Bakterielle Diversität

von Biofilmen in Langsamsandfiltern

Vom Fachbereich Chemie

der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation

von

Heike Petry-Hansen

aus

Wesel

Datum der Einreichung: 19.05.2005
Tag der Prüfung: 27.07.2005

Referent: Prof. H.-C. Flemming
Korreferent: Prof. W. Streit

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2002 bis Mai 2005 am Biofilm Centre, Abteilung Aquatische Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen unter der Leitung von Prof. Dr. H.-C. Flemming erstellt. Die praktischen Tätigkeiten wurden am IWW Rheinisch-Westfälischen Institut für Wasserforschung, Bereich Angewandte Mikrobiologie durchgeführt

Für meine Eltern

und

meinen Mann

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Curt Flemming gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am IWW (Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung) durchführen zu können. Er hat mir durch wertvolle Anregungen, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein Interesse, das er allen Problemen und Ergebnissen dieser Arbeit entgegengebracht hat, sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit danke ich für die Bereitschaft als Zweitkorrektor meiner Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Bei Frau Dr. Helen Steele möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Bei allen Kollegen des Bereiches Angewandte Mikrobiologie des IWW möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die vielfältigen Formen der Unterstützung bedanken. Insbesondere:
Bei Frau Mariël Grooters bedanke ich mich für ihre hervorragende Mitarbeit und ihr Engagement, das sie im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit und als technische Mitarbeiterin meiner Arbeit entgegengebracht hat. Mein Dank gilt auch Frau Kathrin Bemmann für die praktische Unterstützung im Labor.
Bei Frau Dr. Susanne Grobe bedanke ich mich für die konstruktiven Diskussionen, die meine Arbeit positiv beeinflusst haben, und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank sei Frau Ulrike Hütter vom IfW, Schwerte und Herrn Achim Mälzer aus dem Bereich Wassertechnologie des IWW ausgesprochen, die es mir ermöglicht haben, die Probenahmen an ihren Versuchsfiltern durchzuführen.

Der mikrobiologischen Analytik des Bereiches Wasserqualität des IWW danke ich für die Durchführung der Untersuchung nach der Trinkwasserverordnung 2001.

Bei Frau Dr. Anke Heisig und Frau Antje Schnasse bedanke ich mich für die Sequenzierung meiner Proben.

Meiner Familie gilt mein ganz besonderer Dank. Ohne ihr Verständnis, ihre Ermutigungen und den Rückhalt, den sie mir gegeben haben, wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Hier möchte ich mich besonders bei meinen Eltern, Margarete und Wilfried Hansen, bedanken, die mich haushalts- und gartentechnisch stark unterstütz haben. Meinem Mann, Frank Petry, danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und die Aufrechterhaltung meines seelischen Gleichgewichtes auch in schwierigen Phasen.

Für die finanzielle Ermöglichung dieser Arbeit sei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung gedankt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen		**v**
Zusammenfassung		**1**
1.	**Einleitung**	**2**
1.1	**Die Langsamsandfiltration: Ein biologisch-chemisch-physikalischer Prozess der Trinkwasseraufbereitung**	**2**
1.1.1	Geschichte der Langsamsandfiltration	2
1.1.2	Aufbau und Betriebsweise von Langsamsandfiltern	4
1.1.3	Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen	7
1.1.3.1	Rückhalteleistungen von Langsamsandfiltern	7
1.1.3.2	Nachweis hygienisch relevanter Mikroorganismen	9
1.1.4	Rückhalte-, Eliminations- und Reinigungsmechanismen der Langsamsandfiltration	11
1.2	**Diversität und Zusammensetzung von Bakterienpopulationen in natürlichen Biofilmen**	**12**
1.2.1	Bakterienpopulationen in Langsamsandfiltern	12
1.2.2	Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung von Bakterienpopulationen in natürlichen Habitaten	14
1.3	**Problemstellung**	**17**
1.4	**Aufbau der Versuchsanlagen**	**19**
1.5	**Ziel der Arbeit**	**20**
2.	**Material und Methoden**	**22**
2.1	**Material**	**22**
2.1.1	Bakterienstämme	22
2.1.2	Nährmedien	23
2.1.3	Nukleinsäuren	23
2.1.4	Puffer und Lösungen	25
2.1.5	Enzyme	26
2.1.6	Chemikalien und sonstige Materialien	26
2.1.7	Geräte	29
2.1.7.1	Mikroskope	29

2.1.7.2	Sonstige Geräte	30
2.1.8	Software	31
2.2	**Methoden**	**32**
2.2.1	**Aufbau der Versuchsanlagen**	**32**
2.2.1.1	Versuchsanlagen zur Untersuchung alternativer Filtermaterialien	32
2.2.1.2	Versuchsanlagen zur Untersuchung verschiedener Betriebsparameter	33
2.2.1.3	Kommerziell betriebener Filter der Ruhr-Wasserwerke (RWW)	35
2.2.1.4	Beprobung der Zu- und -abläufe sowie der Filtermaterialien	35
2.2.2	**Mikrobiologische und biochemische Methoden**	**37**
2.2.2.1	Stammhaltung der Bakterien	37
2.2.2.2	Homogenisieren der Zu- und Abläufe	37
2.2.2.3	Herstellung von Abschüttelsuspensionen der Filtermaterialien	38
2.2.2.4	Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)	38
2.2.2.5	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)	38
2.2.2.6	Bestimmung der Trockenmassen und Glühverluste	39
2.2.2.7	Quantitativer Nachweis von Indikatororganismen durch kulturelle Methoden	39
2.2.2.8	Quantitativer Nachweis coliformer Bakterien und *Escherichia coli* in Filtermaterialien	39
2.2.2.9	Identifizierung coliformer Bakterien mittels api® 20E	40
2.2.2.10	Bestimmung der Esterase-Aktivität in Filtermaterialien	40
2.2.3	**Molekularbiologische Methoden**	**41**
2.2.3.1	DNS-Isolierung	41
2.2.3.2	Amplifikation von 16S rRNS-Genen	42
2.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.3.4	Reinigung von PCR-Produkten	43
2.2.3.5	Konstruktion von 16S-Clone Libraries	44
2.2.3.6	Plasmidpräparation	45
2.2.3.7	Amplifizierte rDNS-Restriktionsanalyse (ARDRA)	45

2.2.3.8 Ähnlichkeitsindizes der Clone Libraries 46
2.2.3.9 DNS-Sequenzierung 46
2.2.3.10 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) 48
2.2.3.11 Catalysed reporter deposition (CARD) –FISH 49
2.2.3.12 Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung (FMH) 50

3. Ergebnisse 51
3.1 Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen durch Langsamsandfilter 51
3.1.1 Rückhalteleistungen von Langsamsandfiltern unter extremen Rahmenbedingungen 51
3.1.2 Vorbelastung der Filtermaterialien mit hygienisch relevanten Bakterien 66
3.1.3 Elimination, Akkumulation oder Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen im Filterbett 67
3.2 Vergleich der klassisch-kulturellen Nachweisverfahren für Indikatororganismen mit der Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierungs (FMH) –Methode 70
3.3 Charakterisierung der bakteriellen Populationsstruktur der Langsamsandfilter-Biofilme 76
3.3.1 Biochemische und mikrobiologische Charakterisierung der Filtermaterialien 77
3.3.1.1 Makroskopische Beobachtungen der Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe der Filterbetten 77
3.3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Betrachtungen der Filtermaterialien 78
3.3.1.3 Trockenmassen und Glühverluste der Filtermaterialien 84
3.3.1.4 Gesamtzellzahlen, Anzahl der koloniebildenden Einheiten und Anteil EUB338-markierter Zellen 86
3.3.1.5 Esterase-Aktivität 88
3.3.2 Vergleich der Diversität und Zusammensetzung von Bakterienpopulationen in unterschiedlich betriebenen Langsamsandfiltern 90

3.3.2.1 Amplifizierte rDNS Restriktionsanalyse (ARDRA) von 16S-Klonen 90
3.3.2.2 Populationsanalyse der Bakterien in Langsamsandfilter-Biofilmen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) 100

4. Diskussion 109
4.1 Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen durch Langsamsandfilter 110
4.1.1 Rückhalteleistungen von Langsamsandfiltern unter verschiedenen, nicht-optimalen Rahmenbedingungen 110
4.1.1.1 Bedeutung der Biofilme für die Rückhalteleistung der Langsamsandfilter 114
4.1.2 Vorbelastung der Filtermaterialien mit hygienisch relevanten Bakterien 115
4.1.3 Elimination, Akkumulation oder Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen im Filterbett 116
4.2 Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung (FMH) als alternatives Nachweisverfahren für Indikator-organismen 117
4.3 Charakteristika der bakteriellen Populationsstruktur der Langsamsandfilter-Biofilme 121
4.3.1 Biochemische und mikrobiologische Charakteristika der Langsamsandfilter-Biofilme 121
4.3.2 Diversität und Zusammensetzung der Bakterienpopulation in Langsamsandfilter-Biofilmen 126
4.3.2.1 Diversität und qualitative Zusammensetzung der Bakterienpopulation in Langsamsandfiltern anhand von 16S rDNS-Analysen 127
4.3.2.2 Quantitative Zusammensetzung der *Proteobacteria* in Langsamsandfilter-Biofilmen 133
4.4 Ausblick 135

5. Literaturverzeichnis 137

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ARDRA	Amplifizierte rDNS Restriktionsanalyse
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CARD	catalysed reporter deposition
cm	Zentimeter
Cy3	Carbocyanin Cy3
d	Tag
DAPI	4`6-Diamidin-2-phenylindol
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DOC	dissolved organic carbon
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DVGW	Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	*et alii* (lat.: und andere)
FISH	Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung
Fluor	Fluorescein
FMH	Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung
FNU	Formazin Nephelometric Units
G	Guanin
ggf.	Gegebenenfalls
GZZ	Gesamtzellzahl
h	Stunde
HRP	horse-radish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)

Hz	Hertz
KBE	Koloniebildende Einheiten
m	Meter
M	Mol
m^2	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
mM	Millimolar
MPN	Most probable number
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OTU	operational taxonomic unit
PBS	phosphate buffer solution (Phosphatpuffer)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	pH-Wert
pmol	Picomol
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	Ribosomale RNS
sec	Sekunden
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetic-Acid/EDTA
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean
w/v	weight per volume
WQ-MBA	Mikrobiologische Analytik des Bereiches Wasserqualität im IWW

Zusammenfassung

Die Langsamsandfiltration wird seit etwa 200 Jahren zur Trinkwasseraufbereitung genutzt. Sie wurde durch Modifikation der Betriebsparameter optimiert, ohne die biologischen Prozesse im Filter zu untersuchen. Die am Anfang der Nahrungskette stehenden Bakterien sind von essentieller Bedeutung für die Reinigungsleistungen der Langsamsandfilter. Sie wurden bisher aber nur im Ansatz mittels kultureller Methoden erfasst.

Ziel der vorliegen Arbeit war es, einen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung der gesamten Bakterienpopulation in den oberen, aktiven Schichten von Langsamsandfiltern zu erlangen. Die Stabilität dieser Bakterienpopulationen sollte an Versuchsfiltern, die unter nicht-optimalen Bedingungen (hohe Trübstoff-, DOC- und Bakterienkonzentrationen im Zulauf, Wassertemperaturen von 20-30°C, Verwendung von Glasgranulat und Kokosfasern als Filtermaterialien) betrieben wurden, untersucht werden.

Die molekularbiologischen Untersuchungen der Bakterienpopulationen zeigten, dass in den Langsamsandfilter-Biofilmen Multispezies-Gemeinschaften vorliegen, die durch ihre Stoffwechselvielfalt zum sequenziellen Abbau der verfügbaren Nährstoffe fähig sind. Es dominieren Bakterienklassen, die aus verwandten Habitaten bekannt sind. Als eine bedeutende Bakterienklasse in Langsamsandfiltern wurden die *Proteobacteria* – insbesondere die beta-Subklasse – nachgewiesen. Sowohl die qualitativen ARDR-Analysen als auch die quantitativen FISH-Untersuchungen deuten darauf hin, dass die autochthonen Bakterienpopulationen in „reifen“ Langsamsandfiltern relativ stabil sind und durch Veränderungen der Betriebsparameter nur mäßig beeinflusst werden. Obwohl sich bei Betriebstemperaturen von 20-30°C und ausreichend mikrobiell verwertbarer Nährstoffe die zurückgehaltenen, hygienisch relevanten Bakterien coliforme Bakterien und *Escherichia coli* im Filterbett vermehren, dominieren stets Umweltbakterien ohne hygienische Relevanz. Die Schmutzdecke der Langsamsandfilter ist der Ort mit der höchsten Bakteriendichte und der höchsten biologischen Aktivität, während ab ca. 5 cm Tiefe die Bakterienanzahl und –aktivität im gesamten Filterbett konstant ist.

Durch die Rückhalteleistung der Versuchsfilter für hygienisch relevante Mikroorganismen konnte gezeigt werden, dass sich aus hygienischer Sicht die Langsamsandfiltration auch unter nicht-optimalen Betriebsbedingungen zur Trinkwasseraufbereitung eignet. Außer Sand können auch Glasgranulat und Kokosfasern als Filtermaterialien verwendet werden, wobei eine Hitzebehandlung zur Abtötung potentiell im Rohmaterial enthaltener, hygienisch relevanter Mikroorganismen empfohlen wird.

Der Nachweis von Indikatororganismen mit kulturellen Verfahren, entsprechend der Trinkwasserverordnung 2001, ist zeitaufwendig und führt nicht zur Erfassung aller vorhandenen pathogenen Organismen. In der vorliegenden Arbeit konnte exemplarisch für zwei Indikatorparametern, Enterokokken und *Enterobacteriaceae*/coliforme Bakterien, ein schnelleres und sensitiveres Verfahren optimiert werden, die sogenannte Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung.

1. Einleitung

1.1 Die Langsamsandfiltration: Ein biologisch-chemisch-physikalischer Prozess der Trinkwasseraufbereitung

1.1.1 Geschichte der Langsamsandfiltration

Die Filtration ist eine der ältesten Techniken der Trinkwasseraufbereitung. Der ursprüngliche Zweck der Filtration war die Entfernung von Partikeln aus Trinkwasser und hatte rein ästhetische Gründe. Unter sauberem Wasser verstand man ursprünglich klares, gut riechendes und schmeckendes Wasser. Ohne die modernen chemischen und mikrobiellen Untersuchungsmethoden war eine Beurteilung der Sauberkeit des Wassers nur anhand seines Aussehens, Geruchs und Geschmacks möglich. Ein Zusammenhang zwischen der Trinkwasserqualität und der Ausbreitung von Epidemien kam erst im 19. Jahrhundert mit der Entdeckung der „Krankheitskeime“ durch Robert Koch ins Blickfeld. Seither ist das Hauptziel der Filtration die Rückhaltung mikrobieller Krankheitserreger.

Eine erste "Trinkwasserverordnung" enthält eine 2000 Jahre v. Chr. geschriebene, antike Sanskrit-Quelle. Darin werden die Leute angewiesen "faules Wasser", wahrscheinlich nach Geruch, Geschmack und Aussehen als faul beurteiltes Wasser, bis zum Kochen zu erhitzen, dem Sonnenlicht auszusetzen, sieben Mal ein Stück heißes Kupfer hineinzutauchen, dann über groben Sand oder Holzkohle zu filtrieren und in einem Tongefäß abzukühlen (Baker und Taras, 1981).

Jahrhunderte später begann Hippocrates, der Vater der Medizin, Experimente zur Wasseraufbereitung durchzuführen. Wie seine Vorgänger glaubte Hipprocrates, dass guter Geschmack auf die Reinheit des Wasser schließen lässt. Er entwickelte seine eigenen Filter, mit denen er das Wasser, das er für die Behandlung seiner Patienten benötigte, reinigte. Diese Filter bestanden aus Stoffbeuteln, durch die Hippocrates abgekochtes Wasser filtrierte (Baker und Taras, 1981). Der Stoffbeutel sollte alle Trübstoffe zurückhalten, die schlechten Geruch oder Geschmack verursachten.

Die antiken Zivilisationen der Griechen und Römer in Europa und der Maja in Amerika verfügten über erstaunlich gut durchdachte Wasserversorgungssysteme. Mit dem Niedergang dieser Zivilisationen und dem Beginn des Mittelalters endeten auch Entwicklung und Fortschritt der Wasseraufbereitung und -verteilung. Die ersten belegten

Versuche der Wasserfiltration nach dem Mittelalter gehen auf Sir Francis Bacon im Jahr 1627 zurück (Baker und Taras, 1981). Aufgrund von Gerüchten, dass das Salzwasser der Ozeane gereinigt und als Trinkwasser verwendet werden kann, begann er mit Versuchen zur Entsalzung von Meerwasser. Bacon benutze eine Sandfiltermethode: Er glaubte, wenn er ein Loch nahe der Küste graben würde, durch das Meerwasser eindringen könnte, dass das Salz bei Passage der Sandschicht zurückgehalten würde. Auf der Landseite des Loches erwartete Bacon entsprechend salzfreies Wasser. Dies war zwar nicht der Fall, aber sein Experimentaufbau wurde als Vorbild für die weiteren Untersuchungen der Wasserfiltration genutzt.

Ein entscheidender Schritt für die Wasserfiltration war die Entdeckung von Mikroorganismen durch die Mikroskopie. Mitte des 19. Jahrhunderts nahmen die Epidemien in den dicht bewohnten Arbeitervierteln Londons rapide zu. Städtische Beamte begannen eine Verbindung zwischen der Ausbreitung der Cholera und der schlechten Trinkwasserqualität herzustellen. In Stadtgebieten, in denen Sandfilter zur Wasseraufbereitung verwendet wurden, nahm die Anzahl der Choleraausbrüche ab (Baker und Taras, 1981). Diese Vermutung konnte durch John Snow untermauert werden, der verschiedene Choleraausbrüche mit einer Abwasserkontamination des Wassers aus der Broad Street Pumpe in Verbindung bringen konnte. Unter dem Mikroskop konnte er die todbringenden Bakterien im Wasser sehen. Ironischer Weise war genau das Wasser dieser Pumpe in ganz London wegen seines guten Geschmackes und seiner guten Qualität bekannt (Baker und Taras, 1981). Damit war bewiesen, dass der Geschmack und das klare Aussehen nicht auf die Reinheit des Wasser schließen lassen. Aufgrund dieser Erkenntnis verordnete die Stadt London die Errichtung von Sandfiltern im ganzen Stadtgebiet. Durch ihren Einsatz konnten außerdem die Choleraepidemie in Altona (Deutschland) und die Typhusepidemie in Lawrence, Massachusetts (USA), in den neunziger Jahren des 19. Jahrhunderts eingedämmt werden (Bellamy *et al*., 1985). Die Rückhaltung der Epidemie auslösenden Bakterien durch Sandfilter wurde 1886 von Frankland nachgewiesen.

Lange bevor Snow den Zusammenhang zwischen den Choleraausbrüchen und der schlechten Trinkwasserqualität herstellte, begannen die Menschen im Zuge der Aufklärung des 16. bis 18. Jahrhunderts ihr Recht auf menschenwürdiges Leben und damit auch auf sauberes, reines Wasser zu fordern. Die philosophischen Diskussionen trieben den französische Wissenschaftler La Hire an, für jeden Haushalt die Installation eines Sandfilters zu verlangen, um die Versorgung mit sauberem Wasser

sicherzustellen. Im Laufe der Zeit wurden Sandfilter die am weitesten verbreitete Methode der Wasseraufbereitung in Europa.

Langsamsandfilter wurden nachweislich erstmals 1790 in Lancashire, England und 1804 in Paisley, Schottland zur ästhetischen Verbesserung (Geruch, Geschmack und Aussehen) von Trinkwasser eingesetzt. Die ersten Langsamsandfilter, die in den Grundbestandteilen den heutigen Anlagen entsprechen, entwarfen Robert Thom im Jahr 1827 und James Simpson im Jahr 1829 (Simpson, 1829). Bis Anfang des vergangenen Jahrhunderts wurde die Langsamsandfiltration als ein Schritt der Trinkwasseraufbereitung oder Grundwasseranreicherung häufig eingesetzt. Neue Technologien (Desinfektion, Schnellfiltration) verdrängten in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Langsamsandfilter. Erst in den vergangenen 30 Jahren wurde diese Technologie wieder vermehrt eingesetzt. Heute ist die Langsamsandfiltration ein essentielles Element der Trinkwasseraufbereitung in vielen europäischen Städten, z.B. in London, Paris, Amsterdam und Zürich (Ellis, 1985; Rittmann und Huck, 1989; Aeppli, 1990; Bonnet *et al*., 1992). In zahlreichen Ländern Asiens, Afrikas, Süd- und Mittelamerikas werden ebenfalls Langsamsandfilter zur Trinkwasseraufbereitung eingesetzt (Graham, 1988; Graham und Collins, 1996; Urfer *et al*., 1997; Graham, 1999). Die Renaissance der Langsamsandfiltration ist auf die Erkenntnis zurückzuführen, dass viele trinkwasserbürtige Epidemien der letzten Jahrzehnte durch die pathogenen Protozoen *Giardia* spp. und *Cryptosporidium* spp. ausgelöst wurden (MacKenzie *et al*., 1994; Lisle und Rose, 1995; Gornik *et al*., 2001). Die einzige effektive Methode zur Elimination pathogener Protozoen aus Trinkwasser ist die Filtration, da die Dauerformen der Protozoen so unempfindlich gegen Desinfektionsmittel sind, dass Konzentrationen verwendet werden müssten, die in Trinkwässern nicht realisierbar sind.

Obwohl die Langsamsandfiltration eine sehr alte und hoch effektive Technologie der Trinkwasseraufbereitung ist, sind die biologischen Vorgänge im Filter weitgehend unbekannt.

1.1.2 Aufbau und Betriebsweise von Langsamsandfiltern

Langsamsandfilter zeichnen sich durch geringe Kosten sowie Einfachheit in Bau und Betrieb aus. Die wichtigsten Kenngrößen für den Aufbau und Betrieb von Langsam-

sandfiltern sind im schematischen Querschnitt eines Filters in der Abbildung 1.1 und in der Tabelle 1.1 zusammengefasst. Abbildung 1.2 zeigt einen Langsamsandfilter mit ausgeprägter Schmutzdecke. Der Filter war zwei Monate im Betrieb und befand sich zum Zeitpunkt der Aufnahme unmittelbar vor dem Abtragen der Schmutzdecke, dem sogenannten Schälen.

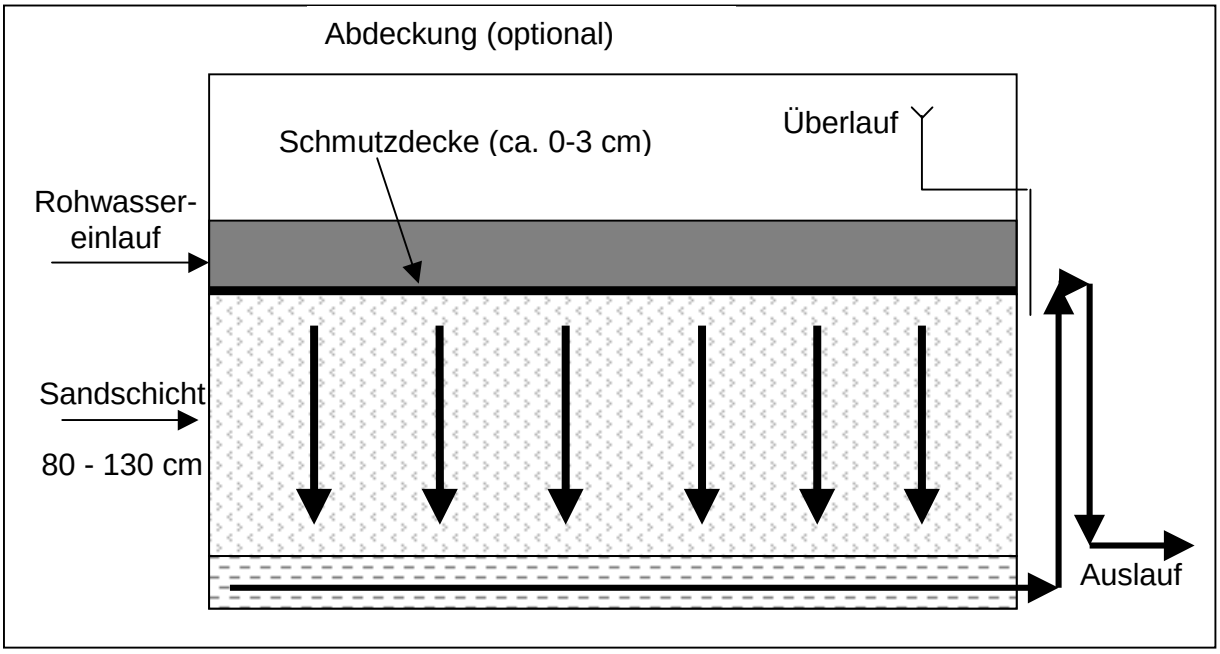


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Langsamsandfilters (modifiziert nach Collins *et al*., 1991).

Abbildung 1.2: Schmutzdecke eines Langsamsandfilters nach zweimonatigem Betrieb unmittelbar vor dem Schälen. Styrum-Ost RWW, Mülheim a.d. Ruhr.

Tabelle 1.1: Aufbau und Betrieb von Langsamsandfiltern in Anlehnung an den Entwurf des DVGW-Arbeitsblatts W213, Teil IV (2003)

Bauform	**Betonbecken (Trinkwassergewinnung) oder offene Infiltrationsbecken (Grundwasseranreicherung)**
Filterfläche	100 – 10.000 m²
Überstauhöhe	0,3 – 1,5 m
Mächtigkeit der Filterschicht	0,8-1,3 m
Mächtigkeit der Stützschicht	0,2 -0,4 m
Mächtigkeit der Drainageschicht	0,2 - 0,5 m
Körnung des Filtermaterials	0,1 – 0,5 mm
Filtergeschwindigkeit	0,05 – 0,3 m/h
Reinigung	Abschälen der obersten 1-3 cm; ggf. Waschen des Filtermaterials

Langsamsandfilter können kontinuierlich oder intermittierend betrieben werden. Bei der kontinuierlichen Betriebsweise ist der Filter dauerhaft mit Wasser überstaut. Der intermittierende Betrieb zeichnet sich durch regelmäßige Unterbrechungen des Zulaufs aus, wodurch der Filter zeitweise trocken fällt.

Während des Filterbetriebs setzen sich auf der Oberfläche partikuläre Bestandteile ab, die mit dem zu reinigenden Wasser eingetragen werden. Es bildet sich die so genannte Schmutzdecke aus, die als biologisch aktivste Schicht des Filters bekannt ist (Schmidt und Schwarz, 1989; Hendel *et al*., 2001, Calvo-Bado *et al*., 2003b). Nach einigen Wochen bis Monaten verblockt der Filter (clogging). Es ist ein hoher Druckverlust zu verzeichnen, so dass nicht mehr genügend Wasser den Filter passiert. Durch Abtragen der Schmutzdecke (Schälen) wird der Filter gereinigt. Anschließend kann der Filter weiter benutzt werden, bis die Sandschicht weniger als 80 cm Stärke aufweist (Graham, 1988; Collins *et al*., 1991; Visscher, 1990; Hendircks, 1991; Letterman, 1991; Cleasby und Logsdon, 1999).

1.1.3 Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen

1.1.3.1 Rückhalteleistungen von Langsamsandfiltern

Während der Filterpassage verbessert sich die physikalisch-chemische und biologische Wasserqualität. Partikuläre Stoffe, einschließlich Mikroorganismen, werden ebenso im Filterbett zurückgehalten wie gelöste Substanzen, die durch mikrobielle Stoffwechselleistungen abgebaut werden. Das Hauptziel der LSF ist die Elimination hygienisch relevanter Mikroorganismen aus dem aufzubereitenden Wasser. Wasserbedingte Infektionen durch hygienisch nicht einwandfreies Wasser sind weltweit von großer Bedeutung. Sie verursachen jährlich rund eine Millarde Erkrankungen und drei Millionen Tote (Ford, 1999). Insbesondere bei schlechter Sanitärhygiene treten wasserbedingte Infektionen auf.
Ein Überblick über die in der Literatur genannten Rückhalteleistungen für hygienisch relevante Mikroorganismen durch Langsamsandfilter ist in Tabelle 1.2 zusammengestellt. Die in der Literatur beschriebenen Rückhalteleistungen wurden von Langsamsandfiltern erzielt, die unter optimalen bis guten Rahmenbedingungen betrieben wurden. Zu diesen optimalen Rahmenbedingungen für die LSF zählen Rohwässer mit geringem Trübstoff-Gehalt (< 50 FNU), Nährstoff-, Licht- und Temperaturverhältnisse, die Bakterien- und Algenmassenentwicklungen unterbinden und geeignete Sande als Filtermaterialien. Für optimale Rückhalteleistungen hygienisch relevanter Mikroorganismen ist eine ausgereifte Biozönose notwendig (Stevik *et al*., 1999; van Cuyk *et al*., 2003; Hijnen *et al*., 2004). Die biologischen Vorgänge im Filterbett sind demnach von immenser Bedeutung für die Langsamsandfiltration.

Die Rückhaltung der hygienisch relevanten Mikroorganismen erfolgt in Sandfiltern zu 90-99% in den oberen 0-10 cm des Filterbettes (Stevik *et al*., 1999; van Cyuk *et al*., 2001). In diesem Bereich ist auch die Stoffwechselaktivität der Biozönose am höchsten (Schmidt und Schwarz, 1989; Hendel *et al*., 2001, Calvo-Bado *et al*., 2003b). Die oberen Schichten von Langsamsandfiltern werden daher auch als biologische oder aktive Schichten bezeichnet (Visscher, 1990; Weber-Shirk und Dick, 1997a).

Tabelle 1.2: Rückhalteleistungen von Langsamsandfiltern für hygienisch relevante Mikroorganismen

Parameter	Rückhalte- bzw. Reinigungsleistung	Betriebsort/-temperatur	Quelle
MS2 Bakterio-phagen	1,5-2 log-Stufen	Niederlande (Außenanlage)	Hijnen *et al*., 2004
coliforme Bakterien	1-4 log-Stufen	UK (Außenanlage)	Ellis, 1987
E. coli	2-3 log-Stufen	Niederlande (Außenanlage)	Hijnen *et al*., 2004
Campylobacter spp.	3-4 log-Stufen	Niederlande (Außenanlage)	Hijnen *et al*., 2004
Cysten von *Giardia* spp.	4-6 log-Stufen	Wassertemperatur 3-20°C	Bellamy *et al*., 1985
Oocysten von *Cryptosporidium* spp.	>4,5 - >6,5 log-Stufen	UK (Wasser der Themse); Laborversuch mit Wassertemperaturen von 4,5 bis 16,5°C	Timms *et al*.,1995; Schuler *et al*., 1991

Über den Verbleib der im Filterbett zurückgehaltenen hygienisch relevanten Mikroorganismen ist wenig bekannt. Preuß und Schwarz, 1995 berichten, dass coliforme Bakterien und *E. coli* beim Eintrag in den Filter am Material der oberen Sandschichten adsorbieren. Gleichzeitig verringert sich die Anzahl dieser Bakterien in der wässrigen Phase. Dies stimmt mit Beobachtungen von Preuß und Nehrkorn, 1994 überein, wonach in natürlichen aquatischen Systemen die Bakterienzahlen an der festen Phase deutlich höher sind als im Wasser. Die Überlebensdauer hygienisch relevanter Bakterien in Langsamsandfiltern ist ebenso wie in Wasser und Böden von Milieubedingungen wie der Temperatur, Trübstoff- und DOC-Gehalt, Feuchtigkeit und UV-Strahlung abhängig. Die Überlebensdauer von *E. coli* O157:H7 ist in Sedimenten bei einer Temperatur von 21°C drei Mal so hoch wie bei 5°C. Bei gutem Nährstoffangebot und einer Temperatur von 5°C konnten *E. coli*-Zellen bis zu 77 Tage überleben, wenn die bodeneigene Flora durch Autoklavieren abgetötet war (Jiang *et al*., 2002). Der Temperatureinfluss scheint jedoch bei hygienisch relevanten Bakterien, die im Wasser suspendiert sind, größer zu sein als bei solchen Organismen, die an Bodenpartikel adsorbiert vorliegen (Gantzer *et al*., 2001). Die höhere Überlebensdauer von pathogenen Organismen in Laborversuchen im Vergleich zu Freilandversuchen deutet auf einen Einfluss des Wechsels zwischen Tag- und Nachttemperatur, der UV-Strahlung und der Austrocknung durch vorbeiströmende Luft hin (Hutchison *et al*., 2000). Der Einfluss der Feuchtigkeit wurde ebenfalls von Gantzer *et al*., 2001

untersucht. In dieser Studie war die Überlebensdauer coliformer Bakterien bei 15% Bodenfeuchtigkeit höher als bei einer Bodenfeuchtigkeit von 35%. Die Überlebensdauer hygienisch relevanter Mikroorganismen ist zudem vom Organismentyp abhängig. Protozoen wie *Cryptosporidium* spp. sind nach dem Einbringen in Böden deutlich länger nachweisbar als Bakterien wie *E. coli* und *Salmonella* spp. (Hutchison *et al*., 2005). Die nicht erwünschte Akkumulation und Vermehrung zurückgehaltener hygienisch relevanter Bakterien in Langsamsandfilter scheint aufgrund dieser Erkenntnisse möglich.

1.1.3.2 Nachweis hygienisch relevanter Mikroorganismen

Ein Ziel der Trinkwasseraufbereitung ist es, hygienisch relevante Mikroorganismen aus dem Rohwasser zu entfernen. Nur so kann der fäkal-oraler Kreislauf von Krankheitserregern unterbrochen und Epidemien verhindert werden. Die Beurteilung der mikrobiologischen Wasserqualität basiert auf Indikatorkeimen, deren Herkunft menschliche und tierische Fäkalien sind.

Zu den mikrobiologischen Krankheitserregern des Fäkaloralen-Kreislaufs zählen Viren, Bakterien und Protozoen. Die Empfindlichkeit dieser verschiedenen Typen von Mikroorganismen gegenüber Umwelteinflüssen und Maßnahmen der Trinkwasseraufbereitung ist sehr unterschiedlich. *E. coli* stirbt z.B. bereits bei deutlich geringeren Desinfektionsmittelkonzentrationen ab als die Cysten von *Cryptosporidium* spp. und die Oocysten von *Giardia* spp. (Botzenhart, 1994). Daher wird die mikrobiologische Trinkwasserqualität am Vorkommen und der Anzahl mehrerer, verschiedenartiger Indikatororganismen gemessen.

Coliforme Bakterien, *E. coli* und Enterokokken gelten als klassische, fäkale Indikatororganismen, die stellvertretend für Gram-negative und Gram-positive Bakterien untersucht werden. *Clostridium perfringens* wurde mit der Trinkwasserverordnung 2001 neu in die Liste der Indikatororganismen aufgenommen, da das Bakterium Sporen bildet. Sporen überleben zum Einen in der Unwelt länger als vegetative Bakterienzellen, so dass Clostridien als Indikatoren für zeitlich länger zurückliegende oder örtlich weit entfernte Fäkalkontaminationen dienen können (WHO, 1989). Die Sporen der Clostridien weisen zum Anderen eine ähnliche Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen auf wie die Cysten von *Cryptosporidium* spp. und die Oocysten von *Giardia*

spp. und sollen entsprechende Verunreinigungen anzeigen (Payment und Franco, 1993). Die routinemäßige Analyse der standorteigenen, so genannten autochthonen Bakterien (KBE bei 22°C) und der nicht erwünschten, allochthonen Bakterien (KBE bei 36°C) dienen der Detektion anormaler Veränderungen.

Der Nachweis der Indikatororganismen erfolgt entsprechend der Trinkwasserverordnung 2001 mittels kultureller Verfahren. Mit den kulturellen Verfahren sollen alle vermehrungsfähigen und damit virulenten Bakterien erfasst werden. Bakterienzellen können sich jedoch in Zuständen befinden, in denen sie sich mit den klassisch-mikrobiologischen Methoden nicht nachweisen lassen und dennoch über das Potential zur Vermehrung und Pathogenität verfügen.
In Umwelthabitaten können Bakterien in VBNC-Stadien (VBCN = viable but nonculturable) vorliegen. VBNC-Zellen können sich auf Nährböden nicht teilen und sind somit nicht kultivierbar (Owen, 1995). Die Lebensfähigkeit und Pathogenität der VBNC-Zellen bleibt potentiell erhalten (Gribbon und Barer, 1995; Oliver und Bockian, 1995; Pommepuy *et al*., 1996; Barer *et al*., 1998; Waage *et al*., 1999).
Zum spezifischen Nachweis der Indikatororganismen wird die Begleitflora durch die selektiven Bedingungen des kulturellen Verfahrens unterdrückt. Vorgeschädigte Zellen der Indikatororganismen sind häufig unter den selektiven Bedingungen nicht vermehrungsfähig. Kämen diese vorgeschädigten Zellen jedoch in ein Milieu mit optimalen Bedingungen, wie z.B. den Darm, wären sie vermehrungsfähig und virulent.
Der Nachweis einzelner Bakterienarten, -gattungen oder –gruppen mittels kultureller Methoden beruht auf spezifischen physiologischen Eigenschaften dieser Bakterien. Diese Eigenschaften sind bei den meisten Stämmen der Zielorganismen vorhanden, bei einigen jedoch nicht. Zum Beispiel werden *E. coli*-Zellen in kulturellen Verfahren durch die Aktivität der β-Glucuronidase bestimmt. Es gibt jedoch *E. coli*-Stämme, die nicht über dieses Enzym verfügen (Regnault *et al*., 2000).
VBNC-Zellen, vorgeschädigte Zellen und manche Stämme einer Zielgruppe werden mit den kulturellen Methoden nicht erfasst, obwohl sie vorhanden und potentiell pathogen sind. Die auf Gensondentechnik basierende Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ermöglicht dagegen die Erfassung auch dieser Bakterienzellen. FISH ist eine kultivierungsunabhängige Methode, bei der phylogenetische Bakteriengruppen mittels 16S oder 23S rRNS-Sonden nachgewiesen werden. Durch Fluoreszenzmarkierung der Sonden können die einzelnen Zellen der Zielorganismen un-

ter dem Mikroskop identifiziert und quantifiziert werden (Amann *et al*., 1995). Eine hohe Kopienzahl der 16S bzw. 23S rRNS liegt nur in intakten, stoffwechselaktiven Zellen vor, die auch mit den klasssich-kulturellen Verfahren nachgewiesen werden sollen. Diese hohe Kopienzahl ist Voraussetzung für ein deutliches Fluoreszenzsignal bei Verwendung einfach markierter Sonden (Moter und Göbel, 2000).

Für den Nachweis vieler hygienisch relevanter und pathogener Mikroorganismen sind geeignete FISH-Sonden vorhanden. Der Einsatz dieser Sonden im medizinischen Bereich sowie in der Lebensmittelkontrolle, einschließlich Trinkwasser, ist von großem Interesse und wird erforscht (Meier *et al*., 1997; Franks *et al*., 1998; Krimmer *et al*., 1999; Jansen *et al*., 2000; Kempf *et al*., 2000; Regnault *et al*., 2000; Fuchs *et al*., 2001; Ootsubo *et al*., 2002).

Ein wichtiger Vorteil der *in situ*-Hybridisierung für die Praxis ist die Zeitersparnis. Das quantitative Endergebnis liegt bei Verwendung von FISH innerhalb eines Arbeitstages vor, während für den kulturellen Nachweis von Indikatororganismen zwei (z.B. für *E. coli*) bis zehn Tage (z.B. für *Legionella* spp.) benötigt werden.

Bevor eine Technik für die Trinkwasserkontrolle eingesetzt werden kann, muss sie mit der nach Trinkwasserverordnung 2001 vorgeschriebenen Methode (Referenzverfahren), die in der Anlage 5, Nr. 1 der Trinkwasserverordnung 2001 für die einzelnen Parameter festgelegt ist, verglichen werden. Mit der neuen Methode müssen mindestens genau so viele Zielorganismen nachgewiesen werden wie mit dem Referenzverfahren (§15, Abs.1 der Trinkwasserverordnung 2001).

1.1.4 Rückhalte-, Eliminations- und Reinigungsmechanismen der Langsamsandfiltration

Die für die Leistung der Langsamsandfilter verantwortlichen Vorgänge im Filterbett sind trotz der fast 200jährigen Nutzung der Technologie bis heute nicht vollständig verstanden. Das Filterbett und die darin ablaufenden Prozesse wurden lange wie eine „Black-Box“ behandelt. Die Elimination von Partikeln, einschließlich hygienisch relevanter Mikroorganismen und gelöster Substanzen aus dem Rohwasser wurde durch Veränderung der Betriebsparameter optimiert, ohne die Vorgänge im Filterbett zu untersuchen.

Die Rückhalte-, Eliminations- und Reinigungsleistungen von Langsamsandfiltern beruhen zum Einen auf den physikalischen und chemischen Mechanismen der Filtration und Adsorption (Matthess *et al*., 1991). Zum Anderen sind vielfältige biologische Prozesse an den effektiven Leistungen der Filter beteiligt. Als Mechanismen der Bakterienrückhaltung und –elimination sind antagonistische Effekte der filtereigenen, so genannten autochthonen Population (Jiang *et al*., 2002) sowie der physikalisch-chemischen Milieubedingungen (Weber-Shirk und Dick, 1997a) und Bakterienfraß (Weber-Shirk und Dick, 1997b; Weber-Shirk und Dick, 1999) bekannt. Die Bakterienzerstörung durch Bakteriophagen und Bdellovibrio im Filterbett wird vermutet (Preuß und Schwarz, 1995).
Durch mikrobielle Stoffwechselleistungen erfolgen im Überstau und Filterbett von Langsamsandfiltern komplexe Reinigungsprozesse (z.B. Nitrifikation und Denitrifikation). Diese Abbauprozesse werden von der autochthonen Biozönose, hauptsächlich der Bakterienpopulation geleistet. Langsamsandfilter stellen ein offenes Ökosystem dar. Mit dem zu filtrierenden Wasser werden ständig neue Nährstoff ein- und Stoffwechselprodukte abtransportiert. Auf diese Weise kann sich ein biologisches Gleichgewicht einstellen, dass sich selbst regenerieren und an wechselnde Belastungen anpassen kann (Schwarz, 1978; Schmidt und Schwarz, 1989).

1.2 Diversität und Zusammensetzung von Bakterienpopulationen in natürlichen Biofilmen

1.2.1 Bakterienpopulationen in Langsamsandfiltern

Die mikrobiellen Populationen von Langsamsandfiltern sind essentiell an den Rückhalte-, Eliminations- und Reinigungsleistungen beteiligt. Filter, die neu befüllt oder geschält wurden, erzielen deutlich schlechtere Leistungen als Filter, die bereits einige Tage bis Wochen in Betrieb sind. Dies wird auf die fehlenden Biofilme der frisch befüllten oder geschälten Filter zurückgeführt (Hijnen *et al*., 2004). In der ersten Zeit nach der Inbetriebnahme etabliert sich die autochthone Biozönose im Bereich der Schmutzdecke und auf den Sandkornoberflächen im gesamten Filterbett in Form von Biofilmen. Biofilme sind die bevorzugten Lebensformen von Bakterien, da sie in vielen Bereichen ökologische Vorteile gegenüber der planktonischen Lebensweise be-

sitzen. Zu diesen Vorteilen zählen der Schutz vor Umwelteinflüssen, die Akkumulation von Nährstoffen und die Ausbildung von Mikrokonsortien (Übersicht in Flemming und Wingender, 2003). Für eine Biofilmbildung sind ausreichend Wasser, mikrobiell verwertbare Nährstoffe und Mikroorganismen notwendig. Diese Voraussetzungen sind in Langsamsandfiltern erfüllt. Die Biozönose der Langsamsandfilter-Biofilme besteht neben Bakterien aus Pilzen, Algen, Protozoen und höheren Organismen; sie entspricht der Sandlückenfauna (Husmann, 1978; Schminke *et al*., 1992). Die mit dem Wasser eingetragenen Substanzen werden zum Teil von Organismen dieser Biozönose abgebaut. Insbesondere die am Anfang der Nahrungskette stehenden und durch ihre große Stoffwechselvielfalt gekennzeichneten Bakterien sind verantwortlich für die biologische Reinigungsleistung der Langsamsandfilter. Die autochthone Bakterienpopulation trägt außerdem zur Elimination der hygienisch relevanten, allochthonen Mikroorganismen bei (Preuß und Schwarz, 1995; Jiang *et al*., 2002).

Für das Verständnis der biologischen Prozesse in Langsamsandfiltern ist die Kenntnis der bakteriellen Diversität und Zusammensetzung notwendig. Das heutige Wissen über die Bakterienpopulationen von Langsamsandfiltern basiert hauptsächlich auf Untersuchungen, in denen kulturelle Methoden verwendet wurden (Calaway *et al*., 1952; Calaway, 1957; Bruces und Hawkes, 1983; Bahgat *et al*., 1999). Durch die Kultivierung entsteht allerdings in der Regel ein verzehrtes Bild von der Diversität und Zusammensetzung bakterieller Populationen in Umwelthabitaten, wie Smith *et al*., 2001 anhand von Populationsanalysen Ammonium-oxiederender Bakterien natürlicher Habitate demonstrierten.

Durch die Kultivierung wird nur ein Bruchteil der in natürlichen Ökosystemen vorkommenden Bakterien erfasst. Bis heute sind trotz der enormen physiologischen, metabolischen und genetischen Vielfalt natürlicher Ökosysteme nur ca. 6.200 Bakterienarten bekannt (Oren, 2004). Nach vorsichtigen Schätzungen entspricht dies weniger als 1% aller *Bacteria* und *Archaea* unserer Umwelt (Amann *et al*., 1995; Pace, 1997). Molekularbiologische, kultivierungsunabhängige Methoden ermöglichen die Analyse aller vorhandenen Bakterien. In der vorliegenden Arbeit sollten molekularbiologische Techniken genutzt werden, um eine Einblick in die bakterielle Diversität von Langsamsandfilter-Biofilmen zu erlangen. Dadurch sollte die „Black-Box“, die die bakterielle Population von Langsamsandfiltern noch darstellt, beleuchtet werden.

1.2.2 Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung von Bakterienpopulationen in natürlichen Habitaten

Die molekularbiologischen Methoden zur Analyse von Bakterienpopulationen basieren auf Sequenzunterschieden bzw. –gemeinsamkeiten. Die Zielstrukturen dieser Analysen sind meist die 16S oder 23S rRNS bzw. rDNS. Die 16S rRNS ist in der kleinen Untereinheit und die 23S rRNS in der großen Untereinheit der Ribosomen aller prokaryotischen Organismen lokalisiert. Aufgrund der einheitlichen Funktion der Ribosomen in der Proteinbiosynthese ist die Sequenz der 16S rRNS bzw. 23S rRNS und der entsprechenden Gene in manchen Bereichen stark konserviert. In den variablen Bereichen sind die Sequenzunterschiede um so größer, je geringer die phylogenetische Verwandtschaft zweier Organismen ist. Die Einteilung aller Lebewesen in die drei Domänen *Bacteria, Eucarya* und *Archaea* basiert auf vergleichenden Analysen der 16S rRNS von Prokaryoten und 18S rRNS von Eukaryoten (Woese, 1987; Woese *et al*., 1990). Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden wurden neue Phyla innerhalb der *Bacteria* und *Archaea* entdeckt, wobei einige dieser Phyla ausschließlich durch die Sequenzen von Umweltproben bekannt sind (Hugenholtz *et al*., 1998; Chelius *et al*., 2001; Derakshani *et al*., 2001). Mehr als die Hälfte der über 70.000 rRNS-Sequenzen aus den Datenbanken stammen von bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismen (Cole *et al*., 2003).

Wichtige und häufig verwendete molekularbiologische Methoden zur Erfassung der bakteriellen Diversität und Zusammensetzung von Umwelthabitaten sind die Erstellung von Clone Libraries, amplifizierte 16S rDNS Restriktionsanalyse (ARDRA), denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) (Abb.1.3).

Zur Analyse der bakteriellen Diversität in Flussbiofilmen wurde zum Beispiel die Methode der 16S rDNS PCR-DGGE eingesetzt (Lyautey *et al*., 2005). Smith *et al*., 2001 untersuchte die Zusammensetzung der Ammoniumoxidierer von Ackerland und marinen Sedimenten durch das Erstellen von 16S Clone Libraries und Sequenzierung der 16S-Gene. ARDRA wurde zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität von landwirtschaftlich genutzten Böden und im marinen Bereich verwendet (Øvreås und Torsvik, 1998, Dang und Lovell, 2000). Egli *et al*., 2003 setzten die RFLP-Methode zur Analyse der Ammonium- und Nitritoxidierer in einem Abwasseraufbereitungsschritt ein.

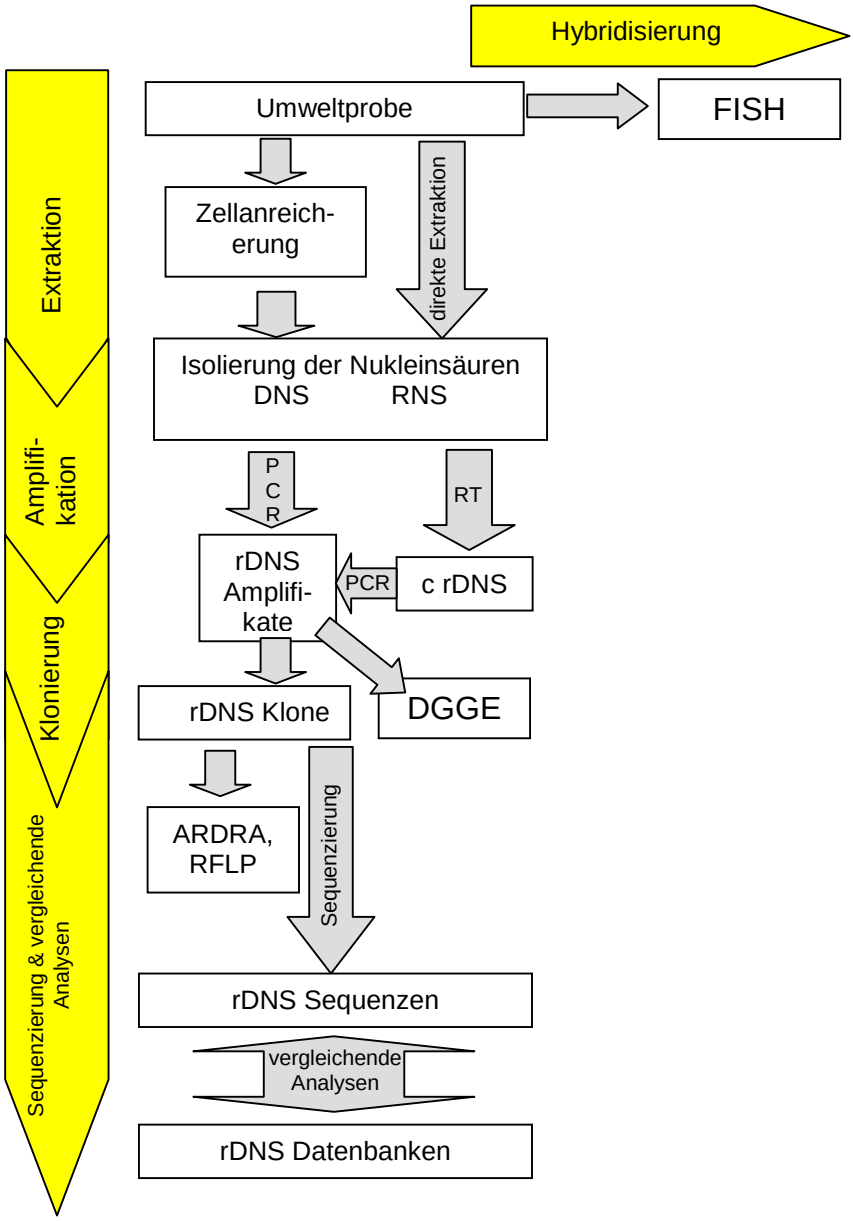


Abbildung 1.3: Flussdiagramm der wichtigsten Charakterisierungsmöglichkeiten der Population einer Umweltprobe durch vergleichende rRNS- bzw. rDNS-Analysen (modifiziert nach Amann *et al*., 1995). ARDRA: amplifizierte rDNS Restriktionsanalyse, DGGE: denaturierende Gradientengelelektrophorese, FISH: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung; RFLP: Restriktionfragmentlängenpolymorphismus, RT: reverse Transkriptase.

Die Untersuchungen der 16S rDNS geben einen qualitativen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung natürlicher Habitate. Die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung - sowie im Idealfall Informationen über die *in situ*-Anordnung einzel-

ner Bakterien innerhalb von Konsortien - sind mit der FISH-Methode möglich (Amann *et al*., 1995). Zur Konstruktion der FISH-Sonden sind die rRNS-Sequenzen der Zielorganismen notwendig. Dementsprechend können mit dieser Methode nur Organismen nachgewiesen werden, deren 16S- bzw. 23S-Sequenzen bekannt sind. FISH diente vielfach der quantitativen Untersuchung der mikrobiellen Diversität und Zusammensetzung von Böden und aquatischen Habitaten (Hahn *et al*., 1992; Manz *et al*., 1993; Alfreider *et al*., 1996; Ramsing *et al*., 1996; Kalmbach *et al*., 1997a; 1997b; Llobet-Brossa *et al*., 1998; Matthew und Kirchman, 2000; Gillan *et al*., 2005). In Abbildung 1.4 sind die Sonden, mit denen Vertreter der wichtigsten Abstammungslinien der Prokaryoten detektiert werden können, zusammengestellt. Es handelt sich um die am häufigsten für Populationsanalysen mittels FISH verwendeten Sonden.

In den letzten Jahren wurde die Metagenom-Analyse entwickelt, die über die Identifizierung der nicht kultivierbaren Organismen hinaus die Untersuchung des gesamten Genoms ermöglicht. Die Durchmusterung metagenomischer DNS-Datenbanken natürlicher Habitate ermöglicht die Isolierung neuartiger Gene und die Identifizierung funktioneller Gene. Zum Einen trägt dies zum Verständnis der Funktionsweise natürlicher Ökosysteme bei, zum Anderen können dadurch neue Biokatalysatoren und Wirkstoffe detektiert werden. Diese neuen Substanzen sind von großem Interesse für die chemische und pharmazeutische Industrie. Metagenom-Analysen von Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen und in Böden heben die Vielfalt der Organismen und deren physiologisches Potential hervor (Handelsman *et al*., 1998; Schmeisser *et al*., 2003).

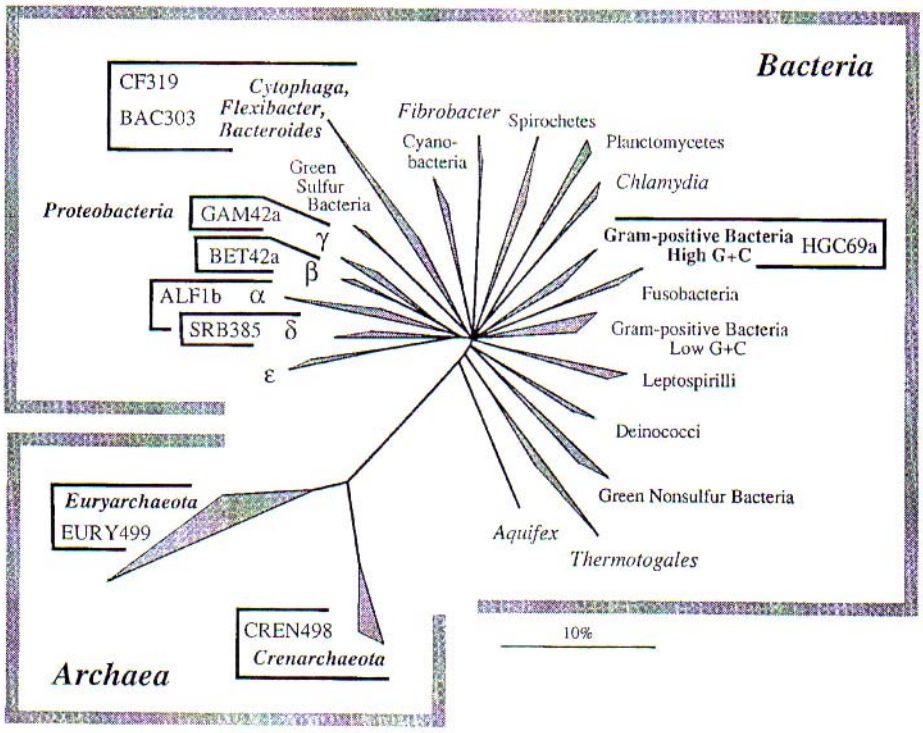


Abbildung 1.4: Phylogenetischer Stammbaum (basierend auf den Daten von 1.800 16S rRNS-Sequenzen von *Bacteria* und *Archaea*; Amann *et al*., 1995). In Klammern sind die FISH-Sonden angegeben, die den Nachweis wichtiger Gruppen der Hauptabstammungslinien ermöglichen. Der phylogenetische Zusammenhang der Hauptabstammungslinien wird angezeigt durch die Länge der Dreiecke. Der Maßbalken entspricht einer etwa 10%igen Sequenzdivergenz.

1.3 Problemstellung

Die Leistungen und Betriebseigenschaften von Langsamsandfiltern wurden unter Rahmenbedingungen optimiert, die für die Langsamsandfiltration optimale Voraussetzungen darstellen. Ein wichtiger Parameter für die Langsamsandfiltration ist das Filtermaterial. Sande mit einer effektiven Korngröße von 0,15-0,45 mm und einem Inhomogenitätskoeffizienten kleiner 3-5 haben sich als geeignete Filtermaterialien erwiesen (Visscher, 1990; Collins *et al*., 1991, Entwurf des DVGW-Arbeitsblattes W213, Teil IV; 2003). Eine Voraussetzung für ökonomische Filterlaufzeiten ist eine gute Qualität des Rohwassers. Von besonderer Bedeutung für die Laufzeiten sind die geringen Trübstoff-, DOC- (dissolved organic carbon), Phosphat- und Stickstoff-Gehalte des Zulaufs. Der Trübstoffgehalt des Filterzulaufs sollte möglichst gering

gehalten werden, um eine schnelle Verblockung des Filters zu vermeiden. Hohe DOC-, Phosphat- und Stickstoff-Gehalte begünstigen die unerwünschte Massenentwicklungen von Bakterien und Algen in den Rohwässern, im Überstau und im Filterbett. Einzelligen Algen und extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) der Langsamsanfilter-Biofilme können zur Verblockung der Filterporen führen (McNair *et al*., 1987; Collins *et al*., 1991; Mauclaire *et al*., 2004). Bei Algenblüten kann es zur Produktion gesundheitsschädlicher Algentoxine kommen. Bakterien- und Algenmassenentwicklungen werden von höheren Wassertemperaturen gefördert. Die Wassertemperatur und die Temperatur im Filterbett liegen in den meisten untersuchten Anlagen zwischen 5°C und 15°C (s. Tab. 1.2, S. 8). Im Filterbett entwickelt sich eine an die Betriebsbedingungen angepasste autochthone Biozönose. Bei dieser Biozönose handelt es sich unter den beschriebenen, optimalen Bedingungen um erwünschte Organismen, die an den biologischen Prozessen der Langsamsandfiltration beteiligt sind.
Unter diesen optimalen Bedingungen sind die Rückhalte- und Reinigungsleistungen sowie die Betriebseigenschaften von Langsamsandfiltern gut untersucht. Modifikationen dieser Rahmenbedingungen, wie z.B. klimatisch bedingte Veränderungen oder unterschiedliche Filtermaterialien, können die Leistungen und Betriebseigenschaften der Langsamsandfilter verschlechtern (Collins *et al*., 1991). Signifikant andere, als ungünstiger für die Langsamsandfiltration eingeschätzte klimatische Rahmenbedingungen liegen in tropischen Regionen vor.
In den Tropen liegt die Wassertemperatur ganzjährig zwischen 20°C und 30°C (Hill und Rai, 1982; Jen und Bell, 1982; Oluwande *et al*., 1983; Wright, 1986). Die Dauer und Intensität der Sonneneinstrahlung ist von längerer Dauer und höherer Intensität als in den gemäßigten Klimazonen. Dies führt - insbesondere in Verbindung mit der höheren Wassertemperatur - zu einem steigenden Anteil der Photosynthese und damit zu einer verstärkten bakteriellen Produktivität und Algenvermehrung. In den tropischen Gewässer korreliert der hohe organische Anteil mit geringen Mengen an freien Phosphat- und Stickstoffverbindungen (Hill und Rai, 1982). Die intensive UV-Strahlung kann zur Abtötung hygienisch relevanter Bakterien an den Oberflächen führen (Fujioka und Navikawa, 1982). In Biofilmen tropischer Gewässern finden coliforme Bakterien, *E. coli* und *Salmonella* spp. jedoch optimale Lebens- und Wachstumsbedingungen vor (Hazen und Toranzos, 1990; Winfield und Groisman, 2003). Der Trübstoffgehalt ist in tropischen Gewässern aufgrund starker, regelmäßiger Regenfälle ebenfalls hoch.

Die Verwendung geeigneter Filtermaterialien ist für die Langsamsandfiltration als essentiell beschrieben (Visscher, 1990; Collins et al., 1991; DVGW-Arbeitsblatt W213, Teil IV). In Gebieten, in denen geeignete Sande nicht vorliegen und deren Beschaffung zu teuer ist, ist die Verwendung alternativer Filtermaterialien von Interesse. Die in vielen dicht besiedelten Regionen der Erde verfügbaren Materialien Glasgranulat und Kokosfasernund haben sich in ersten Versuchen als geeignet für die Langsamsandfiltration erwiesen (Frankel, 1981; CWC Cleaning Washinton Center, 1995; 1998; Mughal, 2000).

Für die Leistungsfähigkeit von Langsamsandfiltern sind die biologischen Vorgänge im Filterbett von immenser Bedeutung. Unter geeigneten Rahmenbedingungen bildet sich im Filterbett eine autochthone Bakterienpopulation aus, die an den biologischen Abbau- und Rückhalteprozessen beteiligt ist und die Akkumulation und Vermehrung allochthoner Mikroorganismen verhindert.
Die Bakterien der Langsamsandfilter-Biofilme werden mit dem Filtermaterial und dem zu reinigenden Wasser eingetragen. Die Milieubedingungen im Filter beeinflussen die Ansiedlung und Akkumulation und damit auch die Zusammensetzung der autochthonen Bakterienpopulation. Bakterienpopulationen sind dynamische Gesellschaften, deren Zusammensetzung und Diversität sich während der Biofilmreifung verändern. Modifikationen der Milieubedingungen können zu Veränderungen der Bakterienpopulationen führen, welche die Funktionalität der entsprechenden Habitate beeinflussen (Manz *et al*., 1999; Williams *et al*., 2004; Griffiths *et al*., 2004). Die Auswirkungen, die Änderungen der Rahmenbedingungen von Langsamsandfiltern auf die autochthone Population und damit auf die Filterleistungen und -funktion haben, sind unbekannt.

1.4 Aufbau der Versuchsanlagen

Versuchsfilter wurden vom Institut für Wasserforschung, Schwerte und dem Bereich Wassertechnologie des IWW, Mülheim betrieben.
Die Filter wurden mit Rohwässern beaufschlagt, die für den Aufbereitungsschritt der Langsamsandfiltration normalerweise zu hohe Trübstoff-, DOC- und/oder Ammonium-Gehalte aufwiesen. Um diese zu erreichen, musste das Oberflächenwasser bei

Schwerte, das für einen Teil der Versuchsanlagen als Zulauf diente, durch die Zugabe von Hefeextrakt und Ammoniumsulfat modifiziert werden (Endkonzentrationen: DOC 5 mg/l und Ammonium 1-2 mg/l). Weitere Versuchsfilter wurden mit dem Ablauf des Emscherklärwerks Dinslaken beaufschlagt. Der Ablauf des Emscherklärwerks wies die gewünschte, schlechtere Rohwasserqualität auf (DOC 5-8,5 mg/l, Ammonium und Nitrit 0,02-1 mg/l, Nitrat 10-55 mg/l und Sulfat 90-430 mg/l). Der Trübstoffgehalt des Wassers aus dem Emscherklärwerk war 17- bis 27mal höher als der des Oberflächenwassers der Ruhr bei Schwerte.
Die Filterzuläufe wurden auf 20-30°C erwärmt. Durch Pflanzenlampen wurde eine der Versuchstemperatur angepasste Dauer von Sonneneinstrahlung nachgestellt. Parallel wurden Versuchsfilter mit dem Standardfiltermaterial Sand und mit den alternativen Filtermaterialien Glasgranulat und Kokosfasern betrieben. An Versuchsfiltern mit dem Filtermaterial Sand wurden Untersuchungen zu den Fragestellungen der kontinuierlichen und intermittierenden Betriebsweise, zu Auflageschichten und zu Algenwachstum bearbeitet. Die Rückhalteleistungen für hygienisch relevante Mikroorganismen und die mikrobiellen Eigenschaften von Langsamsandfiltern wurden in verschiedenen Versuchsphasen untersucht.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung von Langsamsandfilter-Biofilmen zu erlangen und den Verbleib hygienisch relevanter Bakterien zu untersuchen. Die Bakterienpopulationen von Langsamsandfiltern, die unter verschiedenen Rahmenbedingungen betrieben wurden, sollten mittels klassisch-mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht werden.

Dazu wurden folgende Aspekte bearbeitet:

- Die Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen sowie deren Verbleib im Filterbett sollten anhand von Versuchsfiltern untersucht werden.
- Für den Nachweis von Indikatororganismen sollte ein auf der Gensondentechnologie basierendes Verfahren als Alternative zu den klassisch-kulturellen Metho-

den für die Probenmatrix der Langsamsandfilterzu- und –abläufe optimiert und mit dem Referenzverfahren nach Trinkwasserverordnung 2001 verglichen werden.

- Anhand von mikrobiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Charakteristika sollten die Langsamsandfilter-Biofilme, die sich in den oberen, aktiven Filterschichten unter verschiedenen Rahmenbedingungen bilden, miteinander verglichen werden.
- Ein Einblick in die bakterielle Diversität und Zusammensetzung der Langsamsandfilter-Biofilme sollte durch molekularbiologische Analysen der 16S rDNS erlangt werden.
- Bakteriengruppen, die aufgrund der 16S rDNS-Analysen als bedeutend für die LSF eingeordnet wurden, sollten mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung quantitativ untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um Stämme aus der institutseigenen Stammsammlung (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme aus der institutseigenen Stammsammlung und der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

Gattung	Spezies	Herkunft	Dauerkulturnr.
Acinetobacter	*johnsonii*		K3/H4
Acinetobacter	*junii*		K3/G4
Agrobacterium	*tumefaciens*	DSM 30147	K4/C1
Bacillus	*brevis*		K3/D1
Bacillus	*subtilis*		K3/A1
Burkholderia	*cepacia*	DSM 7288	K1/G4
Citrobacter	*freundii*		K3/E4
Comamonas	*acidovorans*		K1/E4
Cytophaga	*sp. R3*	aus einem Ruhrbiofilm isoliert von Dr. J. Wingender	K3/J4
Enterobacter	*aerogenes*		K3/B5
Enterococcus	*faecium*		K3/A3
Enterococcus	*faecalis*	DSM 20478	K3/C3
Escherichia	*coli*	DSM 787	K3/G3
Flavobacterium	*johnsoniae*	DSM 2064	K1/G5
Flexibacter	*aurantiacus*	DSM 6792	K1/H5
Pseudomonas	*aeruginosa*		K1/A2
Salmonella	*spp.*	WQ-MBA	K1/J5
Sphingobacterium	*multivorum*		K3/C5
Xanthomonas	*maltophilia*		K1/B4

2.1.2 Nährmedien

In Tabelle 2.2 sind die verwendeten Nährmedien aufgelistet. Diese wurden entsprechend der Herstellerangaben eingewogen, in deionisiertem Wasser gelöst und 20 Min bei 121°C autoklaviert.

Tabelle 2.2: Verwendete Nährmedien

Medium	Hersteller
Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3	OXOID LTD, Basingstoke, England
Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
R2A-Agar	OXOID LTD, Basingstoke, England
Standard-No.I-Nähragar	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Nukleinsäuren

- **Oligonukleotide**

Die in dieser Arbeit als Amplifikationsprimer eingesetzten Desoxyoligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Sie wurden von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland hergestellt.

Tabelle 2.3: Oligonukleotide zur Amplifikation

Bezeichnung	Position (*E. coli*)[a]	Sequenz 5 '→ 3'*	Zielgruppe
27f[b]	7-27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	*Bacteria*
1492r[b]	1510-1492	GGYTACCTTGTTACGACTT	*Bacteria, Archaea*

* Y= C/T, M= A/C

[a]: Position in *E. coli* 16S rRNS-Primärstruktur (Brosius *et al*., 1981)

[b]: Medlin *et al*., 1998

Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit als Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung verwendet wurden, sind in Tabelle 2.4 zusammengestellt. Diese Oligonukleotide tragen am 5`-Ende entweder einen Fluoreszenzfarbstoff (Cyaninfarbstoff CY3 oder Fluorescein) oder das Enzym Meerrettich-Peroxidase (horse-radish peroxidase = HRP). Die fluoreszenzmarkierten Sonden wurden von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland hergestellt und die HRP-markierten Sonden von Biomers, Ulm, Deutschland.

Tabelle 2.4: Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide für FISH

Bezeichnung	Position[a]	Sequenz 5`→3`	Zielorganismen	Markierung
EUB338[b]	16S, 338-355	GCTGCCTCCCGTAGG	*Bacteria*	CY3, FLUOR oder HRP
NONEUB 338[b]		ACTCCTACGGGAGGCAGC	Negativkontrolle	CY3
Colinsitu[c]	16S, 637-660	GAGACTCAAGATTGCCAGTATCAG	*Escherichia coli*	CY3
ProbeD[d]	16S, 1251-1274	TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT	*Enterobacteriaceae*	FLUOR
Enc131[e]	16S, 131-147	CCCCTTCTGATGGGCAGG	*Entercoccus* sp.	FLUOR
Efs130[e]	16S, 131-147	CCCTCTGATGGGTAGGTT	*E. faecalis*	CY3
ALF968[g]	16S, 968-986	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	α-*Proteobacteria*	FLUOR
BET42a[f]	23S, 1027-1043	GCCTTCCCACTTTT	β-*Proteobacteria*	CY3 oder FLUOR
GAM42a[f]	23S, 1027-1043	GCCTTCCCACATCGTTT	γ-*Proteobacteria*	CY3 oder FLUOR
HGC69a[h]	23S, 1901-1918	TATAGTTACCACCGCCGT	grampositive *Bacteria* mit hohem GC-Gehalt	HRP

[a]: Position in *E. coli* 16S rRNS-Primärstruktur (Brosius *et al.*, 1981); [b]: Amann *et al.*, 1990 ; [c]: Regnault *et al.*, 2000; [d]: Ootsubo *et al.*, 2002 ; [e]: Meier *et al.*, 1997 ; [f]: Manz *et al.*, 1992 ; [g]: Neef, 1997; [h]: Roller *et al.*, 1994
CY3: Cyaninfarbstoff; FLUOR: Fluorescein; HRP: horseradish peroxidase

- **DNS-Größenmarker**

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten DNS-Größenmarker aufgelistet.

Tabelle 2.5: DNS-Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
50-bp-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100-bp-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Smartladder	Eurogentec, Seraing, Belgien

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die selbst hergestellten und in dieser Arbeit verwendten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Puffer und Lösungen

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung / Hersteller
Achromopeptidaselösung	60 U/ml Achromopeptidase, 10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
10%ige Blockingreagenzlösung	10% Blockingreagenz (w/v), 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5
Extraktionspuffer	50 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8,0
Lysozymlösung	500.000 U Lysozym /ml, 50 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl (pH 7,5)
PBS	137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4, pH 7,2
10x Polymerase Puffer mit Mg^{2+}	100 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 500 mM KCl, 15 mM $Mg(OAc)_2$ / Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
5x TaqMaster	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TBE-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.5 Enzyme

In Tabelle 2.7 sind die verwendeten Restriktionsendonukleasen und in Tabelle 2.8 alle weiteren verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 2.7: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller	Enzymsequenz (5→`3`)
*Cfo*I	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	GCG↓C
*Dde*I	Biolabs®, New England, USA	C↓TNAG
*Eco*RI	Biolabs®, New England, USA	G↓AATTC
*Msp*I	Biolabs®, New England, USA	C↓CGG
*Sau*3AI	Biolabs®, New England, USA	↓GATC

Tabelle 2.8: Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
Achromopeptidase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
RNase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.6 Chemikalien und sonstige Materialien

Tabelle 2.9 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und sonstigen Materialien.

Tabelle 2.9: Allgemeine Chemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien/ Materialien	Hersteller
10% Blockingreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
2-Propanol (Isopropanol)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
api® 20E	BioMérieux, Lyon, Frankreich
Borsäure	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Cetyltrimethylammonium-bromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Citifluor AF2	Citifluor, London, UK
Colilert-System; QuantiTray 2000	IDEXX Laboratories, Westbrook, USA
CY3 Tyramid	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
DAPI (4`,6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylformamid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel-deHaen, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formamid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Gel loading solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Chemikalien/ Materialien	Hersteller
Isoamylalkohol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
MetaPhor® Agarose	BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Natriumacatat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nucleospin® Multi-8 Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
One Shot TOP 10 chemically competent *E. coli*	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Phenol (Rotiphenol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polycarbonatfilter, 0,2 µm, GTBP02500	Millipore, Bedford, MA, USA
Polycarbonatfilter, 0,2 µm, GTTP02500	Millipore, Bedford, MA, USA
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sequencer Kit	Perkin Elmer, Forster City, USA
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter (Durchmesser: 0,2 µm)	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasser (für Molekularbiologie, DEPC-behandelt)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, HPLC rein	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Wasser, Rotipuran® p.a., ACS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Wizard® PCR Preps DNA Purification System	Promega, Madison, WI, USA

2.1.7 Geräte

2.1.7.1 Mikroskope

- **Epifluoreszenzmikroskop**

Für die epifluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde ein Mikroskop des Typs DMBL (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Das Mikroskop verfügte über die in Tabelle 2.10 genannten Filter sowie eine Photoeinrichtung (Kamera DC200; Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland).

Tabelle 2.10: Filter des Epifluoreszenzmikroskops

Filter	Anregungs-wellenlänge	Emissions-wellenlänge	detektierbarer Farb-stoff
A	350 nm	465 nm	DAPI
I3	490-502 nm	525-523 nm	Fluorescein
Y3	535-550 nm	610-675 nm	Carbocyanin CY3

- **Rasterelektronenmikroskop**

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem LEO 1530 Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (LEO Electron Microscopy Group) durchgeführt. Die Bildaufnahme erfolgte unter Verwendung des Sekundärelektronendetektors sowie des InLens-Detektors bei einer Beschleunigungsspannung von 10-15 kV. Die REM-Aufnahmen wurden an der Universität Duisburg-Essen, Standort Duisburg, Fakultät 5 im Fachbereich Werkstofftechnik angefertigt.
Das Besputtern der REM-Proben mit Gold wurde mit einem Balzers Union SCD040 durchgeführt. Die Schichtdicke betrug 15-18 nm.

2.1.7.2 Sonstige Geräte

Folgende weitere Geräte sind bei dieser Arbeit zum Einsatz gekommen (Tab. 2.11).

Tabelle 2.11: Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM ™ 310 Genetic Analyser	Perkin Elmer, Foster City, USA
Analysenwaage	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus, Osterode, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Osterode, Deutschland
Electrophoresis Power Supply	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese-Apparatur	Auf Kundenwunsch von der Werkstatt der Phillips-Universität Marburg angefertigt
Hybridisierungsofen	UVP, Upland, California, USA
Muffelofen	Heraeus, Hanau, Deutschland
PCR Thermocycler T3-Kombi	Biometra, Göttingen, Deutschland
Reagenzglasroller	Stuart Scientific, Watford Herts, UK
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Clean Air, Haan, Deutschland
Spektralphotometer	Hitachi, Tokio, Japan
Trockenschrank	GFL, Burgwedel, Deutschland
Ultraturax	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Ultraschalbad, Branson Typ 1200	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Vacuum manifold	Promega, Madison, WI, USA
Geldokumentationsanlage mit UV-Link	INTAS, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

2.1.8 Software

- **BioNumerics**

Als Grundlage für die Clusteranalyse dienten die ARDRA-Ergebnisse. Die Clusteranalysen wurden mit der Software BioNumerics (Applied Maths, Austin, Texas, USA) durchgeführt und ausgewertet. Für den Vergleich der ARDRA-Muster wurde die Methode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ausgewählt. UPGMA ist eine einfache Methode der Stammbaumkonstruktion, die Ähnlichkeiten zwischen OTUs (Operational Taxonomic Units) widerspiegelt. UPGMA beruht auf einem sequentiellen Clusteralogorithmus, wobei lokale topologische Verhältnisse bezüglich Ähnlichkeit identifiziert werden. Der phylogenetische Stammbaum wird schrittweise aufgebaut: Zunächst werden von allen zu analysierenden OTUs die beiden mit der größten Ähnlichkeit identifiziert. Diese werden im nächsten Schritt wie ein OTU behandelt. Zu diesem neuen OTU wird wiederum das OTU mit der höchsten Ähnlichkeit gesucht. Die Analyse wird fortgesetzt bis nur noch zwei OTUs verbleiben (Heyndrickx *et al.*, 1996). In diesen Ähnlichkeitsvergleich gingen nur die manuell ausgewählten Banden der ARDRA-Daten ein.

- **V 4.0 api® 20E**

Die Ergebnisse des Identifizierungssystems api® 20E wurden mit der Software apiLAB Plus (Datenbankversion: V 4.0 api® 20E) ausgewertet.

2.2. Methoden

2.2.1 Aufbau der Versuchsanlagen

2.2.1.1 Versuchsanlagen zur Untersuchung alternativer Filtermaterialien

Das Institut für Wasserforschung (Schwerte) betrieb die Versuchsanlagen zur Untersuchung alternativer Filtermaterialen (Hütter und Schulte-Ebbert, 2005). Als alternative Filtermaterialien wurden Glasgranulat (Körnung 0,2-5 mm) und Kokosfasern ausgewählt. Als Referenzmaterial diente ein für die Langsamsandfiltration optimal geeigneter Sand (Körnung 0,2–2 mm). Um den Temperatureinfluss zu untersuchen, wurden vier- bis sechswöchige Versuchsphasen bei 5-10°C, 20°C und 30°C mit Filtersäulen in einer Klimakammer durchgeführt. Die Säulen wurden 6 h (5 - 10°C), 8 h (20°C) bzw. 12 h (30°C) am Tag durch Pflanzenlampen beleuchtet, um ein offenes Filtersystem nachzustellen. Der Durchmesser der Säulen betrug 20 cm und die Filtermaterialien hatten eine Mächtigkeit von 50 cm. Unter der Filterschicht befand sich eine 8 cm mächtige Stützdrainschicht aus Kies.
Die Filter wurden in der 5-10°C-Versuchsphase mit Oberflächenwasser der Ruhr beaufschlagt, das über Kies vorgefiltert war. In den Versuchsphasen bei 20°C und 30°C wurden die Filter mit unbehandeltem Oberflächenwasser beaufschlagt. Die Anordnung der Versuchssäulen ist der Abbildung 2.1 zu entnehmen.
Zur Erhöhung des DOC- und Ammoniumgehaltes wurde dem Überstau der Versuchsfilter Hefeextrakt- und Ammoniumsulfat-Lösung zugesetzt.
Die alternativen Filtermaterialien Glasgranulat und Kokosfasern wurden im Vergleich zum Sand auch im kleintechnischen Maßstab in Freilandlysimetern untersucht. Die Lysimeter hatten eine Oberfläche von 4 m² und die Filtermaterialien eine Mächtigkeit von 0,5 m. Das Aufschwimmen der Kokosfasern wurde durch eine Kiesschicht in 15 cm Tiefe des Filterbettes sowie ein Gitternetz auf der Filtermaterialoberfläche vermieden. Die Lysimeter wurden mit Oberflächenwasser der Ruhr beaufschlagt, das auf 30°C erwärmt und dem ebenso wie den Filtersäulen Hefeextrakt und Ammoniumsulfat zugesetzt wurde. Innerhalb der viermonatigen Laufzeit der Lysimeter wurden intermittierende und kontinuierliche Betriebsweisen mit verschiedenen Filtergeschwindigkeiten getestet (Tab. 2.12).

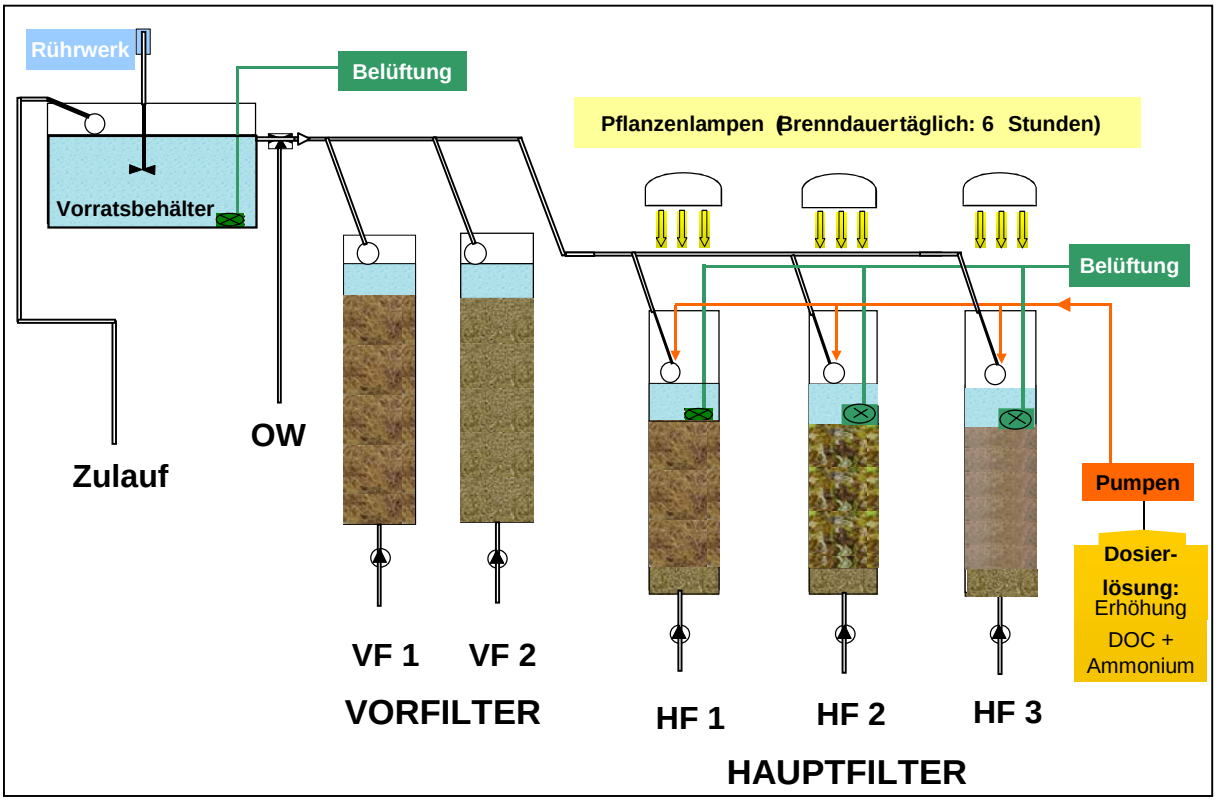


Abbildung 2.1: Anordnung der Filtersäulen in den Versuchsphasen bei 20°C und 30°C. VF = Vorfilter; HF = Hauptfilter; HF1: Kokosfasern, HF2: Glasgranulat; HF3: Sand.

Tabelle 2.12: Betriebsparameter der Lysimeter

Phase	Betriebs-weise	Filtergeschwindig-keit [m/d]	Betriebstage pro Woche
I	kontinuierlich	2,2	7
II	intermittierend	2,2	4
III	intermittierend	3,8	4
IV	kontinuierlich	1,0	7

2.2.1.2 Versuchsanlagen zur Untersuchung verschiedener Betriebsparameter

Der Bereich Wassertechnologie des IWW (Mülheim a.d.R.) betrieb Versuchsfilter (Durchmesser 0,5 m; Mächtigkeit der Filtermaterialien 0,8 m; Mächtigkeit der

Stützdrainschicht aus Kies 25 cm), um die Fragestellungen der Betriebsweise, der Auflagematerialien und des Algenwuchses zu untersuchen. Als Filtermaterial wurde Sand der Körnung 0,2–2 mm verwendet (gleicher Sand wie in den unter 2.2.1.1 beschriebenen Filtern). Die Filter wurden mit dem Ablauf des Klärwerks Emschermündung in Dinslaken beaufschlagt. Um Temperaturschwankungen im Filterbett möglichst zu vermeiden, wurde der Zulauf auf eine konstante Temperatur von 20°C eingestellt. In den Tabellen 2.13 bis 2.15 sind die Betriebsweisen und Unterschiede im Filteraufbau bezüglich der Fragestellungen zusammengefasst.

Tabelle 2.13: Betriebsparameter der Versuchsfilter zur Untersuchung der Betriebsweise

	Filter 1	**Filter 2**	**Filter 3**	**Filter 4**
Betriebsweise	intermittierend, kurzer Betrieb Trockenfilter	intermittierend, langer Betrieb Trockenfilter	kontinuierlich, konstanter Überstau	kontinuierlich, ansteigender Überstau
Filter-geschwindigkeit m/d	2,0	1,4	1	1
Betriebstage pro Woche	3-4	5	7	7
mittlere Filter-geschwindigkeit m/d	1	1	1	1
Überstau min/max in m	0,0/0,9	0,0/0,9	0,9/0,9	0,2/0,9

Tabelle 2.14: Betriebsparameter der Versuchsfilter zur Untersuchung der Auflagematerialien

	Filter 1	**Filter 2**	**Filter 3**	**Filter 4**
Betriebsweise	kontinuierlich, ansteigender Überstau	kontinuierlich, ansteigender Überstau	kontinuierlich, ansteigender Überstau	kontinuierlich, ansteigender Überstau
Auflageschicht 0,2 m	Kies 3-5 mm	Bims 1-4 mm	keine	Kokosfaser
Filter-geschwindigkeit m/d	5	5	5	5
Betriebstage pro Woche	7	7	7	7
Überstau über Auflage bzw. Sand min/max in m	0,2/0,7	0,2/0,7	0,2/0,9	0,2/0,7

Tabelle 2.15: Betriebsparameter der Versuchsfilter zur Untersuchung des Algenwachstums

	Filter 1	Filter 2	Filter 3
Betriebsweise	kontinuierlich, ansteigender Überstau		
Filter-geschwindigkeit m/d	1		
Betriebstage pro Woche	7		
Überstau über Sand min/max in m	0,2/0,4		
Lichteinstrahlung Lux	4000	2000	0

2.2.1.3 Kommerziell betriebener Filter der Ruhr-Wasserwerke (RWW)

Als Vergleichsfilter wurde ein kommerziell betriebener Langsamsandfilter des RWW-Wasserwerks Styrum-Ost, Mülheim a.d. Ruhr untersucht. Dieser Filter wird mit Oberflächenwasser der Ruhr beaufschlagt und dient der Grundwasseranreicherung. Zum Zeitpunkt der Probenahme war der Filter drei Monate kontinuierlich betrieben worden und sollte geschält werden. Die Mächtigkeit der Filterschicht betrug ca. 0,8 m, die der Stützdrainschicht aus Kies ca. 0,2 m.

2.2.1.4 Beprobung der Zu- und Abläufe sowie der Filtermaterialien

- **Beprobung der Zu- und Abläufe von Versuchsfiltern**

Alle Versuchsfilter besaßen Probenahmestellen für die Zu- und Abläufe. Die Probenahmestellen der Filtersäulen und der Lysimter (s. 2.2.1.1) befanden sich jeweils vor der Zugabestelle der Ammoniumsulfat- und Hefeextrakt-Lösungen.
Für die Entnahme repräsentativer Proben, die auf Indikatororganismen untersucht werden sollten, wurden nach dem Öffnen der Probenahmestellen jeweils die ersten 2-3 l Ablauf verworfen. Die Proben wurden in sterile Flaschen gefüllt, wobei der Kontakt zum Probenhahn vermieden wurde. Nach der Entnahme wurden die Proben unmittelbar gekühlt (4°C) und spätestens nach 3-4 Stunden verarbeitet.

- **Beprobung der Filtermaterialien**

Nach Beendigung einzelner Versuche wurden Proben der Filtermaterialien entnommen. Es wurden jeweils die Schmutzdecken einschließlich der oberen Filterschicht und die Filterschichten in 5 cm Tiefe beprobt. Vom kommerziell betriebenen RWW-Filter wurden zusätzlich Proben aus 30 cm und 55 cm Tiefe entnommen. In Anlehnung an die DIN 38414 wurden von den entnommenen Filtermaterialien Mischproben hergestellt. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme gekühlt (4°C) und möglichst schnell verarbeitet. Bei den Versuchsfiltern wurde, aufgrund der geringen Oberfläche, die gesamte Schmutzdecke einschließlich der oberen Filterschicht entnommen. Bei den Lysimetern wurde zwischen dem Einlauf-, Mittel- und Randbereich unterschieden. Die Probenahme erfolgte in allen drei Bereichen. Für die Filtermaterialbeprobung des RWW-Filters wurde ein charakteristischer Mittelbereich gewählt.

2.2.2 Mikrobiologische und biochemische Methoden

2.2.2.1 Stammhaltung der Bakterien

- **Institutseigene Stammsammlung**

Die Bakterienstämme der institutseigenen Stammsammlung lagen als Cryo-Dauerkulturen bei –70°C vor. Sie wurden nach den von der DSMZ empfohlenen Bedingungen kultiviert.

- **Klone**

Alle isolierten und als Reinkultur vorliegenden Klone wurden in Dauerkulturen überführt (Lagerung bei –70°C). Dazu wurde von einer Reinkultur eine Kolonie in ampicillinhaltiger (50 µg/ml) Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3 angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Reagenzglasroller inkubiert. Ein Volumen der Übernachtkultur wurde mit einem Volumen sterilen Glycerins vermischt.
Bei Bedarf wurde Material der Dauerkultur entnommen und auf Ampicillin- (50 µg/ml) und XGal-haltigem (80 µg/ml) Nährboden ausgestrichen. Nach 12-24 stündiger Inkubation bei 36°C waren die Kolonien auf diesen Nährböden gut erkennbar und konnten für weitere Untersuchungen verwendet werden.

2.2.2.2 Homogenisieren der Zu- und Abläufe

Die Zu- und Abläufe der Versuchsfilter wurden unter sterilen Bedingungen 2 min bei 9500 rpm mit dem Ultraturax homogenisiert, um Bakterien, die in Flocken und Aggregaten in großer Anzahl vorkamen, zu vereinzeln (DIN 38402-30, 1997).

2.2.2.3 Herstellung von Abschüttelsuspensionen der Filtermaterialien

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl, der Anzahl koloniebildender Einheiten, der Esteraseaktivität sowie dem quantitativen Nachweis von coliformen Bakterien und *E. coli* wurden Abschüttelsuspensionen der Filtermaterialien verwendet. Dazu wurden 10 g bzw. 20 g Filtermaterial mit 100 ml bzw. 200 ml sterilem Wasser über einen Zeitraum von 30 min bei RT geschüttelt (Schüttelwasserbad bei 90%iger Einstellung). Der Überstand wurde nach zweiminütiger Sedimentationszeit in ein steriles Gefäß überführt und für die weiteren Analysen verwendet.
Durch diese Technik werden nicht alle Bakterien von den Filtermaterialien und Biofilmen abgelöst. Durch den Einsatz der standardisierten Methode kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich um einen konstanten Anteil abgelöster Bakterienpopulation handelt.

2.2.2.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)

Ein definiertes Volumen einer geeigneten Verdünnung der Abschüttelsuspension von Filtermaterialien wurde filtriert. Der Polycarbonatfilter wurde mit 1 ml DAPI-Lösung (5 µg/ml) überschichtet und 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DAPI-Lösung entfernt und mit 5 ml partikelfreiem Wasser gespült. Der trockene Filter wurde mikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet. Dazu wurde die Anzahl der Bakterien in 20 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ausgezählt.

2.2.2.5 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

100 µl der Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-5} der Abschüttelsuspensionen wurden auf R2A-Agar als Dreifachbestimmung ausplattiert. Die Agarplatten wurden 7 Tage bei 20°C ± 2°C inkubiert. Nach 7 Tagen wurden alle mit dem bloßen Auge erkennbaren Kolonien ausgezählt. R2A-Agar ist für die Koloniezahlbestimmung heterotropher Bakterien aus Wasser geeignet.

2.2.2.6 Bestimmung der Trockenmassen und Glühverluste

Zur Bestimmung des Wassergehalts und der organischen Masse der Filtermaterialproben wurden die Trockenverluste und Glührückstände der Filtermaterialien entsprechend der DIN EN 12879 und DIN EN 12880 ermittelt. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.2.7 Quantitativer Nachweis von Indikatororganismen durch kulturelle Methoden

In den Zu- und Abläufen der Versuchsfilter wurden die koloniebildenden Einheiten bei 22°C und bei 36°C, *Escherichia coli*, coliforme Bakterien, Enterokokken und *Clostridium perfringens* quantitativ bestimmt.
Die klassisch-mikrobiologischen Nachweisverfahren wurden entsprechend der TrinkwV 2001 von dem Bereich Wasserqualität – Mikrobiologische Analytik des IWW (Mülheim a.d.R.) durchgeführt.

2.2.2.8 Quantitativer Nachweis coliformer Bakterien und *Escherichia coli* in Filtermaterialien

Der quantitative Nachweis coliformer Bakterien und *E. coli* in den Filtermaterialien erfolgte mit Hilfe des Colilert-Systems. Dieses System beruht auf dem Nachweis von ß-Galactosidase als spezifisches Enzym für coliforme Bakterien und dem Nachweis von β-Glucuronidase als spezifischem Enzym für *E. coli*. Die Enzymaktivität und damit das Vorhandensein entsprechender Bakterien kann anhand einer Farbreaktion abgelesen werden. Die Quantifizierung erfolgt nach dem MPN- (most probable number) Verfahren.
Es wurden von jeder Probe drei unterschiedliche Volumina (z.B. 10 ml, 1 ml und 0,1 ml) der Abschüttelsuspensionen auf coliforme Bakterien und *E. coli* untersucht. Das Colilert-System QuantiTray 2000 wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die gelben und die fluo-

reszierenden Kavitäten ausgezählt. Mit Hilfe der entsprechenden MPN-Tabelle wurde die Anzahl der coliformen Bakterien und *E. coli* ermittelt.

2.2.2.9 Identifizierung coliformer Bakterien mittels api® 20E

Aus dem Filtermaterial Kokosfasern und den Abläufen des Kokosfaserlysimeters wurden exemplarisch coliforme Bakterien isoliert und charakterisiert. Dazu wurden aus Kavitäten, die coliforme Bakterien enthielten, 50 µl der Anreicherungskultur entnommen und auf Standard I-Nährагar ausplattiert. Von einigen repräsentativen Kolonien wurden Reinkulturen hergestellt. Diese Reinkulturen wurden, entsprechend der Herstellerangaben, mit dem Identifizierungssystem api® 20E charakterisiert.

2.2.2.10 Bestimmung der Esterase-Aktivität in den Filtermaterialien

Die Methode wurde in Anlegung an Küpper *et al*., 1999 durchgeführt. 18 ml Abschüttelsuspension wurden mit 2 ml 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) und 20 µl Substratlösung (20 mmol Fluoresceindibutyrat in Aceton) versetzt. Der Ansatz wurde 24 h bei RT geschüttelt. Nach Zentrifugation (4 min, 16060 g, RT) erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption bei 490 nm. Da die Abschüttelsuspensionen eine starke Trübung aufwiesen, wurde jeweils ein Ansatz ohne Substratlösung mitgeführt (18 ml Abschüttelsuspension + 2 ml 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5). Zur Ermittlung der nicht-enzymatischen Hydrolyse des Substrats wurden je zwei Ansätze hergestellt, die 18 ml A. dest. mit 2 ml 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) und 20 µl Substratlösung (20 mmol Fluoresceindibutyrat in Aceton) enthielten.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 DNS-Isolierung

- **Isolierung der Gesamt-DNS aus den Filtermaterialien**

Die Isolierung der Gesamt-DNS aus Langsamfiltermaterialien erfolgte durch eine Kombination enzymatischer, chemischer und physikalischer Verfahren, modifiziert nach Tsai und Olson, 1991.
0,3 g Probe wurden mit 480 µl Lysozymlösung (450.000 U Lysozym/ml, gelöst in Extraktionspuffer) und einer Spatelspitzte PVPP vermischt und 1 Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 120 µl 10%igem SDS erfolgte eine Inkubation von 20 min bei 37°C im Schüttelwasserbad. Die Probe wurde danach fünfmal bei –70°C eingefroren und bei +70°C wieder aufgetaut. Nach Zugabe von 3 µl RNase (28,8 mg/ml) folgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad. Die Probe wurde kurz anzentrifugiert und der Überstand zur DNS-Reinigung in das DNeasy Tissue Kit eingesetzt. Das DNeasy Tissue Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die anschließende DNS-Konzentrierung erfolgte durch Ethanolfällung nach Maniatis *et al.*, 1982: Nach Zugabe von zwei Volumen eiskaltem Ethanol (absolut) und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 4,6) wurde die DNS über Nacht bei -20°C gefällt. Die DNS wurde durch Zentrifugation (45 min, 16060 g, 4°C) pelletiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wurde in 30 µl 1x TE-Puffer aufgenommen.

- **DNS-Isolierung aus Reinkulturen**

Die Extraktion der DNS aus Reinkulturen erfolgte nach Anzucht der Stämme entsprechend der DSMZ-Vorgaben. Es wurde die Phenol-Chloroform-Methode nach Ausubel *et al.,* 1990 angewandt.

2.2.3.2 Amplifikation von 16S rRNS-Genen

Mit Hilfe der PCR wurden spezifische Abschnitte der 16S rDNS von Mikroorganismen aus den Filtermaterialien sowie von Referenzstämmen (Tab. 2.1) amplifiziert.
Um in den PCR-Ansätzen, die parallel bearbeitet wurden, möglichst identische und definierte Bedingungen zu erhalten, wurden die Ansätze vor jeder PCR in Form eines Mastermixes hergestellt und anschließend in definierten Mengen auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt.

PCR-Ansatz:

PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (2mM)	5 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
DNS-Template	0,1 – 10 µl
H_2O (für Molekularbiologie)	ad 50 µl

Wurde isolierte Gesamt-DNS aus Filtermaterialproben als Template verwendet, enthielt der PCR-Ansatzt zusätzlich 10 µl TaqMaster.

Um Verunreinigungen des Pipettenkolbens durch Aerosole zu vermeiden, wurden für alle PCR-Ansätze Einmalspitzen mit Filtereinsätzen verwendet. In jedem PCR-Experiment wurde eine Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne DNS) mitgeführt, um mögliche Verunreinigungen in den Komponenten der PCR-Ansätze zu detektieren. Zusätzlich wurde jeweils eine Positivkontrolle (PCR-Ansatz mit isolierter *E. coli*-DNS) mitgeführt, um Hinweise auf eventuell PCR-untaugliche Chemikalien bzw. auf nicht richtig eingestellte Bedingungen zu erhalten.

Es wurde eine „touch-down“-PCR durchgeführt (Temperaturprofil s. Tab. 2.16). Bei einer „touch-down“-PCR wird in den Zyklen 2 bis 11 die Annealingtemperatur um 1°C pro Zyklus gesenkt. Durch die hohe Annealingtemperatur in den ersten Zyklen ist die Wahrscheinlichkeit, dass Fehlbindungen der Primer auftreten, ge-

ring. Dadurch werden insgesamt wenige unspezifische Amplifikate gebildet und die Spezifität der PCR erhöht.

Tabelle 2.16: Temperaturprofil der „touch-down“-PCR

Zyklus	1.	2.-11.	12.-30.	31.
Denaturierung	94°C, 60 s	94°C, 60 s	94°C, 60 s	
Annealing		65°C – 56°C, 60 s	55°C, 60 s	
Extension		72°C, 90 s	72°C, 90 s	72°C, 7 min

2-10 µl der PCR-Produkte und 5 µl Smart Ladder wurden in einem 1,6 % Agarosegel aufgetrennt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen.

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden Horizontalapparaturen zur Gelelektrophorese verwendet. Der Agaroseanteil der Gele betrug 1,6% - 2%. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 0,5x TAE-Puffer bzw. 1x TBE-Puffer gelöst und 0,3 µg Ethidiumbromid/ml zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in DNS-Doppelstränge, wodurch diese unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbar werden.
Das polymerisierte Gel wurde mit 0,5x TAE-Puffer bzw. 1x TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Beschwererlösung versetzt und aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde eine Spannung von 40 Volt angelegt, die später auf 60-80 Volt erhöht wurde. Nach beendeter Elektrophorese wurden die DNS-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.3.4 Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Wizard® PCR Preps DNA Purification Kit nach Herstellerangaben.
Zur Konzentrationsabschätzung wurden 2-5 µl des aufgereinigten PCR-Produkts zusammen mit 5 µl Smart-Ladder in einem 1,6 % Agarosegel aufgetragen.

2.2.3.5 Konstruktion von 16S-Clone Libraries

Die 16S-PCR-Produkte der Langsamfiltermaterialien wurden unmittelbar nach der PCR unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit dem pCR 2.1-TOPO-Vektor ligiert. Die Ligationsansätze enthielten 0,5 bis 1,5 µl PCR-Produkt und wurden für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Ligation folgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen. Die Zellen wurden nach einstündiger Vorinkubation bei 37°C im SOC-Medium auf einem Selektionsmedium ausplattiert und 18-24 h bei 37°C inkubiert. Als Selektionsmedium wurde ein Nähragar, der Ampicillin (50 µg/ml) und X-Gal (80 µg/ml) enthielt, gewählt. Das Ampicillin ermöglichte nur den Zellen ein Wachstum, die den Vektor, der ein Ampicillin-Resistenz-Gen trägt, aufgenommen hatten. X-Gal diente dem Blau-Weis-Screening. Weiße Kolonien auf dem Selektivagar gehen demnach auf *E. coli*-Zellen zurück, die einen Vektor mit Insert aufgenommen haben. 60-125 solcher weißen, einzeln liegenden Kolonien wurden für die ARDR-Analysen weiter bearbeitet.

- **Nomenklatur der Klone**

Die isolierten Klone wurden nummeriert (von 1 bis 125). Diese Klonnummer wurde an die Bezeichnung der Clone Library angehängt (z.B. 1.a.1 = Klone 1 der Library 1.a). Das Material aller untersuchten Filter war Sand.

Tabelle 2.17: Bezeichnungen der Clone Libraries

Bezeichnung	beprobte Schicht	Betriebsweise	Wassertemperatur	Zulauf
1.a	Schmutzdecke	kontinuierlich	5-10°C	modifiziertes Oberflächenwasser der Ruhr bei Schwerte
1.b			20°C	
1.c			30°C	
3.a	Schmutzdecke	kontinuierlich	7-17°C	Oberflächenwasser der Ruhr bei Mülheim

2.2.3.6 Plasmidpräparation

3 ml flüssige Übernachtkultur einer Klon-Reinkultur wurden zur Pelletierung der Zellen zentrifugiert (2 min, 16060 g, RT). Die Isolierung der Plasmide wurde mithilfe des Nucleospin Multi-8 Plasmid Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden bei 4°C gelagert.

Um zu prüfen, ob das isolierte Plasmid das richtige Insert enthält, wurde ein *Eco*-RI-Verdau durchgeführt. Der Restriktionsansatz enthielt 1 µl isoliertes Plasmid, 10 U *Eco*RI, 1 µl SL-Puffer und ad. 10 µl H_2O. Der Ansatz wurde 2 ½ h bei 37°C inkubiert. Der gesamte Restriktionsansatz wurde zusammen mit 5 µl Smart-Ladder in einem 1,6 % Agarosegel aufgetragen.

Um ausreichend 16S rDNS-Material für die ARDR-Analyse zur Verfügung zu haben, wurde das 16S-Insert mittels PCR amplifiziert (s. 2.2.3.2) und das PCR-Produkt gereinigt (s. 2.2.3.4).

2.2.3.7 Amplifizierte 16S rDNS-Restriktionsanalyse (ARDRA)

ARDRA ist eine Methode zur Untersuchung des phylogenetischen Verhältnis verschiedener, unbekannter Bakterienstämme. Die Methode beruht darauf, dass Bakterien, die phylogenetisch miteinander verwandt sind, sehr ähnliche 16S-Sequenzen aufweisen. Die 16S-Gene der zu untersuchenden Stämme werden mit Restriktionsenzymen verdaut, die eine spezifische Abfolge von 4-6 Basen innerhalb der DNS erkennen und an diesen Stellen die DNS schneiden. Verdaut man die 16S-Gene phylogenetisch nah verwandter Stämme mit Restriktionsenzymen, erhält man ähnliche Bandenmuster. Je geringer der phylogenetische Verwandtschaftsgrad zweier Bakterienstämme ist, um so unterschiedlicher sind die Bandenmuster der mit Restriktionsenzymen geschnittenen 16S-Gene.
Die gereinigten 16S-PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsendonukleasen verdaut. Ein Restriktionsverdau enthielt 8 µl PCR-Produkt, 8 U Enzym, 2 µl Enzym-spezifischen Puffer und wurde auf ad. 20 µl H_2O aufgefüllt. Der Ansatz für

*Sau3*AI enthielt zusätzlich 2 mg BSA. Der Restriktionsansatz wurde 3-18 h bei 37°C inkubiert.
Die Restriktionsprodukte wurden elektrophoretisch in einem 2%igen Metaphor Agarose-Gel (gelöst in 1x TBE-Puffer) getrennt.

2.2.3.8 Ähnlichkeitindizes der Clone Libraries

Die ARDRA-Daten von je zwei Libraries wurden miteinander verglichen und auf Ähnlichkeiten untersucht. Es wurde zwischen identischen Klonen (Ähnlichkeit ≥ 95%), gemeinsamen Gruppen (≥ 80%) und gemeinsamen Cluster (≥ 60%) der beiden Libraries unterschieden. Die Anzahl der Gemeinsamkeiten ging in einen Ähnlichkeitsindex ein, wobei für die Gemeinsamkeiten entsprechend des Ähnlichkeitsgrades Gewichtungen vergeben wurden. Identischen Klongruppen wurde eine Gewichtung von 5 zugewiesen, gemeinsamen Gruppen eine Gewichtung von 3 und gemeinsamen Clustern eine Gewichtung von 1.

Ähnlichkeitsindex = (Anzahl identischen Klongruppen x 5)+ (Anzahl der ähnlichen Klongruppen x 3) + (Anzahl der gemeinsamen Cluster x 1)

2.2.3.9 DNS-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur DNS-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.*, 1977. Dabei wurde der zu sequenzierende DNS-Abschnitt *in vitro* durch eine PCR-Reaktion, das Cycle Sequencing, vervielfältigt. Neben dem DNS-Template, der DNS-Polymerase, einem geeigneten Primer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) enthielt der PCR-Ansatz als zusätzliche Komponente 2´,3´-Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs). Diese sind, wegen des Fehlens der OH-Gruppe am C_3-Atom, nicht in der Lage eine Phosphodiesterbindung auszubilden, so dass ihr Einbau zum Kettenabbruch führt. Da dieser Syntheseabbruch statistisch auftritt, kommt es zur Bildung von DNS-Fragmenten aller möglichen Kettenlängen mit durch den Primer definiertem 5´ Ende.

Im Folgenden wurden die DNS-Fragmente in einer Kapillare aufgetrennt. Die ddNTPs waren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und konnten mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Aus der Abfolge der auftretenden basenspezifischen Farbsignale ergab sich die Basensequenz der untersuchten DNS-Probe. Die Umsetzung der Farbsignale in die Sequenz erfolgte mit Hilfe eines Computers (Power MAC G3) und der entsprechenden Software (Sequence Analysis).

Reaktionsansatz für das Cycle Sequencing:

Ready Reaction Mix	3 µl
DNS-Template (aufgereinigetes PCR-Produkt)	10-100 ng
Primer 27F (10 pmol/µl)	1 µl
H_2O	ad 20 µl

Das Temperaturprofil des Cycle Sequencing ist in Tabelle 2.18 dargestellt.

Tabelle 2.18: Temperaturprofil des Cycle Sequencing

Zyklus	1.	2.-25.
Denaturierung	96°C, 2 min	96°C, 30 s
Annealing		58°C, 15 s
Extension		60°C, 4 min

Zur Reinigung der Proben wurde eine Ethanol Fällung durchgeführt. Zu dem Ansatz wurden 80 µl H_2O, 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,6) und 250 µl Ethanol absolut gegeben. Darauf folgte eine erste dreiminütige Zentrifugation (16060 g, RT). Das Pellet wurde mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 16060 g, RT) und danach mindestens 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Die getrockneten Proben wurden an der Universität Hamburg, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie nach Aufnahme in 20 µl Template Suppression Reagent auf die Kapillare des Sequenzers aufgetragen.

2.2.3.10 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

- **Fixierung**

Die Fixierung der zu untersuchenden Proben erfolgte mit 4%igem Paraformaldehyd nach Amman, 1995. Dazu wurde ein Volumen Flüssigkultur oder Filtermaterial mit drei Volumen 4%igem Paraformaldehyd fixiert und für 3-4 h bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 6082 g, 4°C) und mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden in einem Volumen PBS und einem Volumen eiskaltem absolutem Ethanol aufgenommen und bei –20°C gelagert.

- **Hybridisierung**

Für die Populationsanalysen mittels der phylogenetischen Sonden EUB338, NONEUB, ALF968, BET42a und GAM42a wurden fixierte Filtermaterialien eingesetzt. Von den direkt fixierten Filtermaterialien wurden die Bakterien durch Vortexen (30 sec bei maximaler Einstellung) abgelöst. Es wurde jeweils Probenmaterial aus drei Fixierungsansätzen untersucht.
Wie bei Manz *et al.*, 1994 beschrieben, wurde die Hybridisierungsreaktion in einer feuchten Kammer bei 46°C für mindestens 90 min durchgeführt. Der Hybridisierungspuffer setzte sich aus 5 ng/µl Oligonukleotidsonde, 0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8) und 20% Formamid (ALF 968, EUB338, NONEUB) bzw. 35% Formamid (BET42a, GAM42a, EUB338) zusammen. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Proben für 10 min bei 46°C in einem Puffer gewaschen, der 88 mM NaCl (ALF 968, EUB338, NONEUB) bzw. 250 mM NaCl (BET42a, GAM42a, EUB338) und 20 mM Tris/HCl (pH 8) enthielt. Die Bakterien wurden abschließend mit DAPI (1 µg/ml) gefärbt, getrocknet und in Citifluor AF2 zur Signalverstärkung und –stabilisierung für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet.

Zur Untersuchung des Anteils Bakterien, die mit der Eubakteriensonde EUB338 hybridisieren, wurden die Bakterien von den fixierten Filtermaterialproben durch Vortexen (30 sec bei maximaler Einstellung) und anschließender Ultraschallbehandlung (20 sec, 50 Hz) einer entsprechenden Verdünnungsstufe abgelöst (mo-

difiziert nach Pernthaler *et al.,* 2001). Diese Verdünnungsstufe wurde über einen Polycarbonatfilter filtriert. Es wurde jeweils Probenmaterial aus drei Fixierungsansätzen untersucht.

Die Hybridisierungsreaktion wurde ebenfalls in einer feuchten Kammer bei 46°C für mindestens 90 min durchgeführt. Der Hybridisierungspuffer setzte sich aus 5 ng/µl Oligonukleotidsonde, 0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8), 0,01% SDS und 20% Formamid zusammen. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Filter für 15 min bei 46°C in einem Puffer gewaschen, der 70 mM NaCl und 20 mM Tris/HCl (pH 8), 5 mM EDTA und 0,01% SDS enthielt. Die Bakterien wurden abschließend mit DAPI (1 µg/ml) gefärbt, die Filter getrocknet und in Citifluor eingebettet.

2.2.3.11 Catalysed reporter deposition (CARD) -FISH

Die Eignung der modifizierten FISH-Methode, CARD-FISH, wurde für die Probenmatrix der Filtermaterialien getestet.

Die zu untersuchenden Proben, Reinkulturen von Referenzstämmen und Abschüttelsuspensionen von Filtermaterialien, wurden über Polycarbonatfilter filtriert. Der Filter wurden in Agarose eingebettet. Die Permeabilisierung erfolgte mittels einer einstündigen Lysozymbehandlung (500.000 U Lysozym/ml) bei 37°C. Mittels Achromopeptidase (60 U Achromopeptidase/l) und 0,01 M HCl wurden endogene Peroxidasen inaktiviert. Zur Hybridisierung wurden die Filter in Hybridisierungspuffer überführt und 2 h bei 36°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Hybridisierungspuffer enthielt 0,5 ng/µl Oligonukleotidsonde (HRP markiert), 0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10% (w/v) Dextransulfat, 1/10 Volumen 10%iges Blockingreagenzlösung und 35% Formamid. Das Waschen wurde für 10 min bei 36°C in einem Puffer durchgeführt, der sich zusammensetzte aus 64 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA und 0,01% SDS. Die Amplifikation des Tyramidsignals erfolgte durch die Inkubation des Filters für 10 min bei 36°C in einem Amplifikationspuffer. Der Amplifikationspuffer enthielt 1% CY3 Tyramidlösung, 0,015% H_2O_2, 2 M NaCl, 10% (w/v) Dextransulfat und 1/100 Volumen 10%iger Blocking-reagenzlösung in PBS. Die Bakterienzellen wurden mit DAPI (1 µg/ml) gefärbt und die trockenen Filter in Citifluor AF2 eingebettet.

2.2.3.12 Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung (FMH)

Die FMH-Methode wurde zum Nachweis der Indikatororganismen *Enterobacteriaceae*, *E. coli* und Enterokokken in Filterzuläufen und -abläufen angewandt. Sie wurde für die vorliegende Probenmatrix modifiziert nach Ootsubu *et al.,* 2003 eingesetzt.

In einem ersten Schritt erfolgte die Konzentrierung der Indikatororganismen durch Filtration mit anschließender Mikrokoloniebildung unter ggf. selektiven Bedingungen. Für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* war eine vierstündige Inkubation bei 37°C auf Standard I-Nähragar ausreichend. Dagegen musste für den Nachweis von *E. coli* ein größeres Probenvolumen filtriert und selektive Bedingungen durch eine erhöhte Inkubationstemperatur, 44°C für 4 h, geschaffen werden. Für die Mikrokoloniebildung der Enterokokken und *E. faecalis* wurde das Selektivnährmedium Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar ausgewählt. Die filtrierten Proben wurden auf diesem Nährmedium 16 h bei 36°C inkubiert. Die Zellen der Mikrokolonien wurden durch eine Ethanol-Behandlung permeabilisiert und durch Hitze (20 min bei 80°C) fixiert. Die Hybridisierungsreaktion wurde in einer feuchten Kammer bei 46°C für mindestens 90 min durchgeführt. Der Hybridisierungspuffer setzte sich aus 5 ng/µl Oligonukleotidsonde, 0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8), 0,01% SDS und 35% Formamid zusammen. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Filter für 5 Min bei 48°C in einem Puffer gewaschen, der 80 mM NaCl und 20 mM Tris/HCl (pH 8), 5 mM EDTA und 0,01% SDS enthielt. Die Bakterien wurden abschließend mit DAPI (1 µg/ml) gefärbt und die getrockneten Filter in Citifluor AF2 eingebettet.

3. Ergebnisse

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an Versuchsfiltern durchgeführt. Die Versuchsfilter wurden unter Rahmenbedingungen betrieben, die als grenzwertig für den Betrieb von Langsamsandfiltern bekannt sind (Visscher, 1990; Collins *et al*., 1991). Zu diesen grenzwertigen Betriebsbedingungen der Versuchsfilter zählten hohe DOC-Gehalte (≥ 5 mg/l), erhöhte Ammoniumgehalte (≥ 1 mg/l) und Temperaturen von 20-30°C der Filterzuläufe. Die erhöhten DOC-Gehalte und Temperaturen bilden die Grundlage für eine erhöhte Bakterien- und Algenproduktivität, die in Langsamsandfiltern u.a. aufgrund der schnelleren Kolmation der Filter nicht gewünscht ist. Der erhöhte Ammoniumgehalt des Zulaufs diente der Förderung der Nitrifikation in den Versuchsfiltern. Neben dem Standardmaterial Sand (Körnung 0,2–2 mm) sollten Glasgranulat (Körnung 0,2-5 mm) und Kokosfasern auf ihre Eignung als alternative Filtermaterialien für die Langsamsandfiltration geprüft werden. Die Leistungen dieser Versuchsfilter, die mikrobiologische Qualität des Wassers während der Filterpassage zu verbessern, sowie die mikrobielle Populationsstruktur der Langsamsandfilter-Biofilme wurde unter den veränderten Rahmenbedingungen untersucht. Die mikrobiellen Populationen der Versuchsfilter sollten mit der Population eines kommerziell betriebenen Langsamsandfilters verglichen werden.

3.1 Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen durch Langsamsandfilter

3.1.1 Rückhalteleistungen von Langsamsandfiltern unter extremen Rahmenbedingungen

Die Ausbreitung von Krankheitserregern über den Fäkaloralen-Kreislauf kann nur durch hygienisch einwandfreies Trinkwasser unterbunden werden. Fäkale Verunreinigungen in Trinkwässern werden anhand von Indikatororganismen nachgewiesen. Wichtige Indikatoren für fäkale Verunreinigungen nach der Trinkwasserverordnung 2001 sind *Escherichia coli*, coliforme Bakterien, Enterokokken und *Clostridium perfringens.* Die routinemäßige Analyse der

koloniebildenden Einheiten bei 22°C und bei 36°C dient der Detektion anormaler Veränderungen der allgemeinen bakteriellen Belastung. Die Bakterien, die bei 22°C zur Koloniebildung fähig sind, gehören unter gemäßigten Klimabedingungen der natürlichen, so genannten autochthonen Bakterienpopulation an. Bei 36°C vermehren sich dagegen hauptsächlich hygienisch relevante Bakterien, die im Trinkwasser und Filterbett unerwünscht sind und als allochthon bezeichnet werden.
Die Menge der Indikatororganismen in den Zu- und Abläufen der Versuchsfilter wurde in regelmäßigen Abständen während der gesamten Laufzeiten bestimmt. Die angewendeten Verfahren zum Nachweis der Indikatororganismen entsprechen der Trinkwasserverordnung 2001; sie beruhen auf klassisch-kulturellen Methoden.

- **Rückhalteleistungen alternativer Filtermaterialien bei verschiedenen Temperaturen**

Das Hauptziel der Langsamsandfiltration ist die Entfernung hygienisch relevanter Mikroorganismen aus dem Zulauf. Filter, die unter gemäßigten klimatischen Bedingungen und mit optimalen Sanden als Filtermaterialien betrieben werden, können maximale Rückhalteleistungen von 2 log-Stufen für Phagen/Viren, 4 log-Stufen für coliforme Bakterien und 6 log-Stufen für die Dauerformen pathogener Protozoen erzielen (s. Tab. 1.2, S. 8).
Um die Effektivität der Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen durch Langsamsandfilter mit alternativen Filtermaterialien zu untersuchen, wurden Indikatororganismen in den Zu- und Abläufen entsprechender Versuchsfilter quantitativ bestimmt. Als alternative Filtermaterialien wurden Glasgranulat und Kokosfasern untersucht, welche sich bereits in ersten Versuchen als geeignet erwiesen hatten (Frankel, 1981; CWC Cleaning Washinton Center, 1995; CWC Cleaning Washington Center, 1998; Mughal, 2000). Neben den Filtermaterialien war der Einfluss der Temperatur als eine entscheidende klimatische Rahmenbedingung auf die Filterbiozönose und deren Auswirkung auf die Rückhalteleistungen von Interesse.
Die Einsatzfähigkeit von Glasgranulat und Kokosfasern als alternative Filtermaterialien wurde im Vergleich zu Sand in Versuchsfiltern untersucht. Als Zulauf dieser Versuchsfilter wurde das Oberflächenwasser der Ruhr bei Schwerte gewählt.

Um den DOC- und Ammonium-Gehalt dieses Wassers auf 5 mg/l bzw. 0,2-2 mg/l Endkonzentration zu erhöhen, wurden in den Überstau der Filter Hefeextrakt- und Ammoniumsulfat-Lösungen dosiert.

In einem Vorversuch wurde Glasgranulat parallel zu dem Referenzmaterial Sand in Hauptfiltern getestet. Diese Filter wurden mit über Kies vorfiltriertem Oberflächenwasser der Ruhr beaufschlagt. Das Filtermaterial Kokosfasern wurde in diesem Versuch in Form eines Vorfilters verwendet. Der Vorfilter hatte die gleiche Mächtigkeit (50 cm) wie der Hauptfilter, wurde aber direkt mit dem Oberflächenwasser der Ruhr beschickt.
Die Luft- und Wassertemperatur im Vorversuch betrug 5-10°C, einem Temperaturbereich, bei dem die Filterleistungen bekannt sind (s. Kapitel 1.1.3.1, S. 7f.).
Durch die Vorfiltration wurde die Anzahl der Indikatororganismen um 1-3 log-Stufen verringert. Die Rückhalteleistung der Kokosfasern für hygienisch relevante Bakterien entsprach mindestens der Rückhalteleistung des klassischen Vorfiltermaterials Kies.
Aufgrund der guten Rückhalteleistungen der Vorfilter waren im Zulauf der Hauptfilter die Mengen an Indikatororganismen sehr gering (0-50 MPN/100 ml bzw. KBE/100 ml für *E. coli*, coliformen Bakterien, Enterokokken und *C. perfringens*). Diese geringen Mengen hygienisch relevanter Mikroorganismen wurden - mit einer Ausnahme der coliformen Bakterien – vom Glasgranulat- und Sandfilter während der gesamten Laufzeit vollständig entfernt. Die Anzahl der autochthonen Bakterien (KBE bei 22°C) wurde durch die Filter kaum bis gar nicht verringert. Dagegen wurden allochthone Bakterien (KBE bei 36°C) um bis zu zwei log-Stufen zurückgehalten.

In den Hauptversuchen wurden die Filter bei einer Luft- und Wassertemperaturen von 20°C und 30°C betrieben. Als Zulauf wurde nicht-vorfiltriertes Oberflächenwasser der Ruhr beaufschlagt, um die Anzahl der Indikatororganismen im Zulauf zu erhöhen. In diesen Versuchsläufen wurden Glasgranulat, Kokosfasern und das Referenzmaterial Sand in parallel betriebenen Filtern untersucht.

Die Mengen der Indikatororganismen in den Zu- und Abläufen der Versuchsfilter, die bei 20°C Luft- und Wassertemperatur betrieben wurden, sind in Abbildung 3.1 graphisch dargestellt.

Die Sand- und Glasgranulatfilter hielten den Indikatororganismus *E. coli* mit gleicher Effektivität zurück. Nach vierwöchiger Laufzeit erreichten diese Filter ihre maximale Rückhalteleistung (2 log-Stufen) für *E. coli*. Im Filtrat des Kokosfaserfilters war die Anzahl der *E. coli* in den ersten beiden Betriebswochen höher als im Zulauf. Dies deutet darauf hin, dass in den Kokosfasern bereits vor Versuchsbeginn *E. coli* vorhanden waren, die bei Inbetriebnahme der Filter mit dem Filtrat ausgespült wurden. In den verbleibenden zwei Betriebswochen dieses Versuches erreichte der Kokosfaserfilter Rückhalteleistungen für *E. coli*, die denen der Sand- und Glasgranulatfilter entsprachen.

Alle drei Filter hielten coliforme Bakterien während der gesamten Filterlaufzeiten schlecht bis gar nicht zurück, teilweise wurden coliforme Bakterien sogar aus den Filtern ausgetragen. Die standortfremden, nicht erwünschten, sogenannten allochthonen Bakterien, die über den Parameter der KBE bei 36°C bestimmt werden, wurden während der gesamten Betriebszeit aus den Filtern ausgetragen. Die Austragung nahm mit ansteigender Betriebsdauer der Filter ab.

Durch die Glasgranulat- und Sandfilter wurden alle im Zulauf enthaltenen Enterokokken entfernt (max. 2 log-Stufen). In den ersten beiden Betriebswochen waren keine Enterokokken im Zulauf nachweisbar, so dass eine Rückhaltleistung nicht bestimmt werden konnte. Der Kokosfaserfilter spülte Enterokokken über die gesamte Filterlaufzeit aus.

Die Rückhaltung des Indikatororganismus *C. perfringens* war für alle drei Filtermaterialien gleich. Die im Zulauf enthaltenen *C. perfringens* wurden – mit Ausnahme des ersten Betriebstages – durch alle drei Filter zurückgehalten; dies entspricht einer maximalen Rückhaltung von 2,3 log-Stufen.

Die Anzahl der autochthonen Bakterien (KBE bei 22°C) war in den ersten beiden Betriebswochen der drei Filter in den Abläufen höher als in den Zuläufen. In den folgenden Betriebswochen lag die Rückhaltung dieses Parameters bei 0-2 log-Stufen.

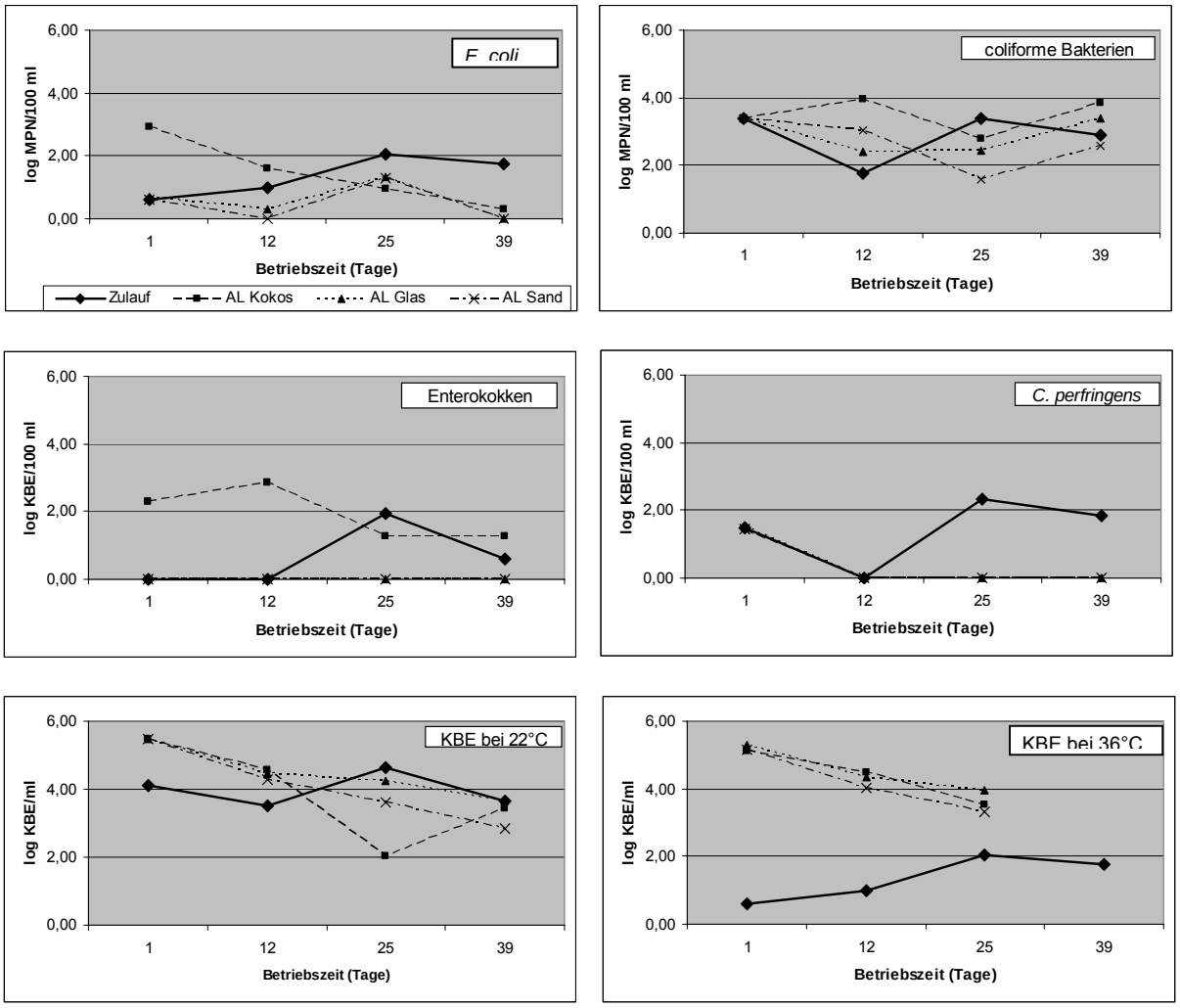


Abbildung 3.1: Anzahl der Indikatororganismen in den Zu- und Abläufen (AL: Ablauf) der Versuchsfilter zur Untersuchung verschiedener Filtermaterialien bei einer Luft- und Wassertemperatur von 20°C.

Die Rückhalteleistungen der Versuchsfilter, die bei 30°C Luft- und Wassertemperatur betrieben wurden, können der Abbildung 3.2 entnommen werden: In der ersten Betriebswoche wurde *E. coli* analog zu dem Versuchslauf bei 20°C aus dem Kokosfaserfilter ausgetragen. Der Sandfilter hielt *E. coli* am ersten Betriebstag ebenfalls noch nicht zurück, während der Glasgranulatfilter unmittelbar nach Inbetriebnahme schon fast alle *E. coli* aus dem Zulauf entfernte. Ab der zweiten Betriebswoche hielten alle drei Filter die im Zulauf enthaltenen *E. coli* zurück. Dies entspricht einer maximalen Rückhaltung von 3 log-Stufen.

Coliforme Bakterien wurden aus allen drei Filtern über die gesamte Versuchszeit ausgetragen.

Die Glasgranulat- und Sandfilter entfernten vom ersten Betriebstag an alle im Zulauf enthaltenen Enterokokken. Die entsprechende maximale Rückhalteleistung betrug 3 log-Stufen. Der Kokosfaserfilter hielt nur in den ersten beiden Betriebswochen, ebenso wie die beiden anderen Filter, alle im Zulauf enthaltenen Enterokokken zurück. Danach akkumulierten die Enterokokken in den Kokosfaserfiltern und wurden zeitweise ausgetragen.
Die im Zulauf enthaltenen *C. perfringens* wurden – mit Ausnahme des ersten Betriebstages – durch alle drei Filter vollständig entfernt (maximale Rückhalteleistung 1,5 log-Stufen).
Keine bzw. eine sehr geringe Rückhaltung wiesen alle drei Filter über die gesamten Filterlaufzeiten für die autochthonen und allochthonen Bakterien (KBE bei 22°C und 36°C) auf.

Die maximalen Rückhalteleistungen hygienisch relevanter Indikatororganismen, die in den Versuchsfiltern zur Untersuchung alternativer Filtermaterialien bei verschiedenen Betriebstemperaturen erzielt wurden, sind in der Tabelle 3.1 zusammengestellt. Die ermittelten maximalen Rückhalteleistungen beruhen meist auf der vollständigen Entfernung aller im Zulauf enthaltenen Indikatororganismen. In diesen Fällen ist es wahrscheinlich, dass die Versuchsfilter mehr Indikatororganismen zurückgehalten hätten, wenn diese im Zulauf enthalten gewesen wären. Um dies deutlich zu machen, wurden entsprechende maximale Rückhalteleistungen mit dem Größer-Gleich-Zeichen (≥) versehen.
Die maximalen Rückhalteleistungen der alternativen Filtermaterialien entsprechen in der Regel denen des Standardfiltermaterials Sand. Daher wurden die Filtermaterialien bei dem Vergleich der maximalen Rückhalteleistungen nicht beachtet.
Die maximalen Rückhalteleistungen von coliformen und allochthonen Bakterien (KBE bei 36°C) betrugen bei einer Betriebstemperatur von 5-10°C ≥ 1-2 log-Stufen. Bei höheren Betriebstemperaturen (20°C und 30°C) lag die maximale Rückhaltung dieser Indikatororganismen zwischen 1 und -2 log-Stufen, was einer geringen bis keiner Rückhaltung bzw. einer Austragung aus dem Filter während der gesamten Laufzeit entspricht. Für die anderen Indikatororganismen scheint die Rückhaltung bei allen untersuchten Temperaturen gleich effektiv zu sein.

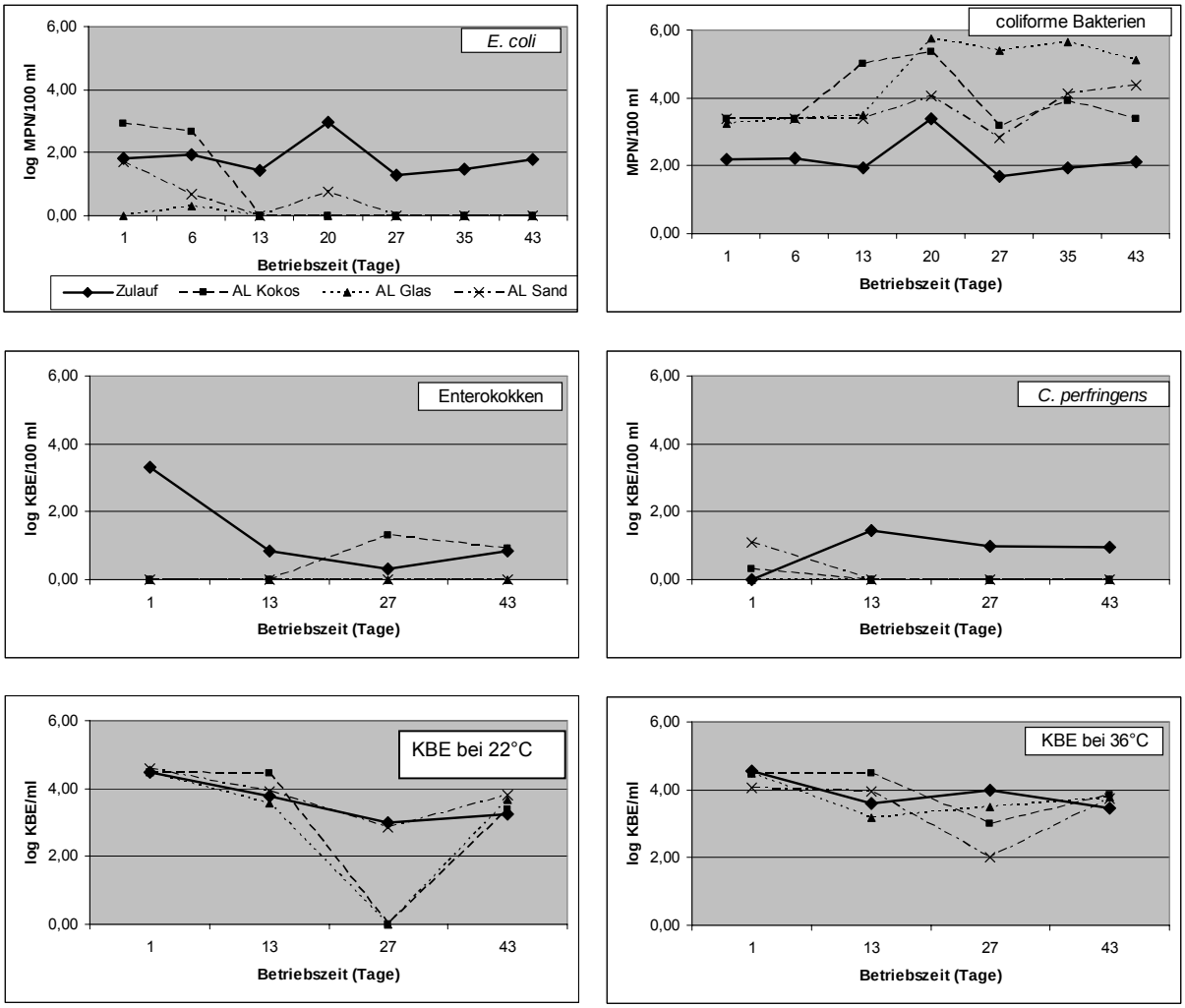


Abbildung 3.2: Anzahl der Indikatororganismen in den Zu- und Abläufen (AL: Ablauf) der Versuchsfilter zur Untersuchung alternativer Filtermaterialien bei einer Luft- und Wassertemperatur von 30°C.

Tabelle 3.1: Maximale Rückhalteleistungen (in log-Stufen) der Versuchsfilter bei verschiedenen Luft- und Wassertemperaturen

Parameter	5-10°C	20°C	30°C
E. coli	≥ 0,7	≥ 1,5	≥ 3
coliforme Bakterien	≥ 1	1	-2
Enterokokken	≥ 0	≥ 2	≥ 3
C. perfringens	≥ 1,7	≥ 2,3	≥ 1,5
KBE (22°C)	1	1	0
KBE (36°C)	2	-1	0

- **Rückhalteleistungen alternativer Filtermaterialien im kleintechnischen Maßstab bei einer Wassertemperatur von 30°C**

An die Untersuchung der alternativen Filtermaterialien im Labormaßstab schloss sich die Untersuchung im kleintechnischen Maßstab an. Dazu wurden Lysimeter mit Glasgranulat und Kokosfasern parallel zu einem Sand-Lysimeter betrieben. Als Betriebstemperatur der Lysimeter wurde 30°C gewählt, weil sich diese Temperatur für die Rückhaltung coliformer und allochthoner Bakterien im Labormaßstab als kritisch erwiesen hatte. Die Lysimeter wurden im Freiland betrieben, wodurch nur die Wasser-, nicht aber die Lufttemperatur beeinflusst werden konnte. Oberflächenwasser der Ruhr, dessen DOC- und Ammonium-Gehalt analog zu den Versuchsfiltern künstlich erhöht wurde, diente als Zulauf der Lysimeter. Die drei Lysimeter wurden von Anfang Juni 2004 bis Mitte September 2004 betrieben. In dieser dreieinhalbmonatigen Versuchszeit wurden die kontinuierliche und intermittierende Betriebsweise in je zwei vierwöchigen Phasen getestet (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Betriebsparameter der Lysimeter in den vier Versuchsphasen

Phase	Betriebs-Weise	Filtergeschwindig-keit [m/d]	Betriebstage pro Woche
I	kontinuierlich	2,2	7
II	intermittierend	2,2	4
III	intermittierend	3,8	4
IV	kontinuierlich	1,0	7

Die Lysimeter wurden in der ersten und vierten Versuchsphase kontinuierlich betrieben. Während der gesamten ersten Phase waren die Rückhaltungen aller untersuchten Indikatororganismen für die drei Lysimeter sehr schwankend. Schwankungen der Rückhaltung aufgrund von Einarbeitung lassen für die gesamte erste Versuchsphase keine Schlüsse auf die Rückhalteleistung während des kontinuierlichen Betriebes zu.

In der vierten Versuchsphase wurden die Lysimeter ebenfalls kontinuierlich betrieben, allerdings mit einer geringeren Filtergeschwindigkeit als in der ersten Versuchsphase. Wegen zu hoher Druckverluste und anaerober Verhältnisse im Filtrat, musste der Kokosfaserfilter bereits am zehnten Betriebstag dieser

Versuchsphase geschält werden. Direkt nach Abschluss des Schälvorganges wurde der Filter wieder in Betrieb genommen.
Die Rückhalteleistungen aller drei Lysimeter waren zu Beginn (erster Betriebstag) der vierten Versuchsphase für die Parameter *E. coli*, Enterokokken und *C. perfringens* sehr gering (0,5-1 log-Stufen; Abb. 3.3). Bei den Filtermaterialien Glasgranulat und Sand war über die gesamte Laufzeit eine kontinuierliche Steigerung der Rückhaltleistung für *E. coli* zu beobachten. Die maximale Rückhaltung wurde hier nach dreiwöchiger Betriebszeit erreicht und entsprach mit 3 log-Stufen der Menge *E. coli*, die im Zulauf enthalten waren. Der Kokosfaserfilter erreichte diese maximale Rückhalteleistung bereits nach zweiwöchiger Betriebszeit und damit unmittelbar nach dem Schälen des Filters. Enterokokken wurden nach einer Betriebswoche durch die Filtermaterialien Glasgranulat und Sand vollständig aus dem Zulauf entfernt (maximale Rückhaltung 2 log-Stufen), während dies für das Material Kokosfasern erst nach zweiwöchiger Filterlaufzeit der Fall war. Die maximale Rückhalteleistung für *C. perfringens* wurde bei allen drei Filtermaterialien nach einer Woche erreicht (maximale Rückhaltung 2,3 log-Stufen).
Coliforme Bakterien wurden von allen drei Filtermaterialien in den ersten beiden Betriebswochen sehr schlecht bis gar nicht zurückgehalten. Am letzten Betriebstag wies Sand die beste Rückhalteleistung (3 log-Stufen) und Glasgranulat die schlechteste Rückhalteleistung (0,5 log-Stufen) für coliforme Bakterien auf.
Die Anzahl der autochthonen und allochthonen Bakterien (KBE bei 22°C und 36°C) wurde durch die Lysimeter gar nicht bis wenig verringert.

In zwei Versuchsphasen (Phase 2 und 3) wurden die Lysimeter bei unterschiedlichen Filtergeschwindigkeiten intermittierend betrieben (jeweils vier Tage Beschickung und drei Tage Pause im Wechsel). Während der Beschickungspause der intermittierenden Betriebsweise fällt der Filter trocken, was zum Aufreißen der Schmutzdecke führt. Der Anstieg des Druckverlustes erfolgt daher langsamer als bei kontinuierlicher Betriebsweise und geschlossener Schmutzdecke. Die Filter müssen daher bei intermittierender Betriebsweise seltener geschält werden, was ein ökonomischer Vorteil ist.
Der Verlauf und die Größenbereiche der Rückhalteleistungen dieser beiden Versuchsphasen sind gleich, weshalb im Folgenden nur auf eine der intermittierenden Phasen eingegangen wird.

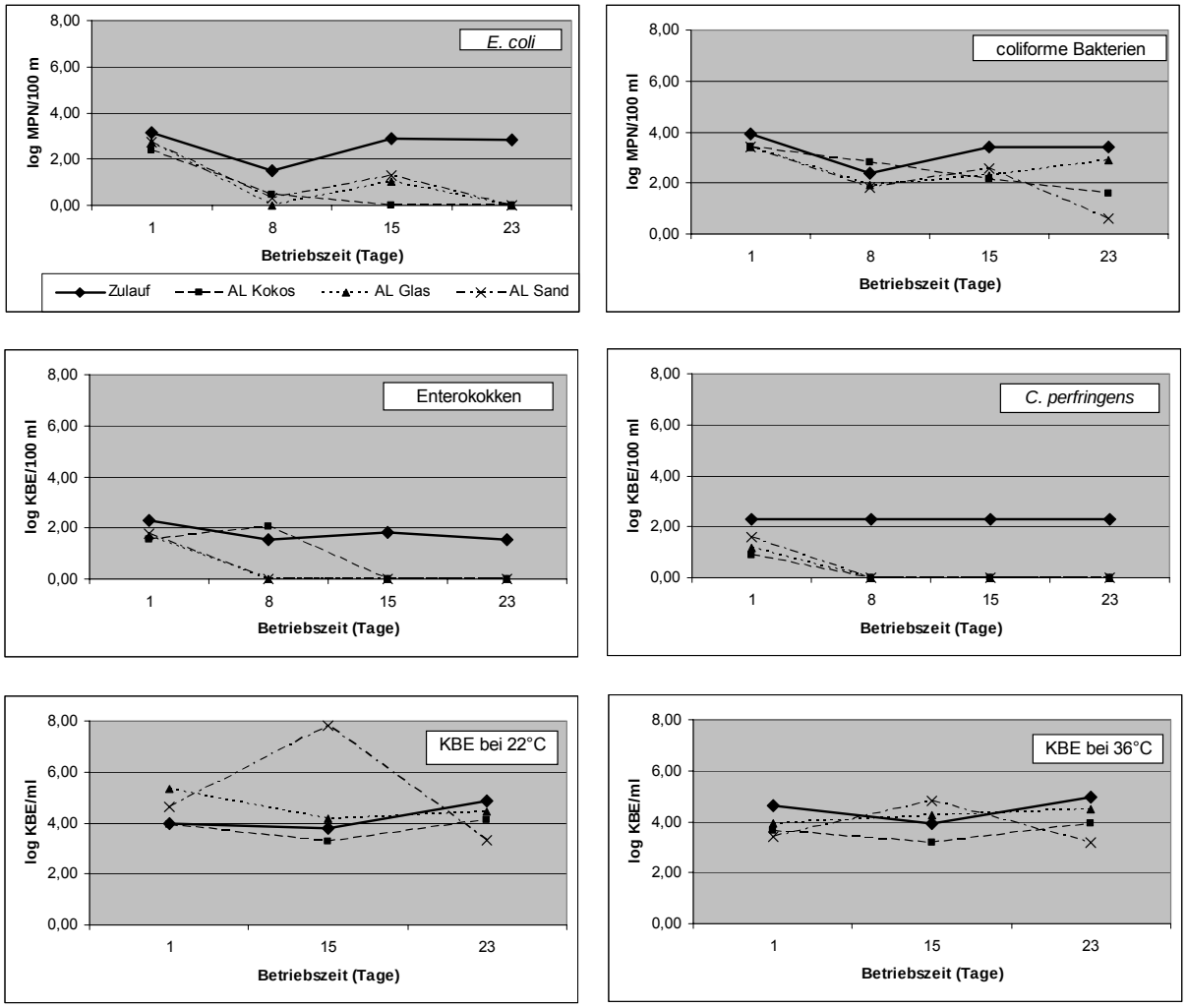


Abbildung 3.3: Anzahl der Indikatororganismen in den Zu- und Abläufen der Kokosfaser-, Glasgranulat- und Sand-Lysimeter bei kontinuierlichem Betrieb (Phase 4: Filtergeschwindigkeit 1 m/d, Wassertemperatur 30°C).

In der Abbildung 3.4 sind die Menge der Indikatororganismen in den Zu- und Abläufen der intermittierend betriebenen Versuchsfilter einer Phase graphisch dargestellt. Die Rückhaltungen von *E. coli*, Enterokokken und *C. perfringens* waren an jedem ersten Betriebstag der Filter sehr gering. Am vierten Betriebstag wurden dagegen in der Regel alle im Zulauf enthaltenen Indikatoren für fäkale Verunreinigungen – mit Ausnahme der coliformen Bakterien - zurückgehalten. Dies entspricht einer maximalen Rückhaltung von 2,5 log-Stufen für *E. coli*, von 1,8 log-Stufen für Enterokokken und von 2,3 log-Stufen für *C. perfringen*s. Signifikante Unterschiede zwischen den Filtermaterialien sind nicht zu erkennen.

Coliforme Bakterien wurden jeweils sowohl am ersten als auch am vierten Betriebstag von allen drei Filtern nur gering zurückgehalten. Am vierten Betriebstag

lag die Rückhaltung coliformer Bakterien durch den Sandfilter bis zu 1,5 log-Stufen höher als durch die Filter mit den alternativen Materialien.

In der ersten Betriebswoche war die Anzahl der autochthonen Bakterien (KBE bei 22°C) im Ablauf aller Lysimeter höher als im Zulauf. In den beiden darauf folgenden

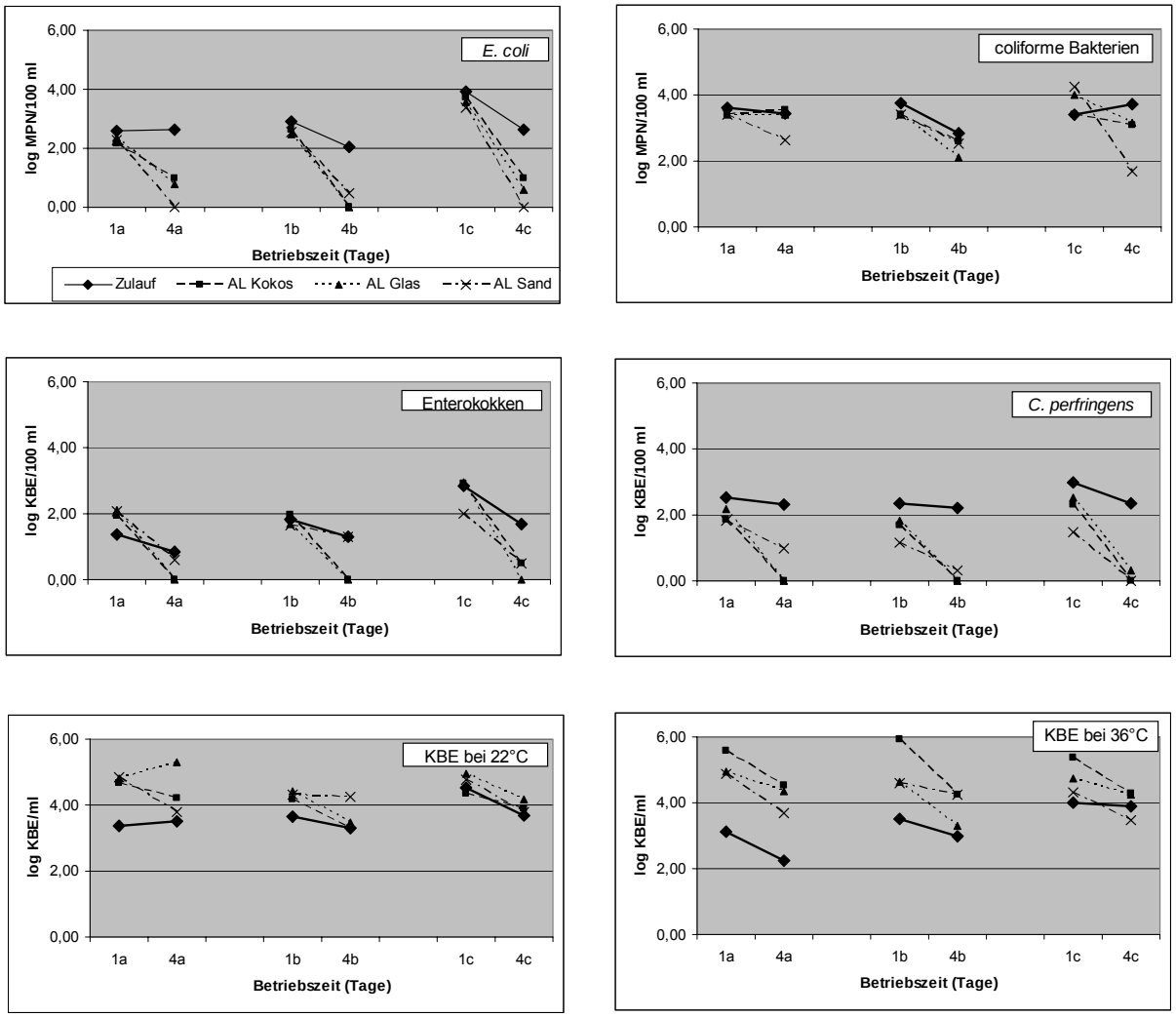


Abbildung 3.4: Anzahl der Indikatororganismen in den Zu- und Abläufe der Kokosfaser-, Glasgranulat- und Sand-Lysimeter bei intermittierendem Betrieb (Phase 2: Filtergeschwindigkeit 2,2 m/d, Wassertemperatur 30°C). Die Proben zur Untersuchung der Rückhalteleistungen wurden jeweils wenige Stunden nach dem Beginn der Beschickung (erster Tag = 1) und vor Ende der Beschickung (vierter Tag = 4) untersucht. Die Rückhalteleistungen wurden in drei aufeinander folgenden Wochen (a: erste Woche, b: zweite Woche, c: dritte Woche) analysiert.

Betriebswochen nahm die Differenz ab, bis sie in der dritten Woche der Zulaufkonzentration entsprach. Eine analoge Einarbeitung war für die allochthonen

Bakterien (KBE bei 36°C) zu beobachten. Aus dem Kokosfaserlysimeter werden jeweils am ersten Betriebstag deutlich mehr allochthone Bakterien ausgetragen als aus den anderen beiden Lysimetern.

Die ermittelten maximalen Rückhalteleistungen der kontinuierlich und intermittierend betriebenen Lysimeter sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt. Die maximalen Rückhalteleistungen der kontinuierlich und intermittierend betriebenen Lysimeter sind zwar etwa gleich, aber die mittlere Rückhalteleistung über die vierwöchigen Versuchszeiten sind für die kontinuierliche Betriebsweise deutlich besser als für die Intermittierende (Tab. 3.4).

Tabelle 3.3: Maximale Rückhalteleistungen (in log-Stufen) kontinuierlich und intermittierend betriebener Lysimeter

Indikatororganismus	kontinuierlicher Betrieb (Phase 4)	intermittierender Betrieb (Phase 2)
E. coli	≥ 3	≥ 2
coliforme Bakterien	1	1
Enterokokken	≥ 1,8	≥ 1,5
C. perfringens	≥ 2,2	≥ 2
KBE (22°C)	1	2
KBE (36°C)	1	2

Tabelle 3.4: Mittlere Rückhalteleistungen (in log-Stufen) kontinuierlich und intermittierend betriebener Lysimeter

Indikatororganismus	kontinuierlicher Betrieb (Phase 4)	intermittierender Betrieb (Phase 2)
E. coli	1,9	1,0
coliforme Bakterien	0,8	0,2
Enterokokken	0,9	0,4
C. perfringens	2,1	1,5
KBE (22°C)	0,4	- 0,4
KBE (36°C)	0,9	- 1,7

An den Lysimetern wurde die kontinuierliche und intermittierende Betriebsweise in aufeinander folgenden Versuchsphasen untersucht. Eine parallele Testung der

beiden Betriebsarten wurde an Sandfiltern, die mit dem Ablauf des Emscherklärwerks Dinslaken beaufschlagt wurden, durchgeführt. Durch den parallelen Lauf der beiden Betriebsarten wurde bestätigt, dass die Rückhalteleistung der Langsamsandfilter für hygienisch relevante Bakterien nach jedem Trockenfallen sehr gering ist.

- **Versuchsfilter mit Auflageschichten**

Ein wesentlicher Aspekt der ökonomischen Betriebsweise ist die Laufzeit der Filter, da das Schälen der Filter die Hauptkosten in der Betriebsphase verursacht. Die Laufzeit der Filter sollte möglichst lang sein, ohne dass die Rückhalteleistungen der Filter negativ beeinflusst werden. Durch die intermittierende Betriebsweise werden zwar die Laufzeiten der Filter verlängert, aber auch die mittleren Rückhalteleistungen verringert. Eine andere Möglichkeit die schnelle Verblockung der Schmutzdecken zu vermeiden, ist das Aufbringen von Auflageschichten auf der eigentlichen Filterschicht. Die Auflagematerialien müssen als Tiefenfilter fungieren, um die Trübstoffe über eine größere Strecke als die Schmutzdecke zurückhalten zu können. Dadurch können mehr Trübstoffe aufgenommen werden und die Filterlaufzeiten verlängern sich. Als Auflagematerien bieten sich grobkörnige Materialien wie Kies und Bims an. Zusätzlich sollte die Eignung von Kokosfasern als Auflageschicht geprüft werden, da sich die mit Kokosfasern betriebenen Versuchsfilter und Lysimeter als Tiefenfilter erwiesen hatten.
An Versuchsfiltern sollte untersucht werden, ob durch Auflageschichten die Laufzeiten der Filter verlängert und gleichzeitig die Effektivität der Rückhaltung für hygienisch relevante Mikroorganismen beibehalten oder gesteigert werden kann. Zur Untersuchung von Auflageschichten auf der Filterschicht Sand wurden drei Filter mit und ein Filter ohne Auflageschicht parallel betrieben. Als Auflagematerialien wurden Kies, Bims und Kokosfaser verwendet. Die Filter wurden bis zum Eintreten eines deutlichen Druckverlustes kontinuierlich betrieben. Durch die Auflageschichten Kies und Bims wurden die Laufzeiten der Filter um etwa das 4fache und um etwa das 10fache durch die Auflageschicht aus Kokosfasern im Vergleich zu dem Referenzfilter ohne Auflageschicht verlängert (Mälzer, 2005).

Die Rückhalteleistungen der Filter für hygienisch relevante Mikroorganismen sind mit und ohne Auflageschichten etwa gleich. Die maximalen Rückhalteleistungen dieser Versuchsfilter (Tab. 3.5) entsprechen für die Parameter *E. coli*, Enterokokken und *C. perfringens* den maximalen Rückhalteleistungen der Versuchsfilter und Lysimeter zur Testung alternativer Filtermaterialien (Tab. 3.1 und 3.2). Für die Parameter coliforme Bakterien sowie autochthone und allochthone Bakterien (KBE bei 22°C und 36°C) sind die maximalen Rückhalteleistungen der Versuchsfilter zur Untersuchung der Auflageschichten 2-3 log-Stufen höher als bei den Filtern zur Untersuchung alternativer Filtermaterialien.

Tabelle 3.5: Maximale Rückhalteleistungen (in log-Stufen) der Versuchsfilter zur Untersuchung von Auflageschichten

Parameter	Auflage Kies	Auflage Bims	Auflage Kokosfasern	keine Auflage
E. coli	4	4	4	4
coliforme Bakterien	4,5	4,5	4	5
Enterokokken	3	3	4	4
C. perfringens	4	4	4	4
KBE (22°C)	2,5	2	2	2,5
KBE (36°C)	2,5	2	2	3

Ein entscheidender Unterschied zwischen den Filtern, die zur Untersuchung der Auflageschichten betrieben wurden, und den Filtern, die der Untersuchung alternativer Filtermaterialien dienten, war die Qualität des Zulaufs. Die mikrobiologische und chemische Qualität des Zulaufs der Versuchsfilter (= Ablauf des Emscherklärwerks Dinslaken), die der Untersuchung der Auflageschichten dienten, war schlechter als die des Zulaufs der Versuchsfilter und Lysimeter zur Untersuchung alternativer Filtermaterialien (= Oberflächenwasser der Ruhr bei Schwerte; Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Durchschnittliche mikrobiologische und chemisch-physikalische Qualität der Filterzuläufe

Parameter	Ablauf Emscherklärwerk Dinslaken	Oberflächenwasser der Ruhr bei Schwerte
E. coli [MPN/100ml]	$1,6 * 10^4$	$5,0 * 10^2$
Coliforme Bakterien [MPN/100 ml]	$9,5 * 10^4$	$>6,0 * 10^3$
Enterokokken [KBE/100 ml]	$9,6 * 10^3$	$4,5 * 10^1$
C. perfringens [KBE/100 ml]	$1,1 * 10^4$	$6,0 * 10^2$
Trübung [FNU]	2,82	0,79
DOC [mg/l]	8,7	5,0 (nach Zudosierung)
pH	7,7	7,8

- **Versuchsfilter zum Algenwachstum**

Algen können die Langsamsandfiltration sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Positiv ist die Akkumulation und Vermehrung fadenförmiger Algen in der Schmutzdecke, wodurch die Schmutzdecke stabilisiert wird und den Charakter einer Auflageschicht erhält. Einzellige Algen können dagegen die Porenräume blockieren und zu einem vorzeitigen Anstieg des Druckverlustes führen (McNair *et al.*, 1987). Bei Algen- und Cyanobakterienblüten im Zulauf und Überstau kann es zudem zur Produktion und Freisetzung von Algen- und Cyanotoxinen kommen. Diese Toxine sind toxisch für Mensch und Tier.

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Algenmenge im Überstau sowie in der Schmutzdecke und der Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen gibt. Dazu wurden drei parallel betriebene Versuchsfilter (Filtermaterial Sand) mit unterschiedlichen Lichtintensitäten bestrahlt, um das Algenwachstum im Überstau und in den Schmutzdecken unterschiedlich anzuregen. Die Filter 1 und 2 wurden durch Pflanzenlampen mit 4000 lux und 2000 lux beleuchtet. Das Lichtspektrum der Pflanzenlampen entspricht dem Tageslicht mit

einem geringen UV-Anteil (λ = 380-780 nm). Der Filter F3 diente als Referenzfilter und wurde nicht beleuchtet. Dies führte zu dem gewünschten unterschiedlich starken Algenbewuchs (Mälzer, 2005).
Alle drei Filter hielten nach einer Einarbeitungsphase etwa die gleichen Mengen Indikatororganismen zurück. Die Rückhalteleistungen entsprachen denen der Filter zur Untersuchung der Auflageschichten.

3.1.2 Vorbelastung der Filtermaterialien mit hygienisch relevanten Bakterien

Die Filtermaterialien sollten vor Versuchsbeginn frei von hygienisch relevanten Mikroorganismen sein, um eine Austragung pathogener Organismen und Indikatororganismen mit dem Filtrat insbesondere in der Einarbeitungsphase ausschließen zu können. Coliforme und allochthone Bakterien wurden jedoch von den Versuchsfiltern und Lysimetern, die zur Testung alternativer Filtermaterialien betrieben wurden, nur gering bis gar nicht zurückgehalten oder ausgetragen. Die Austragung coliformer Bakterien war insbesondere in den ersten Betriebstagen und –wochen bei den Filtern zu beobachten, in denen Kokosfasern als Filtermaterial verwendet wurden. Die Kokosfasern zeigten in den ersten Tagen darüber hinaus eine Austragung von *E. coli* nach der Inbetriebnahme neu befüllter Filter. Daher wurden die Filtermaterialien auf coliforme Bakterien und *E. coli* untersucht.
Die Filtermaterialien wurden in dem Zustand beprobt, den sie bei der Inbetriebnahme der Filter hatten. Das Filtermaterial Kokosfasern wurde unbehandelt verwendet. Der Sand wurde gespült, um Tone und andere Verunreinigungen zu entfernen. Das Glasgranulat wurde aufgrund von Inkrustierungen aus Lebensmittelresten, Etiketten und Klebstoffen mehrmals heiß gespült und anschließend für eine Stunde bei 180°C getrocknet.
In den Filtermaterialien Glasgranulat und Sand waren keine coliformen Bakterien und *E. coli* kulturell nachweisbar. Eine deutliche Belastung mit coliformen Bakterien ($5*10^4$ coliforme Bakterien/g Trockenmasse) und eine geringe Belastung mit *E. coli* ($5*10^0$ *E. coli*/g Trockenmasse) wiesen die Kokosfasern auf.
Die Bestimmung der Bakteriengattung bzw. –art von je drei coliformen Bakterienstämmen, die aus dem Filtermaterial Kokosfasern sowie aus dem Filtrat des Kokosfaserfilters isoliert wurden, erfolgte mit Hilfe des API-Systems. Bei einem

Stamm aus dem Fasermaterial handelte es sich zu 47,5% um *Enterobacter sp.* und bei den beiden anderen Stämmen um *Enterobacter cloacae* (99,4% und 94,3%). Die aus dem Filtrat isolierten Stämme gehörten den Arten *E. cloacae* (95,1%) und *E. coli* (98,6%) sowie der Gattung *Citrobacter* (57,5%) an.

Zur Abtötung der coliformen Bakterien und *E. coli* in den Kokosfasern wurden verschiedene Methoden geprüft. Eine einwöchige Trocknung bei Raumtemperatur (20-22°C) sowie einstündige Hitzebehandlungen bei 40°C und 60°C führten zu keiner Verringerung der coliformen Bakterien und *E. coli* in den Kokosfasern. Erst nach einer einstündigen Hitzebehandlung bei 70°C waren keine coliformen Bakterien und *E. coli* mehr kulturell nachweisbar.

3.1.3 Elimination, Akkumulation oder Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen im Filterbett

Die Rückhaltung von Mikroorganismen erfolgt in Sandfiltern zu etwa 90-99% in den oberen 5-10 cm, in den sogenannten „aktiven Schichten“ (Stevik *et al.*, 1999; van Cuyk *et al.*, 2001). Ob die hygienisch relevanten Mikroorganismen sich in diesen Schichten akkumulieren und vermehren können oder aufgrund der antagonistischen Effekte des Filters abgetötet und eliminiert werden, ist unklar.

Der Verbleib der im Filterbett zurückgehaltenen hygienisch relevanten Mikroorganismen wurde exemplarisch an den Lysimetern zur Testung alternativer Filtermaterialien und an den Versuchsfiltern zum Algenwachstum untersucht. Als Indikatororganismen für hygienisch relevante Mikroorganismen dienten coliforme Bakterien und *E. coli*. Eine Aussage über den Verbleib dieser zurückgehaltenen Indikatororganismen kann anhand des Vergleichs der Anzahlen der Indikatororganismen, die während der gesamten Betriebszeiten der Filter zurückgehalten wurden, und der in den aktiven Schichten nachweisbaren Anzahlen an Indikatororganismen getroffen werden. Repräsentativ für die aktiven Schichten wurden die Schmutzdecken und die Schichten in 5 cm Tiefe untersucht. Bei der Anzahl der Indikatororganismen, die während der gesamten Betriebszeit zurückgehalten wurden, handelt es sich um berechnete Werte, die auf dem Wasserdurchsatz während der gesamten Filterlaufzeit und der durchschnittlichen

zurückgehaltenen Anzahl an Indikatororganismen beruhen. Die Anzahl der Indikatororganismen, die in den repräsentativen Mischproben der Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe bestimmt wurden, dienten als Grundlage für die Berechung der Anzahlen dieser Organismen in den entsprechenden gesamten Filterschichten. Für Kokosfasern wurden zusätzlich die Anzahlen der coliformen Bakterien und *E. coli* beachtet, die in dem Rohmaterial nachgewiesen wurden (s. Kapitel 3.1.2, S. 66).

In den Lysimetern ist die Anzahl der *E. coli*, die während der gesamten Betriebszeit zurückgehalten wurde, höher als die Anzahl der *E. coli*, die zu Versuchsende in den untersuchten Schichten der Filtermaterialien nachgewiesen wurden. Für den Parameter „coliforme Bakterien“ ließ sich der gegenteilige Trend feststellen. Die Anzahl der coliformen Bakterien, die während der gesamten Filterlaufzeiten zurückgehalten wurde, ist geringer als die Anzahl der coliformen Bakterien, die bei Versuchende in den Filtermaterialien enthalten waren. Coliforme Bakterien scheinen sich im Gegensatz zu *E. coli* in den oberen Schichten der untersuchten Filterbetten zu akkumulieren und zu vermehren (Tab. 3.7 und Tab. 3.8).
In den drei Filtern zur Untersuchung des Algenwachstums ist sowohl die Anzahl der *E. coli* als auch der coliformen Bakterien in den Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe um sieben log-Stufen höher als die Anzahl dieser Indikatororganismen, die während der gesamten Filterlaufzeiten zurückgehalten wurden. Dies deutet auf eine Akkumulation und Vermehrung von *E. coli* und auch coliforme Bakterien im Filterbett hin (Tab. 3.7 und Tab. 3.8).

Tabelle 3.7: Anzahl der während der gesamten Filterlaufzeiten zurückgehaltenen *E. coli* und der zu Versuchsende in den oberen Filterschichten enthaltenen *E. coli*

		Anzahl der *E. coli*			Anzahl der *E. coli* in den aktiven Filterschichten zu Versuchsende
		Zulauf	Ablauf	Differenz	
Lysimeter (30°C; Oberfläche 4 m²; Laufzeit: 4 Monate)	Kokos-Fasern	$3,1 * 10^9$	$4,5 * 10^8$	$2,7 * 10^9$	$8,2 * 10^8$
	Glas-granulat	$3,0 * 10^9$	$2,5 * 10^8$	$2,8 * 10^9$	$1,8 * 10^8$
	Sand	$3,0 * 10^9$	$3,3 * 10^8$	$2,7 * 10^9$	$1,0 * 10^8$
Versuchsfilter (20°C; Oberfläche 0,4 m²; Laufzeit 4,5 Monate)	F1 (4000 lux)	$2,6 * 10^6$	$3,1 * 10^4$	$2,6 * 10^6$	$5,5 * 10^{12}$
	F2 (2000 lux)	$2,5 * 10^6$	$3,0 * 10^4$	$2,5 * 10^6$	$4,0 * 10^{11}$
	F3 (0 lux)	$2,7 * 10^6$	$1,3 * 10^4$	$2,7 * 10^6$	$5,0 * 10^{11}$

Tabelle 3.8: Anzahl der während der gesamten Filterlaufzeiten zurückgehaltenen coliforme Bakterien und der zu Versuchende in den oberen Filterschichten enthaltenen coliforme Bakterien

		Anzahl der coliformen Bakterien			Anzahl der coliformen Bakterien in den aktiven Filterschichten zu Versuchsende
		Zulauf	Ablauf	Differenz	
Lysimeter (30°C; Oberfläche 4 m²; Laufzeit: 4 Monate)	Kokos-fasern	$2,2 * 10^{10}$	$1,64 * 10^{10}$	$5,7 * 10^9$	$9,8 * 10^{10}$
	Glas-granulat	$2,2 * 10^{10}$	$1,3 * 10^{10}$	$8,8 * 10^9$	$5,3 * 10^{11}$
	Sand	$2,1 * 10^{10}$	$2,86 * 10^9$	$1,8 * 10^{10}$	$4,0 * 10^{11}$
Versuchsfilter (20°C; Oberfläche 0,4 m²; Laufzeit 4,5 Monate)	F1 (4000 lux)	$1,3 * 10^7$	$1,6 * 10^5$	$1,3 * 10^7$	$4,4 * 10^{13}$
	F2 (2000 lux)	$1,2 * 10^7$	$1,1 * 10^5$	$1,2 * 10^7$	$2,8 * 10^{13}$
	F3 (0 lux)	$1,3 * 10^7$	$2,1 * 10^5$	$1,3 * 10^7$	$3,9 * 10^{13}$

3.2 Vergleich der klassisch-kulturellen Nachweisverfahren für Indikatororganismen mit der Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierungs (FMH) - Methode

Der Nachweis von Indikatororgansimen erfolgt entsprechend der Trinkwasserverordnung 2001 durch kulturelle Methoden. Diese klassisch-mikrobiologischen Nachweisverfahren sind zeitaufwendig. Der Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mit dem Colilert-System der Firma IDEXX dauert 18-20 Stunden und ist die schnellste kulturelle Methode für die in der Trinkwasserverordnung 2001 genannten Indikatoren. Die meisten klassisch-kulturellen Nachweisverfahren dauern mehrere Tage; bei Legionellen liegt das Endergebnis sogar erst nach 10 Tagen vor. Schnellere Nachweisverfahren stehen durch die molekularbiologischen Techniken, wie die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), zur Verfügung.

Für den Nachweis der Indikatororganismen *E. coli,* coliforme Bakterien und Enterokokken sollte an den Filterzu- und –abläufen ein Nachweisverfahren entwickelt und optimiert werden, das auf der FISH-Methode basiert. Die Nachweisbarkeit der Indikatororganismen mit diesem Verfahren sollte mit den Verfahren, die in der Trinkwasserverordnung 2001 angegeben sind verglichen werden.

Mit der auf Gensonden basierenden FISH-Methode können nur phylogenetische Bakteriengruppen nachgewiesen werden. Einige Indikatorgruppe, wie z.B. die coliformen Bakterien, zeichnen sich jedoch durch gemeinsame physiologische Eigenschaften aus. Ein phylogenetischer Zusammenhang dieser Gruppen liegt nicht vor, wodurch ein Nachweis mittels FISH nicht möglich ist. Können alle Arten einer solchen physiologischen Gruppe einer übergeordneten taxonomischen Einheit zugeordnet werden, ist der Nachweis dieser taxonomischen Einheit mittels FISH möglich. Zum Beispiel zählen alle coliformen Bakterien zu der Familie der *Enterobacteriaceae*, die mittels FISH detektiert werden kann.

Zunächst wurde versucht die Indikatororganismen *E. coli*, *Enterobacteriaceae* und Enterokokken in den Zu- und Abläufen der Versuchsfilter direkt über FISH nachzuweisen. Ein detektierbares Signal war jedoch entweder nur gering oder überhaupt nicht vorhanden, so dass eine quantitative Auswertung der Proben nicht möglich war. Dies ist auf die geringe Anzahl der Indikatororganismen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl und die hohe Menge an Partikeln zurückzuführen. Für ähnliche

Probenmatrizes hatte sich die Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung (FMH) für den Nachweis von Indikatororganismen als geeignet erwiesen (Ootsubo *et al*., 2003). Bei der FMH-Methode werden die Indikatororganismen zunächst zur Mikrokoloniebildung angeregt. Durch die Wahl selektiver Bedingungen in Form von Medium und Temperatur kann die Begleitflora unterdrückt und die Vermehrung der Indikatororganismen gefördert werden. Die Mikrokolonien werden in einem zweiten Schritt mittels spezifischer Gensonden detektiert.

Die Mikrokolonien von *E. coli*, *Enterobacteriaceae* sowie Enterkokken waren sowohl in Reinkulturen als auch in Zu- und Ablaufproben der Versuchsanlagen nach den angegebenen Inkubations- und Hybridisierungsbedingungen (s. Kapitel 2.2.3.12, S. 49) mikroskopisch gut erkenn- und differenzierbar. Die Fluoreszenzsignale waren von hoher Intensität und die Mikrokolonien aufgrund ihrer Morphologie deutlich abgegrenzt, was eine schnelle und zuverlässige mikroskopische Auswertung ermöglichte (Abb. 3.5).

Der DNS-Farbstoff DAPI, der alle Organismen anfärbt, wurde als Kontrollfärbung verwendet. Als weitere Kontrolle wurde das Top-to-Bottom-Verfahren eingesetzt. Nach dem Top-to-Bottom-Verfahren muss die Identifikation eines Bakteriums bzw. einer Mikrokolonie durch eine FISH-Sonde höherer phylogenetischer Ordnung bestätigt werden. Zum Beispiel muss eine Zelle oder Mikrokolonie, die mittels Colinsitu-Sonde als *E. coli* identifiziert wurde, auch mit der *Enterobacteriaceae*-Sonde ProbeD und der *Bacteria*-Sonde EUB338 markierbar sein.

Als Mikrokolonien wurden Ansammlungen von mehr als zehn Zellen des gleichen Zelltyps definiert. Die Anzahl der fluoreszierenden Mikrokolonien wurde auf 100 ml bezogen angegeben (FMK/100 ml), wie es auch für die klassisch-kulturellen Methoden üblich ist (MPN/100 ml bzw. KBE/100 ml).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der FMH-Methode wurden Zulaufproben mit Reinkulturen bekannter Konzentration versetzt. Die Proben wurden parallel mittels klassisch-kultureller Verfahren und der FMH-Methode untersucht. Die Nährmedien, die für die klassisch-kulturellen Verfahren der aufgestockten und nicht-aufgestockten Proben verwendet wurden, unterschieden sich geringfügig. Es ist davon auszugehen, dass die Selektivität der Nährmedien übereinstimmt und die ermittelten Wiederfindungsraten auf die sonst verwendeten kulturellen Verfahren übertragbar sind. In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse der Wiederfindung als Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst.

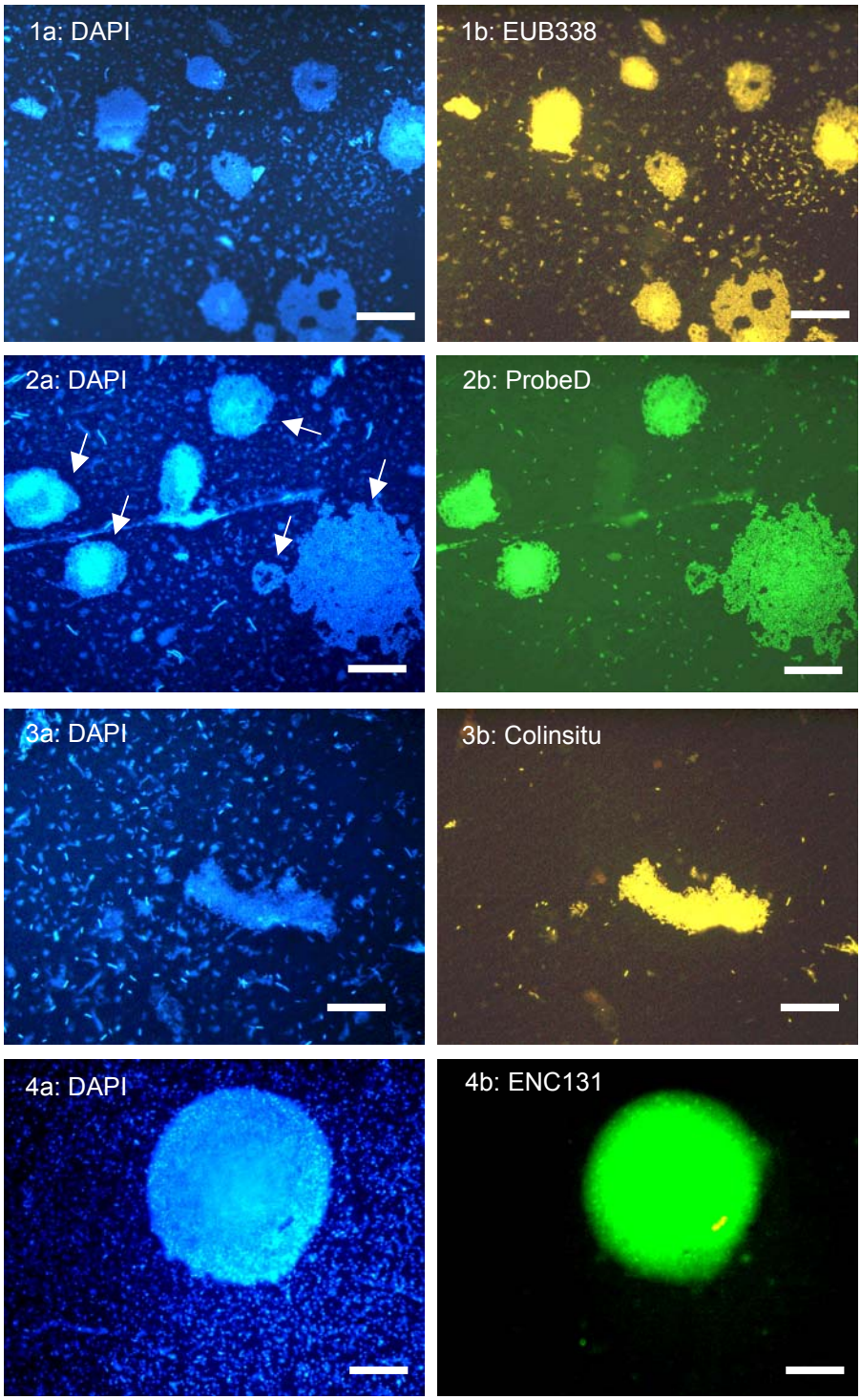


Abbildung 3.5: Epifluorszenzmikroskopische Ansicht der mit DAPI und spezifischen Gensonden markierten Mikrokolonien einer Zulaufprobe. Fluoreszenzmarkierte Sonden wurden zum Nachweis von *Bacteria* (EUB338), *Enterobacteriaceae* (ProbeD), *E. coli* (Colinsitu) und Enterokokken (Enc131) verwendet. Die Bilder einer Zeile zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt. Vergrößerung: 400x; Maßbalken:50 µm.

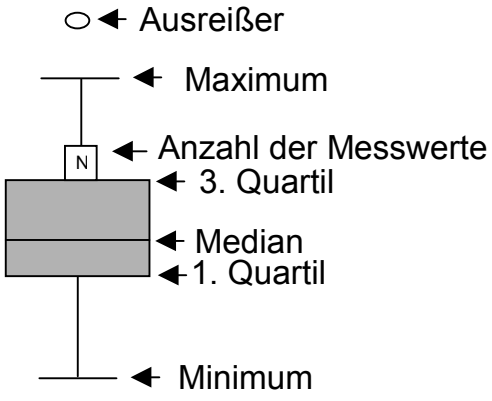
Mit der FMH-Methode wurde für alle untersuchten Parameter mindestens dieselbe Anzahl Organismen wie mit den kulturellen Verfahren nachgewiesen. Durch den Einsatz der Sonde ProbeD (Zielgruppe *Enterobacteriaceae*) wurden bis zu 95 % mehr Bakterien nachgewiesen als mit den kulturellen Methoden (coliforme Bakterien). Die Wiederfindungsraten für die *E. coli* und Enterokokken liegen um 100%.

Tabelle 3.9: Wiederfindung von Bakterien mittels FMH-Methode

Zulauf, aufgestockt mit	kulturelles Verfahren / Zielorganismen	FMH-Sonde	Wiederfindung (%)[1]
Escherichia coli	Brila-Bouillon	Colinsitu	112
Escherichia coli	Brila-Bouillon	ProbeD	195
Enterococcus faecalis	Azid-Glukose-Bouillon	Efs130	97
Enterococcus faecium	Azid-Glukose-Bouillon	Enc131	101

(1): 100 % entspricht dem Konzentrationswert des kulturellen Verfahrens

Die FMH-Methode wurde zur Detektion der Indikatororganismen bzw. Indikatorgruppen *Escherichia coli, Enterobacteriaceae* und Enterokokken in Zu- und Abläufen der Versuchsanlagen eingesetzt. Parallel wurden die Indikatororganismen mit den klassisch-kulturellen Methoden nach TrinkwV 2001 nachgewiesen. Die Ergebnisse der kulturellen Nachweisverfahren und der FMH-Methoden wurden statistisch in Form von Box-Whisker-Plots ausgewertet (Abb. 3.6). Die verwendete Darstellung enthält folgende Informationen:



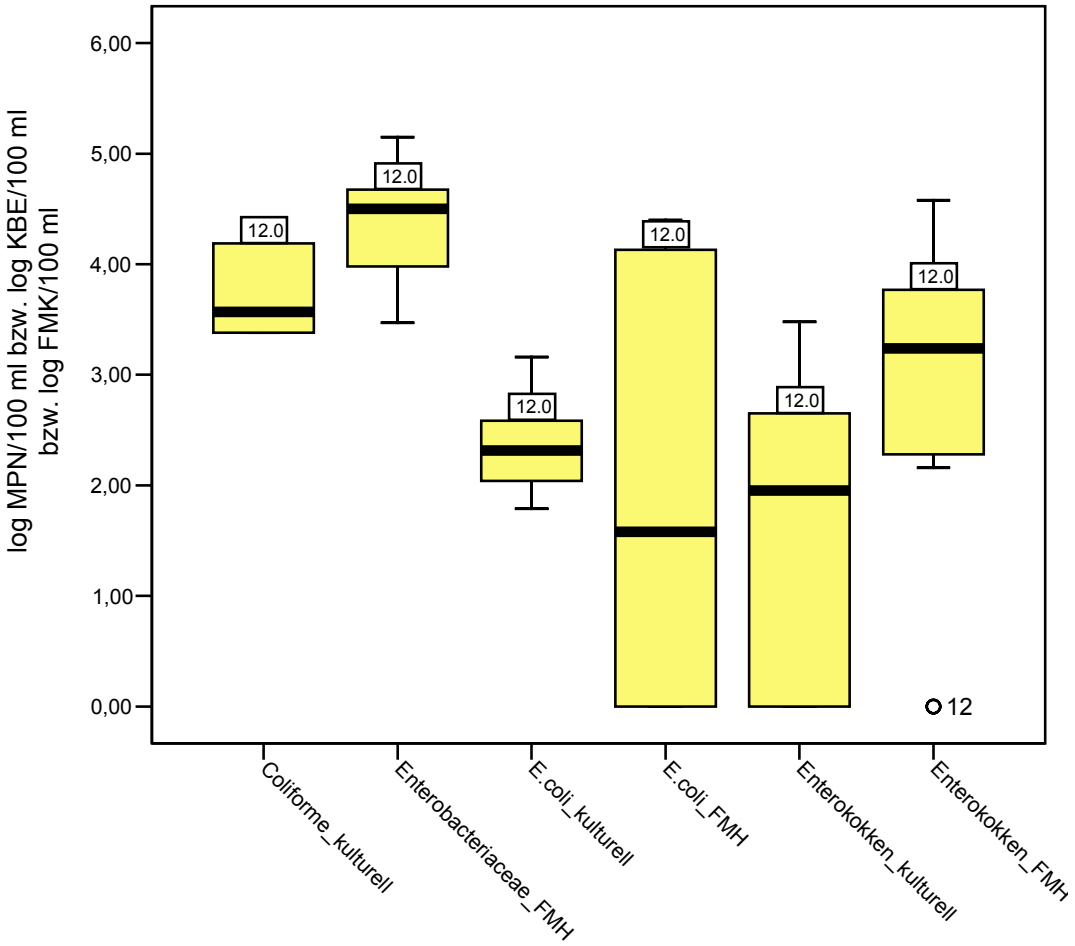


Abbildung 3.6: Statistische Auswertung (Box-Whiskers-Plots) der kulturellen Verfahren und der FMH-Methode (kulturell: kulturelles Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001; FMH: Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung; Coliforme: coliforme Bakterien).

Die Anzahl der mit der FMH-Methode nachgewiesenen Indikatororganismen war für die *Enterobacteriaceae*-Sonde (ProbeD) und die Enterokokken-Sonden (Enc131 und Efs 130) höher als die Anzahl der mit den klassisch-kulturellen Methoden nachgewiesenen Organismen. Dies drückt sich in den insgesamt nach oben verschobenen Box-Whiskers-Plots aus. Für den Parameter *E. coli* ist dagegen der Medianwert der kulturellen Methode 0,4 log-Stufen höher als der Medianwert der FMH-Methode. Insgesamt erstreckt sich der Box-Whiskers-Plot der FMH-Methode über einen Bereich von 4,5 log-Stufen, während der Box-Whiskers-Plot der kulturellen Methoden mit 2 log-Stufen einen deutlich geringeren Bereich umfasst. Diese großen Unterschiede in den Größen der Box-Whiskers-Plots der kulturellen

Nachweisverfahren und der FMH-Methoden für den Parameter *E. coli* spiegeln sich in der geringeren Korrelation dieser beiden Methoden wider (Tab. 3.10). Die Korrelationen der kulturellen Verfahren und der FMH-Methoden für die coliformen Bakterien/*Enterobacteriaceae* und die Enterokokken liegen dagegen im hohen Bereich (Tab. 3.10).

Tabelle 3.10: Korrelationskoeffizienten der Variablen "kulturelle Methode" und "FMH-Methode"

Indikatororganismus	kulturelle Methode	Sonde	Korrelations-koeffizient nach Pearson	Bewertung des Korrelations-koeffizienten[1]
coliforme Bakterien / *Enterobacteriaceae*	Colilert	ProbeD	0,731	hohe Korrelation
E. coli	Colilert	Colinsitu	0,441	geringe Korrelation
Enterokokken	Slanetz-Bartley-Agar	Enc131+ Efs130	0,755	hohe Korrelation

(1): Bewertung der Korrelationskoeffizienten entsprechend den Angaben von SPSS: bis 0,5 geringe Korrelation; von 0,5 bis 0,7 mittlere Korrelation; von 0,7 bis 0,9 hohe Korrelation; ab 0,9 sehr hohe Korrelation

3.3 Charakterisierung der bakteriellen Populationsstruktur der Langsamsandfilter-Biofilme

Die Biozönose in Langsamsandfilter-Biofilmen ist wesentlich an der Rückhalte- und Reinigungsleistung der Filter beteiligt. Insbesondere die am Anfang der Nahrungskette stehenden Bakterien sind von essentieller Bedeutung für das Ökosystem. Bisher wurden fast ausschließlich kulturelle Methoden zur Untersuchung der Bakterienpopulation in Langsamsandfiltern verwendet (Calaway *et al*., 1952; Calaway, 1957; Bruces und Hawkes, 1983; Bahgat *et al*., 1999). Mit kulturellen Methoden wird allerdings nur ein Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Bakterien erfasst. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die Erfassung aller vorhandener Bakterien gelegt. Hierbei wurden zunächst die KBE/GZZ- und EUB338/GZZ-Verhältnisse bestimmt sowie die Esterase-Aktivität als Maß für die allgemeine biologische Aktivität. Um einen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung von Biofilmen zu erlangen, die sich in Langsamsandfiltern unter verschiedenen Betriebsbedingungen etablierten, wurden 16S-Clone Libraries erstellt. Die 16S rRNS-Gene wurden mittels amplifizierter rDNS Restriktionsanalyse und Sequenzvergleichen untersucht. Es wurden die Bakteriengruppen, die aufgrund der 16S-Analysen als bedeutend für die Langsamsandfilter-Biozönose eingeordnet wurden, durch *in situ*-Hybridisierungen quantifiziert. Durch diesen enkaptischen, d.h. ineinander geschachtelten, Ansatz erhält man verschiedenartige Informationen über das gleiche Ökosystem, die sich ergänzen und zum Gesamtverständnis des Habitats beitragen (Abb. 3.7).

Die Filtermaterialien (Schmutzdecken und tiefere Filterschichten) wurden jeweils am Ende der Versuchsläufe beprobt, um möglichst ausgereifte Biofilme und Biozönosen zu untersuchen. Von den oberen, aktiven Schichten wurden repräsentativ die Schmutzdecke und die Schicht in 5 cm Tiefe beprobt. In diesen Schichten wurde die höchste Rückhalte- und Reinigungsleistung bei Sandfiltern beobachtet (Stevik *et al*., 1999; van Cuyk *et al*., 2003). Von dem kommerziell betriebenen RWW-Filter wurden neben der Schmutzdecke die Schichten in 10 cm, 30 cm und 55 cm Tiefe des Filterbettes beprobt, um die Biofilme tieferer Schichten an einem älteren, ausgereiften Filter untersuchen zu können.

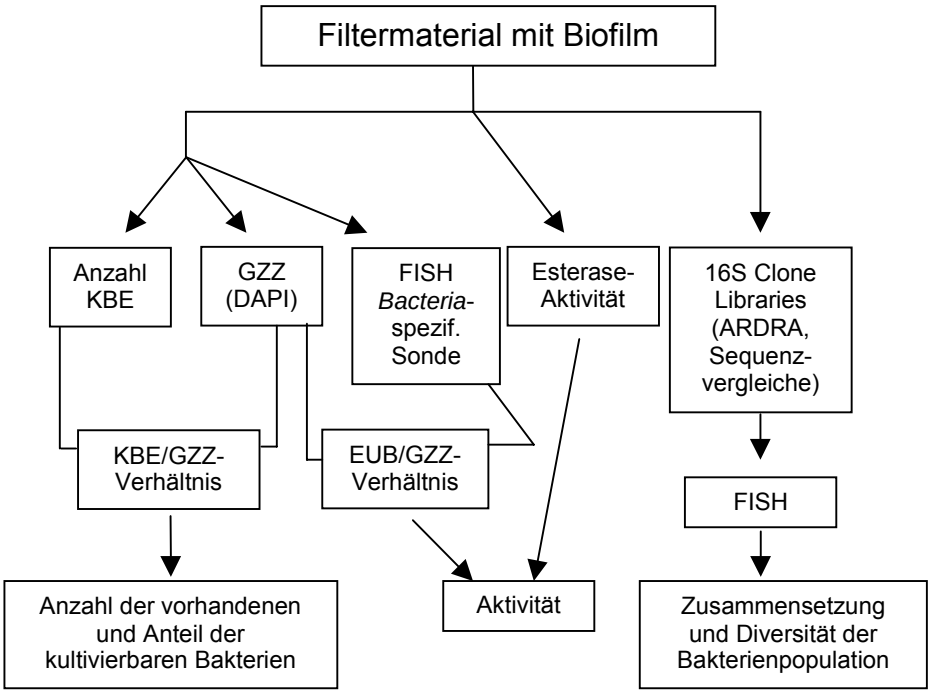


Abbildung 3.7: Flussdiagramm des enkaptischen Ansatzes zur Charakterisierung der bakteriellen Populationsstruktur der Langsamsandfilterbiofilme. KBE: koloniebildende Einheiten; GZZ: Gesamtzellzahl, FISH: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung; ARDRA: amplifizierte rDNS-Restriktionsanalyse.

3.3.1 Biochemische und mikrobiologische Charakterisierung der Filtermaterialien

3.3.1.1 Makroskopische Beobachtungen der Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe der Filterbetten

Auf den Oberflächen aller untersuchten Langsamsandfilter haben sich während der vierwöchigen bis dreieinhalbmonatigen Betriebszeiten Schmutzdecken gebildet, wie sie exemplarisch in der Abbildung 3.8 zu sehen sind. Bei den kontinuierlich betriebenen Filtern waren die Schmutzdecken geschlossen, während die Schmutzdecken der intermittierend betriebenen Filter rissig und nicht geschlossen waren. Zur Schmutzdecke wurden die obere, dunkel verfärbte Filterschicht und die darauf befindliche, aus abgesetzten Trübstoffen bestehende Schicht, gezählt. Die Verfärbung des Filtermaterials reichte im Sand und Glasgranulat nur in eine geringe Tiefe des Filterbettes (ca. 0,5 cm); darunter hatte das Filtermaterial seine

ursprüngliche Farbe (Abb. 3.8). Die Mächtigkeit der Schmutzdecken betrug 0,5-1 cm. Die Kokosfasern wiesen auch in 5 cm Tiefe des Filterbettes noch Verfärbungen auf und der Eintrag von Trübstoffen in diese Schicht war deutlich erkennbar.

Abbildung 3.8: Anstich des Filtermaterials Sand nach dreieinhalbmonatiger Betriebszeit des Lysimeters. Die Schmutzdecke grenzt sich farblich deutlich von dem darunter befindlichem Filtermaterial ab.

3.3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Betrachtungen der Filtermaterialien

Die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Filtermaterialien wurde exemplarisch an den Proben der Lysimeter durchgeführt. Die Lysimeter wurden ausgewählt, weil sie zu den Versuchsfiltern mit der längsten Laufzeit zählten und alle drei verwendeten Filtermaterialien parallel im kleintechnischen Maßstab enthielten. Es wurden Proben von den Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe aller drei Filtermaterialien, Kokosfasern, Glasgranulat und Sand, mit dem Rasterelektronenmikroskop analysiert.

Die Oberflächen der Sandkörner aus der Schmutzdecke sind fast vollständig mit mehrschichtigen Biofilmen belegt. Benachbarte Sandkörner sind über Biofilme verbunden (Abb. 3.9). Bakterien, Algen und extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) konnten als Bestandteile der Biofilme mikroskopisch nachgewiesen werden. In

der 5 cm-Schicht sind die Biofilme ein- bis zweischichtig und der Anteil der Sandkornoberflächen, die mit Biofilmen belegt sind, ist deutlich geringer als in der Schmutzdecke (Abb. 3.10).

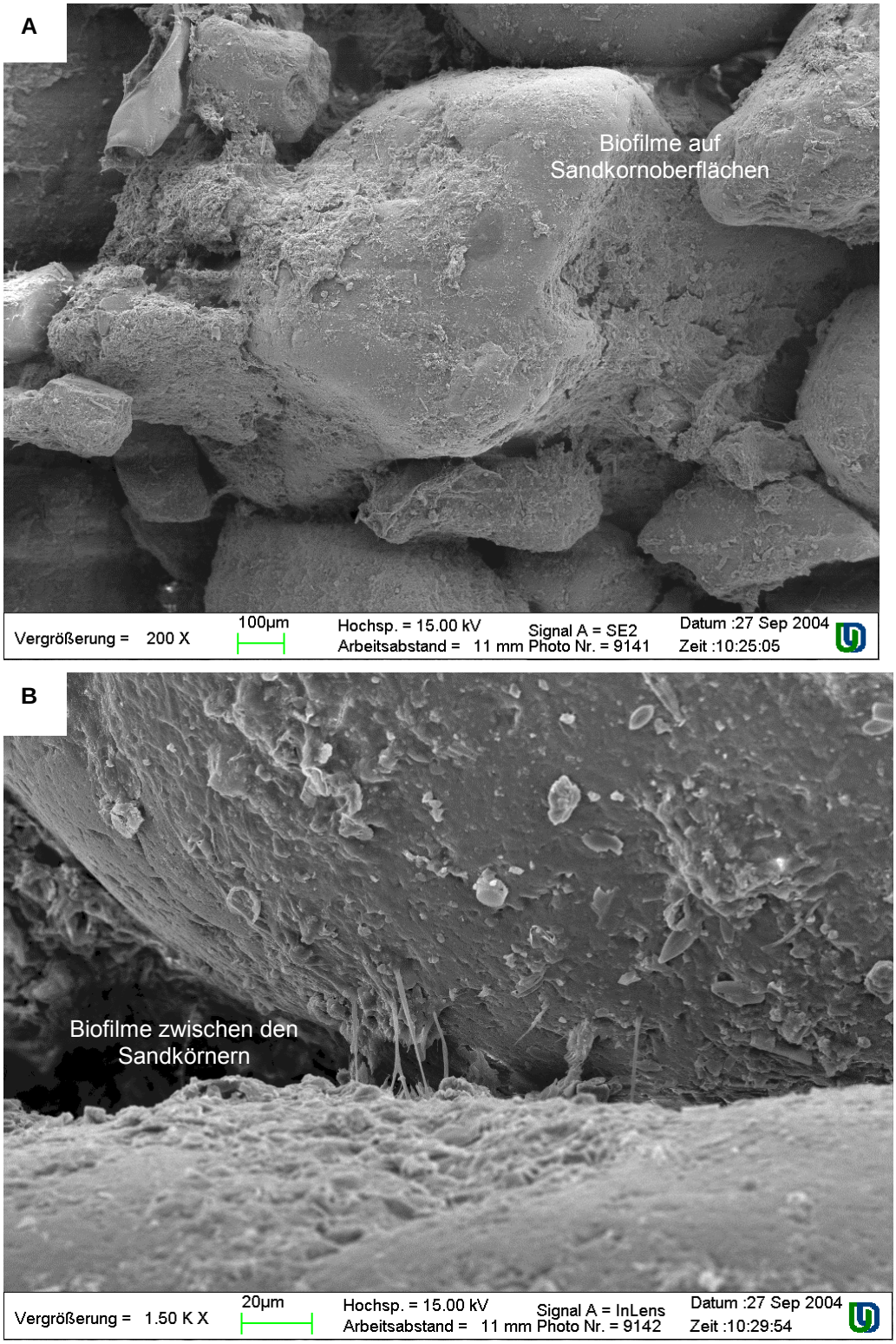


Abbildung 3.9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Sandkörnern aus der Schmutzdecke

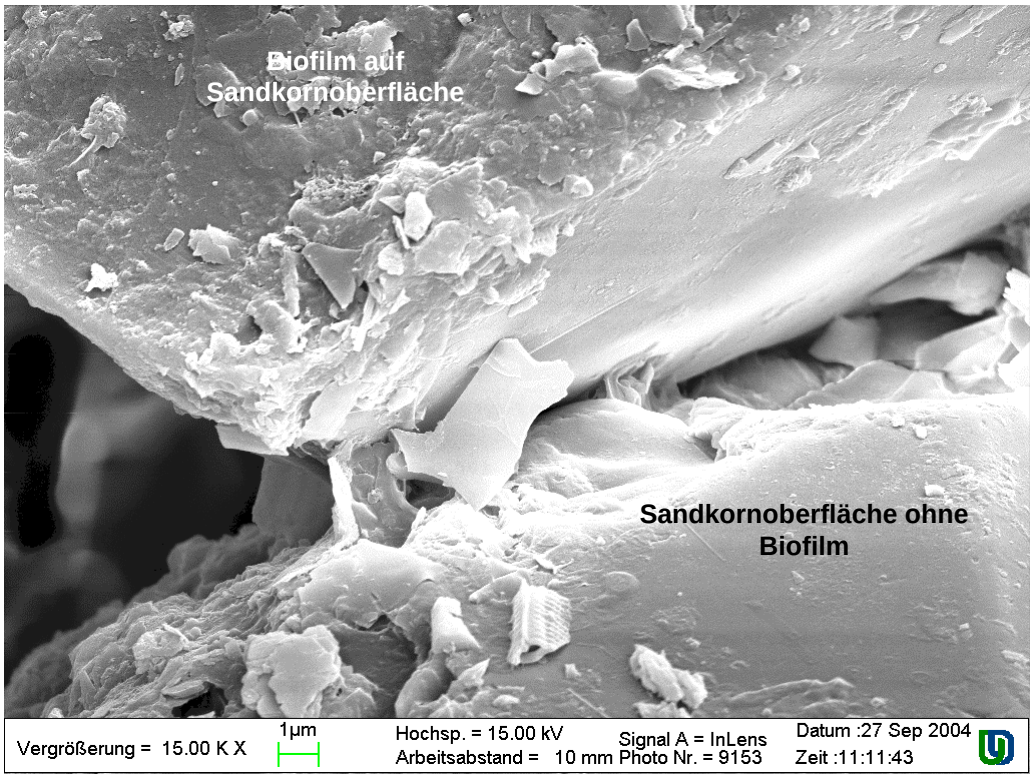


Abbildung 3.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Sandkörnern aus der 5 cm-Schicht.

Die Glasgranulate aus der Schmutzdecke weisen in den Vertiefungen mehrschichtige Biofilme auf, während die Reibflächen nahezu frei von Biofilmen sind (Abb. 3.11, A). Die Biofilme bestehen - ebenso wie beim Filtermaterial Sand - aus Algen, Bakterien und extrapolymeren Substanzen (Abb. 3.12). In der Schicht in 5 cm Tiefe ist der Anteil der mit Biofilmen belegten Glasoberfläche deutlich geringer als in der Schmutzdecke und die vorhandenen Biofilme sind einschichtig (Abb. 3.11; B).

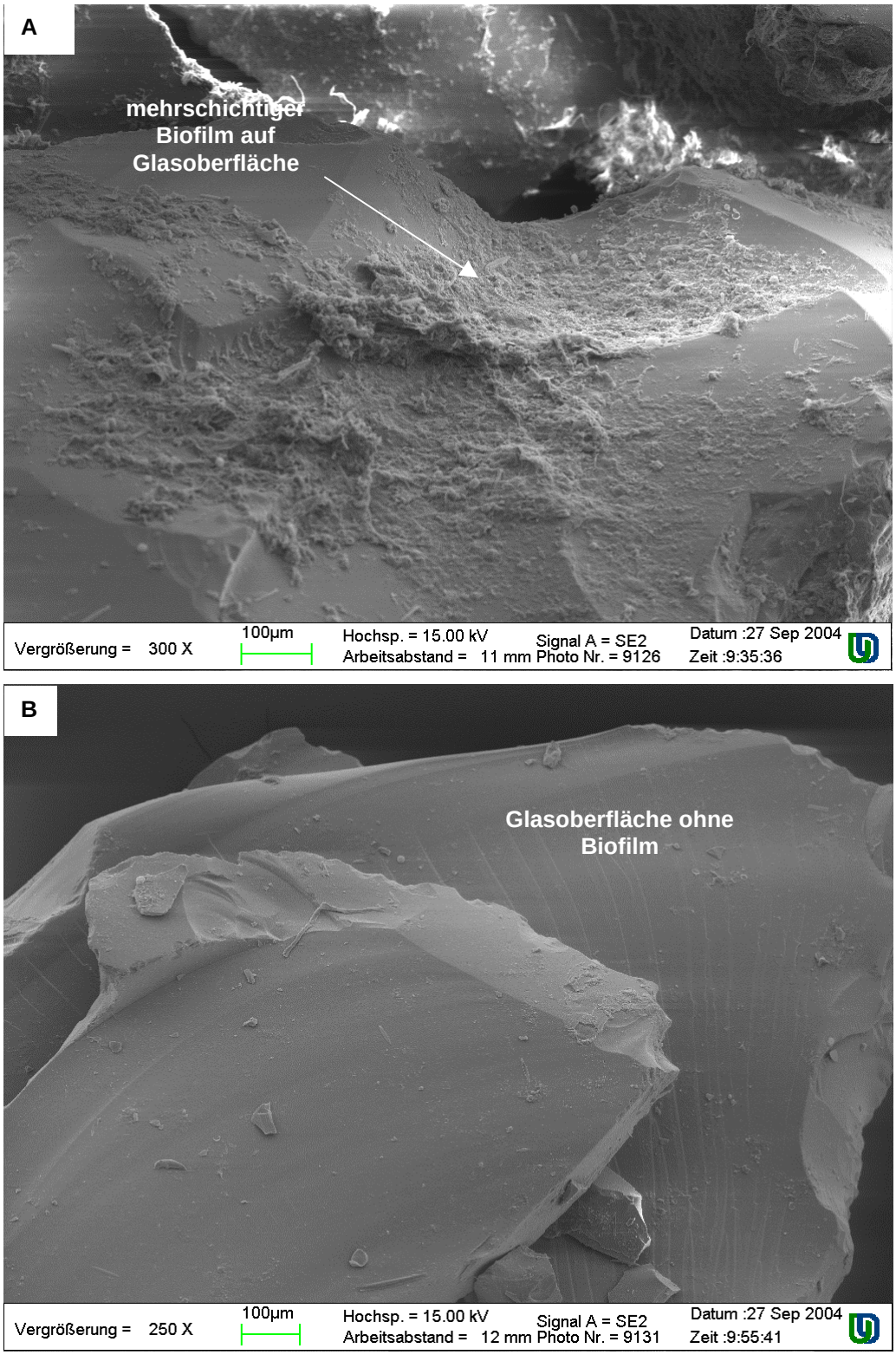


Abbildung 3.11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Glasgranulaten aus der Schmutzdecke (A) und der Schicht in 5 cm Tiefe (B).

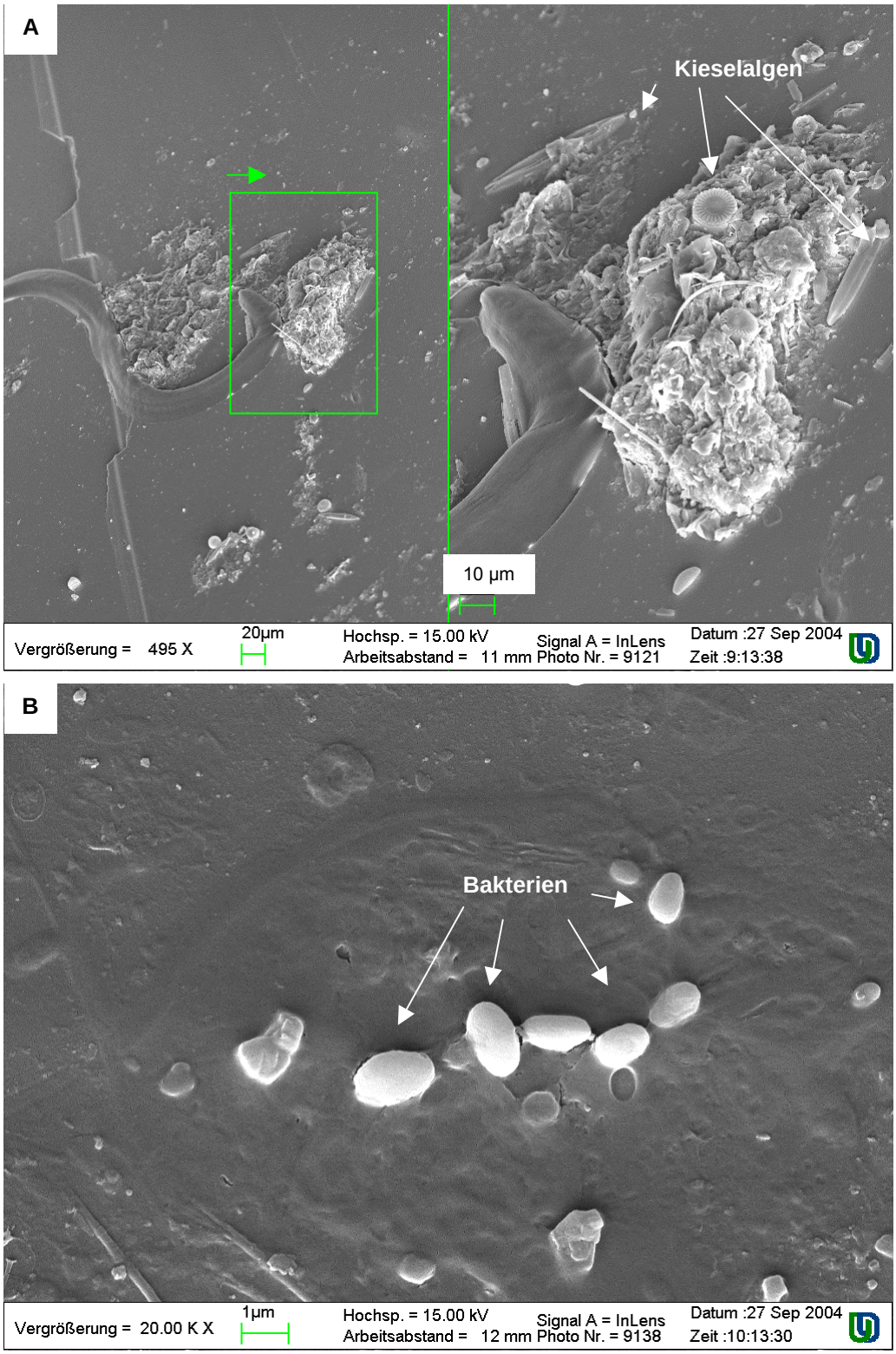


Abbildung 3.12: Detailaufnahmen der mehrschichtigen Biofilme auf Glasgranulaten aus der Schmutzdecke (A) und der einschichtigen Biofilme auf Glasgranulaten aus der Schicht in 5 cm Tiefe.

Bei den Kokosfasern ist kein deutlicher Unterschied zwischen Proben aus der Schmutzdecke und der Schicht in 5 cm Tiefe zu erkennen. In beiden Schichten sind

nur Teilbereiche der Kokosfasern mit Biofilmen belegt. Die Hauptorganismen dieser Biofilme stellen Kieselalgen dar (Abb. 3.14). Zwischen den Kokosfasern befindet sich poröses, nicht faserförmiges Material, das pflanzlichen Ursprungs zu sein scheint

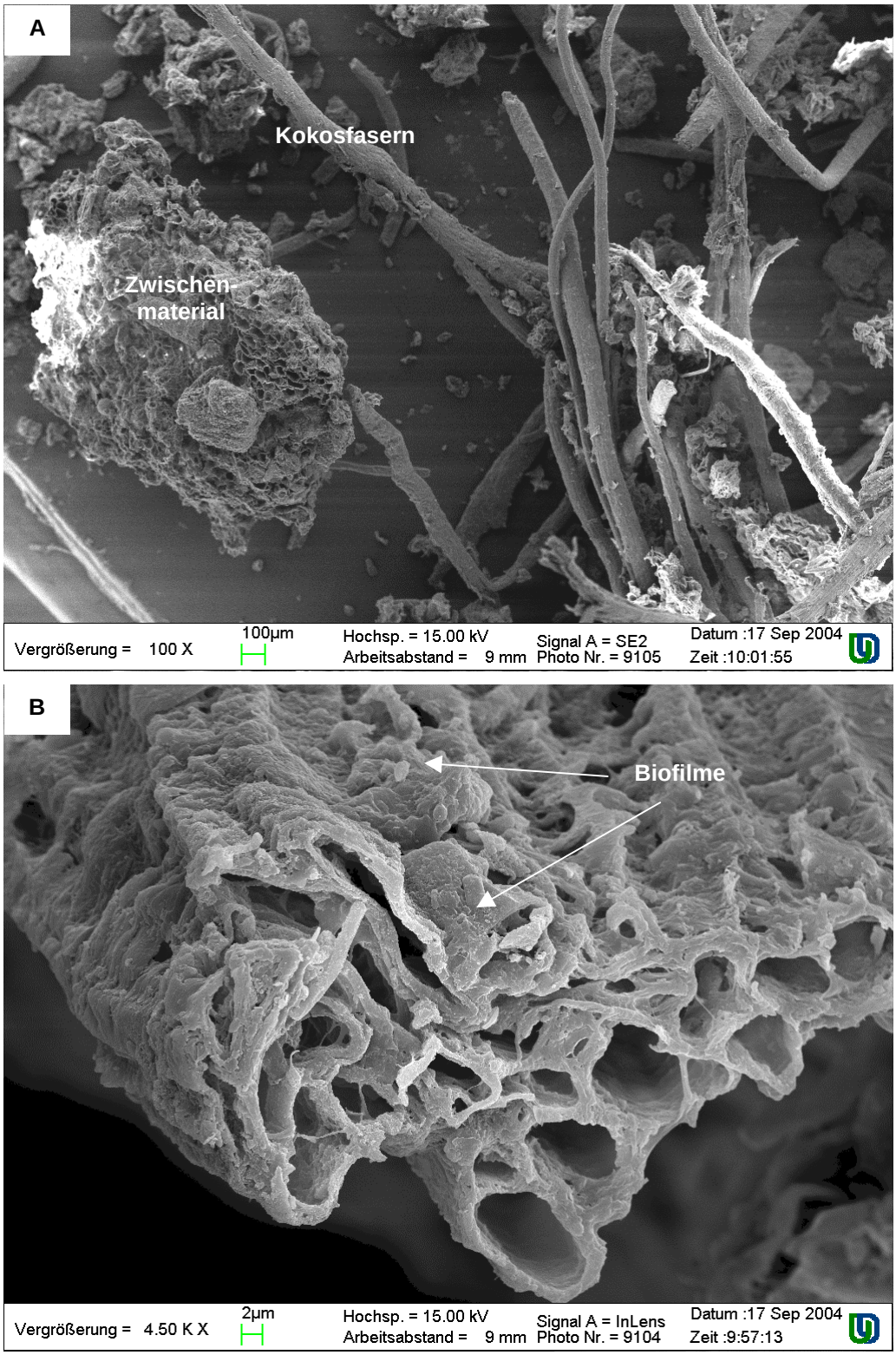


Abbildung 3.13: Kokosfasern und poröses Zwischenmaterial. A: Übersicht; B: Detailaufnahme des Zwischenmaterials.

und zu dem Ausgangsmaterial der Kokosfasern zugehörig scheint (Abb. 3.13). Dieses Material weist ebenso wie die Kokosfasern Belegungen mit Biofilmen auf.

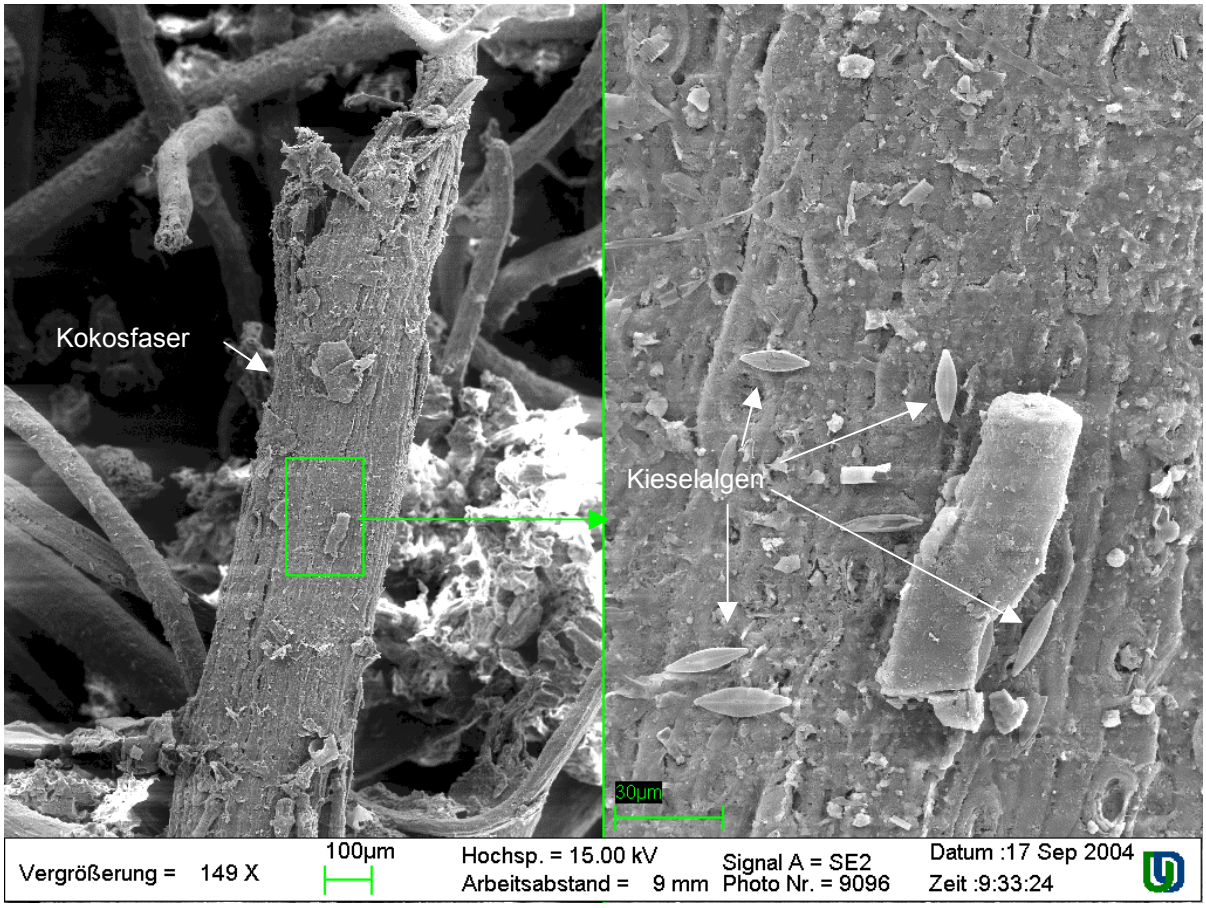


Abbildung 3.14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer repräsentativen Kokosfaseroberfläche, die teilweise mit Kieselalgen belegt ist.

3.3.1.3 Trockenmassen und Glühverluste der Filtermaterialien

Von allen Filtermaterialien wurden die Trockenmassen und Glühverluste bestimmt. Die Trockenmassen aller Proben bestehen zum größten Teil aus Filtermaterialien, die Biofilme haben nur einen geringen Anteil. Der Glühverlust entspricht für Glasgranulat und Sand dem Anteil der organischen Masse, also des Biofilms auf den Filtermaterialien. Dieser Anteil ist bei Kokosfasern nicht als Glühverlust bestimmbar, weil Kokosfasern selbst organischen Ursprungs sind und somit in den Glühverlust eingehen.

Bei den Versuchsfiltern lag der prozentuale Anteil der organischen Masse am Feuchtgewicht in den Schmutzdecken zwischen 0,40% und 3,07% und in den Schichten in 5 cm Tiefe zwischen 0,04% und 0,71%. Die Anteile der organischen Masse und der Wassergehalt waren in den Schmutzdecken aller Filter bis zu 10mal höher als in der Schichten in 5 cm Tiefe. Der Wassergehalt der Kokosfasern war mit 70-80% deutlich höher als der Wasseranteil der anorganischen Filtermaterialien, der bei 3-30% lag.

Aus dem kommerziell betriebenen Langsamsandfilter der RWW wurden zusätzlich zu der Schmutzdecke und der Schicht in 10 cm Tiefe die Schichten aus 30 cm und 55 cm Tiefe untersucht. Die Anteile der organischen Masse der Schichten aus 10 cm, 30 cm und 55 cm Tiefe waren mit etwa 0,5% um das 10fache geringer als in der Schmutzdecke (Abb. 3.15).

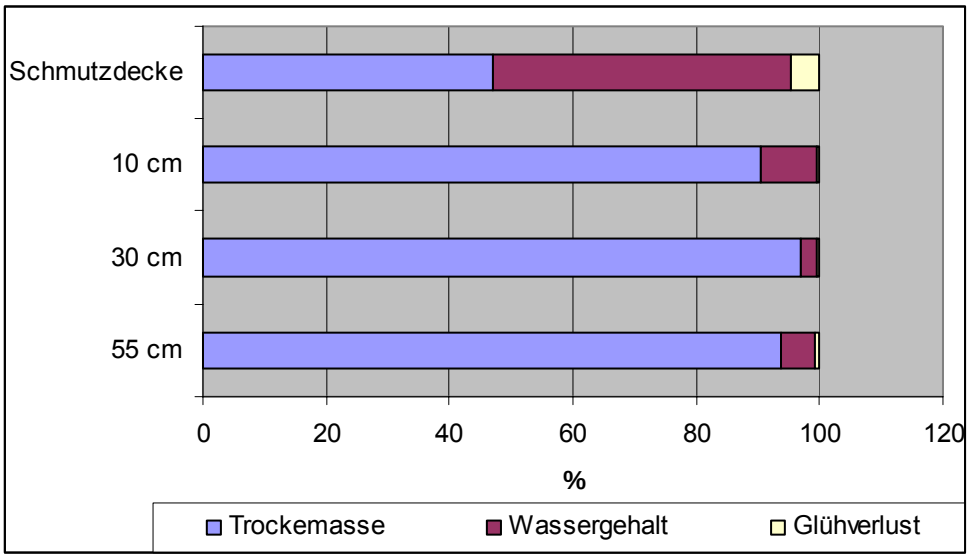


Abbildung 3.15: Trockenmasse, Wassergehalt und Glühverluste der Filtermaterialproben aus verschiedenen Tiefen des RWW-Langsamsandfilters.

3.3.1.4 Gesamtzellzahlen, Anzahl der koloniebildenden Einheiten und Anteil EUB338-markierter Zellen

- **Gesamtzellzahlen und koloniebildende Einheiten**

Die Anzahl der vorhandenen Bakterien und deren kultivierbarer Anteil sind klassisch mikrobiologische Parameter. Diese Parameter sind von Interesse, um einen ersten Überblick über die Menge der vorhandenen Bakterien in den aktiven Schichten von Filtern zu erlangen, die unter verschiedensten Rahmenbedingungen betrieben wurden. Für alle Filtermaterialproben wurden daher die Gesamtzellzahlen (GZZ) und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar bestimmt. Beide Parameter wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf die Oberfläche der Filtermaterialien (m²) bezogen. Die Oberflächen von Sand und Glasgranulat wurden mit Hilfe der Siebkurven und der Annahme berechnet, dass es sich um kugelförmige Körner bzw. Granulate handelt. Bei den Kokosfasern gingen die Dichte der gequollenen, gepackten Fasern, der durchschnittliche Faserdurchmesser sowie die durchschnittliche Faserlänge in die Berechnung ein. Diesen Berechnungen zufolge haben das Filtermaterial Sand eine Oberfläche von 4,12 m²/kg (Trockengewicht), Glasgranulat von 2 m²/kg (Trockengewicht) und die Kokosfasern mit 98,7 m²/kg (Trockengewicht) die mit Abstand größte Oberfläche der verwendeten Filtermaterialien.

Die Gesamtzellzahlen aller untersuchten Proben lagen zwischen 10^9/m² und 10^{13}/m², die Anzahl der KBE zwischen 10^7/m² und 10^{11}/m². In den Schmutzdecken aller untersuchten Filter waren die GZZ/m² und die Anzahl der KBE/m² 0,5-2 log-Stufen höher als in den tieferen Filterschichten (5 cm-55 cm Tiefe).
Das Tiefenprofil des RWW-Filters zeigt, dass die Gesamtzellzahlen und die Anzahl der KBE in den Tiefen von 10 cm, 30 cm und 55 cm etwa gleich waren (Abb 3.16).

In den meisten der untersuchten Proben zählten 0,1% bis 10% der durch die Gesamtzellzahl-Bestimmung eindeutig detektierten Bakterienzellen zu heterotrophen Bakterien, die bei 20°C auf R2A-Agar Kolonien ausbildeten.

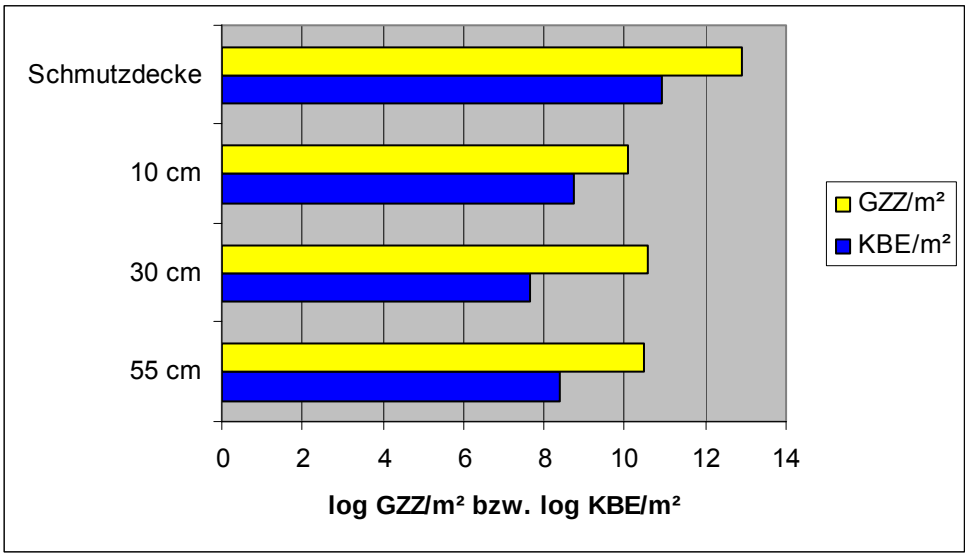


Abbildung 3.16: GZZ und Anzahl der KBE der Filtermaterialproben aus dem RWW-Langsamsandfilter.

- **Anteil EUB338-markierter Zellen an der Gesamtzellzahl**

Bei der Anzahl der KBE handelt es sich um die unter den gewählten Bedingungen kultivierbaren Bakterien. Dieser Parameter sagt jedoch nichts aus über die Aktivität der vorhandenen Bakterien. Zur Aktivitätsbestimmung der Bakterien wurde die FISH-Technik genutzt. Eine Voraussetzung für ein detektierbares Signal mit der FISH-Technik ist eine hohe Anzahl an Zielstrukturen, die in den Ribosomen lokalisiert sind. Stoffwechselaktive Zellen verfügen über hohe Kopienzahlen an Ribosomen. Bei Verwendung der *Bacteria*-spezifischen Sonde (EUB338) stellen die markierten Zellen somit eine Gruppe stoffwechselaktiver, permeabler *Bacteria*-Zellen dar.

In den Schmutzdecken aller untersuchten Filter war der Anteil EUB338-markierter Zellen höher als in den Schichten in 5 cm bis 55 cm Tiefe (Abb. 3.17). Dieser Anteil lag in den Schmutzdecken und Auflageschichten bei 50-90% und in den tieferen Schichten (5 cm bis 55 cm Tiefe) bei 15-60% (Ausreißerwerte bei 80%).

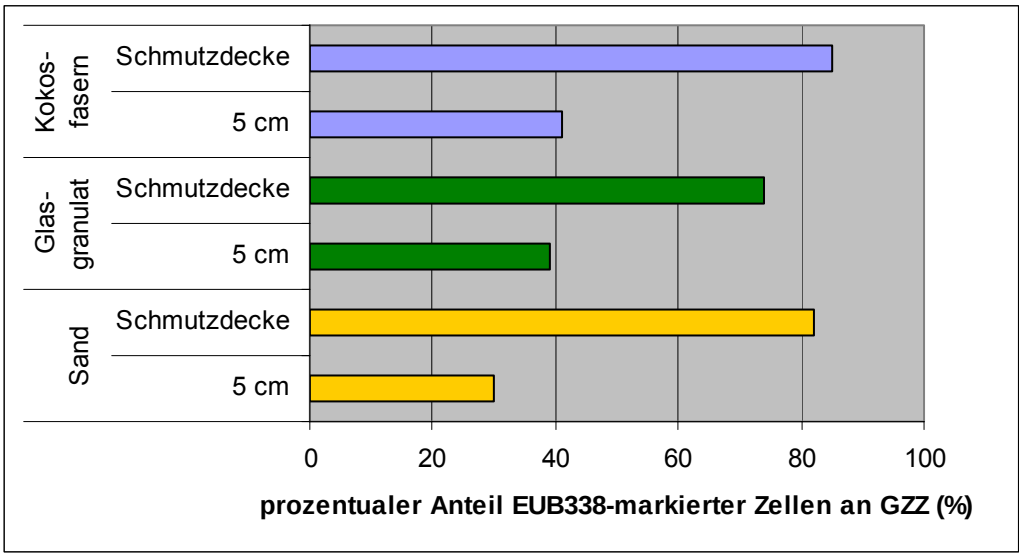


Abbildung 3.17: Anteil der EUB338-markierten Zellen an der GZZ in den Filtermaterialien der Versuchsfilter zur Untersuchung verschiedener Filtermaterialien (Betriebstemperatur 30°C).

3.3.1.5 Esterase-Aktivität

Esterasen werden von allen Lebewesen gebildet, um vorhandene Nährstoffe verfügbar zu machen. Die Esterase-Aktivität lässt daher auf die Aktivität der gesamten Biozönose schließen.

Da die Anteile der KBE und der EUB338-markierter Zellen an der GZZ in allen untersuchten Filtern die gleichen Tendenzen zeigten, wurde die Esterase-Aktivität in zwei repräsentativen Versuchsanlagen (Glasgranulat- und Sand-Lysimeter und Versuchsfilter zur Untersuchung des Algenwachstums) bestimmt.

Die Esterase-Aktivität wird indirekt durch die Produktmenge der von der Esterase katalysierten Reaktion bestimmt. Die Menge des gebildeten Produktes Fluorescein ist abhängig von der Menge und Aktivität der vorhandenen Esterase. Die ermittelten Fluoresceinwerte wurden – analog zu den GZZ und den Anzahlen der KBE – auf die Oberflächen (m²) der Filtermaterialien bezogen, um einen Vergleich zu ermöglichen.

Als Substrat wurde Fluoresceindibutyrat verwendet, das sich nach Küpper *et al.*, 1999 am besten eignet, da es gegenüber abiotischen Einflüssen eine höhere Stabilität als Fluoresceindiacetat aufweist.

In den Schmutzdecken ist die Esterase-Aktivität 2- bis 20mal höher als in den jeweils entsprechenden Schichten in 5 cm Tiefe. Die mit Abstand höchste Esterase-Aktivität weist die Schmutzdecke des Glasgranulat-Lysimeters auf (Abb. 3.18).

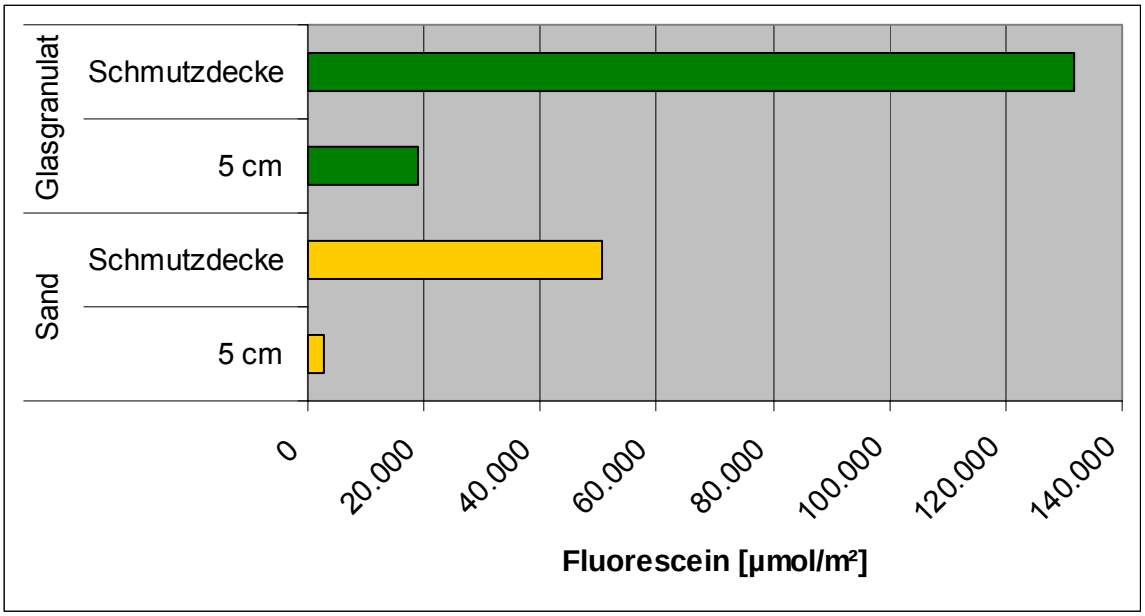


Abbildung 3.18: Esterase-Aktivitäten in den Filtermaterialien Sand und Glasgranulat der Lysimeter (Wassertemperatur 30°C).

3.3.2 Vergleich der Diversität und Zusammensetzung von Bakterienpopulationen in unterschiedlich betriebenen Langsamsandfiltern

Die Diversität und Zusammensetzung von Bakterienpopulationen der Langsamsandfilter, die unter verschiedenen Rahmenbedingungen betrieben wurden, sollten untersucht und verglichen werden. Um alle, auch die nicht-kultivierbaren Bakterien zu erfassen, wurden für diese Analysen molekularbiologische Methoden gewählt. Mittels amplifizierter rDNS Restriktionsanalyse (ARDRA) sollte ein Einblick in die Diversität und die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen erlangt werden. Zur Quantifizierung bedeutender Bakteriengruppen wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) verwendet.

3.3.2.1 Amplifizierte rDNS Restriktionsanalyse (ARDRA) von 16S-Klonen

ARDRA ermöglicht die Untersuchung der phylogenetischen Verwandtschaft unbekannter Mikroorganismen anhand von Sequenzeigenschaften ihrer 16S rRNS-Gene (Erläuterung der ARDRA-Methodik in Kapitel 2.2.3.7, S. 45). Damit die 16S rRNS-Gene einzelner Bakterien einer Mischprobe für die Untersuchungen zugänglich waren, wurden sie zunächst durch den Schritt der Klonierung vereinzelt. Es entsteht eine so genannte 16S Clone Library. Für jede zu untersuchende Probe wurde eine solche Clone Library angelegt.

Zunächst wurde die ARDR-Analyse mit Referenzstämmen der institutseigenen Stammsammlung und der DSMZ durchgeführt. In dieser Phase wurden vier Restriktionsenzyme, *Cfo*I, *Dde*I, *Msp*I und *Sau*3AI, eingesetzt (Vinuesa *et al*., 1998). Es sollte geprüft werden, welche Enzyme geeignet und wie viele notwenig sind, um Bakterien verschiedener taxonomischer bzw. phylogenetischer Gruppen anhand der ARDRA-Ergebnisse unterscheiden zu können. Zusätzlich zu den ARDRA-Versuchen wurden Modellrestriktionen mit Hilfe von Internetdatenbanken (NCBI: GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences und Web-Cutter: http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/) durchgeführt. Die Modellrestriktionen dienten der Bestimmung der gattungsspezifischen Banden der Referenzstämme. Nur die durch Modellrestriktion bestätigten Banden gingen in die weitere Auswertung ein.

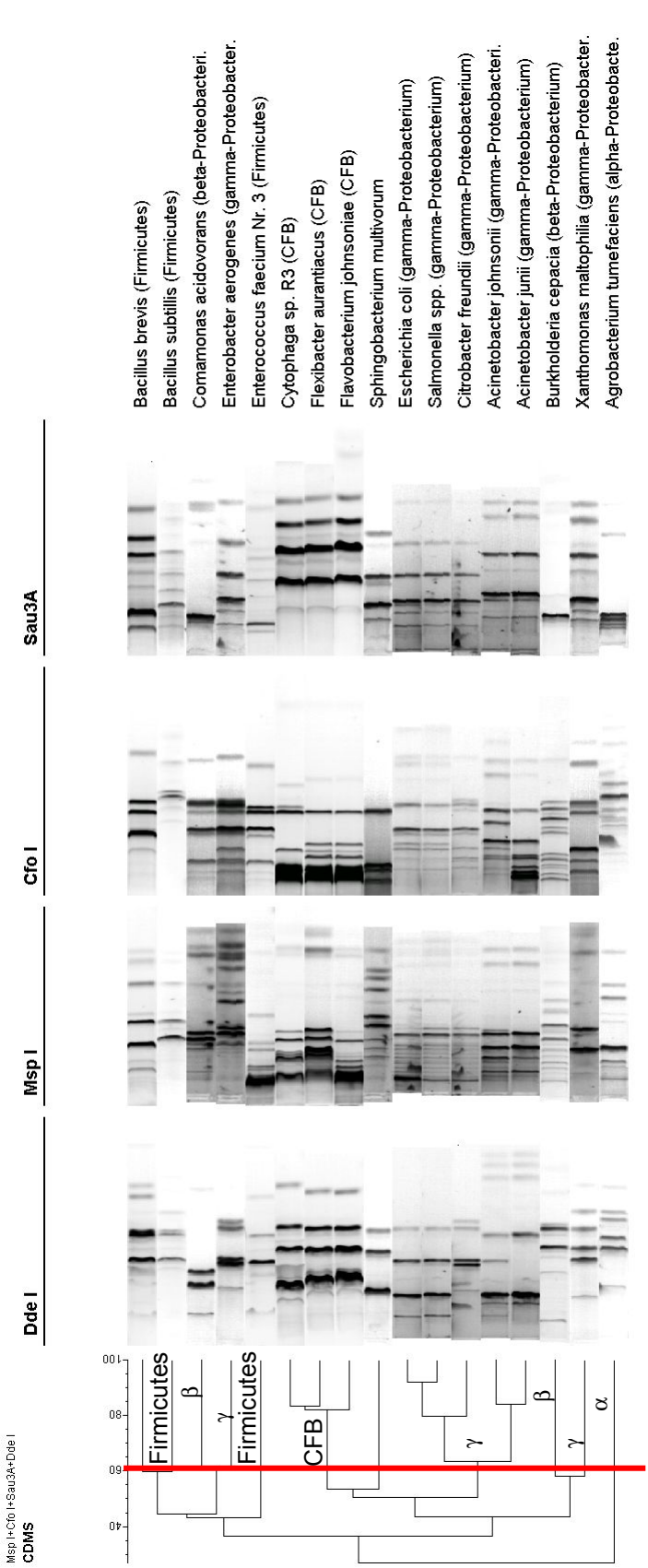


Abbildung 3.19: Dendrogramm der institutseigenen und DSMZ-Referenzstämme. Die Berechung des Dendrogramms beruht auf den Restriktionsbanden der Endonukleasen *Dde*I, *Msp*I, *Cfo*I und *Sau*3AI, die nach der UPGMA-Methode verglichen wurden.

Der Vergleich der ARDRA-Banden erfolgte mit der Software BioNumerics auf der Grundlage von UPGMA (s. Kapitel 2.1.8, S. 31). Das sich daraus ergebende

Dendrogramm für die Referenzstämme ist in Abbildung 3.19 zu sehen. In diesem Dendrogramm bilden Bakterienstämme, die der gleichen taxonomischen bzw. phylogenetischen Gruppe angehören, ein Cluster mit einer Ähnlichkeit von ≥ 60%.

Das Dendrogramm der Referenzstämme, das anhand der ARDRA-Daten aller vier Restriktionsenzyme berechnet wurde, und das Dendrogramm, dessen Berechnung auf den Bandenmuster von nur zwei Enzyme, *Dde*I und *Msp*I, basiert, zeigen eine ähnliche Clusterbildung (Abb. 3.20). Für die vergleichenden ARDR-Analysen dieser Arbeit wurden daher zwei Endonukleasen als ausreichend eingestuft. Die Enzyme *Dde*I und *Msp*I haben sich als geeignet für die Analysen erwiesen.

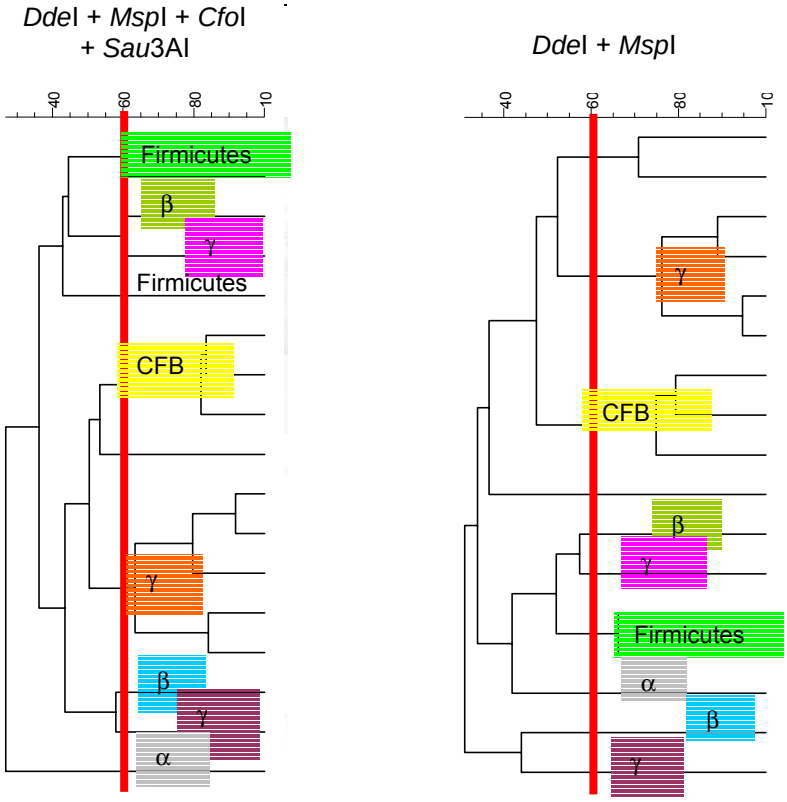


Abbildung 3.20: Dendrogramme der Referenzstämme, die auf den ARDRA-Daten von vier (links) und zwei Restriktionsendonukleasen beruhen (rechts)

Die 16S rRNS-Gene von mindestens 52 bis maximal 125 Klonen jeder Library wurden mit den Enzymen *Dde*I und *Msp*I verdaut. Die Auswertung der entsprechenden ARDRA-Daten erfolgte analog zu den Referenzstämmen mit Hilfe der Software BioNumerics.

Klone einer Library, deren Restriktionsbanden eine sichtbar signifikante Ähnlichkeit aufwiesen und deren Ähnlichkeit nach UPGMA-Berechnung bei ≥80% lag, wurden als eine Gruppe definiert. Jeweils ein repräsentativer Klon einer Gruppe ging in die weiteren Vergleichsanalysen ein. Die Bildung der Gruppen ist am Beispiel der Clone Library 1.b in der Abbildung 3.21 dargestellt.

Entsprechend der Ergebnisse der Referenzstämme wurden die Klone einer Library, die eine Ähnlichkeit ≥ 60% aufwiesen, zu einem Cluster. Die Einteilung in Cluster und Gruppen erfolgte in Anlehnung an Lagacé *et al*., 2004.

Die Anzahl der untersuchten Klone pro Library war unterschiedlich. Um die Cluster- und Gruppenanzahlen miteinander vergleichen zu können, wurden Cluster- und Gruppen-Quotienten bestimmt. Der Cluster- bzw. Gruppenquotient einer Library berechnet sich, indem man die Anzahl der Cluster bzw. der Gruppen durch die Anzahl der untersuchten Klone teilt. Je größer diese Quotienten sind, umso größer ist die phylogenetische Diversität einer Library. Ein weiteres Charakteristikum der Clone Libraries ist die Anzahl dominanter Cluster und Gruppen sowie deren taxonomische Einordnung (Tab. 3.11).

Die Cluster- und Gruppenquotienten der Libraries nehmen mit ansteigender Betriebstemperatur ab. Demnach nimmt mit ansteigender Betriebstemperatur die bakterielle Diversität in den aktiven Filterschichten ab. Die Schmutzdecke des RWW-Filters hat einen kleinen Cluster-, aber einen hohen Gruppenquotienten. Dies deutet darauf hin, dass eine hohe Anzahl verschiedener Arten vorkommt, die zu einer geringen Anzahl an Klassen und Ordnungen zählen.

Mit Ausnahme der Library der Schmutzdecke bei 20°C verfügen alle untersuchten Libraries über ein bis vier dominante Cluster. Die Klone der meisten dieser Cluster zählen zu den *Proteobacteria*. Dominante Gruppen sind in allen Libraries mit Ausnahme der Library des RWW-Filters vorhanden. Auch einige dieser Gruppen konnten den *Proteobacteria* zugeordnet werden. Weitere dominante Gruppen zählen zu den grampositiven Bakterien sowohl mit niedrigem als auch mit hohem GC-Gehalt, den *Nitrospira* sowie dem Reich TM6.

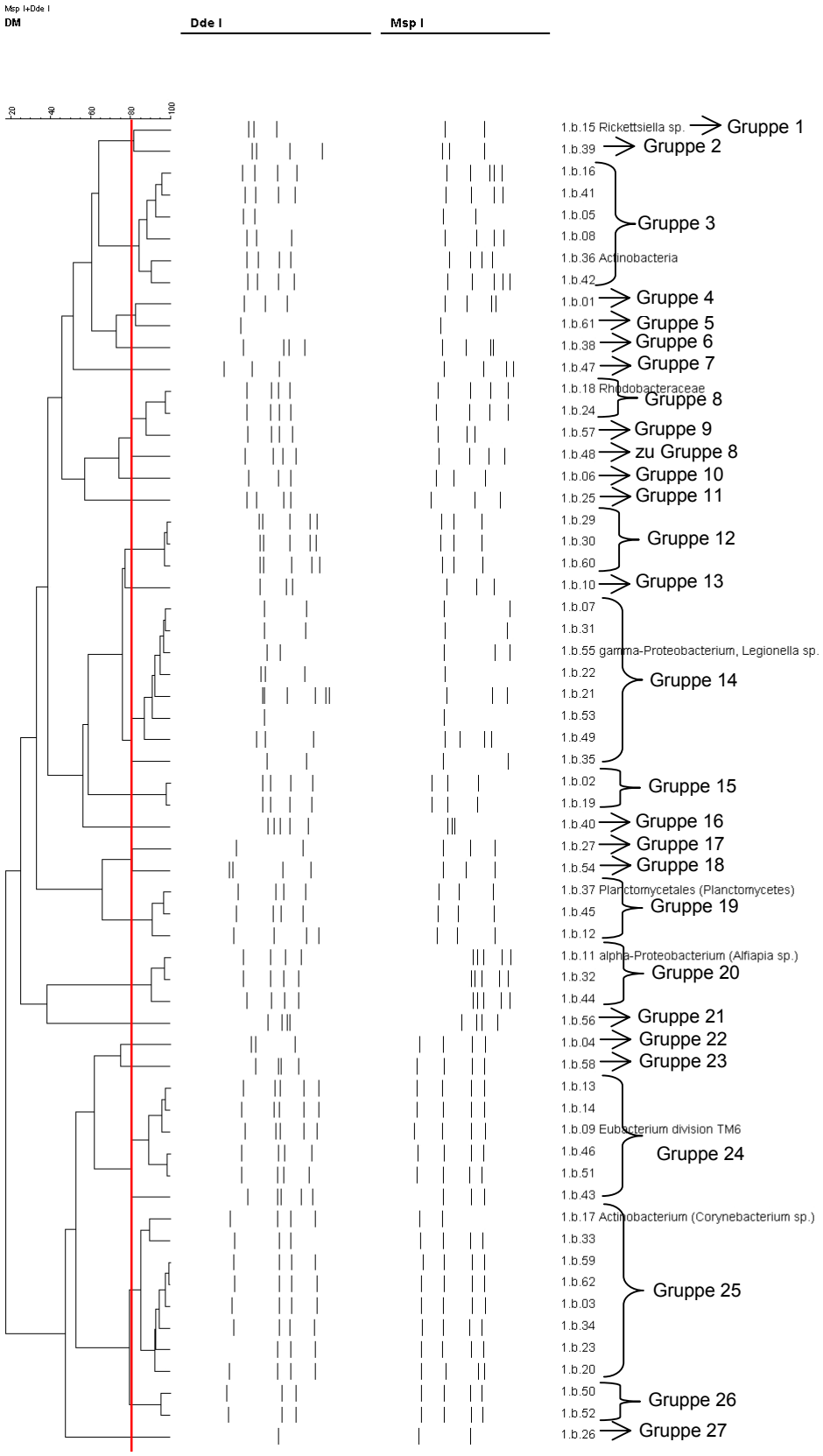


Abbildung 3.21: Zusammenfassung von Klonen zu einer Gruppe am Beispiel der Clone Librabry 1.b.

Tabelle 3.11: Charakteristika der Cluster und Gruppen

Library	Cluster-Quotient	dominante Cluster (Anzahl & taxonomische Zuordnung)	Gruppen-Quotient	dominante Gruppen (Anzahl & taxonomische Zuordnung)
Schmutzdecke, 5-10°C	0,24	1; 1x β-*Proteobacteria*	0,52	2; 2x β-*Proteobacteria*
Schmutzdecke, 20°C	0,21	0	0,44	4; 2x Gram-positive *Bacteria* mit hohem GC-Gehalt, 1x α-*Proteobacteria*, 1x Reich TM6
Schmutzdecke, 30°C	0,15	1; Gram-positive *Bacteria* mit niedrigem GC-Gehalt	0,39	2; 1x *Nitrospira*, 1x n.b.
Schmutzdecke, RWW-Filter	0,20	4; 1x α-*Proteobacteria*, 1x β-*Proteobacteria*, 1x *Proteobacteria*, 1x Gram-positive *Bacteria* mit hohem GC-Gehalt	0,62	0

n.b.= nicht bestimmt

Je zwei Libraries wurden miteinander verglichen und auf Ähnlichkeiten in Form gemeinsamer Cluster, gemeinsamer Gruppen und identischer Klone untersucht. Der Ähnlichkeitsgrad von zwei Libraries wurde in Ähnlichkeitsindizes ausgedrückt (Tab. 3.12). Die Berechnung der Ähnlichkeitsindizes ist in Kapitel 2.2.3.8, S. 46 beschrieben.

Die Ähnlichkeitsindizes der Libraries Schmutzdecke, 5-10°C/Schmutzdecke, 20°C und Schmutzdecke, 5-10°C/Schmutzdecke, 30°C sind deutlich kleiner als der Ähnlichkeitsindex der Libraries Schmutzdecke, 20°C/Schmutzdecke, 30°C (Tab. 3.12). Somit haben die Clone Libraries der Versuchsfilter, die bei 20°C und 30°C betrieben wurden, mehr Gemeinsamkeiten miteinander als die der Clone Library des Filters, dessen Betriebstemperatur bei 5-10°C lag.
Die Clone Library des kommerziell betriebenen RWW-Filters hat am meisten Ähnlichkeit mit der Library des Versuchsfilters, der bei einer Temperatur von 5-10°C betrieben wurde (Tab. 3.13).

Tabelle 3.12: Ähnlichkeitsindizes der Clone Libraries: Vergleich der bakteriellen Populationen in den Schmutzdecken von Sandfiltern, die bei verschiedenen Temperaturen betrieben werden.

	5-10°C	20°C	30°C
5-10°C	/	13	18
20°C		/	28
30°C			/

Tabelle 3.13: Ähnlichkeitsindizes der Clone Libraries: Vergleich der bakteriellen Populationen in den Schmutzdecken von Sandfiltern, die bei verschiedenen Temperaturen betrieben werden, mit der Population in der Schmutzdecke des RWW-Filters.

	5-10°C	20°C	30°C
RWW-Filter	50	40	39

Zur taxonomischen Einordnung der Klone wurden die ARDRA-Daten der Clone Libraries mit denen der Referenzstämme verglichen und auf Ähnlichkeiten untersucht. Je nach Ähnlichkeitsgrad konnten Klone taxonomisch eingeordnet werden, wie es am Beispiel der 1.c-Klone in der Abbildung 22 gezeigt ist.

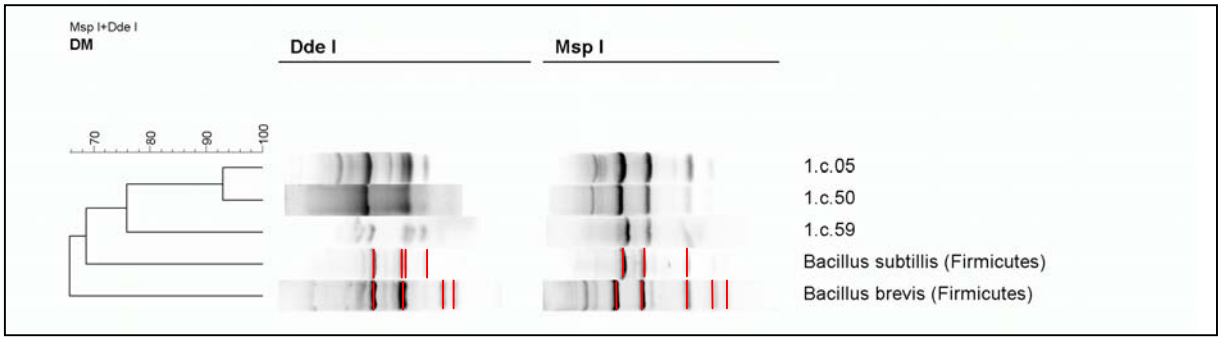


Abbildung 3.22: ARDRA-Banden und Dendrogramm der Referenzstämmen *Bacillus subtilis* und *Bacillus brevis* (Art-spezifische Banden markiert) und Klone der 1.c – Library. Die abgebildeten 1.c-Klone können aufgrund der signifikanten Ähnlichkeit zu den *Bacillus*-Referenzstämmen der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden.

Zur weiteren taxonomischen Einordnung wurde das erste Drittel (ca. 500 Basen) der 16S rRNS-Gene von Klonen, die für Cluster oder Gruppen repräsentativ waren, sequenziert. Die daraus erhaltenen Sequenzen wurden mit den Sequenzen der NCBI-Datenbank unter Zuhilfenahme des BLAST-Programms (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool) verglichen (Tab. 3.14, 3.15).

Tabelle 3.14: Ergebnisse der Sequenzvergleiche für die Klone, die den ***Proteobacteria*** zugeordnet werden konnten

Klon	taxonomische Einordnung	Zugangs-nummer NCBI	nächster phylogenetischer Verwandter	Ähnlich-keit (%)	gefunden in
1.a.02	*Comamonadaceae*, β-*Proteobacteria*	AJ556799	*Comamonadaceae* bacterium MWH55 partial 16S rRNA	99	Süßwasserplankton
1.a.11	*Stenotrophomonas* sp., γ–*Proteobacteria*	AJ495804	*Stenotrophomonas* sp. P1A	100	antarktischer Boden
1.a.58	β-*Proteobacteria, Bacteria*	AY187343	uncultured bacterium clone csbio 160307	99	Biofilme in Trinkwasser
1.b.11	α-*Proteobacteria*	AJ300771	Afipia sp. LMG 19832	100	Reaktor für die Denitrifikation von Trinkwasser
1.b.15	*Rickettsiella* sp., γ-*Proteobacteria*	AY447040	*Rickettsiella* symbiont of *Asellus aquaticus* clone 7	100	Symbionten des Süßwasser-Isopoden *Asellus aquaticus* (Crustacea: Asellota)
1.b.18	*Rhodobacter* sp., α-*Protoebacteria*	AB017796	*Rhodobacter* sp. TCRI 3 16S rRNA	96	/
3.a.52	α-*Proteobacteria*	AY820676	Uncultured bacterium clone CCSD_DF730_B1	100	Hochdruck Steine und Lösungen
3.a.54	α-*Proteobacteria*	AF502216	Uncultured bacterium clone HP1B39	99	Aktivschlamm
3.a.67	*Rickettsiella* sp., γ-*Proteobacteria*	AY447041	*Rickettsiella* Symbiont of *Asellus aquaticus* clone 10	99	Hepatopankreatische Symbiont im Süßwasser-Isopoden *Asellus aquaticus* (Crustacea: Asellota)
3.a.87	α-*Proteobacteria*	U87784	*Afipia* genosp. 13	98	/
3.a.104	β-*Proteobacteria*	AJ421937	uncultured β-*Proteobacterium*	99	Biofilme eines verunreinigten Flusses
3.a.107	β-*Proteobacteria*	AJ421936	uncultured β-*Proteobacterium*	97	Biofilme eines verunreinigten Flusses
3.a.123	β-*Proteobacteria*	AF431292	Uncultured β-*Proteobacterium* clone S37.42SM	96	Boden aus dem Rhizosphärenbereich des British Columbia Forest

Tabelle 3.15: Ergebnisse der Sequenzvergleiche für die Klone, die **nicht** den ***Proteobacteria*** zugeordnet werden konnten

Klon-Nr.	taxonomische Einordnung	Zugangs-nummer NCBI	nächster phylogenetischer Verwandter	Ähnlich-keit (%)	gefunden in
1.a.30	*Bacillus* sp., *Firmicutes*	AY332220	*Bacillus* sp. GWS-TZ-H236	99	stehendes Wasser, Aggregate und Oberflächensediment e des Deutschen Wattenmeeres
1.b.17	*Actinobacteria*	AJ632133	Uncultured bacterium clone 65p27	97	Fischhaut und -kiemen
1.b.37	*Planctomycetes*		Uncultured planctomycete clone CY0ARA031E01	100	aerobes Becken einer städtischen Kläranlage
1.c.13	*Nitrospira* sp., *Nitrospirae*	Y14644	*Nitrospira* sp. strain GC86	99	Nitrit-oxidierender Bioreaktor
1.c.15	*Planctomycetes*	BX294863	Uncultured planctomycete clone CY0ARA032A03	99	aerobes Becken einer städtischen Kläranlage
1.c.43	*Planctomycetes*	BX294719	Uncultured planctomycete clone CY0ARA026B03	97	aerobes Becken einer städtischen Kläranlage
3.a.25	*Actinobacteria*	AY192288	uncultured *Actinobacterium* clone P2-1H	93	alpiner Boden aus den Colorado Rocky Mountains
3.a.27	*Actinobacteria*	AY192288	uncultured *Actinobacterium* clone P2-1H	96	alpiner Boden aus den Colorado Rocky Mountains
3.a.111	*Chloroflexi*	AY326634	uncultured soil bacterium clone 1067-1	96	Boden aus dem Amazonas

In die weiteren Auswertungen gingen nur die Ergebnisse ein, bei denen die Übereinstimmung der 16S-Sequenzen des untersuchten Klons mit dem nächsten verwandten Stamm der NCBI-Datenbanken größer als 90% war. In nur wenigen Fällen stimmte die 16S rDNS-Sequenz der untersuchten Klone zu 100% mit bereits bekannten Sequenzen überein.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem sequenzierten Klon um die nach BLAST-Angaben identifizierte Gattung, Familie oder Subklasse handelt, wurden - analog zu den Analysen der Referenzstämme - Modellrestriktionen durchgeführt. Nur bei Bestätigung des BLAST-Ergebnisses durch die Modellrestriktion wurde der Klon entsprechend des BLAST-Ergebnisses zugeordnet.

Das Habitat des nächsten phylogenetischen Verwandten nach NCBI-Auswertung ist für alle untersuchten Klone ein Boden/Sediment oder ein aquatisches System. Es

handelt sich bei den identifizierten Klonen also durchgängig um apathogene Umweltorganismen.

Aufgrund der Vergleiche mit den Referenzstämmen und der Sequenzergebnisse konnten etwa ein Drittel der untersuchten 16S-Klone taxonomisch eingeordnet werden. Diese Ergebnisse sollten einen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung der Bakterienpopulationen in den Langsamsandfilter-Biofilmen geben. Um die Anzahl der taxonomisch eingeordneten Bakterien zu erhöhen, wurden Libraries zusammengefasst. Eine sinnvolle Zusammenfassung war anhand der Ähnlichkeitsindizes möglich: Die Ergebnisse des Versuchsfilters, der bei 5-10°C betrieben wurde, und des RWW-Filters wurden zusammengefasst, ebenso wie die Ergebnisse aller Versuchsfilter, deren Betrieb bei 20-30°C erfolgte (Tab. 3.16).

Tabelle 3.16: Prozentuale Anteile der Klone an Hauptabstammungslinien

	Filter mit Betriebstemperatur 5-10°C	**Filter mit Betriebstemperatur 20-30°C**
Proteobacteria	27%	12%
Nitrospira	0%	6%
Gram-positive *Bacteria* mit niedrigem GC-Gehalt	1%	5%
Gram-positive *Bacteria* mit hohem GC-Gehalt	1%	4,5%
Cytophaga/Flavobacteria-Gruppe	1%	3%
Planctomyces	1,5%	2%
Bacteria Division TM6	0%	2%
Chloroflexus	1%	0%
nicht taxonomisch eingeordnet	67,5%	64,50%

Die meisten taxonomisch eingeordneten Bakterien zählen zu den *Proteobacteria*, wobei Vertreter der alpha-, beta- und gamma-Subklassen detektiert wurden. In den Filtern, deren Betrieb bei 5-10°C erfolgte, stellten die *Proteobacteria* das einzige Phylum dar, dem eine größere Anzahl der taxonomisch eingeordneten Bakterien angehörten. Eine größere Anzahl der 16S-Klone aus Filtern, deren Betriebstemperatur bei 20-30°C lag, konnte neben den *Proteobacteria* den Gram-

positiven Bakterien - sowohl mit hohem als auch mit niedrigem GC-Gehalt - und der Hauptabstammungslinie *Nitrospira* zugeordnet werden.

3.3.2.2 Populationsanalyse der Bakterien in Langsamsandfilter-Biofilmen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

- **Eignungsprüfung von CARD-FISH für die Probenmatrix der Filtermaterialien**

Die Filtermaterialproben waren zur Bestimmung des Anteils EUB338-markierter Zellen an der GZZ mit der klassischen FISH-Methode untersucht worden, wozu einfach fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet werden. Bei der mikroskopischen Auswertung dieser Proben fiel auf, dass das Fluoreszenzsignal vieler Bakterien schwach war. Dieses Problem ist für Umweltproben bekannt. Daher wurde eine neue FISH-Methode getestet, die bereits im aquatischen Bereich gute Ergebnisse lieferte (Pernthaler *et al*., 2002; Sekar *et al*., 2003). Bei dieser Methode werden Sonden verwendet, die mit der Meerrettich-Peroxidase (horse-radish peroxidase = HRP) markiert sind. Durch die Peroxidase wird das Tyramidsignal verstärkt, so dass die Fluoreszenzsignale einzelner Zellen stärker sind (Bobrow *et al*., 1989). Diese Methode wird als catalysed reporter deposition (CARD)-FISH bezeichnet.
Für die Eignungsprüfung von CARD-FISH wurden die Sonden EUB338 und HGC69a ausgewählt. Da mit der Sonde EUB338 ein Großteil der Organismen der Domäne *Bacteria* nachgewiesen werden, kann mit ihr geprüft werden, ob CARD-FISH für die vorliegende Probenmatrix der Filtermaterialien geeignet ist. Zusätzlich wurde die Sonde HGC69a verwendet, die spezifisch für Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt ist. Zu den Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt zählen wichtige Bodenorganismen, wie z.B. *Actinomyces* und *Streptomyces*. Viele grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt sind aufgrund ihrer geringen Größe – insbesondere bei der vorliegenden Hintergrundfluoreszenz und der Autofluoreszenz partikulärer Bestandteile des zu untersuchenden Probenmaterials – mit der einfachen FISH-Technik nicht nachweisbar.

Zur Kontrolle wurden Reinkulturen mitgeführt. Sie zeigten die erwarteten Ergebnisse (Abb. 3.23): Die Sonde EUB338 band sowohl an *E. coli* als auch an *Micrococcus*

luteus. Die Sonde HGC69a markierte dagegen nur *M. luteus* und nicht *E. coli*. Der Versuch war somit auswertbar.

Um die unspezifischen Fluoreszenzsignale so weit zu reduzieren, dass Bakterienzellen eindeutig erkannt werden konnten, mussten die Proben stark gebleicht werden. Dadurch konnten zwar die Fremdsignale im Wellenlängenbereich des Tyramids so gut wie vollständig eliminiert werden, aber die Signale der Bakterienzellen wurden ebenfalls signifikant verringert (Abb. 3.24). EUB338-markierte Zellen konnten in den Filtermaterialproben nur vereinzelt detektiert werden, HGC69a-markierte Zellen gar nicht. Die Fluoreszenzsignale des Farbstoffes DAPI waren sehr intensiv bei den nach CARD-FISH-Methodik behandelten Proben. Es war nicht möglich, die mit DAPI angefärbten Zellen eindeutig von den nicht-bakteriellen Bestandteilen der Probe zu unterscheiden.

Wie diese Versuche gezeigt haben, eignet sich CARD-FISH nicht für die vorliegende Probenmatrix der Filtermaterialien.

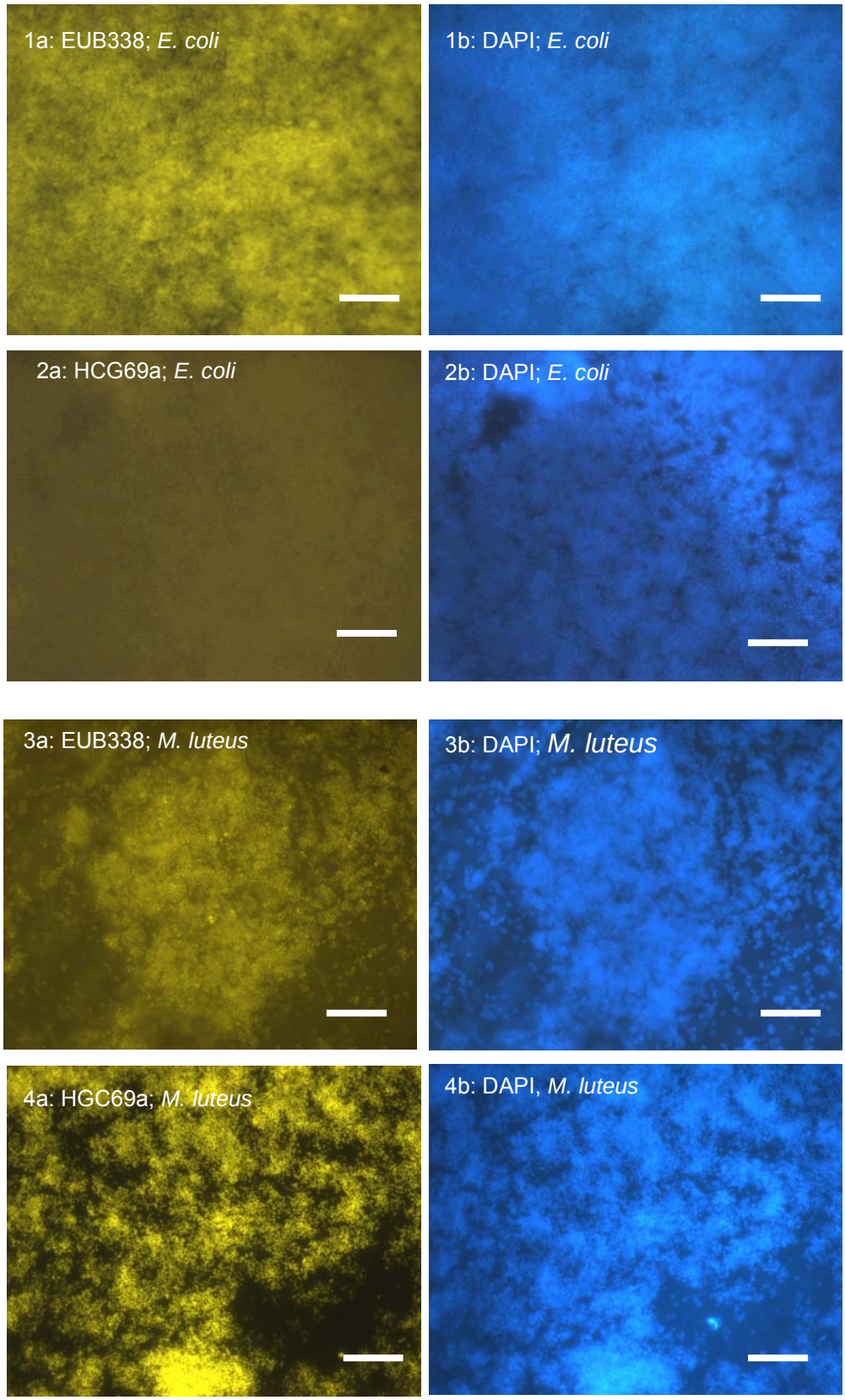


Abbildung 3.23: Epifluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kontrollansätze für CARD-FISH. In einer Reihe ist jeweils der gleiche Bildausschnitt von *E. coli*- und *M. luteus*-Reinkulturen mit den Sonden EUB338 bzw. HGC69a und DAPI (Referenzfarbstoff) zu sehen. Vergrößerung: 1000x, Maßbalken: 20 µm.

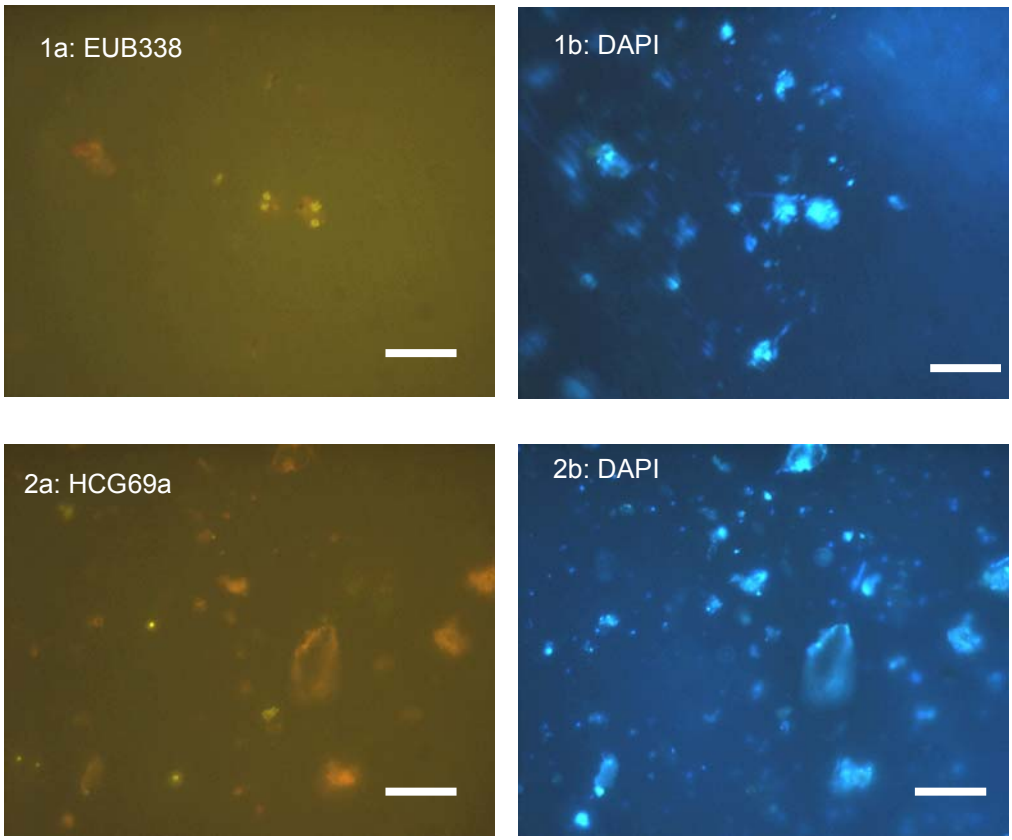


Abbildung 3.24: Epifluoreszenzmikroskopische Bilder der Filtermaterialprobe nach CARD-FISH. Einzelne Bakterien wurden weder durch die FISH-Sonden noch mit DAPI deutlich angefärbt. Die Bilder einer Reihe zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt. Vergrößerung: 1000x; Maßbalken: 20 µm.

- **Populationsanalyse der *Proteobacteria* mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)**

Die Auswertungen der ARDR-Analysen zeigten, dass *Proteobacteria* die bedeutendste Bakteriengruppe im Filterbett der Langsamsandfilter sind. Mit der ARDRA-Methode wurden Vertreter dominierender Bakteriengruppen erfasst. Eine quantitative Aussage ist aber allein durch diese Methode nicht möglich. Daher wurde zur Quantifizierung die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) gewählt.

In den Clone Libraries der Langsamsandfilter wurden Vertreter der alpha-, beta- und gamma-Subklassen der *Proteobacteria* nachgewiesen. Diese drei Subklassen wurden in repräsentativen Proben der Versuchsfilter quantifiziert. Bei den repräsentativen Proben handelt es sich um die Schmutzdecken der Versuchsfilter, die mit alternativen Filtermaterialien betrieben wurden, sowie die Schmutzdecken

und Schichten in 5 cm Tiefe der Lysimeter, die zur Untersuchung verschiedener Filtermaterialien im halbtechnischen Maßstab und der Versuchsfilter zur Untersuchung des Algenwachstums.

Die direkte Analyse der Bakterienpopulationen der Filtermaterialien war nicht möglich, da die Bakterien an den Oberflächen der Filtermaterialien hafteten und in Biofilmen integriert waren. Daher musste zunächst eine Methode angepasst werden, die die Bakterien von den Oberflächen der Filtermaterialien und aus den Biofilmen löst. Dies gelang durch die Kombination eines Abschüttelvorgangs mit anschließender Ultraschallbehandlung. Im nächsten Schritt wurden die Bakterienzellen durch Filtration konzentriert (modifiziert nach Pernthaler *et al.*, 2001). Anschließend konnten die Bakterienzellen durch die FISH-Methode mit Sonden, die spezifisch für die alpha-, beta- und gamma-Subklassen der *Proteobacteria* waren, markiert werden. Die quantitative Auswertung der FISH-Proben erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop. Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch mikroskopische Bilder einer Filtermaterialprobe. Zur Kontrolle entsprechend des Top-to-Bottom-Verfahrens und als Bezugsgröße wurden in jeder Probe neben einer Subklasse der *Proteobacteria* auch alle Zellen der Domaine *Bacteria* mit der Sonde EUB338 identifiziert und quantifiziert.

Die Anzahl der alpha-, beta- und gamma-*Proteobacteria* in den untersuchten Filtermaterialien ist in den Abbildungen 3.26, 3.27 und 3.28 als prozentualer Anteil der EUB338-markierten Zellen dargestellt.
Die prozentualen Anteile aller drei detektierten *Proteobacteria*-Subklassen an den *Bacteria*-Zellen sind in den Schmutzdecken der Lysimeter mit 35-55% deutlich höher als diese Anteile in den Schichten in 5 cm Tiefe der entsprechenden Filter (17-22%). Dieser Unterschied zwischen den Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe ist unabhängig vom Filtermaterial der Lysimeter (Abb. 3.26). In den Versuchsfiltern zur Untersuchung des Algenwachstums sind dagegen die Anteile der *Proteobacteria* an den *Bacteria*-Zellen in den Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe etwa gleich (22-25%; Abb. 3.28).
In den Schmutzdecken der Versuchsfilter, die bei 5-10°C betrieben wurden, sind die Anteile der *Proteobacteria* an den EUB338-markierten Zellen höher als in den

Versuchsfiltern, die bei 20°C und 30°C betrieben wurden. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Filtermaterialien zu sehen.

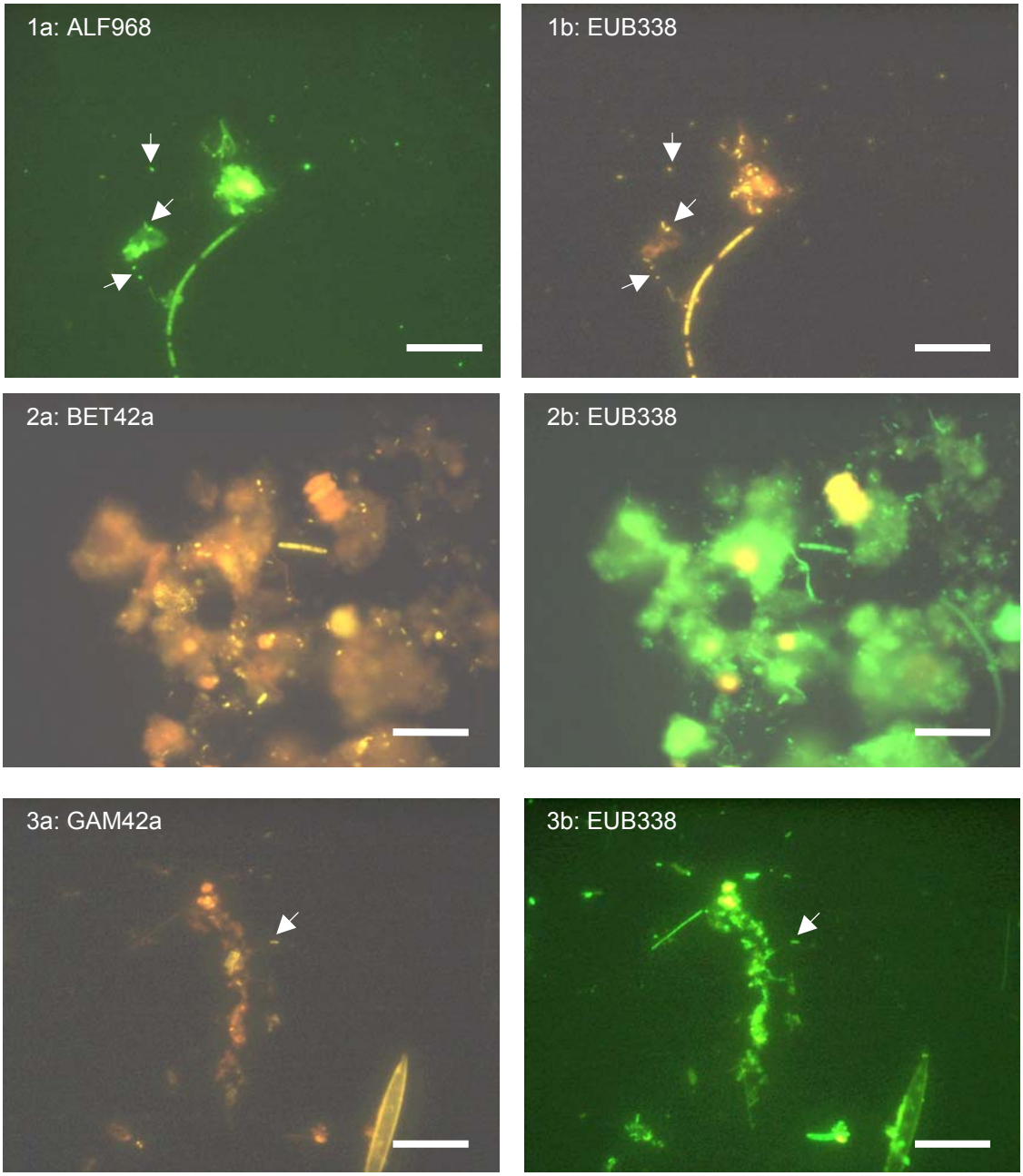


Abbildung 3.25: Epifluoreszenzmikroskopische Bilder der alpha- (ALF968), beta- (BET42a) und gamma- (GAM42a) *Proteobacteria* aus der Schmutzdecke des Kokosfaser-Lysimeters. Die Bilder einer Reihe zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt. Das linke Bild zeigt die Markierung mit der *Bacteria*-spezifischen Sonde, das rechte Bild die Markierung mit der Subklassen-spezifischen Sonde. Durch Pfeile sind einzelne alpha- und gamma-*Proteobacteria* kenntlich gemacht; auf eine Markierung der beta-*Proteobacteria* wurde aufgrund der hohen Anzahl verzichtet. Vergrößerung: 1000x, Maßbalken: 20 µm.

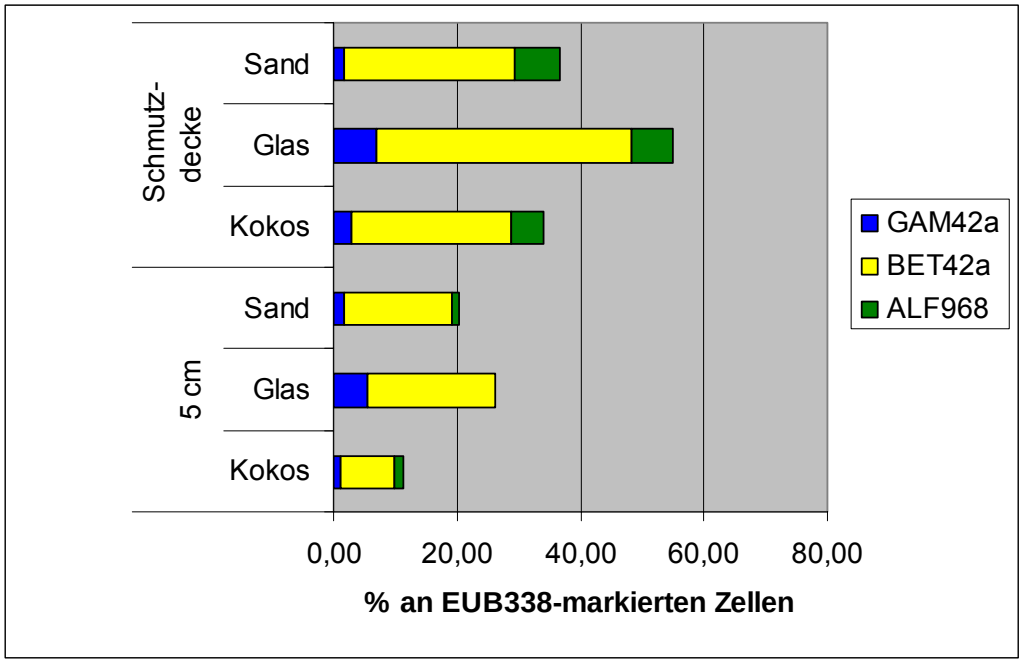


Abbildung 3.26: Anteil der alpha-, beta- und gamma-*Proteobacteria* an EUB338-markierten Zellen in den Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe der Kokosfaser- (Kokos), Glasgranulat- (Glas) und Sand-Lysimeter nach dreieinhalbmonatiger Filterlaufzeiten (Wassertemperatur: 30°C).

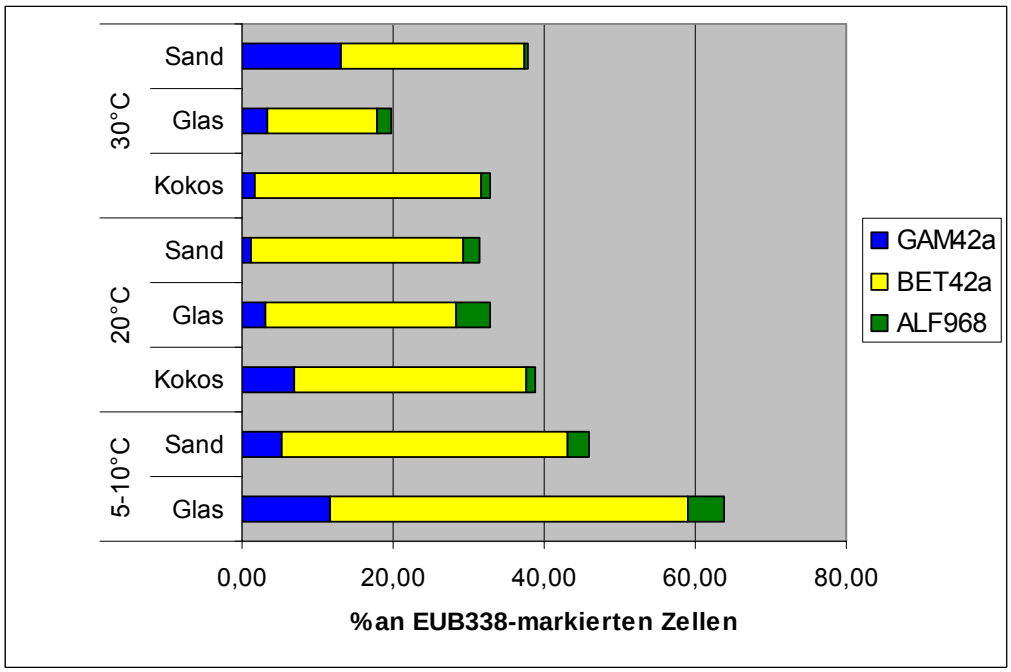


Abbildung 3.27: Prozentuale Anteile der alpha-, beta- und gamma-*Proteobacteria* an EUB338-markierten Zellen in den Schmutzdecken der Filtermaterialien Kokosfasern (Kokos), Glasgranulat (Glas) und Sand aus den Versuchsfilter, die für vier bis sechs Wochen bei 5-10°C, 20°C und 30°C betrieben wurden.

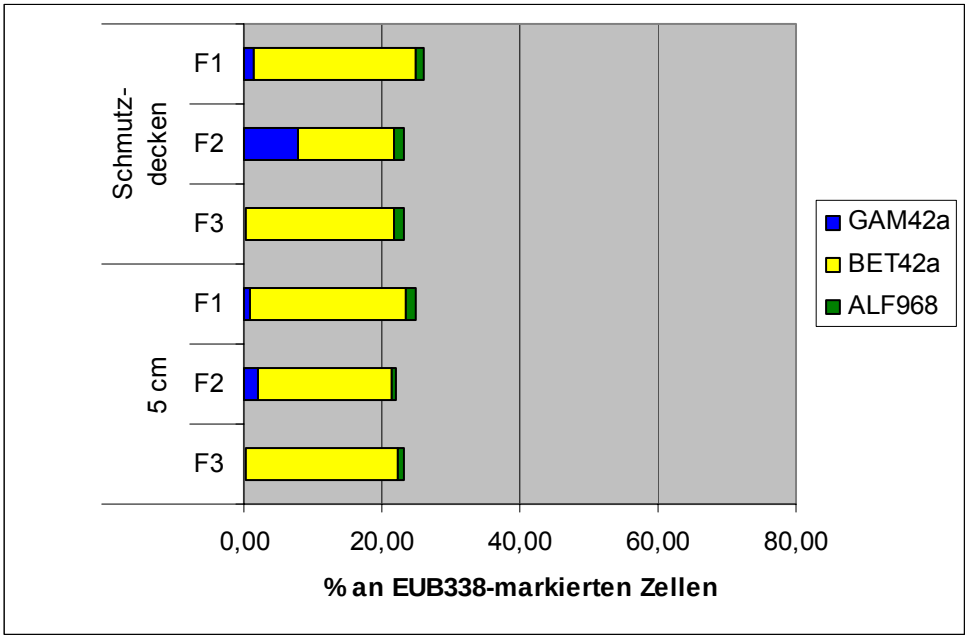


Abbildung 3.28: Prozentuale Anteile der alpha-, beta- und gamma-*Proteobacteria* an EUB338-markierten Zellen in den Schmutzdecken und Schichten in 5 cm Tiefe der Versuchsfilter zur Untersuchung des Algenwachstums nach dreineinhalbmonatiger Betriebszeit (Wassertemperatur 20°C).

In allen untersuchten Proben ist der Anteil der *Proteobacteria* der beta-Subklasse deutlich höher als die Anteile der *Proteobacteria* der alpha- und gamma-Subklassen. Die Ergebnisse aller FISH-Analysen wurden zusammengefasst und als durchschnittliche Anteile der alpha-, beta- und gamma-*Proteobacteria* in den oberen Schichten der Versuchsfilter dargestellt (Abb. 3.29). In den oberen Filtermaterialschichten der untersuchten Langsamsandfilter gehören durchschnittlich 31% der EUB338-markierten Zellen den alpha-, beta- und gamma-*Proteobacteria* an. Die größte Gruppe davon stellen mit durchschnittlich 25% die beta-*Proteobacteria*, wogegen die alpha-*Proteobacteria* mit 2% und die gamma-*Proteobacteria* mit 4% nur geringe Anteile ausmachen.

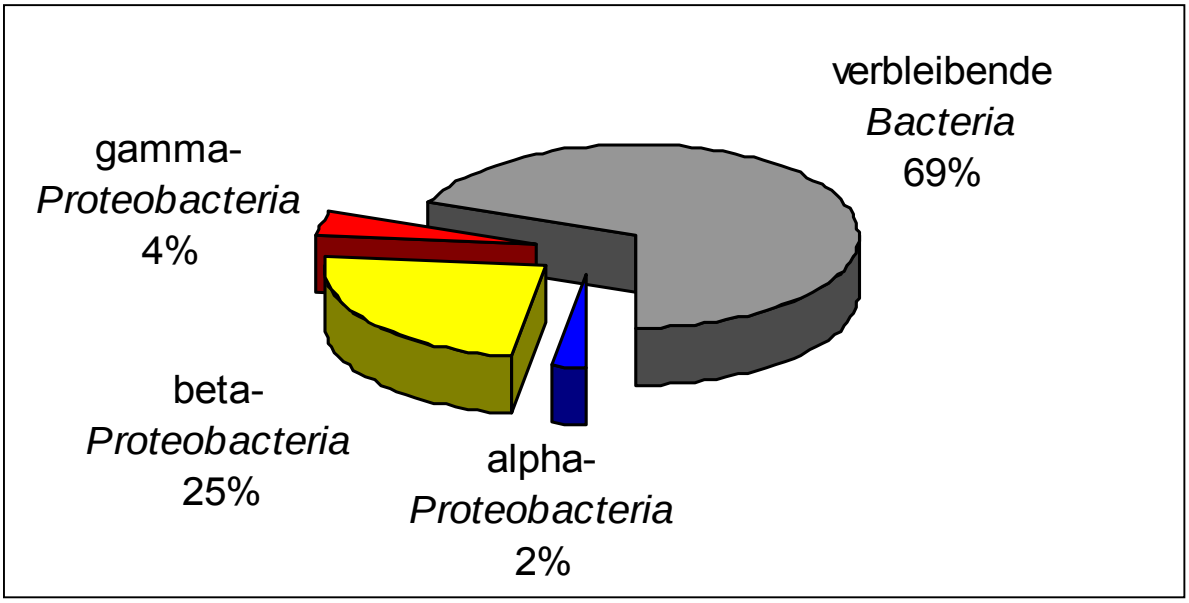


Abbildung 3.29: Durchschnittliche Anteile der alpha-, beta- und gamma-*Proteobacteria* an den *Bacteria*-Zellen in den Schmutzdecke und 5 cm-Schichten Filterschichten der Versuchfilter.

Sowohl die ARDRA- als auch die FISH-Analysen haben gezeigt, dass die *Proteobacteria* – insbesondere die beta-Subklasse - einen großen Anteil an der Bakterienpopulation aller untersuchten Filterschichten und Filtermaterialien unabhängig von den Betriebsparametern haben.

4. Diskussion

Die Langsamsandfiltration ist eine alte, effektive und weit verbreitete Methode der Trinkwasseraufbereitung. Sie wurde aus Ingenieursicht durch Änderung der Betriebsparameter optimiert. Die optimalen Voraussetzungen für die LSF sind: gering belastete Rohwässer (geringe Trübstoff- und DOC-Gehalte), das Vorhandensein geeigneter Sande als Filtermaterialien, geringe bis mittlere Temperaturen (5-15°C), Sonneneinstrahlungen von durchschnittlich kurzer Dauer sowie geringer Intensität und geringe bis mittlere Nährstoffgehalte in den Wässern. Unter diesen Bedingungen erzielen die Langsamsandfilter ökonomische Laufzeiten und optimale Rückhalteleistungen. Es treten in der Regel keine Algenblüten und keine hohen bakteriellen Produktivitäten auf, die zur schnellen Kolmation der Filter führen können. Die Betriebseigenschaften und Leistungen der Langsamsandfilter sind unter diesen optimalen Rahmenbedingungen bekannt. Änderungen dieser Bedingungen, wie schlechtere Rohwasserqualitäten und Sonneneinstrahlung von längerer Dauer sowie höherer Intensität, beeinflussen die Betriebseigenschaften und Leistungen der Filter negativ (Visscher, 1990; Collins *et al*., 1991; DVGW-Arbeitsblatt W213, Teil IV).

Die für die Leistungen der Filter grundlegenden biologischen Vorgänge im Filterbett sind nur im Ansatz untersucht. Bei der Optimierung der Langsamsandfiltration durch Änderungen der Betriebsparameter wurden die Vorgänge im Filterbett als „Black-Box“ behandelt. Daher ist über die Diversität und Zusammensetzung der Biozönose in Langsamsandfiltern wenig bekannt. Von besonderer Bedeutung für die biologischen Mechanismen ist die autochthone Bakterienpopulation der Langsamsandfilter-Biofilme. Es ist davon auszugehen, dass Änderungen in der autochthonen Bakterienpopulation auch die Filtereigenschaften und -leistungen beeinflussen, wie es für andere natürliche Habitate beschrieben ist (Griffiths *et al*., 2004). Zu Änderungen in der autochthonen Population kann es durch Modifikation der äußeren Einflüsse, die auf das offene System der Langsamsandfilter wirken, kommen.

Die Bakterienpopulationen von Langsamsandfiltern, die der Trinkwasseraufbereitung dienen, wurden bisher nur mittels kultureller Methoden untersucht (Calaway *et al*., 1952; Calaway, 1957; Bruces und Hawkes, 1983; Bahgat *et al*., 1999). Daher war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, einen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung der Bakterienpopulationen von Langsamsandfiltern mittels klassisch-mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden zu erlangen.

Dabei stand der Vergleich der Bakterienpopulationen von Langsamsandfiltern, die unter verschiedenen grenzwertigen bzw. nicht-optimalen Bedingungen betrieben wurden, im Fordergrund.

4.1 Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen durch Langsamsandfilter

4.1.1 Rückhalteleistungen von Langsamsandfiltern unter verschiedenen, nicht-optimalen Rahmenbedingungen

Das Hauptziel der Langsamsandfiltration ist die Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen. Daher wurden die Versuchsfilter zunächst anhand der Rückhaltleistungen charakterisiert.
Die Beurteilung der Rückhalteleistungen erfolgt in Analogie zur Beurteilung der mikrobiologischen Trinkwasserqualität, welche sich auf den Nachweis von Indikatororganismen stützt (s. Kapitel 1.1.3.2, S. 9). Coliforme Bakterien, *E. coli*, Enterokokken und *C. perfringens* sind Indikatoren für potentielle fäkale Verunreinigungen. Die regelmäßige Kontrolle der Anzahl heterotropher Bakterien, die bei 20°C und 36°C zur Kolonienbildung fähig sind (KBE bei 20°C und KBE bei 36°C), soll Hinweise auf anormale Veränderungen der Bakterienzahlen geben.

- **Abhängigkeit der relativen Rückhaltleistung von der Qualität des Zulaufs**

Es wurden Versuchsanlagen an zwei Standorten betrieben. Ein wesentlicher Unterschied der Versuchsanlagen war die Qualität des Zulaufs (s. Tab. 3.6, S. 65). Der Zulauf der Versuchsanlagen des IfW, Schwerte ist das gering belastete Oberflächenwasser der Ruhr, das durch die Zugabe von Hefeextrakt und Ammonium modifiziert wurde. Die Versuchsanlagen des IWW, Mülheim wurden mit dem anthropogen stark belasteten Ablauf des Emscherklärwerks Dinslaken beaufschlagt.
Insgesamt sind die ermittelten, maximalen Rückhalteleistungen der Filter, die mit dem Ablauf des Emscherklärwerks betriebenen wurden, höher als die der Versuchsanlagen, die mit Ruhrwasser beaufschlagten wurden (s. Tab. 3.1, S. 57, Tab. 3.3, S. 62 und Tab. 3.5, S. 64). Ein Vergleich der beiden Zuläufe zeigt, dass neben den

Trübstoffen auch die Belastung mit Indikatororganismen für das Wasser aus dem Emscherklärwerk höher war als die des Oberflächenwassers der Ruhr. Der Anteil zurückgehaltener Bakterien nahm zu, wenn die Trübstoff- und Bakteriendichte im Zulauf ebenfalls zunahm. Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach für Retentionsbodenfilter beschrieben (Hagendorf *et al*., 2003; Grobe *et al*., 2005). Mit ansteigender Bakteriendichte im Zulauf nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass Bakterien auf Oberflächen treffen, an denen sie durch Adsorptionskräfte zurückgehalten werden. Zudem tragen höhere Trübstoffgehalte zu einem Flockungseffekt im Überstau bei, so dass Bakterien häufiger in Aggregaten mit anderen partikulären Substanzen vorliegen. Die Entfernung von Partikeln durch Filtrationsprozesse ist ein größenabhängiger Prozess. Größere Partikel, wie z.B. Aggregate, werden zu einem höheren Anteil aus dem Wasser entfernt als kleinere, frei vorkommende Partikel, einschließlich der Bakterien.
Die unterschiedlichen Rückhalteleistungen verschiedener Typen an Indikatororganismen durch die Langsamsandfiltration sind auf die spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Organismen zurückzuführen. So werden Bakterien oder Viren gleicher Zellgröße, aber verschiedener Spezies, in unterschiedlichem Ausmaß eliminiert (Herbold-Paschke *et al*., 1991; Matthess *et al*., 1991). Die Eigenschaften ihrer Zelloberflächen, ihre Mobilität, ihr physiologischer Zustand, ihre Fähigkeit extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) zu bilden und ihre Widerstandsfähigkeit im fremden Milieu entscheiden ebenso wie mögliche Resistenzeigenschaften über ihre Überlebensdauer und ihren Transport durch den Filter.

Unabhängig von der Betriebstemperatur und dem Filtermaterial verringerten die mit Oberflächenwasser der Ruhr beaufschlagten Versuchsfilter und Lysimeter die Anzahl der autochthonen Bakterien im zu reinigenden Wasser nur gering bis gar nicht. Die Versuchsfilter, die mit dem Ablauf des Emscherklärwerks betrieben wurden, hielten dagegen 2-3 log-Stufen sowohl der autochthonen und allochthonen Bakterien zurück. Dies kann zum Einen – ebenso wie die höheren Rückhalteleistungen für Indikatororganismen für fäkale Verunreinigungen – auf den höheren Trübstoffgehalt und die höhere mikrobielle Belastung des Wasser aus dem Emscherklärwerk zurückzuführen sein. Zum Anderen ist das Hefeextrakt, das dem Ruhrwasser zur künstlichen DOC-Erhöhung zugesetzt wurde, für Bakterien wesentlich einfacher zu nutzen als die Substanzen des natürlichen DOCs. Die Zugabe des Hefeextrakts in Kombination

mit hohen Betriebstemperaturen (20°C und 30°C) kann zu einem erhöhten Wachstum in und Austrag der Bakterien aus den Langsamsandfilter-Biofilmen führen.

- **Temperaturabhängigkeit der Rückhalteleistungen**

Die Rückhalteleistungen von coliformen und allochthonen Bakterien nahm in den Versuchsfiltern mit Anstieg der Betriebstemperatur ab (s. Tab. 3.1, S. 57). Die parallele Abnahme der Rückhaltung coliformer und allochthoner Bakterien ist darauf zurückzuführen, dass die coliformen Bakterien eine Teilgruppe der allochthonen Bakterien darstellen. Auf die Rückhaltung der übrigen Indikatororganismen scheint die Betriebstemperatur keinen Einfluss zu haben.
Coliforme Bakterien fielen insbesondere bei Betriebstemperaturen von 30°C auf. Während der gesamten sechswöchigen Laufzeit der Versuchsfilter wurden coliforme Bakterien durch alle drei Filtermaterialien, Sand, Glasgranulat und Kokosfasern nicht zurückgehalten, sondern ausgetragen. Diese Austragung deutet auf eine Akkumulation und signifikante, unerwünschte Vermehrung coliformer Bakterien im Überstau und Filterbett hin (s. Kapitel 4.1.3, S. 116). Die verbleibenden Indikatororganismen, deren Rückhaltung untersucht wurde, scheinen sich entweder nicht im Filterbett zu vermehren oder werden nicht so leicht ausgetragen wie die coliformen Bakterien.

- **Eignung alternativer Filtermaterialien für die Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen**

Die Versuchsfilter mit Glasgranulat hielten etwa so viele hygienisch relevante Bakterien zurück wie der parallel betriebene Versuchsfilter mit Sand. Die gleiche Rückhalteleistung von Glasgranulat mit einer Körnung von 0,2-5 mm und Sand mit einer Körnung von 0,2-2 mm scheint widersprüchlich zu der zunehmenden Durchlässigkeit eines Filterkörpers mit ansteigender Korngröße. In grobkörnigen Materialien oder bei geringer Inhomogenität können auch größere Zellen leichter durch das Filtermaterial gelangen (Baars, 1963; Herbold-Paschke *et al.*, 1991). Die Eigenschaften des Glasgranulats und des Sandes wurden jedoch durch die Bildung der Schmutzdecke und den Biofilmen auf den Oberflächen der Filtermaterialien verändert (s. Kapitel 3.3, S. 76ff.). Die Größe der Porenräume wurde durch die Biofilme verringert und die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Oberflächen der Filtermaterialien veränder-

ten sich (Mauclair *et al*., 2004). Den vorliegenden Ergebnissen zufolge fungieren die Filtermaterialien als Träger der Biofilme und mit zunehmender Laufzeit des Filters nimmt die Bedeutung der Biofilme zu- und die der Filtermaterialien ab.
Die Rückhalteleistungen der Kokosfasern sind geringer als die der beiden anderen Materialien. Es sind häufiger Austragungen hygienisch relevanter Bakterien zu beobachten.
Nach vierzehnwöchiger Filterlaufzeit wies das Kokosfaserlysimeter zudem einen hohen Druckverlust und anaerobe Verhältnisse in den Filterabläufen auf. Die Schmutzdecke dieses Lysimeters wurde daraufhin entfernt und der Filter sofort wieder in Betrieb genommen. Anschließend entsprachen die Rückhalteleistungen des Kokosfaserlysimeters denen der Lysimeter mit den Filtermaterialien Sand und Glasgranulat, die nicht geschält wurden. Dies spricht dafür, dass für Kokosfasern die Schmutzdecke von weniger grundlegender Bedeutung für das Erzielen guter Rückhalteleistungen ist, als dies vom Filtermaterial Sand bekannt ist und auch für das Filtermaterial Glasgranulat zu gelten scheint (Burman, 1962; Hijnen *et al*., 2004). Der Kokosfaserfilter scheint als Tiefenfilter zu fungieren, während bei dem Sand- und Glasgranulatfilter die Rückhalteleistungen zu mehr als 90% in der Schmutzdecke und der direkt daran anschließenden Filterschicht erfolgen.
Kokosfasern sind pflanzlichen Ursprungs und faserförmig, während Glasgranulat und Kokosfasern anorganische Materialien sind und in granulöser Form vorliegen. Aus hygienischer Sicht scheinen anorganische, granulöse Materialien besser für die Langsamsandfiltration geeignet zu sein als organische, faserförmige Stoffe.

- **Einfluss von Auflageschichten und Algen auf die Rückhalteleistung**

Auflageschichten aus Kies, Bims und Kokosfasern verlängerten zwar die Laufzeiten von Langsamsandfiltern, beeinflussten aber nicht deren Rückhalteleistungen. Durch die Auflageschichten konnte das Ziel erreicht werden, die Filterlaufzeiten zu verlängern, ohne die Rückhalteleistungen negativ zu beeinflussen. Theoretisch wäre sogar eine Steigerung der Rückhalteleistungen möglich gewesen, da sich die Filtrationsstrecke durch die Auflageschichten verlängerte.
Ebenfalls keinen Einfluss auf die Rückhaltung hygienisch relevanter Mikroorganismen zeigte die Menge der Algen in der Schmutzdecke. Da fädige Algen die

Schmutzdecken stabilisieren und zu einer Art Auflageschicht aufbauen können, hätte sich auch hier die Rückhalteleistung steigern können (McNair *et al*., 1987).
Die Versuchsfilter erzielten etwa die gleichen Rückhalteleistungen wie die Langsamsandfilter, die unter optimalen Bedingungen betrieben wurden (s. Tab. 1.2, S. 8, Tab. 3.1, S. 57, Tab. 3.3, S. 62 und Tab. 3.5, S. 64). Eine schlechtere Rohwasserqualität in Form von hohen Trübstoff- und Bakterienkonzentrationen kann sogar zu einer Steigerung der relativen Rückhalteleistung führen. Für coliforme Bakterien ist die Rückhaltung durch die Versuchsfilter bei höheren Temperaturen (30°C) verringert. Aus hygienischer Sicht eignen sich Glasgranulat gut und Kokosfasern bedingt als alternative Filtermaterialien für die Langsamsandfiltration.

4.1.1.1 Bedeutung der Biofilme für die Rückhalteleistungen der Langsamsandfilter

Die Rückhalteleistung der Lysimeter war in den ersten vier Versuchswochen gering und unterlag starken Schwankungen. Die Ursache dafür sind die neu eingefüllten Filtermaterialien. Ein Langsamsandfilter muss zunächst „reifen“, d.h. die Schmutzdecke und die Biofilme auf den Oberflächen der Filtermaterialien müssen sich entwickeln. Nur reife Filter sind zu maximalen und konstanten Rückhalteleistungen fähig (Hijnen *et al*., 2004). Bei ganz neuen Filtern, in denen der Reifungsprozess das gesamte Filterbett betrifft, kann dieser Vorgang drei bis sechs Wochen dauern (Bahgat *et al*., 1999; Calvo-Bado *et al*., 2003b).
Eine sehr geringe bis keine Rückhaltung der Indikatoren lag nach jeder Betriebspause vor. Nach viertägiger Betriebszeit erzielten die Filter, die bereits über Biofilme verfügten, maximale Rückhalteleistungen (s. Abb. 3.4; S. 61). In der dreitägigen Betriebspause fielen die Lysimeter trocken, wodurch die Schmutzdecken sichtbar aufrissen. Die erhöhte hydraulische Durchlässigkeit durch die aufgerissenen Schmutzdecken kann eine Ursache für die verringerte Rückhalteleistung unmittelbar nach der erneuten Inbetriebnahme sein. Die Bedeutung einer intakten Schmutzdecke zeigt sich in der um 1-2 log-Stufen geringeren Rückhaltung von Bakterien durch Langsamsandfilter ohne Schmutzdecke als durch Filter mit Schmutzdecke (Hijnen *et al*., 2004). Ein weiterer Faktor, der für diese verringerte Rückhaltung verantwortlich sein könnte, ist die Veränderung der Filterbiozönose während des Trockenfallens. In der

Zeit, in welcher der Filter trocken gefallen ist, sind weniger Wasser und mehr Sauerstoff im Filterbett vorhanden. Diese Faktoren beeinflussen die Aktivität der vorhandenen Mikroorganismen und die Beschaffenheit der Biofilme.

4.1.2 Vorbelastung der Filtermaterialien mit hygienisch relevanten Bakterien

Die drei als Filtermaterialien verwendeten Rohstoffe Sand, Glasgranulat und Kokosfasern wurden auf coliforme Bakterien und *E. coli* untersucht. Um Filtermaterialien in dem Zustand zu untersuchen, wie sie zu Beginn der Filterlaufzeiten vorlagen, wurden die Materialien unmittelbar vor Versuchsbeginn aus den Filtern entnommen. Die Kokosfasern waren unbehandelt in die Filter gefüllt worden. Der Sand lag gewaschen vor und das Glasgranulat war mehrfach mit heißem Wasser gewaschen sowie anschließend 1 Stunde bei 180°C getrocknet worden.
Bei Glasgranulat und Sand waren keine coliformen Bakterien und *E. coli* kulturell nachweisbar. Eine deutliche Belastung mit coliformen Bakterien und eine geringe Belastung mit *E. coli* lag dagegen bei den Kokosfasern vor. Aufgrund dieser mikrobiellen Vorbelastung der Kokosfasern kam es wahrscheinlich zur Vermehrung coliformer Bakterien und *E. coli* in den ersten Betriebswochen neu befüllter Kokosfaserfilter.
Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kokosfasern stammen aus einer Charge. Eine allgemeine Aussage über die Belastung von Kokosfasern mit coliformen Bakterien und *E. coli* ist daher nicht möglich. Die Kokosfasern stammen aus Sri Lanka. Eine Kontamination der Kokosfasern mit coliformen Bakterien und *E. coli* ist bei der Herstellung und dem Transport durch direkte oder indirekte fäkale Verunreinigungen möglich. Die Kokosnüsse werden nach der Ernte zum Quellen in Lagunen gelegt. In den Subtropen und Tropen zählen hygienisch relevante Bakterien wie *E. coli* und *Salmonella* spp. zur natürlichen Biozönose von Böden und Gewässern (Hardina und Fujioka, 1991; Solo-Gabriele e*t al.*, 2000; Byappanahalli *et al*., 2003; Winfield und Groisman, 2003) und damit auch potentiell zu der autochtonen Population von Langsamsandfilter-Biofilmen. Die Kokosfasern werden nach der Trennung von den Nüssen zwar an der Luft getrocknet, aber eine Restfeuchte bleibt in den Pflanzenfasern zurück. Wie Laborversuche zeigten, reichte ein Trocknen der Kokosfasern bei 20-60°C nicht zur Abtötung der coliformen Bakterien und *E. coli* aus. Eine weitere po-

tentielle Quelle für fäkale Verunreinigungen sind Tiere in den Containern, in denen die Kokosfasern nach Europa verschifft werden. Aufgrund dieser Kontaminationsquellen sollte generell mit einer Vorbelastung an hygienisch relevanten Mikroorganismen gerechnet werden.

Für die Kokosfasern wurden, in Analogie zu der Vorbehandlung des Glasgranulats, Hitzebehandlungen zur Abtötung der im Rohmaterial enthaltenen coliformen Bakterien und *E. coli* geprüft. Nach einer einstündigen Hitzebehandlung der Kokosfasern bei 70°C waren coliforme Bakterien und *E. coli* kulturell nicht mehr nachweisbar. Sollten Kokosfasern als Filtermaterial verwendet werden, ist eine entsprechende Vorbehandlung empfehlenswert.

Bei den nachgewiesen coliformen Bakterien, die in den Kokosfasern und dem Filtrat des Kokosfaserfilters nachgewiesen wurden, handelt es sich um fakultativ pathogene Arten der Gattungen *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Escherichia*. Diese Bakterien können für Menschen mit einem schwachen Immunsystem, wie z.B. Kleinkinder, ältere sowie immunsupprimierte Menschen, ein Gesundheitsrisiko darstellen. Durch diese Bakterien werden jedoch keine Epidemien ausgelöst. Die coliformen Bakterien und *E. coli* sind Indikatororganismen, die auf fäkale Verunreinigungen hinweisen sollen. Fäkale Verunreinigungen können die Quelle pathogener, Epidemie auslösender Mikroorganismen sein, die sich über das Trinkwasser ausbreiten. Da coliforme Bakterien und *E. coli* zur natürlichen Population in Böden und Gewässern der Tropen zählen, kann man von dem Vorhandensein dieser Indikatororganismen in tropischen Regionen nicht auf fäkale Verunreinigungen und die damit verbundenen hygienischen Risiken schließen

4.1.3 Elimination, Akkumulation oder Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen im Filterbett

Während der Passage des Rohwassers durch den Langsamsandfilter werden Bakterien aus dem Rohwasser eliminiert und im Filterbett zurückgehalten. Über den Verbleib der im Filterbett zurückgehaltenen hygienisch relevanten Bakterien ist bisher wenig bekannt. Das Ziel ist eine Elimination pathogener Mikroorganismen. Nicht erwünscht dagegen ist die Akkumulation und Vermehrung pathogener Mikroorganismen im Filter.

Das Überleben und die Vermehrungsfähigkeit hygienisch relevanter Bakterien sind abhängig von den Milieubedingungen. Die Indikatororganismen coliforme Bakterien und *E. coli* konnten sich in den Versuchsfiltern bei Temperaturen von 20°C und 30°C sowie hohem Nährstoffangebot vermehren (s. Tab. 3.7, S. 69 und Tab. 3.8, S. 69). Eine hohe Anzahl *Legionella* sp. wurde von Calvo-Bado *et al*., 2003a in den Filtermaterialien von Langsamsandfiltern, die der Wasseraufbereitung in Gewächshäusern dienten, nachgewiesen. Die Vermehrung der Legionellen wird ebenfalls auf die erhöhte Temperatur im Gewächshaus zurückgeführt. Calvo-Bado und Kollegen empfehlen den Betrieb der Langsamsandfilter außerhalb der Gewächshäuser bei niedrigeren Temperaturen, um die Vermehrung hygienisch relevanter Bakterien zu vermeiden. Das Potential der unerwünschten Vermehrung hygienisch relevanter Mikroorganismen im Langsamsandfilter muss bei dem Einsatz dieser Technologie in Gebieten mit entsprechenden Rahmenbedingungen bedacht werden. Durch die starke Belastung der Filtermaterialien mit hygienisch relevanten Mikroorganismen kann es zu Ausspülungen oder Durchbrüchen kommen, was zu einer erhöhten Belastung des Filtrats führt. Daher sind der Langsamsandfiltration bei entsprechenden Temperatur- und Nährstoffbedingungen unbedingt weitere Aufbereitungsschritte, evtl. in Kombination mit einer Desinfektion, nachzuschalten.
Coliforme Bakterien und *E. coli* sind daher als Indikatororganismen für fäkale Verunreinigungen in tropischen Regionen nicht geeignet, da sie zur autochthonen Population von Böden und Gewässern zählen und sich unter entsprechenden klimatischen Bedingungen im Filter ansiedeln und vermehren können (Hazen und Toranzos, 1990; Winfield und Groisman, 2003; s. Kapitel 4.1.2, S. 115).

4.2 Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung (FMH) als alternatives Nachweisverfahren für Indikatororganismen

Die Indikatororganismen *E. coli*, coliforme Bakterien und Enterokokken werden entsprechend der Trinkwasserverordnung 2001 mittels kultureller Methoden nachgewiesen. Mit diesen klassisch-mikrobiologischen Verfahren werden nur die Bakterien erfasst, die unter den selektiven Bedingungen der kulturellen Verfahren zur Ausbildung makroskopisch sichtbarer Kolonien fähig sind. Mit den zeitaufwendigen, kulturellen Verfahren werden jedoch nicht alle vermehrungsfähigen und potentiell virulenten

Bakterien erfasst. Eine schnellere und sensitivere Methode stellten die auf Gensonden basierenden Hybridisierungsverfahren wie FISH dar. FISH ermöglicht die *in situ*-Identifikation und Quantifikation von Bakterien. Je nach Wahl der Sondensequenz können Bakterien, die zu einer phylogenetischen Gruppe zählen, nachgewiesen werden. Die Zielstrukturen von FISH, die 16S oder 23S rRNS in den Ribosomen, liegen nur in stoffwechselaktiven Zellen in hoher Kopienzahl vor (Amann *et al*., 1995). Bei der einfachen FISH-Methode ist eine hohe Kopienanzahl der Ribosomen notwendig, damit genügend Sonden binden können und ein entsprechend starkes Fluoreszenzsignal für die Auswertung entsteht (Moter und Göbel, 2000). Somit werden nur stoffwechselaktive Zellen detektiert, die – ähnlich wie bei dem kulturellen Nachweis – als potentiell virulent eingestuft werden. Zielorganismen, die durch Umweltstress geschädigt sind oder sich im VBNC-Stadium befinden, würden durch FISH im Gegensatz zu den kulturellen Verfahren ebenfalls detektiert, vorausgesetzt die Anzahl der Zielstrukturen ist hoch genug.

Für den direkten Nachweis der Indikatororganismen in den Zu- und Ablaufproben der Versuchsfilter erwies sich FISH als nicht geeignet. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Indikatororganismen im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl und der Vielzahl an Partikeln wurden keine eindeutigen Fluoreszenzsignale erzielt. Die Proben waren nicht auswertbar.

In vergleichbaren komplexen Matrizes hatte sich bereits die sogenannte Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierung (FMH) zum Nachweis von Indikatororganismen als geeignet erwiesen (Meier *et al*., 1997; Ootsubo *et al*., 2003). Bei dieser Methode werden die Indikatororganismen zunächst unter geeigneten Bedingungen zur Mikrokoloniebildung angeregt. Die Begleitflora wird je nach Selektionsgrad der Anzuchtbedingungen reduziert. Dadurch wird das ungünstige Verhältnis der Indikatororganismen zur Gesamtzellzahl aufgehoben. Außerdem sind die Mikrokolonien durch ihre Größe und markante Morphologie eindeutig von Partikeln zu unterscheiden, während der Unterschied zwischen Partikeln und einzelnen Bakterienzellen oft schwierig ist.

Die Anzucht sowie Detektion von *Enterobacteriaceae*-, *E. coli*- und Enterokokken-Reinkulturen und -Umweltisolaten war unter den angegebenen Bedingungen erfolgreich. Etwa 100% der *E. coli*- und Enterokokken-Zellen, die mit den kulturellen Methoden in den aufgestockten Zulaufproben nachgewiesen wurden, wurden auch mit der FMH-Methode detektiert (s. Tab. 3.9, S. 73). Für die Familie der *Enterobacteria-*

ceae lag die Wiederfindung dagegen bei fast 200%. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit der kulturellen Methode die Gruppe der coliformen Bakterien und mit der FMH-Methode die Familie der *Enterobacteriaceae* nachgewiesen wird. Coliforme Bakterien zeichnen sich durch die physiologische Eigenschaft aus, Galactopyranoside spalten zu können. Diese Fähigkeit ist auf das Vorhandensein der β-D-Galaktosidase zurückzuführen. 74 der 117 bekannten *Enterobacteriaceae*-Arten besitzen dieses Enzym und zählen zu den coliformen Bakterien (Holt *et al*., 1994). Die Familie der *Enterobacteriaceae* umfasst neben den coliformen Bakterien weitere Gattungen, die größtenteils ebenso wie die Gruppe der coliformen Bakterien für den Nachweis fäkaler Verunreinigungen geeignet sind (Ootsubo *et al*., 2003). Da die Familie der *Enterobacteriaceae* mehr Arten umfasst als die coliformen Bakterien, wurden durch Einsatz der *Enterobacteriaceae*-Sonde ProbeD bei der FMH-Methode mehr Bakterien in den aufgestockten Zulaufproben nachgewiesen als mit dem kulturellen Nachweis der coliformen Bakterien.

Ein Vergleich der parallel durchgeführten kulturellen Verfahren und der FMH-Methode anhand statistischer Auswertungen zeigt für die drei untersuchten Indikatororganismen unterschiedliche Ergebnisse:

- coliforme Bakterien/*Enterobacteriaceae*

Wie schon die Wiederfindungsrate der aufgestockten Zulaufproben gezeigt hat, werden auch in nicht-aufgestockten Zu- und Abläufen mehr *Enterobacteriaceae* mit der FMH-Methode detektiert als coliforme Bakterien mit der kulturellen Methode (s. Abb. 3.6, S. 74). Insgesamt ist der Box-Whiskers-Plot der FMH-Methode (Nachweis der *Enterobacteriaceae*) etwa 1 log-Stufe nach oben verschoben im Vergleich zu dem Box-Whiskers-Plot der kulturellen Methode (Nachweis der coliformen Bakterien). Die Box-Whiskers-Plots beider Nachweisverfahren erstrecken sich jeweils über etwa eine log-Stufe. Diese statistischen Auswertungen und die hohe Korrelation (s. Tab. 3.10, S. 75) dieser beiden Verfahren sprechen für die potentielle Einsetzbarkeit der FMH-Methode zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* als Alternative zum kulturellen Nachweisverfahren für coliforme Bakterien.

- *E. coli*

Der Box-Whiskers-Plot des kulturellen Nachweisverfahrens für *E. coli* umfasst etwa zwei log-Stufen, während sich der Box-Whiskers-Plot des FMH-Nachweisverfahrens für *E. coli* über etwa 4,5 log-Stufen erstreckt (s. Abb. 3.6, S. 74). Demnach wurden mit der FMH-Methode bis zu drei log-Stufen weniger oder mehr *E. coli* nachgewiesen

als mit der kulturellen Methode. Diese geringe Übereinstimmung der mit den beiden Verfahren nachgewiesenen *E. coli*-Anzahlen spiegelt sich ebenfalls in der geringen Korrelation der beiden Methoden wider (s. Tab. 3.10, S. 75). Ursache für diese Differenzen können die unterschiedlichen Selektivitätsgrade der Anzuchtbedingungen für die Mikrokolonie-Bildung der FMH-Methode und für die MPN-Reihe der kulturellen Methode sein. Die Mikrokoloniebildung erfolgte auf einem Vollmedium bei einer Inkubationstemperatur von 44°C und aeroben Bedingungen. Der Nachweis von *E. coli* mit dem kulturellen Verfahren erfolgt dagegen in einem flüssigen Nährmedium unter anaeroben Verhältnissen bei 36°C. *E. coli*-Zellen sind in dem kulturellen Verfahren über den Besitz der β-Glucuronidase definiert. Es sind jedoch auch β-Glucuronidase-negative *E. coli*-Stämme bekannt (Regnault *et al*., 2000). Diese Stämme werden mit dem kulturellen Verfahren nicht detektiert, wohl aber mit den auf Gensonden basierenden Technologien. Die Anzuchtbedingungen der FMH-Methode sind zudem weniger selektiv als die des klassisch mikrobiologischen Verfahrens. Dementsprechend können sich bei der FMH-Methode mehr Bakterien der Begleitflora vermehren als bei dem kulturellen Verfahren und die *E. coli*-Zellen an der Mikrokolonie-Bildung hindern. Dies würde dazu führen, dass mit dem kulturellen Verfahren mehr *E. coli*-Zellen nachgewiesen würden. Die weniger selektiven Anzuchtbedingungen der FMH-Methode ermöglichen jedoch vorgeschädigten *E. coli*-Zellen und β-Glucuronidase-negative *E. coli*-Stämmen die Vermehrung, welche unter stark selektiven Bedingungen nicht erfolgen könnte. Dementsprechend können mit der FMH-Methode auch mehr *E. coli*-Zellen detektiert werden als mit dem kulturellen Verfahren.

Die in der vorliegenden Arbeit etablierte FMH-Methode ist für den Nachweis von *E. coli* noch nicht ausgereift. Eine Angleichung der Selektivität der Anzuchtbedingungen würde wahrscheinlich zu einer höheren Korrelation der beiden Verfahren führen.

- Enterokokken

Für den Nachweis der Enterokokken mittels FMH wurden zwei, sich ergänzende Sonden verwendet: die Sonde Enc131, mit der die meisten und in der Umwelt häufigsten Enterokokken mit Ausnahme von *E. faecalis* nachwiesen werden können, und die Sonde Efs130, die spezifisch für *E. faecalis* ist (Meier *et al*., 1997). So konnten alle in Wasserproben häufig vorkommenden Enterokokken, die auf fäkale Verunreinigungen hinweisen, erfasst werden.

Die Korrelation der FMH- und der kulturellen Methode für den Indikatorparameter Enterokokken ist hoch (s. Tab. 3.10, S. 75). Mit der FMH-Methode werden mehr En-

terokokken nachgewiesen als mit der kulturellen Methode, was an dem um etwa 2 log-Stufen höher liegenden Box-Whiskers-Plot der FMH-Methode im Vergleich zum Box-Whiskers-Plot der kulturellen Methode zu erkennen ist (s. Abb. 3.6, S. 74). Die Box und die Whiskers der kulturellen Methode erstrecken sich über einen größeren log-Stufenbereich als die der FMH-Methode. Dies spricht für eine größere Streuung der Ergebnisse. Die genannten Unterschiede sind möglicherweise auf den Nachweis von Kolonien unterschiedlichen Alters durch die beiden Verfahren zurückzuführen. Bei der FMH-Methode werden Mikrokolonien nachgewiesen. Aufgrund der stark selektiven Anzuchtbedingungen bilden sich möglicherweise nicht alle Mikrokolonien zu großen, mit dem bloßen Auge sichtbaren Kolonien aus. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für den Einsatz der FMH-Methode als alternatives Verfahren für den Nachweis von Enterokokken.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist die FMH-Methode durchaus geeignet als alternatives Nachweisverfahren für die Indikatorparameter *Enterobacteriaceae* und Enterokokken. Für den Parameter *E. coli* müssten die selektiven Anzuchtbedingungen wahrscheinlich stärker an das kulturelle Verfahren angeglichen werden.
Bei Verwendung der FMH-Methode liegt das Ergebnis für *E. coli* und *Enterobacteriaceae* 10 Stunden früher und für Enterokokken mindestens 24 Stunden früher vor als mit der kulturellen Methode. Diese Zeitersparnis kann in der Praxis von Bedeutung sein, wenn der Nachweis hygienisch relevanter Mikroorganismen zu Auflagen durch das Gesundheitsamt führt. Zudem ist die FMH-Methode sensitiver und genauer, weil Kolonien eines sehr frühen Stadiums mittels spezifischer Sonden detektiert werden.

4.3 Charakteristika der bakteriellen Populationsstruktur von Langsamsandfilter-Biofilme

4.3.1 Biochemische und mikrobiologische Charakteristika der Langsamsandfilter-Biofilme

- **Visualisierung der Langsamsandfilter-Biofilme**

Die Filtermaterialien wurden jeweils zu Versuchsende beprobt. Dieser Zeitpunkt der Probenahme wurde gewählt, um ausgereifte, in stabilen Zuständen befindliche Bio-

filme und Biozönosen im Filterbett vorzufinden. Diese Zustände werden nach etwa ein bis sechs Wochen erreicht (Bahgat *et al*., 1999; Calvo-Bado *et al*., 2003b). Von allen Filtern wurden Proben der oberen Schichten entnommen. Diese Schichten sind von besonderem Interesse, da in den oberen Schichten die Hauptanteile der Reinigungsleistungen erfolgen (Stevik *et al*., 1999; van Cuyk *et al*., 2001). Exemplarisch wurden von einem Filter Proben aus zwei tieferen Schichten (30 cm und 55 cm) entnommen.

Auf allen untersuchten Filtern hatte sich eine Schmutzdecke gebildet. Für die beiden anorganischen, granulösen Filtermaterialien, Sand und Glasgranulat, konnte der Bereich der Schmutzdecke aufgrund einer dunklen Verfärbung deutlich von den tieferen Schichten abgegrenzt werden. Der Unterschied zwischen diesen Schichten zeigt sich aber auch in den höheren Anteilen der organischen Massen, höheren Gesamtzellzahlen und höheren Anzahlen koloniebildener Einheiten in den Schmutzdecken im Vergleich zu den Schichten ab 5 cm Tiefe. Die unter dem Rasterelektronenmikroskop sichtbaren stärkeren Biofilmbelegungen der Sandkörner und Glasgranulate aus den Schmutzdecken im Vergleich zu den Proben aus den Schichten in 5 cm Filtertiefe bestätigen den Unterschied der beiden Schichten. Diese Ergebnisse entsprechen der „traditionellen Bakterienverteilung“ in Sandfiltern, wie sie u.a. von Eighmy *et al*., 1992 sowie Ellis and Aydin, 1995 beschrieben wird. Demnach weisen die Schmutzdecken hohe Gesamtzellzahlen und Anzahlen an KBE auf, während diese Anzahlen in den tieferen Schichten geringer sind. Die hohen Bakterienzahlen korrelieren mit den dunkelbraunen Verfärbungen der Schmutzdecken.
Die Kokosfasern unterscheiden sich von den beiden anderen Filtermaterialien. Die Kokosfasern wiesen zwar auch eine Schmutzdecke auf, aber es lag keine klare Abgrenzung zwischen der Schmutzdecke und dem restlichen Filterbett vor. In der Tiefe von 5 cm zeigten die Kokosfasern eine ähnliche Verfärbung wie im Schmutzdeckenbereich. Auch die Biofilmbelegung der Fasern ist nach rasterelektronischen Beobachtungen in den beiden Schichten gleich. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass die Kokosfaserfilter - im Gegensatz zu den beiden anderen Filtern - als Tiefenfilter fungieren. Die Gesamtzellzahlen und die Anzahlen der KBE waren jedoch - in Übereinstimmung mit den beiden anderen Filtermaterialien - in den Schmutzdecken höher als in den Schichten in 5 cm Tiefe. Eine höhere Zellzahl in den Schmutzdecken im Vergleich zu den tieferen Schichten wird vielfach beschrieben (Ellis und Ay-

din, 1995; Hendel *et al*., 2001; Calvo-Bado *et al*., 2003b). Dies ist möglicherweise auf die bessere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in der Schmutzdecke zurückzuführen, welche auch als ein Grund für die allgemein höhere Aktivität der Filterpopulation in der Schmutzdecke angesehen wird (Hendel *et al*., 2001).
Die mittels Rasterelektronenmikroskopie auf den Filtermaterialien nachgewiesenen Biofilme und Bakterien stimmen mit elektronenmikroskopischen Beobachtungen früherer Studien überein (Esch und Nehrkorn, 1988; Brand und Wohanka, 2000).

- **Charakterisierung der Filtermatrix**

Die organische Masse, Gesamtzellzahlen und Anzahlen der KBE der Schichten in 30 cm und 55 cm Tiefe des Filterbettes stimmten etwa mit denen der Schichten in 10 cm Tiefe des gleichen Filters und den Schichten in 5 cm Tiefe der anderen Filter überein (s. Abb. 3.15, S. 85 und Abb. 3.16, S. 87). Ellis und Aydin, 1995 beschreiben ebenfalls eine konstante Anzahl der KBE in Schichten zwischen 5 cm und 30-40 cm Tiefe des Filterbettes. Der Anteil der EUB338-markierten Zellen in diesen tiefen Filterschichten (30 cm, 55 cm) entsprach dem Anteil in den Schichten in 5 cm Tiefe einiger anderer Filter. Demnach ist zwar die Aktivität in den Schichten unterhalb der Schmutzdecken geringer als in der Schmutzdecke selbst, aber die im gesamten Filterbett vorhandenen Bakterien weisen eine relativ konstante Aktivität auf. Dies wird durch die von Hendel *et al*., 2001 beschriebene, relativ konstante Aktivität an extrazellulären Enzymen im Filterbett unterhalb der Schmutzdecke bestätigt.

Der deutlich höhere Wassergehalt der Kokosfasern im Vergleich zu den beiden anderen Filtermaterialien ist auf den pflanzlichen Ursprung der Kokosfasern zurückzuführen. Im wassergesättigten Filterbett quellen die Faser (s. Abb. 3.15, S. 85).
Die höheren Wassergehalte der Schmutzdecken im Vergleich zu tieferen Filterschichten korrelieren mit den höheren Anteilen an organischer Masse und Biofilmen (s. Abb. 3.15, S. 85). Für den Zusammenhalt von Biofilmen sind extrazelluläre polymere Substanzen verantwortlich, deren Hauptbestandteil Wasser ist (Flemming und Wingender, 2001).

Die Anzahl der KBE machte in den meisten der untersuchten Filtermaterialproben nur 1-10% der Gesamtzellzahlen aus. Dies stimmt mit dem Anteil kultivierbarer Bak-

terien aus Sediment- und Bodenproben sowie Proben aus aquatischen Systemen überein, der bei 0,1-15% liegt (Jones, 1977; Wagner *et al*., 1993; Staley und Konopka, 1985; Torsvik *et al*., 1990).
Dieser geringe Anteil kultivierbarer Bakterien verdeutlicht die Bedeutung molekularbiologischer, kultivierungsunabhängiger Untersuchungen natürlicher Populationen, um ein vollständiges Bild der entsprechenden Ökosysteme zu erhalten.

- **Anteil aktiver Zellen**

Bei Verwendung einfach markierter FISH-Sonden muss die Kopienzahl der Zielstruktur hoch sein, um eine für die Detektion eines Fluoreszenzsignals ausreichende Intensität zu erhalten (Amann *et al*., 1995; Moter und Göbel, 2000). Eine entsprechend hohe Ribosomen-Kopienzahl liegt in Zellen mit aktivem Stoffwechsel vor. Dementsprechend sind alle mit der FISH-Sonde markierten Zellen stoffwechselaktiv. Umgekehrt kann man jedoch nicht sagen, dass alle Bakterienzellen der Probe, die nicht mit der EUB338-Sonde markiert sind, nicht stoffwechselaktiv sind. Zum einen werden, wie Daims *et al.,* 1999 gezeigt hat, nicht alle Bakterien mit der EUB338-Sonde erfasst. Ein weiterer Grund kann in der Inpermeabilität der Zellen für Sonden liegen. Vor der Hybridisierung werden die Zellen durch chemische und eventuell enzymatische Behandlungen permeabilisiert, d.h. die Zellwand wird durchlässig für die Sonden gemacht, ohne dass die Zellen platzen. Es gibt jedoch keine Methode, die alle Bakterienzellwandtypen permeabilisiert. Somit wurden mit der verwendeten Methode alle Zellen erfasst, die durch die gewählte Fixierungsmethode permeabilisiert wurden, stoffwechselaktiv sind und deren 16S rRNS einen Sequenzbereich aufweist, der kompatibel zur Sequenz der EUB338-Sonde ist. Zellen mit diesen Eigenschaften wurden als EUB338-markierte Zellen bezeichnet.
Durch die Doppelfärbung von Langsamsandfilter-Biofilmen mit der *Bacteria*-spezifischen Sonde EUB338 und mit dem DNS-bindenden Farbstoff DAPI kann der durch *in situ*-Hybridisierung identifizierte Anteil der Bakterien an der GZZ bestimmt werden. Der Anteil der EUB338-markierten Zellen an der Gesamtzellzahl ist in den Schmutzdecken aller Filter höher als in den Schichten in 5 cm Tiefe. Dies spricht für einen höheren Anteil stoffwechselaktiver Zellen in den Schmutzdecken im Vergleich zu tieferen Filterschichten. In den Schmutzdecken wiesen 50-90% der mit DAPI anfärbaren Zellen ein eindeutiges Hybridisierungssignal auf (s. Abb. 3.17, S. 88). In

Belebtschlammproben liegt dieser Anteil mit 70-90% im gleichen Größenbereich (Wagner *et al*., 1993; 1994). Diese hohe Nachweiseffizienz belegt, dass die überwiegende Mehrheit der in den Schmutzdecken der Langsamsandfilter vorkommenden Zellen von fluoreszenzmarkierten Sonden penetrierbare Bakterien mit einem zur Detektion ausreichend hohen rRNS-Gehalt pro Zelle sind. Demnach stellen mindestens 50% aller in den Schmutzdecken vorkommenden Zellen physiologisch aktive Bakterien dar.

Die prozentualen Anteile EUB338-markierter Zellen erstrecken sich mit 50-90% für die Schmutzdecken sowie Auflageschichten und 15-60% für die Schichten ab 5 cm Tiefe über sehr große Bereiche. Eine Korrelation zu den Betriebsparametern konnte nicht hergestellt werden. Der physiologische Zustand der Filterbiozönose scheint von hoher Variabilität zu sein, wie es auch für die Biomasse der Schmutzdecken berichtet wird (Campos *et al*., 2002). Die Biofilme in Langsamsandfiltern stellen also ein hochkomplexes Ökosystem dar, dessen Zustand durch äußere Einflüsse, wie z.B. die Nährstoffzufuhr, bestimmt wird.

- **Aktivität der Filterbiozönose**

Carboxylesterasen sind Enzyme, die in allen Lebewesen vorkommen (Manafi *et al*., 1991). Sie gehören zu den Hydrolasen und katalysieren die Reaktion von Carboxylestern mit Wasser zu Alkohol und einem Carboxylat. Als Substrat bevorzugen Carboxylester wasserlösliche und emulgierte Ester mit relativ kurzkettigen Fettsäuren (Jaeger und Wohlfahrt, 1993). Carboxylasen können zellgebunden oder extrazellulär vorkommen. In der vorliegenden Arbeit wurden nur die extrazellulären Carboxylasen untersucht, die als Esterasen bezeichnet wurden.

Die Aktivität extrazellulärer Enzyme, wozu auch die Esterasen zählen, ist bei Nährstoffanwesenheit und somit bei stoffwechselaktiven Organismen höher. Die höhere Esterase-Aktivität in den Schmutzdecken im Vergleich zu den Schichten in 5 cm Tiefe spricht - analog zu den Ergebnissen der EUB338-markierten Bakterienzellen - für eine allgemein höhere Aktivität der Filterbiozönose in den Schmutzdecken als in den tieferen Filterschichten (s. Abb. 3.18, S. 89). Auch für andere extrazelluläre Enzyme, wie die β-Glucosidase, ist eine größere Menge in der oberen Schicht von Langsamsandfiltern als in tieferen Filterschichten nachgewiesen (Hendel *et al*., 2001). Ebenso wurden in Schmutzdecken von Langsamsandfiltern deutlich höhere

ATP-Gehalte nachgewiesen als in tieferen Schichten (Calvo-Bado *et al*., 2003b). Biochemische Analysen mit BIOLOG haben gezeigt, dass die mikrobiellen Gemeinschaften in den obersten Schichten von Sandsäulen zur schnelleren Nutzung von BDOC (biodegradable dissolved organic carbon) fähig sind als die Gemeinschaften tieferer Schichten (Moll und Summer, 1996). Neben der höheren Aktivität in den Schmutzdecken im Vergleich zu den tieferen Filterschichten weisen die Schmutzdecken assoziierte Bakterien auch eine höhere Aktivität als die in der freien Wasserphase befindlichen Bakterien auf (Eighmy *et al*., 1992).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen, dass in den Schmutzdecken von Langsamsandfiltern die Anzahl der Bakterien und der Anteil aktiver Organismen signifikant höher sind als in den Schichten ab 5 cm Tiefe. Ab 5 cm Tiefe scheinen die Anzahl der Bakterien und der Anteil aktiver Organismen relativ konstant zu sein. Diese Unterschiede zwischen Schmutzdecken und tieferen Filterschichten liegen eindeutig für die granulären Filtermaterialien, Sand und Glasgranulat, vor. Bei den Kokosfasern deuten die makro- und mikroskopischen Betrachtungen auf geringere mikrobiologische Unterschiede zwischen der Schmutzdecke und der 5 cm-Schicht hin.

4.3.2 Diversität und Zusammensetzung der Bakterienpopulation in Langsamsandfilter-Biofilmen

Die autochthone Bakterienpopulation der Langsamsandfilter-Biofilme setzt sich aus den Bakterien zusammen, die der Sand mitbringt und die mit dem zulaufenden Wasser ins Filterbett eingetragen werden. Die Bakterienbesiedlung des Sandes vor Einsatz in Langsamsandfiltern ist relativ gering. Sobald der Filter in Betrieb genommen ist, erfolgt eine schnelle Kolonisierung des Sandes, bis zur vollständigen Belegung der Sandkornoberflächen mit Biofilmen. Die signifikantesten Veränderungen der mikrobiellen Population wurden während der ersten Woche nach Inbetriebnahme und in der Schmutzdecke beobachtet. Die Filterpopulation verändert sich während der gesamten Betriebszeit (Pell, 1991; Calvo-Bado *et al*., 2003b).
Ein Ziel dieser Arbeit war es, mittels molekularbiologischer, kultivierungsunabhängiger Methoden einen Einblick in die Diversität und Zusammensetzung der Bakterien-

population von Langsamsandfiltern zu erhalten und die Populationen von Filtern, die unter nicht-optimalen Bedingungen betrieben wurden, auf Shifts in den Bakterienpopulationen zu untersuchen.

4.3.2.1 Diversität und qualitative Zusammensetzung der Bakterienpopulationen in Langsamsandfiltern anhand von 16S rDNS-Analysen

Woese und seine Mitarbeiter lieferten durch die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes, basierend auf Sequenzanalysen der rRNS-Gene, die Grundlagen für die molekularbiologischen Analysen der Diversität und Zusammensetzung natürlicher Habitate (Woese *et al*., 1987; 1990). Das ausgewogene Vorhandensein konservierter und variabler Sequenzbereiche sowie das Vorkommen in jeder Zelle machen die 16S rDNS bzw. rRNS zu optimalen phylogenetischen Chronometern. Eine Amplifikation der 16S rDNS unbekannter Organismen ist aufgrund der konservierten Endbereiche möglich. Die aus Umweltproben amplifizierten 16S-Gene werden mittels Klonierung getrennt, um die Gene einzelner Organismen untersuchen zu können. Die Identifizierung der Mikroorganismen erfolgt über die variablen Bereiche der 16S-Gene.

Zur Untersuchung der bakteriellen Diversität und Phylogenie sind die Techniken Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), amplifizierter Fragmentlängenpolymorphismus (AFLP), zufällig amplifizierter DNS-Polymorphismus (RAPD), denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) und amplifizierte rDNS Restriktionsanalyse (ARDRA) weit verbreitete Techniken. Die meisten dieser Methoden umfassen neben der Amplifikation von rRNS-Genen mittels PCR die Spaltung mit Restriktionsenzymen und/oder die Sequenzierung von Teilbereichen der rDNS (Vaneechoutte, 1996; Kilb *et al*., 1998; Jang *et al*., 2002, Bramucci *et al*., 2003; Buchan *et al*., 2003; Calvo-Bado *et al*., 2003a; 2003b; Ntougias *et al*., 2004; Noll *et al*., 2005). Die ARDRA-Methode, die in dieser Arbeit zur Fingerprint-Analyse verwendet wurde, wurde erfolgreich zur Analyse der Bakteriengemeinschaften sehr unterschiedlicher Habitate eingesetzt (Ross *et al*., 2000; Lagacé *et al*., 2004; Shamseldin *et al*., 2005; Vite und Giovanetti, 2005). Zu diesen Habitaten zählen auch solche, die dem Langsamsandfilter ähnlich sind, wie z.B. Frischwassersedimente (Lomans *et al*., 2001) und landwirtschaftlich genutzte Böden (Øvreås und Torsvik, 1998). Die ARDR-

Analyse ermöglicht eine Gruppierung der Organismen anhand von Restriktionsbanden. Dieser Methode liegt zugrunde, dass phylogenetisch nah verwandte Organismen eine ähnliche 16S rDNS-Sequenz und dementsprechend auch ähnliche Restriktionsbanden haben.
Für ARDR-Analysen werden in der Regel ein bis drei verschiedene Endonukleasen verwendet (Øvreås und Torsvik, 1998; Guan *et al*., 2003; Lagagé *et al*., 2004; Ntougias *et al*., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst vier Endonukleasen an Referenzstämmen getestet, um die minimal notwendige Anzahl und die am bestgeeigneten Restriktionsenzyme für eine sinnvolle Gruppierung phylogenetisch verwandter Stämme zu bestimmen. Eine Gruppierung der Referenzstämme, die den phylogenetischen Zusammenhängen entspricht, war anhand der Restriktionsbanden der Enzyme *Dde*I und *Msp*I möglich. Phylogenetisch nah verwandte Referenzstämme konnten zu Clustern zusammengefasst werden, deren Bandenmuster eine Ähnlichkeit von ≥ 60% aufwiesen (s. Abb 3.19, S. 91 und Abb. 3.20, S. 92).

Ein Vergleich der bakteriellen Diversität von Filtermaterialien, die aus unterschiedlich betriebenen Langsamsandfiltern stammen, ist anhand der Cluster- und Gruppenquotienten der entsprechenden Clone Libraries möglich (s. Tab. 3.11, S. 95). Mit ansteigender Wassertemperatur nimmt die Diversität in den Filtermaterialien ab. Die Temperatur scheint auf die Filterpopulation einen Selektionsdruck auszuüben, so dass sich bei höheren Temperaturen (20°C und 30°C) möglicherweise Arten, die zu einer geringeren Anzahl phylogenetischer Gruppen gehören, im Filter ansiedeln können.
Die Temperatur scheint neben der Diversität auch die Ähnlichkeiten der Bakterienpopulationen zu beeinflussen wie an den Ähnlichkeitsindizes der Clone Libraries abzulesen ist (s. Tab. 3.12, S. 96 und Tab. 3.13, S. 96). Bei 20°C und 30°C entwickeln sich anscheinend ähnliche Bakterienpopulationen, die sich von den Populationen in Filtern mit niedrigeren Betriebstemperaturen (5-10°C) unterscheiden.
Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Clone Libraries wiesen Ähnlichkeiten untereinander auf, was auf das Vorkommen gleicher Bakteriengruppen in den Schmutzdecken aller untersuchten Filter hindeutet. In anderen Studien unterschieden sich die Bakterienpopulationen in den oberen, mittleren und unteren Filterschichten von Langsamsandfiltern, zeigten aber - ebenso wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit - eine Dominanz gleicher Gruppen in allen Schichten (Moll *et al*., 1998; Calvo-Bado *et al*., 2003b). Das Vorkommen gleicher Bakterien in verschiede-

nen Filtern oder verschiedenen Filterschichten ist darauf zurückzuführen, dass sich die Filterbiozönose aus den Organismen zusammensetzt, die mit dem Filtermaterial und dem Wasser eingetragen werden. Bei allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Filtern wurde Sand als Filtermaterial verwendet. Außerdem wurden alle diese Filter mit Oberflächenwasser der Ruhr beaufschlagt, entweder mit dem Ruhrwasser auf Höhe von Schwerte oder auf Höhe von Mülheim. Daher kann von einer großen Übereinstimmung der in die Filter eingetragenen Bakterien ausgegangen werden. Welche der eingetragenen Bakterien sich ansiedeln und vermehren können, scheint von vielen Faktoren abzuhängen. Die Temperatur konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse als ein Faktor bestimmt werden, der Einfluss auf die Entwicklung der Filterbiozönose hat.

Die ARDRA-Bandenmuster nur einzelner Klone zeigten Ähnlichkeiten zu denen der Referenzstämme. Da die Referenzstämme zum Großteil hygienisch relevante Organismen waren, schien der Anteil solcher Organismen im Filterbett gering zu sein. Auch durch die Sequenzvergleiche konnte kein Klon eindeutig einer hygienisch relevanten oder pathogenen Art bzw. Gattung zugeordnet werden. Um diese Ergebnisse einordnen zu können, ist eine nähere Betrachtung der Aussagekraft der ARDRA-Untersuchungen notwendig: Für die ARDRA-Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils 60 Klone der Libraries aus den Versuchsfiltern und 125 Klone aus der Library des RWW-Filters ausgewählt. Damit wird nur ein Teil der vorhandenen Bakterien erfasst. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die meisten der auf diesem Weg untersuchten Bakterien zu den mengenmäßig bedeutenden Gruppen zählen. Die äußerst geringe Anzahl der Klone, die als hygienisch relevant oder pathogen identifiziert wurden, deuten demnach darauf hin, dass in den Langsamsandfiltern hygienisch relevante Arten in deutlich geringeren Mengen vorkommen als Umweltorganismen ohne hygienische Bedeutung. Langsamsandfilter-Biofilme scheinen also ebenso wie Biofilme in Trinkwasserverteilungsnetzen nicht die bevorzugten Habitate von pathogenen Arten zu sein (Wingender und Flemming, 2004). Dies gilt sowohl für Filter, die bei 5-10°C betrieben wurden, als auch für Filter, deren Betriebstemperatur bei 20-30°C lag. Die Menge der coliformen Bakterien und *E. coli*, die in den aktiven Schichten der bei 20-30°C betriebenen Filter nachgewiesen wurden, stellen demnach einen verschwindend geringen Anteil an der Gesamtpopulation dar.

Die Sequenzen der untersuchten Klone stimmten nur in wenigen Fällen zu 100% mit 16S rDNS-Sequenzen bekannter Mikroorganismen überein, d.h. diese Organismen sind bisher nicht beschrieben worden. Viele der Sequenzen in den Internet-Datenbanken, die die höchste Übereinstimmung mit den Sequenzen der hier untersuchten Klone aufweisen, stammen zudem von nicht-kultivierten Bakterien aus Sedimenten, Böden oder aquatischen Ökosystemen. Bei den Langsamsandfilter-Biofilmen handelt es sich demnach um komplexe Konsortien, die zu einem großen Teil aus nicht-kultivierbaren, bisher unbekannten Mikroorganismen bestehen. Calvo-Bado *et al*., 2003b beobachteten, dass die meisten DGGE-Banden aus den direkt (über PCR) untersuchten Langsamsandfiltermaterialien nicht mit den DGGE-Banden übereinstimmen, die sich aus den gleichen Proben kultivierter Bakterien ergeben. Die meisten Bakterien der Filterpopulation scheinen mit den bekannten Methoden nicht kultivierbar zu sein. Die Nicht-Kultivierbarkeit, das Vorhandensein unbekannter, aber taxonomisch einzuordnender Stämme und die Identifizierung neuer Bakterienstämme sind ebenfalls für Trinkwasser-Biofilme bekannt (Kalmbach *et al*., 1997b; Schmeisser *et al*., 2003).
Ungewiss ist, ob man mit den molekularbiologischen Methoden alle vorhandenen Bakterienzellen erfasst. Um eine möglichst hohe Anzahl der vorhandenen Bakterien zu erfassen, wurde zur DNS-Isolierung in der vorliegenden Arbeit eine Kombination enzymatischer, chemischer und physikalischer Verfahren gewählt und die 16S rRNS-Gene der isolierten DNS durch eine „touch-down-PCR mit universellen Primern amplifiziert“ (s. Kapitel 2.2.3.1, S. 41 und Kapitel 2.2.3.2, S. 42f.).

Um einen Einblick in die Zusammensetzung der Bakterienpopulation in Langsamsandfilter-Biofilmen zu bekommen, wurden die Ergebnisse des Versuchsfilters, der bei 5-10°C betrieben wurde und die des kommerziell betriebenen RWW-Langsamsandfilters (Betriebstemperatur ca. 10°C) zusammengefasst und den Daten der Versuchsfilter gegenübergestellt, die bei 20°C und 30°C betrieben wurden (s. Tab. 3.16, S. 99). In allen untersuchten Filtermaterialien zählen die meisten der phylogenetisch einzuordnenden Bakterien zu den *Proteobacteria*. Es wurden Vertreter der alpha-, beta- und gamma-Subklassen der *Proteobacteria* nachgewiesen. Das Phylum *Proteobacteria* zeichnet sich durch eine extrem große Stoffwechselvielfalt aus. So zählen zu den *Proteobacteria* z.B. Bakterien, die anoxygene Photosynthese betreiben, nitrifizierende Bakterien, sulfat-, schwefel- und eisenoxidierende Bakterien

sowie methanotrophe und methylotrophe Arten. *Proteobacteria* dominieren allgemein in heterotrophen Bakteriengemeinschaften von Oberflächenwässern wie Seen, Flüssen und Ozeanen (Glöckner *et al*., 1999; Giovannoni und Rappé, 2000). In Langsamsandfiltern wurden auch in anderen Studien verschiedene *Proteobacteria*, wie *Pseudomonas* spp. und *Legionella* spp., als wichtige Biofilm-Bewohner nachgewiesen (Bruces und Hawkes, 1983; Baghat *et al*., 1999; Calvo-Bado *et al*., 2003b).
Während die *Proteobacteria* in den Filter, die bei 5-10°C betrieben wurden, die einzige große Gruppe phylogenetisch zuzuordnender Bakterien darstellt, wurden in den Filtern mit höherer Betriebstemperatur auch mehrere Bakterienstämme detektiert, die den Gram-positiven Bakterien sowohl mit niedrigem als auch mit hohem GC-Gehalt und dem Phylum *Nitrospira* zuzuordnen sind. Die hohe Anzahl der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem und hohem GC-Gehalt geht jeweils auf eine großer Anzahl sehr ähnlicher Bakterienstämme innerhalb einer Clone Library zurück. So konnten Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt fast alle als *Bacillus* spp. identifiziert werden. *Bacillus* spp. wurde bereits mehrmals mittels kultureller Methoden in Langsamsandfiltern detektiert (Calaway *et al*., 1952; Calawy, 1957; Baghat *et al*., 1999). Dies deutet darauf hin, dass *Bacillus* spp. zur autochthonen Population von Langsamsandfiltern zählt. Zu den Gram-positiven Bakterien zählen viele Bodenbewohner, die zur autochthonen Besiedlung des Filtermaterials zählen können. Zahlreiche Gram-positive Bakterien können Hitze und Trockenheit durch die Ausbildung von Sporen überstehen. Durch die Bildung antibakterieller Substanzen können viele Gram-positive Bakterien andere Bakterien abtöten, was als ein biologischer Mechanismus der Elimininatio hygienisch relevanter Bakterien in Langsamsandfiltern beschrieben wird (Preuß und Schwarz, 1995).
Die Bakterienstämme, die zum Phylum *Nitrospira* zählen, wurden nur in den Schmutzdecken der bei 20°C und 30°C betriebenen Filter detektiert. Eine hohe Anzahl der Nitrit-Oxidierer der Gattung *Nitrobacter* in den oberen Schichten ist für Langsamsandfilter bekannt und wird auf den Sauerstoffbedarf der Nitrit-Oxidierer zurückgeführt. Durch den Nachweis von Nitrit-Oxidieren ausschließlich in der Schmutzdecke, wird die Bedeutung dieser Schicht für die mikrobiellen Abbauprozesse hervorgehoben. Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Nitrifikation und der Entwicklung der Ammonium- und Nitrit-Oxidierer existiert in Langsamsandfiltern (Bahgat *et al*., 1999). *Nitrospira* ist im Gegensatz zu *Nitrobacter* an niedrige Nitrit- und Sauerstoffkonzentration adaptiert (Okabe *et al*., 1999; Schramm *et al*., 1999;

2000). Bakterien des Phylums *Nitrospira* sind in der Natur weit verbreitet (Burrell *et al.,* 1998; Hovanec *et al*., 1998; Juretschko *et al*., 1998; Li *et al*., 1999; Marilley und Aragno, 1999; Cho und Kim, 2000; Todorov *et al*., 2000; Gieseke *et al*., 2003) und möglicherweise signifikant an den globalen Nitrit-Oxidationen beteiligt. Die dominante Gruppe der Nitrit-Oxidierer in Abwasseranlagen sind *Nitrospira*-Arten und nicht – wie man lange glaubte - *Nitrobacter* spp. (Juretschko *et al*., 1998; Schramm *et al*., 1998; Okabe *et al*., 1999; Daims *et al*., 2001). Es ist denkbar, dass in Langsamsandfiltern *Nitrospira*-Arten die dominanten Nitrit-Oxidierer sind und daher durch die ARDR-Analysen nachgewiesen wurden.

In allen Filtermaterialien wurden Vertreter der Ordnung *Planctomycetales* und der *Cytophaga-Flavobacterium* (CF)-Gruppe nachgewiesen. Die Ordnung *Planctomycetales* ist eine der Hauptabstammungslinien der Domäne *Bacteria* (Schlesner, 1986; Stackebrandt *et al*., 1986; Woese, 1987; Liesack und Stackebrandt, 1992). Das Wissen über diese Gruppe ist limitiert, da nur wenige Arten in Reinkulturen vorliegen. Die *Planctomyces*-Arten zeichnen sich durch eine immense Stoffwechselvielfalt aus. Neben chemoorganotrophen und obligat sowie fakultativ aerobe Arten sind auch obligat anaerobe, autotrophe und phototrophe Arten beschrieben (Fuerst, 1995; Miskin *et al*., 1999). Mittels molekularbiologischer Methoden wurden *Planctomyces*-Arten in den verschiedensten Umwelthabitaten, wie Böden, Sedimenten, Süßwasser-Biofilmen, marinen Habitaten und Kläranlagen detektiert (Liesack *et al*., 1992; DeLong *et al*., 1993; Bond *et al*., 1995; Holmes *et al*., 2001; Chouari *et al*., 2003, Brümmer *et al*., 2004). Planctomyceten werden demnach mit dem Filtermaterial oder dem Zulauf in den Filter eingetragen und finden dort Bedingungen vor, an die sie optimal angepasst sind.

Die CF-Gruppe ist eine komplexe Gruppe in der Ordnung *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB). Bakterien der CFB-Ordnung kommen ubiquitär vor, z.B. in Trinkwasserbiofilmern und Abwasseraufbereitungsanlagen (Röske *et al*., 1998; Schmeisser *et al*., 2003; Berkenherg und Fischer, 2004). CFB sind von essentieller Bedeutung für den Nährstoffumsatz in Flüssen (Cottrel und Kirchman, 2000; O`Sullivan *et al*., 2002). *Cytophaga* spp. verfügen über Cellulase, Amylase und Chitinase, die sie zum Abbau komplexer Polymere befähigen (van Hannen *et al*., 1999; Casamayor *et al*., 2000; Laetitia *et al*., 2000). Bei dem Abbau der Polymere entstehen Produkte, die durch die anderen Bakterien der Biozönosen verwertet werden können. *Cytophaga* spp. wurde in Langsamsandfilter nachgewiesen (Calvo-Bado *et*

al., 2003b; Shokouhi, 2004). *Flavobacteria* sp. wurden bereits von Calaway *et al*., 1952 und Calaway, 1957 mittels kultureller Methoden in Sandfiltern detektiert. Rodgers *et al*., 2003 zeigten, dass CFB Cysten hygienisch relevanter Protozoen während der Langsamsandfiltration abbauen und entfernen können. Aufgrund ihrer Fähigkeit Polymere abzubauen und Cysten hygienisch relevanter Protozoen zu entfernen, sind Bakterien der CFB-Ordnung wichtige Bestandteile der Biozönosen von Langsamsandfilter-Biofilmen.

Die Analysen der 16S rDNS-Klone zeigten, dass es sich um sehr diverse Bakteriengemeinschaften handelt. Die Daten deuten darauf hin, dass die meisten Bakterienstämme der Langsamsandfilter-Biofilme nicht kultivierbar, bisher nicht bekannt und ohne hygienische Relevanz sind. Die Dominanz einzelner Spezies scheint nicht vorzuliegen. Eine bedeutende Gruppe der autochthonen Filterpopulation unabhängig von der Temperatur scheinen die *Proteobacteria* zu sein. Auf einen Shift der Bakterienpopulation durch höhere Betriebstemperaturen deutet die abnehmende Diversität bzw. das vermehrte Vorkommen von Bakterien der Phyla *Nitrospira* und grampositive Bakterien bei 20-30°C gegenüber 5-10°C hin. Alle taxonomisch zugeordneten Bakterien gehören stoffwechselphysiologisch vielseitigen und für die biologischen Abbauprozesse im Filter bedeutenden Gruppen an. Die Langsamsandfilter-Biofilme stellen eine Multispeziesgemeinschaft dar, die einen sequenziellen Abbau der vorhandenen Nährstoffe betreibt. Dies ist die Grundlage für den Aufbau einer komplexen Biozönose und für eine effektive Reinigungsleistung der Langsamsandfilter.

4.3.2.2 Quantitative Zusammensetzung der *Proteobacteria* in Langsamsandfilter-Biofilmen

Das Wissen über die Diversität und die qualitative Zusammensetzung der Bakterienpopulationen natürlicher Habitate ist durch den Einsatz molekularer Fingerprint-Methoden im vergangen Jahrzehnt enorm gewachsen. Die bei Verwendung der Fingerprint-Analysen offen bleibende Frage, welche Bakterien in welchen Mengen in natürlichen Ökosystemen vorkommen, kann durch Oligonukleotidhybridisierungen, insbesondere der *in situ*-Hybridisierung (ISH) beantwortet werden. Die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung einzelner Zellen ist durch den Einsatz fluores-

zenz-markierter Sonden, die die 16S oder 23S rRNS als Zielstruktur haben, möglich (Amann *et al*., 1995). Durch das Vorhandensein konservierter und variabler Bereiche in den rRNS-Molekülen können Sonden für alle phylogenetischen Bakteriengruppen von der Domäne bis zur Art gewählt werden.
Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde und wird sehr häufig für die Analyse der Bakteriengemeinschaften in den verschiedensten Umwelthabitaten eingesetzt (Glöckner *et al*., 1996; Ramsing *et al*., 1996; Snaidr *et al*., 1997; Zarda *et al*., 1997; Böckelmann *et al*., 2000). Neben der Hybridisierung mit einfach fluoreszenzmarkierten Sonden wurden mehrere FISH-Variationen zur Signalverstärkung entwickelt. Eine noch relativ neue Methode ist CARD (catalysed reporter deposition) -FISH. Durch CARD-FISH konnte der Anteil nachweisbarer Süßwasserbakterien deutlich erhöht werden (Pernthaler *et al*., 2002; Sekar *et al*., 2003). In den Filtermaterialproben konnte dagegen keine gleichzeitige Verstärkung der Bakteriensignale und Abschwächung der Fremdsignale mit der CARD-FISH-Methode erzielt werden. Daher wurde die einfache FISH-Methode für die Quantifizierung bedeutender Gruppen von Langsamsandfilter-Biofilmen verwendet. Als bedeutende Gruppe wurden anhand der ARDRA-Daten der vorliegenden Arbeit die *Proteobacteria* eingestuft. Da bei den 16S-Analysen Vertreter der alpha-, beta- und gamma-Subklassen der *Proteobacteria* in den Filtermaterialien nachgewiesen worden waren, sollte die Menge dieser *Proteobacteria*-Subklassen untersucht werden.

In den untersuchten Langsamsandfiltern waren die Anteile der *Proteobacteria* der alpha- und gamma-Subklassen gering, während der Anteil der *Proteobacteria* der beta-Subklasse relativ hoch war (s. Kapitel 3.3.2.2, S. 100ff.). Die Dominanz der *Proteobacteria* der beta-Subklasse wurde in allen Langsamsandfiltern unabhängig von den Betriebsparametern und Filtermaterial nachgewiesen. *Proteobacteria* der beta-Subklasse sind auch in anderen, den Langsamsandfiltern ähnlichen Ökosystemen dominant: in Trinkwasser-Biofilmen (Manz *et al*., 1993; Kalmbach *et al*., 1997b), in Seen und Flüssen (Grossart *et al*., 1993; Alfreider *et al*., 1996; Weiss *et al*., 1996; Böckelmann *et al*., 2000), im Aktivschlamm (Wagner *et al*., 1993) und im Aquifer (Detmers *et al*., 2004). *Proteobacteria* der beta-Subklasse scheinen eine wichtige Gruppe der autochtonen Bakterienpopulationen in Süßwasser-Habitaten zu sein.
Die Dominanz der beta-Subklasse der *Proteobacteria* in den Biofilmen aller untersuchten Langsamsandfilter, die unter verschiedenen Bedingungen betrieben wurden,

deutet darauf hin, dass für die Grundfunktion von Langsamsandfiltern Biofilme vorhanden sein müssen, in denen aktive, autochthone Bakterien dominieren.

4.4 Ausblick

Die molekularbiologischen Analysen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass es sich bei den Bakterienpopulationen der Langsamsandfilter-Biofilme um Multispezies-Gemeinschaften handelt. Es dominieren hygienisch nicht relevante Bakterien, die aus verwandten Habitaten bekannt sind und mit dem Filtermaterial oder dem Zulauf in den Filter gelangen. Die mengenmäßig dominanten Bakterien gehören Klassen mit immenser Stoffwechselvielfalt an, z.B. der beta-Subklasse der *Proteobacteria*. Es wurden aber auch funktionelle Gruppen, wie die an der Nitrifikation beteiligten Bakterien und die wichtige Gruppe der *Cytophaga-Flavobacteria,* detektiert. Um die Anwesenheit solcher Bakteriengruppen näher zu bestimmen, wären Untersuchungen mit der denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) geeignet. Weiterführende Informationen über die Aktivität der vorhandenen Organismengruppen könnten mittels real-time PCR erlangt werden.
Die Entwicklung der Bakterienpopulation im Filterbett wird hauptsächlich durch das Rohwasser beeinflusst, das den Filter passiert. Um herauszufinden, welche Mikroorganismen sich unter welchen Bedingungen entwickeln, wäre die Beschickung mit künstlichem, genau definiertem Rohwasser erforderlich. Nur in diesem Fall kann ein direkter Bezug zwischen der entwickelten Filterpopulation und den Bedingungen hergestellt werden.

Langsamsandfilter können auch unter nicht optimalen Betriebsbedingungen gute Rückhalteleistungen für hygienisch relevante Mikroorganismen erzielen. Die Langsamsandfiltration alleine reicht jedoch nicht aus, um eine stets gleich bleibende bakteriologische Sicherheit des Trinkwassers zu gewährleisten. Eine Verbindung der leistungsstarken, ökonomischen und umweltschonenden Langsamsandfiltration mit weiteren Schritten der Trinkwasseraufbereitung, evtl. auch in Kombination mit einer Desinfektion (chemisch, UV-Behandlung), entsprechend des Multi-Barrieren-Systems, ist sinnvoll.

Coliforme Bakterien und *E. coli* sind die Indikatoren, die am häufigsten verwendet werden, um fäkale Verunreinigungen nachzuweisen. Aufgrund des natürlichen Vorkommens von coliformen Bakterien und *E. coli* in Böden und Gewässern der Tropen, sind diese Bakterien als Indikatoren für fäkale Verunreinigungen in entsprechenden Regionen nicht geeignet. Hier müsste über den Einsatz anderer Indikatororganismen nachgedacht werden.

Für die Überwachung von Wässern werden klassisch mikrobiologische Methoden eingesetzt, die auf rein kulturellen Verfahren beruhen. Mit den kulturellen Verfahren werden zum Einen nicht alle vorhandenen Organismen der Indikatorgruppen erfasst und zum anderen sind die Verfahren teilweise sehr zeitaufwendig. Durch die Entwicklungen der Molekularbiologie in den letzten Jahrzehnten stehen empfindlichere und zeitsparende Nachweisverfahren zur Verfügung. Eine Optimierung der Verfahren für die Wassermatrix ist in den meisten Fällen noch erforderlich, ebenso wie ein Vergleich mit den gesetzlich vorgeschriebenen Verfahren.
Exemplarisch für drei Indikatorparameter sollte in dieser Arbeit ein auf der Gensondentechnologie basierendes Nachweisverfahren geprüft und optimiert werden. Für zwei Parameter, *Enterobacteriaceae* und Enterokokken, gelang die Optimierung eines schnelleren und sensitiveren Verfahrens, bei dem mittels FISH Mikrokolonien nachgewiesen werden. Die entsprechende Fluoreszenz-Mikrokolonie-Hybridisierungs (FMH) -Methode müsste jedoch für jeden Indikatororganismus optimiert und insbesondere im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit den klassisch-kulturellen Nachweisverfahren, entsprechend der Trinkwasserverordnung 2001, verglichen werden.

5. Literaturverzeichnis

Aeppli, J. (1990). Appearance of invertebrates in slow sand filters and reservoirs of the Zurich Switzerland Water Supply. Aqua (Oxf.) 39, 48-55.

Alfreider, J.P., Amann, R., Sattler, B., Glöckner, F.O., Wille, A., Psenner, R. (1996). Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high moutain lake by *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2138-2144.

Amann, R., Krumholz, I., Stahl, D.A. (1990). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172, 762-770.

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59, 143-169.

Amann, R. (1995). *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. Mol. Micro. Ecol. 3.3.6, 1-15.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smit, J.A., Seidman, J.C., Struhl, K.S. (1990). Current protocols in molecular biology. John Wiley, Inc. New York.

Baars, J.K. (1963). Transformations in infiltration ponds and in the soil layers immediately underneath. Lecture 2nd Rudolfs Research Conference, New Brunswick N.J., 5-7 June 1963.

Bahgat, M., Gewedar, A., Zayed, A. (1999). Sand-filters used for wastewater treatment: buildup and distribution of microorganisms. Wat. Res. 33, 1949-1955.

Baker, M.N., Taras, M.J. (1981). The quest for pure water: The history of the twentieth century. Volume 1 and 2, Denver; AWWA.

Barer, M.R., Bribbon, L.T., Harwood, C.R., Nwoughuh, C.E. (1998). The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology. Rev. Med. Microbiol. 4, 183-191.

Bellamy, W.D., Silverman, G.P., Hendricks, D.W., Logsdon, G.S. (1985). Removing *Giardia* cysts with slow sand filtration. J. Am. Wat. Wks. Assoc. 77, 52-60.

Berkenheger, I., Fischer, U. (2004). Competition for polymers among heterotrophic bacteria isolated from particles in the Equatorial Atlantic. Microbiol. 7, 13-18.

Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J., Litt, G.J. (1989). Catalysed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J. Immunol. Methods 125, 279-285.

Böckelmann, U., Manz, W., Neu, T.R., Szewzyk, U. (2000). Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates (`river snow`) in the Elbe river of Germany by cultivation and molecular methods. FEMS Microbiol. Ecol. 33, 157-170.

Bond, P.L., Hugenholtz, P., Keller, J., Blackall, L.L. (1995). Bacterial community structures of phosphate removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1910-1916.

Bonnet, M.C., Welte, B., Montiel, A. (1992). Removal of biodegradable dissolved organic carbon in a water treatment plant. Wat. Res. 26, 1673-1680.

Botzenhart, K. (1994). Die Beherrschung mikrobiologischer Belastungen bei der Oberflächenwasseraufbereitung nach der SWTR (USA). gwf Wasser/Abwasser, 135, 201-206.

Bramucci, M., Kane, H., Chen, M., Nagarajan, V. (2003). Bacterial diversity in an industrial wastewater bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 594-600.

Brand, T., Wohanke, W. (2000). Importance and characterization of the biological component in slow sand filters. Acta Hortic. 554, 313-321.

Brosius, J., Dull, T.L. Sleeter, D.D., Noller, H.F. (1981). Gene organisation and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Molec. Biol. 148, 107-127.

Bruce, A.M, Hawkes, H.A. (1983). Biological filters. In: Cruds, C.R. and Hawkes, H.A. (eds.): Ecological Aspects of Used-Water Treatment. Academic Press, New York.

Buchan, A., Newell, S.Y., Butler, M., Biers, E.J., Holibaugh, J.T., Moran, M.A. (2003). Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6676-6687.

Brümmer, I.H.M., Fleske, A.D.M., Wagner-Döbler, I. (2004). Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5094-5101.

Burman, N.P. (1962). Bacteriological control of slow sand filtration. Effl. Wat. Treatment 2, 674-677.

Burrell, P.C., Keller, J., Blackall, L.L. (1998). Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1878-1883.

Byappanahalli, M., Fowler, M., Shively, D., Whitman, R. (2003). Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a midwestern coastal stream. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4549-4555.

Calaway, W.T., Carroll, W.R., Long, S.K. (1952). Heterotrophic bacteria encountered in intermittent sand filtration of sewage. Sewage Ind. Wastes 24, 742-653.

Calaway, W. (1957). Intermittent sand filters and their biology. Sewage Ind. Wastes 29, 1-5.

Calvo-Bado, L.A., Morgan, J.A.W., Sergeant, M., Pettitt, T.R., Whipps, J.M. (2003a). Molecular characterization of *Legionella* populations present within slow sand filters used for fungal plant pathogen suppression in horticultural crops. Appl. Environ. Microbiol. 69, 533-541.

Calvo-Bado, L.A., Pettitt, T.R., Parsons, N., Petch, G.M., Morgan, J.A.W., Whipps, J.M. (2003b). Spatial and temporal analysis of the microbial community in slow sand filters used for treating horticultural irrigation water. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2116-2125.

Campos, L.C., Su, M.F.J., Graham, N.J.D., Smith, S.R. (2002). Biomass development in slow sand filters. Wat. Res. 36, 4543-4551.

Casamayor, E.O., Schäfer, H., Baneras, L., Pedrós-Alió, C., Muyzer, G. (2000). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 66, 499-508.

Chelius, M.K., Triplett, E.W. (2001). The diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of zea mays L. Microb. Ecol. 41, 252-263.

Cho, J.C., Kim, S.J. (2000). Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. Appl. Environ. Microbiol. 66, 956-965.

Chouari, R., Le Paslier, D., Dagelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A. (2003). Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. Appl. Environ. Microbiol. 68, 7354-7363.

Cleasby, J.L., Logsdon, G.S. (1999). Granular bed and precoat filtration. In: Letterman, R.D (ed.): Water Quality and treatment. New York, McGraw Hill, Inc., 8.1-8.99.

Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. (2003). The ribosomal database project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res. 31, 442-443.

Collins, M.R., Eighmy, T.T., Malley, J.P. (1991). Evaluating modifications to slow sand filters. J. Am. Water Wks. Assoc. 83, 62-70.

Cottrell, M.T., Kirchman, D.L. (2000). Natural assemblages of marine proteobacteria and Cytophaga-Flavobacter consuming low and high- molecular weight dissolved organic matter. Appl. Environ. Microb. 66, 1692-1697.

CWC Clean Washington Center (1995). Evaluation of crushed recycled glass as a filtration medium in slow sand filtration. Report No. GL-95-4 (http://www.cwc.org /glass/gl_htm/ g1954rpt.htm).

CWC Clean Washington Center (1998). Evaluation of recycled glass sand media for high-rate sand filtration. Report No. GL-98-1 (http://www.cwc.org /glass/gl_htm/ g1981rpt.htm).

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. System. Appl. Microbiol. 22, 434-444.

Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (2001). *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5273-5284.

Dang, H., Lovell, C.R. (2000). Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbio. 66, 467-475.

DeLong, E.F., Franks, D.G., Alldredge, A.I. (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached and free-living marine bacterial assemblages. Limnol. Oceanogr. 38, 924-934.

Derakshani, M., Lukow, T., Liesack, W. (2001). Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signatur nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice micocosms. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2), 623-631.

Detmers, J., Strauss, H., Schulte, A., Bergmann, A., Knittel., K., Kuever, J. (2004). FISH shows that *Desulfotomaculum* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. Microb. Ecol. 47, 236-242.

DIN 38402-30 (1997). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Allgemeine Angaben (Gruppe A) – Teil 30: Vorbehandlung, Homogenisierung und Teilung heterogener Wasserproben (A30).

DIN EN 12879 (2001). Charakterisierung von Schlämmen: Bestimmung des Glühverlustes und der Trockenmasse. Beuth Verlag Berlin.

DIN EN 12880 (2001). Charakterisierung von Schlämmen: Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts. Beuth Verlag Berlin.

DIN 38414 (1987). Probenahme von Sedimenten. Beuth Verlag Berlin.

DVGW-Arbeitsblatt W213, Teil IV (Entwurf im Mai 2003). Filtrationsverfahren zur Partikelentfernung bei der Wasseraufbereitung; Teil 4 Langsamfiltration. DVGW-Regelwerke.

Egli, K., Langer, C., Siegrist, H.-R., Zehnder, A.J.B., Wagner, M., van der Meer, J.R. (2003). Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitritation reactors. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3213-3222.

Eighmy, T.T., Collins, M.R., Spanos, K., Fenstermacher, J. (1992). Microbial populations, activities and carbon metabolism in slow sand filters. Wat. Res. 26, 1319-1328.

Ellis, K.V. (1985). Slow sand filtration. Crit. Rev. Environ. Control 154 (4), 315-354.

Ellis, K.V. (1987). Slow sand filtration as a technique for the tertiary treatment of municipal sewages. Wat. Res. 21 (4), 403-410.

Ellis, K.V., Aydin, M.E. (1995). Penetration of solids and biological activity into slow sand filters. Wat. Res. 29, 1333-1341.

Esch, P., Nehrkorn, A. (1988). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen über die mikrobielle Besiedlung von Langsamsandfiltern. Zentralbl. Bakteriol. Hyg. B. 185, 569-579.

Flemming, H.-C., Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. Wat. Sci. Technol. 43, 1-8.

Flemming, H.-C., Wingender, J. (2003). Biofilms. In: Steinbüchel, A. (Hrsg.): Biopolymers 10, 209-245. Wiley-VCH, Weinheim.

Fontes, D.E., Mills, A.L. Hornberger, G.M., Herman, J.S. (1991). Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2473-2481.

Ford, T.E. (1999). Microbiology safety of drinking water: United States and global perspectives. Environ. Health Perspect. 107, Suppl. 1, 191-206

Frankel, R.J. (1981). Design, construction and operation of a new filter approach for treatment of surface waters in southeast Asia. J. Hydrol. 51, 319-328.

Frankland, P.F. (1886). Water-purification: Its biological and chemical bases. Institute of Chemical Engineers, London.

Franks, A.H., Harmsen, H.J.M., Raanges, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., Welling, G.W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3336-3345.

Fry, J.C., Staples, D.G. (1976). Distribution of *Bdellovibrio* bacteriovorus in sewage work, river water, and sediment. Appl. Environ. Microbiol. 31, 469-474.

Fuchs, B.M., Syutsubo, K., Ludwig, W., Amann, R. (2001). *In situ* accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labelled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 67, 961-968.

Fuerst, J.A. (1995). The *Planctomycetes*: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. Microbiology 141, 1493-1506.

Fujioka, R.S., Navikawa, O.T. (1982). Effect of sunlight on the enumeration of indicator bacteria under field conditions. Appl. Environ. Microbiol. 44, 395-401.

Gantzer, C., Gillerman, L., Kuznetsov, M., Oron, G. (2001). Adsorption and survival of faecal coliforms, somatic coliphages and F-specific RNA phages in soil irrigated with wastewater. Wat. Sci. Technol. 43, 117-124.

Gieseke; A., Bjerrum, L., Wagner, M. Amann, R. (2003). Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existimg in a biofilm. Environ. Microbiol. 5, 355-369.

Gillan, D.C., Danis, B., Pernet, P., Loly, G., Dubois, P. (2005). Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. 71, 679-690.

Giovannoni, S.J., Rappé, M.S. (2000). Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. p. 47-84. In: Kirchman, D.L. (ed.): Microbial ecology of the ocean. Wiley Interscience. New York.

Glöckner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, A., Psenner, R., Trebesius, K., Schleifer, K.-H. (1996). An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 19, 403-406.

Glöckner, F.O., Fuchs, B.M., Amann, R. (1999). Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3721-3726.

Gornik, V., Behringer, K., Kölb, B., Exner, M. (2001). Erster Giardiaausbruch im Zusammenhang mit kontaminiertem Trinkwasser in Deutschland. Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz, 4, 351-357.

Graham, N.J.D. (ed) (1988): Slow sand filtration: Recent developments in water treatment technology. John Wiley & Sons, Chichester.

Graham, N.J.D., Collins, R. (eds) (1996). Advances in slow sand alternative biological filtrations. John Wiley & Sons, Chichester.

Graham, N.J.D. (1999). Removal of humic substances by oxidation/biofiltration processes – a review. Water. Sci. Technol. 40, 141-148.

Gribbon, L.T., Barer, M.R. (1995). Oxidative metabolism in nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3379-3384.

Griffiths, B.S., Kuan, H.L., Ritz, K., Glover, L.A., McCaig, A.E., Fenwick, C. (2004). The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland soil. Microb. Ecol. 47, 104-113.

Grobe; S., Henrichs, M., Uhl, M., Merkel, W. (2005). Weitergehende Mischwasserbehandlung mit Bodenfiltern Untersuchungen zum Filteraufbau und Filterbetrieb zur Verbesserung der Reinigungsleistung insbesondere hinsichtlich

hygienisch relevanter Mikroorganismen. Abschlussbericht zum Untersuchungsauftrags des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Munlv) des Landes NRW.

Grossart, H.P., Simon, M. (1993). Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): occurrence, characteristics, and microbial dynamics in lake Constance. Limnol. Oceanogr. 38, 532-546.

Guan, L.L., Hagen, K.E., Tannock, G.W., Korver, D.R., Fasenko,G.M., Allison, G.E. (2003). Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel Electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69 (11), 6750-6757.

Hagendorf, U. (Hrsg.) (2003). Bewachsene Bodenfilter als Verfahren der Biotechnolgie. Umweltbundesamt. ISSN 0722-186X.

Hahn, D., Amann, R., Ludwig, W., Akkermans, A.D.L., Schleifer, K.-H. (1992). Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. J. Gen. Microbiol. 138, 879-887.

Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem. Biol. 5, R245-R249.

Hardina, C.M., Fujjioka, R.S. (1991). Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii`s streams. Environ. Toxicol. Water Qual. 6, 185-195.

Hazen, T.C., Toranzos, G.A. (1990): Tropical source water. In: McFeter, G.A. (ed): Drinking water microbiology– progress and recent developments. Springer-Verlag New York inc.

Hendel, B., Marxsen, J., Fiebig, D., Preuß, G. (2001). Extracellular enzyme activities during slow sand filtration in a water recharge plant. Wat. Res. 35, 2484-2488.

Hendricks, D.W. (1991). Manual of design for slow sand filtration. Denver, CO, American Water Works Association research foundation and American Water Works Association.

Herbold-Paschke, K., Fischer, B., Karch, G., Hahn, T., Botzenhart, K. (1991). Transport von Mikroorganismen unter verschiedenen hydrogeologischen Bedingungen. Forum Städte-Hygiene 42, 102-105.

Heyndrickx, M.L.V., Vandamme, P., Kersters, K., de Vos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. J. Microbial. Methods 26, 247-259.

Hijnen, W.A.M., Schijven, J.F., Bonné, P., Visser, A., Medema, G.J. (2004). Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. Wat. Science Technol. 50, 147-154.

Hill, G., Rai, H. (1982). A preliminary characterization of the tropical lakes of the Central Amazon by comparison with polar and temperate systems. Arch. Hydrobiol. 96, 97-111.

Holms, A.J., Tujula, N.A., Holley, M., Contos, A., James, J.M., Rogers, P., Gillings, M.R. (2001). Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. Environ. Microbiol. 3, 256-264.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Snearth. P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). Family *Enterobacteriaceae*. pp. 175-194. In: Holt, J.G. (ed): Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. Baltimore: Williams and Wilkins.

Hovanec, T.A., Taylor, L.T., Balkis, A., Delong, E.F. (1998). *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. Appl. Environ. Microbiol. 64, 258-264.

Hütter, U., Schulte-Ebbert, U. (2005). Grenzen der Langsamsandfiltration, Möglichkeiten der technischen Modifikation und Anpassung an lokale Gegebenheiten. Abschlussbericht zum Teilprojekt A1 im BMBF-Forschungsvorhaben Exportorientierte Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Wasserver- und -entsorgung Teil I: Trinkwasser. Institut für Wasserforschung GmbH Dortmund (im Druck).

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998): Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. 180, 4765-4774.

Husmann, S. (1978). Die Bedeutung der Grundwasserfauna für die biologischen Reinigungsvorgänge im Interstitial von Lockergesteinen. gwf Wasser-Abwasser 119, 293-302.

Hutchison, M.L., Nicholson, F.A., Smith, K., Keevil, C., Moore, T. (2000). A study of on-farm manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of pathogen transfer into the food chain. MAFF report FS2526. Ministry of agriculture Fisheries and Food, London, United Kingdom. [Online: http://www.pathogenes.org].

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, T., Thomas, D.J.I., Avery, S.M. (2005). Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. Appl. Environ. Microbiol. 71, 691-696.

Jaeger, K.-E., Wohlfahrt, S. (1993). Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung. BioEngineer 2, 39-46.

Jang, J., Kim, B., Lee, J., Kim, J., Jeong, G., Han, H.G. (2002). Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. FEMS Microbiol. Lett. 212, 29-34.

Jansen, G.J., Mooibbroek, M., Idema, J., Harmsen, J.M., Welling, G.W., Degener, J.E. (2000). Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescent labelled oligonucleotide probes. J. Clin. Microbiol. 38, 814-817.

Jen, W.-C., Bell, R.G. (1982). Influence of temperature and time incubation on the estimation of bacterial numbers in tropical surface waters. Wat. Res. 16, 601-604.

Jiang, X., Morgan, J., Doyle, M.P. (2002). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2605-2609.

Jones, J.G. (1977). The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. Freshwater Biology 7, 67-91.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommering-Röser, A., Koops, H.-P., Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3042-3051.

Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U. (1997a.). Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and *in situ* hybridization. FEMS Microbiol. Ecol. 22, 265-280.

Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U. (1997b). Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4164-4170.

Kempf, V.A.J., Trebresius, K., Autenrieth, I.B. (2000). Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid detection of microorganisms in blood cultures. J. Clin. Microbiol. 38 (2), 830-838.

Kilb, B., Kuhlmann, B., Eschweiler, B., Preuß, G., Ziemann, E., Schöttler (1998). Darstellung der mikrobiellen Besiedlungsstruktur verschiedener Grundwasserhabitate durch Anwendung molekularbiologischer Methoden. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 26 (6), 349-354.

Krimmer, V., Merkert, H., von Eiff, C., Frosch, M., Eulert, J., Löhr, J.F., Hacker, J., Ziebuhr, W. (1999). Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidemidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed *in situ* hybridization. J. Clin. Microbiol. 37 (8), 2667-2673.

Küpper, H., Wingender, J., Jaeger, K.-E., Flemming, H.-C. (1999). Eignung von Fluoresceinestern zur Bestimmung der Esterase-Aktivität von Wasserbakterien. Tagungsband der Jahrestagung der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regensburg, 10.-12.5.1999, S. 208-211.

Laetitia, B., Schäfer, H., Joux, F., Courties, C., Muyzer, G., Lebaron, P. (2000). Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. Aquat. Microb. Ecol. 23, 1-11.

Lagacé, L., Pitre, M., Jacques, M., Roy, D. (2004). Identification of bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2052-2060.

Letterman, R.D. (1991). Filtration strategies to meet the surface water treatment rule. Denver, CO, American Water Works association.

Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999). Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depth. Biodivers. Conserv. 8, 659-677.

Liesack, W., Stackebrandt, E. (1992). Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J. Bacteriol. 174, 5072-5078.

Lisle, J.T., Rose, J.B. (1995). *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a minireview. J. Water SRT 44, 103-107.

Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., Amann, R. (1998). Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2691-2696.

Lomans, B.P., Luderer, R., Steenbakkers, P., Pol,. A., van der Drift, C., Vogels, G.D., Op den Camp, H.J.M. (2001). Microbial population involved in cycling of dimethyl sulfide and methanethiol in freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1044-1051.

Lyautey, E., Lacoste, B. Ten-Hage, L., Rols, J.-L., Garabetian, F. (2005). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. Wat. Res. 39, 380-388.

MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. New Engl. J. Med. 331, 161-167.

Mälzer, H.-J. (2005). Optimierung und Erweiterung des Einsatzes von Langsamsandfiltern durch spezielle Auflageschichten und Betriebsweisen. Abschlussbericht des Teilprojektes A2 im BMBF-Forschungsvorhaben Exportorientierte Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Trinkwasserver- und –entsorgung Teil I: Trinkwasser. IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung, Mülheim (im Druck).

Manafi, M., Kneifel, W., Bascomb, S. (1991). Fluorogenic and chromomogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev. 55, 335-348.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). Molecular cloning – A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, New York.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H. (1992). Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria:* problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol. 15, 593-600.

Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.-H., Stenström, T. (1993). *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by

hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2293-2298.

Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K.H. (1994). *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. Water Res. 28, 1715-1723.

Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U., Lawrence, J.R. (1999). Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal scanning microscopy. Microb. Ecol. 37, 225-237.

Marilley, L., Aragno, M. (1999). Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. Appl. Soil Ecol. 13, 127-136.

Mauclaire, L., Schürmann, A., Thullner, M., Zeyer, J., Gammeter, S. (2004). Sand filtration in a water treatment plant: biological parameters responsible for clogging. J Water SRT - Aqua 53, 93-108.

Matthess, G., Bedur, E., Gundermann, K.N., Loof, M., Petera, D. (1991). Vergleichende Untersuchungen zum Filtrationsverhalten von Bakterien und organischen Partikeln in Porengrundwasserleitern I. Grundlagen und Methoden. Zbl. Hyg. 1991, 53-97.

Matthew, T., Kirchman, D.L. (2000). Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5116-5122.

McNair, D. R., Sims, R. C., Sorensen, D. L., Hulbert M. (1987). Schmutzdecke characterization of clinotilolite-amended slow sand filtration. J. Am. Water Wks. Assoc. 79, 74-81.

Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L. (1998). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. Gene 71, 491-499.

Meier, H., Koob, C., Ludwig, W., Amann, R., Frahm, E., Hoffmann, S., Obst, U., Schleifer, K.H. (1997). Detection of enterococci with rRNA targeted DNA probes and their use for hygienic drinking water control. Wat. Sci. Tech. 35, 437-444.

Miskin, I.P., Farrimond, P., Head, I.M. (1999). Identification of novel bacteria lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. Microbiol. 145, 1977-1987.

Moll, D.M., Summers, R.S. (1996). Performance, biomass and community structure profiles of biological rapid media filters, p. 159-166. In: Graham, N. and Collins, R. (eds.): Advances in slow sand and alternative biological filtration. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.

Moll, D.M., Summers, R.S., Breen, A. (1998). Microbial characterization of biological filters used for drinking water treatment. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2755-2759.

Moter, A., Göbel, U.B. (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods 41, 85-112.

Mughal, F.H. (2000). A low-cost water treatment system. DAWN-Business 17.07.2000 (http://www.dawn.com/2000/07/17/ebr4.htm).

Neef, A. (1997). Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Ph.D. Thesis. Technische Universität München, Munich, Germany.

Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M., Liesack, W. (2005). Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. Environ. Microbiol. 7, 382-395.

Ntougias, S., Zervakis, G.I., Kavroulakis, N., Ehaliotis, C. Papadopoulou, K. (2004). Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. System. Appl. Microbiol. 27, 746-754.

Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y. (1999). *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3182-3191.

Oliver, J.D., Bockian, R. (1995). *In vivo* resuscitation and virulence towards mice of viable but not culturable cells of *Vibrio vulnifucus*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2520-2523.

Oluwande, P.A., Sridhar, K.C., Bammeke, A.O., Okubadejo, A.O. (1983). Pollution level in some Nigerian rivers. Wat. Res. 17, 957-963.

Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Yoshimizu, M., Ezura, T., Oyaizu, H. (2002). Oligonucleotide probe for detecting *Enterobacteriaceae* by *in situ* hybridization. J. Appl. Microbiol. 93, 60-68.

Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Ezura, Y. (2003). Seven-hour fluorescence *in situ* hybridization technique for enumeration of *Enterobactericeae* in food and environmental sample. J. Appl. Microbiol. 95, 1182-1190.

Oren, A. (2004). Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. Philo. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 359 (1444), 623-638.

O'Sullivan, L.A., Weightman, A.J., Fry, J.C. (2002). New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in river taff epilithon. Appl. Environ. Microbiol. 68 (1), 201-210.

Øvreås, L., Torsvik, V. (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. Microb. Ecol. 36, 303-315.

Owen, R.J. (1995). Bacteriology of *Helicobacter pylori*. Baillieres Clinic. Gastroenterology 9, 415-446.

Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276 (5313), 734-740.

Payment, P., Franco, E. (1993). *C. perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and cysts. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2418-2424.

Pell, M (1991). Microbiology and nitrogen transformations in sand-filter systems for treatment of household septic-tank effluents. Ph.D. thesis, Swedish Univerity of Agricultural Science, Uppsala.

Pernthaler, J., Gloeckner, F.-O., Schoenhuber, W., Amann, R., (2001). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Meth. Enzymol. 30,207-226.

Pommepuy, M., Butin, M., Derrin, A., Gourmelon, M., Colwoll, R.R., Cormier, M. (1996). Potential of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4621-4626.

Preuß, G., Nehrkorn, A. (1994). Mikrobielle Sukzession bei der Infiltration von Oberflächenwasser. In: Schöttler, U. und Schulte-Ebbert, U. (Hrsg.) „Schadstoffe im grundwasser“ – Band III. Verhalten von Schadstoffen bei der Infiltration von Oberflächenwasser am Beispiel des Untersuchungsgebiets Insel Hensgen im Ruhrtal bei Schwerte. Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Preuß, G., Schwarz, D. (1995). Elimination von Mikroorganismen und Parasiten bei der Langsamsandfiltration. In: Anforderungen an die Aufbereitung von Oberflächenwasser zu Trinkwasser aus mikrobiologischer Sicht. Neuntes Mülheimer Wassertechnisches Seminar, 19.01.1995, IWW-Schriftenreihe Nr. 14.

Ramsing, N.B., Fossing, H., Ferdelman, T.G., Andersen, F., Thamdrup, B. (1996). Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1391-1404.

Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., Lefevre, M., Grimont, P.A.D. (2000). Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli/Escherichia ferusonii* cells by *in situ* hybridization: specifity and potential applications. Res. Microbiol. 151, 521-533.

Rittmann, B.E., Huck, P.M. (1989). Biological treatment of public water supplies. Crit. Rev. Environ. Cont. 19, 179-184.

Rodgers, M., Flanigan, D., Pfaller, S., Jakubowski, W., Kinkle, B. (2003). Identification of a flavobacterium strain virulent against Giardia lamblia cysts. World J. Microbiol. Biotechnol. 19, 703-709.

Roeske, I., Roeske, K., Uhlmann, D. (1998). Gradients in the taxonomic composition of different microbial systems: comparison between biofilms or advanced wasted treatment and lake sediments. Wat. Sci. Technol. 37, 159-166.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1994). *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high GC content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. Microbiol. 140, 2849-2858.

Ross, I.L., Alami, Y., Harvey, P.R., Achouak, W., Ryder, M.H. (2000). Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related pseudomonads isolated from wheat field soils in South Australia. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1609-1616.

Sanger, F., Nicklen, S., Levy, S.B. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 224-228.

Schlesner, H., Stackebrandt, E. (1986). Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirellula* to a new family *Plantomycetaceae* fam. nov. and description of the order *Planctomycetales* ord. nov. Syst. Appl. Microbiol. 8, 174-176.

Schmeisser, C., Stöckigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D. F., Flemming, H.-C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.-E., Streit, W. (2003). Metagenom survey of biofilms in drinking-water networks. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7298-7309.

Schmidt, K., Schwarz, D. (1989). Die Biologie der Wassergewinnung. DVGW-Schriftenreihe Wasser Nr. 201.

Schminke, H.K., Rumm, P., Schmidt, P. (1992). Vom Nutzen der Kleintierwelt – Langsamsandfilter als Lebensraum. Ruhrwassergüte 1992, AWWR (Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke an der Ruhr), Ruhrverband.

Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M., Amann, R. (1998). Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3480-3485.

Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., Amann, R. (1999). Microscale distribution of populations and activities of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. Along a microscale gradient in nitrifying bioreactors: Quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3690-3696.

Schramm, A., de Beer, D., Gieseke, A., Amann, R. (2000). Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. Environ. Microbiol. 2, 680-686.

Schuler, P.F., Ghosh, M.M., Gopalan, P. (1991). Slow sand and diatomaceous earth filtration of cysts and other particulates. Wat. Res. 25 (8), 995-1005.

Schwarz, D. (1978). Sicherung der Wasserversorgung durch Gewässerschutz. Wasseraufbereitung und –Verbund. Gewässerschutz-Wasser-Abwasser 29, 647-668.

Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., Amann, R. (2003). An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescent *in situ* hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2928-2935.

Shamseldin, A.A.Y., Vinuesa, P., Thierfelder, H., Werner, D. (2005): *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate *Phaseolus vulgaris* in Egyptian soils and display cultivar-dependent symbiotic efficiency. Symbiosis 38, 145-161.

Shokouhi, B. (2004). The use of PCR and FISH in the detection and identification of *Cythophaga* in slow sand filters. Master thesis. University Duisburg-Essen.

Simpson, J. (1829). Supply of water to the metropolis. J. of Sci, Literature, the Arts. Royal Inst. of Great Britain, London. Cited by Baker, M.N. (1981): The quest for pure water. Vol. 1. AWWA, Denver.

Smith, Z., McCaig, A.E., Stephen, J.R., Embley, T.M., Prosser, J.I. (2001). Species diversity of uncultured and cultured populations of soil and marine ammonia oxidizing bacteria. Microb. Ecol. 42, 228-237.

Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1997). Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2884-2896.

Solo-Gabriele, H., Wolfert, M.A., Desmarais, T.R., Palmer, C.J. (2000). Source of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. Appl. Environ. Microbiol. 66, 230-237.

Stackebrand, E., Fischer, A., Roggentin, T., Schlesner, H. (1986). The phylogeny of an ancient group of budding peptidoglycan-less eubacteria: the genera *Planctomyces* and *Pirellula*. Enocytobiosis Cell. Res. 3, 29-40.

Staley, J.T., Konopka, A. (1985). Measurement of *in situ* activity of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic end terrestic habitats. Ann. Rev. Microbiol. 39, 321-346.

Stevik, T.K., Ausland, G., Jennsen, P.D., Siegrist, R.L. (1999). Removal of *E. coli* during intermittent filtration of wastewater effluent as affected by dosing rate and media type. Wat. Res., 33, 2088-2098.

Timms, S., Slade J.S., Fricker, C.R. (1995). Removal of *Cryptosporidium* by slow sand filtration. Wat. Sci. Tech. 31 (5-6), 81-84.

Todorov, J.R., Chistoserdov, A.Y., Aller, J.Y. (2000). Molecular analysis of microbial communities in mobile deltaic muds of southeastern Papua New Guinea. FEMS Microbiol. Ecol. 33, 147-155.

Torsvik, V., Goksoyr,J., Daae, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, 782-787

Tsai, Y.-L., Olson, B.H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1070-1074.

Urfer, D., Huck, P.M., Booth, S.D.J., Coffey, B.M. (1997). Biological filtration for BOM and particle removal: a critical review. J. Am. Water Wks. Assoc. 89, 83-98.

Van Cuyk, S., Siegrist, R., Logan, A., Masson, S., Fischer, E., Figueroa, L. (2001). Hydraulic and purification behaviors and their interactions during wastewater treatment in soil infiltration systems. Wat. Res. 35, 953-964.

Vaneechoutte, M. (1996). DNA fingerprint techniques for microorganisms – a proposal for classification and nomenclature. Mol. Biotechnol. 6, 115-142.

Van Hannen, E., Zwart, G., van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Ebert, J., Laanbroek, H. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic structure after mass kysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. Appl. Environ. Microbiol. 65, 795-801.

Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung (2001). Bundesgesundheitsblatt Teil I Nr. 24, 959-969.

Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., De Bruijn, F.J., Werner, D. (1998). Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA Sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 64 (6), 2096-2104.

Visscher, J.T. (1990). Slow sand filtration: design, operation, and maintenance. J. Am. Water Wks. Assoc. 82, 67-71.

Vite, C., Giovannetti. L. (2005). Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. Appl. Soil Ecology 28, 101-112.

Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V., Kapperud, G. (1999). Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1636-1643.

Wagner, M., Amman, R., Lemmer, H., Schleifer, K.-H. (1993). Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1520-1525.

Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K.-H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe for the genus

Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 60, 792-800.

Weber-Shirk, M.L., Dick , R.I. (1997a). Physical-chemical mechanisms in slow sand filters. J. Am. Wat. Wks. Assoc. 89, 87-100.

Weber-Shirk, M.L., Dick , R.I. (1997b). Biological mechanisms in slow sand filters. J. Am. Wat. Wks. Assoc. 89, 72-83.

Weber-Shirk, M.L., Dick, R.I. (1999). Bacterivory by a chrysophyte in slow sand filters. Wat. Res. 33, 631-638.

Weiss, P., Schweitzer, B, Amann, R., Simon, M. (1996). Identification *in situ* and dynamics on limnetic organic aggregates (lake snow). Appl. Environ. Microbiol. 62, 1998-2005.

Williams, M.M, Domingo, J.W., Meckes, M.C., Kelty, C.A., Rochon, H.S. (2004). Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. J. Appl. Microbiol. 96, 954-964.

Winfield, M.D., Groisman, E.A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3687-3694.

Wingender, J., Flemming, H.-C. (2004). Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. Wat. Sci. Technol. 49 (11-12), 277-286.

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221-271.

Woese, C.R., Winker, S., Gutell, R.R. (1990). Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of tetra-loops. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8467-8471.

World Health Organization (WHO) (1989). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed., (WHO, Geneva), p. 8-29.

Wright, R.C. (1986). The seasonality of bacterial quality of water in a tropical developing country (Sierra Leone). J. Hyg. 96, 75-82.

Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R.I., Zeyer, J. (1997). Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. Arch. Microbiol 168, 185-192.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Hilfsmittel genutzt. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten entnommen wurden, habe ich unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Duisburg, Mai 2005

(H. Petry-Hansen)

Lebenslauf

Heike Petry-Hansen
Luisenstraße 62, 46483 Wesel

Persönliche Daten

Geburtsdatum:	10. August 1974
Geburtsort:	Wesel
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

August 1981 - Juli 1985	Gemeinschaftsgrundschule am Hansaring, Wesel
August 1985 – Juli 1994	Andreas-Vesalius-Gymnasium, Wesel

Studium

Oktober 1994 – März 2000	Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn Abschluss als Diplom-Biologin
seit März 2002	Promoventin im Biofilm Centre, Abteilung Aquatische Mikrobiologie (Prof. Dr. Flemming) an der Universität Duisburg-Essen

Beruflicher Werdegang

01.04.00 – 30.09.00	wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Bonn
01.11.00 – 28.02.02	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie, Universität Hamburg
seit 01.03.02	wissenschaftliche Mitarbeiterin im IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung, Mülheim, Bereich Angewandte Mikrobiologie