Inkubation bei 21°C. (F&O= Fabig & Ottow; NNB= Nitratnährbouillon; T&H= Thomlinson & Hochstein; GM= Giltay's Medium; NNB 1:10= Nitratnährbouillon 1:10 verdünnt)

3.3 Homogenisierung der Bakterienaggregate im Auslauf des RBR und Biofilmauflösung auf den Füllkörpern

3.3.1 Mechanische Methoden

Die Homogenisierung der Bakterienaggregate erfolgte wie im Kapitel 2.4 beschrieben. Die Ergebnisse (Abb.III.5) zeigen deutliche Unterschiede in der Effektivität der einzelnen Methoden im Bezug auf die Homogenisierung von Bakterienaggregaten.

Die Behandlung mit dem nichtionischen Detergenz Lubrol W ist nicht geeignet, Aggregate aufzulösen, da kein Anstieg in der Zahl der KBE festzustellen war. Natriumpyrophosphat führt nur zu einem geringen Anstieg der KBE, indem es sich an die Oberfläche von Zellen anlagert und eine erneute Flockenbildung verhindert. Jedoch führt Natriumpyrophosphat nicht zu einer nennenswerten Auflösung bereits bestehender Flocken.

Ein beachtlicher Erfolg in der Homogenisierung von Flocken ist durch Ultraschallbehandlung zu erzielen, wobei mit 50 Watt bessere Ergebnisse erreicht wurden als mit 100 Watt. Im Lichtmikroskop sind nach Homogenisierung bei 100 Watt mehr einzelne Zellen sichtbar als nach Homogenisierung bei 50 Watt, aber die Zahl der Bakterien, die aufgrund von Zerstörungen nicht mehr wachstumsfähig sind, ist gegenüber der Homogenisierung bei 50 Watt stark angestiegen.

Die 2-minütige Homogenisierung mit dem Ultra Turrax führte zu der höchsten Zahl an freien KBE, obwohl auch in diesem Fall im Rasterelektronenmikroskop bereits zerstörte Zellen sichtbar waren, und andererseits noch kleine Aggregate von durchschnittlich fünf Zellen vorhanden waren.

Die Auswertung der lichtmikroskopischen Untersuchungen und der Zahl der KBE führte zu dem Ergebnis, daß die 2-minütige Homogenisierung mit dem Ultra Turrax die beste Methode für die Homogenisierung von Aggregaten aus einem Denitrifikationsreaktor ist. Jedoch ist es nicht möglich, mit dem Ultra Turrax den Biofilm von den Füllkörpern zu lösen, da der Ultra Turraxstab von den Füllkörpern zerstört würde. In diesem Fall ist man gezwungen den Ultraschallstab anzuwenden.

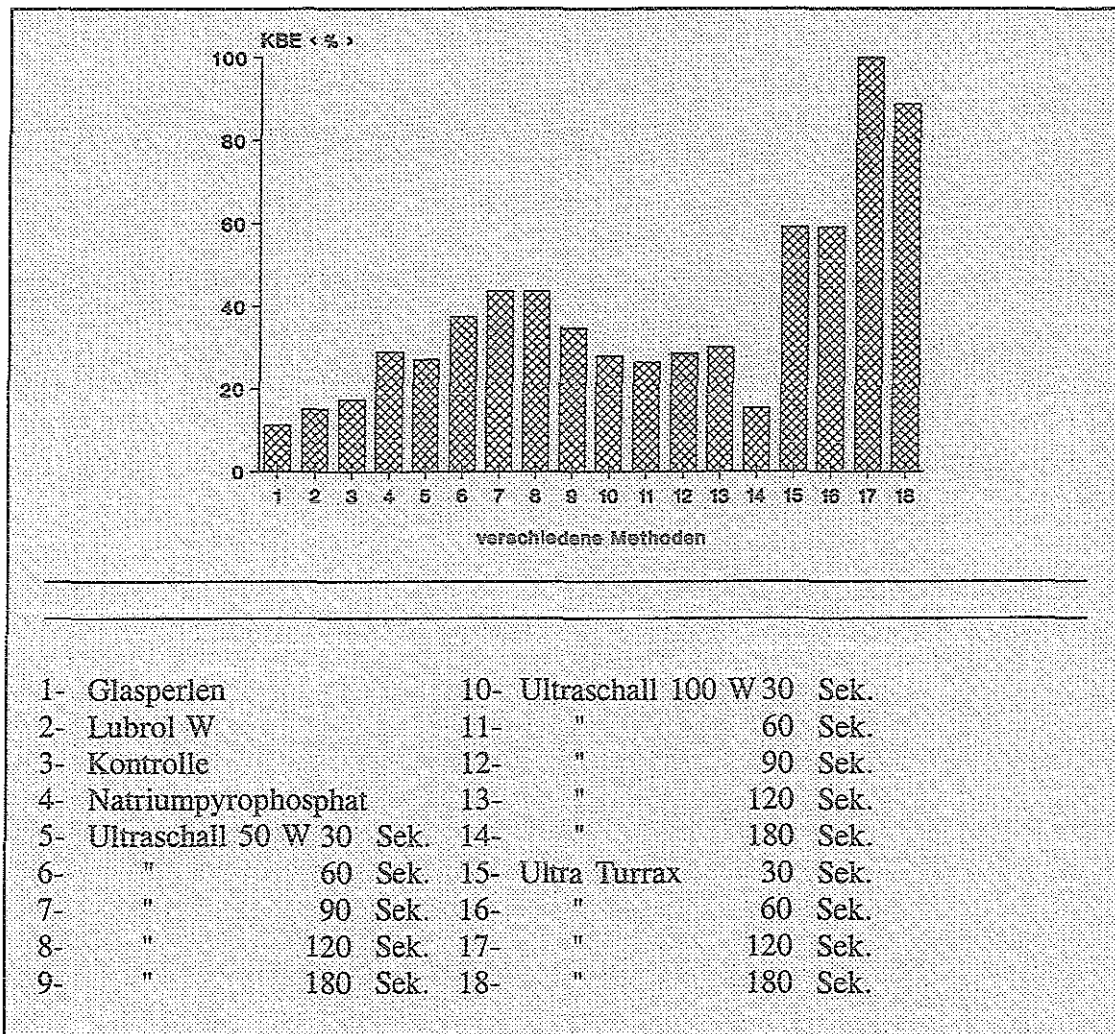


Abb. III.5 Die Effektivität verschiedener Homogenisierungsmethoden bezüglich der Aggregatauflösung bei Proben aus dem Auslauf des RBR zur Denitrifikation, gemessen an der Zahl der freigesetzten KBE. Das beste Ergebnis wurde gleich 100% gesetzt.

Zur Ablösung des Biofilmes von den Blähtonkugeln, die als Füllkörper verwendet wurden, wurden verschiedene Behandlungszeiten mit dem Ultraschall-Stab bei 50 W getestet. Eine Ultraschall-Dauer von 2 Minuten erwies sich als die den anderen an Effektivität überlegene Zeit, wenn man die Effektivität an der Zahl freigesetzter KBE mißt.

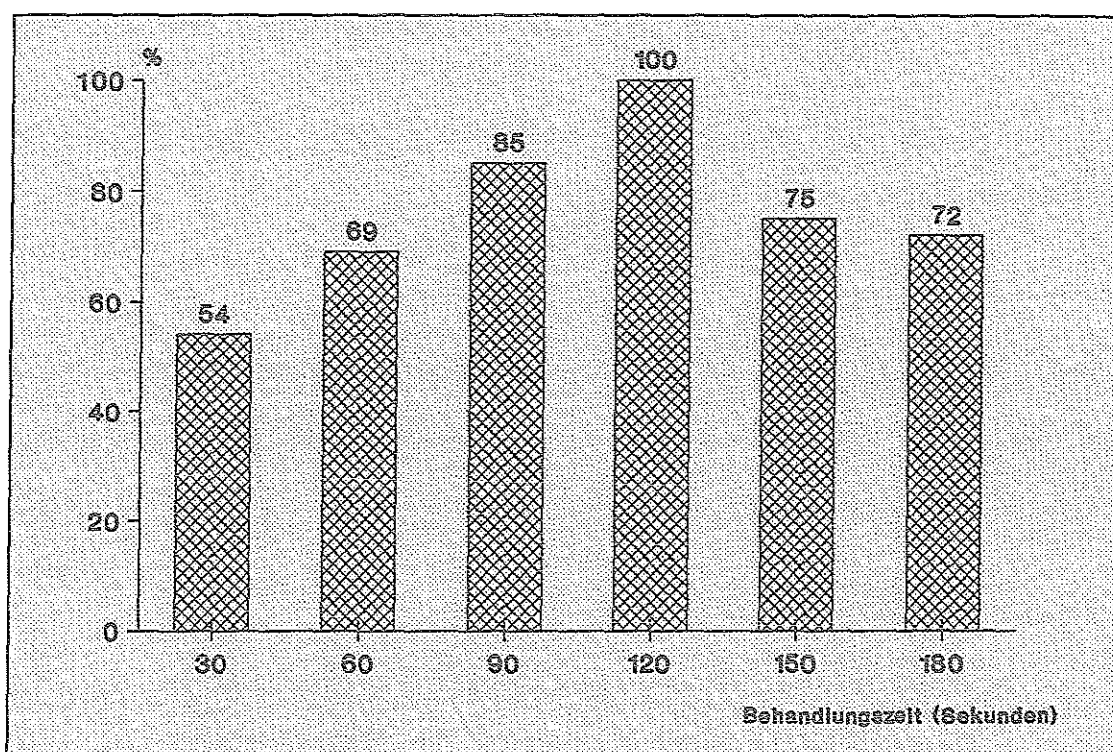


Abb.III.6 Einfluß der Dauer der Ultraschallbehandlung auf die Ablösung der Bakterienbiomasse von Blähtonkugeln. Dargestellt ist die Anzahl an KBE für verschiedene Zeiten der Ablösung, wobei das Ergebnis der Zeit, bei der die höchste Ausbeute erzielt wurde, gleich 100% gesetzt wurde.

3.3.2 Einfluß von Ultra Turrax bzw. Ultraschallbehandlung auf die Aktivität von Bakterien aus einem Denitrifikationsreaktor

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten, die nach einer bestimmten Behandlungszeit mit dem Ultra Turrax oder der Ultraschallsonde freigesetzt werden, ist ein Kriterium für die Güte der eingesetzten Homogenisierungsmethode. Ein anderes Kriterium ist die Denitrifikationsaktivität, die nach der Homogenisierung noch nachzuweisen ist.

Der Reaktorauslauf aus einem Labormodell des RBR wurde mit Ultraschall (50 W) bzw. Ultra Turrax für 2 Minuten homogenisiert. Anschließend wurde die Denitrifikationsaktivität nach Acetylenblockade in der modifizierten Warburg-Apparatur

gemessen.

Es konnte bei der unbehandelten Probe eine Denitrifikationsaktivität von $0,4 \mu\text{mol N}_2\text{O/ml Probe} \times \text{min}$, bei der mit Ultra Turrax behandelten von $0,45 \mu\text{mol N}_2\text{O/ml Probe} \times \text{min}$ und bei der mit Ultraschall behandelten von nur $0,18 \mu\text{mol/ml Probe} \times \text{min}$ gemessen werden.

Das bedeutet, daß gegenüber der unbehandelten Probe (=100% Denitrifikationseffektivität) nach der Ultra Turraxbehandlung eine leichte Steigerung (+12%) der Denitrifikationsaktivität zu verzeichnen war, während die Probe, die mit dem Ultraschall homogenisiert war, einen starken Abfall (-55%) der Denitrifikationsleistung aufwies.

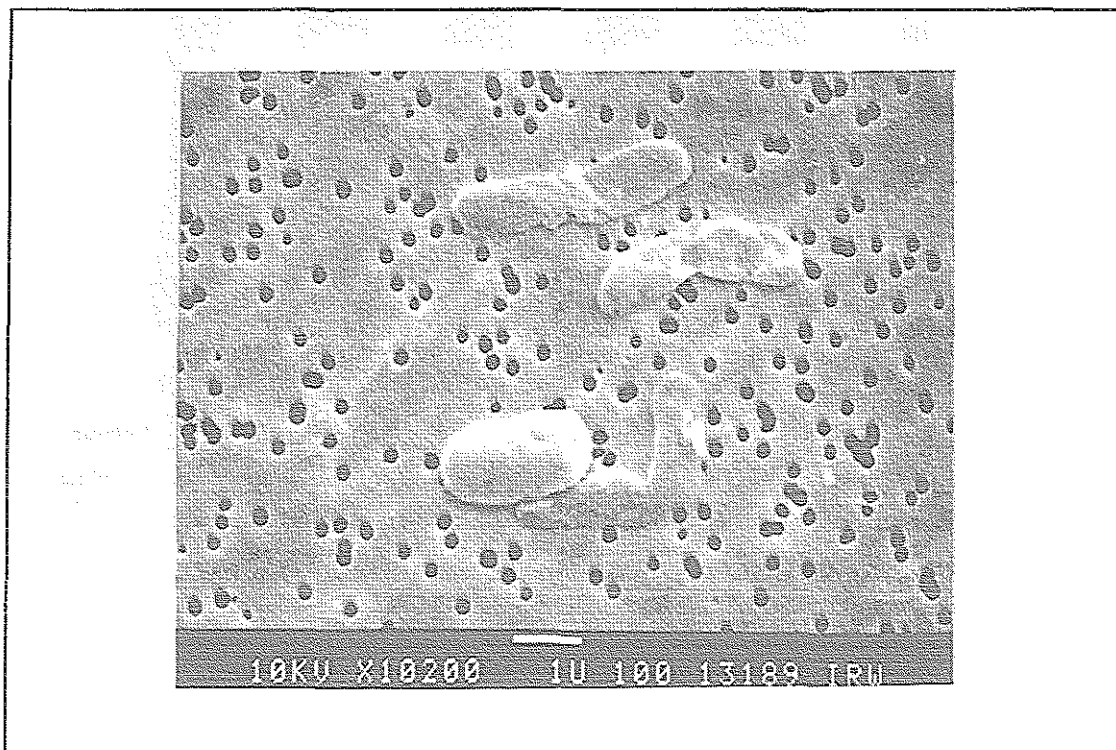


Abb.III.7 Zerstörte und nicht zerstörte Bakterien nach Ultra Turraxbehandlung.

Füllkörper, die mittels Ultraschall vom anhaftenden Biofilm befreit wurden, wurden ebenfalls mit der Acetylenblockade-Technik und der modifizierten Warburg-Apperatur auf die verbliebene Denitrifikationsaktivität untersucht. Die verbliebene Denitrifikationsaktivität wurde als ein Maß für die nicht abgelöste Biomasse auf den Füllkörpern nach der Ultraschallbehandlung genommen.

Dazu wurde nach der Beschallung der Überstand auf seine Denitrifikationsaktivität überprüft und ebenfalls die Füllkörper, von denen dieser Überstand stammte.

Es wurde deutlich, daß mit der Ultraschallsonde alleine keine vollständige Ablösung des Biofilms zu erzielen war (Tab.III.1). Die Füllkörper wiesen zu allen Zeiten noch

hohe Denitrifikationsaktivitäten auf, die von dem verbliebenen Biofilm herrühren (Abb.III.8). Bezüglich der Effektivität der einzelnen Zeiten für die Ultraschallbehandlung zur Biofilmauflösung waren nur geringe Unterschiede festzustellen.

Tab.III.1	Vergleich der Denitrifikationsaktivität in der Suspension und auf den Trägern nach Ablösung des Biofilms von den Füllkörpern	
	Suspension	Füllkörper
1 Minute Ultraschall	68%	32%
2 Minuten Ultraschall	69%	31%
3 Minuten Ultraschall	74%	26%

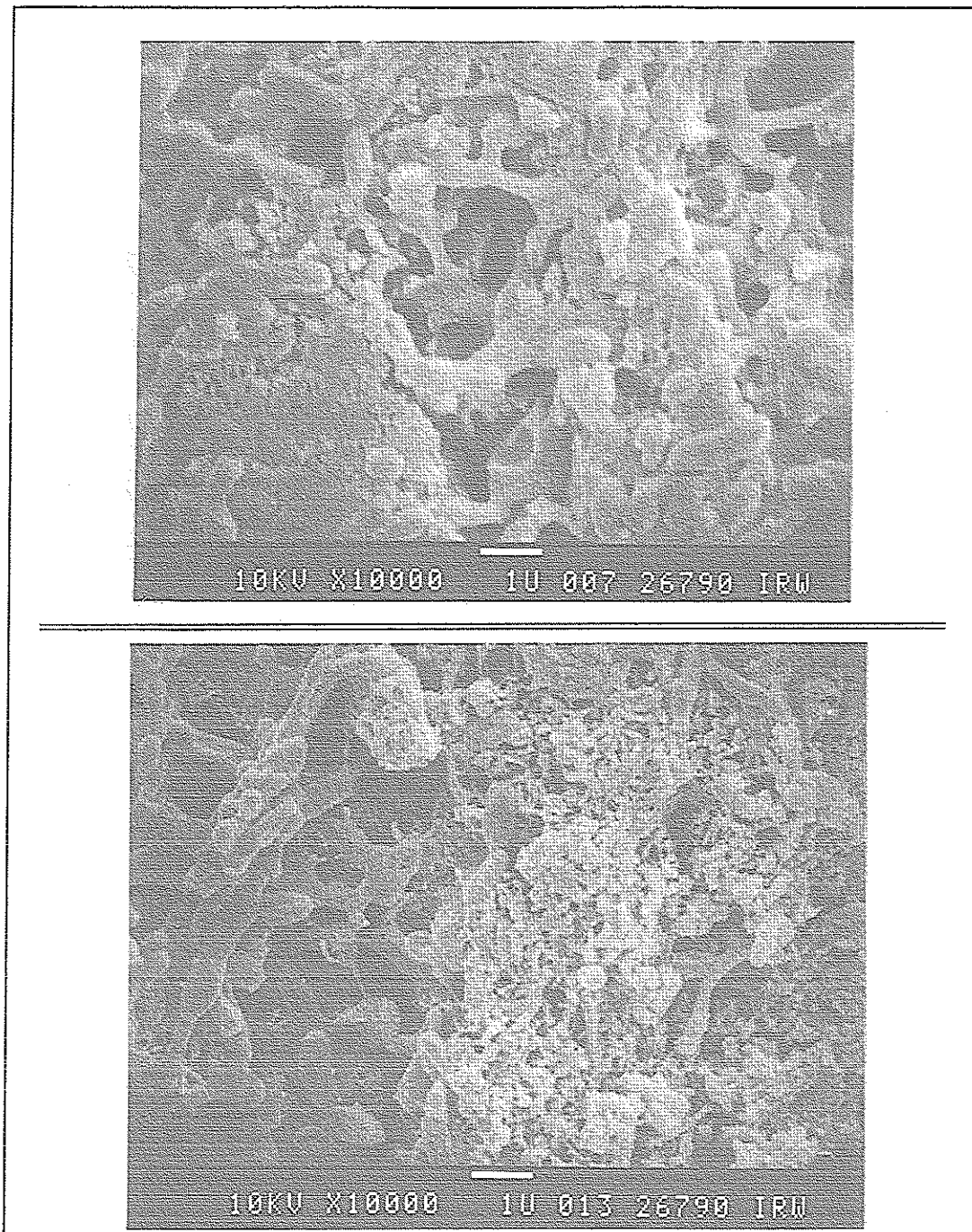


Abb. III.8 Blähtonkugel vor und nach 2-minütiger Behandlung mit Ultraschall (50 Watt); in beiden Fällen ist ein dichter Biofilm zu sehen, über dessen Dicke keine Aussage zu machen ist (*10000).

Da die Ergebnisse der verschiedenen mechanischen Homogenisierungsmethoden nicht zufriedenstellend waren, wurden die Exopolysaccharide der im Denitrifikationsreaktor am häufigsten gefundenen Bakterienart, *Pseudomonas fluorescens*, näher untersucht, um festzustellen, welche Enzyme eventuell einen zusätzlichen Beitrag zur Homogenisierung der Flocken leisten könnten.

3.3.3 Zuckeranalyse der Exopolysaccharide von *Pseudomonas fluorescens* nach saurer Hydrolyse

Die untersuchte Reinkultur war ein frisches Isolat aus der Pilotanlage des Roto-Bio-Reaktors in Königshausen. Gegenüber anderen Isolaten zeichnete sich dieser Stamm durch eine besonders starke Schleimbildung auf Nähragarplatten aus. Das Vorgehen zur Gewinnung der Exopolymere und ihre Hydrolyse ist in Kapitel 2.7 beschrieben.

Die Zusammensetzung der Exopolymere in Ansätzen mit und ohne Füllkörper war gleich. Es konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Gegenwart oder Abwesenheit eines Trägermaterials festgestellt werden.

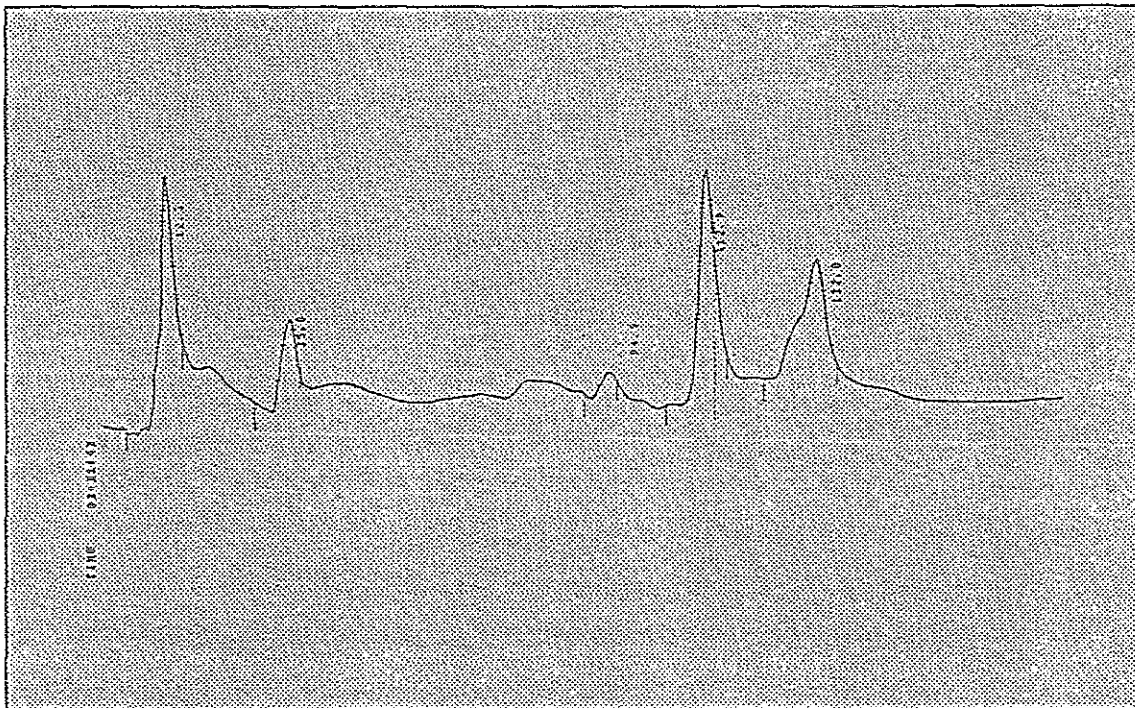


Abb.III.9 Ionenaustauscherchromatogramm des Hydrolysats der extrazellulären Polysaccharide von *Pseudomonas fluorescens*.

Zucker	Retentionszeit/Minuten
Oligomere	12,3
Cellobiose	35,8
D - Galaktose	94,9
D - Xylose	112,9
D - Glukose	132,8

Der Hauptanteil der Monomere sind Glukose-Einheiten, die zumindest teilweise β -1,4-glycosidisch verknüpft sind, wie durch unvollständige Hydrolyse nachgewiesen werden konnte. Aus diesen Gründen erschien der Einsatz von Cellulasen zur Lockerung der Exopolymere sinnvoll.

Bei dem ersten Peak, der nach zehn bis zwölf Minuten auftrat, handelte es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um höhermolekulare, nicht vollständig hydrolysierte Teile der Exopolysaccharid-Fraktion. Sie nehmen ebenso wie die Cellobiose mit verbesserter Hydrolyse ab.

Neben den beschriebenen Peaks traten noch zwei weitere auf: ein Xylose-Peak und ein Galaktose-Peak. Quantitative Bestimmungen der einzelnen Monomere wurden nicht durchgeführt.

3.3.4 Einsatz von Cellulase zur Auflösung von Bakterienaggregaten und Biofilm-Ablösung

Eine deutliche Verbesserung der Aggregatauflösung konnte tatsächlich erreicht werden, wenn die zu homogenisierende Probe vor der mechanischen Homogenisierung mit Cellulasen (s. Kap.2.4.2) inkubiert wird. Eine alleinige Inkubation mit Cellulasen ohne mechanische Homogenisation ist jedoch nicht ausreichend (Abb.III.10).

Ein signifikanter Anstieg der Bakterienzahlen aufgrund von bakteriellem Wachstum während der Inkubationszeit mit der Enzympräparation kann ausgeschlossen werden, wie die Kontrolle ohne Enzym beweist (Abb.III.10; gestrichelte Linie). Es ist anzunehmen, daß die Abnahme der KBE in Leerproben ohne Cellulase, die schon länger (30, 75 bzw. 150 min) standen, bevor sie mit dem Ultra Turrax behandelt wurden, auf einen Anstieg der abgestorbenen Bakterien im Inneren der Flocken zurückzuführen ist, was nur zum Tragen kommt, wenn anschließend eine mechanische Homogenisierung erfolgt (vgl. die beiden gestrichelten Linien in Abb.III.10).

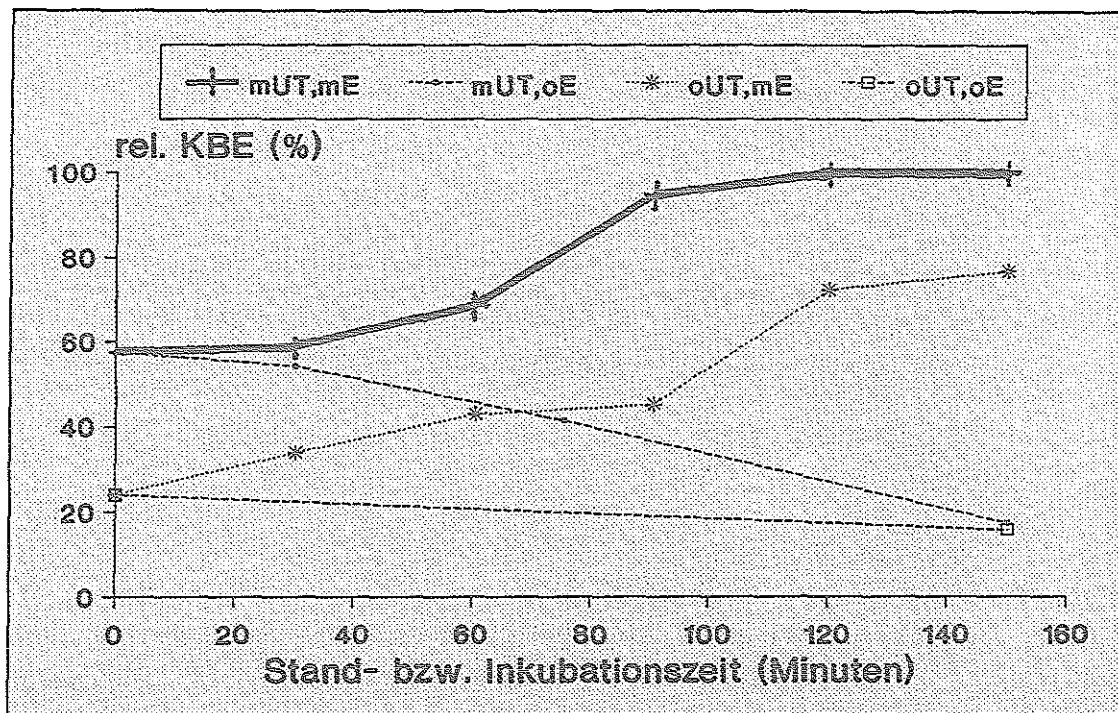


Abb.III.10 Kombinierte enzymatisch-mechanische Homogenisierung von Aggregaten im Auslauf eines RBR. Der erreichte Maximalwert an KBE, der nach der 120-minütigen Inkubation mit Cellulase und anschließender 2-minütiger Ultra Turraxbehandlung festgestellt wurde, wurde gleich 100 gesetzt. Die Werte bei anderen Methoden wurden als der prozentuale Anteil von 100 angegeben. (mUT= mit Ultra Turrax; oUT= ohne Ultra Turrax; mE= mit Cellulase; oE= ohne Cellulase). Proben, die nicht mit Cellulase behandelt wurden, standen die entsprechende Zeit in einem geschlossenen Gefäß bis zur Homogenisierung.

Bei der Cellulase-Behandlung des Biofilms auf Füllkörpern eines RBR konnte durch die in Kapitel 2.4.2 beschriebene Methode eine fraktionierte Ablösung des Biofilms erzielt werden. Wie nicht anders erwartet, war die Zahl der Bakterien, berechnet auf die Oberfläche der Füllkörper, in der dem Einlauf des RBR nächstgelegenen Kammer am höchsten. Dies ist begründet im dortigen, verglichen mit den anderen Kammern, relativ hohen Nährstoffangebot. Die fraktionierte Ablösung des Biofilms ist in den Abb.III.11-13 dargestellt. Nach 6 Stunden Gesamtinkubation mit Cellulase war der Biofilm soweit abgelöst, daß eine weitere Inkubation keine KBE mehr freisetzte.

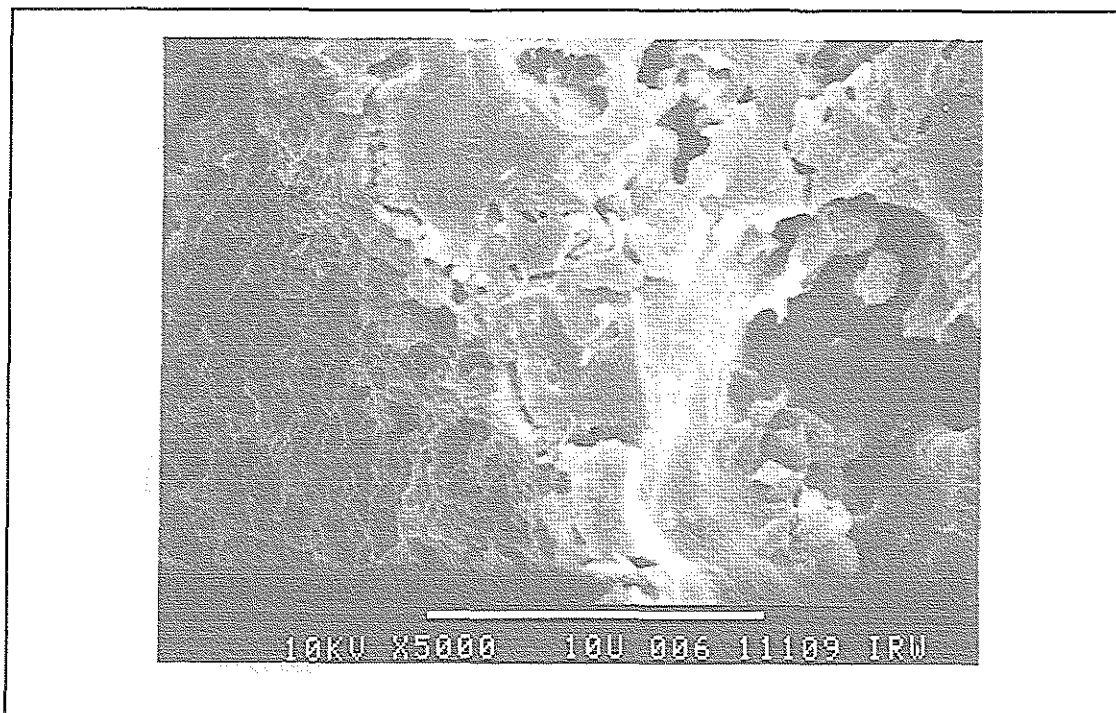


Abb.III.11 Biofilm auf einer halbierten Blähtonkugel (*5000).

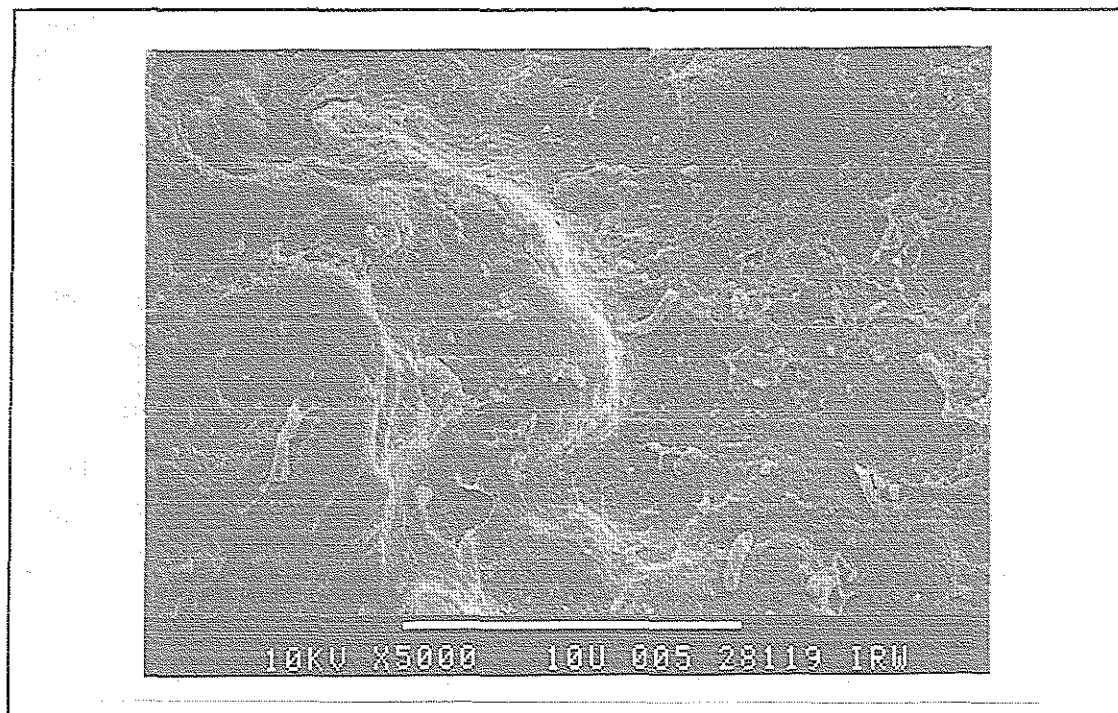


Abb.III.12 Verbliebene Bakterien auf der Blähtonkugel nach 2-stündiger Inkubation mit Cellulase und 2-minütiger Ultraschallbehandlung (*5000).

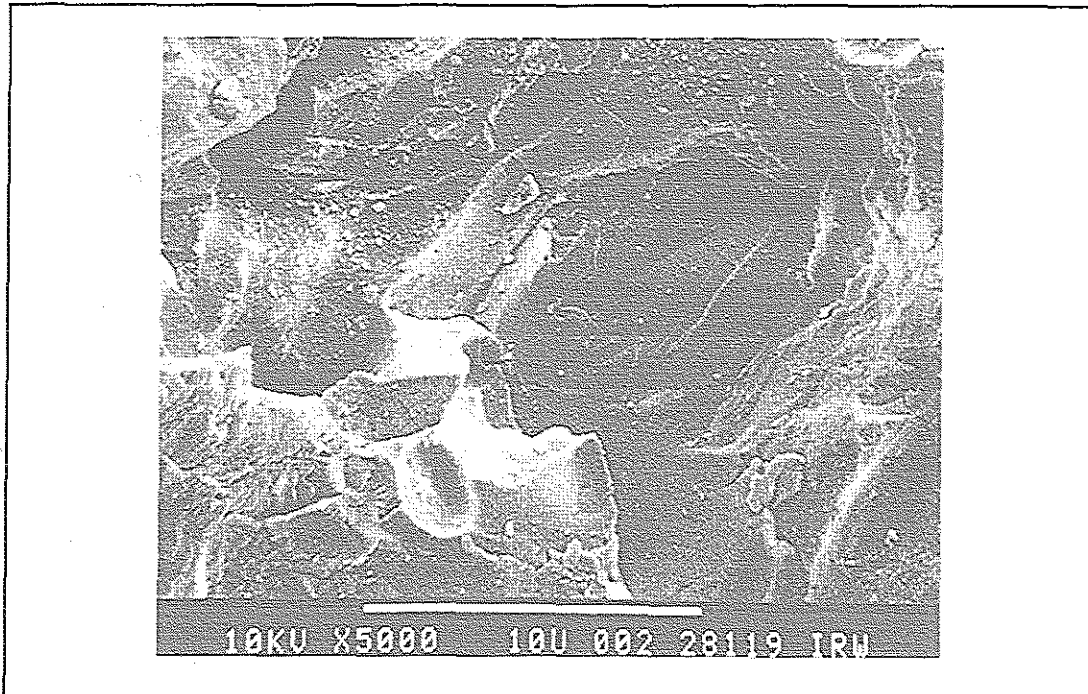


Abb.III.13 Nach 6 Stunden Inkubation mit Cellulase und 2-minütiger Ultraschallbehandlung ist die Oberfläche der Blähtonkugeln biofilmbefrei (*5000).

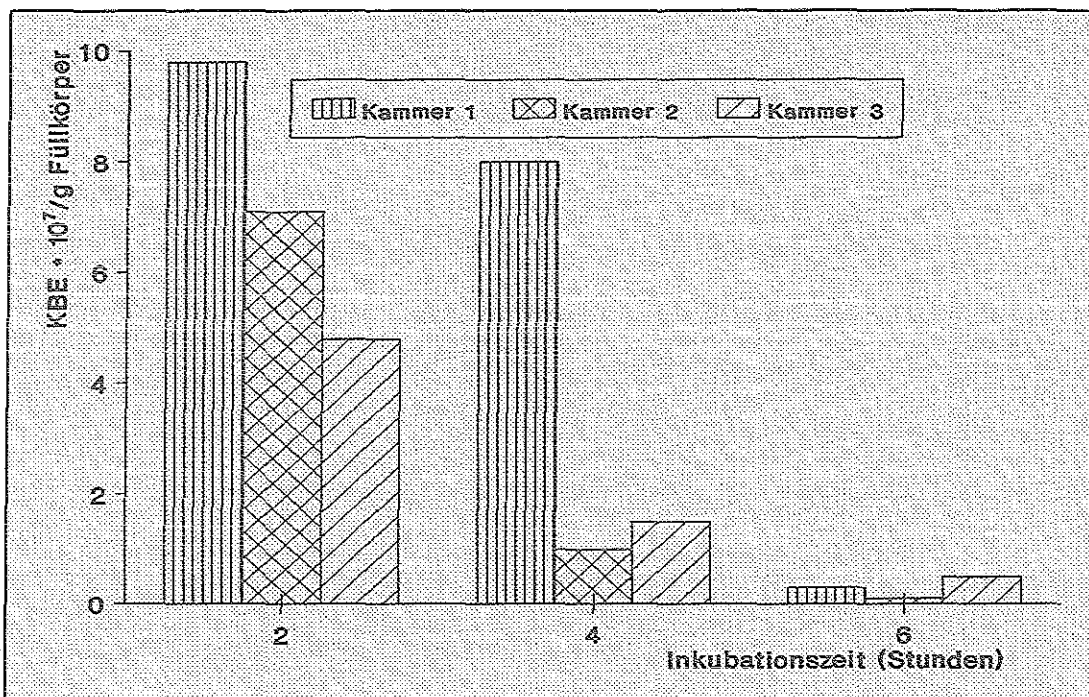


Abb.III.14 Anzahl der KBE nach den einzelnen Schritten der fraktionierten Ablösung des Biofilms vom Trägermaterial.

Die fraktionierte Ablösung des Biofilms macht es möglich, den Biofilm verschiedener Schichten getrennt abzulösen und zu analysieren (Tab.III.2).

Proteinasen, die ebenfalls zur Hydrolyse der Exopolymere getestet wurden, zeigten keinen Einfluß auf die Auflösung von Aggregaten oder die Ablösung des Biofilms.

Durch Anwendung der kombinierten enzymatisch-mechanischen Homogenisierung war es möglich, 20% der lichtmikroskopisch ermittelten Gesamtzellzahl als KBE auf Nähragar zum Wachstum zu bringen. Eine weitere Verbesserung der Ausbeute wird erzielt, wenn man Nähragar verwendet, der mit Reaktorauslauf anstelle von Aqua dest. angesetzt wird. Auf diese Weise gelang es, ca. 50% der Gesamtzellzahl als KBE wiederzufinden.

Tab.III.2	Anteil der Denitrifikanten an der Gesamtpopulation in den verschiedenen Schichten des Biofilms der einzelnen Kammern des RBR		
	2 h	4 h	6 h
Kammer 1	62%	100%	100%
Kammer 2	91%	100%	100%
Kammer 3	91%	100%	100%

3.4 Bakterienanalysen

3.4.1 Die Eignung des BIOLOG- Systems zur Bakterienanalyse

Zur Überprüfung der Genauigkeit der Identifizierungsergebnisse mit dem BIOLOG-System wurden Referenzstämme eingesetzt. Diese Referenzstämme waren so ausgesucht, daß eine gewisse Wahrscheinlichkeit bestand, sie im aquatischen Milieu der Denitrifikationsreaktoren ebenfalls anzutreffen. Die folgenden Versuche wurden mit Reaktorwasser und Auslaufwasser eines Laborreaktors durchgeführt.

Verteilung der Gesamtaktivitäten

Zur Charakterisierung der Bakterienpopulation wurden in Anlehnung an die von Dott und Trampisch [1983] entwickelte Methode die Gesamtaktivitäten in der Population bestimmt. Die Gesamtaktivitäten wurden als Prozentsatz positiv ausgefallener Tests im BIOLOG-System bestimmt, d.h. von 95 durchgeführten biochemischen Tests.

Die Gesamtaktivität beschreibt die physiologischen Fähigkeiten der Bakterien unter definierten, relativ nährstoffreichen Bedingungen. Eine Unterteilung erfolgte nach den Probenahmestellen und den verwendeten Anreicherungsmedien. Als beschreibende Statistik enthält Tab.III.3 mittlere, maximale und minimale Gesamtaktivitäten, Medianwert, sowie die 10% und die 90% Percentile.

Tab.III.3		Verteilung der Gesamtaktivitäten im Auslauf und im Reaktorwasser des RBR in Abhängigkeit von dem zur Primärisolierung verwendeten Medium (PCTL= Percentil; NA= Nähragar; NNA= Nitratnähragar; R2A= Reasoner 2-Agar)					
		Mittel	Maximum	Median	Minimum	PCTL -10	PCTL -90
Auslauf	NA	51,8	76	56	14	19	76
Auslauf	NNA	43,9	79	34,5	13	24	77
Auslauf	R2A	38,9	83	33	7	11	74
Auslauf	GES	42,2	83	36,5	7	14	76
Reaktor	R2A	32,1	76	28	9	9	68
Reaktor	NNA	47,9	77	50	6	15	69
Reaktor	NA	40,5	78	45	13	13	69
Reaktor	GES	42,9	78	46	6	13	69

Verteilung der Gesamtaktivitäten in der Population des Auslaufs

Abb.III.15 zeigt die Verteilung der Gesamtaktivitäten im Reaktorauslauf, wobei alle Bakterienstämme (n=85), die auf den drei zur Primärisolierung verwendeten Medien wuchsen, berücksichtigt wurden (s. Tab. III.3 Auslauf Ges). Über einen Bereich von 7% bis 83% sind fast alle möglichen Gesamtaktivitäten zu finden. Der Median liegt mit 36,5% unterhalb der mittleren Gesamtaktivität von 42,2%. Dies zeigt ein Vorherrschen von Bakterien niedriger Aktivität mit Verteilungsmaxima um 14% der Aktivität. Kleinere Werte werden oberhalb des Medians für 46%, 58%, 64% und 72 bis 78% (entspricht 90% Percentil) beobachtet.

Wie die einzelnen Verteilungen zeigen (Abb.III.16), basiert diese Aktivitätsverteilung teilweise auf die zur Isolierung verwendeten Medien. Die Mittelwerte und Mediane zeigen von R2 über NNB zu NB hin zunehmende Werte und geben einen Eindruck von den Isolierungsschwerpunkten der Medien. NB zeigt gegenüber der Gesamtverteilung

vom Auslauf eine zu höheren Aktivitäten verschobene Verteilung. Der Median liegt bei 56%, Maximum und Verteilungsschwerpunkt bei 72 bis 76%. Die Isolate sind über einen weiten mittleren Aktivitätsbereich verbreitet. Aufgrund der geringen Zahl von Isolaten tragen sie wenig zur Gesamtverteilung bei. NNB bestimmt stark die Verteilung im unteren Aktivitätsbereich um 30% (10% Perzentil bei 24% Gesamtaktivität) und zeigt eine weitere Anhäufung von Isolaten mit ungefähr 64 und 74% Aktivität. Schwerpunktmäßige Überschneidungen mit NB traten im 90% Perzentil der Gesamtverteilung (bei 76%) auf.

R2 stellt Isolate niedriger Aktivität. Das 10% Perzentil reicht bis 11% Gesamtaktivität. Das Maximum der Verteilung liegt bei 14%. Zusammen mit NNB stellt es die Isolate des Maximums im 30% Bereich der Gesamtverteilung des Auslaufs. Außerdem werden durch R2 Isolate mittlerer Aktivität um 46 und 58% gestellt, aber auch wie bei NNB und NB Isolate im Bereich um 74% Aktivität.

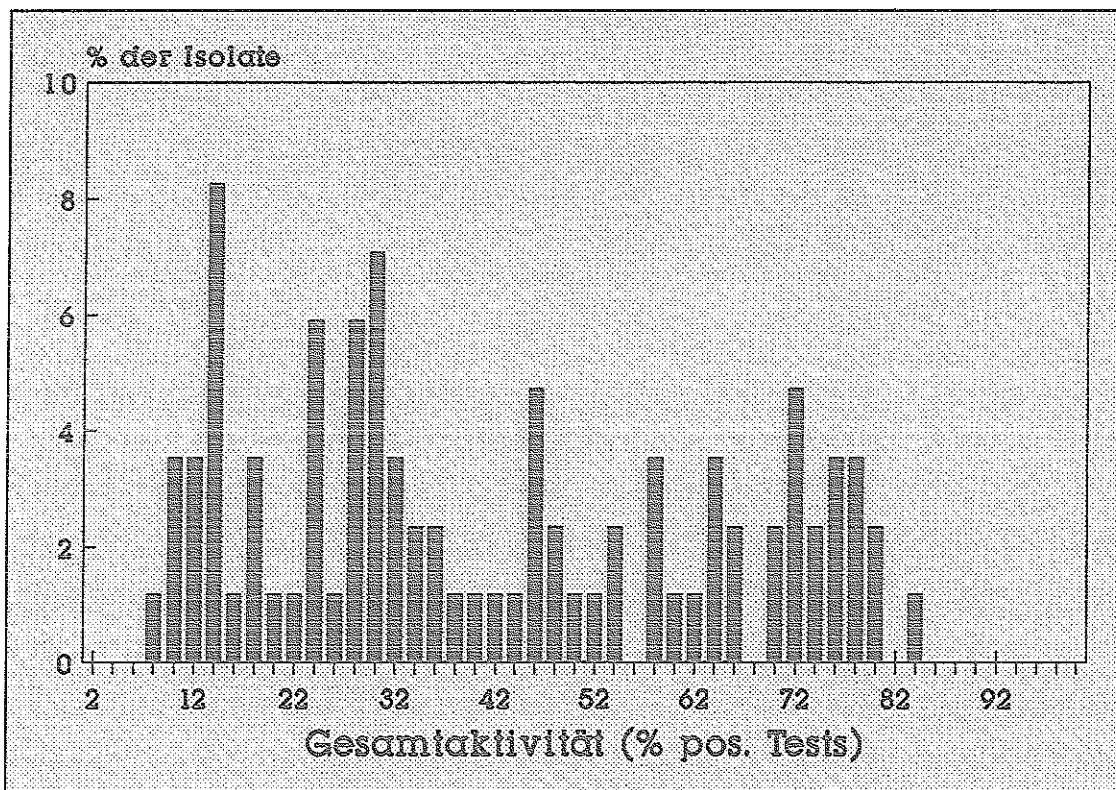
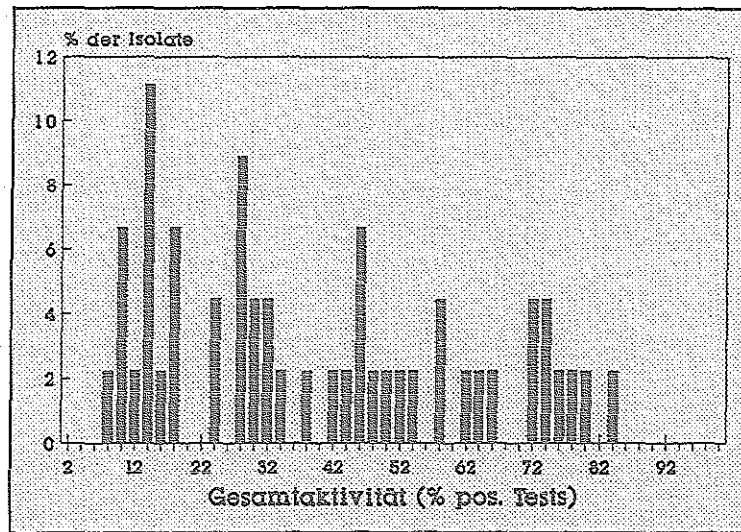
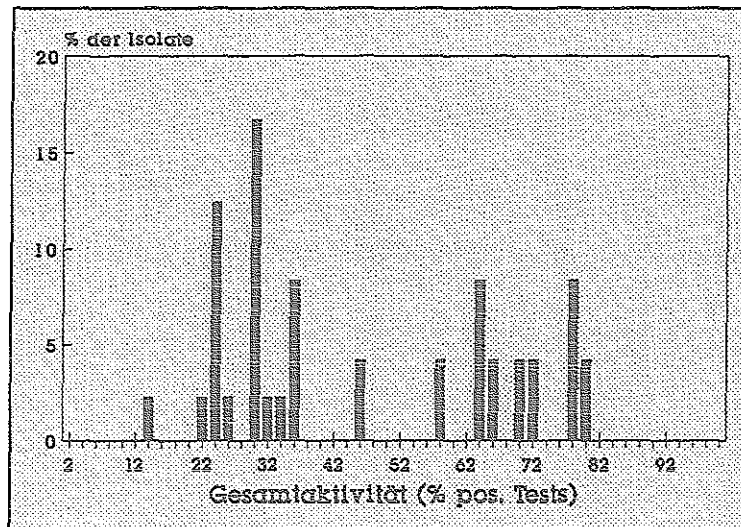


Abb.III.15 Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten in der Auslaufpopulation unter Berücksichtigung der Isolate, die von allen drei Medien zur Primärisolierung gewonnen wurden.

a



b



c

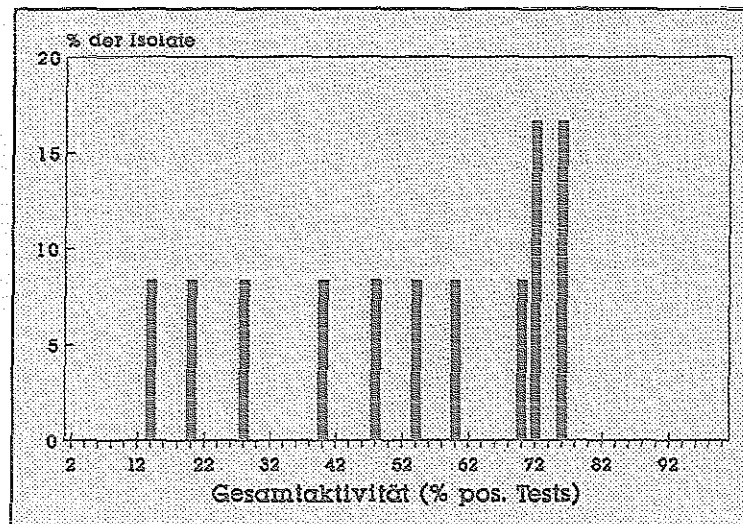


Abb.III.16

Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten der Population des Auslaufs in Abhängigkeit von den zur Primärisolation verwendeten Medien (a: Reasoner 2-Medium; b: Nitratnährbouillon; c: Nährbouillon)

Verteilung der Gesamtaktivitäten in der Population des Reaktorwassers

Die Verteilung der Gesamtaktivitäten im Reaktorwasser (für $n=104$ Isolate) zeigt gegenüber dem Auslauf wesentlich ausgeprägtere Maxima bei gleichem Mittelwert und gleichen Minima in der Gesamtaktivität. Im unteren Bereich liegt ein Schwerpunkt der Verteilung um 14%. Bei 28% Aktivität findet sich ein gleich starkes Maximum wie im Auslauf, das dort den Verteilungsschwerpunkt ausmacht. Starke Maxima finden sich auch bei 50 und 66% Aktivität. Der Median ist dadurch 10% höher als im Auslauf. Die maximal beobachtete Aktivität ist 78%. Stark aktive Isolate wie im Auslauf (70 bis 84%) sind nur in geringem Ausmaß vertreten. Das 90 Perzentil liegt bereits bei 69% gegenüber 76% im Auslauf. Ein Maximum um 24% fehlt.

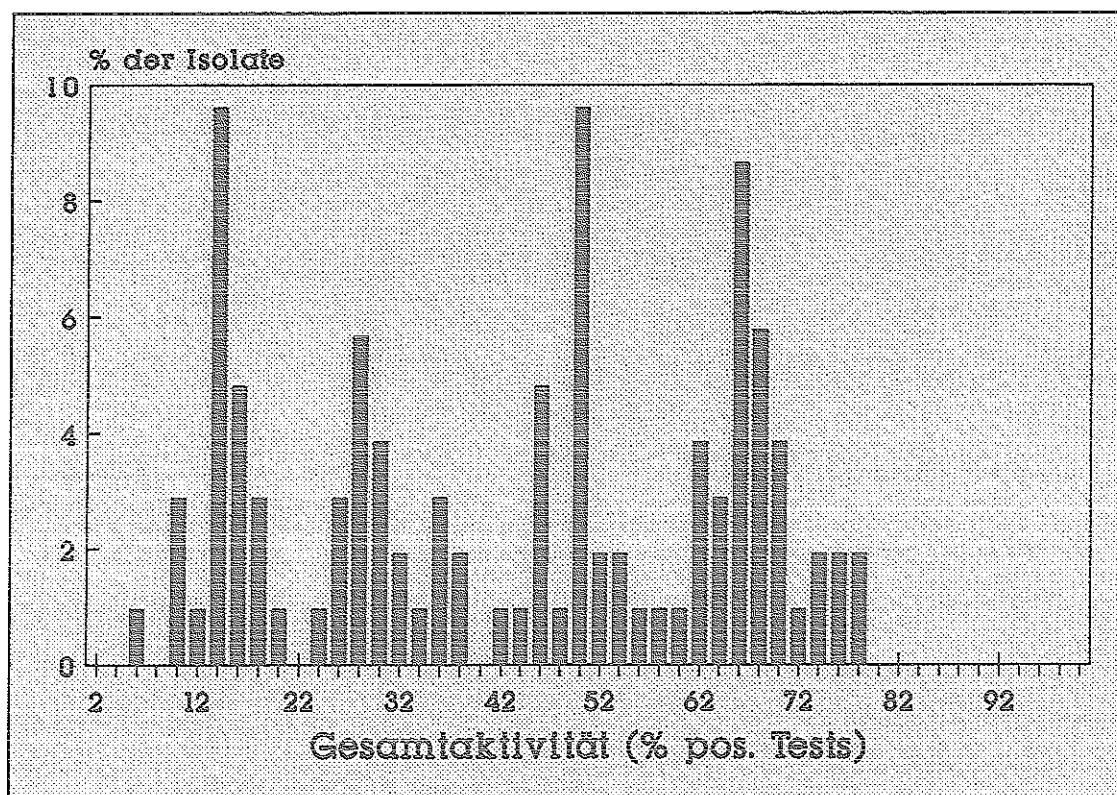
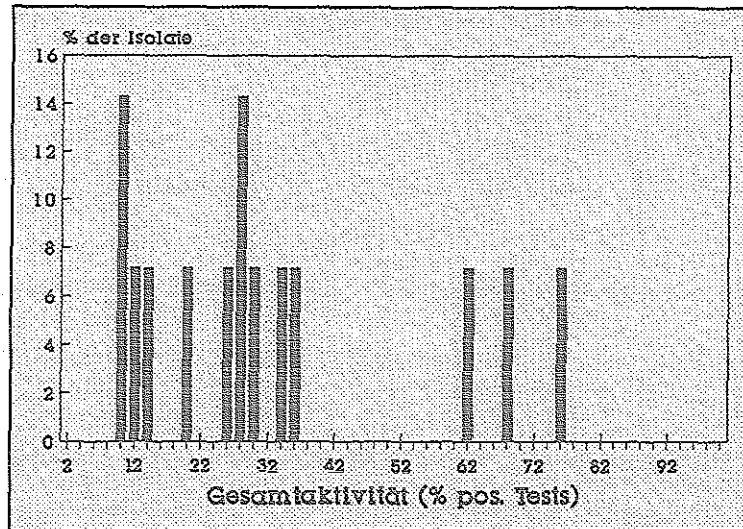
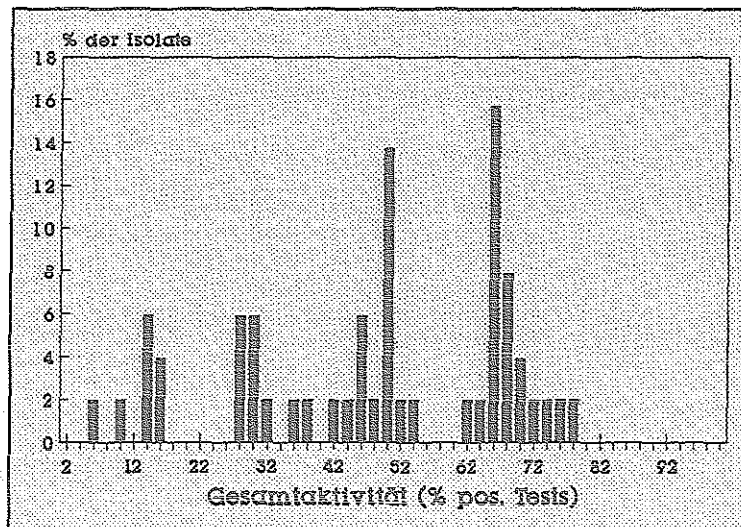


Abb. III.17 Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten in der Population des Reaktorwassers unter Berücksichtigung der Isolate, die von allen drei Medien zur Primärisolierung gewonnen wurden.

a



b



c

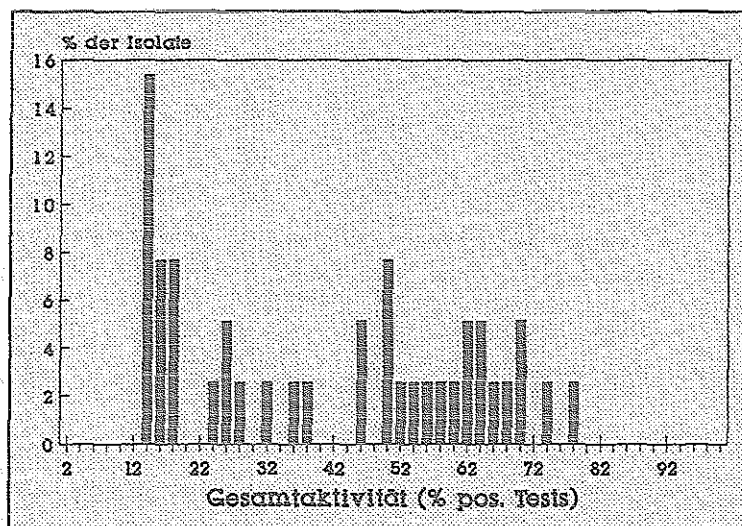


Abb.III.18 Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten der Population im Reaktorwasser in Abhängigkeit von der zur Primärisolierung verwendeten Medien (a: Reasoner 2-Medium; b: Nitratnährbouillon; c: Nährbouillon).

Die Abb.III.18 zeigt, wie die Populationsverteilung im Reaktorwasser durch die Isolate der einzelnen Medien bestimmt wird.

Die Verteilung für NB zeigt den gleichen Umfang (14 bis 78% Aktivität) wie für den Auslauf. Verstärkt werden Isolate mit niedriger Aktivität um 14% isoliert. NB liefert den größten Teil der Isolate dieses Maximums der Gesamtverteilung des Reaktors. Verstärkt werden nach Primärisolierung mit NB Isolate mit 50% Aktivität beobachtet, die im Auslauf nicht zu finden sind. NNB liefert Isolate des Maximums der Gesamtverteilung um 66%, sowie um 50%, die ebenfalls nicht im Auslauf vertreten waren. R2 trägt bei den Isolaten aus dem Reaktor kaum zur Gesamtverteilung bei. Dies ist auf die nach der Primärisolierung erfolgte Überimpfung auf NA-Medium zurückzuführen, bei der vermutlich viele oligocarbophile Bakterien verloren gehen. Die wenigen erzielten Isolate zeigen eine Häufung bei niedrigen Aktivitäten.

Es wurde deutlich, daß die Verteilung der Gesamtaktivitäten im Reaktor heterogener ist als im Auslauf. Die Bakterien des Auslaufs haben eine zu höheren Werten hin verschobene Aktivität, wie ein Vergleich von Median und 90% Percentile zeigt.

Während NB kaum zu den Isolaten des Auslaufs beiträgt, gilt dies für R2 im Reaktor. In beiden Fällen ist die geringe Anzahl von Isolaten zu beachten (NB: n=39 Isolate; R2: n=14 Isolate).

Im Reaktor vorherrschende oligocarbophile Bakterien werden mit R2 angereichert und gehen bei Passage auf NB verloren. Deutlich zeigt dies der Vergleich von Reaktor NB mit Auslauf R2. Verbleibende Isolate spiegeln deshalb die Häufigkeitsverteilung von NB wieder. Im Auslauf kommt es zu einer Verschiebung der Bakterienpopulation in Richtung stärker aktive Bakterien.

Identifikation der Bakterien

Das BIOLOG-System zeigte unter anderem folgendes Problem: Es wurde eine große Gruppe von Klebsiella und Enterobacter identifiziert, die derart hohe Aktivitäten nach 24 Stunden zeigten (95 bis 99% positive Tests), daß entsprechend Herstellerangaben die Bestimmung nach 4-stündiger Inkubation wiederholt wurde. Nach 4 Stunden war dagegen der Wuchs so gering, daß keine Identifikation möglich war. Diese Isolate sind deshalb als nicht identifiziert einzuordnen. Insgesamt sind 31 von 66 Isolaten im Auslauf nicht identifiziert worden und im Reaktorwasser 16 von 75 (in Anhang 1 werden die Ergebnisse der Identifizierung bzw. Charakterisierung der Isolate ausführlich dargestellt).

Tab.III.4		Identifikationsergebnisse Gram-negativer Isolate des Reaktorwassers und des Auslaufs mit dem BIOLOG-System	
	Reaktorwasser	Auslaufwasser	
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	10	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	7	5	
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	-	1	
<i>Clavibacter michiganense</i>	3	3	
<i>Flavomonas oryzae</i>	-	-	
<i>Haemophilus ducrey</i>	-	-	
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	-	-	
<i>Moraxella spec.</i>	2	3	
<i>Moraxella atlantae</i>	5	-	
<i>Moraxella bovis</i>	1	1	
<i>Ochrobacterium anthropi</i>	3	-	
<i>Pseudomonas spp.</i>	2	1	
<i>Ps. cichorii</i>	-	-	
<i>Ps. corrugata</i>	15	5	
<i>Ps. facilis</i>	9	3	
<i>Ps. fragi</i>	-	-	
<i>Ps. marginalis</i>	-	1	
<i>Ps. putida</i>	-	-	
Σ (identifiziert)	57	23	
Σ (nicht identifiziert)	6	8	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	11	
<i>Klebsiella terrigena</i>	1	-	
<i>Vibrio anguillarum</i>	1	-	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	1	
<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	
<i>Psychrobacter immobilis</i>	-	-	
Σ (identifiziert)	2	12	
Σ (nicht identifiziert)	10	23	

Tab.III.5	Identifikationsergebnisse von Referenzstämmen mit dem BIOLOG-System
Referenzstamm	BIOLOG
<i>Alcaligenes faecalis</i> DSM 30030 <i>Ps. alcaligenes</i> DSM 50342 <i>Alcaligenes eutrophus</i> DSM 428 <i>Ps. denitrificans</i> DSM 1650 <i>Ps. fluorescens</i> ATCC 17563 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Alcaligenes denitrificans</i> DSM 30026 <i>Ps. alcaligenes</i> DSM 50342 <i>Alcaligenes eutrophus</i> DSM 531 <i>Ps. alcaligenes</i> DSM 50342 <i>Azospirillum brasiliense</i> DSM 1690 <i>Ps. aeruginosa</i> DSM 50071 <i>Ps. fluorescens</i> DSM 50090 <i>Ps. putida</i> DSM 291 <i>Aeromonas hydrophila</i>	nicht ident.; <i>Alcaligenes faecalis</i> nicht identifiziert nicht identifiziert nicht identifiziert nicht identifiziert <i>Ac. spec.</i> ; <i>Ac. johnsonii</i> <i>Ac. lwoffii</i> ; nicht identifiziert <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> nicht identifiziert <i>Comamonas acidovorans</i> <i>Moraxella spec.</i> <i>Moraxella bovis</i> ; nicht ident. <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Ps. corrugata</i> <i>Ps. putida</i> <i>Serratia liquefaciens</i>

Clusteranalysen

Die beschreibende Statistik der Clusteranalyse ermöglicht eine vereinfachte Darstellung der Populationsverteilung. So ist mit dieser Methode ein Vergleich der isolierten Gram-positiven Bakterien möglich.

In der Clusteranalyse werden mögliche Identifikationen mit angegeben, um die Analyse zu erleichtern. Die taxonomischen Bezeichnungen besitzen in diesem Zusammenhang rein deskriptiven Charakter und sind nicht als Identifikation zu werten. Die Dendrogramme der Clusteranalysen zeigen die Übereinstimmung ($S_{jac} = \Sigma_{+/+} / (\Sigma_{+/+} + \Sigma_{+/-})$; relative Einheiten) bzw. die Differenzen ($D = 1 - S_{jac}$) zwischen den ähnlichsten Isolaten zweier Cluster.

Ausgehend von dem Zustand "ein Isolat/ein Cluster" werden die Clustergrenzen erweitert, bis schließlich sämtliche Isolate in einem Cluster zusammengefaßt sind.

Die Definition der Clustergrenzen erfolgt anhand der Identifikationen, der Referenzstämme und von Doppelbestimmungen.

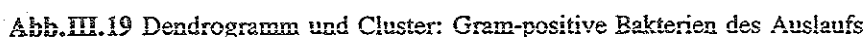
Die angegebenen Niveaus, auf denen die Grundcluster festgelegt werden, dienen der Orientierung und geben einen ersten Überblick, von dem aus die weitere Gruppierung erfolgt. Dieses Niveau ermöglicht den Vergleich von heterogenen und homogenen

Gruppen. Die Gram-positiven Isolate können so in Gruppen zusammengefaßt werden, die unter Zuhilfenahme der biochemischen Profile und Aktivitäten einen Einblick in die Verteilung dieser Bakterien ermöglichen. Mit diesen Gruppen kann ein Vergleich der Gram-positiven Population zwischen Reaktorwasser und Auslaufwasser erfolgen.

Die Gram-negativen Bakterien werden entsprechend analysiert. Hier kann allerdings auch eine taxonomische Einteilung erfolgen, da Identifikationen der Bakterien und Referenzstämme vorliegen. Die Clusteranalyse ermöglicht die Beurteilung dieser Identifikationen.

Charakterisierung der Gram-positiven Bakterien im Auslaufwasser

Das BIOLOG-System liefert auf dem 50%-Niveau sieben übergeordnete Cluster für 18 Gram-positive Isolate. Sie sind zwei verschiedenen Hauptgruppen A und B mit nur 15% Übereinstimmung (S_{jac} in %) zwischen den ähnlichsten Isolaten zuzuordnen. Cluster 3...7 der Gruppe B enthalten schwach aktive Isolate (4 bis 6% positive Tests) mit weniger als 50% Übereinstimmung untereinander. Die falsche taxonomische Einordnung durch das Testsystem in die Systematik der Gram-negativen zeigt "Moraxella"-ähnliche biochemische Profile. Hauptgruppe A umfaßt Isolate mit 50 bis 76% positive Tests. Deutlich zu unterscheiden ist Isolat ANOE51 (13,7% Aktivität) und 8NNA50 (23 bis 26% Aktivität), die eine schwache Übereinstimmung zum Reaktionsmuster von *Clavibacter michigense* (Gram-negativ) zeigen. Die geringe Übereinstimmung von 31% der beiden Isolate deutet auf eine große Variabilität dieses Taxons hin. Auf dem 70% Niveau lassen sich hier Isolate mit 76% Aktivität (ANNG50) und 65% Aktivität (ARO2D2, ARR2C2) unterscheiden. Die verbleibende größte beobachtete Gruppe mit acht Isolaten enthält zumeist mäßig aktive Bakterien (34 bis 44% positive Tests), aber auch zwei mit 67 bzw. 80% Aktivität.

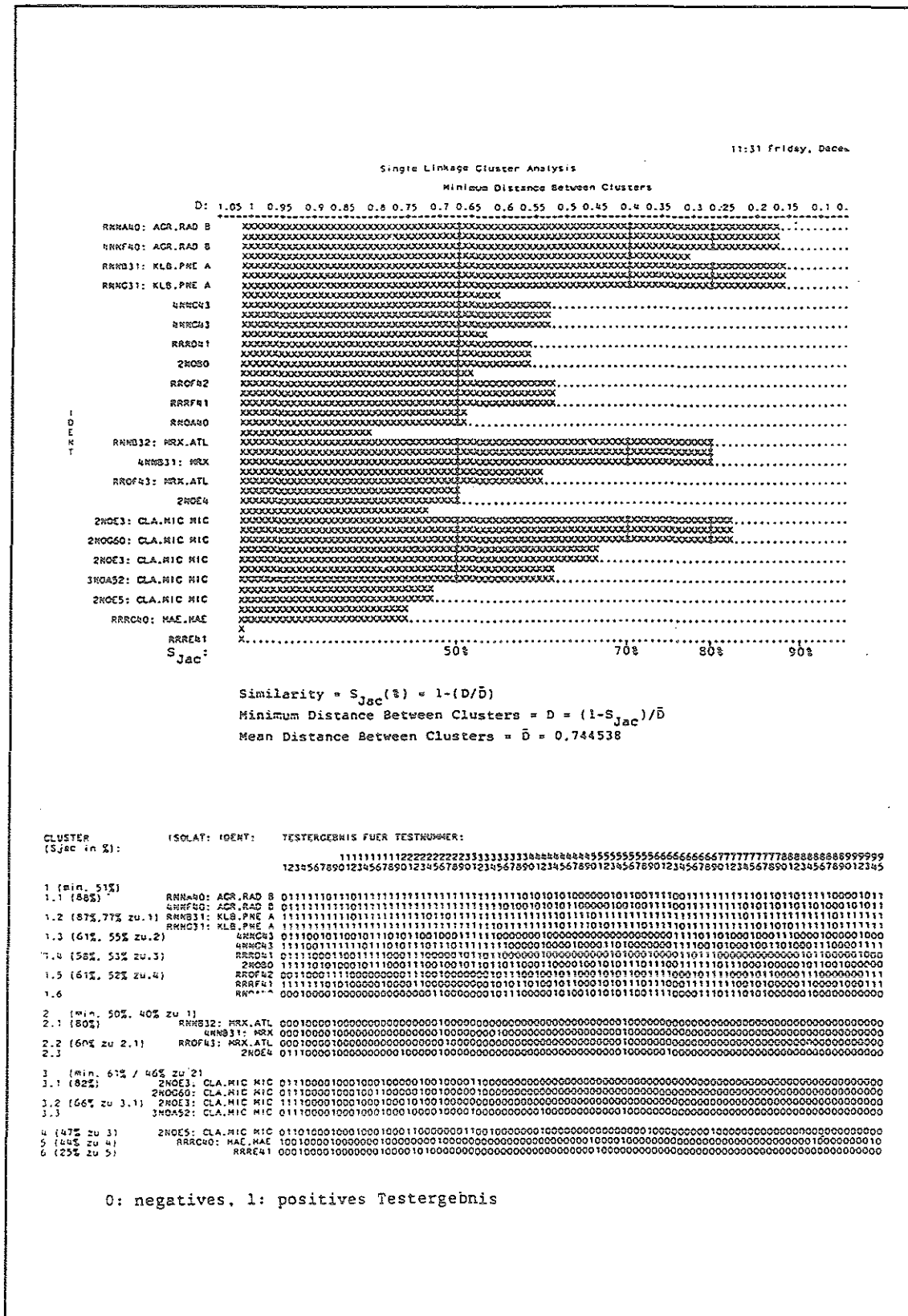


Charakterisierung der Gram-positiven Bakterien des Reaktorwassers

Auch hier sind wie beim Auslauf Doppelbestimmungen und 6 Isolate zweifelhaften Gram-Verhaltens zu beobachten. Sie sind mit * bzw. Unterstreichung des Isolatnamens gekennzeichnet.

20 eindeutig Gram-positive Isolate des Reaktorwassers wurden mit dem BIOLOG-System charakterisiert.

In den Abbildungen enthaltene "Identifikationen" des Testsystems kennzeichnen biochemische Profile Gram-positiver Bakterien, die denen Gram-negativer Taxa entsprechen. Sie besitzen keinen systematischen Wert und dienen lediglich dem Vergleich.



Es sind Doppelbestimmungen enthalten, die 61 % bzw. 62 % Übereinstimmung (S_{jac} in %) zeigen. Sie bieten einen Anhaltspunkt für die Definition der Cluster. Für die Bestimmung der übergeordneten Cluster wurde das 50 % Niveau als Grenze angesetzt. Das Dendrogramm zeigt ein nicht einzuordnendes, schwach aktives Isolat (6,3 % positive Tests) mit nur 25 % Übereinstimmung zum nächstähnlichen Isolat. Die auf dem 50 % Niveau zu unterscheidenden 6 Cluster zeigen eine deutliche Trennung nach der Aktivität der Isolate (vergl. Abb.III.20). Cluster 1.1. und 1.2. umfassen 4 hochaktive Isolate mit 77 % Übereinstimmung. Davon getrennt werden auf 56 % Niveau die Cluster 1.3. bis 1.6. mit Isolaten von 34 bis 54 % Aktivität. Cluster 2 enthält drei "Moraxella"-ähnliche Isolate geringerer Aktivität (4 bis 6 % positive Tests), sowie eines mit vermittelnder Position zum nächsten Cluster mit "Clavibacter"-ähnlichen Isolaten (10 bis 15 % positive Tests). Wie schon beim Auslauf bestätigt sich hier die große Variabilität der Gram-negativen Taxa "Moraxella" und "Clavibacter". Cluster 4, 5 und 6 enthalten ebenfalls einige Isolate mit nur 25 % S_{jac} zwischen Cluster 5 und 6. In Analogie zum Dendrogramm des Auslaufs ist Cluster 6 aufgrund der geringen Übereinstimmung als eine Hauptgruppe zu betrachten. Der Vergleich mit den Anreicherungsmedien zeigt, daß die hochaktiven Cluster 1.1. und 1.2. nur mit NNB angereichert wurden. Gleiches gilt für das Cluster 3 mit "Clavibacter"-ähnlichen Isolaten einschließlich der Isolate 2NOE4 und 2NOE5. Die beiden Isolate mit nur 46 bzw. 47 % S_{jac} werden aufgrund der beobachteten Variabilität noch dem Cluster 3 zugeordnet. Hier zeigt sich der Tailing-Effekt der Single-Linkage-Methode der Clusteranalyse.

Die Differenz ($D = 1 - S_{jac}$) zwischen den äußersten Isolaten zweier Cluster wird geringer als die Differenz zu den Centroiden der Cluster (d.h., daß in der Vektordarstellung zwei nahe benachbarte Punktwolken vereint würden).

Faßt man Cluster 2, 3 und 4 zusammen, wird deutlich, daß die verbleibenden schwach aktiven Bakterien anderen physiologischen Gruppen entstammen, die speziell mit NNB bzw. R2 angereichert und isoliert wurden.

Mäßig aktive Bakterien (30 bis 54 % positive Tests) wurden dagegen von allen Medien isoliert. Effekte der Isolierungs- und Anreicherungsbedingungen waren nicht feststellbar.

Charakterisierung und Identifizierung Gram-negativer Bakterien des Auslaufs mit dem BIOLOG-System

Gram-negative Bakterien können mit diesem Testsystem identifiziert werden. Um Fehlbestimmungen zu revidieren, wurde eine Clusteranalyse mit Referenzstämmen durchgeführt. Das begrenzte Spektrum dieser Stämme konnte keine vollständige Lösung bringen, aber die Zugehörigkeit verschiedener Gruppen klären und auch Verwechslungsmöglichkeiten aufdecken (Cluster und Dendrogramm siehe Anhang 1). In Anhang 2 sind die Dendrogramme und Cluster für die Gram-negativen Isolate des Auslaufs wiedergegeben. Die Numerierung der Cluster erfolgte anhand eines festen Limits von 70% S_{jac} . Hiervon ausgehend wurden größere, heterogene Cluster zusammengefaßt, aber auch Subcluster definiert. Als Entscheidungshilfe dienten Doppelbestimmungen, die für schwach aktive Isolate minimal 30% Übereinstimmung, für stärker aktive Isolate (>40% Aktivität) mindestens 80% Übereinstimmung zeigten. Die Clusterung zeigt eine deutliche Ordnung nach der Aktivität der Isolate, die der taxonomischen Einordnung folgt.

Die BIOLOG-Identifikationen ergaben folgende Gruppen:

Pseudomonaden:

"*Pseudomonas fluorescens*-Gruppe"

Für die *Ps. fluorescens*-Gruppe soll der Anhang 2 exemplarisch genauer erklärt werden.

Hierbei handelt es sich um eine Gruppe, die die *Ps. fluorescens*-Referenzstämmen enthält, die jedoch nicht korrekt als *Ps. corrugata* identifiziert wurden ($\Sigma=5$): Cluster 1.10. bis 1.15. mit einer Aktivität von 48 bis 60%. Die Aktivität ist der Prozentsatz positiv ausgefallener Tests des BIOLOG-Systems, das insgesamt 95 Testsubstrate umfaßt. Im Computerausdruck des Anhangs sind die positiv ausgefallenen Tests mit "1" markiert. Enthält ein Cluster mehrere Isolate, so wird im Anhang nach der Clusterbezeichnung, z.B. 1.12, in einer Klammer als erstes das Maß der Übereinstimmung der Isolate dieses Clusters untereinander und dann die Übereinstimmung zum vorherigen Cluster angegeben, z.B. (92 %, 88 % zu .11).

"*Pseudomonas marginalis*"

Ein deutlich von anderen Pseudomonaden zu unterscheidendes Cluster, dessen einziges

Mitglied als solches identifiziert wurde ($\Sigma=1$): Cluster 1.16. mit einer Aktivität von 72%.

"*Pseudomonas spec.*"

Isolate mit fraglicher Artidentifizierung ($\Sigma=4$): Cluster 1.17., 1.18. und 1.24. mit 50 bis 57% Aktivität.

"*Pseudomonas putida*"

Ein nicht identifiziertes Isolat mit hoher Übereinstimmung zum *Pseudomonas putida*-Referenzstamm ($\Sigma=1$): Cluster 1.20. mit einer Aktivität von 48%.

"*Pseudomonas facilis*"

Eine heterogene Gruppe von Pseudomonaden mit fraglicher Artidentifikation für *Ps. facilis* ($\Sigma=12$): Cluster 9.1. bis 9.9. mit einer Aktivität von 36 bis 39%.

"*Pseudomonas alcaligenes*"

Die taxonomische Einordnung erfolgte aufgrund der Zuordnung des Referenzstammes. Identifiziert wurde "*Moraxella*" ($\Sigma=2$): Cluster 18 und 21 mit 8% Aktivität.

Sonstige:

"*Klebsiella*"

Isolate, die nach 24 Stunden Inkubation eine hohe Aktivität zeigten und nicht zu identifizieren waren: Die 24-Stunden-Bestimmung ergab *Klebsiella pneumoniae* bzw. *Enterobacter gergoviae*. Die 4-Stunden-Bestimmung ergab eine Nichtidentifikation. Die Benennung hat lediglich einen beschreibenden Charakter ($\Sigma=14$): Cluster 1.1. bis 1.5. mit 90 bis 96% Aktivität.

"*Agrobacterium*"

Isolate, die als *A. radiobacter* identifiziert wurden ($\Sigma=5$): Cluster 1.7. mit 67 bis 77% Aktivität.

"*Alcaligenes xylosoxidans*"

Als *A. xylosoxidans* bzw. ähnliche identifiziert. Die Identifikation ist durch *Alcaligenes*-Referenzstämme bestätigt ($\Sigma=2$): Cluster 4.1. mit 41 bis 42% Aktivität.

"Moraxella"

Zwei heterogene Gruppen schwacher Aktivitäten und geringer Übereinstimmung ($\Sigma=4$): Cluster 11 bis 14 mit 14 bis 21% Aktivität und Cluster 32 und 33 mit 5% Aktivität.

"Clavibacter"

Eine heterogene Gruppe schwach aktiver Isolate, die als *"Moraxella atlantae"* bzw. *"Clavibacter michiganense"* oder ähnliche identifiziert wurden. Die Zuordnung ist fraglich ($\Sigma=8$): Cluster 24 bis 31 mit 3 bis 19% Aktivität.

"nicht identifiziert"

a) hochaktive Bakterien, die sich nicht zuordnen lassen. Eine Identifikation spricht für "Ochrobakterien" ($\Sigma=2$): Cluster 1.8 und 1.9. mit 70 bis 76% Aktivität. ($\Sigma=4$): Cluster 1.17., 1.18. und 1.24. mit 50 bis 57% Aktivität.

b) nicht identifizierbar, da nicht zuzuordnen ($\Sigma=1$): Cluster 9.10. mit 27% Aktivität.

Einige offensichtliche Fehlidentifikationen (*Ps. corrugata*, *Moraxella*) konnten mittels Clusteranalyse revidiert werden. Die Clusteranalyse folgt der Aktivitätsverteilung, die einen großen Aktivitätsbereich umfaßt (min. 3%, max. 99%).

Charakterisierung und Identifizierung Gram-negativer Bakterien des Reaktorwassers mit dem BIOLOG-System

Die graphische Darstellung der Cluster und Dendrogramme ist in Anhang 3 zu finden. Als Gruppen (unter Berücksichtigung der Ergebnisse vom Auslauf) wurden festgelegt:

Pseudomonaden:*"Ps. fluorescens"*

Für *Ps. fluorescens* soll der Anhang 3 exemplarisch genauer erklärt werden.

Wie beim Auslauf waren die als *"Pseudomonas corrugata"* identifizierten Bakterien *"Ps. fluorescens"* zuzuordnen, da die Referenzstämme (als *"Ps. corrugata"*-ähnlich identifiziert) diese Gruppe einschlossen ($\Sigma=17$): Cluster 4.6. bis 4.10. mit 53 bis 63% Aktivität. Die Aktivität ist der Prozentsatz positiv ausgefallener Tests des BIOLOG-

Systems, das insgesamt 95 Testsubstrate umfaßt. Im Computerausdruck des Anhangs sind die positiv ausgefallenen Tests mit "1" markiert. Wie die "Agrobacterium"-Gruppe waren die Isolate einander sehr ähnlich. Eine weitere Differenzierung erfolgte jedoch auf dem 90 bis 95% Niveau. Enthält ein Cluster mehrere Isolate, so wird im Anhang nach der Clusterbezeichnung, z.B. 4.7, in einer Klammer als erstes das Maß der Übereinstimmung der Isolate dieses Clusters untereinander und dann die Übereinstimmung zum vorherigen Cluster angegeben, z.B. (92 %, 77 % zu .6).

"*Ps. facilis*"

Eine heterogene Gruppe von Isolaten, die als "*Ps. spec.*", "*Ps. facilis*" oder ähnliche identifiziert wurde ($\Sigma=12$): Cluster 6 mit 27 bis 28% Aktivität.

"*Ps. spec.*"

Ein Isolat, als "*Ps. fragi*"-ähnlich identifiziert. Möglich wäre laut Bochner [1990] eine Verwechslung mit "*Ps. putida*" Gruppe A. Der Referenzstamm *Ps. putida* (D 291) wurde als Gruppe B identifiziert und von diesem Isolat durch *Paracoccus denitrificans* (nicht identifizierbar, da nicht in der Datenbank) getrennt. Eine Verwechslung mit dem benachbarten Cluster für *Ps. aeruginosa* (D 50071) war ausgeschlossen [Bochner, 1990]. *Pseudomonas* ist als Taxon anzunehmen ($\Sigma=1$): Cluster 4.16. mit 61% Aktivität.

"*Ps. alcaligenes*"

Aufgrund der nach beiden Seiten benachbarten Doppelbestimmungen für *Ps. alcaligenes* (D 50342) wurden die als "*Moraxella spec.*", "*Moraxella atlantae*" und "nicht identifizierten" Isolate der Gruppe "*Ps. alcaligenes*" zugeordnet. Hierfür sprachen auch die Erfahrungen mit der Auslaufpopulation: Von daher war die geringe Aktivität und Varianz von *Ps. alcaligenes* bekannt; auch konnten dort bereits "*Moraxella atlantae*"-Isolate dieser Art zugeordnet werden ($\Sigma=6$): Cluster 21, 26 und 33 mit 3 bis 12% Aktivität.

Sonstige

"*Pantoea*"

Ein Isolat mit schwacher Übereinstimmung zu *Pantoea agglomerans* (ehemals: *Enterobacter*) wurde bestimmt. Trotz der engen Verwandtschaft mit *Enterobacter gergoviae* war dieses Isolat durch die Zuordnung zu *Aeromonas hydrophila* (WO48)

deutlich von der (falsch identifizierten) "Klebsiella"-Gruppe getrennt, die im Auslauf auch "Enterobacter"-Identifikationen enthielt. Die Identifikation und Zuordnung ist fraglich. ($\Sigma=1$): Cluster 3.2. mit 59% Aktivität.

"Agrobacterium radiobacter"

Eine Gruppe von Isolatén hoher Aktivität (alle als "*A. radiobacter*" identifiziert), die erst über 92% S_{jac} in 3 Subcluster unterschieden wurde ($\Sigma=16$): Cluster 4.2., Subcluster; 66 bis 74% Aktivität (8 Isolate), 68 bis 78% Aktivität (5 Isolate), 70 bis 77% Aktivität (3 Isolate).

"Klebsiella"

Eine Gruppe hochaktiver Isolate, die aufgrund einer zusätzlichen 4-Stunden-Messung als nicht identifiziert anzusehen waren ($\Sigma=5$): Cluster 4.3. und 4.4. mit 94 bis 97% Aktivität.

"Ochrobactrum anthropi"

Aufgrund der 4-Stunden-Messung ebenfalls nicht identifiziert ($\Sigma=4$): Cluster 45 mit 67 bis 77% Aktivität.

"nicht identifiziert"

a) Aufgrund der Übereinstimmung zu benachbarten Clustern mit Pseudomonaden und der schwachen Identifizierung von Pseudomonas-Arten für zwei der Isolate, wurde für diese Gruppe ebenfalls "Pseudomonas" vermutet. ($\Sigma=3$): Cluster 4.11., 4.12. und 9 mit 47 bis 78% Aktivität.

b) Nicht identifizierte Isolate mit geringer Übereinstimmung zu benachbarten "Pseudomonas" bzw. "Alcaligenes"-Clustern, für die keine weiteren Informationen zur Verfügung standen. ($\Sigma=3$): Cluster 5 mit 66% Aktivität; Cluster 7 mit 45% Aktivität; Cluster 8 mit 56% Aktivität.

"Alcaligenes xylosoxidans"

Aufgrund Einbeziehung in die gut differenzierte Gruppe der Alcaligenes-Referenzstämme und den Erfahrungen mit der Population vom Auslauf war die Identifikation anzunehmen ($\Sigma=2$): Cluster 10.2. mit 41 bis 42% Aktivität.

"*Moraxella*"

a) Eine Gruppe von Isolaten, die z.T. als "*Acinetobacter johnsonii*" oder ähnlich nicht identifiziert oder als "*Moraxella bovis*"-ähnlich bestimmt wurden, zeigte keine Übereinstimmung zu dem als "*Acinetobacter johnsonii*" identifizierten Referenzstamm *Acinetobacter calcoaceticus* (WO16), d.h. die Identifikation war unwahrscheinlich ($\Sigma=5$): Cluster 16 bis 19 mit 14 bis 24% Aktivität.

b) Als "*Moraxella bovis*" identifizierte Isolate wurden ebenfalls eingeordnet: Cluster 31 und 32 mit 6 bis 10% Aktivität.

"*Clavibacter*"

Die Gruppe umfaßt 2 Cluster der Identifikation "*Clavibacter michiganense*" oder ähnlich ($\Sigma=5$): Cluster 28 bis 30 mit 8 bis 26% Aktivität.

Das BIOLOG-System ermöglichte eine gute taxonomische Gruppierung der Identifikationen.

Die "*Pseudomonas*"-Gruppe war im Reaktor offenbar sehr umfangreich vertreten. Das System wurde dieser Gattung nur in begrenztem Maße gerecht. Eine größere Auswahl an Referenzstämmen ist für bessere Analysen unumgänglich.

Vergleich der Identifikationen für die Ansatzmedien

Der Vergleich der BIOLOG-Identifikationsgruppen mit den Ansatzmedien zeigte deutlich, daß auch hier wieder wie beim Auslauf R2 die schwach aktiven Arten "*Clavibacter*" und "*Moraxella*" lieferte (nur ein *Klebsiella* mit R2 isoliert). Dies bestätigte die Annahme, daß R2 die oligocarbophilen Bakterien des Reaktors anreichert. Durch das Überimpfen auf NA gingen sehr viele dieser Bakterien verloren, so daß hier nur wenige Taxa, die auch auf reicheren Medien wachsen können, erfaßt wurden. Hierzu waren *Clavibacter* und ein Teil der heterogenen "*Moraxella*"-Gruppe zu rechnen.

"*Ochrobactrum*" und "*Alcaligenes xylosoxidans*" wurden nur mittels NNB isoliert.

Als eine große Schwäche des BIOLOG-Systems muß sicher gewertet werden, daß die *Pseudomonaden* nicht korrekt identifiziert wurden. Dies ist umso tragischer, da, wie

später dargelegt, einige Pseudomonaden eine wichtige Indikatorfunktion für den Zustand der Denitrifikationsanlage ausmachen.

Bei der Anwendung des BIOLOG-Systems zur Identifizierung der Bakterienpopulation einer RBR-Laboranlage konnten 47% aller Gram-negativen Bakterien des Auslaufs nicht identifiziert werden. Bei den Bakterien, die im Reaktor flotierten, machte die Fraktion der nichtidentifizierten noch immerhin knapp über 21% der Gram-negativen aus.

3.4.2 Bakterienanalyse an der halbtechnischen RBR-Pilotanlage Königschaffhausen

Zum Zeitpunkt der Probenahme galten folgende Betriebsparameter:

Tab.III.6	Betriebsparameter der RBR-Pilotanlage in Königschaffhausen	
Volumenstrom:	4000	l/h
Aufenthaltszeit:	15	min
Temperatur (Einlauf):	9,2	°C
Temperatur (Auslauf):	9,4	°C
pH-Wert (Einlauf):	7,09	
pH-Wert (Auslauf):	7,41	
Sauerstoffgehalt (Einlauf):	7,3	mg/l
Sauerstoffgehalt (Auslauf):	0	mg/l
Nitratkonzentration (Einlauf):	65	mg/l
Nitratkonzentration (Auslauf):	14	mg/l
Nitritkonzentration (Auslauf):	0,36	mg/l
Ethanol (Einlauf):	29,2	mg/l
Eisen (Rohwasser):	0,04	mg/l
Eisenzudosierung:	0,01	mg/l
Eisen (gesamt):	0,05	mg/l
Denitrifikationseffektivität	0,553	kg N/m ³ · d

Die folgende Bakterienanalyse wurde nur vom Auslaufwasser des Reaktors, nicht jedoch vom Biofilm auf dem Trägermaterial der einzelnen Kammern, durchgeführt.

Tab.III.7		Zelldichte im RBR-Auslaufwasser bestimmt nach verschiedenen z.T. nicht kompatiblen Methoden	
KBE (NA)	LKZ-MPN		Deni-MPN
aerob		anoxisch	
$7,7 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^8$		$5 \cdot 10^7$

Es wurden 19 Isolate, die auf Nähragar wuchsen, untersucht, wovon 9 als *Pseudomonas fluorescens* identifiziert wurden. *Pseudomonas fluorescens* macht damit den Hauptanteil der auf Nähragar bei der Primärisolierung wachsenden Keime aus. Häufig kamen auch *Ps. stutzeri* und *Kingella denitrificans* vor. 2 von 19 Isolaten konnten nicht näher identifiziert werden. 84% der Isolate waren Denitrifikanten und 11% waren Nitratreduzierer. Nur 5% der Isolate waren Gram-positiv.

Keime, die hygienisch bedenklich wären, wie *Ps. aeruginosa* oder Enterobacteriaceen, wurden in dieser Bakterienanalyse nicht festgestellt.

Tab.III.8		Artenspektrum im Auslauf des RBR	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	47%	Denitrifikant	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	16%	Denitrifikant	
<i>Kingella denitrificans</i>	16%	Denitrifikant	
<i>Neisseria mucosa</i>	5%	Denitrifikant	
<i>Bacillus spec.</i>	5%	Denitrifikant	
unidentifiziert (2 Arten)	11%	Nitratreduzierer	

3.4.3 Bakterienanalyse an der Pilotanlage in Wyhl

Zum Zeitpunkt der Probenahme galten folgende Betriebsparameter:

Tab.III.9 Betriebsparameter der RBR-Pilotanlage in Wyhl	
Volumenstrom:	2975 l/h
Aufenthaltszeit:	20 min
Temperatur (Einlauf):	18,8 °C
Temperatur (Auslauf):	18,8 °C
pH-Wert (Einlauf):	7,22
pH-Wert (Auslauf):	7,26
Sauerstoffgehalt (Einlauf):	5,1 mg/l
Sauerstoffgehalt (Auslauf):	0 mg/l
Nitratkonzentration (Einlauf):	57 mg/l
Nitratkonzentration (Auslauf):	11 mg/l
Nitritkonzentration (Auslauf):	<0,1 mg/l
Ethanol (Einlauf):	25,65 mg/l
Eisen (Rohwasser):	0,05 mg/l
Eisenzudosierung:	0,08 mg/l
Eisen (gesamt):	0,13 mg/l
Denitrifikationseffektivität	0,37 kg N/m ³ · d

Tab.III.10 Bakteriendichte in KBE auf den Füllkörpern bzw. im Auslauf nach Aggregatauflösung bzw. Biofilmauflösung mit der kombinierten enzymatisch-mechanischen Methode		
Kammer 1	$1,85 \cdot 10^{12}$	KBE/g Blähton
Kammer 2	$3,70 \cdot 10^{11}$	KBE/g Blähton
Kammer 3	$3,00 \cdot 10^8$	KBE/g Blähton
Auslauf	$7,70 \cdot 10^5$	KBE/ml Auslauf

Den Hauptanteil der Isolate stellten die Gram-negativen Stäbchen.

Tab. III.11		Gruppierung der Isolate auf den Füllkörpern bzw. im Auslauf nach Aggregatauflösung bzw. Biofilmauflösung mit der kombinierten enzymatisch-mechanischen Methode		
	Stäbchen	Gram(-)	Gram(+)	Gram(-) Kokken
Kammer 1	59	51	8	2
Kammer 2	42	31	11	
Kammer 3	43	30	13	
Auslauf	40	32	8	

Die Leistungsfähigkeit des Denitrifikationsreaktors hängt unter anderem von der noch vorhandenen Sauerstoffmenge in den einzelnen Kammern des RBR ab. Der Sauerstoffgehalt sinkt durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien nach kurzer Passage durch den RBR auf Null. In Kammer 1 tritt sauerstoffhaltiges Wasser ein, daher findet man neben den Denitrifikanten Bakterien, die aerob wachsen. In Kammer 2 treten fast nur Denitrifikanten auf. Dieses Ergebnis kann auf die anoxischen Verhältnisse in dieser Kammer zurückgeführt werden. In Kammer 3 ist neben dem Sauerstoff auch schon ein Großteil des Nitrats verbraucht, so daß nitratlimitierte Zustände auftreten und Bakterien mit anderen Stoffwechselmöglichkeiten als der Denitrifikation herausselektioniert werden.

Tab. III.12		Anteil von Denitrifikanten und Nitratreduzierer an der Gesamtpopulation in Prozent	
	Denitrifikanten	Nitratreduzierer	
Kammer 1	50	50	
Kammer 2	95	5	
Kammer 3	75	25	
Auslauf	73	27	

Wie in Tabelle III.13 zu sehen ist, stellten die Pseudomonaden den Hauptanteil der Isolate. Vertreten waren diese u.a. durch *Ps. fluorescens*, *Ps. cepacia*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. pseudoalcaligenes*, *Ps. caryophylli* und *Ps. mendocina*. Daneben wurden aus den verschiedenen Probenorten *Kingella denitrificans* und andere Arten in geringen Mengen isoliert.

Tab.III.13 Artenspektrum in den verschiedenen Abschnitten des RBR und im RBR-Auslauf		
Kammer 1		
<i>Ps. fluorescens</i>	13,6%	Denitrifikant
<i>Ps. cepacia</i>	25,4%	Nitratreduzierer
<i>Ps. caryophylli</i>	8,5%	Denitrifikant
<i>Ps. alcaligenes</i>	8,5%	Denitrifikant
<i>Ps. mendocina</i>	15,3%	Denitrifikant
<i>Kingella denitrificans</i>	6,8%	Denitrifikant
Gram-pos. Stäbchen	11,9%	
nicht identifiziert	10,2%	
Kammer 2		
<i>Ps. fluorescens</i>	2,3%	Denitrifikant
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	13,6%	Denitrifikant
<i>Kingella denitrificans</i>	38,6%	Denitrifikant
<i>Flavobacterium spec.</i>	6,8%	Denitrifikant
Gram-pos. Stäbchen	27,3%	
Gram-pos. Kokken	4,6%	
nicht identifiziert	6,8%	
Kammer 3		
<i>Ps. fluorescens</i>	16,3%	Denitrifikant
<i>Ps. cepacia</i>	7,0%	Nitratreduzierer
<i>Ps. caryophylli</i>	7,0%	Denitrifikant
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	4,7%	Denitrifikant
<i>Kingella denitrificans</i>	25,6%	Denitrifikant
Gram-pos. Stäbchen	30,0%	
<i>Flavobacterium spec.</i>	9,3%	Denitrifikant
Auslauf		
<i>Ps. fluorescens</i>	7,5%	Denitrifikant
<i>Ps. cepacia</i>	10,0%	Nitratreduzierer
<i>Ps. caryophylli</i>	5,0%	Denitrifikant
<i>Ps. alcaligenes</i>	10,0%	Denitrifikant
<i>Ps. mendocina</i>	2,5%	Denitrifikant
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	25,0%	Denitrifikant
<i>Kingella denitrificans</i>	12,5%	Denitrifikant
Gram-pos. Stäbchen	20,0%	
nicht identifiziert	7,5%	

Gesundheitsrelevante Organismen, wie *E. coli*, Enterokokken oder *Ps. aeruginosa* wurden nicht nachgewiesen. Die Gründe dafür werden in Kap. 3.5. erläutert.

3.4.4 Identifizierung der häufigsten Bakterienart in einer Laboranlage des RBR bei hoher Eiseneingangskonzentration

Die Laboranlagen aus Plexiglas zeigten bei hoher Eisenkonzentration im Einlauf immer eine orange-rote Färbung der gesamten Biomasse. Der Organismus, der in allen untersuchten Fällen diese Färbung hervorrief, war *Pseudomonas mendocina*, der 5% der auf NA bei 21°C isolierten Keime ausmachte. Es konnten in diesen Reaktoren keine fluoreszierenden Pseudomonaden nachgewiesen werden, die in anderen Reaktoren nahezu die Hälfte aller auf Nähragar kultivierbaren Bakterien ausmachen. Nicht anwesend war auch *Pseudomonas stutzeri*.

Pseudomonas mendocina ist ein Mikroorganismus, bei dem bis heute keine Siderophore nachgewiesen werden konnten. Sein verstärktes Auftreten bei hohen Eisenkonzentrationen ist möglich, ein Auftreten bei niedrigen Eisenkonzentrationen ist durch den Selektionsdruck der Siderophorbildner unwahrscheinlich (s. Abb.III.21).

3.5 Zusammenhang zwischen Eisenkonzentration im Einlaufwasser des Denitrifikationsreaktors und der Bakterienzusammensetzung

Die Bakterienanalysen an verschiedenen Anlagen ergaben Unterschiede in Bezug auf die Zahl der vorzufindenden Arten, ebenso wie auf die Art der Bakterienstämme. *Ps. fluorescens* war das häufigste Isolat in einigen Reaktoren, wo es fast die Hälfte der auf Nähragar kultivierbaren Bakterien ausmachte. In anderen Anlagen kam *Ps. fluorescens* nur in geringer Zahl oder gar nicht vor. Das gleiche gilt für *Ps. stutzeri*, der nur in einigen Reaktoren auftrat. Es konnte beobachtet werden, daß eine inverse Relation besteht zwischen dem Auftreten von *Ps. fluorescens* und *Ps. mendocina* in den Reaktoren. Stieg der Anteil Isolate der einen Art in einem Reaktor, so nahm die Anzahl der Isolate der anderen Art ab. In extremen Situationen trat nur eine der beiden Arten auf.

Diese Phänomene sind in engem Zusammenhang zu bringen mit der Eisenkonzentration im Einlauf des RBR. Beispiele für Bakterien mit starken Eisenchelatoren sind *Ps. fluorescens* und *Ps. stutzeri*. Dagegen sind bis heute bei *Ps. mendocina* keine Siderophore entdeckt worden. Hohe Eisenkonzentrationen sind deshalb selektierend für

Ps. mendocina, während niedrige Eisenkonzentrationen selektierend für *Ps. fluorescens* und *Ps. stutzeri* sind.

Selbstverständlich kamen neben *Ps. stutzeri*, *Ps. fluorescens* und *Ps. mendocina* noch andere Bakterienarten vor, wobei diesen drei Arten eine eindeutige Indikatorfunktion zugewiesen werden konnte. Diese anderen Arten traten seltener auf, jedoch manchmal in größerer Zahl als die Indikatororganismen. Sie waren komplett abwesend in extremen Situationen der strikten Eisenlimitierung oder Sättigung. Beispiele für solche Arten sind *Ps. alcaligenes*, *Ps. pseudoalcaligenes* und *Ps. cepacia*. Strikt selektive Situationen reduzieren die Zahl der verschiedenen Arten in einem Reaktor.

Es war möglich das fluoreszierende gelb-grüne Siderophor von *Ps. fluorescens*, das Pyoverdin, aus dem Biofilm auf den Füllkörpern mit Aceton zu extrahieren. Quantitative Untersuchungen wurden nicht gemacht. Dies zeigt eindeutig, daß das Siderophor nicht nur unter oxischen Bedingungen gebildet wurde, sondern auch unter anoxischen Denitrifikationsbedingungen.

Diese stark selektierende Wirkung des Eisens in Denitrifikationsreaktoren war nicht nur bei den verschiedenen RBR zu beobachten, sondern auch bei Reaktoren anderer Bauweise (s. Tab.III.14). Als Beispiele für Reaktoren anderer Bauart sind in der folgenden Tabelle der Denipor-Reaktor der Firma Preussag und ein Säulenreaktor im Laborformat von Blasczyk et al. [1980] aufgeführt.

Tab.III.14	Häufigkeit des Auftretens von verschiedenen Pseudomonaden in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im Einlauf einer Denitrifikationsanlage				
	Jülich (LA)	Königschaffhausen (PA)	Wyhl (PA)	Blasczyk (LA)	Denipor (TA)
<i>Ps. aeruginosa</i>	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Ps. fluorescens</i>	0%	47%	7,5%	40%	42%
<i>Ps. stutzeri</i>	0%	16%	0%	21%	8%
<i>Ps. mendocina</i>	5%	0%	2,5%	0%	0%
Eisenkonzentration (Einlauf)/[mg/l]	0,25	0,05	0,13	0,60	0,05
Denitrifikationseffektivität (DE) [kg N/m ³ · d]	0,33	0,55	0,45	3,90	0,70
DE/Eisenkonzentration (Einlauf)	1,32	10	3,44	6,5	14

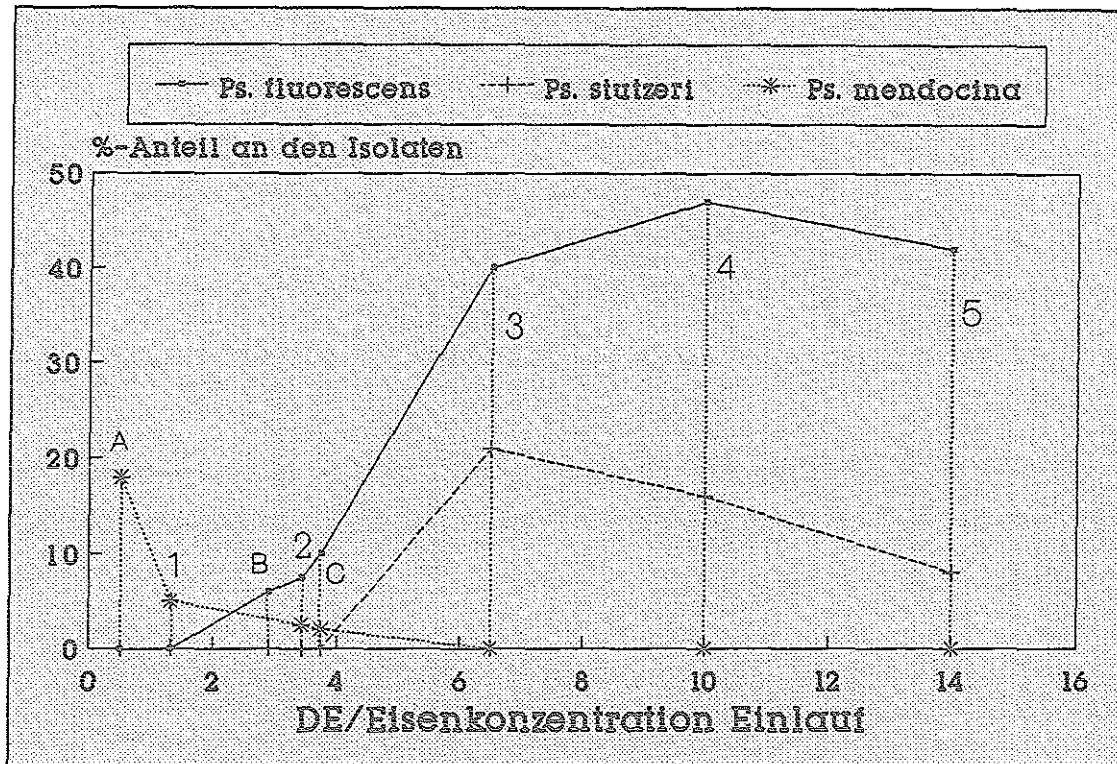


Abb. III.21 Vorkommen von Indikator-Organismen im Reaktorauslauf in Abhängigkeit vom Verhältnis Denitrifikationseffektivität zu Eisen im Reaktor. (1 = Jülich LA, 2 = Wyhl PA, 3 = Blasczyk LA, 4 = Königschaffhausen PA, 5 = Denipor TA) A, B und C sind die Ergebnisse der Versuche mit axenischen Startbedingungen, die in Kapitel 3.7.1 (A), 3.7.2 (B) und 3.7.3 (C) beschrieben werden.

3.6 Siderophorproduktion von ausgewählten Isolaten unter Denitrifikationsbedingungen

In Batch-Versuchen wurde die Pyoverdin-Produktion von *Ps. fluorescens* unter aeroben und unter denitrifizierenden Bedingungen verfolgt. Dabei wurde Meyer und Abdallah-Medium (s. Kapitel 2.2.3) mit verschiedenen hohen Eisenkonzentrationen eingesetzt. Die Pyoverdin-Produktion unter aeroben Verhältnissen war stark abhängig von der eingesetzten Eisenkonzentration. Die Pyoverdin-Produktion war unter denitrifizierenden Bedingungen sehr viel niedriger, jedoch auch hier wieder abhängig von der Eisenkonzentration zu Beginn des Versuches.

Unter denitrifizierenden Bedingungen war das Nitrat der das Wachstum begrenzende Faktor. Gegen Ende der Versuche lagen keine reduzierbaren Stickstoffverbindungen im Medium vor. Da in allen Ansätzen gleich viel Nitrat als Ausgangskonzentration eingesetzt war, gleichen sich die entsprechenden Wachstumskurven stark. Um die von

einer bestimmten Biomasseeinheit gebildete Pyoverdinmenge zu vergleichen, wurde die OD bei 405 nm, die ein relatives Maß für die Pyoverdinmenge ist durch die OD bei 620 nm (= Trübung) dividiert.

Unter oxischen Bedingungen war der Verlauf der Wachstumskurven in den einzelnen Ansätzen stark abhängig vom Eisengehalt des Mediums. Pyoverdin wurde im Ansatz ohne Eisenzusatz besonders ausgeprägt in der logarithmischen Phase des Wachstums gebildet. Bei den beiden Ansätzen mit Eisenzusatz wurde bereits während der logarithmischen Phase des Wachstums permanent die Pyoverdin-Produktion im Vergleich zur Biomassezunahme gedrosselt. Mit Erreichen der stationären Phase pendelte sich die Pyoverdinproduktion in allen drei Fällen langsam auf ein bestimmtes Level ein.

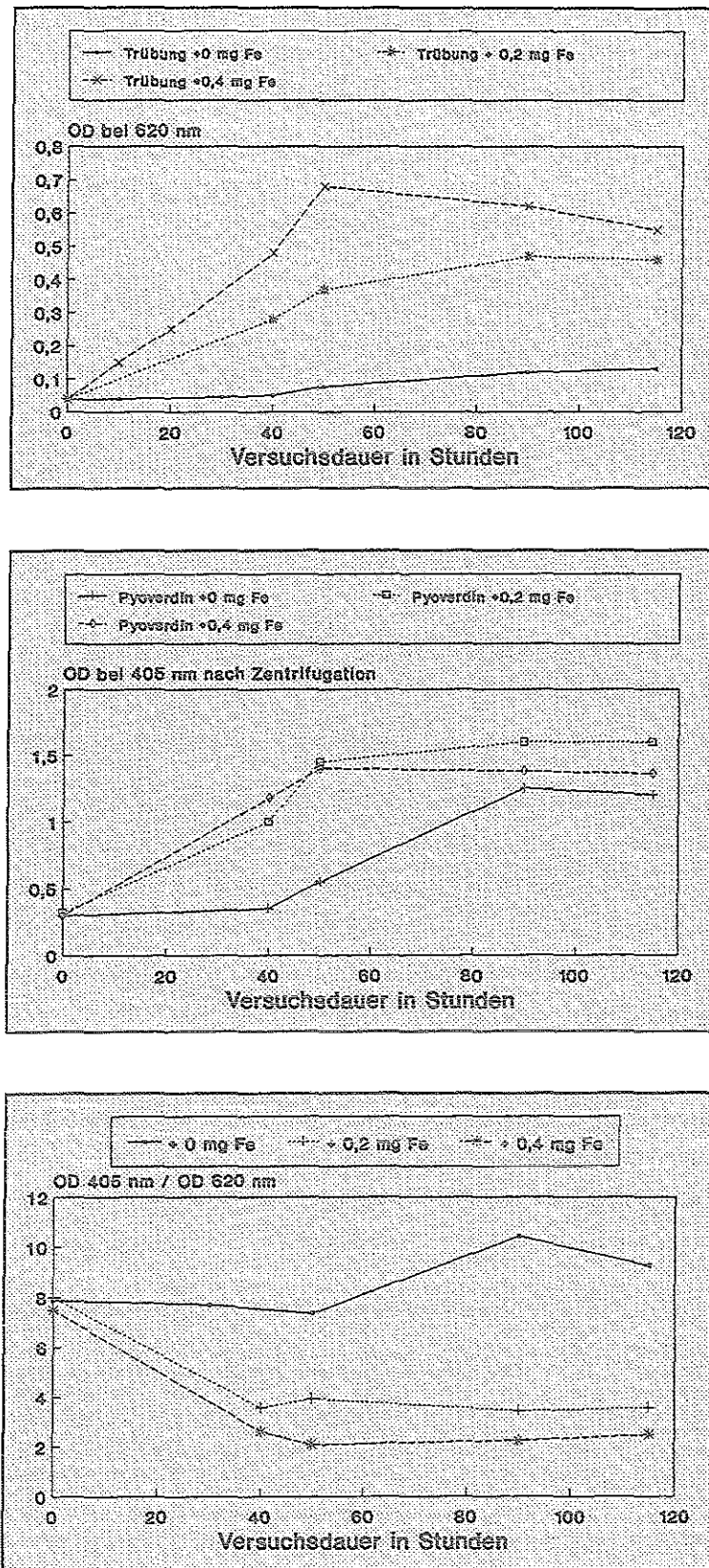


Abb.III.22 Wachstum und Pyoverdine-Produktion von *Ps. fluorescens* bei verschiedenen Eisenkonzentrationen im Medium unter aeroben Verhältnissen.

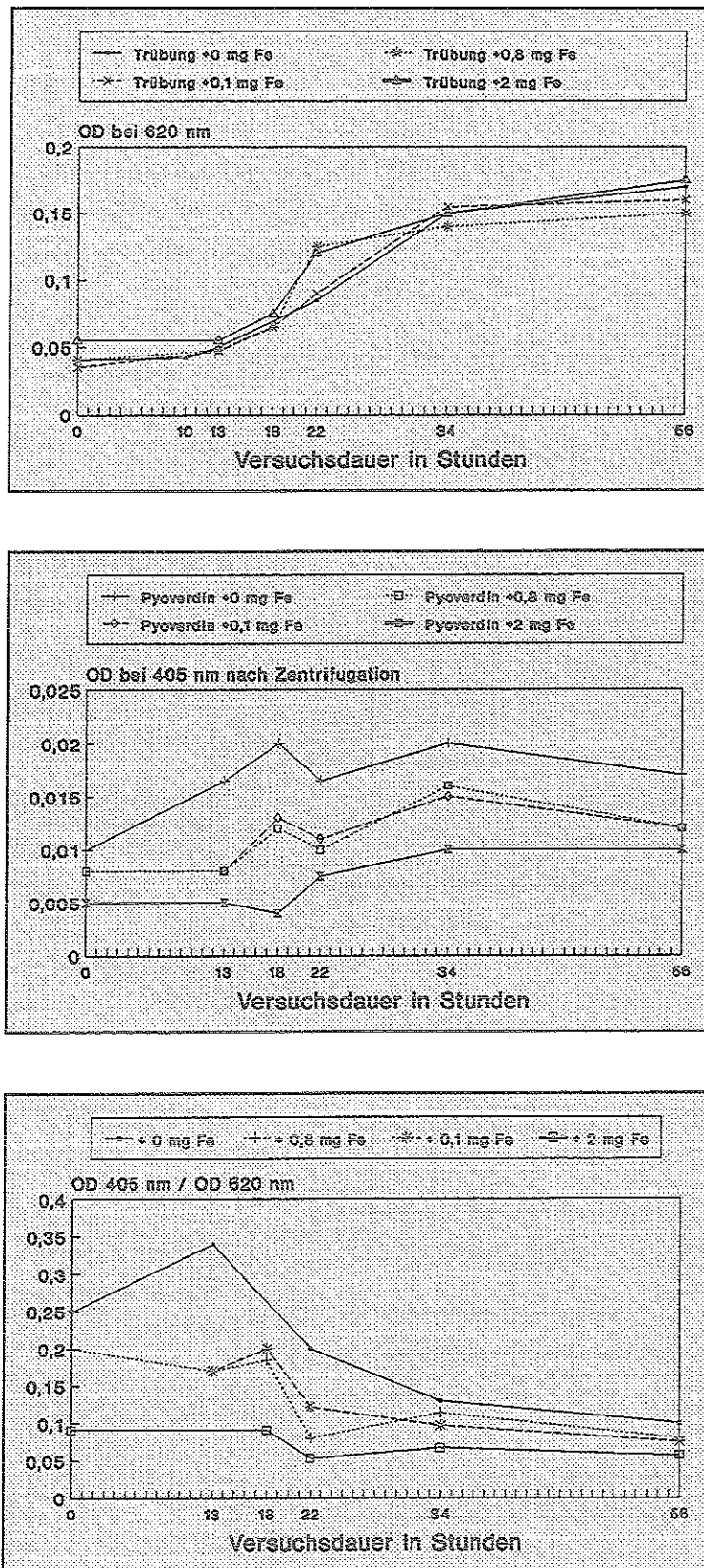


Abb. III.23 Wachstum und Pyoverdinin-Produktion von *Ps. fluorescens* bei verschiedenen Eisenkonzentrationen im Medium unter denitrifizierenden Verhältnissen.

3.7 Betrieb des RBR mit axenischen Kulturen

Während sich bei den Pilotanlagen und den Laborreaktoren der Biofilm ohne Einwirkung von außen aus den im Wasser vorhandenen Bakterien ausbildet, wurde in den folgenden Versuchen die Biofilmbildung mit axenischen Kulturen gesteuert. Anschließend wurde verfolgt, wie sich die Zusammensetzung des Biofilms verändert, wenn unsteriles Wasser den Reaktor durchströmt. Als Reinkulturen zur Biofilmbildung wurden verwendet:

Ps. fluorescens ATCC 17563

Ps. fluorescens DSM 50108

Pseudomonas MS1 RNA-Gruppe I

Tab.III.15	Reaktorversuche mit axenischen Startbedingungen im Überblick		
Versuch-Nr.: Inokulum	1 <i>Ps. fluorescens</i> ATCC 17563	2 <i>Ps. MS1</i> Isolat aus RBR	3 <i>Ps. fluorescens</i> DSM 50108
Anfangstiter KBE/ml	$2,42 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$
1. Versuchsphase (Batchphase)	7 Tage Dauer	11 Tage Dauer	8 Tage Dauer
2. Versuchsphase (Teillastphase)	20 Tage Dauer 10 l/h Durchsatz	14 Tage Dauer 10 l/h Durchsatz	16 Tage Dauer 10 l/h Durchsatz
3. Versuchsphase (Vollastphase)	42 Tage Dauer 20 l/h Durchsatz	20 Tage Dauer 20 l/h Durchsatz	15 Tage Dauer 20 l/h Durchsatz
Versuchsdauer	69 Tage	45 Tage	39 Tage

3.7.1 Betrieb des RBR mit axenischen Startbedingungen und *Ps. fluorescens* ATCC 17563 als Startkultur

Im ersten Versuch unter axenischen Startbedingungen wurde der Reaktor mit *Ps. fluorescens* ATCC 17563 inokuliert. Nach 6 Versuchstagen waren noch 57% des eingesetzten Nitrats im Medium vorhanden. Am darauf folgenden Tag konnte weder Nitrat noch Nitrit im Medium nachgewiesen werden (s. Abb.III.24). Die Kultur wurde während der gesamten Batchphase weder mit Nitrat noch Succinat nachgefüttert.

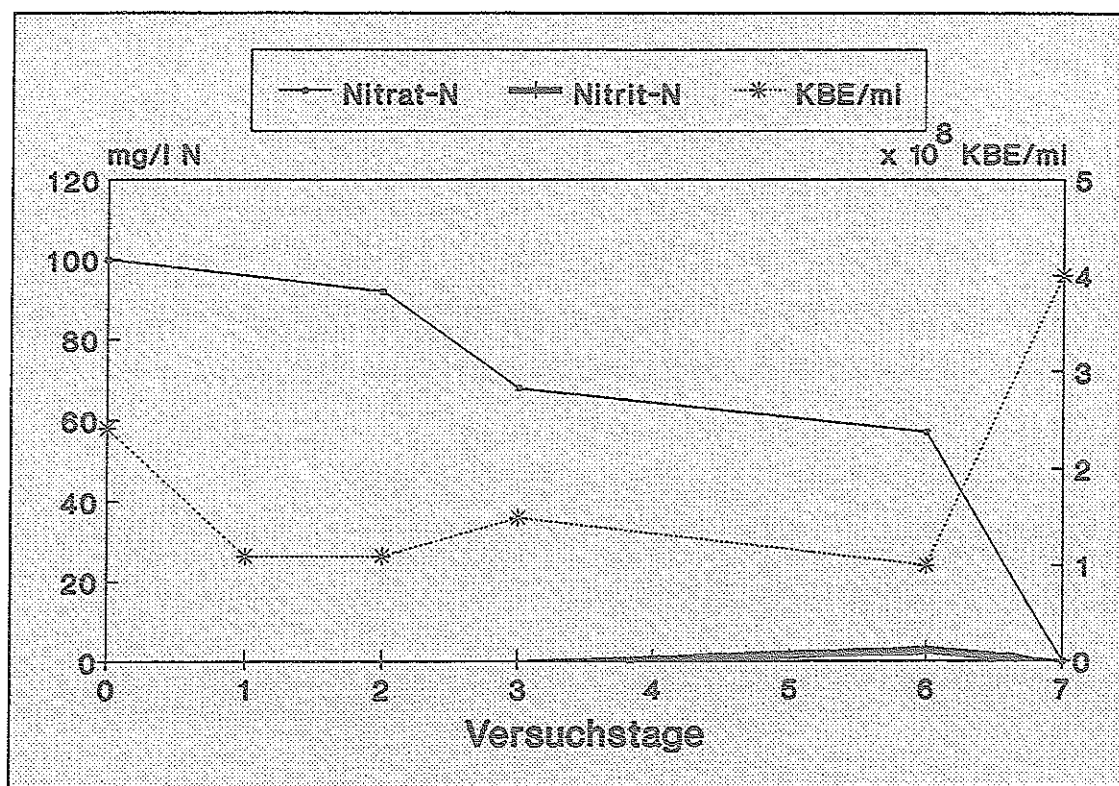


Abb.III.24 Daten zur Batchphase des Versuches mit axenischen Startbedingungen und *Ps. fluorescens* ATCC 17563 als Starterkultur.

Der Keimtiter im Reaktorwasser ging innerhalb der ersten 24 Stunden um 55% von $2,42 \cdot 10^8$ auf $1,10 \cdot 10^8$ KBE/ml zurück, verblieb bis zum 6. Tag auf diesem Niveau und vervierfachte sich bis zum 7. Tag (Abb.III.24).

Die aus dem Reaktorwasser isolierten Keime waren bis zum 2. Tag einheitlich und entsprachen den eingesetzten Keimen. Am 5. Versuchstag fand eine erneute Überprüfung der Bakterienpopulation statt. Die Population hatte wieder ein einheitliches Aussehen. Jedoch kamen diesmal ausschließlich schwärmende Kolonieformen auf den Nähragarplatten vor. Sie wuchsen auf Cetrimid-Agar zu weißen punktförmigen Kolonien heran und schieden keine wasserlöslichen Farbstoffe aus. Im folgenden wird dieses Isolat *Pseudomonas* MS1 genannt.

Auf dem Trägermaterial traten diese Kolonieformen schon ab dem 2. Versuchstag auf. Sie hatten sich bis zum Ende der Batchphase vollständig gegenüber *Ps. fluorescens* ATCC 17563 durchgesetzt. Die Abbildung III.25 gibt die prozentuale Zunahme von Isolat *Pseudomonas* MS1 auf dem Trägermaterial und im Reaktorwasser wieder.

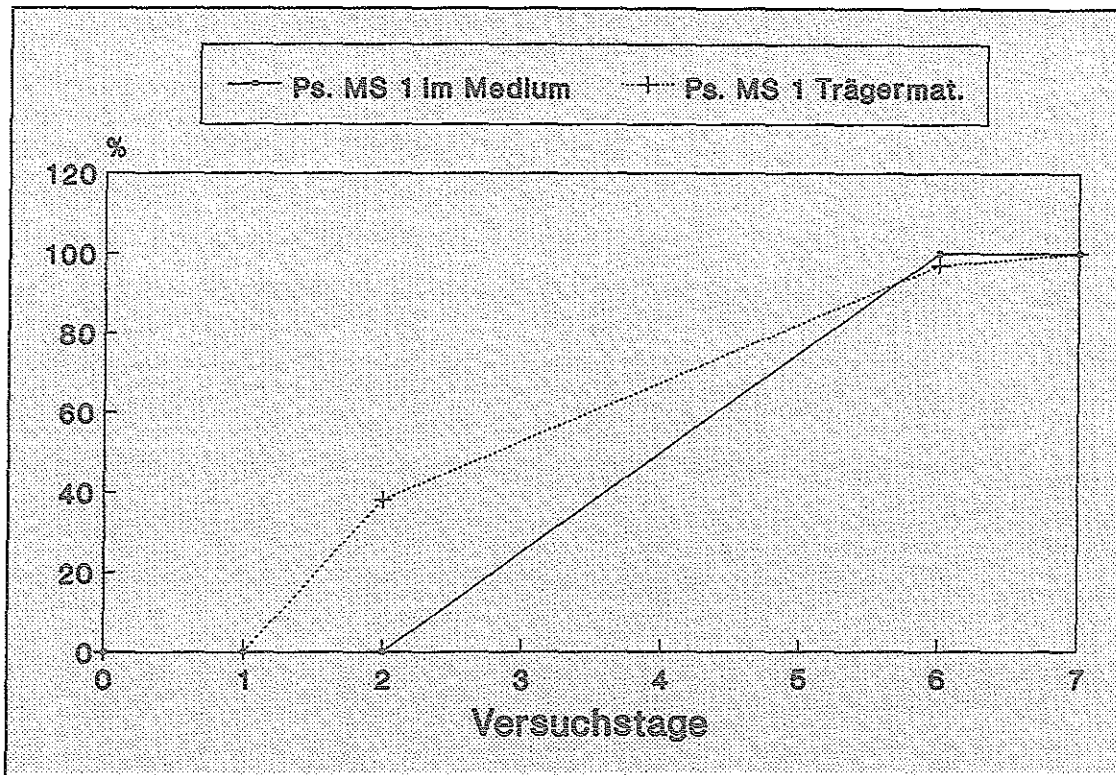


Abb.III.25 Prozentuales Vorkommen von *Pseudomonas* MS1 auf dem Trägermaterial und im Medium während der Batchphase.

Eine Überprüfung der Denitrifikationsfähigkeit von *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17563 ergab, daß dieser Stamm, wahrscheinlich aufgrund der langen Halterung auf NA-Platten unter aeroben Bedingungen, seine Fähigkeit zur Denitrifikation verloren hatte. Batchversuche unter denitrifizierenden Bedingungen bestätigten dieses Ergebnis. Ferner wurden in mehreren Batchversuchen zu gleichen Teilen *Ps. fluorescens* ATCC 17563 und *Ps. MS1* eingesetzt. Nach 2 Versuchstagen waren in den Ansätzen über 90% *Ps. MS1* zu finden.

Elektronenmikroskopische Beobachtungen

Bis zum 3. Versuchstag war keinerlei Besiedlung auf dem Blähton sichtbar. Erst an den darauffolgenden Tagen war von den Nischen des Trägermaterials ausgehend eine Biofilmbildung erkennbar. Für den nächsten Versuch mit *Ps. MS1* als Ausgangsstamm eines axenischen Versuchs sind die verschiedenen Stadien fotografisch dokumentiert.

Keimtiterverläufe des Reaktoreinlaufwassers und Reaktorauslaufwassers

Im Teillastbetrieb schwankte der Keimtiter des Zulaufs zwischen $2 \cdot 10^3$ und $2 \cdot 10^5$ KBE/ml. Die gegenüber dem Leitungswasser erheblich erhöhten Keimzahlen sind auf Wachstumsprozesse in den Zulaufleitungen zurückzuführen. Durch die höhere hydraulische Belastung während der Vollastphase nimmt die Keimzahl im Einlauf um 70% ab.

Die höchsten Keimtiter im Auslauf mit bis zu $8,8 \cdot 10^7$ KBE/ml wurden innerhalb der ersten Stunden nach der Umstellung auf die kontinuierliche Betriebsweise beobachtet. Nachdem die nicht fest im Biofilm integrierten Bakterien ausgespült waren, pendelte sich der Keimtiter zwischen $2 \cdot 10^6$ und maximal $2 \cdot 10^7$ KBE/ml ein.

Besiedlungsverlauf auf dem Trägermaterial

Die niedrigste Besiedlungsdichte wurde jeweils zu Beginn des kontinuierlichen Reaktorbetriebs ermittelt. Die Besiedlung erreicht jedoch innerhalb der ersten 5 Tage des kontinuierlichen Betriebs ihre endgültige Dichte mit Werten um $5 \cdot 10^9$ KBE/g Blähton.

Populationsuntersuchungen im Reaktoreinlaufwasser

Von den Bakterien, die aus dem Einlaufwasser isoliert wurden, waren ca. 15% zur Denitrifikation fähig. 30 bis 50% konnten auf Cetrimid-Agar wachsen. Während der Vollastphase ging die Zahl der Denitrifikanten im Einlaufwasser auf 10% zurück, ebenso groß war die Zahl der Kolonien, die auf Cetrimid wuchsen.

Populationsuntersuchungen im Reaktorablaufwasser

Innerhalb der ersten 7 Tage des kontinuierlichen Betriebs ging der Anteil an *Ps. MS1* von 100 auf 25% zurück und sank dann weiter bis auf 10% zum Versuchsende. Am Ende des Versuchs waren noch 80% der gefundenen Keime in der Lage auf Cetrimid zu wachsen und ca. 85% der Population war zur Denitrifikation fähig. Nitratreduzierer wurden nur vereinzelt gefunden. Ebenfalls nur vereinzelt (ca. 2%) wurde *Ps. mendocina* nachgewiesen.

Beschreibung der Population im Biofilm auf dem Trägermaterial

Innerhalb der ersten 6 Tage ging der Anteil von *Pseudomonas* MS1 auf Werte um 50% zurück und verblieb auf etwa diesem Niveau.

Bis zum Versuchsende konnten 98% der isolierten Keime denitrifizieren und fast ebenso viele auf Cetrimid wachsen. Mit der im Kapitel 2 beschriebenen Methode wurden die Schichtungen innerhalb des Biofilms analysiert (Abb.III.26).

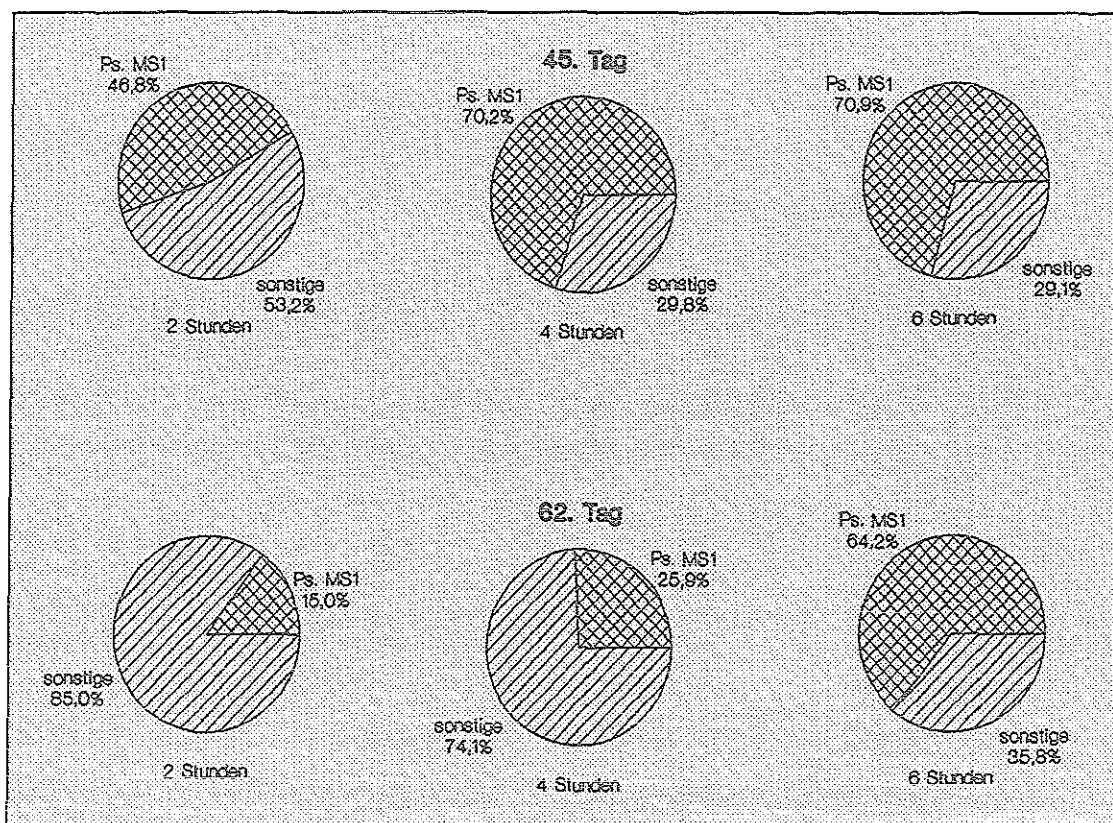


Abb.III.26 Das Vorkommen von *Ps. MS1* in den verschiedenen Schichten des Biofilms an unterschiedlichen Versuchstagen der Vollastphase.

Einfluß der Eisenkonzentration auf die Populationszusammensetzung

Die mikrobiologischen Ergebnisse belegen einmal mehr, daß es einen starken Zusammenhang zwischen der Eisenkonzentration des Einlaufwassers und der Artenvielfalt gibt. Mit Zunahme der Eisenkonzentration steigt die Artenvielfalt sowohl auf dem Trägermaterial Blähton, als auch in der wässrigen Phase. Die Anzahl der auf Cetrimid-Agar wachsenden siderophorbildenden Arten nimmt dagegen ab. Nitratreduzierer, die Nitrat nur bis zum Nitrit reduzieren, kommen bei höheren

Eisenkonzentrationen häufiger vor als bei niedrigen.

Während der Vollastphase lag die Eisenkonzentration im Einlaufwasser des Reaktors bei 0,08 mg/l.

Ps. MS1 nimmt in diesem Versuch offensichtlich die Stelle von *Ps. fluorescens* ein. *Ps. fluorescens* war während der ganzen 62-tägigen Versuchsdauer der Teil- bzw. Vollastphase nicht nachzuweisen. Bei einem Verhältnis von Denitrifikationseffektivität zu Eiseneingangskonzentration von

$$\frac{0,3 \text{ kgN/m}^3 \text{ d}}{0,08 \text{ mg}} = 3,75$$

ist der Wert von 10% *Ps.* MS1 im Auslaufwasser des Reaktors, der für *Ps. fluorescens* aus Abb.III.21 zu erwartende Wert.

Auch *Ps. mendocina* ist in diesem Versuch mit 2% so selten nachzuweisen wie man es aus Abb.III.21 heraus erwartet.

Die Gründe weshalb *Ps.* MS1 in diesem Versuch *Ps. fluorescens* vollständig ersetzt, sind aus den Ergebnissen dieses Versuchs heraus nicht zu erklären.

3.7.2 Betrieb des RBR mit axenischen Startbedingungen und *Ps.* MS1 als Startkultur

Im Gegensatz zu dem in Kapitel 3.7.1 beschriebenen Versuch wurde das Nitrat hier innerhalb der ersten 14 Stunden vollständig abgebaut. Ab dem 3. Versuchstag ist deshalb in 24-stündigen Abstand mit Nitrat nachgefüttert worden. Dadurch stieg die Nitratkonzentration auf 72 mg/l NO_3^- -N an.

Elektronenmikroskopische Beobachtungen

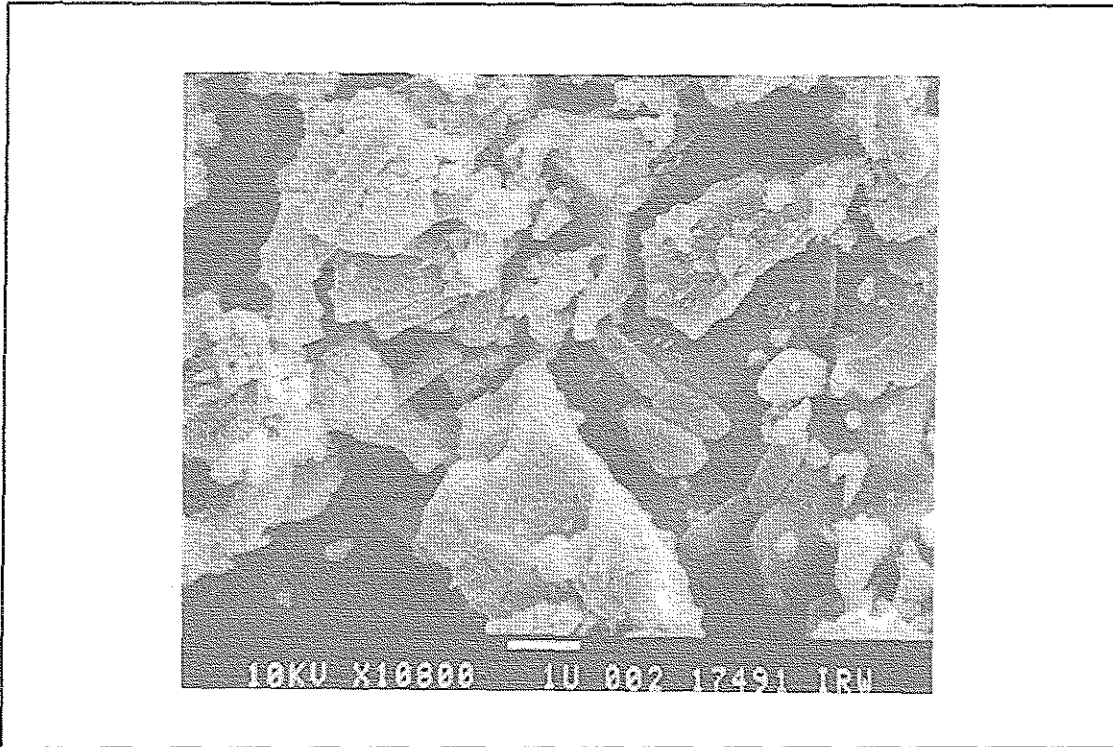


Abb.III.27 Entwicklung des Biofilms: Aufnahme vom 7. Versuchstag der ersten Versuchsphase (*10800)



Abb.III.28 Entwicklung des Biofilms: Aufnahme vom 11. Versuchstag der ersten Versuchsphase (*10400)

Vom 7. bis zum 11. Versuchstag ist eine Zunahme der Dichte des Biofilms zu beobachten. In dieser ersten Versuchsphase wird der RBR noch als Batchreaktor betrieben.

Populationsuntersuchungen im Reaktorablaufwasser

Bereits am 3. Tag nach Anschluß an das Trinkwassernetz waren keine der eingesetzten Mikroorganismen *Ps. MS1* im RBR-Auslauf nachzuweisen. *Ps. mendocina* trat erstmalig am 10. Tag mit 17% auf und hielt sich bis zum Ende des Versuchs bei 18%. Isolate, die zum Wachstum auf Cetrimid-Agar befähigt waren, traten nach dem Verschwinden von *Ps. MS1* nicht mehr auf.

Beschreibung der Population im Biofilm auf dem Trägermaterial

Innerhalb der ersten beiden Tage ging der Anteil von *Ps. MS1* auf 55% zurück. In den folgenden Tagen verschwand *Ps. MS1* immer mehr (Abb.III.29).

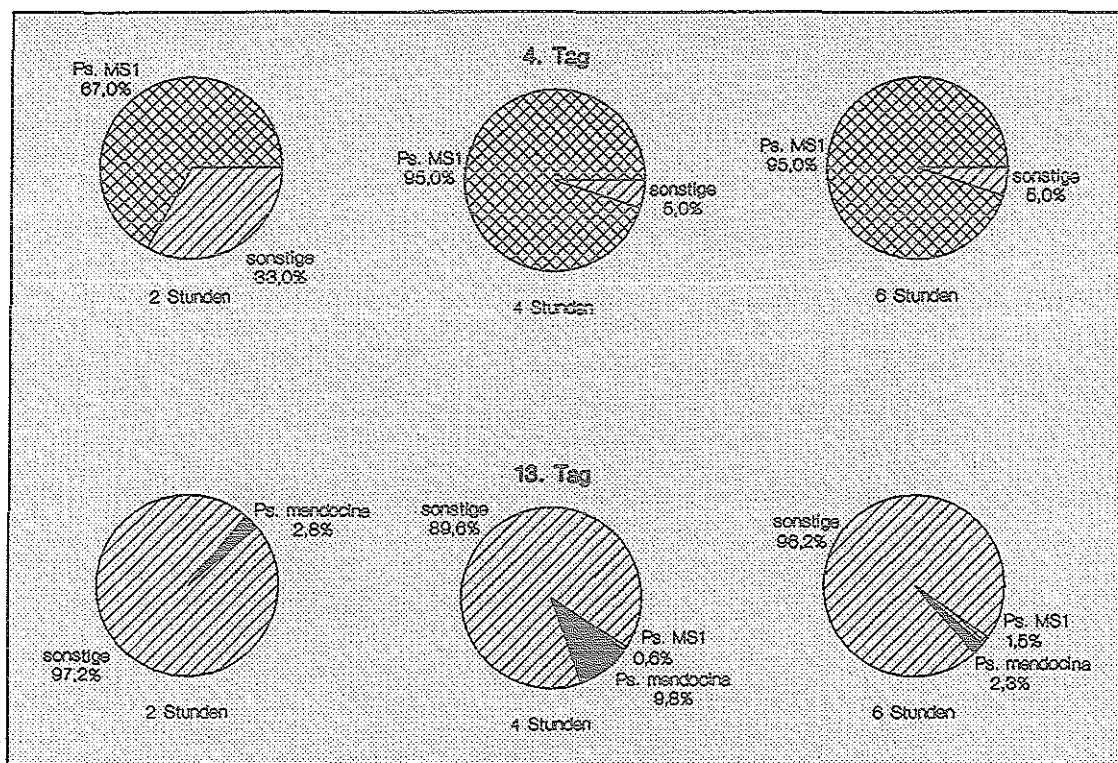


Abb.III.29

Bakterienanalyse verschiedener Schichten des Biofilms nach Anschluß des RBR an das Trinkwassernetz.

Einfluß der Eisenkonzentration auf die Populationszusammensetzung

Entsprechend der höheren Eisenkonzentration im Einlaufwasser während dieses Versuches (0,22 mg/l) und der verminderten Denitrifikationsleistung (0,11 kg N/m³ · d) ergibt sich eine völlig andere Besiedlung des Trägermaterials im RBR. *Ps. mendocina* macht einen so großen Teil der KBE im Reaktorauslauf aus, wie in keinem anderen Versuch vorher oder nachher. Siderophorbildende und auf Cetrimid-Agar wachsende Keime haben offensichtlich keine Chance bei diesem Verhältnis zwischen Denitrifikationseffektivität und Eiseneingangskonzentration (DE/Fe=0,5).

3.7.3 Betrieb des RBR mit axenischen Startbedingungen und *Ps. fluorescens* DSM 50108 als Startkultur

Auf Einzelheiten aus diesem Versuch soll nicht weiter eingegangen werden, da auch hier das Resultat der Bakterienanalysen nach Einsetzen der Teillast- bzw. Vollastphase so ist, wie man es aufgrund der Verhältnisse zwischen Denitrifikationseffektivität und Eisenkonzentration erwartet hätte:

Denitrifikationseffektivität (DE) 0,319 kg N/m³ · d

Eisenkonzentration im Einlauf 0,11 mg/l

DE/Fe=2,9

Ps. fluorescens: 6% im Auslaufwasser

Zusammenfassend ist zu den Versuchen des Betriebs eines RBR mit axenischen Startbedingungen zu sagen, daß sich innerhalb kürzester Zeit ein Biofilm ausbildet, der in puncto Heterogenität den natürlich ausgebildeten Biofilmen aus den halbtechnischen Anlagen in nichts nachsteht. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, findet eine Begrenzung des Artenspektreums im RBR ohne großen Aufwand durch den Einsatz von Einlaufwasser mit geringer Eisenkonzentration statt.

3.8 Beschreibung des Isolats *Pseudomonas* MS1

Vieles spricht dafür, daß es sich bei dem Isolat *Pseudomonas* MS1 um eine bislang in der Literatur nicht beschriebene Art handelt. In der folgenden Tabelle sind die physiologischen Charakteristika von *Ps.* MS1 aufgeführt.

Tab.III.16 Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> MS1		
Form	Kokkoidale Stäbchen	E
Beweglichkeit	+	ED
Gram-Reaktion	-	ED
Lyse durch 3% KOH	+	ED
Hauptchinon-Komponente	Ubichinon 9	D
Sporen	-	D
Oxidase	+	ED
Katalase	+	ED
Phenylalanin-desaminase	-	D
Levan aus Saccharose	-	D
Wachstoffsbedarf	-	D
Urease	-	D
Tyrosinabbau	-	D
Wachstum		
anaerob	-	D
37/40/41 °C	+/-/-	ED
pH 5,6	+	D
Mac-Conkey-Agar	+	D
SS-Agar	+	D
Cetrimid-Agar	+	ED
ONPG	-	D
ADH	+	D
ODC	-	D
VP	-	D
Indol	-	D
Denitrifikations-Test		
NO ₂ ⁻ aus NO ₃ ⁻	+	ED
N ₂ O aus NO ₃ ⁻	+	E
Gas aus NO ₃ ⁻	+	E
Denitrifikation	+	ED

Tab. III.16 (-Fortsetzung-)		Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> MS1			
N-Acetyl-D-Glucosamin	-	DK	Acetat	+	DK
Amygdalin	+	K	Benzoylformiat	-	D
D-Arabinose	-	K	Butyrat	+	K
L-Arabinose	-	DK	Caprat	+	DK
Arabonsäure	-	K	Heptanoat	-	K
p-Arbutin	+	K	Isobutyrtat	+	K
D-Cellobiose	-	K	Isovaleriat	+	K
Dextran	-	K	Propionat	+	K
D-Fucose	+	DK	Sorbinsäure	+	K
D-Fucose	-	K	cis-aconitat	+	K
L-Fucose	-	K	trans-aconitat	-	K
D-Galactose	-	DK	Adipat	+	DK
α-D-Galacturonat	-	K	Azelat	+	K
D-Glucarat	-	K	Citraconat	-	K
Gluconat	+	DK	Citrat	+	EDK
D-Glucosamine	-	K	Fumarat	+	K
D-Glucosaminsäure	-	K	Glutarat	+	K
D-Glucose	+	DK	Glycerat	+	K
D-Glucuronat	-	K	Glycerophosphat	-	K
Glycogen	-	K	Glycolat	-	DK
Glycyrrhizinat	-	K	Glyoxylat	+	K
Inulin	+	K	Hydroxyputyrat	+	D
Lactose	-	K	DL-3-Hydroxybutyrat	+	K
Lactulose	-	K	4-Hydroxybutyrat	-	K
D-Lyxose	-	K	DL-2-Hydroxyisobutyrtat	-	K
D-Maltose	-	DK	L-2-Hydroxyisocaprat	-	K
Mannose	-	D	DL-2-Hydroxyisoovalerat	-	K
D-Mannose	-	K	2-Hydroxyvalerat	+	K
L-Mannose	-	K	DL-Isocitrat	+	K
D-Mannoheptulose	-	K	Itaconat	+	K
α-D-Melezitose	-	K	D-Lactat	+	DK
α-D-Melibiose	-	K	DL-Lactat	+	DK
α-Methyl-D-Mannosid	-	K	L-Lactat	+	DK
Methyl-α-D-Glucopyranosid	-	K	Lävulinat	+	DK
β-Methyl-D-Xylosid	-	K	DL-Malat	+	DK
Mucar	+	K	L-Malat	+	DK
5-Oxogluconat	-	K	Maleat	+	K
α-D-Raffinose	-	K	Maionat	-/+	D/K
L-Rhamnose	-	K	Mesaconat	+	K
D-Ribose	-	K	Mesoaxalat	-	K
D-Saccharose	-	K	Oxalacetat	+	K
Salicin	-	K	2-Oxoglutarat	+	K
L-Sorbose	-	K	2-Oxoisocaprat	+	K
Stärke	-	K	Pimelat	+	K
D-Tagatose	-	K	Pyruvat	+	K
D-Trehalose	-	DK	Saccharat	-	D
D-Turanose	-	K	Suberat	-/+	D/K
D-Xylose	-	K	Succinat	+	EK
L-Xylose	-	K	D-Tartrat	-	K
Adonit	-	K	m-Tartrat	-	K
D-Arabit	-	K	L-Tartrat	+	K
Dulcit	-	K	Tartronat	-	K
m-Erythrit	-	K	n-Valerat	+	D
Glycerin	+	K	1-Butanol	+	K
i-Inosid	-	K	2-Butanol	-	K
Maltit	-	K	Ethanol	+	EK
D-Mannit	-	DK	1-Hexanol	+	K
Tributyrtin	-	K	1,8-Oktandiol	+	K
D-Xylit	-	K	Acetamidocaprat	-	K

Tab. III.16
(-Fortsetzung-)

Charakterisierung von *Pseudomonas* MS1

Acetyl-L-Glutamat	-	K	L-Serin	+/-	D/K
Acetyl-L-Glutamin	-	K	L-Threonin	-	K
Acetyl-Glycin	-	K	D-Tryptophan	-	K
Acetyl-DL-Methionin	-	K	L-Tryptophan	-	DK
Acetyl-L-Prolin	-	K	L-Valin	+/-	D/K
D-Alanin	+	K	Benzylamin	+	D
L-Alanin	+	DK	Butylamin	+	K
β-Alanin	+	K	Cadaverin	+	K
DL-2-Aminoadipat	+	K	Carnitin	+	K
DL-2-Aminobutyrat	-	K	Creatin	-	K
DL-3-Aminobutyrat	-	K	Creatinin	-	K
DL-2-Aminoisobutyrat	-	K	Ethanolamin	+	K
4-Aminobutyrat	+	K	Ethylamin	-	K
Aminooxyacetat	-	K	Harnstoff	-	K
D-Arginin	+	EDK	Hexylamin	+	K
L-Arginin	+	EDK	Putrescin	+	K
D-Asparagin	-	K	Spermidin	+	K
L-Asparagin	+	K	Spermin	+	K
L-Aspartat	+	K	Taurin	-	K
DL-Aspartat	+	K	Trigonellin	-	K
Betain	+	K	Tryptamin	-	K
Casein	-	K	Tyranin	-	K
L-Cysteinat	-	K	Acetamid	-	K
L-Citrullin	-	K	Allantoin	+	K
DL-2,4-Diaminobutyrat	-	K	Cytosin	-	K
Diaminopimelat	-	K	Glycinamid	-	K
2,3-Diaminopropionat	-	K	Hippurat	-	K
Dimethylglycin	+	K	Indol-3-Acetat	+	K
D-Glutamat	+	K	L-Leucinamid	+	K
L-Glutamat	+	K	Oxamidsäure	-	K
L-Glutamin	+	K	Salicylamid	-	K
L-Glycin	-	K	Thiamin	-	K
Glycinanhydrid	-	K	Uracil	-	K
D-Histidin	-	K	Ureidosuccinat	-	K
L-Histidin	-/+	D/K	L-Valinamid	-	K
L-Homoserin	-	K	Athranilat	-	K
DL-Delta-Hydroxylysin	-	K	3-Aminobenzoat	-	K
L-Hydroxyprolin	+	K	4-Aminobenzoat	-	K
DL-Isoleucin	+	K	Benzoat	+	K
L-Isoleucin	+	K	Furan-2-Carbonsäure	-	K
D-Leucin	+	K	3-Hydroxybenzoat	-	K
L-Leucin	+	K	4-Hydroxybenzoat	+	K
D-Lysin	+	K	2-Hydroxyphenylacetat	-	K
L-Lysin	+	K	3-Hydroxyphenylacetat	-	DK
D-Methionin	-	K	4-Hydroxyphenylacetat	-	K
L-Methionin	-	K	Isophthalat	-	K
DL-Methioninsulfon	-	K	D-Mandelat	-	K
L-Norleucin	-	K	L-Mandelat	-	K
D-Norvalin	+	K	Phenoxyacetat	-	K
L-Norvalin	-	K	Phenylacetat	+	K
L-Ornithin	+	K	Phenyllactat	-	K
D-Phenylalanin	+	K	Phenylpropionat	-	K
L-Phenylalanin	-	K	Phenylpyruvat	-	K
Phenylglycin	-	K	Phthalat	-	K
D-Prolin	-	K	Protocatechuat	+	K
L-Prolin	+	K	Chinasäure	+	K
Sarcosin	+	K	Salicylat	-	K
D-Serin	-	K	Tropinsäure	-	K
			Vanillat	-	K

Tab.III.16 (-Fortsetzung-)		Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> MS1			
Wachstum mit					
NaCl 1% + Glukose	+	K	NaCl 10% + Glukose	-	K
NaCl 2% + Glukose	+	K	Na-Azid 0,005% + Glukose	+	K
NaCl 5% + Glukose	+	K	Na-Azid 0,01% + Glukose	+	K
NaCl 7% + Glukose	-	K	Na-Azid 0,02% + Glukose	+	K
Säure aus (OF-Test):					
Glukose aerob	+	D	Glukose	+	D
Glukose anaerob	-	D	Fructose	+	D
Gas aus Glukose	-	D	Xylose	-	D
Säurebildung aus:					
N-Acetyl-D-Glucosamin	-	K	Gluconat	+	K
D-Arabinose	-	K	D-Glucosamin	+	K
L-Arabinose	-	K	D-Glucose	+	K
Arabonsäure	-	K	D-Glucuronat	-	K
D-Cellobiose	+	K	Glycogen	-	K
Dextran	-	K	Inulin	-	K
D-Fructose	+	K	Lactose	-	K
D-Galactose	+	K	Lactobionsäure	+	K
α-D-Galacturonat	-	K	Lactulose	-	K
Stärke	-	K	L-Lyxose	-	K
D-Tagatose	-	K	D-Maltose	-	K
D-Trehalose	-	K	D-Mannose	-	K
D-Turanose	-	K	α-D-Melzitose	-	K
D-Xylose	-	K	α-D-Melibiose	-	K
L-Xylose	-	K	α-Methyl-D-Mannosid	-	K
Dulcitol	-	K	Methyl-α-D-Glucopyranosid	-	K
m-Erythrit	-	K	β-Methyl-D-Xylosid	-	K
Glycerin	+	K	Mucar	-	K
i-Innosit	-	K	α-D-Raffinose	-	K
Maltit	-	K	L-Rhamnose	-	K
D-Mannit	-	K	D-Ribose	-	K
D-Xylit	-	K	D-Saccharose	-	K
Tributyrin	-	K	Salicin	-	K
			L-Sorbose	-	K
Hydrolyse von:					
Stärke	-	D	pNP-β-D-Glucopyranosid	-	K
Gelatine	-	ED	pNP-β-D-Glucuronid	-	K
Casein	-	D	pNP-β-D-Lactosid	-	K
DNA	-	D	pNP-α-D-Mannopyranosid	-	K
Tween 80	-	D	pNP-α-D-Maltosid	-	K
Asculin	-	D	pNP-β-D-Maltosid	-	K
Arginin	+	E	pNP-β-D-Melibiose	-	K
pNP-N-Acetyl-β-D-Galactosaminid	-	K	pNP-α-L-Rhamnopyranosid	-	K
pNP-N-Acetyl-α-D-Glucosaminid	-	K	pNP-β-D-Xylosid	-	K
pNP-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid	+	K	pNP-Sulfat	-	K
pNP-α-L-Arabinopyranosid	-	K	pNP-Phosphat pH 7 CHA-Salt	+	K
pNP-α-L-Fucopyranosid	-	K	pNP-Phosphat pH 5,4 Ph-Eth-Sa.	+	K
pNP-β-L-Fucopyranosid	-	K	pNP-Phosphat pH 8,2 Ph-Eth-Sa.	+	K
pNP-α-D-Galactopyranosid	-	K	bis-pNP-Phosphat	+	K
pNP-β-D-Galacturonid	-	K	pNP-Phenyl-Phosphonat	+	K
pNP-α-D-Glucopyranosid	-	K	pNP-Phosphoryl-Cholin	+	K

Tab.III.16 (-Fortsetzung-)		Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> MS1			
2-Desoxythymidin-5'-pNP-Phosphat	-	K	γ -L-Glutamat-pNA	+	K
Acetyl-L-Alanin-pNA	-	K	L-Glutamat- γ -3-Carboxy-pNA	+	K
Acetyl-L-Leucin-pNA	-	K	Glycin-pNA	+	K
D-Alanin-pNA	-	K	L-Lysin-pNA	+	K
L-Alanin-pNA	+	K	L-Phenylalanin-pNA	-	K
L-Arginin-pNA	+	K	L-Prolin-pNA	+	K
Benzoyl-DL-Arginin-pNA	-	K	Succinyl-L-Phenylalanin-pNA	-	K
Glutamat-1-pNA	+	K	L-Valin-pNA	-	K

Die Charakterisierung dieses Isolates von Frau Dr. S. Verbarg (DSM), Herrn Dr. P. Kämpfer (TU Berlin) und die Ergebnisse der eigenen taxonomischen Untersuchungen ergaben, daß es sich um einen Pseudomonaden der RNA-Gruppe I handelt.

Am Institut Le Bel de Centre National de la Recherche Scientifique in Straßburg konnte durch Vermittlung von Prof. Dr. Jean Marie Meyer die Struktur des von *Pseudomonas* MS1 gebildeten farblosen Siderophors bis jetzt teilweise analysiert werden. Bei diesem Siderophor, das eine höhere Affinität zu Fe(III) hat als Pyoverdin ($k_f=10^{32}$), ist ein Acetylrest mit einem kurzen Peptid, das verhältnismäßig viel δ N-OH-ornithin enthält, verknüpft. Das für Pyoverdin typische Chromatophor fehlt. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da das Siderophor wahrscheinlich zu einer Gruppe von bislang nicht beschriebenen Siderophoren gehört, die in diesem Jahr bei Bakterienstämmen aus der Rhizosphäre von Reis entdeckt wurden. Aufgrund ihres hohen δ N-OH-ornithin-Gehaltes wird für diese Gruppe von Siderophoren der Name Ornibactin vorgeschlagen [persönliche Mitteilung bislang unveröffentlichter Ergebnisse von Prof. Dr. Jean Marie Meyer]. Diese Bakterienstämme sind genau wie *Pseudomonas* MS1 nicht eindeutig einer bereits bekannten Art zuzuordnen.

Weitere Untersuchungen von *Pseudomonas* MS1 und des Siderophors erfolgen bei Prof. Meyer in Straßburg. Vergleichende Untersuchungen zwischen den Isolaten aus der Rhizosphäre von Reis und *Pseudomonas* MS1 über DNA-Hybridisation sind dabei eingeplant.

In den Versuchen, die in Kap. 3.7.1 und 3.7.2 beschrieben werden, tritt *Pseudomonas fluorescens* nicht auf, nur *Pseudomonas* MS1. Da die Affinität des Siderophors von *Pseudomonas* MS1 zu Fe(III) größer ist als die des Pyoverdins, kann *Pseudomonas fluorescens* in Reaktoren, wo bereits ein *Pseudomonas* MS1-Biofilm ausgebildet ist, nicht mehr Fuß fassen. Seine Rolle wird vollständig von *Pseudomonas* MS1 übernommen.

Dagegen scheint *Pseudomonas* MS1 unter den Bedingungen eines sich natürlich aus aquatischen Bakterien entwickelten Biofilms in Denitrifikationsreaktoren ohne Chance zu sein. Die Gründe hierfür werden in Kapitel 4 diskutiert.

4 Diskussion

4.1 Homogenisierung von Bakterienaggregaten und Biofilmablösung von den Füllkörpern

Die in der Literatur häufig beschriebenen mechanischen Methoden zur Homogenisierung von bakteriellen Aggregaten und zur Ablösung von Biofilmen auf Trägermaterialien ergaben im Rahmen der vorliegenden Arbeiten nur unbefriedigende Ergebnisse. Anstelle von einzelnen Zellen wurden nach der Behandlung immer noch mehr oder weniger große Zellverbände gefunden (s. Kap. 3.3.1 und 3.3.2). Aus diesem Grund wurde die enzymatische Hydrolyse der Exopolysaccharide in Erwägung gezogen. Um Enzyme auswählen zu können, die in der Lage sind, die Exopolysaccharide zu hydrolysieren, wurde in einem Vorversuch ihre Zusammensetzung untersucht. Dazu wurde eine saure Hydrolyse durchgeführt. Nach der in Kapitel 2 beschriebenen Aufreinigung wurden die Monomere durch Ionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt.

Die Analyse stimmt mit den Angaben der Literatur im Bezug auf Glukose und Galaktose überein. Das festgestellte Verhältnis von acht Teilen Glukose zu einem Teil Galaktose entspricht den von Hejzlar u. Chudoba [1986] beschriebenen Werten. Daß die Exopolysaccharide von *Ps. fluorescens* mannanhaltig sind, wurde von Hejzlar u. Chudoba [1986] ebenfalls festgestellt und kann durch die hier vorliegenden Ergebnisse noch einmal bestätigt werden. Die Kombination von Glukose und Galaktose ist häufig in den Exopolysacchariden der verschiedensten Bakterien zu finden. Dabei schwankt das Verhältnis der beiden Zucker je nach dem Ursprung der Exopolysaccharide, wobei jedoch Glukose mengenmäßig stets überwiegt.

Durch die unvollständige Hydrolyse und verbunden damit einer höheren Konzentration von Cellobiose im Hydrolysat wird deutlich, daß die Glukose in den Exopolysacchariden hauptsächlich β -1,4-glycosidisch verknüpft ist. Die zahlenmäßige Überlegenheit der Glukose im Vergleich zu Galaktose läßt die Möglichkeit von längeren Glukose-Abschnitten zu.

Im Gegensatz zu Pilzen ist die Fähigkeit, solche cellulose-ähnlichen Abschnitte zu

hydrolisieren, bei Bakterien nicht häufig verbreitet.

Da *Ps. fluorescens* unter gewissen Bedingungen (s.Kap. 3.5) einen großen Anteil der Bakterien im RBR stellt, werden auch die Exopolysaccharide, die die Bildung der Flocken und Biofilme beeinflussen, hauptsächlich der oben beschriebenen Zusammensetzung entsprechen.

Die Analyse der Exopolysaccharide eines frisch aus dem Denitrifikationsreaktor isolierten Stammes von *Ps. fluorescens* ließ den Versuch sinnvoll erscheinen, zwecks Homogenisierung von Bakterienflocken eine Cellulase-Präparation zu verwenden. Diese käuflichen, in der Regel nur grob aufgereinigten Enzym-Präparate, enthalten neben cellulolytisch wirksamen Enzymen noch eine ganze Reihe anderer hydrolytisch wirkender Enzyme, z.B. Xylanasen, was der Hydrolyse der heterogen zusammengesetzten Exopolysaccharide zuträglich ist.

Wie gezeigt werden konnte, führte die Inkubation der Bakterienaggregate oder des Biofilms mit einer Cellulase-Präparation zu einem drastischen Anstieg in der Zahl der freigesetzten KBE. Dies ist auf die Hydrolyse von β -1,4-glycosidischen Bindungen in den Exopolysacchariden zurückzuführen. Jedoch wurden die Exopolysaccharide nicht vollständig hydrolisiert. Eine anschließende mechanische Behandlung führte zu einem nochmals verbesserten Ergebnis.

Da das pH-Optimum der Cellulasepräparation von *Basidiomyces spec.* im sauren Bereich (pH_{opt} 4,8) liegt, mußte ein Kompromiß gewählt werden zwischen der Cellulaseaktivität und dem pH-Wert, bei welchem die Bakterien noch überleben (pH 6,8). Das gleiche gilt für die Temperatur. Die optimale Temperatur für die verwendete Enzympräparation liegt bei 30°C.

Normalerweise sind nur 0,1...0,5% der im Mikroskop sichtbaren Bakterien eines natürlichen aquatischen Lebensraumes auf Standardmedien kultivierbar [Reichardt, 1978]. Mögliche Gründe für diese enorme Diskrepanz zwischen dem mikroskopischen Bild und der Zahl der KBE sind das Vorhandensein von großen Mengen toter Bakterien und das Auftreten von physiologischen Spezialisten, wie die extrem oligotrophen, die auf Standardmedien keine Kolonien bilden.

Das Hauptproblem bei der Bestimmung der Anzahl von Bakterien in Denitrifikationsreaktoren scheinen jedoch nicht die nichtkultivierbaren Bakterien oder die physiologischen Spezialisten auszumachen, sondern die Bakterienaggregate und deren Zerstörung.

Die Anwendung von cellulolytisch wirksamen Enzymen in Kombination mit mechanischen Methoden bedeutet eine Verbesserung der Ausbeute an KBE auf 20% der im Mikroskop detektierten Zellen.

Eine weitere Steigerung konnte erzielt werden, wenn der zur Primärisolierung verwendete Nähragar mit RBR-Auslauf angesetzt wurde anstelle von Wasser. Ähnliche Beobachtungen sind für Abwasser-Bakterien gemacht worden, die am besten auf Belebtschlamm-Agar wuchsen [Kappesser u. Kutzner, 1990]. Im Falle von Belebtschlamm-Agar konnten Zellzahlen erreicht werden, die eine Größenordnung über den Werten auf Standardmedien lagen. Jedoch konnten in diesem Fall noch nicht die Faktoren isoliert werden, die für das verbesserte Wachstum verantwortlich sind. Da mit dem modifizierten Nähragar eine Verdopplung der KBE aus dem RBR-Auslauf auftritt, bedeutet dies, daß nahezu 50% aller sichtbaren Zellen auch kultivierbar sind.

Ruft man sich die Tatsache ins Gedächtnis zurück, daß sogar die beste Homogenisierungsmethode (120 Minuten Inkubation mit Cellulase, 2 Minuten Ultra Turrax-behandlung) einige kleine Aggregate zurückläßt, und daß andere Bakterien von den mechanischen Kräften, die auf sie im Reaktor bzw. bei der Homogenisation einwirken, angegriffen oder sogar getötet werden, so wird deutlich, daß die Zahl der nicht kultivierbaren Bakterien im Auslauf oder im Biofilm des RBR relativ niedrig ist.

4.2 Quantifizierung der Population

Es existiert eine Vielzahl ungleichwertiger, nicht kompatibler Methoden, um mikrobielle Organismendichten und Biomasseparameter zu ermitteln. Die Entscheidung über die jeweils zu wählende Methode hängt von der speziellen Problemstellung ab. Die eklatanten Spezifitätsunterschiede zwischen den einzelnen Methoden veranschaulicht Abb.IV.1. Die durchschnittliche Ausbeute mit indirekten ("kulturellen") Verfahren ist selten größer als 1...10% und beträgt oft nur 0,1...1% der lichtmikroskopisch erfaßbaren Organismendichte. Aber selbst die lichtmikroskopische Methodik verbürgt noch keine Maximalwerte, wie ein Vergleich mit elektronenmikroskopischen Zählwerten zeigt [Reichardt, 1978].

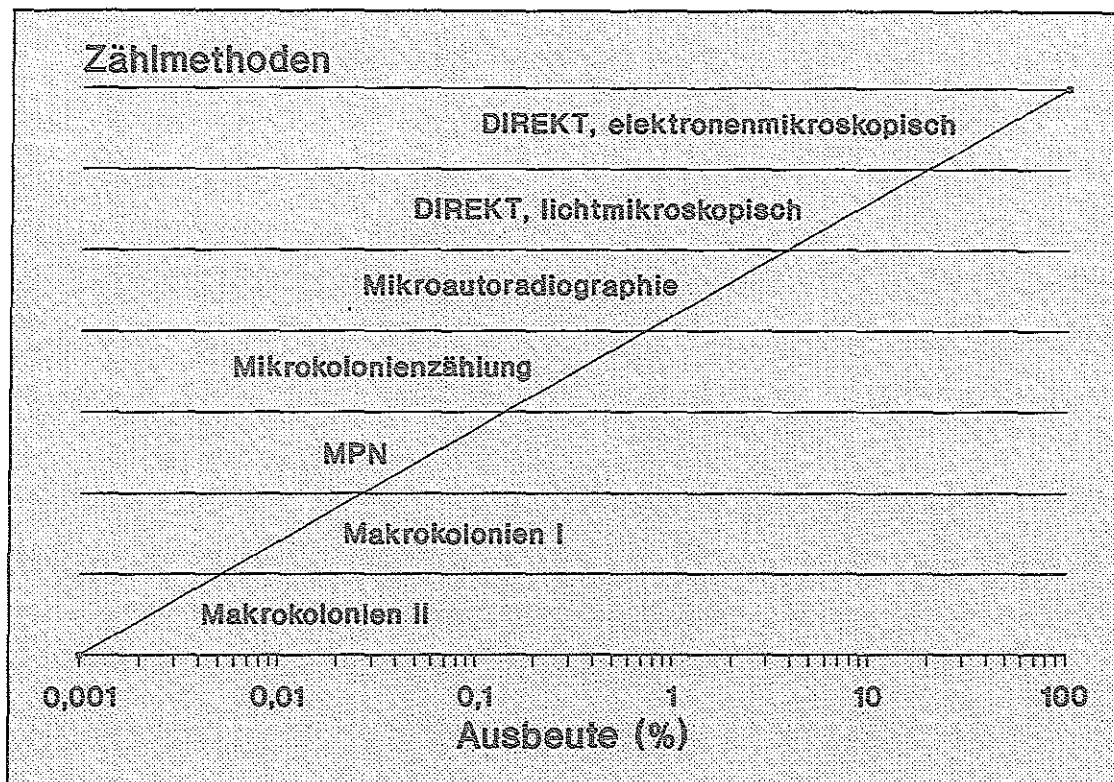


Abb.IV.1 Grobschematische Übersicht über die Größenordnung der durch verschiedene Methoden erfaßbaren Prozent-Anteile der Organismendichte der Gesamt-Mikroflora in Gewässern [Reichardt, 1978].

Bereits im vorangegangenen Kapitel wurde die Steigerung der Ausbeute an KBE durch Verwendung von mit Reaktorauslaufwasser angesetztem Nähragar beschrieben.

Die Primärisolierung ist für Populationsuntersuchungen von entscheidender Bedeutung. Es gibt kein geeignetes Medium zur Kultivierung aller Bakterien. In Abhängigkeit von dem benutzten Medium werden bestimmte Bakterienarten bevorzugt und andere benachteiligt.

Untersuchungen von Selenka und Meissner [1971] haben gezeigt, daß bei der Koloniezahlbestimmung in Abhängigkeit vom benutzten Medium Abweichungen auftreten, zum einen in Bezug auf die Zahl der erfaßten Bakterien, zum anderen auch in Bezug auf das Artenspektrum. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die sich nicht nur auf die mit verschiedenen Medien erfaßten Organismenzahlen beziehen, bestätigen diese Ergebnisse. Das unterschiedliche Artenspektrum, das mit verschiedenen Medien erzielt wurde, zeigte sich in den unterschiedlichen Aktivitäten der Isolate in der BIOLOG-Analyse (s. Kap. 3.4).

Ein großes Problem bei der Primärisolierung, Weiterkultivierung und Identifizierung aus aquatischem Milieu stellen die oligotrophen Organismen dar. Oligotrophe Bakterien zeichnen sich dadurch aus, daß sie bei niedrigen Substratkonzentrationen im Medium

(1...15 mg C/l) hohe Wachstumsraten aufweisen [Kuznetsov, 1979].

Das von verschiedenen Autoren für die Anzucht von oligotrophen Bakterien empfohlene Medium nach Reasoner und Geldreich [1985] enthält Substrate in Konzentrationen, die zwar unter denen mancher anderer Medien liegen, aber sie übersteigen die unter oligotrophen Bedingungen auftretenden Konzentrationen um Größenordnungen. Hier spiegelt sich der manchmal unüberlegte Gebrauch des Begriffs "oligotroph" wieder.

Ob die im lichtmikroskopischen Bild erscheinenden, im Vergleich zu den KBE größeren, Bakterienzahlen auf oligotrophe Organismen zurückzuführen waren, die auf den eingesetzten nährstoffreichen Medien ihr Wachstum einstellen oder extrem verlangsamen, soll im folgenden diskutiert werden.

Bereits Winogradsky [1925] unterteilte die Bakterienflora an natürlichen Standorten in zwei Gruppen: die zymogene und die autochthone Gruppe. Die erstere induziert einen raschen Degradationsprozeß von leicht abbaubarem organischem Material. Ihr Vorhandensein ist immer an große Konzentrationen organischen Materials gebunden und damit nur von kurzer Dauer in natürlichen Systemen. Dagegen baut die zweite Gruppe von Bakterien stabile Moleküle ab. Diese Gruppe von Bakterien ist ein konstanter Bestandteil natürlicher Floren. In Fortführung der Studien von ZoBell und Grant [1943] fanden Yanagita und Mitarbeiter [1978], daß viele Bakterien, die aus nährstoffarmen Lebensräumen isoliert wurden, in der Lage waren, spontan oder nach Adaption auch auf nährstoffreichen Medien zu wachsen. Kuznetsov [1979] definiert deshalb "oligotrophe" Bakterien als solche, die auf Medien mit 1 bis 15 mg C/l in Rekultivierungen wachsen, obwohl sie auch in der Lage wären, auf nährstoffreichen Medien zu wachsen. Die Tatsache, daß Wachstum auch auf nährstoffreichen Medien stattfinden kann, läßt Kuznetsov anmerken, daß die Einteilung der Bakterien in zwei Gruppen entsprechend ihrer Substratbedürfnisse die wirklichen Gegebenheiten zu stark vereinfacht. Selbst *Ps. aeruginosa* wächst unter oligotrophen Bedingungen. Diese beiden Beispiele veranschaulichen, wie komplex dieses Problem ist.

Die Bakterien, die in Lebensräumen mit geringem Angebot an verwertbaren Substraten wachsen, zeigen unter solchen Bedingungen häufig besondere morphologische Strukturen; beobachtet wurden unter anderem coccoidale Zwergformen und gestielte Bakterien.

Poindexter [1981] stellte eine Liste von Kennzeichen auf, die ein oligotrophes Modellbakterium besitzen sollte. Ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis bedingt das bereits erwähnte Auftreten von kleinen Zellen oder anderer besonders gestalteter Formen. Die durch den Zellmetabolismus freigesetzte Energie sollte hauptsächlich für die Aufnahme von Nährstoffen verwendet werden. Da das Aufnahmesystem eine hohe Affinität besitzen sollte, ist die Sensibilität für antibiotische Wirkstoffe biologischen oder abiotischen Ursprungs hoch. Insgesamt ist die maximale Wachstumsrate relativ niedrig.

Wenn man bei den Denitrifikationsreaktoren von einer durchschnittlichen Ethanoldosierung von 30 mg/l ausgeht, so entspricht das einer Kohlenstoffkonzentration von 15,6 mg/l zuzüglich des bereits im Wasser vorhandenen Kohlenstoffes, der um die 4 mg DOC/l liegt. Damit läge die Kohlenstoffkonzentration im Eintrittsbereich des Reaktors knapp über den Werten für oligotrophes Wasser. Da jedoch die Stoffwechselleistung im Reaktor sehr hoch ist, wird das vorhandene Ethanol rasch verbraucht, und man könnte fast den gesamten Reaktor als oligotrophen Lebensraum bezeichnen. Da jedoch die Biomasse selbst als Kohlenstoffquelle dient, muß zumindest für Teilbereiche des Reaktors ein eutrophes Milieu angenommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Nie fielen Bakterien auf, die sich durch ihre geringe Größe oder andere morphologische Besonderheiten ausgezeichnet hätten. Im Gegenteil war im mikroskopischen Bild die Größe der Bakterien sehr einheitlich, wobei in der Mehrzahl Stäbchen auftraten.

Es ist daher anzunehmen, daß Bakterien im Reaktor angereichert wurden, die sowohl unter niedrigen, als auch unter hohen Substratkonzentrationen wuchsen, wie z.B. die Pseudomonaden. Da eine deutliche Verbesserung in der KBE-Ausbeute durch den mit Reaktorauslauf angesetzten Nähragar zu beobachten war, wurde deutlich, daß nicht die oligocarbophilen Bakterien das Hauptproblem im Reaktor darstellten, sondern daß das Nichtwachsen bestimmter Bakterien eher durch einen Mangel an Supplinen bedingt war, die mit dem Reaktorauslauf zugeführt wurden. Das Einstellen des Wachstums kann viele Ursachen haben, und man macht es sich zu leicht, nur die Substratkonzentration dafür verantwortlich zu machen.

4.3 Kommerzielle Bakterienanalysesysteme

Die kommerziellen Bakterienanalysesysteme bieten eine Reihe von Vorteilen. Durch die bereits abgefüllten Medien in den Testplatten ist eine vollautomatische Bestimmung durch ein umfangreiches Testspektrum bei geringem Personalaufwand möglich. Die Zeitersparnis gegenüber anderen herkömmlichen Bakterienanalysen ist beträchtlich. Erst mit diesen Systemen sind Bakterienanalysen im großen Umfang möglich.

Das BIOLOG-System, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, umfaßt eine umfangreiche Datenbank. Entscheidungshilfen bieten dem Anwender die Möglichkeit zur besseren Kontrolle der Ergebnisse. Im Vergleich zu anderen Testsystemen fiel die insgesamt höhere Aktivität der Isolate im BIOLOG-System auf. Dies ist unter anderem durch unterschiedliche Inkubationstemperaturen bei den einzelnen Systemen zu erklären. Als Aktivität wird der Prozentsatz positiv ausgefallener Tests in den BIOLOG-Mikrotiterplatten bezeichnet.

Die Ergebnisse mit dem BIOLOG-System sind, so wie das BIOLOG-System zur Zeit angeboten wird, nicht zufriedenstellend für die Fragestellung, die dieser Arbeit zugrundeliegt. Die Fehlidentifikationen für *Ps. fluorescens*, das als *Ps. corrugata* identifiziert wurde, sind für Denitrifikationsreaktoren sehr schwerwiegend, da es sich bei *Ps. fluorescens* um einen Indikatororganismus für den Zustand des Reaktors handelt, und seine Identifizierung unbedingt einwandfrei zu erfolgen hat. Fehlidentifikationen traten auch für andere Pseudomonaden auf.

Die Identifikation der Indikatororganismen (*Ps. fluorescens*, *Ps. stutzeri*, *Ps. cepacia*, *Ps. mendocina*) ist auf herkömmlichen Wegen mit den in Kapitel 2 beschriebenen Methoden relativ einfach möglich. Der Einsatz des BIOLOG-Systems würde keine Arbeitserleichterung bedeuten, wenn das Ergebnis wirklich korrekt wäre. Da die Identifikation jedoch falsch war, ist von einem Einsatz des Systems zur Identifikation von Isolaten aus Denitrifikationsreaktoren zum gegenwärtigen Zeitpunkt abzuraten. Bessere Ergebnisse können in Zukunft nur erreicht werden, wenn die Firmen mehr Entwicklungsarbeit für die Optimierung der Identifikationssysteme aufwenden, mit welchen man die Bakterien aus aquatischen oder terrestrischen Biotopen identifizieren will.

Identifikationssysteme anderer Hersteller mit geringeren Testspektren ergaben noch höhere Anteile von Fehlidentifikationen. Das führte in manchen Fällen so weit, daß *Ps. fluorescens*-Referenzstämme als *Ps. aeruginosa* identifiziert wurden; ein für die Praxis

einer Denitrifikationsanlage fataler Fehler.

4.4 Populationsanalysen an verschiedenen Denitrifikationsreaktoren

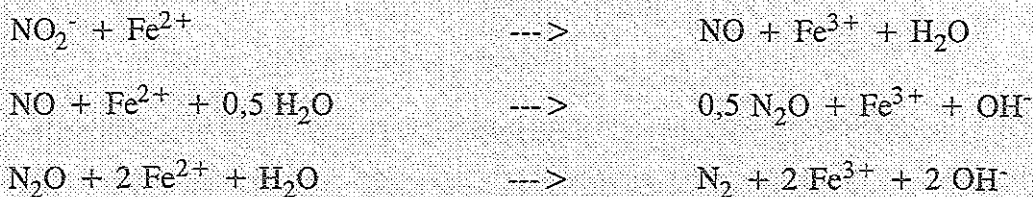
Es wurden verschiedene Populationsanalysen an Roto-Bio-Reaktoren durchgeführt. Es ist offensichtlich, daß die Bakterienanalysen Schwächen aufweisen: nicht alle Organismen wurden bei der Primärisolierung erfaßt; von den wachsenden Bakterien wurden einige nicht identifiziert. Außerdem existiert auch hier die Regel, daß man nur das findet, was man sucht. Man kann sicher sein, daß die unter den gewählten Versuchsbedingungen in den einzelnen Proben identifizierten Bakterien nur eine Teilmenge der gesamten Bakterienpopulation im Reaktor darstellen.

Im Bewußtsein dessen kann aber gesagt werden, daß die auf diese Weise beschränkte mikrobiologische Beschreibung der Denitrifikationsreaktoren dazu beiträgt, die Abläufe in solchen Systemen besser zu verstehen.

4.5 Die Populationsdynamik im Hinblick auf verschiedene selektierende Faktoren

Die Bildung von Siderophoren unter Denitrifikationsbedingungen ist bis heute noch extrem wenig erforscht. Das hängt damit zusammen, daß das Eisen unter anoxischen Verhältnissen in der gut zugänglichen reduzierten Form vorliegt und damit kein Problem für die Bakterien darstellen sollte. Doch existieren enge Beziehungen zwischen verschiedenen Redox-Prozessen, wie dem Stickstoffkreislauf und dem Eisenkreislauf. Eisen (II) kann durch verschiedene Zwischenprodukte der bakteriellen Denitrifikation oxidiert werden, so daß das Eisen in seine schwerlösliche dreiwertige Form überführt wird. Nur diese dreiwertige oxidierte Form des Eisens induziert aber die Bildung von Siderophoren.

Durch Adsorption von oxidierenden oder reduzierenden Stoffen wird das Redox-potential und der Sauerstoffpartialdruck innerhalb eines Biofilms beträchtlich verändert, so daß auch dadurch Zonen entstehen können, die die Oxidation von Eisen fördern.



Die im vorigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse zeigen klar, daß für Bakterien in Denitrifikationsreaktoren die Bildung von Siderophoren notwendig wird, wenn der Eisengehalt im Einlauf niedrig ist. Deshalb haben unter solchen Umständen Bakterien, die starke Siderophore bilden, einen Selektionsvorteil. Neben der Denitrifikationsfähigkeit scheint Eisen der stärkste selektive Faktor in Denitrifikationsreaktoren zu sein. Der Selektionsdruck ist so stark, daß sich bei Reaktoren verschiedener Bauart (Festbett; RBR; Wirbelschicht) und unter sonst ebenfalls stark unterschiedlichen Bedingungen (Nitrat-Konzentration von 60 bis 1000 mg/l) die Bakterienpopulation immer nach der in Kapitel 3.5 beschriebenen Gesetzmäßigkeit zusammensetzt, je nachdem wie hoch die Eisenkonzentration im Einlauf des Reaktors ist.

Enterobacteriaceen, die den stärksten aller Siderophore bilden, das Enterobactin, wurden, wegen ihrer Unfähigkeit zu denitrifizieren, in den untersuchten Reaktoren nie gefunden.

Unter eisenlimitierten Bedingungen kommt bei Denitrifikanten, die Siderophore mit gleicher Affinität für Eisen produzieren, als dritte Komponente die Fähigkeit zur Verwertung einer gegebenen Kohlenstoffquelle ins Spiel. *Ps. fluorescens* und *Ps. stutzeri* bilden verschiedene Siderophore, jedoch mit gleicher Affinität für Eisen ($K_f = 10^{32}$). Diesbezüglich hat der eine keinen Vorteil gegenüber dem anderen. Hier konnten Blaszcyk und seine Mitarbeiter [1980] zeigen, daß in einem Festbett-Denitrifikationsreaktor unter Eisenlimitierung mit Ethanol als Kohlenstoffquelle *Ps. fluorescens* 40% der kultivierbaren Bakterien ausmacht, gefolgt von 21% *Ps. stutzeri*. Mit Acetat als Kohlenstoffquelle ist dagegen unter sonst gleichen Bedingungen *Ps. stutzeri* mit 83% das am häufigsten anzutreffende Bakterium. Jedoch besteht mit Acetat die Gefahr, daß *Ps. aeruginosa* herausselektiert wird, nämlich dann, wenn anstelle von Nitrat der Elektronenakzeptor Nitrit vorliegt.

Ob eine Eisenkonzentration hoch oder niedrig ist, hängt von der Denitrifikationseffektivität des Reaktors ab. Die Denitrifikationseffektivität bestimmt das Maß an not-

wendigen Enzymen zur Denitrifikation, welche, da sie meist Eisen enthalten, wiederum den Eisenbedarf beeinflussen.

Wählt man die Eisenkonzentration im Zulauf der Denitrifikationsreaktoren so, daß die Population sich vorrangig aus Siderophorproduzenten zusammensetzt, so reduziert man durch die antibiotische Wirkung der gebildeten Siderophore die Möglichkeit des Vorkommens Gram-positiver Bakterien, da sich die antibiotische Wirkung der Siderophore bevorzugt auf Gram-positive Bakterien erstreckt [Weinstein u. Wagman, 1978].

Die antibiotische Wirkung des von *Ps. stutzeri* produzierten Nocardamin ist spezifisch gegen Mycobakterien wirksam [Weinstein u. Wagman, 1978].

4.6 Das mögliche Auftreten von Pilzen im RBR und anderen Denitrifikationsreaktoren

Biofilme bestehen aus zwei Hauptkomponenten, den Mikroorganismen und extrazellulären Polymeren, in denen die Mikroorganismen eingebettet sind. Die Organismen, die man in Biofilmen vorfindet, können Viren, aber auch Eukaryonten sein. Die Möglichkeiten sind vielfältig. Die dominanten Organismen sind jedoch häufig die Bakterien.

Auf einigen REM-Aufnahmen [persönliche Mitteilung von M. Reich-Walber, 1990] wurden hyphenförmige Gebilde im Biofilm auf den Füllkörpern aus dem RBR entdeckt, bei denen die Möglichkeit diskutiert wurde, inwiefern es sich hierbei um Pilze handeln könnte. Eine andere Möglichkeit wäre, daß es sich um Bakterien handelte, die unter den Bedingungen im Reaktor filamentös waren, bei der Anzucht auf Nähragar dann jedoch wieder stäbchen- oder kokkenförmig erschienen.

Unter Bedingungen mit hohen Scherkräften (z.B. RBR) müssen Biofilme, um intakt zu bleiben, besondere Strukturen ausbilden, da die Exopolysaccharide dann nicht ausreichen, um den Biofilm zu festigen. Auch bei großen Flocken treten diese Probleme auf. Abhilfe schaffen in diesen Fällen filamentöse Organismen, die ein wichtiger Bestandteil von Aggregaten unter solchen Bedingungen sind. Flocken ohne Filamente sind klein und rund. Dagegen sind Flocken mit Filamenten unregelmäßig gestaltet. Die Filamente bilden eine Struktur, die einem Skelett vergleichbar ist und von

stäbchenförmigen Bakterien umwachsen wird.

Um die Frage zu klären, ob das Vorkommen von Pilzen in einem RBR wahrscheinlich ist, sollen an dieser Stelle kurz die möglichen antagonistischen Effekte zwischen Bakterien und Pilzen dargestellt werden. Diese Effekte sind in Laborversuchen einfach zu untersuchen. Es besteht jedoch die Schwierigkeit, die Ergebnisse auf natürliche Systeme zu übertragen, da antagonistische Effekte stark von den Lebensbedingungen abhängig sind.

Fluoreszierende *Pseudomonaden* inhibieren die Keimung von Chlamydosporen phytopathogener Pilze, wie z. B. *Fusarium oxysporum*. Diese Inhibierung geschieht durch Siderophore, die die *Pseudomonaden* unter Eisenmangelbedingungen ausbilden. Die Gabe von Eisen unterbindet die Produktion der Siderophore und damit die inhibierende Wirkung auf die Keimung der Pilzsporen [Elad u. Baker, 1985]. Daneben konnte im Fall einer Mutante von *Pseudomonas spec.*, die kein Siderophor mehr produzierte ebenfalls eine Hemmwirkung auf die Keimung von Pilzsporen der Arten *F. oxysporum*, *F. solani* und *F. graminearum* festgestellt werden. Diese Hemmung war jedoch nicht durch Eisenzugabe aufzuheben. In diesem Fall wurde angenommen, daß eine Konkurrenz um den verfügbaren Kohlenstoff zwischen Bakterienbiomasse und Pilzsporen stattfand.

Jayaswal et al. [1990] konnten einen *Pseudomonas cepacia*-Stamm von den Karyopsen von *Tripsacum dactyloides* isolieren, der einen antifungiziden Wirkstoff produziert. Ihre Untersuchungen beziehen sich dabei im besonderen auf pflanzenpathogene Pilze. *Pseudomonas cepacia* produziert diesen Wirkstoff auf Maismehl-Agar und auf Kartoffel-Dextrose-Agar. Er wird nicht von Proteasen, Hitze, Säure oder Alkali denaturiert, so daß angenommen wird, daß es sich hierbei nicht um ein Protein handelt. Es handelt sich auch nicht um ein Siderophor. Alle diese Eigenschaften unterscheiden ihn deutlich von bereits früher von anderen *Pseudomonaden* isolierten antifungiziden Stoffen.

Insgesamt kann man sagen, daß die Unterdrückung von Pilzen durch fluoreszierende *Pseudomonaden* multifaktoriell begründet ist. Neben der Konkurrenz für Eisen und/oder Kohlenstoff gehört auch die Bildung von sekundären Metaboliten (z.B. Phenazine, Pyrrole, Acetylphloroglucinole oder Cyanid) zu den hemmenden

Maßnahmen der Pseudomonaden [Voisard et al., 1989]. Die Bildung von Cyanid als antifungizidem Wirkstoff wird durch Eisen stimuliert. Es kann also als Alternative angesehen werden, für Lebensbedingungen der Bakterien mit relativ viel Eisen, wo eine Hemmung durch Siderophore nicht gegeben ist [Voisard et al., 1989]. Natürlich ist eine solche Hemmung nie vollständig, und es gibt immer einige Organismen, die durch Cyanid nicht gehemmt werden. Das kann u. a. dadurch geschehen, daß sie das Cyanid zu Formamid abbauen [VanEtten u. Kistler, 1984]. Auch unter dem Gesichtspunkt der dargelegten Beobachtungen der Stimulation der Cyanidbildung durch Eisenzugabe ist im Trinkwasserbereich eine niedrige Eisenkonzentration bei mikrobiellen Prozessen eindeutig zu bevorzugen.

Berücksichtigt man alle Faktoren, ist das Auftreten von Pilzhyphen in Denitrifikationsreaktoren des beschriebenen Typs unwahrscheinlich, da die Hemmung durch die vorhandene Bakterienbiomasse zu groß ist. Mit dem Rohwasser in den Reaktor eintretende Pilzsporen werden an der Keimung gehindert. Da die Hemmung jedoch in erster Linie von siderophorbildenden Bakterien ausgeht, sollten diese Bakterien durch geringe Eisenkonzentrationen im Einlauf herausselektiert werden.

4.7 Vergleich des Isolats *Pseudomonas* MS1 mit anderen Arten der selben RNA-Gruppe

Der Denitrifikant, der im Rahmen dieser Arbeit als *Pseudomonas* MS1 bezeichnet wird, wurde aus einem Labor-RBR isoliert, der unter axenischen Anfangsbedingungen betrieben wurde.

Das Isolat, das durch seine starke Schwärmerbewegung auf Nähragar auffiel, war in den nicht-axenischen Reaktoren vorher nie beobachtet worden. Die starke Schwärmerbewegung deutet auf eine reduzierte bis nicht vorhandene Glycocalyxbildung hin. Die dadurch ausfallende Schutzwirkung gegen antibiotische Ausscheidungen anderer Organismen ist eine mögliche Erklärung dafür, weshalb das beschriebene Isolat nie in anderen Reaktoren zu finden war, die mit undefinierten Mischkulturen betrieben wurden. In Reaktoren, wo das Problem der antibiotisch wirksamen Stoffe anderer Bakterien nicht auftritt, wie im Fall der Reaktoren, die mit einem reduzierten Artenspektrum betrieben werden, ist das Auftreten von *Pseudomonas* MS1 nicht ausgeschlossen.

Das Isolat zeichnet sich neben seiner Schwärmerbewegungen auf Nähragar durch die Bildung eines starken Siderophors aus. Dieses farblose Siderophor hat eine stärkere Affinität zu Eisen als das Pyoverdin von *Ps. fluorescens* [persönliche Mitteilung von Prof. J.M. Meyer, Straßburg].

Identifizierungsansätze

Die Identifizierungen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ, Braunschweig) und von Herrn Dr. Kämpfer aus der Arbeitsgruppe Dott der FU Berlin ergaben aufgrund physiologischer Tests in beiden Fällen die Einordnung in die RNA-Gruppe I der Pseudomonaden.

Bei der RNA-Gruppe I handelt es sich um die komplexeste Gruppe aller Pseudomonaden. Bis heute ist das Einteilungssystem nach Arten innerhalb dieser Gruppe nicht zufriedenstellend [Bergey's Manual, 1984]. Das führt dazu, daß immer wieder Isolate beschrieben werden, die keiner der bekannten Arten zuzuordnen sind. Ein Beispiel dafür ist das im Rahmen dieser Arbeit isolierte Bakterium.

Die RNA-Gruppe I der Pseudomonaden

Diese Gruppe umfaßt saprophytische und phytopathogene fluoreszierende Pseudomonaden, die nichtpigmentierte *Pseudomonas stutzeri*-Gruppe und nichtpigmentierte Arten, die der *Pseudomonas alcaligenes*-Gruppe angehören [Bergey's Manual, 1984].

Die Vertreter der RNA-Gruppe I zeichnen sich durch die Bildung von Siderophoren aus, die oft charakteristisch gelb-grün gefärbt sind. Stämme, die keine Farbstoffe in das Medium ausscheiden, können jedoch häufig anhand der physiologischen Eigenschaften einer Art zugerechnet werden [Bergey's Manual, 1984].

Die saprophytischen Stämme dieser Gruppe können von den phytopathogenen Arten durch die positive Arginindihydrolase-Reaktion unterschieden werden. Daneben ist das Wachstum der Saprophyten in den meisten Medien schneller [Bergey's Manual, 1984].

Die Ergebnisse dieser Identifizierungsansätze weisen auf eine enge Verwandtschaft zwischen dem Isolat *Pseudomonas* MS1 und *Ps. fluorescens* hin. Dadurch veranlaßt,

wurden die Ergebnisse des prozentuellen Anteils dieses Isolats an der Gesamtpopulation in Reaktoren einbezogen in die Ergebnisse, die sich auf *Ps. fluorescens* beziehen und die Abhängigkeit seines Auftretens von der Eisenkonzentration im Einlaufwasser des Reaktors (s. Abb. III.15). Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Stämme, zeigt, daß diese Vereinfachung legitim war und unterstreicht nochmals die sehr enge Verwandtschaft.

Ein anderer Ansatz zur Identifizierung von *Pseudomonas* MS1 wurde von Prof. J. M. Meyer und seiner Arbeitsgruppe in Straßburg gewählt.

Prof. Meyer ordnet das Isolat einer *Ps. cepacia*-ähnlichen Gruppe zu. Diese Zuordnung geschah nach der teilweisen Analyse des von *Pseudomonas* MS1 produzierten Siderophors, das strukturell völlig verschieden vom Pyoverdin von *Ps. fluorescens* ist [persönliche Mitteilung von Prof. Meyer, 1993].

4.8 Axenische Kulturen in Denitrifikationsreaktoren

Verschiedene Arbeitsgruppen [Nilsson u. Ohlson, 1982; Schmidt u. Vorlop, 1987; Weil u. Kalbertodt, 1989; Heinemann, 1990] versuchen immer wieder das Artenspektrum in Denitrifikationsreaktoren zu limitieren, um auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit des Auftretens möglicherweise pathogener Keime zu verringern. Daneben bietet die Minimierung des Artenspektrums eine bessere Kontrolle über die mikrobiologischen Vorgänge im Reaktor.

Die Limitierung der auftretenden Arten in Denitrifikationsreaktoren kann durch den Betrieb der Anlagen als lithoautotrophe Denitrifikationsanlagen geschehen. Die Zahl der lithoautotrophen Denitrifikanten ist gegenüber den heterotrophen sehr beschränkt. Da die lithoautotrophe Biomasse jedoch rasch als Substrat für heterotrophe Bakterien Verwendung findet [Selenka, 1987], wird das Ziel eines limitierten Artenspektrums nicht erreicht und nach kürzester Zeit ist eine genauso heterogene Gesellschaft vorzufinden wie in anderen Denitrifikationsreaktoren.

Eine andere Möglichkeit zur Begrenzung des Artenspektrums ist die Immobilisierung von Reinkulturen des gewünschten Denitrifikanten auf oder in einem Trägermaterial, das eventuell gleichzeitig als Kohlenstoffquelle dienen kann.

Beispiele von Denitrifikationsverfahren mit immobilisierten Bakterien sind in Tabelle IV.1 zusammengefaßt.

Probleme bei der Immobilisierung von Biokatalysatoren betreffen insbesondere die Stabilität des Immobilisats und die Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit sowohl durch Diffusionsbegrenzungen des Substrates als auch des Produktes. Das Auswaschen bzw. Auswachsen von Mikroorganismen aus dem Immobilisat kann eventuell durch Anlegen einer mikroorganismenfreien Außenschicht verhindert werden. Gleichzeitig ist die Bakterienkultur vor Fremdinfectionen zu schützen, z. B. in dem das Immobilisat durch UV-Bestrahlung in regelmäßigen Abständen oberflächlich sterilisiert wird [Müller et al., 1991].

Tab.IV.1	Vergleich von Denitrifikationsverfahren mit immobilisierten Bakterien		
Gruppe	Schmidt u. Vorlop, 1987; Weil u. Kalbertodt, 1989	Nilsson u. Ohlson, 1982	Heinemann, 1990
Bakterien	<i>Ps. denitrificans</i> autotroph	<i>Ps. denitrificans</i> heterotroph	<i>Ps. spec.</i> heterotroph
H-Donator	Wasserstoff	Ethanol, K-Tartrat	Polyhydroxybuttersäure
Gelmatrix	Ca-Alginat	Ca-Alginat	Ca-Alginat, Chitosan
intermediär NO₂⁻	+	+	+
Umsatzrate [kg N/m³ · d]	0,65 ¹ 0,62 ²	0,8 ³	0,2 ⁴
¹ Schmidt u. Vorlop [1987]; Laboranlage 10°C ² Weil u. Kalbertodt [1989]; halbtechn. Versuchsanlage 10°C ³ Laboranlage 22°C ⁴ Laboranlage 18°C			

Auch diese heterotrophen und autotrophen Denitrifikationsverfahren mit immobilisierten Bakterien werden während des Betriebs der Anlagen von anderen Bakterien infiziert. Das mikroorganismenhaltige Rohwasser, das den Reaktor durchströmt, führt zu einer stetigen Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der "unerwünschten" und zuungunsten der ursprünglichen Bakterien. Die vorgeschlagene

regelmäßige UV-Sterilisation der Oberfläche der Träger ist in der Praxis kaum durchführbar und müßte daneben so häufig durchgeführt werden, daß das Verfahren unwirtschaftlich würde.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurde untersucht, wie ein definierter Biofilm, der sich unter axenischen Bedingungen ausbilden konnte, durch auf ihn mit dem Rohwasser einströmende Mikroorganismen reagiert. Der zur Ausbildung dieses definierten Biofilms notwendige apparative Aufwand (sterilisierbarer RBR) ist im Labormaßstab gerade noch zu bewältigen, beim tatsächlichen Einsatz im Wasserwerk jedoch unmöglich.

Obwohl der Biofilm, wie im elektronenmikroskopischen Bild sichtbar, vor Beginn der unsterilen Phase dicht ausgebildet war, wurde er in wenigen Versuchstagen von mit dem Rohwasser eintretenden Bakterien durchsetzt. Auch eine UV-Entkeimung des Rohwassers vor Eintritt in den Reaktor brachte keine nennenswerte Verbesserung.

Wie bereits in vorhergehenden Versuchen gefunden, bestätigte sich auch hier wieder der stark selektive Druck folgender Faktoren: Denitrifikationsfähigkeit, Substratverwertung, Eisenkonzentration im Einlaufwasser des Reaktors. Selbst vorhandene gut ausgebildete definierte Biofilme verändern sich in wenigen Tagen entsprechend den selektiven Faktoren, deren Einfluß in Kapitel IV.5 genauer dargelegt ist. Hierbei ist es gleichgültig, welcher Stamm der Ausgangsstamm zur Biofilmbildung unter axenischen Bedingungen war.

Es ist ersichtlich, daß auf längere Sicht und mit vertretbaren wirtschaftlichen Mitteln ein Einfluß auf die Population in Denitrifikationsreaktoren in Richtung definierter Populationen nur auszuüben ist, wenn man sich biologischer Methoden (Selektion) bedient. Dazu ist es unbedingt erforderlich, die die Populationsdynamik betreffenden Faktoren genauer zu untersuchen. Ich hoffe, daß diese Arbeit einen Beitrag dazu geleistet hat.

I Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wird von drei Hauptergebnissen geprägt:

Das erste ist die Entwicklung der enzymatisch-mechanischen Methode zur Auflösung von Bakterienaggregaten und die Ablösung des Biofilms in einzelnen Schichten.

Das zweite Hauptergebnis, das unzweifelhaft von größerer Tragweite ist, ist die erstmalige Beschreibung des Einflusses der Eisenkonzentration in Denitrifikationsreaktoren auf die Populationsdynamik.

Im Zusammenhang mit den Arbeiten unter eisenlimitierten Bedingungen konnte dann als drittes Hauptergebnis *Pseudomonas* MS1, ein bislang nicht beschriebener Stamm, isoliert werden.

Die Entwicklung der enzymatisch-mechanischen Methode ermöglicht die verbesserte Auflösung von Bakterienaggregaten und verbunden damit eine höhere Ausbeute an KBE aus den Proben. Als Enzym wird bei dieser Methode eine Cellulase-Rohpräparation von *Basidiomyces spec.* eingesetzt. Diese hydrolisiert die Exopolysaccharide, die hauptsächlich verantwortlich sind für die Stabilität der Bakterienaggregate. Da es sich hierbei nur um eine teilweise Hydrolyse handelt, wird das vollständige Auflösen des Verbandes durch eine mechanische Methode, dem Ultra Turrax (2 Minuten), herbeigeführt. Gegenüber Wasserproben, die nur mit dem Ultra Turrax behandelt wurden, erhöhte sich die Anzahl an KBE um das Doppelte auf 20% der lichtmikroskopisch sichtbaren Zellen. Im Falle des Biofilms auf Trägermaterialien, wie z. B. Blähtonkugeln, wurde als mechanischer Homogenisierungsschritt anstelle des Ultra Turrax ein Ultraschallstab eingesetzt (2 Minuten, 50 Watt). Die Anwendung der kombinierten enzymatisch-mechanischen Methode hatte im Falle des Biofilms zur Folge, daß dieser sukzessiv abgelöst werden konnte. Dadurch wurde es möglich, Bakterienanalysen der einzelnen Schichten des Biofilms getrennt vorzunehmen.

Zahlreiche Bakterienanalysen an Denitrifikationsreaktoren ermöglichten die Beobachtung, daß die Eisenkonzentration im Einlaufwasser eines Reaktors von entscheidender Bedeutung für die Zusammensetzung der Population in einem Denitrifikationsreaktor ist. Wie bereits bei Paul und Clark [1988] beschrieben, erhöhen denitrifizierende Verhältnisse das Redoxpotential so stark, daß dadurch die

Eisenreduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) inhibiert wird.

Bakterien, die in der Lage sind, Siderophore zu produzieren (*Ps. fluorescens*, *Ps. stutzeri* u.a.), siedelten sich bei niedrigen Eisenkonzentrationen im Einlaufwasser bezogen auf die Denitrifikationseffektivität bevorzugt als Hauptkomponente des Biofilms an. Dagegen machte *Ps. mendocina*, das keine Siderophore bildet, einen größeren Teil der Population aus, wenn dem Reaktor relativ zur Denitrifikationseffektivität viel Eisen zugeführt wurde.

Die festgestellte Gesetzmäßigkeit ist so streng, daß ausgehend von einer bekannten Eisenkonzentration und Denitrifikationseffektivität im Reaktor der Anteil von *Ps. fluorescens*, *Ps. stutzeri* und *Ps. mendocina* an der Gesamtzahl der kultivierbaren Bakterien angegeben werden kann.

Das unter niedrigen Eisenkonzentrationen aus dem Biofilm zu extrahierende Pyoverdin machte deutlich, daß die Bildung des Siderophors auch unter anoxischen Bedingungen im Denitrifikationsreaktor erfolgte. Auch in Batch-Versuchen konnte eine geringe Siderophorproduktion von *Ps. fluorescens* unter denitrifizierenden Bedingungen nachgewiesen werden.

Die Beobachtungen bezüglich der Zusammensetzung der Bakterienpopulation in Denitrifikationsreaktoren und der selektierenden Wirkung des Eisens bezogen sich nicht nur auf Roto-Bio-Reaktoren, sondern waren bei Reaktoren verschiedenster Bauart und Betriebsweise zu beobachten [Blasczyk et al., 1980; Roennefahrt et al., 1988].

Außerdem gelang im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung des Bakterienstammes *Pseudomonas* MS1, eines bislang nicht beschriebenen Stammes. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine starke Schwärmertätigkeit auf Nähragar und durch die Bildung eines ebenfalls bis jetzt nicht beschriebenen Siderophors mit dem vorläufigen Namen Ornibactin aus. Unter bestimmten Bedingungen trat diese Art anstelle von *Ps. fluorescens* in Denitrifikationsreaktoren auf.

II Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Wolf danke ich freundlichst für die Übernahme des Themas und die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Herrn Prof. Dr. Carl Johannes Soeder gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz und das Vertrauen, das er in mich setzte.

Prof. Jean Marie Meyer aus Straßburg danke ich für das entgegengebrachte Interesse, seine wertvollen Anregungen und für die Bereitschaft, *Pseudomonas* MS1 weiter zu betreuen.

Mein Dank gilt der deutsch-israelischen Stiftung für wissenschaftliche Forschung und Entwicklung, Jerusalem, für die Bereitstellung von Sach- und Personalmitteln im Rahmen des Projekts Nr. I-45-150.8/87 "Denitrifikation".

Herrn Dr. N. Salhani danke ich für die freundliche Aufnahme in die von ihm geleitete Arbeitsgruppe und die stetige moralische Unterstützung.

Danken möchte ich Herrn H. Overath, ohne den es keinen Roto-Bio-Reaktor gäbe, für seine freundschaftlichen Diskussionen und wichtigen Anregungen.

Bei Herrn F. Els (Institut für Reaktorwerkstoffe) bedanke ich mich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Mein Dank gilt Herrn Dipl. Biol. M. Schwefringhaus, der im Rahmen seiner Diplomarbeit die Arbeiten mit axenischen Kulturen durchführte und der *Pseudomonas* MS1 isolierte.

Ebenso danke ich Frau Dipl. Biol. C. Hoch, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit die Arbeiten mit dem Biolog-Identifizierungssystem durchführte.

Manfred Schastok und Wolfgang Wimmer danke ich für die Unterstützung bei der graphischen Gestaltung dieser Arbeit.

Ich danke all denen, die mir durch ihre freundliche Aufnahme im IBT 3 ein so gutes Arbeitsklima schufen, daß es Freude bereitete, in diesem Institut zu arbeiten.

III Literaturverzeichnis

- Ampola, G. und E. Garino, 1896. Über die Denitrifikation. Zentralblatt für Bakteriologie, 670-676.
- Belas, M.R. und R.R. Colwell, 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. J. Bacteriol. 151, 1568-1580.
- Blaszyk M., R. Mycielski, H. Jaworowska-Deptuch und K. Brzostek, 1980. Effect of various sources of organic carbon and high NO_2^- - and NO_3^- - concentrations on the selection of denitrifying bacteria. Acta Microbiol. Polonica 29, 397-406.
- Bochner B.R. und M.A. Savageau, 1977. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. Appl. Env. Microb. 33, 434-444.
- Bochner B.R., 1990. Taxonomy of gram-negative aerobic bacteria: Carbon source utilization data combined with phylogenetic inferences. Biolog Inc., 3447 Investment Blvd. Suite 2, Hayward, Ca 94545.
- Bollag J.M., M.L. Orcutt und B. Bollag, 1970. Denitrification by isolated soil bacteria under various environmental conditions. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 34, 875-879.
- Borneff J., 1991. Hygiene. Ein Leitfaden für Studenten und Ärzte. 5. überar. u. erw. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Bringmann G. und R. Kühn, 1963. Ein Schnell-Denitrifikationsverfahren mit automatischer Redox-Steuerung. Gesundheits-Ing. 11, 333-334.
- Brown C.M., D.C. Ellwood und J.R. Hunter, 1977. Growth of bacteria at surfaces: Influence of nutrient limitation. FEMS Microbiol. Lett. 1, 163-166.
- Burdon K.L., 1946. Fatty material in bacterial and fungi revealed by staining dried fixed slide preparations. J. Bacteriol. 52, 665-680.
- Buyer J.S., L.S. Sikora und M. Kratzke, 1990. Monoclonal antibodies to ferric pseudobactin, the siderophore of plant growth-promoting *Ps. putida* B10. Appl. Environm. Microbiol. 56, 419-424.

- Christensen W.B., 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bacteriol. 52, 461-466.
- Collins V.G., 1963. The distribution and ecology of bacteria in freshwater. Proc. Soc. Wat. Treatm. Examin. 12, 40-73.
- Cornelis P., D. Hohnadel und J.M. Meyer, 1989. Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. Infection and immunity, 57, 3491-3497.
- De Man J.C., 1975. The probability of most probable number. Eur. J. Appl. Microbiol. 1, 67-78.
- Dott W., 1986. Die mikrobiologische Denitrifizierung durch heterotrophe und autotrophe Organismen. Vortrag auf dem wissensch. Kolloquium "Biologische Nitratentfernung unter Einsatz von Wasserstoff und anderen H-Donatoren". Bochum 18.07.86.
- Dott W. und H.J. Trampisch, 1983. Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 5. Mitteilung: Vergleichende Untersuchungen an zwei Schnellsandfiltern. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 177, 141-155.
- Elad Y. und R. Baker, 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp.. Phytopathology 75, 1053-1059.
- Fabig W. und J.C.G. Ottow, 1979. Isolierung und Identifizierung neuer denitrifizierender Bakterien aus einer Modellkläranlage mit anaeroben Festbettreaktoren. Arch. Hydrobiol. Stuttgart 85, 372-391.
- Ferguson S.J., 1987. Denitrification: a question of the control and organization of electron and ion transport. TIBS 12, 354-357.
- Fletcher M. und G.D. Frootgate, 1973. An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. J. Gen. Microbiol. 74, 325-334.
- Focht D.D. und H. Joseph, 1973. An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37, 698-699.

- Gayon, U. und G. Dupetit, 1886. Recherches sur la reduction des nitrates par les infiniment petits. Mem. Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux Ser. 3.2, 201-307
- Gordon A.S., S.M. Gerchakov und F.J. Millero, 1983. Effects of inorganic particles on metabolism by a periphytic marine bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 45, 411-417.
- Gouda S. und F. Chodat, 1963. Glyoxylate et succinate, facteurs determinant respectivement l'hypochromie et l'hyperchromie des cultures de *Pseudomonas fluorescens*. Pathologia et Microbiologia 26, 721-725.
- Govan J.R.W., 1975. Mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: The influence of culture medium on the stability of mucus production. J. Med. Microbiol. 8, 513-522.
- Govan J.R.W. und J.A.M. Fyfe, 1978. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: Resistance of the mucoid form to carbenicillin, flucloxacillin, tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 4, 233-240.
- Gregersen T., 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechn. 5, 123-127.
- Hajirezaei M.R., 1989. Vergleichende Untersuchungen einiger pflanzlicher Abfallstoffe als Substratquelle für die Denitrifikanten bei der Trinkwasseraufbereitung; Entwicklung und Einsatz einer Methode zur Bestimmung der Denitrifikationsrate im Kurzzeittest. Diplomarbeit, Abt. Biologie der Universität Bayreuth.
- Heinemann A., 1990. Untersuchungen zur Co-Immobilisierung von Bakterien und Poly- β -Hydroxybuttersäure in Calciumalginat und Chitosan zur heterotrophen Denitrifikation von Trinkwasser. Diplomarbeit, Inst. f. Lebensmitteltechnol., Universität Hohenheim.
- Hejzlar J. und J. Chudoba, 1986. Microbial polymers in the aquatic environment - I. Wat. Res. 20, 1209-1216.
- Hejzlar J. und J. Chudoba, 1986. Microbial polymers in the aquatic environment - II. Wat. Res. 20, 1217-1221.

- Hohnadel D. und J.M. Meyer, 1988. Specificity of pyoverdinin-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. *J. Bacteriol.* **170**, 4865-4873.
- Holt J.G. und N.R. Krieg (eds.), 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, Verlag Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hugh R. und E. Leifson, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.* **66**, 24-26.
- Jayaswal A., 1990. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1053-1058.
- Jeter R.M. und J.L. Ingraham, 1981. The denitrifying procaryotes. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds.). *The prokaryotes. A handbook of habitats*. Springer Verlag New York, 913-925.
- Keller-Schierlein W., V. Prelog und H. Zöhner, 1964. Siderochrome. *Fortschritte d. Chem. org. Naturst.* **22**, 279-322.
- Kenne L. und B. Lindberg, 1983. Bacterial polysaccharides. In: G.O. Aspinall (ed.). *The polysaccharides*, Vol. 2. Academic Press, New York. 287-363.
- Knowles R., 1982. Denitrification. *Microbiol. Reviews.* **46**, 43-70.
- Kuznetsov S.I., G.A. Dubinia und N.A. Lapteva, 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 377-387.
- Lelliot R.A., E. Billing und A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bact.* **29**, 470-489.
- Litchfield C.D., J.B. Brake, J. Zindulis, R.T. Watanabe und D.J. Stein, 1975. Optimization of procedures for the recovery of heterotrophic bacteria from marine sediments. *Microbial Ecology* **1**, 219-233.
- Lowbury E.J.L. und A.G. Collins, 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas pyocyanea*. *J. Clin. Pathol.* **8**, 47-48.

- Luft J.H., 1971. Ruthenium red and ruthenium violet. *Anat. Rec.* **171**, 347-368.
- Mackie E.B., K.N. Brown, J. Lam und J.W. Costerton, 1979. Morphological stabilization of capsules of group B streptococci, types Ia, II and III, with specific antibody. *J. Bacteriol.* **138**, 609-617.
- Marsh P.D., J.R. Hunter, G.H. Bowden, I.R. Hamilton, A.S. McKee, J.M. Hardie und D.C. Ellwood, 1983. The influence of growth rate and nutrient limitation on the microbial composition and biochemical properties of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 755-770.
- Marshall K.C., R. Stout und R. Mitchell, 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microb.* **68**, 337-348.
- Marshall K.C., R.H. Cruickshank, 1973. Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. *Arch. Microbiol.* **91**, 29-40.
- Matthysse A.G., P. Wyman und K.V. Holmes, 1978. Plasmid-dependent attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to plant tissue culture cells. *Infect. Immun.* **22**, 516-522.
- Mayfield C.J. und W.E. Innis, 1977. A rapid simple method for staining bacteria flagella. *Can. J. Microbiol.* **23**, 1311-1313.
- Meyer J.M. und M. Abdallah, 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physiochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 319-328.
- Meyer J.M., D. Hohnadel, A. Khan und P. Cornelis, 1990. Pyoverdine-facilitated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Immunological characterization of the ferripyoverdine receptor. *Molecular Microbiology* **4**, 1401-1405.
- Meyer J.M. und J.M. Hornsperger, 1978. Role of pyoverdine PF, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 329-331.
- Meyer J.M., M. Mock und M.A. Abdallah, 1979. Effect of iron on the protein composition of the outer membrane of fluorescent pseudomonads.

- FEMS Microbiol. Lett. 5, 395-398.
- Misaghi J. und R.G. Grogan, 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 59, 1436-1450.
- Müller W.R., A. Heinemann und J. Wurmthaler, 1991. Verfahren zur Nitratelimination. in: Gewässerschutz und Wasseraufbereitung - Grundlagen einer zuverlässigen Trinkwasserversorgung; 5. Trinkwasserkolloquium Feb. 1991 des Forschungs- und Entwicklungsinstituts für Industrie- und Siedlungswasserwirtschaft Stuttgart. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft Bd. 115.
- Murphy J.R., A.M. Pappenheimer und S.T. De Borms, 1974. Synthesis of diphtheria toxgene products in *E. coli* extracts. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 71, 11-15.
- Neilands J.B., 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Nutr.* 1, 27-46.
- Nelson N., 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
- Nilsson I. und S. Ohlson, 1982. Columnar denitrification of water by immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14, 86-90.
- N. N., 1990. Nährböden Handbuch. Merck (ed.), Darmstadt.
- N. N., 1980. Richtlinie des Rates vom 15.07.1980 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (80/778/EWG) (ABl.EG vom 30.08.1980 Nr. L 229/11).
- N. N., World Health Organization (WHO) (ed.). Guidelines for drinking-water quality. Vol.2 health criteria and other supporting information (1984). Geneva.
- Overath H., T. Raphael, N. Salhani und C.J. Soeder, 1989. Denitrifikation von Trinkwasser in Festbett-Drehrohr-Reaktoren. *Wasser und Boden* 4, 199-202.
- Paul E.A. und F.E. Clark (eds.), 1988. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press.

- Poindexter J.S., 1981. Oligotrophy: Feast and famine existence. In: M. Alexander (ed.) *Advances in Microbial Ecology* 5, Plenum Press, New York, 63-89.
- Pollack J.R. und J.B. Neilands, 1970. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 38, 989-992.
- Poszich C., 1988. Über das Abbaupotential einer speziell für den Abbau von phenolischen Komponenten produzierten Bakterienmischpopulation. Diplomarbeit, Abt. Biologie der Ruhruniversität Bochum.
- Rauscher K., J. Voigt, I. Wilke und K.T. Wilke (eds.), 1972. *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt a. Main.
- Rautenbach R., W. Kopp, G.v. Opbergen und R. Hellekes, 1988. Nitratelimination durch Umkehrosmose und/oder Elektrodialyse - Verfahrensentwicklung und Verfahrensoptimierung. Vortrag vor der Technischen Akademie Wuppertal 19.10.88.
- Reichardt W., 1978. *Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1. Aufl.
- Reich-Walber M., 1990. Verfahrenstechnische Optimierung des Roto-Bio-Reaktors im Hinblick auf die Denitrifikation von Trinkwässern. Forschungszentrum Jülich, Bericht Nr. 2376.
- Rheinheimer G., W. Hegemann, J. Raff und I. Sekoulov (eds.), 1988. *Stickstoffkreislauf im Wasser*. R. Oldenbourg Verlag GmbH München.
- Read R.R. und J.W. Costerton, 1987. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Ps. putida* and *Ps. fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* 33, 1080-1090.
- Reasoner D.J. und E.E. Geldreich, 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environm. Microbiol.* 1, 1-7.
- Robertson L.A. und J.G. Kuenen, 1984a. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.* 139, 351-354.
- Robertson L.A. und J.G. Kuenen, 1984b. Aerobic denitrification - Old wine in new bottles. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 525-544.

- Roennefahrt K.W., M. Dickgreber und T. Stöver, 1988. Biologische Trinkwasseraufbereitung - Spezifische Nitrarentfernung mit Hilfe natürlich vorkommender aquatischer Mikroorganismen in Festbettreaktoren mittels Äthanol. Vortrag vor der Technischen Akademie Wuppertal.
- Rohmann U. und H. Sontheimer, 1985. Nitrat im Grundwasser - Ursachen, Bedeutung, Lösungswege. DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe.
- Savage D.C., 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annual Review of Microbiology 31, 107-133.
- Schimz K.L., K. Irrgang und B. Overhoff, 1985. Trehalose, a cytoplasmic reserve disaccharide in *Cellulomonas* sp. DSM 20108. FEMS Microbiol. Lett. 30, 165-169.
- Schlegel H.G., 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarb. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schmider F. und J.C.G. Ottow, 1981. Quantitative Differenzierung der denitrifizierenden Flora in unterschiedlich belasteten Biotopen (Gewässer, Böden und Abwasser). Landw. Forsch., Sonderheft 38, 667-677.
- Schmidt J. und K.D. Vorlopp, 1987. Process for denitrification of drinking water. In: Proc. 4th European Congress on Biotechnology 1987 Bd. 1 Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 155-158.
- Schultz-Hock R., 1989. Vorrichtung zur Bestimmung der mit Gasentwicklung verbundenen biologischen Aktivität von Mikroorganismen. Deutsches Gebrauchsmuster G 89-10-6601.
- Schultz-Hock R. und M.R. Hajirezaei, 1990. A new method for the measurement of denitrification activity. Mitteilungen der deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft 60, 325-331.
- Selenka F. und R. Meissner, 1971. Unterschiedliche Erfassung von Keimgruppen auf Nährböden bei der Bestimmung der Keimzahl im Wasser. Arch. Hyg. 154, 488-499.
- Sneath P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe und J.G. Holt (eds.), 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Verlag Williams & Wilkins, Baltimore.

- Somogyi M., 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195, 19-23.
- Stumm W. und J.J. Morgan, 1981. Aquatische Chemie. Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- Subcommittee on Iron, 1979. Iron. University Park Press.
- Thornley M., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol. 23, 37-52.
- Tomlinson G.A. und C.T. Hochstein, 1972. Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. Tech. Eng. 3, 115-117.
- Ulker A. und B. Sprey, 1990. Production and characterization of an unglycosylated low molecular weight 1,4- β -glucan-glucanohydrolase. In: Kubicek, C.P. et al. (eds.) *Trichoderma reesei* Cellulases: Biochemistry, Genetics, Physiology and Application, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Van Etten H.D. und H.C. Kistler, 1984. Microbial enzyme regulation and its importance for pathogenicity. In: Kosuge T. u. E.W. Nester (eds.) Plant-Microbe-Interactions. Macmillan Publishing Company, New York, 42-68.
- Voisard C., C. Keel, D. Haas und G. Defago, 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. The EMBO Journal 8, 351-358.
- Vogl J., A. Heigl und K. Schäfer (eds.), 1988. Internationaler Umweltatlas-Jahrbuch der Weltressourcen Analysen, Daten, Berichte. ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg-München.
- Wagner R. (ed.), 1989. Wasserkalender 1989 - Jahrbuch für das gesamte Wasserfach. Erich Schmidt Verlag.
- Weil G. und S. Kalbertodt, 1989. Autotrophe Denitrifikation von Trinkwasser mittels immobilisierter *Paracoccus denitrificans*. Bioengineering 6, 21-31.
- Weinstein M.J. und G.H. Wagman (eds.), 1978. Antibiotics - Isolation, separation and purification. Elsevier.

- Whatley M.H., J.B. Margot, J. Schell, B.B. Lippincott und J.A. Lippincott, 1978. Plasmid and chromosomal determination of Agrobacterium adherence specificity. J. Gen. Microbiol. 107, 395-398.
- Winkelmann G., D. v.d. Helm, J.B. Neilands (eds.), 1987. Iron transport in microbes, plants and animals. Weinheim.
- Winogradsky S. N., 1949. Microbiologie du sol. Masson et Cie., Paris.
- Wolters N. und W. Schwarz, 1956. Untersuchungen über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen in reinen Grundwässern. Arch. Hydrobiol. 51, 500-541.
- Yanagita T., T. Ichikawa, T. Tsuji, Y. Kamata, K. Ito und M. Sasaki, 1978. Trophic groups of bacteria, oligotrophs and eutrophs - their distribution in fresh- and seawater areas in central northern Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 24, 59-88.
- ZoBell C.E., 1943. The effect of solid surfaces on bacterial activity. J. Bacteriol. 46, 39-56.

IV Abbildungsverzeichnis

Abb.I.1	Globaler Wasserkreislauf (in Tausend km ³ pro Jahr) [Vogl et al., 1988]	1
Abb.I.2	Toxizität von Nitrat [Rohmann u. Sontheimer, 1985]	4
Abb.I.3	Änderung der Ionenzusammensetzung des Wassers nach physikalisch-chemischer "Nitratelimination"	6
Abb.I.4	Der Stickstoffkreislauf [Schlegel, 1992]	9
Abb.I.5	Stöchiometrische Verhältnisse bei der heterotrophen Denitrifikation [Rohmann u. Sontheimer, 1985]	10
Abb.I.6	Stöchiometrische Verhältnisse bei der autotrophen Denitrifikation [Rohmann u. Sontheimer, 1985]	11
Abb.I.7	Schema der enzymkatalysierten Elektronenübertragung bei den einzelnen Reaktionsschritten der Denitrifikation [Rohmann u. Sontheimer, 1985]	12
Abb.I.8	An der Denitrifikation beteiligte Enzyme am Beispiel der Atmungskette von <i>Paracoccus denitrificans</i> [Ferguson, 1987]	13
Abb.I.9	Bereiche der Eisen(II) - bzw. Eisen(III) - Dominanz bei 25°C und 1 bar [Subcommittee on Iron, 1979].	26
Abb.I.10	Struktur von Ferrichrom und von Enterobactin [Keller- Schierlein et al., 1964; Pollack u. Neilands, 1970]	28
Abb.I.11	Pyoverdine von <i>Ps. aeruginosa</i> [Buyer, 1990]	29
Abb.II.1	Schematische Darstellung des Roto-Bio-Reaktors (K1 = 1. Kammer, K2 = mittlere Kammer, K3 = 3. Kammer)	34

Abb.II.2	N ₂ O-Eichkurve für die modifizierte Warburgapparatur	58
Abb.II.3	Beispiel einer Dünnschichtchromatographieplatte mit aufgetragenen Proben nach Orcein-Reagenz-Behandlung. Es sind Proben mit abgebautem (6d) und nicht abgebautem Zucker sichtbar.	63
Abb.II.4	Glukose Eichgerade nach Nelson-Somogyi	67
Abb.II.5	Chromatogramm einer Eichlösung mit verschiedenen Zuckern	68
Abb.III.1	Koloniebildende Einheiten bzw. MPN der Lebendkeimzahl auf/in verschiedenen Medien nach 14-tägiger Inkubation bei 21°C.	70
Abb.III.2	Vergleich aerobe (ae) und anaerobe (an) Inkubation auf verschiedenen Medien nach 14-tägiger Inkubation bei 21°C.	70
Abb.III.3	14-tägige Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (10°C/21°C).	71
Abb.III.4	"Most probable number" für Denitrifikanten in verschiedenen Medien nach 14-tägiger Inkubation bei 21°C.	73
Abb.III.5	Die Effektivität verschiedener Homogenisierungsmethoden bezüglich der Aggregatauflösung bei Proben aus dem Auslauf des RBR zur Denitrifikation.	74
Abb.III.6	Einfluß der Dauer der Ultraschallbehandlung auf die Ablösung der Bakterienbiomasse von Blähtonkugeln.	75
Abb.III.7	Zerstörte und nicht zerstörte Bakterien nach Ultra-Turraxbehandlung.	76

Abb.III.8	Blähtonkugel vor und nach 2-minütiger Behandlung mit Ultraschall (50 Watt); in beiden Fällen ist ein dichter Biofilm zu sehen, über dessen Dicke keine Aussage zu machen ist.	78
Abb.III.9	Ionenaustauscherchromatogramm des Hydrolysats der extrazellulären Polysaccharide von <i>Pseudomonas fluorescens</i>	79
Abb.III.10	Kombinierte enzymatisch-mechanische Homogenisierung von Aggregaten im Auslauf eines RBR.	81
Abb.III.11	Biofilm auf einer halbierten Blähtonkugel	82
Abb.III.12	Verbliebene Bakterien auf der Blähtonkugel nach 2-stündiger Inkubation mit Cellulase und 2-minütiger Ultraschallbehandlung.	82
Abb.III.13	Nach 6 Stunden Inkubation mit Cellulase und 2-minütiger Ultraschallbehandlung ist die Oberfläche der Blähtonkugeln biofilmfrei.	83
Abb.III.14	Anzahl der KBE nach den einzelnen Schritten der fraktionierten Ablösung des Biofilms vom Trägermaterial.	83
Abb.III.15	Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten in der Auslaufpopulation	86
Abb.III.16	Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten der Population des Auslaufs in Abhängigkeit von den zur Primärisolation verwendeten Medien	87
Abb.III.17	Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten in der Population des Reaktorwassers	88
Abb.III.18	Häufigkeiten der Gesamtaktivitäten der Population im Reaktorwasser in Abhängigkeit der zur Primärisolierung verwendeten Medien	89

Abb.III.19	Dendrogramm und Cluster: Gram-positive Bakterien des Auslaufs	94
Abb.III.20	Dendrogramm und Cluster: Gram-positive Bakterien des Reaktorwassers	96
Abb.III.21	Vorkommen von Indikator-Organismen im Reaktorauslauf in Abhängigkeit vom Verhältnis Denitrifikations-effektivität zu Eisen im Reaktor.	111
Abb.III.22	Wachstum und Pyoverdin-Produktion von <i>Ps. fluorescens</i> bei verschiedenen Eisenkonzentrationen im Medium unter aeroben Verhältnissen.	113
Abb.III.23	Wachstum und Pyoverdin-Produktion von <i>Ps. fluorescens</i> bei verschiedenen Eisenkonzentrationen im Medium unter denitrifizierenden Verhältnissen.	114
Abb.III.24	Daten zur Batchphase des Versuches mit axenischen Startbedingungen und <i>Ps. fluorescens</i> ATCC 17563 als Starterkultur.	116
Abb.III.25	Prozentuales Vorkommen von <i>Pseudomonas</i> MS1 auf dem Trägermaterial und im Medium während der Batchphase.	117
Abb.III.26	Das Vorkommen von <i>Ps. MS1</i> in den verschiedenen Schichten des Biofilms an unterschiedlichen Versuchstagen der Vollastphase.	119
Abb.III.27	Entwicklung des Biofilms: Aufnahme vom 7. Versuchstag der ersten Versuchsphase (*10800)	121
Abb.III.28	Entwicklung des Biofilms: Aufnahme vom 11. Versuchstag der ersten Versuchsphase (*10400)	121

Abb.III.29	Bakterienanalyse verschiedener Schichten des Biofilms nach Anschluß des RBR an das Trinkwassernetz.	122
Abb.IV.1	Grobschematische Übersicht über die Größenordnung der durch verschiedene Methoden erfaßbaren Prozent-Anteile der Organismendichte der Gesamt-Mikroflora in Gewässern [Reichardt, 1978].	133

V Tabellenverzeichnis

Tab.I.1	Durch die EG-Richtlinie über die Qualität von Wasser [1980] festgelegte Höchstkonzentration bzw. Grenzwerte für Trinkwasserinhaltsstoffe (ausgewählte Beispiele)	2
Tab.I.2	Denitrifizierende Prokaryonten [Jeter u. Ingraham, 1981]	15 f.
Tab.I.3	Eisenhaltige Enzyme und Proteine in Mikroorganismen [Subcommittee on Iron, 1978]	24
Tab.I.4	Aminosäure-Bestandteile von verschiedenen Siderophoren [Buyer, 1990]	30
Tab.II.1	Durchgeführte Primary Tests	51
Tab.II.2	Einteilung der Isolate aufgrund der Primary-Tests	52
Tab.II.3	Tests im BIOLOG-System	55
Tab.III.1	Vergleich der Denitrifikationsaktivität in der Suspension und auf den Trägern nach Ablösung des Biofilms von den Füllkörpern	77
Tab.III.2	Anteil der Denitrifikanten an der Gesamtpopulation in den verschiedenen Schichten des Biofilms der einzelnen Kammern des RBR	84
Tab.III.3	Verteilung der Gesamtaktivitäten im Auslauf und im Reaktorwasser des RBR	85

Tab.III.4	Identifikationsergebnisse Gram-negativer Isolate des Reaktorwassers und des Auslaufs mit dem BIOLOG-System	91
Tab.III.5	Identifikationsergebnisse von Referenzstämmen mit dem BIOLOG-System	92
Tab.III.6	Betriebsparameter der RBR-Pilotanlage in Königschaffhausen	104
Tab.III.7	Zelldichte im RBR-Auslaufwasser bestimmt nach verschiedenen z.T. nicht kompatiblen Methoden	104
Tab.III.8	Artenspektrum im Auslauf des RBR	105
Tab.III.9	Betriebsparameter der RBR-Pilotanlage in Wyhl	106
Tab.III.10	Bakteriendichte in KBE auf den Füllkörpern bzw. im Auslauf nach Aggregatauflösung bzw. Biofilmauflösung mit der kombinierten enzymatisch-mechanischen Methode	106
Tab. III.11	Gruppierung der Isolate auf den Füllkörpern bzw. im Auslauf nach Aggregatauflösung bzw. Biofilmauflösung mit der kombinierten enzymatisch-mechanischen Methode	107
Tab.III.12	Anteil von Denitrifikanten und Nitratreduzierer an der Gesamtpopulation in Prozent	107
Tab.III.13	Artenspektrum in den verschiedenen Abschnitten des RBR und im RBR-Auslauf	108

Tab.III.14	Häufigkeit des Auftretens von verschiedenen Pseudomonaden in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im Einlauf einer Denitrifikationsanlage	110
Tab.III.15	Reaktorversuche mit axenischen Startbedingungen im Überblick	115
Tab.III.16	Charakterisierung von <i>Pseudomonas</i> MS1	124
Tab.IV.1	Vergleich von Denitrifikationsverfahren mit immobilisierten Bakterien	144

VI Anhang

Erläuterungen zu den Anhängen 1-3:

Name	Bezeichnung des Isolats bzw. Referenzstammes
Probe	Probenahmestelle
Med	Anreicherungsmedium des MPN-Ansatzes
idl	beste Identifikationsmöglichkeit
sl	"similarity" des Stammes mit dem Taxon "idl" (Identifikationswahrscheinlichkeit)
idass	Identifikationsgüte
	LS geringe Selektivität (low)
	P nicht identifiziert (poor)
	N nicht identifiziert
	EX sehr gute Identifikation
	G gute Identifikation
	GG gute Gruppenidentifikation
	AG/AC akzeptierbare Identifikation der Gattung/ Art
akt	% positiv ausgefallener Tests (100% = 95 pos. Tests)
NAAB	Nitratverwertung
	N Nitritproduzent
	/ Denitrifikation fraglich
	- keine Umsetzung
	D Denitrifikant
OXI	Oxidaseaktivität
Kat	Katalaseaktivität
KOH	KOH-Test auf Gram-Verhalten
AMP	Aminopeptidasetest auf Gram-Verhalten
Gram	Gramverhalten (Resultat von KOH und AMP)
FLM	Bildung von Flocken in Flüssigkultur
	F = positiv
KMORPH	Koloniemorphologie
	WEISSL weißlich
	GELBL gelblich
	CITR citronenfarbig
	FL fluoreszierend
	OP opalisierend
	SCHL schleimig
	SCHW Schwärmer
	GRISS grisselig
	KL kleine Kolonien

REFERENZSTÄHMRE

ANHANG 1

N A M E	C N R A M B	B T M D 1	B T M D 1	B T M D 1	B T M D 1	K M O R P H I S T O R I E
AC.CALC.W016	- D NA	ACN.JOH/GEN 7	50.0	GG	21.1	- + - + F WEISSL/CREME,SCHL
AC.CALC.W023	- D NA	ACN.JOH/GEN 7	53.3	C	28.4	- + - + CREME,SCHL
AER.HYD.W048	- N NA	ACN.LWO/CLN 8	54.0	C	14.7	- + - + CREME,SCHL+
AER.HYD.W049	- N NA	AER.HYD	25.1	N	15.8	- + - + WEISSL/CREME,SCHL
ALC.D.030026	- / NA	SER.LIQ/CR1	26.1	P	42.1	- + - + CREME,SCHL
ALC.E.0428	- / NA	SER.LIQ/CR1	28.1	CG	44.2	- + - + CREME,SCHL
ALC.E.0531	- N NA	ALC.FAE TYPE I	66.3	C	73.7	- + - + CREME,SCHL
ALC.F.030030	- D NA	ALC.FAE TYPE II	40.2	P	38.9	- + - + CREME,SCHL
AQ.DISP.0736	- D NA	CON.ACI	45.4	CG	42.1	- + - + CREME,SCHL
AZ.URA.01690	- / NA	CON.ACI	19.4	N	24.2	- + - + CREME,SCHL
FL.AQ.01132	- - NA	CON.ACI	37.1	P	55.8	- + - + CREME,SCHL
P.AER.050071	- D NA	ALC.FAE TYPE II	46.1	P	38.9	- + - + CREME,SCHL
P.ALC.0503H2	- D NA	ALC.FAE TYPE II	15.8	N	28.4	- + - + CREME,SCHL
P.DEN.01650	- D NA	ALC.FAE TYPE II	26.0	P	33.7	- + - + CREME,SCHL
P.FLU.A17563	- D NA	MRX.BOV	70.5	C	11.6	- + - + ROSA,SCHL
P.FLU.D50090	- D NA	MRX.BOV	40.2	P	15.8	- + - + KLAR/CREME,WUCHS(+)
P.PUT.D291	- / NA	MRX.BOV	21.0	N	23.2	- + - + CREME,SCHL
PAR.D.01403	- D NA	PSD.AER	59.6	C	46.3	- + - + CREME,SCHL
PAR.D.065	- D NA	PSD.AER	57.8	C	48.4	- + - + CREME,SCHL
		ALC.FAE TYPE II	0.3	N	45.3	- + - + CREME,SCHL
		MRX.BOV	39.2	CG	5.3	- + - + CREME,SCHL
		MRX.BOV	32.3	CG	8.4	- + - + CREME,SCHL
		PSD.AZE	24.9	H	44.2	- + - + CREME,SCHL
		PSD.COR	42.4	P	56.8	- + - + CREME,SCHL
		PSD.COR	16.7	N	66.3	- + - + CREME,SCHL
		PSD.COR	47.3	P	63.2	- + - + CREME,SCHL
		PSD.FLU A	33.6	P	64.2	- + - + CREME,SCHL
		PSD.PUT B	35.6	P	43.2	- + - + CREME,SCHL
		PSD.PUT D	53.4	G	52.6	- + - + CREME,SCHL
		ACR.RAD B	5.1	N	62.1	- + - + CREME,SCHL
		KAN.CAM P C1TR	10.1	N	52.6	- + - + CREME,SCHL
		VIB.NAT	3.2	N	65.3	- + - + CREME,SCHL
		KAN.CAM P C1TR	0.3	N	53.7	- + - + CREME,SCHL

AUSLAUF GRAM(+)-BAKTERIEN

N A M E	C N R A M B	B T M D 1	B T M D 1	B T M D 1	B T M D 1	K M O R P H I S T O R I E
AK051	+ / NA	CLA.MIC MIC	48.9	P	13.7	- + - - F WEISSL,BLASS
AK050	+ D NNA	CLA.MIC MIC	35.6	P	23.2	- + - - WEISSL,BLASS
AK050	+ / NNA	CLA.MIC MIC	41.3	P	26.3	- + - - CREME,KL
AK01A1	+ / R2A	KLB.PHE A	0.6	N	75.8	- + - - WEISSL,RAUH,SCHW
AK01A2	+ D R2A	MRX.BOV	36.3	CG	5.3	- + - - WEISSL,SCHL
AK01A3	+ D R2A	AER.HYD DNA 12	24.4	H	37.9	- + - - WEISSL,SCHL
AKR1A0	+ - R2A	ENT.ACC A	6.0	N	67.4	- + - - WEISSL,SCHL
AKR1C1	+ - R2A	AER.HYD DNA 12	10.1	N	34.7	- + - - KLAR/CREME,WUCHS(+)
AKR1D1	+ - R2A	AER.HYD DNA 12	23.5	H	37.9	- + - - WEISSL,SCHL
AKR2B2	+ - R2A	VIB.ANG	13.1	N	49.5	- + - - WEISSL,SCHL
AKR2B3	+ N R2A	MRX.ATL	62.7	C	4.2	- + - - WEISSL,RAUH,SCHW
AKR2B2	+ D R2A	PSD.COR	25.5	P	66.3	- + - - WEISSL,SCHL
AKR2E2	+ / R2A	MRX.BOV	47.1	CG	6.3	- + - - WEISSL,RAUH,SCHW
AKR2M1	+ / R2A	AER.HYD DNA 12	4.6	H	44.2	- + - - WEISSL,SCHL
AKR2H2	+ - R2A	AER.HYD DNA 12	16.2	N	36.8	- + - - WEISSL,SCHL
AKR2D1	+ - R2A					- + - - KLAR/CREME,WUCHS(+)
AKR2D2	+ / R2A	KLB.TER	44.5	P	80.0	- + - - WEISSL,SCHL
AKR2C1	+ D R2A	PSD.COR	9.5	N	64.2	- + - - WEISSL,SCHL
AKR2D0	+ - R2A					- + - - KLAR/CREME,WUCHS(+)
AKR2C2	+ - R2A	MRX.ATL	55.4	C	4.2	- + - - WEISSL,BLASS
AKR2H0	+ - R2A					- + - - KLAR/CREME,WUCHS(+)
AKR2H1	+ N R2A	MRX.ATL	55.4	C	4.2	- + - - WEISSL,SCHL
						- + - - WEISSL,SCHL

REAKTOR GRAM(+)-BAKTERIEN

N A M E	C N R A M B	B T M D 1	B T M D 1	B T M D 1	B T M D 1	K M O R P H I S T O R I E
RNOA40	+ / NA	ACN.CAL/GEN 1	12.1	N	29.5	- + - - F CREME,KL,KON
2N0B0	+ N NA	VIB.PAR	11.7	N	49.5	- + - - CELBL/C1TR,KLAR
2N0D2	+ - NA					- + - - KLAR/CREME,WUCHS(+)
2N0E3	+ N NA	CLA.MIC MIC	73.3	C	10.5	- + - - WEISSL,SCHL
2N0E4	+ N NA	MRX.BOV	19.9	N	8.4	- + - - CELBL/C1TR,KLAR,SCHW
2N0E5	+ N NA	CLA.MIC MIC	52.1	C	14.7	- + - - WEISSL,SCHL
2N0C60	+ N NA	CLA.MIC MIC	72.2	C	10.5	- + - - WEISSL,BLASS
3N0A52	+ N NA	CLA.MIC MIC	64.4	C	11.6	- + - - CELBL/C1TR,KLAR
RRAH40	+ D NNA	ACR.RAD B	62.3	C	72.6	- + - - CREME,SCHL
RNNB31	+ D NNA	KLB.PHE A	72.7	C	92.6	- + - - WEISSL,SCHL
RNNB32	+ N NNA	MRX.ATL	54.9	C	4.2	- + - - WEISSL,RAUH,SCHW
RNNC31	+ D NNA	KLB.PHE A	51.0	C	69.5	- + - - CREME,KL
4NNB31	+ D NNA	MRX.ATL	30.5	CG	5.3	- + - - CREME,SCHL
4NNC43	+ - NNA	AER.HYD DNA 12	7.3	N	35.8	- + - - WEISSL,SCHL
4NNF40	+ D NNA	VIB.ANG	13.5	N	53.7	- + - - CREME,SCHL
RROE42	+ - R2A	ACR.RAD B	64.7	C	69.5	- + - - KLAR/CREME,WUCHS(+)
RROF42	+ / R2A	ACN.CAL/GEN 1	0.3	N	42.1	- + - - CREME,KL
RROF43	+ N R2A	MRX.ATL	55.4	C	4.2	- + - - WEISSL,RAUH,SCHW
RRRC40	+ D R2A	HAE.HAE	55.3	C	9.5	- + - - WEISSL,SCHL
RRRD41	+ - R2A	AER.HYD DNA 12	10.9	N	33.7	- + - - WEISSL,SCHL
RRRE41	+ - R2A	MRX.NON	16.6	N	6.3	- + - - WEISSL,SCHL

ANHANG 1

AUSLAUF GRAH(-)BAKTERIEN

N A N E	C H A H G	N A H E D I	B T D	D		K H O R F R P H
				B S I	B A K T	
ANOA11	-	D NA	PSD.COR	53.6 G	52.6	++ + CREME, SCHL+
ANOA12	-	/ NA	ENT.GER	29.5 P	88.4	++ + GELB, KLAR
ANOA13	-	D NA	PSD.COR	63.7 G	54.7	++ + CREME, SCHL
ANOD1	-	/ NA	PSD.PUT B	40.2 P	49.5	+ - + F CREME, KL
ANOD41	-	D NA	CLA.MIC MIC	29.6 P	18.9	++ + KLAR/CREME, WUCHS(+)
ANOD42	-	N NA	ENT.GER	46.7 P	90.5	+ - + F WEISSEL, FL
ANOD51	-	- NA	CLA.MIC MIC	51.8 G	8.8	++ +
			MRX.ATL	69.7 G	3.2	
ANOD52	-	- NA	KLB.PNE A	26.1 P	89.5	- + + GELB, OP
ANOD50	-	D NA	KLB.PNE A	73.6 G	95.8	++ + GELB, KLAR
ANOD52	-	N NA	PSD.FAC	17.0 N	21.1	++ + WEISSEL, FL
ANOD50	-	D NA	ENT.GER	4.9 N	75.8	- + + GELB, OP
ANOD50	-	D NA	KLB.PNE A	78.4 EX	98.7	++ + GELB, KLAR
ANNAN0	-	D NNA	KLB.PNE A	56.6 G	92.6	++ + F GELB, KLAR
ANNB41	-	D NNA	PSD.FAC	52.4 G	29.5	+ - + F CREME, SCHW
			PSD.FAC	38.6 P	35.8	
ANNB42	-	/ NNA	PSD.CIC	34.5 P	52.6	++ + F CREME, SCHW
ANNB42	-	/ NNA	PSD.CIC	34.5 P	52.6	++ + F CREME, SCHW
ANNB50	-	D NNA	PSD.FAC	10.7 P	10.5	++ + CREME, SCHL
ANNB51	-	D NNA	PSD.FAC	29.3 P	31.6	++ + CREME, SCHW
ANNB60	-	D NNA	AGR.RAD B	79.1 EX	69.5	- + + CREME, SCHL
ANNB51	-	N NNA	PSD.FAC	42.5 P	34.7	+ - + F CREME, SCHW
ANNB52	-	/ NNA	PSD.FAC	58.1 C	33.7	++ + F CREME, SCHW
ANNB40	-	D NNA	ALC.XYL	53.5 G	42.1	++ + CREME, SCHL+
ANNB51	-	D NNA	SHE.PTF A	0.2 N	29.5	++ + CREME, KL
ANNH40	-	D NNA	AGR.RAD B	75.6 EX	70.5	- + + CREME, SCHL
BNNB41	-	D NNA	GCH.ANT	35.6 P	69.5	++ + F CREME, SCHL
BNNB42	-	D NNA	PSD.MCS	57.7 C	71.6	++ + CREME, SCHL
BNNB51	-	- NNA	KLB.PNE A	81.7 EX	96.8	++ + GELB, KLAR
			KLB.PNE A	80.4 EX	98.9	
BNNB52	-	N NNA	PSD.FAC	46.4 P	29.5	++ + F CREME, SCHW
BNNB53	-	N NNA	PSD.FAC	38.1 P	28.6	++ + F CREME, SCHW
BNNB50	-	D NNA	ALC.XYL	40.1 P	41.1	++ + CREME, SCHL
BNNB60	-	D NNA	AGR.RAD B	71.0 C	76.8	++ + F CREME, SCHL
BNNB50	-	N NNA	MRX.ATL	20.8 N	6.3	- + + GELB, KLAR
ARO1C0	-	D R2A	KLB.PNE A	66.6 G	95.8	- + + F WEISSEL, FL
ARO1C0	-	D R2A	KLB.PNE A	66.6 G	95.8	- + + F WEISSEL, FL
ARO1D5	-	- R2A		53.1 G	90.5	- + + F WEISSEL, FL
ARO1E1	-	/ R2A	KLB.PNE A	75.3 C	97.9	++ + WEISSEL, KLAR
ARO1E2	-	/ R2A	PSD.FAC	42.6 P	30.5	++ + KLAR/CREME, WUCHS(+)
						++ + F CREME, SCHW
ARO1F1/8	-	/ R2A	PSD.FAC	42.1 P	32.6	+ - + F CREME, SCHW GRISS
ARO1F2	-	D R2A	PSD.FAC	51.6 G	29.5	+ - + F CREME, SCHW GRISS
ARO1C1	-	/ R2A	PSD.COR	59.5 G	53.7	++ + CREME, SCHL+
			PSD.COR	66.2 G	60.0	
ARO1C2	-	D R2A	PSD.COR	63.2 G	55.8	++ + CREME, SCHL+
ARR1B0	-	- R2A	MRX.ATL	44.3 CG	5.3	++ + KLAR/CREME, WUCHS(+)
ARR1C2	-	N R2A	KLB.PNE A	70.3 G	94.7	- + + WEISSEL, FL
ARR1D2	-	- R2A	MRX.ATL	49.5 CG	5.3	- + + KLAR/CREME, WUCHS(+)
ARR1E0	-	N R2A	HAE.DUC	27.1 P	6.3	- + + GELBL/CITR, KLAR, SCHW
ARR1E1	-	/ R2A	KLB.PNE A	73.9 G	95.8	++ + GELB, KLAR
ARR1E2	-	D R2A	PSD.FAC	50.2 CG	32.6	++ + F CREME, SCHW GRISS
ARR1F1	-	N R2A	PSD.FAC	45.4 P	28.4	++ + CREME, SCHW GRISS
ARR1C1	-	N R2A	PSD.COR	56.5 G	54.7	++ + CREME, SCHL+
ARR1C2/10	-	N R2A	MRX.BOV	45.3 CG	15.8	++ + F CREME, KL, KON
ARR1H2	-	N R2A	PSD.COR	14.9 N	48.4	- + + GELBL/CITR, KLAR
ARO2B1	-	- R2A				++ + KLAR/CREME, WUCHS(+)
ARO2C1	-	D R2A	AGR.RAD B	57.8 C	67.4	++ + CREME, SCHL
ARO2C2	-	- R2A	KLB.PNE A	83.3 EX	95.8	++ + CREME, SCHL
ARO2D1	-	- R2A				++ + KLAR/CREME, WUCHS(+)
ARO2E0	-	N R2A	ACH.CAL/CEH 1	9.3 N	32.6	++ + CREME, KL
ARO2C1	-	D R2A	PSD.COR	30.5 P	56.8	- + + F WEISSEL, RAUH, SCHW
ARO2F1	-	D R2A	MRX.BOV	31.3 P	23.2	++ + CREME, SCHW
ARO2F2	-	D R2A	PSD.FAC	36.3 P	55.8	++ + CREME, SCHW
ARR2A1	-	N R2A	CLA.MIC MIC	80.0 EX	10.5	- + + GELB, GLASS, WUCHS(+)
ARR2C2	-	D R2A	AGR.RAD B	66.9 G	69.2	++ + CREME, SCHL+
ARR2E1	-	N R2A	KLB.PNE A	49.0 P	90.5	++ + GELB, KLAR
			KLB.PNE A	73.9 G	95.8	
ARR2F2	-	N R2A	MRX.BOV	34.3 P	21.1	- + + F CREME, SCHL+
ARR2F3	-	N R2A	CLA.MIC MIC	66.2 G	10.5	- + + GELBL/CITR, KLAR
ARR2F4	-	/ R2A	HAE.HAC	18.1 N	8.4	- + + GELBL/CITR, KLAR, SCHW
ARR2F1	-	D R2A	MRX.BOV	52.8 G	13.7	++ + CREME, SCHW
ARR2F2	-	D R2A	PSD.FAC	19.4 N	27.4	- + + KLAR/CREME, WUCHS(+)
ARR2C1	-	D R2A	MRX.BOV	34.3 P	8.4	- + + GELBL/CITR, KLAR, SCHW

ANHANG 1

REAKTOR GRAM (-) ISOLATE:

N A M L	C N R A M B U D	B T M E D I	B T D S S I S	B T D S S I S	K H O R P H	O K K A F R P H	X A O H L P H	I T H P H	K H O R P H
RNOC31	- / NA	KLB.PNE A	73.9 C	95.8	+	+	+	+	GELB, KLAR
RNOC32	- D NA	AGR, RAD B	68.0 C	71.6	+	+	+	+	CREME, SCHL
RNOU	- D NA	AGR, RAD B	68.8 C	76.8	+	+	+	+	CREME, SCHL
RNOU1	- D NA	PSD, COR	72.6 C	57.9	+	+	+	+	CREME, SCHL+
RNOC32/5	- D NA	KLB.PNE A	58.7 C	57.7	+	+	+	+	GELB, KLAR
RNOU	- D NA	AGR, RAD B	68.6 C	66.3	+	+	+	+	CREME, SCHL
RNOU2	- / NA	MRX.PNE	39.2 CG	4.2	+	+	+	+	GELB, BLASS
RNOU3/3	- / NA	ENT, AGG A	2.0 N	66.3	+	+	+	+	GELB, BLASS
RNOU1	- D NA	AGR, RAD B	68.0 C	69.5	+	+	+	+	CREME, SCHL
RNOU3	- D NA	AGR, RAD B	67.5 C	67.4	+	+	+	+	CREME, SCHW UN?
RNOC321	- D NA	AGR, RAD A	12.1 N	55.8	+	+	+	+	WEISSL/CREME, SCHL
RNOC322	- D NA	AGR, RAD B	52.0 C	67.4	+	+	+	+	CREME, SCHL
RROU30/6	- D NA	PSY, IMM	19.0 N	16.8	+	+	+	+	CREME, KL
2ROA61	- D NA	MRX, BOV	53.8 C	6.3	+	+	+	+	CREME, SCHW
2NOA62	- / NA	PAN, AGG	37.6 P	58.9	+	+	+	+	GELBL/CITR, SCHL+
2ROU6	- NA	MRX, ATL	69.0 C	3.2	+	+	+	+	GELBL/CITR, KLAR, SCHW
2ROU3	- NA	PSD, FRA	31.3 P	61.1	+	+	+	+	ROSA, SCHL
2NOU0	- NA	MRX, ATL	69.7 C	3.2	+	+	+	+	GELBL/CITR, KLAR, SCHW
2NOU2	- NA	CLA, MIC	29.4 P	9.5	+	+	+	+	GELBL/CITR, KLAR, SCHW
2ROU1	- NA	PSD, FAC	54.8 C	31.6	+	+	+	+	CREME, SCHW
2NOU2	- NA	CLA, MIC	62.5 C	26.3	+	+	+	+	WEISSL, KLAR
2NOU3/4	- NA	CLA, MIC	60.7 C	20.0	+	+	+	+	WEISSL, KLAR
2NOU61	- NA	MRX, BOV	36.9 P	14.7	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU5	- D NA	PSD, FAC	50.3 CG	28.4	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU9	- NA	MRX, NON	23.7 N	9.5	+	+	+	+	CREME, SCHW GRISS
3NOU51	- D NA	PSD, FAC	54.2 C	28.4	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU52	- / NA	PSD, FAC	18.4 N	45.3	+	+	+	+	CREME, SCHW GRISS
3NOU50	- D NA	AGR, RAD B	60.6 C	68.4	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU41/1	- D NA	PSD, COR	55.8 C	61.1	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU43	- NA	PSD, COR	63.2 C	55.8	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU42	- D NA	PSD, COR	68.4 C	57.9	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU50	- D NA	AGR, RAD B	78.4 EX	72.6	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU50	- NA	PSD, FAC	53.2 C	31.6	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU53	- D NNA	AGR, RAD B	76.2 EX	67.4	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU54	- NNA	PSD, C1C	10.4 N	46.3	+	+	+	+	GELBL/CITR, SCHW
3NOU51	- D NNA	PSD, FLU A	13.8 N	73.7	+	+	+	+	GELB, KLAR
3NOU51	- N NA	KLB.PNE A	76.9 EX	95.8	+	+	+	+	GELB, KLAR
3NOU52	- D NNA	MRX, BOV	45.4 P	9.5	+	+	+	+	GELB, KLAR
3NOU51	- D NNA	PSD, FAC	52.9 C	36.8	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU52	- D NNA	KLB.PNE A	66.6 C	95.8	+	+	+	+	WEISSL, FL
3NOU51	- D NNA	PSD, COR	66.3 C	58.9	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU52	- D NNA	AGR, RAD B	57.5 C	72.6	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- D NNA	PSD, COR	56.8 C	57.9	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU52	- D NNA	AGR, RAD B	59.1 C	73.7	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- D NNA	PSD, COR	59.5 C	53.7	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU52	- D NNA	ACK, JOH/GEN 7	54.5 C	16.8	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU53	- D NNA	OCH, ANT	63.4 C	68.4	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU54/9	- D NNA	MRX, BOV	31.7 P	13.7	+	+	+	+	CREME, SCHW GRISS
3NOU50	- D NNA	PSD, COR	56.7 C	61.1	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU51	- D NNA	ALC, XYL	40.3 P	42.1	+	+	+	+	CREME, KL
3NOU51	- / NNA	ALC, XYL	60.4 C	41.1	+	+	+	+	CREME, KL
3NOU52	- / NNA	PSD, MCS	16.1 N	75.8	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU51	- N NNA	PSD, FAC	69.4 C	29.5	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU51	- D NNA	OCH, ANT	68.1 C	71.6	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- D NNA	PSD, COR	70.6 C	56.8	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU52	- D NNA	OCH, ANT	43.4 P	67.4	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- D NNA	OCH, ANT	51.2 C	76.8	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU52	- D NNA	PSD, FAC	55.6 C	31.6	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU50	- D NNA	PSD, COR	51.0 C	63.2	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU52	- D NNA	PSD, COR	53.6 C	61.1	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- D NNA	PSD, FAC	54.7 C	31.6	+	+	+	+	CREME, SCHW GRISS
3NOU52	- NNA	HA, HA	37.2 P	11.6	+	+	+	+	KLAR/CREME, WUCHS(+)
3NOU51	- / NNA	MRX, ATL	69.7 C	3.2	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- / NNA	PSD, COR	58.5 C	52.6	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- / NNA	PSD, COR	66.8 C	55.8	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- D NNA	AGR, RAD B	61.9 C	74.7	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU52	- / NNA	PSD, COR	54.5 C	52.6	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- N NNA	PSD, FAC	56.5 C	27.4	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU50	- D NNA	AGR, RAD B	74.5 C	70.5	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- N NNA	PSD, FAC	46.6 P	30.5	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU52	- D NNA	AGR, RAD B	57.8 C	77.9	+	+	+	+	CREME, SCHL
3NOU51	- D NNA	FLA, ORY	28.2 P	77.9	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU52	- D NNA	PSD, COR	61.1 C	54.7	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU53	- D NNA	PSD, COR	36.5 P	63.2	+	+	+	+	CREME, SCHL+
3NOU51	- D R2A	KLB.PNE A	75.4 C	97.9	+	+	+	+	WEISSL, FL
3NOU51/2	- / NA				+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU52	- N R2A	PSD, DEL	41.1 CG	32.6	+	+	+	+	CREME, SCHW GRISS
3NOU52	- D R2A	AGR, RAD B	78.5 EX	73.7	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU50	- N R2A				+	+	+	+	KLAR/CREME, WUCHS(+)
3NOU51	- N R2A	CLA, MIC	76.2 EX	9.5	+	+	+	+	GELBL/CITR, KLAR, SCHW
3NOU51	- N R2A				+	+	+	+	KLAR/CREME, WUCHS(+)
3NOU52	- N R2A	MRX, ATL	61.5 C	3.2	+	+	+	+	KLAR/CREME, WUCHS(+)
3NOU51	- N R2A				+	+	+	+	KLAR/CREME, WUCHS(+)
3NOU52	- N R2A	CLA, MIC	45.3 P	8.4	+	+	+	+	GELBL/CITR, KLAR
3NOU51	- N R2A	ACK, JOH/GEN 7	45.9 P	24.2	+	+	+	+	WEISSL, FL
3NOU51	- / R2A	PSD, FAC	51.8 C	28.4	+	+	+	+	CREME, SCHW
3NOU52	- D R2A	PSD, FAC	43.8 P	35.8	+	+	+	+	CREME, SCHW GRISS
3NOU50/7	- D R2A	AGR, RAD B	64.3 C	67.4	+	+	+	+	CREME, SCHL

[illegible]

ANHANG 2

GRAM(-) Auslauf
Single Linkage Cluster Analysis

Minimum Distance Between Clusters

D: 1.1	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2
--------	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[illegible]

ANBIANG 2

[illegible]

$$\text{Similarity} = S_{\text{IAC}}(\%) = 1 - (D/\bar{D})$$

Minimum Distance Between Clusters = $D = (1 - S_{Jac}) / \bar{D}$

Mean Distance Between Clusters = $\bar{D} = 0,635764$

111111111222222222333333333444444444555555555666666666777777777888888888999999999
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345

[illegible]

[illegible]

ANHANG 3

Gram {-} Resktor

Single Linkage Cluster Analysis

Minimum Distance Between Clusters

[illegible]

Jül-3043
März 1995
ISSN 0944-2952