Detektion und Charakterisierung Polyphosphatspeichernder Bakterien in Gewässersedimenten

Detection and Characterization of Polyphosphate Accumulating Bacteria in Lake Sediments

Dissertation

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

> von Stefanie Glöß

geboren am 03.02.1979 in Plauen

Oldenburg, Mai 2010

Erstreferent:PD Dr. Hans-Peter GrossartErster Koreferent:Prof. Dr. Meinhard Simon

Tag der Disputation:10.05.2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2004 bis April 2007 am Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB) in den Abteilungen Zentrales Chemielabor (Berlin) und Limnologie Geschichteter Seen (Neuglobsow) durchgeführt.

Meiner Familie

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Gloess, S., Grossart, H.-P., Allgaier, M., Ratering, S. & Hupfer, M. (2008). Use of Laser Microdissection for Phylogenetic Characterization of Polyphosphate-Accumulating Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, pp. 4231-4235.

Gloess, S., Hupfer, M., Ratering, S. & Grossart, H.-P. (2007). Detection and phylogenetic characterization of polyphosphate accumulating bacteria in lake sediments. *IGB Annual Report 2006*, pp. 77-88.

Weitere Veröffentlichungen

Hupfer, M., Glöss, S., Schmieder, P. & Grossart, H.-P. (2008): Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments. *International Review of Hydrobiology*. Vol. 93, pp. 1-30.

Hupfer, M., Gloess, S. & Grossart, H.-P. (2007): Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments. *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 47, pp. 299-311.

Tagungsbeiträge

Glöß, S., Hupfer, M. & Grossart, H.-P. (2006): Hunting polyphosphate accumulating bacteria in lake sediments. 11th International Symposium on Microbial Ecology, Aug. 2006, Wien. (Poster)

Glöß, S., Hupfer, M. & Grossart, H.-P. (2005). Nachweis von Polyphosphat und potentiellen Poly-P speichernden Bakterien in Gewässersedimenten. DGL-Jahrestagung, Sept. 2005, Karlsruhe. (Poster)

Glöß, S., Hupfer, M., Grossart, H.-P. (2004). Polyphosphat-speichernde Bakterien in Gewässern – Strategien zur Detektion und Charakterisierung . DGL-Jahrestagung Sept. 2004, Potsdam. (Poster)

Weitere Tagungsbeiträge

Hupfer, M., Glöß, S., Herzog, C. Schmieder, P. & Grossart, H.-P. (2007). Experimenteller Nachweis mikrobieller Polyphosphat-Bildung im Sediment. DGL-Jahrestagung Sept. 2007, Münster. (Vortrag)

INHALTSVERZEICHNIS

Inł	naltsve	erzeich	nis	VI			
Ab	bildur	ngsverz	zeichnis	IX			
Та	beller	verzeio	chnis	XI			
Ab	kürzu	ngen		XII			
Ζu	Isamm	nenfass	sung	1			
Sι	ımmaı	<i>т</i> у		3			
I	Einle	eitung u	und Zielsetzung	5			
	I.1	Mikrok	bielle Diversität und ihre ökologische Bedeutung in limnischen Habitat	en 5			
	I.2	.2 Der Phosphorkreislauf in Gewässersedimenten: Interaktion von					
		geochemischen und biologischen Prozessen					
	I.3	Polypl	hosphat-speichernde Bakterien (PAO)	10			
		I.3.1	Polyphosphat (Poly-P) - "a molecule for many reasons"	10			
		1.3.2	Metabolismus Poly-P-akkumulierender Bakterien	11			
		1.3.3	Poly-P-akkumulierende Bakterien in Belebtschlämmen	13			
		1.3.4	Poly-P-akkumulierende Bakterien in natürlichen Gewässern	15			
	I.4	Von d	ler Bakteriengemeinschaft zur Einzelzelle: Werkzeuge in der				
		Mikrob	biologie	17			
	l.5	Zielse	etzung der Arbeit	20			
II	Material und Methoden						
	II.1	Metho	odenüberblick	22			
	II.2	Ausgewählte Gewässer					
	II.3	Probenentnahme aus Sedimenten					
	II.4	Probe	enentnahme mittels Sedimentfallen	25			
	II.5	Inkuba	ationsexperimente	25			
	II.6	I.6 Physikalische und chemische Parameter					
		II.6.1	Routineanalytik	26			
		II.6.2	Poly-P-Quantifizierung mittels ³¹ P-NMR	26			
	II.7	Chara	akterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft	27			
		II.7.1	Zellextraktion und Zellfixierung aus Sedimentproben	27			
		II.7.2	I.7.2 Quantifizierung der Gesamtzellzahl mittels DAPI-Färbung				
		II.7.3	Analyse der Sedimentproben durch Catalyzed Reporter Deposition				
			Fluoreszenz in situ Hybridisierung (CARD-FISH)	28			
			II.7.3.1 Gelatine-Beschichtung der Objektträger	28			
			II.7.3.2 Durchführung der Hybridisierung und Signalverstärkung	28			
		II.7.4	DNA-Extraktion aus den Sedimentproben	30			
			II.7.4.1 Vergleich verschiedener Extraktionsprotokolle	30			

			II.7.4.2	Modifiziertes Standard DNA-Extraktions-Protokoll	31			
			II.7.4.3	Quantitative Analyse der extrahierten DNA	31			
		II.7.5	DNA-Am	nplifikation mittels PCR	31			
		II.7.6	Analyse	der Bakteriengemeinschaften mittels Denaturierender				
			Gradien	ten Gel Elektrophorese (DGGE)	35			
			II.7.6.1	Trennung der 16S rDNA aus den Sedimentproben	35			
			II.7.6.2	Analyse der 16S rDNA-Fragmente ausgewählter DGGE-				
				Banden	36			
		II.7.7	Analyse	der Sedimentproben anhand von 16S rDNA-Klonbibliotheken	37			
		II.7.8	Sequenz	zierung von DNA-Proben	37			
		II.7.9	Sequenz	zanalyse	38			
	II.8	Einsat	z der Las	er-Mikrodissektion zur Separation und phylogenetischen				
		Chara	kterisierui	ng von PAOs	38			
		II.8.1	Probenv	orbereitung, Laser-Mikrodissektion und Separation	38			
		II.8.2	Molekula	arbiologische Aufarbeitung	39			
			II.8.2.1	DNA-Extraktion	39			
			II.8.2.2	DNA-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	40			
Ш	Erge	bnisse	und Diskı	ussion	42			
	III.1	Unters	uchung v	erschiedener Gewässersedimente	42			
		III.1.1	Bestimm	nung limnologischer und chemischer Parameter	42			
		III.1.2	Poly-P T	iefenprofile	43			
		III.1.3	Poly-P	Sehalte im Sedimentfallenmaterial	44			
		III.1.4	Molekula	arbiologische Voruntersuchungen	46			
			III.1.4.1	DAPI-Zählungen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl	46			
			III.1.4.2	Auswirkung der Enzymbehandlung im CARD-FISH Protokoll				
				auf die Eubacteria Zellzahlen	49			
			III.1.4.3	Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsprotokolle	50			
		III.1.5	Charakte	erisierung der mikrobiellen Gemeinschaft	51			
			III.1.5.1	Mikrobielle Fingerprintprofile	51			
			III.1.5.2	Quantifizierung verschiedener bakterieller Großgruppen	79			
			III.1.5.3	Populationsanalyse anhand von 16S rDNA Klonbibliotheken	58			
	III.2	Unters	uchung d	les Stechlinsee-Sedimentes unter saisonalen Veränderungen	84			
		zierung der Poly-P Gehalte	84					
		III.2.2 Quantifizierung verschiedener Bakteriengruppen						
	III.3 Untersuchung der Induzierbarkeit der Poly-P Bildung durch							
		Inkuba	ubationsexperimente					
		III.3.1	Charakte	erisierung der mikrobiellen Gemeinschaft	90			

			III.3.1.1	Mikrobielle Fingerprintprofile	. 90
			III.3.1.2	Quantifizierung verschiedener Bakteriengruppen	. 92
	111.4	Zwisch	en-Fazit:	Mikrobielle Populationen in Poly-P reichen	
		Gewäs	sersedim	enten	. 97
	III.5	Detekt	ion und C	harakterisierung von PAOs mittels Laser-Mikrodissektion	. 74
		III.5.1	Nachwei	s Poly-P speichernder Mikroorganismen durch DAPI-Färbung	. 75
		III.5.2	Separati	on und Identifikation Poly-P akkumulierender Bakterien	. 77
IV	Gesa	amtbetra	achtung		112
V	Litera	aturverz	eichnis		116

Anhang A - Publikationen

- A1. Use of Laser Microdissection for Phylogenetic Characterization of Polyphosphate-Accumulating Bacteria.
- A2. Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments.
- A3. Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments.

Anhang B – Weitere Angaben

- B1. Dank
- B2. Lebenslauf
- B3. Erklärung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Überblick über mögliche Beziehungen des mikrobiellen P-Pools innerhalb der P-Diagenese in aquatischen Sedimenten. Transferprozesse zwischen den wichtigsten P-Pools (teilweise aus BOSTRÖM et al., 1988 und RODEN & EDMONDS, 1997): a) Zunahme der P-Sedimentation;
 b) enzymatischer Abbau von Eisen-gebundenem P; c) P-Transfer in die benthische Nahrungskette; d) schnelle P-Freisetzung unter wechselnden Redoxbedingungen, e) Bildung von Eisen (II)-P Mineralen, z.B. Vivianit; f) Bildung von Calcium-P Mineralen, z.B. Hydroxyapatit; g) Festlegung als Poly-P (aus HUPFER et al., 2007).
- Abb. 2 Anorganisches Poly-P als Substrat. Die Ketten werden an ihren Endpunkten von AMP, ATP, Glukose oder H₂O in enzymatisch katalysierten Reaktionen angegriffen (KORNBERG, 1995).10

- Abb. 9 Poly-P Gehalte in verschiedenen Sedimenttiefen von Scharmützelsee (beprobt September 2003), Arendsee (beprobt August 2003) und Stechlinsee (beprobt November 2006). 44
- Abb. 11 Prozentualer Anteil der Gesamtzellzahlen in den verschiedenen Extraktionsschritten...... 48
- Abb. 12 Vergleich der EUB338 I-III positiven Zellzahlen aus Scharmützel-, Stechlin- und Arendsee vom Juni 2004 nach Lysozymbehandlung und ohne entsprechende Behandlung. Es wurden die Mittelwerte aus 20 Zählungen mit Standardabweichung logarithmisch dargestellt. 49

- Abb. 16 Phylogenetische Verwandschaftsverhältnisse der ausgeschnittenen und sequenzierten DGGE-Banden. 54
- Abb. 18 Prozentualer Anteil verschiedener Bakteriengruppen an der *Eubacteria* Zellzahl (Sonde EUB338 I-III) in den Sedimenten von Scharmützel-, Arend- und Stechlinsee im Juni 2004 80
- Abb. 19 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA Gensequenzen in die bakteriellen Großgruppen82
- Abb. 21 Mittelgruppen-Poly-P Gehalte in den verschiedenen Inkubationsansätzen. Graue Balken entsprechen den Feldproben, schwarze Balken den Laborproben. Die Abkürzungen sind im Text erläutert. 64
- Abb. 22 DGGE Fingerprintprofile ausgewählter Proben der Inkubationsexperimente (vgl. Abb. 7) .. 90

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Limnologische Parameter der beprobten Seen
Tab. 2	Eingesetzte Oligonukleotidsonden, gelabelt mit HRP (Horseradish-Peroxidase) (FA = Prozent Formamid im Hybridisierungspuffer)
Tab. 3	Verwendete Primerpaare für DGGE-Proben (z.T. aus GICH et al., 2005)
Tab. 4	Übersicht über die eingesetzten PCR-Programme in Abhängigkeit der verwendeten Primer.3
Tab. 5	Zusammensetzung der eingesetzten Stammlösungen
Tab. 6	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel
Tab. 7	Pipettierschema und Amplifikationsbedingungen der Sequenzierungs-PCR
Tab. 8	Sichttiefe (ST) und chemische Parameter der verschiedener Seen, beprobt im Juni 2004. Die chemischen Parameter wurden 0,3-1 m über der Sedimentoberfläche bestimmt 42
Tab. 9	Konzentration und Anteil von Poly-P in Sedimentoberflächen (0-0,5 cm) unterschiedlicher Seen, bei Beprobung der jeweils tiefsten Stelle im Juni 2004; sortiert nach dem Poly-P Gehalt unter Angabe verschiedener Sedimentparameter. Erläuterungen zum NaOH-EDTA Extrakt siehe Kapitel II.6.2. *) für das Müg-Sediment wurde der korrigierte quantifizierte Poly-P Gehalt in Klammern angegeben (Erläuterungen siehe Text)
Tab. 10	Konzentration und Anteil von Poly-P im Fallenmaterial und der Sedimentoberfläche. Schm SF25 = Sedimentfallen im Scharmützelsee; Fallentiefe 25 m. Schm SO = Sedimentoberfläche Scharmützelsee. Are SF40 = Sedimentfallen im Arendsee, Fallentiefe 40 m. Are SO = Sedimentoberfläche Arendsee. SR = Sedimentationsrate. Die Beprobung

- Tab. 12 Phylogenetische Zuordnung und jeweilige Anzahl der analysierten Klone (Primerpaar 341f/907r) aus Klärschlamm und Stechlinsee-Sediment. Für Vertreter von Gattungen, in Fettschrift dargestellt, wurde Poly-P Speicherung in der Literatur beschrieben. Vertreter von Gattungen, mit grauem Hintergrung dargestellt, wurden bereits in Klärschlamm gefunden.110

ABKÜRZUNGEN

Are	Arendsee
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition FISH
DAPI	4`-6`-Diamidino-2-Phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBPR	erhöhte biologische P Entfernung (enhanced biological P removal)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Poly-P Endgruppen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
Fuku NO/SW	Fuchskuhle Nordost/Südwest-Becken
GGI	Groß Glienicker See
GV	Glühverlust
Kap.	Kapitel
MG	Poly-P Mittelgruppen
Müg	Müggelsee
³¹ P-NMR	³¹ P-Kernmagnetresonanzspektroskopie
Р	Phosphat
Poly-P	Polyphosphat
PAO	Poly-P akkumulierende Bakterien (poly-P accumulating organisms)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pet	Petersdorfer See
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Schm	Scharmützelsee
SRP	gelöstes reaktives P (soluble reactive P)
Ste	Stechlinsee
ТМ	Trockenmasse
TP	Gesamt-P (total P)

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Seen bezüglich des Vorkommens von Polyphosphat (Poly-P) untersucht. Parallel erfolgte eine molekularbiologische Charakterisierung der Bakteriengemeinschaften auf unterschiedlichem phylogenetischem Niveau. Ergänzende Untersuchungen wurden an Belebtschlämmen durchgeführt.

Mittels ³¹P-NMR konnten die Poly-P Gehalte in den obersten Sedimentschichten bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass der benthische Poly-P Gehalt nicht an bestimmte chemische Parameter oder an die Trophie gekoppelt ist. Poly-P wurde auch in Sedimentfallenmaterial nachgewiesen. Ein Teil des Poly-P Pools in den obersten Sedimentschichten resultiert folglich aus sedimentierendem Material, welches aus dem Freiwasser eingetragen wird.

Die Sedimente mit den höchsten Werten (Stechlin, Scharmützel- und Arendsee) wurden mikrobiologisch und molekularbiologisch genau untersucht. Ausgehend von der Annahme, dass aus Belebtschlämmen bekannte Poly-P akkumulierende Bakterien (PAO) in diesen Gewässersedimenten vermehrt anzutreffen sind, erfolgte der Einsatz spezifischer Primer und Sonden. PAO, insbesondere Candidatus *Accumulibacter phosphatis* konnten in allen Proben detektiert werden, in keinem Fall spielten sie jedoch eine nennenswerte Rolle in der mikrobiellen Gemeinschaft. Um dominierende Bakteriengruppen innerhalb der Bakteriengemeinschaft zu ermitteln, wurden 16S rDNA Klonbibliotheken erstellt und Großgruppenspezifische Primer (z.B. für Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese, DGGE) und entsprechende Oligonukleotidsonden (CARD-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, CARD-FISH) eingesetzt. Es zeigte sich in allen Proben eine große Diversität, in keinem Fall koinzidierte jedoch ein gehäuftes Vorkommen einer bestimmten Großgruppe mit einem hohen Poly-P Gehalt.

Insbesondere der Stechlinsee war durch besonders hohe benthische Poly-P Gehalte gekennzeichnet. Daher erfolgte eine genauere Untersuchung unter saisonalen Veränderungen. Starke Schwankungen im Poly-P Gehalt konnten festgestellt werden. Auch die Bakteriengemeinschaft zeigte eine große Diversität, häufig mit einem hohen Anteil unbekannter Vertreter.

Die Induzierbarkeit der Poly-P Synthese in Sedimenten und eine daran gekoppelte Präferenz von PAO innerhalb der Bakteriengemeinschaft wurde anhand von Laborexperimenten untersucht. Durch aerobe bzw. alternierende aerobe/anaerobe Bedingungen konnte die Poly-P Bildung gesteigert werden, anaerobe Bedingungen hemmten hingegen die Poly-P Synthese. Eine dominierende Rolle von bekannten PAO bzw. bestimmten bakteriellen Gruppen konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Da die bisher etablierten Methoden zur Charakterisierung der Bakteriengemeinschaft in Hinblick auf PAO nicht den erhofften Erfolg brachten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Laser-Mikrodissektion für Umweltproben etabliert. Ziel war es, Bakterien mit Poly-P Granula (erkenntlich im Fluoreszenzmikroskop mittels DAPI-Färbung) gezielt aus Sediment- und Belebtschlammproben zu separieren, um sie anschließend phylogenetisch charakterisieren zu können. Erste Ergebnisse zeigen eine hohe Diversität von bekannten aber auch bisher unbekannten PAO in den untersuchten Proben. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der verschiedenen Gewässersedimente bzw. Inkubationsexperimente mittels DGGE, CARD-FISH und 16S rDNA Klonbibliotheken werden dadurch untermauert.

SUMMARY

This thesis investigated the occurrence of polyphosphate (poly-P) in different lake sediments in combination with a molecular characterization of the bacterial community structure on different phylogenetic levels. Additional studies were performed on activated sludge.

The poly-P content in the uppermost sediment layers was quantified by ³¹P-NMR. Poly-P content did not correlate with water chemistry or trophic state of the studied lakes. Poly-P was also detected in sediment trap material suggesting that a part of the benthic poly-P pool originates from settling seston.

Surficial lake sediments with the highest poly-P concentrations (Lake Stechlin, Lake Scharmützel and Lake Arend) were analyzed in more detail regarding their microbial community structure using different microbiological and molecular approaches. Based on the assumption that poly-P accumulating bacteria (PAO) known from activated sludge are more present in the selected poly-P rich lake sediments, group-specific primers and oligonucleotide probes were applied for their detection. PAO, especially Candidatus *Accumulibacter phosphatis* were detected in all sediment samples but never indicate to be a prominent member within the studied microbial communities. To further characterize microbial communities in the uppermost sediment layers, a variety of qualitative and quantitative molecular methods were applied including construction of 16S rRNA gene clone libraries, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) and CARD-FISH (catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization) using universal and group specific primers and oligonucleotide probes. A high bacterial diversity was found in all studied samples but no significant correlations occurred between poly-P contents and the presence of specific microbial groups.

Surficial sediment of Lake Stechlin was characterized by an extremely high poly-P content. A study characterizing seasonal variations within poly-P concentration in this lake showed strong temporal variations in the benthic poly-P pool linked to a high microbial diversity with a large fraction of unknown and uncharacterized bacteria.

The inducibility of poly-P synthesis in the uppermost sediment layers and stimulation of growth of PAO under alternating redox conditions were studied in laboratory experiments. Alternating redox conditions as well as aerobic conditions induced the poly-P formation whereas anaerobic conditions inhibited poly-P synthesis. Dominance of known PAO or other bacterial groups could not be observed in any of the experimental setup.

Since analysis of microbial communities using 16S rRNA gene sequencing and FISH did not reveal PAOs responsible for poly-P accumulation in the poly-P rich lake sediments a new strategy was successfully tested enabling identification of selected bacteria from environmental samples. A laser microdissection method has been established for the separation of poly-P positive bacterial cells (visualized by DAPI staining under a fluorescence

microscope) from lake sediment and activated sludge samples. Coupled with a phylogenetic characterization of the selected bacteria a high diversity of known and unknown PAO were identified across all samples. This is in agreement with results from previous studies using DGGE, CARD-FISH and 16S rRNA gene sequencing for characterization of PAO in lake sediments and laboratory incubation experiments.

I EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

I.1 Mikrobielle Diversität und ihre ökologische Bedeutung in limnischen Habitaten

In allen Ökosystemen sind Bakterien die zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden Organismen. Durch sie fließt eine große Fraktion der jährlichen Primärproduktion (COLE, 1999). Faktoren, die ihre Abundanz, Verteilung, Wachstumsrate und Respiration regulieren, beeinflussen letztendlich Schlüsselfunktionen des Ökosystems. Einer der ersten Forscher, der über die signifikante Rolle der Bakterien in aquatischen Systemen berichtete, war LOHMANN (1911). Zu dieser Zeit fehlten der Mikrobiologie jedoch Techniken, um Gewässerbakterien zuverlässig zu zählen oder ihre Produktivität zu bestimmen (POMEROY, 2001).

In Gewässern ist das Sediment eines der vielfältigsten mikrobiellen Habitate (TORSVIK & Ovreås, 2002). Hier findet sich eine beträchtliche Bakterienzahl mit einer hohen Diversität an Morphotypen (RÖSKE et al., 1998) auch in Sedimenttiefen über 5 cm. Aufgrund der hohen Bakterienzahlen und den vielfältigen mikrobiellen Stoffwechselleistungen wurde das Sediment bereits Anfang der 30er Jahre als "natürlicher belebter Schlamm" charakterisiert (HÖLL, 1930). Als mögliche Ursachen für die hohen Zellzahlen können das Vorhandensein von erhöhten Konzentrationen an partikulärem organischem Material (POM) und ein geringerer Grazing-Druck genannt werden (UHLMANN et al., 2000). In Talsperrensedimenten zeigten Untersuchungen der Sedimentoberflächen, dass die Fraktionen der Alpha- und Betaproteobacteria die oberen 5 mm der Biofilme dominieren (RÖSKE et al., 1998; UHLMANN et al., 2000). Dabei koinzidiert die mikrobielle Aktivität mit dem Trophiegrad der Gewässer. Der höhere Input an Detritus in eutrophen Gewässern fördert die Aktivität der Mikroorganismen in den oberen Sedimentschichten, was zu verstärkten Abbauprozessen und höheren Konzentrationen an gelöstem organischem Kohlenstoff im Porenwasser führt (WOBUS et al., 2003). Die intensive mikrobielle Atmung verbraucht Elektronenakzeptoren wie beispielsweise O₂ und NO₃⁻ innerhalb von wenigen Millimetern im Sediment. In der darunter liegenden anaeroben Zone findet die reduktive Auflösung von Eisen- und Manganoxiden sowie die Sulfatreduktion statt. Am Ende der mikrobiellen Abbauprozesse steht schließlich die Methanogenese. Die Intensität dieser mikrobiellen Prozesse beeinflusst direkt die Rücklösung von Nährstoffen, wie beispielsweise Phosphat (P) in das Freiwasser (CASPER et al., 2000).

Die Sediment-Wasser-Grenze gehört zu den biologisch aktivsten Zonen in Gewässern. Organisches Material, dass aus dem Pelagial sinkt, wird an der Sedimentoberfläche von der aktiven benthischen Bakteriengemeinschaft mineralisiert. Die Mikroorganismen im Sediment sind abhängig vom Nachschub an frischem organischem Material, welches durch Sedimentationsprozesse in das Sediment verfrachtet wird, obwohl einige Nährstoffe auch aus tieferen Sedimentschichten nach oben diffundieren können. Durch saisonale Änderungen in Qualität und Quantität des aussinkenden Sestons, bedingt unter anderem durch die mikrobielle Aktivität im Pelagial, können sich biogeochemische Prozesse im Sediment ändern (TUOMINEN et al., 1996).

Bakterien nehmen in aquatischen Ökosystemen eine Schlüsselrolle im Abbau von organischem Material und der Remineralisierung von Nährstoffen ein. So dienen sie beispielsweise als Nahrungsgrundlage für Protozoen und stellen damit die Basis heterotropher aquatischer Nahrungsketten dar (MUYLAERT et al., 2002). Durch Überführung gelöster organischer Substanz in bakterielle Biomasse wird die Weitergabe an Organismen höherer Trophieebenen möglich. Um die Mechanismen zu verstehen, die Stoffumsätze und –flüsse kontrollieren, ist es wichtig, die mikrobiellen Räuber-Beute-Beziehungen, den "microbial loop", zu kennen. Bakterielles Wachstum und Diversität werden durch die zur Verfügung stehenden Nährstoffe (bottom-up-Kontrolle) und durch Bakterienfresser, sogenannte Grazer (top-down-Kontrolle) kontrolliert. Lysis der Bakterienzellen durch virale Infektionen regulieren zusätzlich die bakterielle Biomasse und erhöhen die Freisetzung von gelöstem organischem Material in das Umgebungswasser.

Innerhalb der limnischen Bakteriengemeinschaften gibt es vielfältige Beziehungen. So finden sich im Pelagial neben freien Bakterien auch an Aggregate angeheftete Bakterien. Diese Aggregate bestehen zu einem großen Teil aus organischem Material, wie beispielsweise Algenzellen, und stellen aufgrund der höheren Substratkonzentrationen ein attraktives Habitat für Mikroorganismen dar (GROSSART et al., 1997; KIØRBOE et al., 2002, SIMON et al., 2002). Insbesondere in oligotrophen Gewässern findet ein Großteil der bakteriellen Produktion auf Aggregaten statt. Untersuchungen haben gezeigt, dass mit zunehmender Tiefe das Kohlenstoff:Phosphor (C:P) -Verhältnis in Sinkstoffen und Seston sinkt (GÄCHTER & MARES, 1985; GARCIA-RUiz et al., 1999). Dabei agieren Bakterien als Netto P-Senke. Da Seston meist ein relativ hohes C:P-Verhältnis besitzt, können Bakterien, die Seston als C- und P-Quelle nutzen, kein P abgeben (GARCIA-RUiz et al., 1999). Nur wenn das C:P-Verhältnis von Bakterien und Substrat ähnlich ist, kann P in größerem Umfang abgegeben werden, wie dies beispielsweise für den aeroben Abbau von *Microcystis* oder *Anabaena* beobachtet wurde (TEZUKA, 1989).

Heterotrophe Bakterien selbst haben im Vergleich zum Phytoplankton meist ein niedrigeres C:P Verhältnis (BRATBAK, 1985; VADSTEIN & OLSEN, 1989) und einen hohen P-Gehalt. Ursache hierfür ist die größere Menge P-reicher RNA in Bakterien, die in der bakteriellen Überlebensstrategie begründet ist. Ein schnelles Wachstum setzt ein hohes Maß an Proteinsynthesen voraus. Die RNA fungiert dabei unter anderem als Überträger der "genetischen Information" von der DNA zu den fertigen Proteinen.

I.2 Der Phosphorkreislauf in Gewässersedimenten: Interaktion von geochemischen und biologischen Prozessen

P ist in vielen Gewässern der produktionsbegrenzende Faktor (VOLLENWEIDER, 1976) und Ansatzpunkt vieler Seentherapie-Konzepte. Die genaue Kenntnis der biotischen und abiotischen P-Umsetzungsprozesse ist hierbei unabdingbar, um sinnvolle Sanierungs- und Restaurierungsmaßnahmen einleiten zu können. Insbesondere über das Zusammenwirken geochemischer und biologischer Mechanismen bei der P-Freisetzung aus Sedimenten gibt es Kenntnisdefizite. Vor allem an der Sediment-Wasser-Grenze ist es schwierig, den Einfluß der mikrobiellen Prozesse abzuschätzen, da diese eng mit chemischen Prozessen gekoppelt sind. Außerdem zeigt sich eine hohe Variabilität bezüglich der Sedimentbeschaffenheit zwischen verschiedenen Gewässern.

Der größte Teil des P ist in limnischen Systemen im Sediment festgelegt und unterliegt dort Transformationsprozessen. Folglich besitzen Sedimente eine wichtige Funktion im P-Kreislauf. Die P-Konzentration in Gewässersedimenten liegt dabei häufig um mehr als drei Größenordnungen über der Konzentration im Freiwasser (HUPFER et al., 1995). Wird nur eine sehr geringe Menge P aus dem Sediment freigesetzt, kann dies einen signifikanten Einfluss auf die P-Konzentration im Freiwasser haben. Sedimente können sowohl als P-Quellen als auch –Senken agieren. Über einen längeren Zeitraum wirken Sedimente jedoch immer als Netto-Senken (BOSTRÖM et al., 1988).

Entsprechend der klassischen Vorstellung des P-Kreislaufes kann die Mobilität von P und die Freisetzung aus dem Sediment in den Wasserkörper weitgehend mit dem Redoxchemismus erklärt werden (EINSELE, 1936; MORTIMER, 1941). Mit der Sedimentation gelangt P in das Tiefenwasser bzw. in das Sediment und fällt unter oxischen Bedingungen an Eisen aus. Im anoxischen Milieu hingegen wird Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert und Eisen und P gehen in Lösung (Abb. 1). Mikroorganismen treten hierbei nur indirekt in Erscheinung. Durch Änderungen der Milieubedingungen infolge O2, NO3 oder SO42 - Verbrauch schaffen sie Bedingungen zur Eisen-Reduktion, mit der Folge von P-Freisetzung und Eisen(II)-sulfid-Fällung. Die P-Freisetzungsprozesse aus Sedimenten sind jedoch wesentlich komplexer als sie durch das Einsele-Mortimer-Modell erklärt werden können (HUPFER & LEWANDOWSKI, 2008). Beispielsweise kann in Sedimenten mit einem hohen Anteil an organischer Substanz und genügend Sulfat selbst bei oxischen Bedingungen im Wasserkörper die Rückfällung des freigesetzten P vermindert oder unterbunden sein, weil Eisen im Sediment sulfidisch festgelegt ist (CARACO et al., 1993). P reichert sich im Tiefenwasser an und kann somit auch unter aeroben Bedingungen nicht gefällt werden. Es findet dabei eine Entkopplung des Eisen- vom P-Kreislauf im Sediment statt (CARACO et al., 1993). Hinweise auf die Beziehungen zwischen P-, Eisen- und Schwefel-Kreislauf finden sich bereits in den ersten Arbeiten von OHLE (1938).

Neben der bereits erwähnten P-Rücklösung infolge Eisenreduktion unter anaeroben Bedingungen wurden weitere Prozesse beschrieben, die zur P-Freisetzung unter Abwesenheit von Sauerstoff führen (Abb. 1), z. B.:

- (1) Lösung von Apatit infolge einer pH-Abnahme (GOLTERMAN, 1998, 2001)
- (2) Mineralisierung von sedimentiertem organischem Material durch bakterielle Aktivität (GÄCHTER et al., 1988)
- (3) Abgabe von Poly-P durch benthische Bakterien (GÄCHTER et al., 1988; WAARA, 1993; HUPFER et al., 2007)

In den letzten Jahren wurde zunehmend auch die wichtige direkte Rolle von Mikroorganismen als Poolgröße in Freisetzungs- bzw. Festlegungsprozessen von P erkannt (z. B. GÄCHTER & MEYER, 1993; DAVELAAR, 1993, SCHULZ & SCHULZ, 2005). So kann ein erheblicher Teil des Sediment-P in der bakteriellen Biomasse gebunden sein (GÄCHTER & MEYER, 1993; WAARA, 1993). GÄCHTER & MEYER (1993) kamen zu dem Ergebnis, dass in eutrophen Seen die einfache bis doppelte Menge, in oligotrophen Seen die acht bis neunfache Menge des jährlich durch Sedimentation eingetragenen P in Bakterien festgelegt sein kann. Die benthischen Bakterien können dabei als direkte Quelle von gelöstem P wirken oder indirekt als Eisenreduzierer Einfluss auf den P-Kreislauf nehmen (DE MONTIGNY & PRAIRIE, 1993). Einige anaerobe Bakterien (Denitrifikanten) nutzen Eisen(III) als Elektronenakzeptor, wenn Nitrat verbraucht ist. Andere Bakterien können auch unter aeroben Bedingungen eisengebundenen P lösen und assimilieren (FLEISCHER, 1986, 1988). Weiterhin kann Eisen(III) durch Schwefelwasserstoff chemisch reduziert werden (Abb. 1). Verschiedene Bakterien sind in der Lage, P unter aeroben Bedingungen aufzunehmen und in Form von Poly-P zu speichern (KORNBERG, 1995; KURODA & OHTAKE, 2000). Unter anaeroben Bedingungen wird P wieder abgegeben. Auch verschiedene Algen besitzen die Fähigkeit zur Poly-P-Speicherung. In autotrophen Organismen wird diese durch verschiedene Umweltbedingungen beeinflusst, z.B. durch Licht (SIANOUDIS et al., 1986), Schwefel (LAWERENCE et al., 1998) oder Stickstoffverfügbarkeit (KÜSEL et al., 1989). Bei heterotrophen Organismen kann die Poly-P-Synthese mit physikalischen und chemischen Streßfaktoren in der Umgebung gekoppelt sein (BROWN & KORNBERG, 2004; THOMAS & O'SHEA, 2005). P wird von Bakterien gespeichert, wenn das Wachstum durch andere Nährstoffe als P und organischen Kohlenstoff limitiert wird ("luxury uptake") oder wenn Phungernde Bakterien mit diesem in Kontakt kommen ("P-Overplus-Phänomen"). P wird außerdem freigesetzt, wenn aerobe Bakterien infolge Sauerstoffmangels oder durch virale Infektion lysieren (BOSTRÖM, 1988; DE MOTIGNY & PRAIRIE, 1993; RICCIARDI-RIGAULT et al., 2000).



Abb. 1 Überblick über mögliche Beziehungen des mikrobiellen P-Pools innerhalb der P-Diagenese in aquatischen Sedimenten. Transferprozesse zwischen den wichtigsten P-Pools (teilweise aus BOSTRÖM et al., 1988 und RODEN & EDMONDS, 1997): a) Zunahme der P-Sedimentation; b) enzymatischer Abbau von Eisen-gebundenem P;
c) P-Transfer in die benthische Nahrungskette; d) schnelle P-Freisetzung unter wechselnden Redoxbedingungen, e) Bildung von Eisen (II)-P Mineralen, z.B. Vivianit; f) Bildung von Calcium-P Mineralen, z.B. Hydroxyapatit; g) Festlegung als Poly-P (aus HUPFER et al., 2007).

Der bakterielle Beitrag zum P-Pool in Sedimenten kann durch die Kenntnis der Bakterienzahl, des organischen P-Gehaltes und dem C:P Verhältnis abgeschätzt werden (z.B. GÄCHTER et al., 1988, BOSTRÖM et al., 1989, GÄCHTER & MEYER, 1993, GOLTERMAN, 2004). Diese Abschätzungen unterliegen jedoch enormen Schwankungen, da das spezifische Zellvolumen, der C-Gehalt bezogen auf das Biovolumen und das C:P-Verhältnis sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Bakterienspezies sehr variabel sein kann. Während bakterielle Zellzahlen häufig zwischen 10⁹ bis 10¹¹ Zellen g⁻¹ TM⁻¹ variieren, beträgt der bakterielle C-Gehalt bis zu 20 % des C-Gehaltes in Sedimenten (GÄCHTER et al., 1988; SCHALLENBERG & KALFF, 1993). Für den P-Gehalt finden sich Werte von 4 bis 42 µg P pro mm³ Biomasse (GÄCHTER & MEYER, 1993). Das C:P Verhältnis in aquatischen Bakterien variiert, abhängig vom physiologischen Status und der P-Verfügbarkeit, von 28 (VADSTEIN et al., 1988) bis 50 (FAGERBAKKE et al., 1996); die exzessive Akkumulation von P in Form von Poly-P wird bei der Bestimmung solcher Verhältnisse jedoch häufig ausgeschlossen. Kalkulationen für den Beitrag der bakteriellen Biomasse zum Gesamt-P in den obersten Sedimentschichten (zwischen 0-1 cm Tiefe) verschiedener Seen reichen von 2,2 bis 52,5 % (BELL & AHLGREN, 1987; GÄCHTER et al., 1988; LACZKO, 1988; GOEDKOOP & PETTERSSON, 2000).

Jedoch existieren in den obersten Sedimentschichten in Abhängigkeit von der Jahreszeit ausgeprägte Gradienten bezüglich der Bakterienabundanz und –biomasse, die zudem zwischen verschiedenen Sedimenten unterschiedlich stark ausgeprägt sind. In Abhängigkeit von Sedimenttiefe und Sedimentbeschaffenheit kommt es somit zu starken Schwankungen bei der Bestimmung des mikrobiellen P-Pools im Sediment (GÄCHTER et al., 1988; BOSTRÖM et al., 1989, BRUNBERG, 1995).

I.3 Polyphosphat-speichernde Bakterien (PAO)

I.3.1 Polyphosphat (Poly-P) - "a molecule for many reasons"

Dieser Ausspruch stammt von KORNBERG (1994) und beschreibt die wichtige Bedeutung von Poly-P für Organismen. Modellexperimente zeigen, dass Poly-P wahrscheinlich bereits auf der Urerde eine wichtige Rolle in der Synthese von Nukleinsäuren und anderen Makromolekülen spielte (KULAEV, 1979). Eine Vielzahl von Fakten stützt die Vorstellung, dass diese Polymere von sehr altem evolutionärem Ursprung sind. So findet sich eine Reihe von Enzymen des Poly-P- Stoffwechsels in Prokaryoten, nicht jedoch in Eukaryoten. Während der Evolution von den Prokaryoten hin zu den Eukaryoten nahm die energetische Rolle von Poly-P ab (KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000).

Anorganisches Poly-P, erstmals vor mehr als hundert Jahren identifiziert (LIEBERMANN, 1888 in KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000), ist ein Polymer aus mehreren zehn bis hunderten Orthophosphat (P_i) –Resten, die durch energiereiche Phosphoranhydridbindungen miteinander verbunden sind (KORNBERG, 1995) (Abb. 2).



Abb. 2 Anorganisches Poly-P als Substrat. Die Ketten werden an ihren Endpunkten von AMP, ATP, Glukose oder H₂O in enzymatisch katalysierten Reaktionen angegriffen (KORNBERG, 1995).

Poly-P ist in lebenden Organismen weit verbreitet, sowohl in Bakterien, Protozoen, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren (KULAEV, 1979). Insbesondere in Bakterien spielt das Poly-P eine wichtige Rolle sowohl in der Regulation verschiedener biochemischer Prozesse als auch bei der Resistenz von Bakterien während ungünstiger Umweltbedingungen (KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000). Die höchsten Biomasse-spezifischen Poly-P-Gehalte finden sich in Bakterien, die Poly-P als Energiereserve speichern, insbesondere unter fluktuierenden Umweltbedingungen (KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000).

Das wichtigste Enzym, welches die Poly-P Synthese in Bakterien vermittelt, ist die Polyphosphat-Kinase (PPK). Der Syntheseweg von Poly-P ist die Polymerisierung der terminalen P der ATP-Moleküle durch PPK (Abb. 3). Diese Reaktion ist reversibel, indem die PPK den terminalen P-Rest von Poly-P auf ADP überträgt und ATP synthetisiert. Eine weitere Quelle von ATP ist die AMP-Attacke auf Poly-P, wodurch ADP entsteht. Diese Reaktion wird durch die AMP-Phosphotransferase katalysiert. Aus ADP wird durch Kopplung mit der PPK oder der Adenylat-Kinase ATP synthetisiert. Ein weiteres Enzym, die Exopolyphosphatase (PPX) katalysiert die Hydrolyse der terminalen Reste in P_i mit einer starken Präferenz für lange Poly-P Ketten (Abb. 3).

n ATP	<->PPK →	poly-P _n + n ADP	(I)
poly-P _n	◆ PPX	Pi + poly-P _{n-1}	(11)

Abb. 3 Poly-P-Synthese bzw. Degradation katalysiert durch (I) die Polyphosphatkinase (PPK) und (II) die Exopolyphosphatase (PPX) (KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000).

Sowohl PPK als auch PPX liegen im gleichen Operon (KORNBERG, 1995). Mutationen im PPK codierenden Gen (*ppk*) resultieren in einem signifikanten Mangel an Poly-P in der Zelle (AKIYAMA et al., 1992; RAO & KORNBERG, 1996). Werden hingegen die Gene, welche für die PPK (*ppk*), die Acetat-Kinase (*acka*) und das P_i-spezifische Transportsystem (*pstS, pstC, pstA, pstB*) codieren, aktiviert, so steigt das Ausmaß der Poly-P-Akkumulation an. Dies konnte an einem rekombinanten *E. coli* Stamm gezeigt werden, dessen P-Gehalt durch genetische Manipulation auf 16 % der TM stieg. Dies ist etwa das 10-fache gegenüber dem Kontrollstamm (HARDOYO et al., 1994).

I.3.2 Metabolismus Poly-P-akkumulierender Bakterien

Für die Beschreibung der Poly-P-Akkumulation unter fluktuierenden Bedingungen existieren verschiedene biochemische Modelle, die von diversen Belebtschlammuntersuchungen abgeleitet wurden (COMEAU et al., 1986; WENTZEL et al., 1991, VAN LOOSDRECHT et al., 1997; MINO et al., 1998). Folgendes vereinfachtes Modell der Poly-P-Speicherung in Mikroorganismen lässt sich daraus ableiten (Abb. 4):



Abb. 4 Vereinfachtes Modell des Stoffwechsels Poly-P-akkumulierender Bakterien. Kurzkettige Fettsäuren (kkFS) werden unter anaeroben Bedingungen als Poly-betahydroxyalkanoate (PHA) unter Abbau der Poly-P Reserven gespeichert. Bei Aerobie (oder anoxischen Bedingungen) wird der PHA Speicher für das Zellwachstum und das Auffüllen des Poly-P-Pool verwendet (verändert nach HESSELMANN et al., 1998).

<u>Unter anaeroben Bedingungen</u> können die obligat aeroben heterotrophen Poly-P-Bakterien (PAO) nicht wachsen. Sie nutzen jedoch den intrazellulären Poly-P-Pool als Energiequelle (durch Spaltung der energiereichen Anhydridbindung werden 42 KJ/Mol freigesetzt). Die gewonnene Energie wird zur Synthese von Polyhydroxyalkanoaten (PHA; z. B. Poly-betahydroxybutyrat) aus Monomeren, wie z.B. Acetat, genutzt. Die benötigten kurzkettigen Fettsäuren werden aus der Umgebung in die Zellen aufgenommen. Die Substrate entstehen durch die Aktivität fermentativer Bakterien, die nach Einsetzen der Anaerobie organische Kohlenstoff-Komponenten in diese Fettsäuren umwandeln. Ein Teil des aufgenommenen Acetats wird in aktivierter Form (Acetyl-Coenzym A) in den Citratzyklus eingeschleust. Dies ist zur Aufrechterhaltung der zellulären Lebensfunktionen notwendig.

<u>Unter aeroben (bzw. auch anoxischen) Bedingungen</u> nutzen die PAO die anaerob gespeicherten intrazellulären Reservestoffe als Energie- und C-Quelle zum Wachstum. Gleichzeitig wird P aus der Umgebung aufgenommen und als Poly-P in der Zelle gespeichert. Vermutlich besitzen PAO einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen aeroben heterotrophen Bakterien, die für ihre Synthesen ausschließlich exogene Substrate nutzen. Entsprechend den vorgegebenen alternierenden Bedingungen a) anaerob-aerob oder b) anaerob-anoxisch kommt es zur Anreicherung von a) PAO oder b) DPAO (denitrifizierende PAO). Bisher wurde angenommen, dass es sich um unterschiedliche Organismen handelt. Inzwischen gibt es vermehrt Indizien, dass es die gleichen Organismen sind, die sowohl Sauerstoff als auch Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen können (ZENG et al., 2003).

I.3.3 Poly-P-akkumulierende Bakterien in Belebtschlämmen

Bakterien, die in der Lage sind, Poly-P intrazellulär zu speichern, sind die Akteure der erhöhten biologischen P-Eliminierung (EBPR, enhanced biological phosphorus removal) aus Abwässern und in diesem Zusammenhang von großem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse. Der bisherige Kenntnisstand über diese Bakterien beruht auf Untersuchungen von Belebtschlämmen. Der Prozeß der EBPR wird seit mehr als drei Jahrzehnten intensiv untersucht, mit dem Ziel niedrige P-Werte im Abwasser zu erhalten. Es handelt sich um einen ökonomischen und umweltfreundlichen Prozeß, der jedoch nicht immer stabil abläuft und dessen Fehlersuche bzw. -behebung sich oft schwierig darstellt, da die Wechselwirkungen der mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Belebtschlamm und die zugrundeliegenden Mechanismen nicht komplett verstanden sind.

In den ersten mikrobiologischen Untersuchungen wurden Vertreter der Gattung Acinetobacter sp. isoliert (FUHS & CHEN, 1975; VAN GROENESTIJN et al., 1987), mit der Annahme, dass diese Bakterien für die vermehrte P-Akkumulation verantwortlich sind. Auch Microlunatus phosphovorus (NAKAMURA et al., 1995) und Lampropedia spp. (STANTE et al., 1997) wurden als Poly-P-Speicherer isoliert. Allerdings scheint keiner der isolierten Stämme im Belebtschlamm zu dominieren, noch zeigten sie typische Charakteristika der P-Entfernung aus Belebtschlämmen (KORTSTEE et al., 2000). Aufgrund der Selektivität von kultivierungsabhängigen Methoden werden vermehrt kultivierungsunabhängige Techniken wie Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), Klonierung von phylogenetischen Markergenen oder Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) eingesetzt, um die Bakteriengemeinschaften in Belebtschlämmen zu charakterisieren. Eine Übersicht etablierter Methoden findet sich in Abb. 5 und eine Beschreibung der Techniken in Kapitel I.4. Der Einsatz spezifischer Oligonukleotidsonden zur Detektion taxonomischer Gruppen (z.B. Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria) zeigte, dass Betaproteobacteria in der biologischen Abwasserreinigung dominieren (BOND et al., 1995 und 1999; KÄMPFER et al., 1996; MUDALY et al., 2000; LIU et al., 2001). Die Kombination von FISH mit DAPI-Anfärbung der intrazellulären Poly-P-Granula ergab hingegen, dass Bakterien, die Poly-P-Granula enthalten, in die Gruppe der Alphaproteobacteria und Actinobacteria einzuordnen sind (KAWAHARASAKI et al., 1999). Obwohl Betaproteobacteria in dieser Untersuchung dominierten, enthielten viele von ihnen keine Poly-P-Granula. Weitere dominante Gruppen Belebtschlamm, die mittels FISH quantifiziert wurden, sind das Cytophagaim Flavobacterium-Cluster des Bacteroides Phylum, grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt (Guanin-Cytosin-Gehalt; Actinobacteria) sowie Gammaproteobacteria

(KAWAHARASAKI et al., 1999; HESSELMANN et al., 1999; MUDALY et al., 2000). Mit dieser Methode können jedoch keine Aussagen über die Fähigkeit zur Poly-P-Speicherung getroffen werden. Detailliertere taxonomische Informationen finden sich unter anderem bei HESSELMANN et al. (1999), CROCETTI et al. (2000), LEE et al. (2003), und JEON et al. (2003) die verschiedene molekularbiologische Methoden kombinieren und neu designte Oligonukleotidsonden einsetzen. Sie detektierten Bakterien, die der Gattung Rhodocyclus nah verwandt sind, als Hauptakteure der vermehrten P-Akkumulation. Rhodocyclus ist phylogenetisch in die Betaproteobacteria-2 Untergruppe einzuordnen. HESSELMANN et al. (1999) nannten diese Vertreter « Candidatus Accumulibacter phosphatis » (Accumulibacter). Accumulibacter ist jedoch, im Gegensatz zu anderen Vertretern der Gattung Rhodocyclus, nicht zum phototrophen Wachstum fähig und weist eine andere Zellform auf. Verschiedene weitere Forschergruppen konnten Accumulibacter als Poly-P-Speicherer im Belebtschlamm nachweisen (LIU et al., 2001; LEVANTESI et al., 2002; BLACKALL et al., 2002; ZENG et al., 2003; PIJUAN et al., 2004). Durch optimierte Bedingungen erreichte Accumulibacter in Belebtschlämmen einen Anteil an der Bakteriengemeinschaft von > 90 % (LU et al., 2006). Durch Kombination der FISH-Technik mit der Mikroautoradiographie (MAR-FISH) kann, neben der Analyse der mikrobiellen Populationsstruktur, die in situ Aufnahme von radioaktiv markierten Substraten spezifischer Bakterien untersucht werden. In kommunalen Kläranlagen assimilierten verschiedene Morphotypen der Betaproteobacteria, die mit der Oligonukleotidsonde BET42a detektiert wurden, radioaktiv markiertes P (LEE et al., 1999). Gammaproteobacteria (Oligonukleotidsonde GAM42a) hingegen nahmen in dieser Studie Ρ kein radioaktives auf. Unter Verwendung der Accumulibacter-spezifischen Oligonukleotidsonde konnte ferner gezeigt werden, dass diese Bakterien Acetat, Pyruvat, Propionat und Glutaminsäure assimilieren. Entsprechend dem biochemischen Modell (Abb. 4) speicherten sie unter anaeroben Bedingungen PHA und unter aeroben Bedingungen Poly-P (KONG et al., 2002 und 2004). Auch für andere Bakterien, insbesondere der Alpha- and Gammaproteobacteria konnte eine Poly-P Akkumulation gezeigt werden, wenngleich der Anteil dieser Bakterien an der mikrobiellen Gemeinschaft eher gering war (KONG et al., 2004). Der Nachweis der Poly-P Speicherung von Belebtschlamm-Bakterien, die eng verwandt zur Gattung Tetrasphaera sind, konnte ebenfalls mittels MAR-FISH erbracht werden (KONG et al., 2005). Diese Bakterien assimilierten, abweichend vom biochemischen Modell, kein Acetat und speicherten auch kein PHA. Die hohen gefundenen Zellzahlen der Tetrasphaera-verwandten Bakterien und ihre relativ hohe Abundanz in verschiedenen kommunalen Kläranlagen weisen jedoch auf eine ähnlich wichtige Rolle im EBPR-Prozeß hin, wie sie für die Vertreter des Rhodocyclus Clusters gezeigt werden konnte (KONG et al., 2005).

Auch DGGE Analysen zeigten eine große Diversität in den mikrobiellen Belebtschlamm-Popluationen (ONDA et al., 2002). Änderungen in der Betriebsweise der Kläranlagen scheinen die Etablierung der mikrobiellen Gemeinschaft signifikant zu beeinflussen (ONUKI et al., 2002). In verschiedenen Studien zeigte die Sequenzanalyse ausgeschnittener Banden eine enge Verwandtschaft mit der Gattung *Rhodocyclus* (AHN et al., 2002; ONDA et al., 2002; ONUKI et al., 2002), was ein weiterer Beweis für die wichtige Rolle dieser PAO in Anlagen mit EBPR ist.



Abb. 5 Überblick über die wichtigsten bisher eingesetzten Methoden zur Detektion und Quantifizierung von Poly-P und Poly-P akkumulierenden Mikroorganismen in Belebtschlämmen und limnischen Sedimenten (verändert aus HUPFER et al., 2008).

I.3.4 Poly-P-akkumulierende Bakterien in natürlichen Gewässern

In der Literatur finden sich nur sehr wenige Veröffentlichungen, die sich mit heterotrophen PAO in natürlichen Gewässern beschäftigen. Als theoretische Arbeiten sind hier insbesondere GÄCHTER & MEYER (1993), DAVELAAR (1993) und HUPFER et al. (2007) zu nennen. PAO sind möglicherweise ubiquitär in der Natur verbreitet (DAVELAAR, 1993). Diese Mikroorganismen profitieren von fluktuierenden anaeroben und aeroben Bedingungen.

Diese Vermutungen werden durch verschiedene Untersuchungen untermauert (z.B. FLEISCHER, 1978 und 1983; WAARA et al., 1993; HUPFER et al., 1995 und 2004; KHOSHMANESH et al., 1999 und 2002). So zeigen die Ergebnisse von FLEISCHER (1978, 1983), dass zumindest ein Teil des unter anaeroben Bedingungen aus dem Sediment freigesetzten P aus bakteriellen Zellen stammt. Auch BOSTRÖM et al. (1982, 1988) weisen auf die P-Mobilisierung als Resultat bakterieller Aktivität hin. UHLMANN & BAUER (1988) konnten durch Einsatz von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gekoppelt mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDXS) erstmals Bakterien mit intrazellulären Poly-P Granula in einem Gewässersediment detektieren. Durch den Einsatz der ³¹P NMR-Spektroskopie konnte Poly-P sowohl in limnischen Sedimenten (HUPFER et al., 1995 und 2004, REITZEL et al., 2006) als auch marinen Sedimenten (CARMAN et al., 2000; SANNIGRAHI & INGALL, 2005) nachgewiesen werden. Dieses Poly-P kann nur aus lebenden bzw. toten Mikroorganismen stammen, da Poly-P nicht während der Extraktionsschritte entstehen kann. Außerdem wird freies Poly-P unter natürlichen Bedingungen sehr schnell enzymatisch abgebaut. Somit wurde auch die These von GOLTERMAN (2004) entkräftet, wonach bakterielles P keine wichtige Rolle im P Zyklus von Sedimenten spielt. In einem Gewässer-Screening wurden 22 europäische Seen hinsichtlich ihres benthischen Poly-P Gehaltes untersucht (HUPFER et al., 2004). Mit Ausnahme von 4 Seen konnte in allen Gewässern Poly-P in den obersten Sedimentschichten nachgewiesen werden mit einem Anteil von 1,5-11,4 % am Gesamt-P Gehalt, unabhängig von Trophiegrad und Redoxbedingungen. Ferner konnte Poly-P nur in den oberen, nicht aber in den tieferen (4-5 cm) Sedimentschichten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde Poly-P in Sedimentfallenmaterial und Sestonproben detektiert. Das stützt die Annahme, dass zumindest ein Teil des Poly-P Pools im Sediment aus dem Pelagial stammt. Dabei könnte Poly-P sowohl in Form von lebenden Algen als auch besiedeltem Detritus in das Sediment eingebracht werden (REITZEL et al., 2006). Diese Sinkstoffe bestehen aus aggregiertem abgestorbenem Zoo- und Phytoplankton, welches von Bakterien und Pilzen besiedelt ist (GROSSART et al., 1997, SIMON et al., 2002).

Offen bleibt derzeit die Frage, ob das in den Sinkstoff-Fallen nachgewiesene Poly-P bakteriellen Ursprungs ist und/oder ob es durch absinkende Algen in das Sediment eingetragen wird. Aufgrund der relativ langen Expositionsdauer der Fallen ist es außerdem möglich, dass die Poly-P Bildung erst in den Fallen stattfindet. Weiterhin gibt es derzeit nur wenige Erkenntnisse über die eindeutige phylogenetische Einordnung der PAO und welche Habitate sie besiedeln. Außerdem bleibt zu klären, welche Stellung und Funktion sie in der gesamten Bakterienpopulation einnehmen und welche Rolle sie im P-Kreislauf spielen. Sind diese Fragen geklärt, kann man weitere Aussagen über die funktionelle Rolle der Poly-P-spei-chernden Bakterien innerhalb eines Gewässer-Ökosystems treffen.

I.4 Von der Bakteriengemeinschaft zur Einzelzelle: Werkzeuge in der Mikrobiologie

Um die ökologische Rolle von spezifischen Bakterien bzw. Bakteriengemeinschaften in (Öko)-Systemen besser zu verstehen, ist es notwendig, diese zu separieren. Studien zur Phylogenie und Physiologie werden erst dadurch möglich.

Bis in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts erfolgten solche Untersuchungen mittels kultivierungsabhängiger Methoden, beispielsweise durch Isolierung von Bakterien in **Reinkultur** oder die Quantifizierung von Mikroorganismen durch Bestimmung der Anzahl an koloniebildenden Einheiten (colony forming unit, CFU). Reinkulturen ermöglichen die Einstellung standardisierter Bedingungen und die Durchführung von morphologischen, metabolischen und physiologischen Untersuchungen. Der Erfolg dieser sehr zeitintensiven Methoden eingestellten Bedingungen. Schätzungen zufolge lassen sich derzeit weniger als 1 % aller Bakterien erfolgreich *in vitro* kultivieren (WAGNER et al., 1993, AMANN et al., 1995). Diese geringe Kultivierbarkeit wurde als "great plate count anomaly" von STALEY & KONOPKA (1985) beschrieben. Da sogenannte "unkultivierbare Bakterien" in der Natur sehr wohl wachsen, basiert ihre Unkultivierbarkeit im Labor auf dem bisherigen fehlenden Kenntnisstand über die Wachstumsansprüche dieser Mikroorganismen und den unzureichenden methodischen Möglichkeiten.

Neue Medien und Kultivierungsstrategien lassen die Stammsammlungen stetig wachsen. Ein erfolgreicher experimenteller Ansatz war und ist das Ausbringen von Bakterienzellen in **Diffusionskammern** in ihre natürliche Umwelt (KAEBERLEIN et al., 2002). In der natürlichen Bakteriengemeinschaft bilden Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren ein Kommunikationsnetzwerk, welches in der Petrischale nicht zur Verfügung steht. Durch Diffusionskammern lässt sich dieses Problem teilweise lösen. Ein weiterer Ansatz ist die *in vitro* Zugabe von kleinen Signalmolekülen, wie beispielsweise kurzen Peptiden. Dadurch kann das *in vitro* Wachstum bisher unkultivierbarer Bakterienspezies erreicht werden (NICHOLS et al., 2008).

Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher aber noch nicht gelungen, PAO aus Belebtschlämmen zu isolieren, die maßgeblich an der P-Elimination beteiligt sind.

Um Aussagen über die Zusammensetzung und Dynamik der mikrobiellen Biozönose treffen zu können, sind kultivierungsabhängige Methoden gänzlich ungeeignet, da sie stets zu einer Selektion von Bakterien führen. Die Auswahl der Kulturbedingungen beeinflusst entscheidend das Wachstum, da *in situ* Bedingungen nur ansatzweise eingestellt werden können und folglich nur Vertreter wachsen, die den vorgegebenen Kulturbedingungen am besten angepasst sind. In den ersten mikrobiologischen Belebtschlammuntersuchungen wurden Vertreter der Gattung *Acinetobacter* sp. regelmässig isoliert (FUHS & CHEN, 1975; VAN GROENESTIJN et al., 1987), mit der Annahme, dass diese Bakterien für die vermehrte P-Akkumulation verantwortlich sind. Erst die Entwicklung kultivierungs<u>un</u>abhängiger Methoden widerlegte diese Annahme.

Ein entscheidender Meilenstein in der Einführung kultivierungsunabhängiger Methoden war die Entwicklung der **Polymerase-Ketten-Reaktion** (polymerase chain reaction, PCR) durch MULLIS (SAIKI et al., 1985; MULLIS & FALOONA, 1987) bei der DNA *in vitro* gezielt vervielfacht werden kann. In der mikrobiellen Ökologie stehen dabei insbesondere Gensequenzen der 16S rRNA als "molekulare Chronometer" im Mittelpunkt (WOESE, 1987). Ihr Vorhandensein in allen Bakterien, die hohe Kopiezahl und die ausreichende Länge und Zusammensetzung (von variablen bis hin zu stark konservativen Bereichen) ermöglichen Verwandtschaftsuntersuchungen auf unterschiedlichem phylogenetischem Niveau (PACE et al., 1986). Mit der amplifizierten DNA als Ausgangspunkt können durch Einsatz weiterer molekulabiologischer Methoden unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet werden.

Beispielsweise erlaubt die **Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese** (DGGE) die sequenzspezifische Auftrennung von PCR-Produkten gleicher Länge (MUYZER et al., 1993). Diese "Fingerprint"-Technik ermöglicht somit einen raschen Vergleich von unterschiedlichen Bakteriengemeinschaften oder dynamischen Veränderungen innerhalb einer Gemeinschaft, jedoch können keine Aussagen zur Abundanz getroffen werden. Um genaue phylogenetische Informationen über eine Bakteriengemeinschaft zu erhalten, hat sich die Erstellung von 16S rDNA **Klonbibliotheken** bewährt. Durch die Erstellung phylogenetischer Bäume können Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb einer Bakteriengemeinschaft visualisiert werden. Die Vollständigkeit einer Klonbibliothek ist jedoch in großem Maße von der Effizienz der eingesetzten PCR und der Zahl der analysierten Klone abhängig. Daher eignet sich diese Methode insbesondere zur phylogenetischen Erfassung dominanter Bakteriengruppen, ohne jedoch Aussagen zur *in situ* Dominanz verschiedener Bakteriengruppen treffen zu können.

Diese Lücke kann durch die Verwendung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) geschlossen werden, ein PCR-unabhängiges Verfahren zur quantitativen Analyse von Bakteriengemeinschaften *in situ* (AMANN & LUDWIG, 1994; AMANN et al., 1995). Durch die Auswahl entsprechender Oligonukleotidsonden ist die Quantifizierung auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen möglich. Das Sondendesign setzt jedoch die Kenntnis der Zielsequenzen voraus und ist somit abhängig von den in entsprechenden Datenbanken eingetragenen Sequenzen. Die Aussagefähigkeit der FISH-Ergebnisse wird zudem durch verschiedene Faktoren eingeschränkt. Unspezifische Bindungen der Oligonukleotidsonden infolge nicht optimaler Hybridisierungsbedingungen sowie Hintergrundfluoreszenz des Untersuchungsmaterials oder zu geringe Ribosomenzahl der Zielbakterien erschweren die Auswertung der Signale. Optimiert wird die FISH-Methode indem an die Oligonukleotidsonde anstelle des Fluoreszenzfarbstoffes ein Enzym (Horseradish-Peroxidase, HRP) gekoppelt wird, welches zu einer Signalverstärkung führt (CARD-FISH) (PERNTHALER et al., 2002).

Dadurch kann die Sensitiviät der Methode um das 21-42-fache erhöht werden (HOSHINO et al., 2008).

Ein weiterer Ansatz zur taxonimischen Identifizierung unbekannter Bakterien aus Umweltproben ist die **stabile Isotopenbeprobung** (stable isotope probing, SIP), die zudem Aussagen über metabolische Fähigkeiten der separierten Mikroorganismen erlaubt (RADAJEWSKI et al., 2000). Doch diese Studien werden insbesondere mit ¹³C als Tracer durchgeführt. Da P nur ein stabiles Isotop hat, eignet es sich nicht als Tracer-Isotop (MCLAUGHLIN et al., 2004). Zudem kann die Zugabe externer Substrate die Aktivität und Zusammensetzung der *in situ* Bakteriengemeinschaft verändern. Diese Fehlerquelle kann durch den Einsatz der **Durchflußzytometrie** umgangen werden. Mittels dieser Methode können komplexe Lebensgemeinschaften in Fraktionen einzelner Zelltypen aufgrund definierter Färbeeigenschaften sortiert werden. Doch ein kontaminationsfreies Sortieren ist extrem schwierig, zudem ist die Klassifizierung einzelner Zelltypen insbesondere in Proben mit einem hohen Anteil an anorganischen Partikeln und Aggregaten, z.B. Sedimente, problematisch (WALLNER et al., 1997).

Um neben der Diversität auch die Funktion von Bakterien in einer Umweltprobe zu analysieren, ist die **Mikroautoradiographie** eine erfolgversprechende Methode. Hierbei wird die Substrataufnahme von Bakterien durch Einsatz radioaktiv-markierter Substrate, z.B. mit ³²P, untersucht und anschließend mit entsprechenden Oligonukleotidsonden detektiert, welche Bakteriengruppen das angebotene Substrat aufgenommen haben (**MAR-FISH**). Neben der MAR-FISH eignet sich auch die **Raman-FISH**, um in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften Struktur-Funktion-Analysen durchzuführen. Mittels Raman-FISH können "chemische Fingerprints" von Einzelzellen erstellt werden (HUANG et al., 2004, 2007, 2009). Bisher wurden solche Einzelzell-Untersuchungen nur an kultivierten Bakterien durchgeführt.

Die hochauflösende Untersuchung im Nanometer-Maßstab mittels **Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie** (NanoSIMS, CLODE et al., 2007) ermöglicht ebenfalls die quantitative Darstellung Mikroorganismen-spezifischer Umsatzprozesse in Umweltproben. In Kombination mit FISH (ORPHAN et al., 2001) oder der modifizierten CARD-FISH (Element-markierende FISH, EL-FISH, BEHRENS et al., 2008) ist es möglich, gleichzeitig einzelne Zellen phylogenetisch zu identifizieren.

Ein gezieltes Selektieren unbekannter Bakterien aus verschiedenen Proben wird durch die Laser-Mikrodissektion ermöglicht. Voraussetzung ist die Unterscheidbarkeit der zu selektierenden Zellen von anderen Organismen in der Probe, beispielsweise durch spezifisches Anfärben. Breite Anwendung findet die Laser-Mikrodissektion für eukaryontische Zellen und Gewebeproben in verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen auf dem Gebiet der Forensik (z.B. ANSLINGER et al., 2006), Botanik (z.B. ANGELES et al., 2006), Pathologie (CURRAN & MURRAY, 2002, Review) oder den

Neurowissenschaften (FERNANDEZ-MEDARDE et al., 2007). Bisher gibt es jedoch nur wenige Anwendungen in der Mikrobiologie, meist beschränkt auf das Gebiet der medizinischen Mikrobiologie zur Analyse pathogener Bakterien in Gewebeproben und Überprüfung der Spezifität von Oligonukleotidsonden (HOOPER, 2004; KLITGAARD et al., 2005; FUJIMURA et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Laser-Mikrodissektion auch für Umweltproben etabliert. Poly-P positive Zellen konnten nach Anfärbung mit DAPI aus Sediment- und Belebtschlammproben selektiert und phylogenetisch charakterisiert werden (GLOESS et al., 2008).

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Austausch von P zwischen Wasser und Sediment ist komplex und umfasst chemische, biologische und physikalische Prozesse, die in Wechselbeziehungen zueinander stehen (BOSTRÖM et al., 1988). Die meisten physikalischen und chemischen Prozesse sind relativ gut verstanden, während über die Rolle der Bakterien im P-Kreislauf nur sehr wenig bekannt ist. Insbesondere die Herkunft von in Sedimenten detektiertem Poly-P ist unklar. Die Arbeit sollte dazu beitragen, den Poly-P-Pool und die entsprechenden PAO in verschiedenen Gewässersedimenten phylogenetisch zu charakterisieren, mit dem Ziel, die Funktion dieser Mikroorganismen im benthischen P-Kreislauf besser zu verstehen. Dabei konzentrierte sich die Arbeit auf die Prüfung folgender Hypothesen:

a. Unterschiede in den limnologischen Parametern verschiedener Gewässern beeinflussen den mikrobiellen Poly-P Pool im Sediment.

Der Trophiegrad sowie weitere chemische und biologische Merkmale eines Sees können eine große Bedeutung für den mikrobiellen P-Umsatz und die Festlegung von P im Sediment haben. Für die Poly-P Analyse der Sedimente wurden daher Gewässer untersucht, die sich vor allem hinsichtlich der P-Verfügbarkeit, der Versorgung mit organischer Substanz und der Sauerstoffverhältnisse über dem Sediment während der Stagnation unterscheiden. Da die Untersuchungen ausgewählter Sedimente zusätzlich zu verschiedenen jahreszeitlichen Situationen (z.B. dem Vorhandensein von Aerobie und Anaerobie) erfolgten, wurden Hinweise erwartet, unter welchen Bedingungen es zur Poly-P Speicherung bzw. Abgabe kommt.

b. Voraussetzung für die mikrobielle Poly-P Speicherung sind alternierende Milieubedingungen.

Diese Hypothese wurde am Auftreten von Poly-P Speicherern unter Freilandbedingungen geprüft. Langanhaltende Anaerobie im Tiefenwasser während der Schichtung müsste demnach zur Abgabe von Poly-P führen. In Gewässersedimenten, die durch Redox-schwankungen gekennzeichnet sind (z.B. durch Sedimentationsereignisse organischer

Substanz und diskontinuierliche Nachlieferung von Sauerstoff), sind Nachweise der P-Speicherung und Poly-P-akkumulierender Bakterien wahrscheinlich.

Durch Laborexperimente können Bedingungen simuliert werden, die das Auftreten von Poly-P Speicherern an der Sedimentoberfläche induzieren. Aussagen über das Potenzial der benthischen Bakteriengemeinschaft in Hinblick auf die Poly-P-Bildung werden so ermöglicht. In den Untersuchungen sollten Poly-P-speichernde Bakterien molekularbiologisch detektiert und quantifiziert werden.

c. In Gewässersedimenten lassen sich Poly-P speichernde Bakterien nachweisen, wie sie aus Kläranlagen mit biologischer P-Elimination bekannt sind. In Sedimenten mit hohen Poly-P-Gehalten treten diese verstärkt in Erscheinung.

Bakterien mit dem Potenzial, die P-Dynamik eines Gewässers zu beeinflussen, könnten insbesondere Poly-P speichernde Bakterien sein. Es lag daher nahe, die mikrobielle Gemeinschaft in Sedimenten, in denen Poly-P nachgewiesen werden konnte, molekularbiologisch zu charakterisieren und zu quantifizieren. Der Fokus lag hierbei insbesondere auf der Detektion und gegebenenfalls Quantifizierung von Bakteriengruppen, die als Poly-P Speicherer bekannt sind (*Accumulibacter*). In Belebtschlammuntersuchungen etablierte Methoden, wie FISH, DGGE und die Erstellung von 16S rDNA Klonbibliotheken sollten zur Charakterisierung der mikrobiellen Populationen eingesetzt werden.

d. Poly-P speichernde Bakterien in Gewässersedimenten zeigen eine größere Diversität als ihre Vertreter in den Belebtschlämmen.

In Gewässersedimenten sind Bakterien stark schwankenden Umweltbedingungen ausgesetzt, im Gegensatz zu Belebtschlämmen, die den Bedürfnissen der PAO angepasst sind. Vielfältige Mikro-Nischen in den Sedimenten förden eine große mikrobielle Diversität . Daher erschien neben dem Einsatz gängiger molekularbiologischer Methoden zur Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft, die Etablierung neuer Methoden notwendig (Laser-Mikrodissektion), um gezielt Poly-P speichernde Bakterien aus den Gewässersedimenten zu separieren und phylogenetisch einordnen zu können.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Methodenüberblick

Der interdisziplinäre Ansatz dieser Arbeit kombiniert die Poly-P Quantifizierung durch chemische Methoden mit der Populationsanalyse der entsprechenden Bakteriengemeinschaften mittels molekularbiologischer Werkzeuge. Die Auswahl der Methoden und ihr Einsatzgebiet sind in Abb. 6 dargestellt. Sie werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert. Die Methoden fanden Anwendung in Sedimenten unterschiedlicher Seen, unter saisonalen Veränderungen sowie in Inkubationsexperimenten. Die Laser-Mikrodissektion wurde zusätzlich in Belebtschlämmen angewendet.



Abb. 6 Übersicht über die ausgewählten Methoden zur Bestimmung des Poly-P Gehaltes sowie der Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaften in den Sedimentproben

II.2 Ausgewählte Gewässer

Als Untersuchungsgewässer wurden Seen im Nordosten Deutschlands ausgewählt, die Mehrheit von ihnen ist seit langem Forschungsgegenstand des Leibniz-Institutes für Gewässerökologie und Binnenfischerei Berlin (IGB). Die limnologischen Parameter sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Stechlinsee

Der oligotrophe Stechlinsee liegt im Norden von Brandenburg und gehört zur ostmecklenburgischen Kleinseeplatte. Der tiefe dimiktische Hartwassersee ist ein glazialer Rinnensee. Charakteristisch sind sein hoher hypolimnischer Sauerstoffgehalt und eine relativ niedrige Phytoplanktonbiomasse (KOSCHEL, 1976; CASPER, 1985).

Scharmützelsee

Der mesotrophe Scharmützelsee liegt in einer Seenkette südlich von Berlin. Es handelt sich um einen subglazialen Rinnensee mit einem sehr großen Einzugsgebiet. Der tiefe dimiktische Hartwassersee ist charakterisiert durch ein ausgeprägtes anaerobes Hypolimnion bereits zu Beginn der Vegetationsperiode. Dies führt zu einer H₂S- und P-Freisetzung aus den Sedimenten (NIXDORF et al., 1995). Zwischen den Jahren 2000 und 2003 konnte ein starker Rückgang der Trophie festgestellt werden, gekennzeichnet durch einen Rückgang der Phytoplanktonbiomasse und der Abnahme des Cyanobakterienanteils am Phytoplankton (RÜCKER & NIXDORF, 2004).

Arendsee

Der mesotrophe Arendsee liegt im Norden von Sachsen-Anhalt. Der natürlich entstandene Suberosionssee ist durch eine lange Verweilzeit des Wassers (>100 Jahre) charakterisiert. In dem dimiktischen Gewässer wurde 1995 eine Seekreideaufspülung durchgeführt (RÖNICKE et al., 1998).

Große Fuchskuhle

Die Fuchskuhle ist ein kleines huminstoffreiches Gewässer, welches für Biomanipulationsexperimente im Jahre 1989 in vier Kompartimente unterteilt wurde (KASPRZAK, 1993; KOSCHEL, 1995). Bedingt durch die Biomanipulation entwickelten die Nordbecken einen mesotrophen Charakter, während die Südbecken durch das angrenzende Moorgebiet dystroph blieben.

Großer Müggelsee

Der mesotrophe Müggelsee ist ein Flachsee der von der Spree durchflossen wird. Die Verweilzeit des Wassers liegt bei 60 Tagen und zeigt den großen Einfluß der Spree, die dem Müggelsee erhebliche Nährstofffrachten zuführt. Das Phytoplankton des Müggelsees wird insbesondere durch die *Cyanobacteria* dominiert.

Groß-Glienicker See

Der mesotrophe Groß-Glienicker See ist ein kalkreicher Flachlandsee mit langsamen Wasseraustausch. Er liegt in einer glazialen Rinne und wird hauptsächlich von Grundwasser gespeist. Als Therapiemaßnahmen wurde 1992 mit einer hypolimnischen Belüftung begonnen und 1992/93 erfolgte eine Eisenbehandlung zur P-Festlegung im Sediment (WOLTER, 1994).

Petersdorfer See

Der eutrophe Petersdorfer See ist ein ganzjährig intensiv durchmischter ungeschichteter Flachsee. Zwischen den Jahren 2000 und 2003 hat sich die Wasserqualität des Petersdorfer See leicht verbessert, gekennzeichnet durch einen Rückgang der Phytoplanktonbiomasse und der Abnahme des Anteils der Cyanobakterien am Phytoplankton (RÜCKER & NIXDORF, 2004).

	Fläche	Max. Tiefe	Mittlere Tiefe	Volumen	Einzugs- gebiet	Trophie	Mixis
	[km²]	[m]	[m]	[Mio. m ³]	[km²]		
Stechlinsee	4,25	68	22,8	96,9	26	oligotroph	di
Scharmützelsee	12,07	29	9	108,28	112	mesotroph	di
Arendsee	5,14	48,7	28,6	146,9	29,8	mesotroph	di
Gr. Müggelsee	7,2	7,5	4,8	35	6790	mesotroph	poly
Groß-Glienicker S.	0,67	11,3	6,8	4,53	16	mesotroph	di
Petersdorfer S.	0,23	3,5	2,1	0,53	3,5	eutroph	poly
Fuchskuhle	0,02	5,6	3,5	0,05	0,005	eu- ^{NO} /dystroph ^{SW}	mono

Tah 1	Limnologiecho	Parameter	dar hanrahtan Saan
1 a. 1	LIIIIIUUUUUUUUU		

Zusätzlich wurden im Januar 2005 Belebtschlammproben aus der Kläranlage in Wassmannsdorf nahe Berlin genommen.

II.3 Probenentnahme aus Sedimenten

Alle Seen wurden im Juni 2004 beprobt. Stechlinsee, Arendsee und Scharmützelsee wurden zusätzlich zu verschiedenen Jahreszeiten zwischen 2004 und 2006 beprobt. An der tiefsten Stelle der Gewässer wurde zunächst ein Tiefenprofil erstellt mit folgenden Parametern: Temperatur (°C), Sauerstoffsättigung (%) und pH. Zusätzlich wurden die Sichttiefe mittels Secchi-Scheibe und die Gewässertiefe durch Echolot bestimmt. Mit einem Sedimentstecher
(Uwitech, Österreich) erfolgte die Entnahme von Sedimentkernen. Der oberste Biofilm (0 - ca. 0,5 cm) wurde mit einer 50 ml Plastikspritze abgesaugt. Pro Gewässer wurden 6 bis 7 Kerne beprobt und das entnommene Biofilmmaterial gepoolt, um mögliche Heterogenitäten zwischen den Sedimentkernen auszugleichen. Der Transport des gekühlten Materials in das Labor erfolgte umgehend.

II.4 Probenentnahme mittels Sedimentfallen

Im Scharmützel-, Arend- und Stechlinsee wurden zylindrische Sedimentfallen mit eintägiger Expositionsdauer in folgenden Tiefen ausgebracht:

Scharmützelsee: 9 m und 25 m

Stechlinsee: 18 m und 65 m

Arendsee: 40 m

Bei einigen Probennahmen wurden die Sedimentfallen mit trichterförmigen Aufsätzen ausgestattet, um den Fangerfolg zu erhöhen.

Das gewonnene Material wurde abfiltriert (Cellulose-Acetat-Filter, 0,45 µm) und bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exikator wurden die Filter auf 0,1 mg Genauigkeit ausgewogen. Durch Bestimmung der Trockenmasse und des Fallenvolumens konnten die Materialausbeute und die Sedimentationsrate ermittelt werden.

II.5 Inkubationsexperimente

Die Induzierbarkeit der Poly-P Bildung wurde anhand von Inkubationsexperimenten unter Laborbedingungen geprüft. Sedimentkerne wurden an der tiefsten Stelle des Scharmützelsees gestochen und umgehend ins Labor gebracht. Die Inkubation der Kerne erfolgte im Dunkeln bei 8-10°C. Nach achtwöchiger aerober Vorinkubation unter kontinuierlicher Begasung mit atmosphärischer Luft wurden unterschiedliche Redoxbedingungen eingestellt (Abb. 7). Nach elfwöchiger Inkubation wurde das Inkubationsexperiment beendet. Die Ansätze mit alternierenden aerob/anaeroben Bedingungen wurden in der aeroben Phase beendet. Parallel mit Beendigung des Inkubationsexperimentes im Labor erfolgte eine Sedimentkernentnahme im Scharmützelsee (Freilandprobe). Die Bestimmung des Poly-P Gehaltes erfolgte in allen Proben mittels ³¹P-NMR.



Abb. 7 Aufbau des Inkubationsexperimentes unter Verwendung von Sedimentkernen aus dem Scharmützelsee.

II.6 Physikalische und chemische Parameter

II.6.1 Routineanalytik

Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte durch Trocknung der Sedimentproben bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz und des Glühverlustes bei 450°C für 3 Stunden.

Die Bestimmung des Gesamt-P-Gehaltes (TP) sowie die Quantifizierung des löslichen reaktiven P (SRP) erfolgten durch das Zentrale Chemielabor des Leibniz-Institutes für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB).

II.6.2 Poly-P-Quantifizierung mittels ³¹P-NMR

Die ³¹P-Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) ermöglicht die Quantifizierung verschiedener anorganischer und organischer P-Spezies. Sie wurde daher für die Poly-P-Quantifizierung in den Sedimentproben eingesetzt, zunächst in einem Gewässer-Screening. Dazu wurden die obersten Sedimentbiofilme der in Kapitel I.1.2 vorgestellten Seen mittels ³¹P – NMR beprobt. Vom Scharmützel-, Arend- und Stechlinsee wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 2004-2006 Proben analysiert und Poly-P-Tiefenprofile erstellt.

Die Probenvorbereitung für die ³¹P-NMR-Messung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zunächst wurden 9 g frisches Sediment bzw. Fallenmaterial mit 50 ml EDTA-Na₂ x 2 H₂O (25 g I^{-1} , Titriplex III) versetzt und 30 min über Kopf geschüttelt (Stufe 3, Heidolph Reax Control) um paramagnetische Stoffe, insbesondere Eisen, durch Komplexierung aus der Probe zu

entfernen. Nach anschließender Zentrifugation (11.000 U min⁻¹, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 15 ml des Extraktionsmittels NaOH-EDTA (8 g l⁻¹ NaOH, 25 g l⁻¹ EDTA-Na₂ x 2H₂O Titriplex III) versetzt. Ein Teil des Überstandes wurde bis zur späteren TP und SRP-Messung bei 4°C gelagert. Nach zweistündigem Über-Kopf-Schütteln wurde erneut zentrifugiert (11.000 U min⁻¹, 5 min, 4°C), das Volumen des Überstandes bestimmt und das Pellet verworfen. 2 ml des Extraktes wurden für die spätere TP und SRP-Bestimmung entnommen, der verbliebene Extrakt wurde bis zur Gefriertrocknung eingefroren.

Vor der ³¹P-NMR-Messung wurden die gefriergetrockneten Proben in Aqua dest. im Verhältnis 1:10 unter ständiger Kühlung aufgenommen. Die ³¹P-NMR-Messungen wurden am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin durchgeführt.

II.7 Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft

II.7.1 Zellextraktion und Zellfixierung aus Sedimentproben

Ein Gramm frisches Sediment wurde mit 15 ml 0,1 % Natriumpyrophosphat (w/v, sterilfiltriert) versetzt und für 3 min im Ultraschallbad inkubiert, um angeheftete Bakterien vom Substrat zu lösen. Anschließend wurde die Suspension 30 min auf einem Schüttler (Heidolph Reax Control, Stufe 3) über Kopf geschüttelt. Nach anschließender 30 minütiger Sedimentation wurde der Überstand (Extrakt) in ein steriles Gefäß überführt und erneut für 1 min in das Ultraschallbad gelegt. Um den Erfolg des Protokolls zu überprüfen, wurde der Sediment-rückstand erneut mit Natriumpyrophosphat versetzt und wie beschrieben behandelt. Dies wurde bis zu fünfmal duchgeführt. Die so gewonnenen Extrakte wurden mit eiskaltem sterilfiltriertem Ethanol im Verhältnis 1:1 fixiert und bei –20°C gelagert.

II.7.2 Quantifizierung der Gesamtzellzahl mittels DAPI-Färbung

Die Quantifizierung der Bakterien aus den extrahierten Sedimenten erfolgte durch Anfärbung mit dem DNA und RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff 4`-6`-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (PORTER & FEIG, 1980). Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

Je nach Zelldichte wurden 50-100 µl der fixierten Extrakte mit 100 µl sterilfiltriertem Wasser und 75-100 µl DAPI (5 µg ml⁻¹ bis 20 µg ml⁻¹) 30 min in einem Reaktionsgefäß inkubiert und anschließend auf 0,2 µm Polycarbonatfilter (Nucleopore[®], Whatman, Durchmesser 27 mm) filtriert. Dazu wurde auf dem Filter 1 ml steriles Wasser vorgelegt, danach erfolgte die Zugabe des DAPI gefärbten und mit Wasser verdünnten Extraktes. Um möglichst alle Zellen aus dem Reaktionsgefäß auf den Filter zu überführen wurde das leere Reaktionsgefäß nochmals mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und dieses Waschwasser wurde dann ebenfalls auf den Filter pipettiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die auf dem Filter zurückgebliebenen gefärbten Zellen wurden ausgewertet. Die Quantifizierung der DAPIpositiven Zellen erfolgte mit einem Leica DR-MB Epifluoreszenzmikroskop bei 1000x Vergrösserung. Von jeder Probe wurden jeweils 20 Zählfelder mit einer Mindestanzahl von 400 DAPI positiven Zellen gezählt und ausgewertet.

II.7.3 Analyse der Sedimentproben durch Catalyzed Reporter Deposition Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (CARD-FISH)

II.7.3.1 Gelatine-Beschichtung der Objektträger

Die zu beschichtenden Objektträger (8 Aussparungen, Firma Marienfeld, Bad Mergentheim) wurden mit Haushaltsspülmittel entfettet, gründlich mit Aqua dest. gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in eine warme Gelatinelösung (0,1-prozentige Gelatine, 0,01-prozentiges Kaliumchromsulfat) getaucht und 3 h unter der Sterilbank bei Raumtemperatur getrocknet. Die Gelatinebeschichtung bewirkt eine verbesserte Haftung der Zellen auf der Objektträgeroberfläche.

II.7.3.2 Durchführung der Hybridisierung und Signalverstärkung

Für die Durchführung der CARD-FISH wurden verschiedene Sonden eingesetzt, die teilweise unterschiedliche Formamid-Konzentrationen im Hybridisierungspuffer benötigen (Tab. 2). Für die Hybridisierung und Signalverstärkung wurden folgende Lösungen und Puffer angesetzt:

Hybridisierungspuffer

Puffer A 30% Formamid 0,9 M NaCl 20 mM Tris-HCl 0,1g/ml Dextransulfat 1% Blocking Reagent* <u>Puffer B</u> 55% Formamid 0,9 M NaCl 20 mM Tris-HCl 0,1 g/ml Dextransulfat 1% Blocking Reagent*

Waschpuffer

Puffer A	<u>Puffer B</u>
64 mM NaCl	3 mM NaCl
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCI
5 mM EDTA	5 mM EDTA
0,01% SDS	0,01% SDS

Amplifikationspuffer

1x PBS 0,1% Blocking Reagent* 2 M NaCl 0,1 g/ml Dextransulfat 1 μg/ml Tyramide, ALEXA488 gelabelt 1% 100xH₂O₂ Lösung (0,15% H₂O₂ in 1xPBS)

*) Blocking Reagent (Boehringer, Mannheim, Germany)

Pro Probe wurden 10 µl des ethanolfixierten Extraktes in eine Objektträgeraussparung pipettiert und bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden nochmals 10 µl zupipettiert und erneut getrocknet. Bei einigen Proben wurden alternativ zur Objektträgerverwendung Extrakte auf Polycarbonatfilter abfiltriert. Zur besseren Haftung des Extrakts in den Aussparungen wurden die Objektträger in 0,2-prozentige Gelatine (MetaPhor, FMC Bioproducts, Rockland, Maine) getaucht und anschließend bei 37°C getrocknet. Das gleiche Vorgehen erfolgte auch bei den Proben, die auf Polycarbonatfilter aufgebracht wurden. Es folgte eine 1-minütige Inkubation in 80-prozentigem Ethanol zur Nachfixierung und zusätzlichen Dehydrierung der Proben. Die Proben, die später mit der Oligonukleotidsonde HGC69a hybridisiert wurden, wurden zur Permeabilisierung gram-positiver Bakterien bei 37°C für 60 min mit Lysozym (10 mg ml⁻¹ Lysozym; 0,05 M EDTA, 0,1 M Tris-HCI) inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Zur Hybridisierung wurden auf jedes Objektträgerfeld 1,75 µl der Meerrettich-Peroxidase (HRP)-markierten Oligonukleotidsonde (Konzentration 50 ng µl⁻¹, ThermoHybaid, Ulm, Germany) und 33,75 µl Hybridisierungspuffer pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die Hybridisierung erfolgte bei 35°C über Nacht. Für die Hybridisierung ist eine feuchtigkeitsgesättigte Atmosphäre nötig, um unspezifische Bindungen durch veränderte Pufferkonzentrationen infolge Austrocknung zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden feuchte Kammern verwendet, welche aus 50 ml Plastikröhrchen bestanden, die mit Hybridisierungspuffer getränkten Zellstoff enthielten. Zum Abstoppen der Hybridisierung wurden die Objektträger mit 37°C warmen Hybridisierungspuffer gespült und in 1xPBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Signalverstärkung. Hierzu wurden die Objektträgerfelder mit Amplifikationspuffer bedeckt

und bei 37°C für 10 min inkubiert. Der Amplifikationspuffer enthielt die zur Signalverstärkung nötigen ALEXA488-gelabelten Tyramide. Es folgten Inkubationen in 1xPBS (15 min, Raumtemperatur), destilliertem Wasser (1 min, Raumtemperatur) und 80% Ethanol (1 min, Raumtemperatur). Nach Trocknung wurden die Objektträger bis zur Analyse bei –20°C aufbewahrt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach Einbettung der aufgetauten Objektträger in Einbettmedium (Citifluor, CITIFLUOR Ltd., London, England) mit einem Leica DR-MB Epifluoreszenzmikroskop bei 1000x Vergrößerung. Von jeder Probe wurden jeweils 20 Zählfelder gezählt und ausgewertet.

Sonde	Spezifität	Sequenz (5`-3`)	FA (%)	Referenz
EUB338 I EUB338 II EUB338 III	Bacteria (Eubacteria)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT GCAGCCACCCGTAGGTGT GCTGCCACCCGTAGG TGT	55	Амалл et al., 1990 Daims et al., 1999 Daims et al., 1999
ALF1b	Alphaproteobacteria	CGTTCGYTCTGAGCCAG	30	Manz et al., 1992
BET42a	Betaproteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT	55	Manz et al., 1992
GAM42a	Gammaproteobacteria	GCCTTCCCACATAGTTT	55	Manz et al., 1992
CF319a	Cytophaga- Flavobacteria-Gruppe	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	55	Manz et al., 1996
PLA886	Planctomycetes	GCCTTGCGACCATACTCCC	55	NEEF et al., 1998
HGC69a	High G+C grampositive Bakterien (<i>Actinobacteria</i>)	TATAGTTACCACCGCCGT	30	Roller et al., 1994
PAO462	PAO-Cluster (Cand. Accumulibacter)	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	55	CROCETTI et al., 2000
PAO846	PAO-Cluster (Cand. Accumulibacter)	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	55	CROCETTI et al., 2000

Tab. 2 Eingesetzte Oligonukleotidsonden, gelabelt mit HRP (Horseradish-Peroxidase) (FA = Prozent Formamid im Hybridisierungspuffer).

II.7.4 DNA-Extraktion aus den Sedimentproben

II.7.4.1 Vergleich verschiedener Extraktionsprotokolle

Die Mikroorganismen wurden direkt in der Sedimentprobe lysiert und die DNA aus der gesamten Probe extrahiert und aufgereinigt. Zur Isolierung genomischer DNA aus den Sedimenten wurden verschiedene Protokolle getestet:

- (1) PowerSoil[™] DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA)
- (2) UltraClean[™] Soil DNA Isolation Kit, "Alternative Protocol" (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA)
- (3) QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)

(4) Phenol/Chloroform-Extraktion (ALLGAIER & GROSSART, 2006)

(5) Modifiziertes Standard DNA-Extraktions-Protokoll (physikalisch-enzymatisch-chemisch)

Die DNA-Extraktionen mittels verschiedener Kits (1.-3.) erfolgten entsprechend den Herstellerprotokollen.

Nach Auswertung der Ergebnisse wurden alle folgenden Proben gemäß Protokoll (5) aufgearbeitet.

II.7.4.2 Modifiziertes Standard DNA-Extraktions-Protokoll

Jeweils ca. 0,75-1g der bei -20°C eingefrorenen Sedimentproben wurden der DNA-Extraktion unterzogen. Zunächst erfolgte ein chemisch-physikalischer Zellaufschluss. Hierzu wurde das Sediment mit 700 µl Natrium-P-Puffer (120 mM, pH 8), ca. 0,5 g sterilen Zirkoniumkügelchen (0,7 mm) und 230 µl SDS (10 %) versetzt und 10 min auf einem Horizontalvortexer bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Nach anschließender Zentrifugation (6 min, 12.000 U min⁻¹) wurde der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde mit 700 µl Natrium-P-Puffer gewaschen, kurz zentrifugiert und der Überstand mit dem restlichen Überstand vereinigt. Es folgte eine enzymatische Zelllyse durch Zugabe von 200 µl Lysozym (10 mg ml⁻¹ in TE Puffer), 337 µl SDS (10 %) und 15 µl Proteinase K (10 mg ml⁻¹ in sterilfiltriertem Aqua dest.) und Inkubation für 15 min bei 60°C. Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von 0,4 Vol. 7,5 M Ammonium-Acetat (7,5 M) auf 1 Vol. der Probenlösung und Inkubation für 5 min auf Eis. Durch Zentrifugation (8 min, 12000 U min⁻¹) wurden Zelltrümmer und gefällte Proteine abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol auf 1 Vol. der Probenlösung und Zentrifugation (60-90 min, 12.000 U min⁻¹) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 600 µl eiskaltem Ethanol (80%) gewaschen, gevortext (15 sec), zentrifugiert (5 min, 13.000 U min⁻¹) und anschließend getrocknet. Die genomische DNA wurde mit 70-100 µl TE-Puffer pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA-Na₂, pH 8,0) versetzt, über Nacht bei 4°C gelöst und anschließend aliguotiert. Die Lagerung der DNA-Aliguote erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C.

II.7.4.3 Quantitative Analyse der extrahierten DNA

Die Quantifizierung der extrahierten DNA aus Sedimentproben erfolgte über ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel (1,5%, bioline GmbH, Luckenwalde). Als Referenz wurde ein Marker mit bekannter DNA Konzentration aufgetragen (Low DNA Mass[™] Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

II.7.5 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die *in vitro* Amplifikation der bakteriellen DNA erfolgte mittels PCR. Die 16S rDNA Abschnitte wurden gezielt durch ausgewählte flankierende Primer vervielfältigt, die die Spezifität der

PCR bestimmten. Als Grundlage für die später eingesetzte Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese) enthielt jeweils ein Primer pro Primerpaar eine GC-Klammer. Neben dem Standard-Protokoll bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation wurden für einige Primerpaare Touchdown-PCR und nested-PCR-Protokolle entwickelt, um die Spezifität bzw. Sensitivität der PCR Reaktionen zu erhöhen. In der nested-PCR kam in der ersten PCR ein universelles Primerpaar zum Einsatz (8f: AGAGTTTGATCMCTGGCT CAG; 1492r: GGYTACCTTGTTACGACTT) (WEISBURG et al., 1991), mit dem fast die gesamte 16S rDNA amplifiziert wurde. In einer zweiten PCR wurden dann die jeweiligen spezifischeren Primerpaare eingesetzt.

Folgende Chemikalien wurden pro PCR Ansatz eingesetzt: 200 nM pro Primer (MWG biotech AG, Ebersberg), 250 µM von jedem dNTP, 2 mM MgCl₂, 10 µl 10x PCR Puffer, 0.5 U MangoTaq DNA Polymerase (bioline GmbH, Luckenwalde) sowie Bovines Serum Albumin (BSA, Endkonz. 0,125 µg, AppliChem GmbH, Darmstadt). Jeder PCR-Ansatz enthielt 1-2 µl der 1:10 bis 1:100 verdünnten "template" DNA und wurde auf ein Gesamtvolumen von je 50 µl mit ultrapurem Wasser (bioline GmbH, Luckenwalde) aufgefüllt. Zur *in vitro* Amplifikation kam ein Gradient Cycler PT 200 (MJ Research) zum Einsatz.

Tab. 3 Verv	vendete Primerpaare für DGGE-Proben (z.T. aus Gісн et al., 2005)	
Bacteria		
GC-341f	CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCCCCCCCCCCCCCC	Muyzer et al., 1995
907r	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	MUYZER et al., 1995
Alphaproteo	bacteria	
GC-517f	CGCCCGCCGCGCCCGGCCCGCCCCCCCCCCCCGCCAGCAG	Lane, 1991
Alf968r	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	Neef, 1997
Betaproteob	acteria	
Beta680f	CRCGTGTAGCAGTGA	OVERMANN et al., 1999
GC-1055r	CGCCCGCCGCGCCCGGCCCGCCCCCCCCCCCCCGCCCAGCTGACGACAGCCAT	AMANN et al., 1995
Planctomyce	PS	
GC-341f	CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCGCCCCGCCCGCCCGCCAGGAGG	MUYZER et al., 1995
PLA886r	GCCTTGCGACCATACTCCC	Neef, 1998
Flavobacteria	a-Cytophaga	
GC-CFB319f	CGCCCGCCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCCCCGCCCGTACTGAGACACGGACCA	Manz et al., 1996
907r	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	MUYZER et al., 1995
Acinetobacte	er spec.	
GC-8f	CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCCCGCCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG et al., 1991, MYERS et al., 1985
ACA652r	ATCCTCTCCCATACTCTA	WAGNER et al., 1994
Candidatus	Accumulibacter	
I.) GC-8f	CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCCCGCCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG et al., 1991, MYERS et al., 1985
I.) PAO462r	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	CROCETTI et al., 2000
II.) GC-341f	CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCGCCCCCCCCCCCCCCCGCCAGCAG	MUYZER et al., 1995
II.) PAO846r	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	CROCETTI et al., 2000
Candidatus /	Accumulibacter cluster	
GC-8f	CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCGCCCCCGCCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG et al., 1991, MYERS et al., 1985
PAO651r	CCCTCTGCCAAACTCCAG	CROCETTI et al., 2000

	Initialisierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklenzahl	finale Elongation
GC-341f/907r	95°C, 3 min	95°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 10 min
GC-8f/PAO462	95°C, 4 min	95°C, 1 min	60°C, 45 sec	72°C, 3 min	30	72°C, 15 min
GC-341f/PAO651	95°C, 5 min	95°C, 1 min	57,9°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 10 min
GC-341f/PAO846	95°C, 5 min	95°C, 1 min	60°C, 45 sec	72°C, 2 min	30	72°C, 15 min
GC-341f/ACA652	95°C, 3 min	95°C, 1 min	49,2°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 10 min
GC-341f/RHX991	95°C, 3 min	95°C, 1 min	52°C, 1 min	72°C, 2 min	30	72°C, 10 min
GC-517f/Alf968r	95°C, 5 min	95°C, 1 min	58°C, 45 sec	72°C, 2:30 min	10/-1°C pro Zyklus	
(Touchdown-PCR)		95°C, 1 min	53°C, 45 sec	72°C, 2:30 min	20	60°C, 30 min
Beta680f/GC-1055r	95°C, 3 min	95°C, 1 min	52,2°C, 45 sec	72°C, 2:30 min	10/-1°C pro Zyklus	
(Touchdown-PCR)		95°C, 1 min	47,2°C, 45 sec	72°C, 2:30 min	20	60°C, 30 min
8f/1492r	95°C, 5 min	95°C, 1 min	54°C, 1 min	72°C, 2 min	20	72°C, 10 min
GC-CFB319f/907r	95°C, 5 min	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 2 min	20	72°C, 10 min
(nested-PCR)						
GC-341f/Pla886r	95°C, 5 min	95°C, 1 min	63°C, 1 min	72°C, 2 min	20	72°C, 10 min
(nested PCR)						

Tab. 4 Übersicht über die eingesetzten PCR-Programme in Abhängigkeit der verwendeten Primer.

Nach Ablauf des Programms erfolgte eine Kühlung der Proben auf 4°C bis zur Entnahme aus dem PCR Cycler.

Qualität und Quantität der PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft (1,5% Agarose, bioline GmbH, Luckenwalde, Germany). Als Referenz wurde ein Marker mit bekannter DNA Konzentration aufgetragen (Low DNA Mass[™] Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). Dies ermöglichte das Auftragen ähnlicher DNA-Mengen in der DGGE und somit eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Umweltproben.

II.7.6 Analyse der Bakteriengemeinschaften mittels Denaturierender Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Mittels DGGE können DNA-Fragmente gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz voneinander getrennt werden (MUYZER et al. 1993). Diese Trennung erfolgt in einem Polyacrylamidgel, welches einen Gradienten DNA-denaturierender Agenzien enthält (Harnstoff und Formamid). In diesem Gradienten werden die DNA-Fragmente unterschiedlich schnell denaturiert und zeigen daher in Abhängigkeit von ihrer Sequenz ein anderes Laufverhalten. Das Resultat ist die (vollständige) Trennung unterschiedlicher DNA-Fragmente.

II.7.6.1 Trennung der 16S rDNA aus den Sedimentproben

Zwischen zwei mit SDS (10%), Aqua dest. und Ethanol gereinigten Platten wurde ein Acrylamid-Gel (7% v/v) mit einem Formamid-Harnstoff-Gradienten von 40-70% gegossen.

Substanz	Stammlösung 0 %	Stammlösung 80 % denaturierend
Harnstoff (Urea)	-	50,4 g
Formamid	-	48 ml
50x TAE, pH 7,4	3 ml	3 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid	26,25 ml	26,25 ml
auffüllen mit ddH ₂ O	150 ml	150 ml

Tab. 5 Zusammensetzung der eingesetzten Stammlösungen.

Substanz	Lösung A (Sammelgel)	Lösung B (40 %)	Lösung C (70 %)
Stammlösung 0 %	9 ml	12 ml	3 ml
Stammlösung 80 %	-	12 ml	21 ml
Tetramethylethylendiamid	8 µl	17 µl	17 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	100 µl	86 µl	86 µl

Tab. 6 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.

Pro Probe wurden 20-40 µl PCR-Produkt in die Geltaschen gefüllt. Als Standard diente ein PCR-Produkt bestehend aus 3 verschiedenen Bakterienkulturen (DSM109 *Rhodocyclus tenuis*, DSM586 *Acinetobacter* sp., DSM 20415 *Rhodococcus pyridinivorans*; Stammsammlung DSMZ, Braunschweig, Germany).

Die DGGE-Läufe erfolgten in einem PhorU DGGE-System (Ingeny International BV, The Netherlands) entsprechend dem Protokoll von BRINKHOFF & MUYZER (1997) in 1 x TAE Elektrophorese-Puffer (40 mM Tris-HCI (pH 8.3), 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA), für 20 h bei 100 V und 60°C. Die Gele wurden mit 1 x SYBR Gold (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) 30-60 min gefärbt, 10 min in Aqua dest. entfärbt und am Alphalmager 2200 Transilluminator (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Germany) dokumentiert.

II.7.6.2 Analyse der 16S rDNA-Fragmente ausgewählter DGGE-Banden

Ausgewählte Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mittels einer sterilen Kanüle in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation (1 min, 10.000 U min⁻¹) wurden 75 µl Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA) zugegeben und entsprechend der Fragmentlänge 3-12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die eluierte Gelbande mit 50 µl Elutionspuffer gewaschen. Beide Überstände wurden vereinigt. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 0,4 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M) und 0,7 Vol. eiskaltem Isopropanol auf 1 Vol. der Probenlösung und anschließender Zentrifugation (60 min, 13.000 U min⁻¹). Das Pellet wurde zweimal mit je 100 µl eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen, kurz gevortext und 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde über Nacht bei 4°C in 15-25 µl TE-Puffer gelöst.

Die Amplifikation erfolgte mit den entsprechenden Primerpaaren, jedoch ohne GC-Klammer. Die finale Elongation der PCR Protokolle betrug jeweils 15-30 min. Anschließend wurde die Qualität und Quantität der PCR-Produkte über ein Agarosegel (1,5%, bioline GmbH, Luckenwalde) überprüft, mit QuickClean (bioline GmbH, Luckenwalde, Germany) entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und sequenziert (Kap. II.7.8).

II.7.7 Analyse der Sedimentproben anhand von 16S rDNA-Klonbibliotheken

Die 16S rDNA wurde unter Verwendung des universellen Primerpaares 8f und 1492r wie unter I.1.5 beschrieben, allerdings mit 30 Zyklen, amplifiziert. Je 4 μ l der amplifizierten DNA wurden unter Anwendung des pGEM-T-Easy Vector System II Kits (Promega GmbH, Mannheim, Germany) eingesetzt. Die Erstellung der 16S rDNA Klonbibliotheken erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. Pro 16S rDNA Klonbibliothek wurden bis zu 120 Klone gepickt. Die Plasmid-DNA wurden mittels Wizard[®] Plus Minipreps DNA purification system (Promega GmbH, Mannheim) gemäß dem Herstellerprotokoll präpariert. Qualität und Quantität der präparierten Plasmid-DNA wurden auf einem Agarosegel (1,5%, bioline GmbH, Luckenwalde, Germany) überprüft. Anschließend wurden die klonierten 16S rDNA Fragmente mittels Primer M13f (5' – GTT TTC CCA GTC ACG AC – 3') partiell sequenziert (Kap. II.7.8).

II.7.8 Sequenzierung von DNA-Proben

Die Sequenzierungsreaktionen wurden unter Verwendung des Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc, Foster City, USA) durchgeführt, welches auf der Kettenabbruchmethode nach SANGER (1977) basiert. In einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer sind neben dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) vorhanden, die basenabhängig mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Bei Einbau der ddNTPs kommt es zu basenspezifischen Abbrüchen, wodurch unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und deren Sequenz durch einen Laser ermittelt wird.

Reaktionsar	nsatz	PCR-Bed	lingungen
template DNA	0,5-4,5 µl	94°C	1min
BigDye Mix	1,0 µl	94°C	10 sec
Primer (5 µM)	1,0 µl	55°C	5 sec
5xSequenzierpuffer	1,5 µl	60°C	4 min
Aqua dest.	ad 10 µl		25 Zyklen
		10°C	∞

Tab. 7 Pipettierschema und Amplifikationsbedingungen der Sequenzierungs-PCR.

Nach Ablauf der Sequenzierungsreaktion (Tab. 7) wurden Komplexe markierter Nukleotide durch Zugabe von SDS (Endkonzentration 0,2%) und Inkubation bei 98°C für 5 min zerstört.

Zur Aufreinigung der DNA wurde eine Ethanolfällung vorgenommen. Der Sequenzieransatz wurde mit 1 µl 3 M Natriumactetat und 25 µl Ethanol abs. versetzt, inkubiert (15 min, Raumtemperatur) und zentrifugiert (15 min, 13.000 U min⁻¹). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 35 µl Ethanol (70%) gewaschen und zentrifugiert (15 min, 13.000 U min⁻¹). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet getrocknet und bei –4°C aufbewahrt. Zur Sequenzierung am ABI Prism® 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems Inc, Foster City, USA) wurde das Pellet in 10 µl Injektionspuffer (HiDi Formamid, Applied Biosystems Inc, Foster City, USA) aufgenommen.

II.7.9 Sequenzanalyse

Die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen erfolgte durch Datenbankrecherchen mit den Programmen BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) und dem "sequence classification tool" des Ribosomal Database Project RDP II (http://rdp.cme.msu.edu/). Die phylogenetische Analyse ausgewählter DNA-Sequenzen für die Stammbaumerstellung basierend auf Multiplen Alignments der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Sequenzdatenprogramm ARB (http://arb-home.de).

II.8 Einsatz der Laser-Mikrodissektion zur Separation und phylogenetischen Charakterisierung von PAOs

Mittels Laser-Mikrodissektion können gezielt Gewebeareale, einzelne Zellen bis hin zu subzellulären Bereichen aus komplexen Proben selektiert werden.

II.8.1 Probenvorbereitung, Laser-Mikrodissektion und Separation

Die Bakterienzellen wurden aus den Sedimenten extrahiert (Kap. II.7.1). Es folgte eine DAPI-Anfärbung der auf Polycarbonatfilter filtrierten Proben (Kap. II.7.2). Hohe DAPI-Konzentrationen führen zu einer intensiven Gelbfärbung der Poly-P Granula, die erst allmählich bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausbleicht. Anhand dieser Gelbfärbung konnten Poly-P-haltige Bakterienzellen in den Belebtschlamm- und Sedimentproben lokalisiert und mittels LMPC-Technologie (laser microdissection and pressure catapulting) am PALM MicroBeam System (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Germany) aus den Proben separiert werden. Das MicroBeam System beinhaltete ein Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) und war ausgestattet mit der PALM RoboSoftware v2.0 (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Germany). Die Betrachtung der Polycarbonatfilter erfolgte mit dem Fluoreszenzfilter FS 18 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) bei 400x Vergrößerung. Um ein steriles Ausschneiden und Katapultieren der Bakterienzellen aus den Proben in die Deckel spezieller Adhesive-Caps (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Germany) zu gewährleisten, war das MicroBeam System von einer Kunststoffbox umschlossen, die regelmässig mit Ethanol gereinigt wurde (Abb. 8). Um die Kontaminationsfreiheit des Systems zu überprüfen, wurden parallel zu den mit Proben belegten Polycarbonat-Filtern, neue Filter als Kontrolle beprobt und molekularbiologisch aufgearbeitet. Um den Katapultierungserfolg zu überprüfen, wurde in jeder Probe das in den Deckeln haftengebliebene Material im Mikroskop besichtigt.



Abb. 8 linkes Bild: PALM MicroBeam System mit Kunststoffbox; rechtes Bild: Blick auf den Objekträgertisch des Fluoreszenzmikroskopes, mit dem eingespannten Objektträger und dem darüberliegenden AdhesiveCap.

II.8.2 Molekularbiologische Aufarbeitung

Die molekularbiologische Analyse der Proben und Kontrollen wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- 1. "Knacken der Zellen" direkt in den Adhesive-Caps mittels "Freeze and Thaw"
- 2. Amplifikation der 16S rDNA mittels PCR
- 3. Separation der 16S rDNA Sequenzen mittels Klonbibliotheken
- 4. Sequenzierung und Auswertung.

Die Bearbeitung der Proben erfolgte in der Sterilbank unter kontaminationsfreien Bedingungen. Jeweils vor und nach Bearbeitung der Proben wurde die Sterilbank und alle benutzten Geräte mit UV Licht bestrahlt und mit einem DNA Dekontaminationsmittel (DNA-ExitusPlus, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) gründlich gereinigt. Die Reinheit der eingesetzten Reaktionsgefäße (AdhesiveCaps von P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH sowie Biopur Safe-Lock tubes der Firma Eppendorf, Germany) wurde mittels PCR unter Verwendung universeller bakterieller 16S rDNA Primer überprüft.

II.8.2.1 DNA-Extraktion

Für die Extraktion genomischer DNA aus den separierten Zellen wurde zunächst das Qiagen MicroKit (Qiagen, Hilden, Germany) gemäß den Herstellervorschriften eingesetzt. Dieses Kit wurde speziell für die Bearbeitung kleinster DNA-Mengen beispielsweise von mikrodissektierten Zellen entwickelt. Die Zell-Lyse erfolgte über Kopf direkt im Deckel der AdhesiveCaps. Mit dem Qiagen MicroKit war jedoch keine kontaminationsfreie Bearbeitung der selektierten Bakterienzellen möglich. Daher wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem die ausgeschnittenen Zellen direkt in den AdhesiveCaps "geknackt" wurden. Kontaminationen während der verschiedenen DNA-Extraktionsschritte konnten so vermieden werden (GLOESS et al., 2008).

Die separierten Bakterienzellen befanden sich jeweils in der Deckelinnenseite der AdhesiveCaps. Diese sind mit einem speziellen Material beschichtet, welches ein Anheften des katapultierten Materials im Deckel gewährleistet. In die AdhesiveCap Deckel mit den Proben bzw. Kontrollen wurde eine DNase I-verdaute Puffer-Wasser-Lösung pipettiert. Diese beinhaltete pro Ansatz 10 µl ultrareines Wasser (biopur, Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 1 µl 10xPCR Puffer (Qiagen, Germany) und 0,75 U DNase I (AppliChem, Darmstadt, Germany). Die Aktivierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation der DNase-I-haltigen Puffer-Wasser-Lösung für 12 min bei Raumtemperatur, die anschließende Inaktivierung für 15 min bei 95°C.

Nach Zugabe der DNase-I-behandelten Puffer-Wasser-Lösung zu den Proben wurden die AdhesiveCaps kopfüber gevortext, anschließend erfolgte das "Knacken" der Zellen durch: I.) Zentrifugation für 2 min bei 13.000 U min⁻¹; II.) Ultraschallbad für 2 min; III.) Zentrifugation für 5 min bei 13000 U min⁻¹; IV.) "freeze-thaw". Schritte I-III erfolgten bei Raumtemperatur. Für den freeze-thaw Schritt wurden die Proben für jeweils 3 min bei 98°C inkubiert, anschließend jeweils 3 min in flüssiges Stickstoff getaucht. Diese zwei Schritte wurden pro Probe dreimal durchgeführt.

II.8.2.2 DNA-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung

Die DNA-Amplifikation erfolgte mittels PCR unter Verwendung des universellen Primersets 341f/907r und teilweise 8f/907r. Der Reaktionsansatz enthielt 250 nM von jedem Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany), 250 µM pro dNTP (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 2 mM MgCl₂, 1 µl 10xPCR Puffer und 0,2 U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Germany). Der Reaktionsansatz wurde mit ultrareinem Wasser (Bioline GmbH, Germany) auf 11 µl aufgefüllt. Um Kontaminationen, insbesondere durch Spuren von *Escherichia coli* DNA zu vermeiden, wurde der PCR Master Mix mit DNase I (Endkonzentration 0,51 U) 12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inaktivierung der DNase I und gleichzeitig Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 min.

11 µl dieses enzymbehandelten PCR Master Mixes wurden mit je 4 µl der "geknackten" Zellen in ein neues steriles Biopur Reaktionsgefäß (Eppendorf, Germany) pipettiert. Sowohl die enzymbehandelte Puffer-Wasser-Lösung als auch der behandelte PCR Master Mix wurden auf Kontaminationen überprüft, indem jeweils eine PCR Amplifikation erfolgte ohne die Zugabe von template DNA. Die PCR wurde in einem Gradient Cycler PT200 (MJ Research) mit folgendem Programm durchgeführt: 1.) Initiale Denaturierung bei 95°C für 2 min; 2.) Denaturierung bei 95°C für 1 min; 3.) Annealing bei 55°C für 40 sec; 4.) Extension bei 72°C für 20 sec (48 Zyklen von Schritt 2 bis 4); 5.) finale Extension bei 72°C für 10 min. Das Programm wurde mit dem Abkühlen der Proben auf 4°C beendet.

Die Erstellung und Auswertung der 16S rDNA Klonbibliotheken ist in den Kapiteln II.7.7, II.7.8 und II.7.9 beschrieben.

III ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Daten zur mikrobiellen Diversität Poly-P speichernder Bakterien in Gewässersedimenten in der Literatur vor, wenngleich diese Vertreter in Belebtschlammuntersuchungen seit Jahrzehnten intensiv untersucht werden. Daher wurden zunächst verschiedene Gewässer beprobt (Tab. 8) und die Sedimente mit den höchsten Poly-P Gehalten wurden anschließend molekularbiologisch untersucht. Der Stechlinsee, das Gewässer mit Rekordwerten im benthischen Poly-P Gehalt (Tab. 9), wurde zusätzlich unter jahreszeitlichen Änderungen beprobt. Inkubationsexperimente rundeten die Studien ab.

III.1 Untersuchung verschiedener Gewässersedimente

Tak 0. Ciakttiata (CT) und akamiaaka Danamatan dan unnakia dan an Caan

III.1.1 Bestimmung limnologischer und chemischer Parameter

Poly-P kann einen erheblichen Anteil am gesamten biogenen P-Pool darstellen. Es ist in der Biomasse gebunden, freies Poly-P zerfällt jedoch rasch durch enzymatische Hydrolyse. Verschiedene Gewässer wurden ausgewählt, um den Einfluß unterschiedlicher Umweltbedingungen auf die Poly-P Speicherung abschätzen zu können. Die Seen zeigen große Unterschiede in allen untersuchten Parametern (Tab. 1, Tab. 8).

Da die Detektion von PAO in Gewässern mit hohem Poly-P Gehalt im Sediment am aussichtsreichsten ist, wurden die Gewässersedimente mit besonders hohen Poly-P Gehalten (Scharmützel-, Stechlin- und Arendsee) einer detaillierten mikro- und molekularbiologischen Studie unterzogen.

Gowäe	sor	ST [m]	ъЦ	0. [9/]	Tomp [°C]	Chla	Podox [m\/] f [uS	cm ⁻¹ 1
	chemi	schen Parar	neter wurde	en 0,3-1 m ü	ber der Sedim	entoberflä	che bestimmt.	
1 ab. 8	Sichtti	iere (ST) uni	a chemisch	e Parameter	der verschied	iener Seer	i, beprobt im Juni 200	J4. Die

Gewässer	ST [m]	рН	O ₂ [%]	Temp. [°C]	Chl a	Redox [mV]	Lf [µS cm ⁻¹]
Ste	k. A.	8	59,2	4,4	k. A.	k. A.	k. A.
Schm	3,5	7,7	18,6	6,9	1,4	113	406
Are	1,25	7,8	34,0	4,6	0,8	133	457
Müg	2.0	7.6	23,2	14,2	k. A.	k. A.	k. A.
GGI	4,5	7,9	4,5	7,6	21,4	39	552
Pet	0,55	8,1	35,0	17,0	109,7	19	380
Fuku NO	1,5	7,4	0,5	6,2	142,0	56	55

Tab. 9 Konzentration und Anteil von Poly-P in Sedimentoberflächen (0-0,5 cm) unterschiedlicher Seen, bei Beprobung der jeweils tiefsten Stelle im Juni 2004; sortiert nach dem Poly-P Gehalt unter Angabe verschiedener Sedimentparameter. Erläuterungen zum NaOH-EDTA Extrakt siehe Kapitel II.6.2. *) für das Müg-Sediment wurde der korrigierte quantifizierte Poly-P Gehalt in Klammern angegeben (Erläuterungen siehe Text).

	NaOH-EDTA								
	тм	GV	ТР	ТР	SRP	EG	MG	EG + MG	
	[%]	[%]	[mg (g TM) ⁻¹]	[mg (g TM) ⁻¹] [% von TP]				
Ste	3,97	34,03	4,92	1,43	0,265	0,054	0,805	17,5	
Schm	4,76	29,62	2,29	0,55	0,099	0,164	0,021	8,1	
Are	4,96	38,02	2,94	0,68	0,101	0,026	0,128	5,3	
Fuku NO	1,31	82,53	1,74	0,48	0,102	0,027	0,029	3,2	
Pet	3,14	37,02	1,77	0,31	0,087	0,024	0,012	2,0	
GGI	4,16	34,45	3,42	0,36	0,174	0,014	0,000	0,4	
Müg	7,92	25,43	5,29	1,33	1,029	0,000	0,109	2,3 (0,0)*	

Die Müg-Probe war mit Pyro-P kontaminiert, wodurch Poly-P-Endgruppen detektiert wurden (Abb. 9). Die Quantifizierung aus den erhaltenen NMR Spektra ergab einen tatsächlichen Poly-P-Gehalt von 0 %.

Die Poly-P Speicherung scheint nicht an die untersuchten Paramter gekoppelt zu sein. Weder der Trophiegrad (Tab. 1), noch die Temperatur oder Sauerstoffverfügbarkeit über Grund (Tab. 8) bzw. der TP-Gehalt (Tab. 9) koinzidieren mit den ermittelten Poly-P-Werten. Auch ein hoher Anteil an organischer Substanz (Tab. 9, Fuku NO) fördert nicht die Poly-P Speicherung im Sediment.

Die Sedimentoberflächen des oligotrophen Stechlinsee und des mesotrophen Scharmützelund Arendsee zeigen die höchsten Poly-P Gehalte (Tab. 9). Folglich wurden diese Gewässer für eine mikrobielle Charakterisierung ausgewählt. Insbesondere der Stechlinsee wies einen sehr hohen Poly-P Gehalt von 17,5 % (bezogen auf Gesamt-P) auf und liegt damit deutlich über den bisher publizierten Daten mit Poly-P Gehalten zwischen 0 und 11,4 % bezogen auf den Gesamt-P Gehalt (HUPFER et al., 2004, AHLGREN et al., 2006 a).

III.1.2 Poly-P Tiefenprofile

Um zu überprüfen, ob der Poly-P Gehalt, wie vermutet, mit der Sedimenttiefe abnimmt, wurden Tiefenprofile (0-11 cm) für die Sedimente von Scharmützel-, Arend- und Stechlinsee erstellt (Abb. 9). Es hat sich gezeigt, dass der Poly-P-Gehalt mit zunehmender Sedimenttiefe abnimmt. Maximalwerte finden sich an der Sedimentoberfläche, im frisch sedimentierten Material (0-0,5 cm Tiefe). Bereits unterhalb von 3 cm beträgt der Poly-P Anteil bezogen auf

Gesamt-P weniger als ein Prozent (Abb. 9). Eine Abnahme des Poly-P Gehaltes mit der Sedimenttiefe konnten auch HUPFER et al. (1995) zeigen. Bereits ab 4-5 cm Tiefe war kein Poly-P mehr nachweisbar, ferner konnten in dieser Tiefe keine Bakterien mit Poly-P Granula detektiert werden - im Gegensatz zur Sedimentoberfläche.

Insbesondere die PAO sind aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften auf alternierende Redoxbedingungen und eine gute Verfügbarkeit von kurzkettigen Fettsäuren und P angewiesen (s. Kap. I.3.2). Diese Voraussetzungen finden sich im Sediment nur an der Oberfläche. Deshalb wurde nur der oberste Biofilm bis zu einer Tiefe von 0,5 cm beprobt.

Poly-P kann ferner durch aussedimentierendes Material in das Sediment eingetragen werden. Der Beitrag dieser Quelle am Gesamt Poly-P Pool im Sediment kann jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht abgeschätzt werden (s. Kap. III.1.3).



Abb. 9 Poly-P Gehalte in verschiedenen Sedimenttiefen von Scharmützelsee (beprobt September 2003), Arendsee (beprobt August 2003) und Stechlinsee (beprobt November 2006).

III.1.3 Poly-P Gehalte im Sedimentfallenmaterial

Poly-P kann auch durch aussinkendes Seston in das Sediment eingetragen werden. Untersuchungen haben hohe Poly-P Gehalte im planktischen Seston nachgewiesen (HUPFER et al., 2004). Problematisch ist hierbei jedoch die Expositionsdauer der Sedimentfallen. Diese lagen bei bis zu 2 Wochen, um ausreichend Material für die ³¹P-NMR-Messungen zu sammeln. Allerdings kann bei einer so langen Expositionsdauer nicht abgeschätzt werden, inwieweit P-Transformationsprozesse den ursprünglichen Poly-P Gehalt des aussinkenden Sestons verändern.

Deshalb wurden auch Sedimentfallen mit einer eintägigen Expositionsdauer ausgebracht, um P-Transformationen durch die mikrobielle Gemeinschaft in den Fallen zu minimieren. Jeweils zwei unterschiedliche Tiefen wurden gewählt, um Änderungen in der Zusammensetzung während der Sedimentation zu untersuchen. Da sich im Scharmützelsee eine Sprungschicht in 10-11 m Tiefe bildet und im Stechlinsee bei 18-20 m, die durch eine extreme Abnahme des Sauerstoffgehaltes gekennzeichnet ist, wurde ein Teil der Fallen direkt über der Sprungschicht positioniert (9 m Tiefe im Scharmützelsee, 18 m im Stechlinsee), die anderen Fallen wurden nahe der Sedimentoberfläche in 25 m Tiefe (Scharmützelsee) bzw. 65 m (Stechlinsee) und 40 m (Arendsee) ausgebracht. Dadurch sollten Aussagen getroffen werden, inwieweit oxische bzw. anoxische Verhältnisse Einfluß auf die Poly-P Bildung des sedimentierenden Materials besitzen. Die bodennahen Fallen sollten zudem Aussagen darüber erlauben, inwieweit Poly-P während der Sedimentation Umsatzprozessen unterliegt und wie hoch der Eintrag von Poly-P in das Sediment durch aussinkendes Material ist.

Tab. 10 Konzentration und Anteil von Poly-P im Fallenmaterial und der Sedimentoberfläche. Schm SF25 = Sedimentfallen im Scharmützelsee; Fallentiefe 25 m. Schm SO = Sedimentoberfläche Scharmützelsee. Are SF40 = Sedimentfallen im Arendsee, Fallentiefe 40 m. Are SO = Sedimentoberfläche Arendsee. SR = Sedimentationsrate. Die Beprobung des Scharmützelsee erfolgte im Juni 2004, des Arendsee im Oktober 2004. Weitere Abkürzungen siehe Tab. 9

NaOH-EDTA							
	SR	ТР	TP	SRP	EG	MG	EG + MG
	[g m ⁻² d ⁻¹]	[mg (g TM) ⁻¹]	[% von TP]				
Schm SF25	2,48	4,10	1,346	0,342	0,355	0,000	8,7
Schm SO		2,29	0,55	0,099	0,164	0,021	8,1
Are SF40	1,7	3,37	1,504	0,353	0,227	0,000	6,7
Are SO		2,05	0,602	0,117	0,058	0,000	2,8

Im beprobten Fallenmaterial konnte Poly-P nachgewiesen werden (Tab. 10). Ein Teil des Sediment Poly-P Pools scheint damit pelagischen Ursprungs zu sein. Das Fehlen von Poly-P Mittelgruppen im Fallenmaterial deutet auf langkettige Poly-P Moleküle hin.

Der im Oktober beprobte Arendsee zeigt eine geringere Sedimentationsrate im Vergleich zum Scharmützelsee, welcher im Juni beprobt wurde (Tab. 10). Die niedrigeren Poly-P Gehalte in den Arendsee Proben können somit auf einer geringeren Substratverfügbarkeit am Ende der Vegetationsperiode beruhen. Generell war die Fallenausbeute sehr gering, so dass nur für den Scharmützel- und den Arendsee bei jeweils einer Probennahme sowie einer Fallentiefe Material beprobt werden konnte (Tab. 10). Das in die Fallen sedimentierte Material aus dem Stechlinsee reichte für eine Poly-P Quantifizierung nicht aus.

Versuche, die Fallenausbeute durch Anbringen von Trichtern auf den Fallen zu erhöhen, schlugen fehl. Die Erhöhung der Expositionsdauer um mehrere Tage bzw. Wochen erschien aus den bereits genannten Gründen nicht sinnvoll, da der Schwerpunkt der folgenden Untersuchungen auf die Charakterisierung der *in situ* Bakteriengemeinschaft gelegt werden sollte. Folglich wurde in allen weiteren Untersuchungen der Fokus auf die Sediment-oberfläche gelegt.

III.1.4 Molekularbiologische Voruntersuchungen

Bei der Anwendung molekularbiologischer Methoden zur kultivierungsunabhängigen Diversitätsanalyse von komplexen Bakterienpopulationen können, wie bei jedem anderen methodischen Ansatz auch, verschiedene Fehlerquellen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Einige dieser Fehlerquellen wurden im Vorfeld genauer untersucht. Dazu zählte das eingesetzte Extraktionsprotokoll zur Abtrennung der Bakterien aus dem Sediment, die sowie Auswahl Enzymbehandlung im CARD-FISH Protokoll die DNAdes Extraktionsprotokolles. Diese Ergebnisse (Kap. III.1.4.1, III.1.4.2 und III.1.4.3) werden daher den eigentlichen Resultaten der Probennahmen vorangestellt.

III.1.4.1 DAPI-Zählungen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die DNA-Färbung mittels Acridine-Orange (HOBBIE et al., 1977) oder DAPI (PORTER & FEIG, 1980) ist seit mehreren Jahren die erfolgreichste Methode zur Bestimmung der bakteriellen Gesamtzellzahl in unterschiedlichstem Probenmaterial (KEPNER & PRATT, 1994). Die Bestimmung der Gesamtzellzahl durch DAPI-Färbung ist jedoch mit verschiedenen Fehlerquellen behaftet. Man kann Proben direkt mit DAPI versetzen und die Signale im Fluoreszenzmikroskop quantifizieren. Der Vorteil ist, dass keine Zellen durch Extraktionsschritte verloren gehen. Diese Methode ist in Sedimenten aber wenig erfolgversprechend, da der hohe Gehalt an anorganischen und organischen Partikeln ein annähernd korrektes Auszählen unmöglich macht (SCHALLENBERG et al., 1989). Somit empfiehlt sich für Gewässersedimente vor Einsatz der DAPI-Lösung eine Extraktion der Zellen aus dem Sediment. Hierfür stehen verschiedene Protokolle zur Verfügung. Die besten Ergebnisse für die vorliegenden Sedimente wurden durch Einsatz von Natrium-Pyrophosphat und Ultraschall erzielt (vgl. VEIJI & ALBRIGHT, 1986). Da nur der Überstand abgenommen und analysiert wurde, erfolgte eine gewisse Unterschätzung der eigentlichen Zellzahlen in den Proben. Zum einen werden durch die Prozedur nicht alle Zellen von großen organischen Partikeln gelöst und verbleiben somit im Pellet, zum anderen sedimentieren Zellen während der Sedimentationsphase unterschiedlich schnell ab und werden somit nicht alle im Überstand erfasst. Eine weitere, schwer abschätzbare Fehlerquelle, ist die Zahl der Bakterien, die die 0,2 µm Poren der Polycarbonatfilter passieren und somit durch die Gesamtzellzahlbestimmung nicht erfasst werden. Insbesondere in oligotropher Umgebung können solche "Ultramikrobakterien", die einen Durchmesser von < 0,3 µm aufweisen, einen beträchtlichen Anteil in der Bakteriengemeinschaft ausmachen (z.B. BAE et al., 1972, TORELLA & MORITA, 1981, HAHN et al., 2003).

Um die Effizienz des Extraktionsprotokolls zu überprüfen, wurde die Extraktion an derselben Sedimentprobe bis zu viermal wiederholt. Zusätzlich wurde im verbleibenden Sedimentpellet die Zellzahl bestimmt (Abb. 10).



Abb. 10 Ermittelte Zellzahlen in den verschiedenen Extraktionsschritten von Scharmützel-(Schm), Stechlin- (Ste), Müggel- (Müg) und Petersdorfer See (Pet) sowie der Fuchskuhle, Nordost-Becken (Fuku NO), beprobt im Juni (Jun) bzw. Juli 2004.



Abb. 11 Prozentualer Anteil der Gesamtzellzahlen in den verschiedenen Extraktionsschritten.

Aus Abb. 10 und Abb. 11 wird ersichtlich, dass im ersten Extraktionsschritt in allen Proben die höchsten Zellzahlen zu finden sind, insbesondere in den Sedimenten von Stechlinsee und Fuchskuhle. In Abb. 11 zeigt sich, dass die Extraktionsausbeute im ersten Schritt zwischen 45 % (Scharmützelsee, Juni 2004) und 70 % (Stechlinsee; Fuchskuhle, Nordost-Becken) liegt. Addiert man die ermittelten Zellzahlen der ersten und zweiten Extraktion erfasst man 75 % (Scharmützelsee, Juli 2004) bis 90 % (Scharmützelsee, Juni 2004; Fuchskuhle, Nordost-Becken) der Gesamtzellen. Stechlinsee: Auch nach 4 Extraktionsschritten und zusätzlicher Quantifizierung im zurückgebliebenen Pellet ist eine Unterschätzung der tatsächlichen Gesamtzellzahl nicht auszuschließen, da insbesondere auf Partikeln nur die Bakterien der obersten Ebenen mikroskopisch erfasst werden.

Für die Quantifizierung der verschiedenen Bakteriengruppen mittels CARD-FISH wurde aus Zeitgründen nur der erste Extrakt eingesetzt. Daher muss bei der Auswertung dieser Ergebnisse die Fehlerquelle durch die Extraktion berücksichtigt werden, die auf einer Unterschätzung der tatsächlichen Zellzahlen beruht. Nicht ermittelt wurden mögliche Unterschiede in der Bakterienzusammensetzung zwischen den einzelnen Extrakten. Hier könnte eine weitere Fehlerquelle liegen, deren Ausmaß sich jedoch ohne entsprechende Untersuchungen nicht abschätzen lässt.

III.1.4.2 Auswirkung der Enzymbehandlung im CARD-FISH Protokoll auf die Eubacteria Zellzahlen

Actinobacteria sind grampositiv und somit durch eine besonders dicke Mureinhülle gekennzeichnet. Deshalb werden die mit der Oligonukleotidsonde HGC69a hybridisierten Proben mit Lysozymlösung vorbehandelt, um die Zellwände zu perforieren und somit ein besseres Eindringen der Sonden in die Zellen zu gewährleisten. Inwieweit die Lysozymbehandlung eine Rolle bei der Quantifizierung der *Eubacteria* mittels Oligonukleotidsonde EUB338 I-III spielt, wurde anhand der Proben vom Juni 2004 von Scharmützelsee, Stechlinsee und Arendsee getestet.

Der Begriff der *Eubacteria* gilt inzwischen als veraltet, in heutiger Zeit werden Prokaryoten in die Domänen der *Bacteria* (früher: *Eubacteria*) und *Archaea* eingeteilt. Da die EUB338 I-III Oligonukleotidsonde nach den *Eubacteria* benannt wurde (AMANN et al., 1990), wurde dieser Term in der vorliegenden Arbeit beibehalten.



Abb. 12 Vergleich der EUB338 I-III positiven Zellzahlen aus Scharmützel-, Stechlin- und Arendsee vom Juni 2004 nach Lysozymbehandlung und ohne entsprechende Behandlung. Es wurden die Mittelwerte aus 20 Zählungen mit Standardabweichung logarithmisch dargestellt.

Zwischen den Proben, die mit Lysozym vorbehandelt wurden, und denen ohne enzymatische Vorbehandlung zeigen sich keine deutlichen Unterschiede (Abb. 12). Deshalb wurden bei der Quantifizierung alle Zellzahlen auf Gruppenniveau auf die EUB338 I-IIII positiven Zellzahlen <u>ohne</u> enzymatische Vorbehandlung bezogen.

Generell ist der Erfolg der FISH bzw. CARD-FISH Methode von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. An erster Stelle steht das beprobte Material selbst. So gehören Sediment und Bodenproben aufgrund ihrer Komplexität zu den schwierigsten zu untersuchenden Habitaten. Insbesondere unter oligotrophen Bedingungen finden sich auch langsam wachsende Zellen. Aufgrund des niedrigen rRNA Gehaltes sind diese Zellen mit dem FISH-

Protokoll schwierig zu detektieren. Die Etablierung der CARD-FISH, die auf einer Signalverstärkung beruht, löste dieses Problem (PERNTHALER et al., 2002). Ausgehend von der Auswahl und gegebenenfalls Optimierung eines geeigneten Extraktionsprotokolles (siehe Kap. III.1.1), spielt die Fixierung der Bakterienzellen eine wichtige Rolle, denn eine ungenügende Permeabilisierung der Zellen beeinträchtigt die Diffusion der Oligonukleotidsonden. Es gibt zwei Gruppen von Fixierungsmitteln, 1. Präzipitierende, wie Ethanol oder Methanol und 2. Aminogruppen guervernetzende, wie Aldehyde (HAASE et al., 1984). Während die Paraformaldehyd-Lösung insbesondere zur Fixierung gramnegativer Bakterien eingesetzt wird (AMANN et al., 1990), hat sich die Ethanol-Fixierung bei grampositiven Bakterien bewährt (BRAUN-HOWLAND et al., 1992; ROLLER et al., 1994; SEKAR et al., 2003). Der Einsatz von Enzym-markierten Oligonukleotidsonden war erfolgreich für alle untersuchten gramnegativen und einige grampositive Bakterien nach Ethanolfixierung (AMANN, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurden daher alle Sedimentproben mit Ethanol fixiert. Die Hybridisierung Oligonukleotidsonde erfolgreiche einer kann zudem durch die Sekundärstruktur der Ribososmen eingeschränkt werden. Für die Hybridisierungseffizienz sind ausserdem optimale Hybridisierungs- und Waschbedingungen entscheidend (PERNTHALER et al., 2001).

III.1.4.3 Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsprotokolle

Vor Beginn der Probenaufarbeitung wurden verschiedene DNA-Extraktionsprotokolle getestet (siehe Kap. II.7.4.1). Das Ziel bestand darin, ein effektives, zeit- und kostensparendes Protokoll zu finden, dass sich auf alle Proben anwenden lässt.

Das Ergebnis der DGGE Fingerprintprofile ist in Abb. 13 dargestellt. Mittels Phenol-Chloroform-Protokoll konnte aus den getesteten Sedimenten keine genomische DNA extrahiert werden, folglich findet sich auch kein Bandenmuster auf dem DGGE-Gel. Die höchste Bandenzahl findet sich beim Standardprotokoll und unter Verwendung des UltraClean Kits (Abb. 13). Zur Extraktion von genomischer DNA aus den verschiedenen Gewässersedimenten wurde daher das Standardprotokoll angewendet.



Abb. 13 DGGE Fingerprintprofile, die aufgetragene DNA entstammt unterschiedlichen Gewässersedimenten (Are=Arendsee; Pet=Petersdorfer See; Ste=Stechlinsee; Sch=Scharmützelsee; Fu=Fuchskuhle, Nordost-Becken) unter Anwendung verschiedener Extraktionsprotokolle (vgl. II.7.4.1)

III.1.5 Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft

III.1.5.1 Mikrobielle Fingerprintprofile

Im Folgenden wurden Fingerprintprofile der bakteriellen Gemeinschaften aus Stechlin-, Arend- und Scharmützelsee-Sediment (Probennahme jeweils im Juni 2004) erstellt. Hierbei kamen neben einem universellen Primerpaar zur Amplifizierung der *Eubacteria*-DNA, Großgruppen-spezifische Primersets zur Analyse der *Alpha*- und *Betaproteobacteria*, sowie der *Planctomycetales* und *Cytophaga-Flavobacteria* zum Einsatz. Um gezielt das Vorkommen von Candidatus *Accumulibacter* zu überprüfen, wurden die spezifischen Oligonukleotidsonden PAO462 und PAO846 als Primer eingesetzt und die erzielte Diversität dieser Amplifikate mittels DGGE überprüft. Zusätzlich konnten einige Banden sequenziert werden (Abb. 14). Durch die Entwicklung von Oligonukleotidsonden spezifisch für Candidatus *Accumulibacter* (HESSELMANN et al., 1999; CROCETTI et al., 2000) und deren Einsatz in vielfältigen Belebtschlammstudien ist bekannt, dass diese Bakterien Vertreter der PAO darstellen und zur Poly-P Akkumulation in Belebtschlämmen beitragen können (u.a. LIU et al., 2001; KONG et al., 2005). Die von CROCETTI et al. (2000) publizierten Oligonukleotidsonden weisen die höchste Spezifität für Candidatus *Accumulibacter* auf und wurden daher in der vorliegenden Arbeit als Primer und Oligonukleotidsonden eingesetzt. Weitere Candidatus *Accumulibacter* spezifische Sonden wurden von HESSELMANN et al. (1999) und ZILLES et al. (2002) entwickelt.

Inzwischen gibt es auch erste Belebtschlammuntersuchungen in denen diese spezifischen Oligonukleotidsonden (PAO651 und PAO846) als Primer in PCR Reaktionen eingesetzt wurden (FUKUSHIMA et al., 2007; OKUNUKI et al., 2007). Die Oligonukleotidsonde PAO462 kam jedoch ebenso wenig zum Einsatz wie Fingerprint Methoden.



Abb. 14 DGGE Fingerprintprofile von (1) Stechlinsee, (2) Arendsee und (3) Scharmützelsee, beprobt im Juni 2004. S=Standard. Die Banden, markiert durch Kästen A bis F, wurden ausgeschnitten und sequenziert (siehe Abb. 16).

Insbesondere bei den *Eubacteria*, aber auch bei den bakteriellen Großgruppen zeigt sich eine enorme Diversität (Abb. 14). Dennoch wäre es möglich, dass nur bestimmte Bakteriengruppen im Sediment aktiv sind und beispielsweise Poly-P speichern. Hier offenbart sich der Nachteil der DNA basierten Fingerprint-Methoden, da auch inaktive und abgestorbene Zellen erfasst werden. Dieses Defizit wird durch den Einsatz weiterer Methoden, wie z.B. der CARD-FISH (Kap. III.1.5.2) ausgeglichen.

Dennoch ist die DGGE eine sinnvolle Methode, um in relativ kurzer Zeit verschiedene Proben und Primersysteme miteinander zu vergleichen. Die Ähnlichkeit zwischen zwei DGGE-Bandenmustern wurde mittels SØRENSEN-Index ermittelt (SØRENSEN, 1948). Dieser wird wie folgt berechnet: $C_s=2j/(A+B)$, wobei A, die Gesamtzahl der Banden von Probe 1 und B, die Gesamtzahl von Probe 2 ist; j ist die Anzahl der gemeinsamen Banden von Probe 1



und 2. Der sich ergebende Wert kann eine Größenordnung von 0 bis 1 einnehmen, wobei eine 100% ige Übereinstimmung einem SØRENSEN-Index von 1 entspricht.

Abb. 15 Ähnlichkeitskoeffizienten (SØRENSEN-Index) der Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Planctomycetes und Cytophaga-Flavobacteria Cluster Populationen in Stechlin-, Scharmützel- und Arendsee-Sediment (beprobt im Juni 2004).

Die Åhnlichkeitskoeffizienten zwischen den verschiedenen Fingerprintprofilen zeigen keine extremen Schwankungen (Abb. 15). Die größte Ähnlichkeit in den Bandenmustern war zwischen den Proben aus dem Arend- und Scharmützelsee-Sediment unter Verwendung des *Betaproteobacteria*-spezifischen Primersets nachweisbar (fast 60 %) (Abb. 15). Alle anderen Werte sowohl für die *Beta*- als auch die *Alphaproteobacteria* lagen zwischen 0,40 und 0,48, dies entspricht einer Übereinstimmung im Bandenmuster zwischen 40 und 48 %. Größere Unterschiede zwischen den Bandenmustern der verschiedenen Seen gab es bei den *Planctomycetes* und dem *Cytophaga-Flavobacteria* Cluster der *Bacteroidetes* mit Werten zwischen 0,34 und 0,39. Ausnahme bildete der Vergleich der Bandenmuster von Stechlin-und Scharmützelsee unter Verwendung *Planctomycetes*-spezifischer Primer mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,27. Für die Fingerprintprofile mit dem universellen Primerset wurden keine Ähnlichkeitskoeffizienten ermittelt, da aufgrund der enormen Bandenzahl keine saubere Auftrennung im Gel möglich war. Dies zeigte sich auch beim Ausschneiden und Sequenzieren einzelner Banden, hinter denen sich stets ein Gemisch der 16S rDNA verschiedener Spezies verbarg, mit Ausnahme einer Bande der *Planctomycetes*-spezifischen

Amplifikate. Eine große Bandenzahl war auch bei Verwendung der Großgruppenspezifischen Primer erkennbar. Hier liegt eine Fehlerquelle, da schwache Banden möglicherweiser nicht in die Berechnung des Ähnlichkeitskoeffizienten einbezogen wurden. Neben den Großgruppen-spezifischen Primern kamen auch Primer spezifisch für Candidatus *Accumulibacter* zum Einsatz, um die Diversität dieser bekannten Poly-P Speicherer mittels Fingerprintprofilen zu überprüfen. Einige Banden wurden ausgeschnitten und sequenziert, mit dem Ziel, Aussagen über die tatsächliche Spezifität der eingesetzten Primer treffen zu können (Abb. 16). Durch den Einsatz der spezifischen Primersysteme, wie beispielsweise die Candidatus *Accumulibacter* spezifischen Primer PAO846 und PAO462, ist eine gute Auftrennung möglich, die ein späteres Sequenzieren einzelner Banden erlaubt.



Abb. 16 Phylogenetische Verwandschaftsverhältnisse der ausgeschnittenen und sequenzierten DGGE-Banden.

Es zeigt sich, dass mit *Planctomycetes*-spezifischen Primern nicht zwangsläufig nur 16S rDNA von *Planctomycetes* amplifiziert wird.

Die sequenzierte Bande DGGE060504-PLA-11_seq20 fällt in das Phylum der *Acidobacteria*. Ebenso ist Primer PAO462 nicht spezifisch für Candidatus *Accumulibacter* des *Rhodocyclus* Clusters, vielmehr zeigt sich eine enge Verwandschaft der amplifizierten 16S rDNA zur Gattung *Dechloromonas*, die jedoch der Familie der *Rhodocyclaceae* angehört. Mittels Primer PAO846 lassen sich hingegen gezielt Vertreter eng verwandt zum *Rhodocyclus* Cluster amplifizieren (Abb. 16). Folglich wurde der Primer PAO846 für die DNA-Amplifikation aus verschiedensten Sedimentproben eingesetzt, um das Vorkommen von Candidatus *Accumulibacter* zu überprüfen.



Abb. 17 Mikrobielle Fingerprintprofile unter Einsatz Candidatus Accumulibacter-spezifischer Primer in verschiedenen Gewässersedimenten ausgewählter Seen und im Belebtschlamm, unter saisonalen Veränderungen

In allen untersuchten Gewässersedimenten war die PCR mit dem spezifischen Primerset 341f-gc/PAO846 erfolgreich. Auch das DGGE-Bild zeigte die stärksten Banden auf gleicher Höhe (Abb. 17). Da in allen Proben stets das gesamte PCR Produkt in der DGGE eingesetzt wurde, sagt die Bandenintensität zwischen den verschiedenen Proben nichts über verschieden hohe Anteile von Candidatus *Accumulibacter* in der jeweiligen mikrobiellen Gemeinschaft aus. Vielmehr scheint die DNA-Extraktion und Amplifikation in den verschiedenen Proben unterschiedlich erfolgreich gewesen zu sein. Die Quantifizierung von Candidatus *Accumulibacter* in den Einsatz des spezifischen Primers als Oligonukleotidsonde mittels CARD-FISH (III.1.5.2).

Das ubiquitäre Vorkommen von Candidatus *Accumulibacter* wäre gemäß der Hypothese "everything is everywhere but the environment selects" (BAAS-BECKING, 1934; FINLAY, 2002, FENCHEL & FINLAY, 2004) nicht verwunderlich, da mit PCR basierten Methoden mitunter auch kleinste DNA Mengen amplifiziert werden können, unabhängig ob ihr Ursprung aus toten oder lebenden Mikroorganismen stammt. Bisher konnte diese Hypothese jedoch nicht bestätigt werden (LACHANCE, 2004; WHITFIELD, 2005). Im Gegenteil, es finden sich auch Meinungen, die eine globale Verteilung aller Mikroorganismen anzweifeln (u.a. WHITAKER et al., 2003). Insbesondere die 16S rDNA basierte phylogenetische Einordnung von Umweltsequenzen mit dem 97 % Ähnlichkeitskriterium zu bestehenden Taxa (SPEKSNIJDER et al., 2001) steht im Zentrum der Kritik. Durch das "Ökotyp-Konzept" von COHAN (2002) findet sich eine weitere Erklärung. Demnach enthält eine beschriebene Bakterienart verschiedene Ökotypen. Jeder Ökotyp beinhaltet eine Zahl von bakteriellen Populationen, die die gleiche ökologische Nische besetzen. Unterschiedliche Ökotypen können über nahezu identische ribosomale RNA verfügen. HE et al. (2007) untersuchten verschiedene Belebtschlämme, die durch ein gehäuftes Auftreten von Candidatus Accumulibacter gekennzeichnet waren. Um eine höhere genetische Auflösung zu erhalten, setzten diese Autoren das ppk Gen als molekularen Marker ein (siehe Abb. 3). Es zeigte sich, dass die Candidatus Accumulibacter lineage diverser ist, als bisher angenommen wurde. Es konnten durch das ppk Gen 5 Stämme erhalten werden, die 5 mögliche Ökotypen von Candidatus Accumulibacter repräsentieren (HE et al., 2007). In aktuellen Studien war der parallele Einsatz der Candidatus Accumulibacter spezifischen PCR sowohl mit 16S rRNA als auch dem ppk Gen als molekularem Marker ebenfalls erfolgreich für verschiedene Habitate. In Salz und Süßwasser und in den assoziierten Sedimenten konnte Candidatus Accumulibacter nachgewiesen werden und vereinzelt ebenfalls in Bodenproben (KUNIN et al., 2008, PETERSON et al., 2008). Der Befund, dass Candidatus Accumulibacter multiple Gene besitzt, die für verschiedene Funktionen codieren, wie beispielsweise den kompletten Stoffwechsel für Stickstoff und Kohlenstoff-Fixierung, weist zudem auf eine gute Anpassung an oligotrophe Habitate hin (GARCIA MARTIN et al., 2006).

III.1.5.2 Quantifizierung verschiedener bakterieller Großgruppen

In einem "top-to-bottom-approach" (AMANN et al., 1995) wurden gruppenspezifische 16S bzw. 23S rRNA Oligonukleotidsonden, die mikrobielle Taxa unterschiedlicher Hierarchien erfassen, in der CARD-FISH eingesetzt. Zusätzlich wurden die *Cyanobacteria* quantifiziert. Im Grünfilter zeigen diese eine rote Autofluoreszenz durch Phycobili-Proteine und Chlorophyll a.

Folgende Hybridisierungseffizienzen (relativer Anteil der EUB338 I-III hybridisierbaren Zellen an der durch DAPI-Färbung bestimmten Gesamtzellzahl) wurden ermittelt: Scharmützelsee 113 %, Stechlinsee 61 % und Arendsee 34 %.

Ähnliche Hybridisierungeffizienzen finden sich auch in der Literatur, so wurden mittels FISH für marine Proben Werte zwischen 30 - > 80% ermittelt (PERNTHALER et al., 2001). UHLMANN et al. (2000) erreichten in Talsperrensedimenten Effizienzen zwischen 50-90 %, beprobt wurden in der genannten Arbeit der Aufwuchs auf in das Sediment eingebrachten Objekt-trägern. Dadurch konnten Artefakte durch Hintergrundfluoreszenzen minimiert werden. Allerdings stellt die Untersuchung des Aufwuchses keine echte *in situ* Bedingung dar, da das Einbringen der Objektträger und die Vorgabe des Glases als Anheftungssubstrat die Besiedlung durch bestimmte Baktereingruppen beeinflussen kann. PEPLIES et al. (2006) zeigten mittels CARD-FISH, dass in verschiedenen Gewässersedimenten die *Eubacteria* zwischen 35-71 % der Gesamtbakterienzahl (DAPI) ausmachen. Die für den Scharmützelsee ermittelte Effizienz von > 100 % kann sich nur durch methodische Artefakte erklären. Die geringe Effizienz in den Arendseeproben könnte durch einen hohen Anteil insbesondere der *Archaea* bedingt sein, die durch die EUB Sonde nicht erfasst werden. Die *Archaea* gehören neben den *Bacteria* (auch *Eubacteria* genannt) zu den Prokaryoten und bilden eine eigene Domäne (WOESE et al., 1990). Archeelle Populationen spielen beispielsweise eine wichtige Rolle beim anaeroben Acetatabbau aus der Algenbiomasse (SCHWARZ et al., 2007).



Abb. 18 Prozentualer Anteil verschiedener Bakteriengruppen an der *Eubacteria* Zellzahl (Sonde EUB338 I-III) in den Sedimenten von Scharmützel-, Arend- und Stechlinsee im Juni 2004

In allen drei untersuchten Sedimenten war ein grosser Anteil der *Eubacteria* (18-31%) nicht mit den eingesetzten Sonden quantifizierbar (Abb. 18). Der Anteil der *Actinobacteria* (Sonde HGC69a) lag in allen Sedimenten unter 8 %. Im eutrophen Scharmützelsee dominierten das *Cytophaga-Flavobacteria* Cluster der *Bacteroidetes*, die *Planctomycetales*, sowie die *Betaproteobacteria*. Eine solche Zusammensetzung der dominierenden Gruppen findet sich ebenfalls im Sediment des mesotrophen Arendsee, der auch den höchsten Anteil der *Cyanobacteria* aufweist (12%). Die *Cyanobacteria* sind im Sediment des oligotrophen Stechlinsee kaum zu detektieren, ihr Anteil liegt bei lediglich 1%. Fast die Hälfte der *Eubacteria* sind den Proteobacteria (*Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria*) zuzuordnen (Abb. 18).

UHLMANN et al. (1998), die den Aufwuchs von in Talsperrensediment eingebrachten Objektträgern mittels FISH untersuchten, fanden *Alphaproteobacteria* als eine der dominierenden Gruppen (bis 80 %). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Betaproteobacteria erzielt, das Cytophaga-Flavobacteria-Cluster zeigte in dieser Studie hingegen Anteile von weniger als 10%. Parallelen zu den hier dargestellten Ergebnissen lassen sich jedoch nur bedingt ziehen. Die von UHLMANN et al. (1998) publizierten Ergebnisse beziehen sich auf Untersuchungen der Biofilme auf in Sediment eingebrachte Objektträgern. Ferner wurden Sedimentproben bis 16 mm beprobt und die verschiedenen Tiefen separat ausgewertet. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse basieren hingegen auf gepoolten Sedimentoberflächen von 0-5 mm Tiefe. Aufgrund ausgeprägter Gradienten insbesondere an der Sedimentoberfläche können sich deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft ergeben, die in gepoolten Proben nicht erfasst werden.

III.1.5.3 Populationsanalyse anhand von 16S rDNA Klonbibliotheken

Ein entscheidender Einflußfaktor auf die Qualität einer phylogenetischen Analyse ist die Länge der verwendeten Sequenzen. Da zum einen der Informationsgehalt eines Markermoleküls natürlicherweise begrenzt ist und zum anderen unterschiedliche Teile der Primärstruktur Informationen über unterschiedliche phylogenetische Ebenen beinhalten, sollten grundsätzlich nur Vollsequenzen bei der Erstellung phylogenetischer Stammbäume Verwendung finden (LUDWIG & SCHLEIFER, 1994), insbesondere in bislang unbekanntern Habitaten, in denen ein Großteil der gefundenen Sequenzen nur geringe Ähnlichkeit zu vorhandenen Datenbankeinträgen aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurden die 16S rDNA Inserts jedoch nur partiell sequenziert. (450-600 bp), um einen groben Überblick über die vorliegende Diversität zu erhalten. Aufgrund der dadurch eingeschränkten Aussagekraft wurde auf die Erstellung von Stammbäumen verzichtet. Vielmehr wurden die Daten auf Klassenniveau dargestellt und sind als Ergänzung zu den anderen Ergebnissen anzusehen.



Abb. 19 Phylogenetische Einordnung der 16S rRNA Gensequenzen in die bakteriellen Großgruppen

Die 16S rDNA Klonbibliotheken wurden von den *Proteobacteria* dominiert (Abb. 19). Auch die *Bacteroidetes* scheinen eine wichtige Rolle, insbesondere im Stechlinsee zu spielen. Im Stechlinsee konnten auch die meisten Sequenzen phylogenetischen Großgruppen zugeordnet werden. Die *Planctomycetes* waren nur in geringer Abundanz in allen Sedimenten vertreten. *Actinobacteria* konnten nur im Scharmützelsee nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den Ergebnissen mittels CARD-FISH (Abb. 18). Durch den Einsatz einer *Actinobacteria*-spezifischen Oligonukleotidsonde konnte diese Großgruppe in allen drei Sedimenten nachgewiesen werden, wenngleich ihr Anteil in der Bakteriengemeinschaft gering war. Mögliche Fehlerquellen reichen bei der 16S rDNA Klonbibliothek von der Effizienz der verwendeten DNA-Extraktions- und PCR-Protokolle bis hin zu einer zu geringen Anzahl untersuchter Klone. Die Ergebnisse der PCR-unabhängigen CARD-FISH können dirch eine unzureichende Sondenspezifität verfälscht werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der *Cyanobacteria*, deren Anteil mittels fluoreszenzmikroskopischer Quantifizierung unterschätzt und/oder anhand der 16S rDNA Klonbibliotheken überschätzt wird (Abb. 18) und Abb. 19). Ausschließlich im Scharmützelsee finden sich ferner Vertreter der Abteilung der *Firmicutes* (Abb. 19). Die gefundenen Sequenzen fallen alle in die Ordnung *Clostridiales*. Clostridien sind ubiquitär insbesondere in Böden verbreitet. Ihr Stoffwechsel ist heterogen, es gibt keine andere Bakteriengruppe die so viele verschiedene Substrate vergären kann. Ebenfalls ausschließlich im Scharmützelsee finden sich Vertreter der Abteilung OP11. Diese Bakterien sind weit verbreitet. Da bisher kein Vertreter kultiviert werden konnte, bleiben ihre physiologischen Eigenschaften unklar (HARRIS et al., 2004).

Nur im Arendsee konnten Vertreter der *Chloroflexi* (Grüne Nichtschwefelbakterien) gefunden werden. Diese filamentösen Bakterien sind zur Photosynthese fähig und konnten auch in Belebtschlämmen nachgewiesen werden (BJÖRNSSON et al., 2002), allerdings scheinen sie nicht zur Poly-P Speicherung befähigt zu sein (SPEIRS et al., 2009). In Scharmützel- und Arendsee finden sich außerdem Vertreter der *Acidobacteria* (Abb. 19). Bisher gibt es nur einige Isolate, daher ist wenig über ihren Metabolismus bekannt. In Belebtschlämmen wurden Vertreter der *Acidobacteria* nachgewiesen, die allerdings nicht zur Poly-P Speicherung fähig waren (AHN et al., 2008).

Ebenfalls recht wenig bekannt ist über die Abteilung der *Verrucomicrobia*. Nur wenige Vertreter sind beschrieben, sie sind weitverbreitet insbesondere im Süßwasser und Boden (HUGENHOLTZ et al., 1998). Vertreter konnten in allen drei beprobten Seen nachgewiesen werden.

Generell zeigt sich anhand der 16S rDNA Klonbibliotheken, dass die Diversität in den Sedimenten nicht ausreichend durch die eingesetzten CARD-FISH Oligonukleotidsonden erfasst und somit quantifiziert werden konnte. Beispielsweise wurden die *Deltaproteobacteria* sowie die *Verrucomicrobia* nicht durch Oligonukleotidsonden erfasst (s. Abb. 18). Somit erklärt sich auch der relativ hohe Anteil von EUB positiven Zellen, die nicht durch die spezifischeren CARD-FISH Sonden detektiert werden konnten. Ein Vergleich der CARD-FISH Daten mit den 16S rDNA Klonbibliothek-Ergebnissen ist jedoch kaum möglich, da die Anzahl der sequenzierten Klone bei weitem nicht ausreicht, um diese Daten quantitativ auswerten zu können. Anhand der 16S rDNA Klonbibliothek-Daten lässt sich aber zeigen, dass in den Sedimenten keine der aus den Belebtschlämmen bekannten PAO dominieren.

III.2 Untersuchung des Stechlinsee-Sedimentes unter saisonalen Veränderungen

III.2.1 Quantifizierung der Poly-P Gehalte

Das Gewässer-Screening zeigte einen hohen Anteil von Poly-P im Sediment des Stechlinsees (Abb. 9). Um saisonale Veränderungen im Poly-P Pool dieses Gewässers nachvollziehen zu können, wurden weitere Probenahmen am Stechlinsee-Sediment
durchgeführt. Die Messung der Proben mittels NMR war teilweise schwierig, da im Stechlinsee hohe Eisengehalte vorzufinden sind, die zu Linienverbreiterungen in den Spektrogrammen führen und so die Poly-P-Quantifizierung erschweren.

Sec	aimentp	arameter.							
	NaOH-EDTA								
	тм	GV	ТР	ТР	SRP	EG	MG	EG + MG	
	[%]	[%]	[mg (g TM) ⁻¹]	[% von TP]					
17. Jun 04	3,97	34,03	4,92	1,43	0,265	0,054	0,805	17,5	
22. Jun 05	3,75	38,42	4,85	1,55	0,475	0,129	0,548	13,9	
12. Aug 05	3,67	36,71	5,10	0,92	0,417	0,000	0,348	6,8	
20. Sep 05	3,05	41,63	4,79	0,72	0,166	0,000	0,383	8	
07. Dez 05	3,12	36,68	5,79	1,17	0,410	0,035	0,632	11,5	
08. Apr 06	3,72	35,34	6,94	1,41	0,660	0,019	0,446	6,7	
18. Apr 06	2,66	35,97	4,77	1,00	0,329	0,000	0,174	2,8	
26. Apr 06	3,14	34,14	3,32	0,60	0,150	0,000	0,953	5,3	
11. Mai 06	2,87	32,39	4,47	1,51	0,360	0,000	0,134	21,3	

Tab. 11 Konzentration und Anteil von Poly-P in den Oberflächen (0-0,5 cm) der Stechlinsee-Sedimente, bei Beprobung der tiefsten Stelle und unter Angabe verschiedener Sedimentparameter.

Aus Tab. 11 wird ersichtlich, dass der Poly-P Gehalt im Stechlinsee-Sediment großen saisonalen Schwankungen unterliegt. Bereits Beprobungen in Abständen von 8-14 Tagen, wie sie von April bis Mai 2006 erfolgten, zeigten Unterschiede im Poly-P Gehalt bis um den Faktor 10. Poly-P ist eine labile Komponente und kann schnellen Umsatzprozessen unterliegen. Welche Faktoren diese großen Schwankungen im Poly-P Pool des Stechlinsee-Sedimentes auslösen, bleibt offen.

III.2.2 Quantifizierung verschiedener Bakteriengruppen

Mittels CARD-FISH unter Einsatz verschiedener Großgruppen-spezifischer Oligonukleotidsonden wurde die mikrobielle Gemeinschaft im Stechlinsee untersucht. Die Beprobung erfolgte zu Beginn der Untersuchungen im Juni 2004 (siehe auch III.1.5.2) sowie monatlich zwischen Mai und November 2005, um die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft unter saisonalen Änderungen zu verfolgen.



Abb. 20 Prozentualer Anteil verschiedener Bakteriengruppen an der *Eubacteria* Zellzahl (Sonde EUB338 I-III) unter saisonalen Veränderungen im Stechlinsee-Sediment

Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im Stechlinseesediment zeigt im jahreszeitlichen Verlauf starke Schwankungen. Häufig stellen die *Proteobacteria* eine dominante Fraktion innerhalb der Bakteriengemeinschaft (Abb. 20). Ihr Anteil an den *Eubacteria* lag bei bis zu 75 %. Insbesondere die *Betaproteobacteria* dominierten mit Werten zwischen 10-55 %. Die Candidatus *Accumulibacter* Vertreter der Betaproteobacteria hatten einen Anteil von < 1 % in allen untersuchten Proben. Das *Cytophaga-Flavobacterium* Cluster der *Bacteroidetes* sowie die *Planctomycetes* treten insbesondere in der zweiten Jahreshälfte in Erscheinung mit Anteilen von bis zu 20 %. Die *Actinobacteria* spielen eine eher untergeordnete Rolle in der Bakteriengemeinschaft, ihr Anteil liegt unter 8 %. Während zu Beginn und am Ende der Vegetationsperiode die Bakteriengemeinschaft recht gut mit den eingesetzten Sonden erfasst und charakterisiert werden konnte, war dies in den Proben von Ende Mai, Ende Juni und Ende September nicht möglich. Bis zu 65 % der *Eubacteria* konnten nicht durch die eingesetzten Sonden erfasst werden.

III.3 Untersuchung der Induzierbarkeit der Poly-P Bildung durch Inkubationsexperimente

Anhand von Inkubationsexperimenten sollte die Induzierbarkeit der Poly-P Bildung unter verschiedenen Bedingungen überprüft werden. Um in allen Sedimentkernen möglichst geringe Poly-P Gehalte als Ausgangswerte zu erhalten, wurden alle Kerne zunächst 8 Wochen bei kontinuierlicher Begasung mit atmosphärischer Luft vorinkubiert. Diese Verfahrensweise hat sich in, dieser Arbeit vorausgehenden, Voruntersuchungen als sinnvoll erwiesen. Nach erfolgter Vorinkubation wurden unterschiedliche Inkubationsbedingungen eingestellt:

- 1. alternierend aerob/anaerob (ae/anae)
- 2. alternierend aerob/anaerob mit Acetatzugabe in den aeroben Phasen (ae/anae+Ac)
- 3. anaerob, Begasung mit CO₂/N₂-Gemisch (anae begast)
- anaerob (keine Begasung, in den Kernen kam es zu anaeroben Bedingungen und H₂S-Bildung) (<u>anae Original</u>)
- 5. aerob, Begasung mit atmosphärischer Luft (ae)

Die Beprobung der Ansätze mit wechselnden aeroben/anaeroben Bedingungen erfolgten jeweils am Ende der aeroben Phase, da hier eine maximale Poly-P Akkumulation in den Bakterienzellen zu erwarten war. Aus Abwasseruntersuchungen ist bekannt, dass ein Zirkulieren von Belebtschlamm durch aerobe und anaerobe Phasen den EBPR Prozess in Gang setzt (BARNARD, 1975). Entsprechend den Modellen des EBPR-Metabolismus (z.B. MINO et al., 1998) ist die aerobe Phase unter anderem durch den Aufbau des intrazellulären Poly-P Pools gekennzeichnet (s. Kap. I.3.2). In der anaeroben Phase werden kurzkettige Fettsäuren als Kohlenstoff-Quelle genutzt. Acetat als typisches Endprodukt der Fermentation komplexer organischer Verbindungen ist ein solches Substrat für PAO und wurde deshalb in einem der Inkubationsansätze zugefügt.



Abb. 21 Mittelgruppen-Poly-P Gehalte in den verschiedenen Inkubationsansätzen. Graue Balken entsprechen den Feldproben, schwarze Balken den Laborproben. Die Abkürzungen sind im Text erläutert.

Um die Induzierbarkeit der Poly-P Bildung zu zeigen, war es notwendig in allen Proben möglichst niedrige Poly-P Gehalte einzustellen. Daher erfolgte eine achtwöchige aerobe Vorinkubation. Dann startete das eigentliche Inkubationsexperiment mit einer 11 wöchigen Inkubation unter verschiedenen Redoxbedingungen (Abb. 7). Langkettiges Poly-P ist durch eine hohe Zahl an Mittelgruppen gekennzeichnet, deshalb wurden die Quantifizierungsergebnisse der Poly-P Mittelgruppen grafisch dargestellt. (Abb. 21).

Durch Begasung unter alternierenden aeroben/anaeroben Bedingungen konnte eine Poly-P Bildung induziert werden. Da durch die mehrwöchige Inkubation ohne Lichteinfluß ein Wachstum von Algen und Cyanobakterien verhindert wurde, lässt sich die induzierte Poly-P Synthese ausschließlich auf die Anwesenheit heterotropher Sedimentbakterien zurückführen. Zu diesem Ergebnis kommen auch KOSHMANESH et al. (2002) anhand von Inkubationsversuchen mit Moorsediment unter aeroben/anaeroben Bedingungen und Acetatzugabe. Parallel zu einem Anstieg des Poly-P Gehaltes konnte in dieser Studie mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie das Vorhandensein Poly-P akkumulierender Bakterien gezeigt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch eine zusätzliche Anreicherung mit Acetat keine weitere Steigerung der Poly-P Bildung bewirken, verglichen mit den Proben, bei denen auf eine zusätzliche Substratzugabe verzichtet wurde. Möglicherweise wurde das Acetat zum Teil von anderen Bakterien metabolisiert, die nicht zur Poly-P Speicherung fähig sind, wie beispielsweise Glycogen akkumulierende Bakterien (OEHMEN et al., 2006). Diese Bakterien nehmen kurzkettige Fettsäuren unter anaeroben Bedingungen auf, speichern jedoch kein Poly-P unter aeroben Verhältnissen (u. a. FUKASE et al., 1985, CECH & HARTMANN, 1990 und 1993, CROCETTI et al., 2002). Wie eine neuere Studie an Belebtschlämmen zeigt, kann eine alternierende Zugabe von Acetat und Propionat das Wachstum Glycogen akkumulierender Bakterien unterdrücken, *Candidatus* Accumulibacter hingegen stark anreichern (LU et al., 2006).

Insbesondere in der aeroben Probe wurden fast so hohe Werte wie im Freiland erreicht. Es ist daher denkbar, dass PAO insbesondere in der Sedimentschicht günstige Lebens-



bedingungen finden, in der die aerobe in die anaerobe Phase übergeht, unabhängig von den Redoxverhältnissen im Freiwasser. Dies zeigt sich auch im Stechlinsee, der sowohl duch ein ganzjährig sauerstoffgesättigtes Hypolimnion als auch saisonale Rekordwerte im benthischen Poly-P Gehalt (Tab. 11) gekennzeichnet ist. Anhand der aeroben Inkubationsansätze kann gezeigt werden, dass der gemessene Poly-P Gehalt in der Freilandprobe (Juli 2005, Abb. 21) weitestgehend durch das Poly-P Synthese-Potenzial der Sedimentbakterien erklärt werden kann, da durch die Inkubationsbedingungen ein Eintrag von Poly-P durch aussedimentierendes Material, wie z. B. mikrobiell besiedelte Aggregate oder auch Algen, unterbunden wurde.

III.3.1 Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft

III.3.1.1 Mikrobielle Fingerprintprofile

Von ausgewählten Proben des Inkubationsexperimentes wurden mittels DGGE unter Verwendung eines universellen Primerpaares (341f-gc/907r) Fingerprintprofile der angereicherten Bakteriengemeinschaften erstellt.

Abb. 22 DGGE Fingerprintprofile ausgewählter Proben der Inkubationsexperimente (vgl. Abb. 7)

Es zeigt sich in allen Proben eine Vielzahl von Banden, deren saubere Auftrennung im Gel nicht möglich war (Abb. 22). Diese große Bandenzahl weist auf eine sehr hohe bakterielle Diversität in den Proben hin. Die Bandenmuster der verschiedenen Proben waren sich jedoch sehr ähnlich, so dass ähnliche Populationsstrukturen in den verschiedenen Proben vermutet werden können, lediglich die Intensität einzelner Banden unterscheidet sich zwischen den Proben. Dies mit Unterschieden in der Abundanz bestimmter Bakterien zu begründen, wäre aber zu vage, da es sich auch um PCR Artefakte handeln kann. Die PCR kann bei verschiedenen Sedimenten unterschiedlich erfolgreich verlaufen, ohne dass dies im Agarosegel gleich ersichtlich ist. DGGE Gele sind durch die sequenzabhängige Auftrennung wesentlich sensitiver, mögliche PCR Artefakte können Auswirkungen auf Bandenmuster und -intensität haben.

Die sehr große Ähnlichkeit der Bandenmuster wird durch die Ermittlung der SØRENSEN-Indizes untermauert. Der geringste Wert liegt bei 0,784 für den Vergleich zwischen der aerob/anerob+Acetzugabe und dem Originalsediment vom Juli 2005 und weist somit trotzdem auf eine sehr grosse Ähnlichkeit. Der höchste Wert wurde für den Vergleich der Originalsedimente von April und Juli ermittelt. Diese Bandenmuster sind mit einem Sørensen-Index von 0,976, dies entspricht einer Übereinstimmung im Bandenmuster von 97,6 %, nahezu identisch.

Diese ermittelten Werte erscheinen jedoch wenig wahrscheinlich, da eine Inkubationsdauer von 11 Wochen und deutliche Unterschiede in den Inkubationsbedingungen bzw. zu den Feldproben Änderungen in den Biozönosen zur Folge haben müssten. Möglicherweise waren diese Veränderungen in der Populationsstruktur nicht ausgeprägt genug, um mittels DGGE visualisiert zu werden oder es wurde nur die Aktivität bestimmter Bakteriengruppen beeinflusst. Obwohl ein universelles Primerpaar gewählt wurde, könnten zudem während der PCR bestimmte Bakteriensequenzen in allen Proben bevorzugt amplifiziert worden sein. Auch eine Selektion von bestimmten Bakterien während der DNA-Extraktion wäre denkbar. Die nicht-saubere Auftrennung im DGGE Gel wäre eine weitere mögliche Fehlerquelle. Insbesondere in sehr komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften ist das Auflösungsvermögen der DGGE limitiert (MUYZER & SMALLA, 1996), so werden Ökotypen mit einer Abundanz < 1 % nicht erfasst (MURRAY et al., 1996). Der möglicherweise wichtigste Grund ist, dass mittels 16S rDNA basierter DGGE auch inaktive und tote Zellen mit erfasst werden und unterschiedliche Aktivitäten der verschiedenen Bakteriengruppen keine Berücksichtigung finden. Extrazelluläre DNA abgestorbener Mikroorganismen kann, an Tonminerale gebunden, über Monate bis hin zu Jahren im Sediment überdauern (DEMANECHE et al., 2001). Deshalb wurden die Proben zusätzlich mittels CARD-FISH unter Verwendung verschiedener gruppenspezifischer Oligonukleotidsonden untersucht (Kap. III.3.1.2). Mögliche DNA- und PCR-Artefakte werden durch diese Methode vermieden. Außerdem ist eine Quantifizierung der untersuchten Bakteriengruppen möglich.

III.3.1.2 Quantifizierung verschiedener Bakteriengruppen

Der Anteil verschiedener bakterieller (Groß)-gruppen wurde mittels CARD-FISH bestimmt. Hierbei kamen neben den universellen Oligonukleotidsonden EUB338 I-III gruppenspezifische Sonden zum Einsatz. Neben den *Alpha*-, *Beta*- und *Gamma*proteobacteria (Sonden ALF, BET, GAM) wurden die *Actinobacteria* (grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt, Sonde HGC), die *Planctomycetes* (Sonde Pla), sowie das *Cytophaga-Flavobacterium*-Cluster (Sonde CF) quantifiziert. Candidatus *Accumulibacter* wurde ebenfalls



detektiert (Sonde PAO846).

Die Hybridisierungseffizienz (relativer Anteil der EUB338 I-III-hybridisierbaren Zellen an der durch DAPI-Färbung bestimmten Gesamtzellzahl) lag zwischen 30-50%. Diese geringe Effizienz könnte sich durch einen hohen Anteil inaktiver und toter Zellen erklären, die zwar mit DAPI angefärbt werden (KEPNER & PRATT, 1994), aber nicht durch die Oligonukleotidsonden, deren Zielmolekül die rRNA in metabolisch aktiven Zellen ist (PERNTHALER et al., 2002), erfasst werden. Auch die große Ähnlichkeit in den DGGE-Fingerprintprofilen lässt auf einen hohen Anteil toter Zellen schließen (Abb. 22). Eine weitere Fehlerquelle ist die Spezifität der eingesetzten Oligonukleotidsonden. Die verwendeten EUBI-III Oligonukleotidsonden erfassen zwar eine große Zahl der *Eubacteria* (DAIMS et al., 1999), aber nicht alle (LOY et al., 2007).

Möglicherweise fanden auch Vertreter der *Archaea* in den Inkubationsexperimenten geeignete Lebensbedingungen und konkurrierten in den anaeroben Sedimentschichten mit den *Eubacteria* um die verfügbaren Substrate. Eine Zunahme der *Archaea* Populationen könnte die geringe Hybridisierungseffizienz zusätzlich erklären.

Abb. 23 Absolute Werte der Gesamtzellzahl und der *Eubacteria* in den Feldproben und Inkubationsansätzen des Scharmützelsee-Sedimentes. (Abkürzungen siehe Abb. 7)



Die höchsten Werte der EUB338 I-III-hybridisierbaren Zellen finden sich im aerob/anaerob begasten Ansatz unter Acetat-Zugabe (ae/anae+Ac) (2 x 10¹⁰ Zellen pro Gramm Trocken-

masse) sowie in den Feldproben zu Beginn (Schm Apr.05; 1,5 x 10^{10} Zellen g TM⁻¹) und am Ende des Experimentes (Schm Juli 05; 1,8 x 10^{10} Zellen g TM⁻¹) (Abb. 23).

Acetat als leicht verfügbares Substrat fördert das bakterielle Wachstum als zentrales Intermediat im Kohlenstoff-Stoffwechsel. Ferner ist es das bedeutenste Zwischenprodukt beim anaeroben Abbau der Algenbiomasse (SCHWARZ, 2006). Daher ist auch in den Feldproben an der Sedimentoberfläche eine gute Substratverfügbarkeit durch aussinkendes Material zu erwarten. Das wiederum begünstigt das mikrobielle Wachstum. In allen anderen Ansätzen finden sich bis um den Faktor 10 niedrigere Zellzahlen, die sich insbesondere durch ein mangelndes Substratangebot während der mehrwöchigen Inkubation begründen lassen. Erstaunlicherweise finden sich in dem aeroben Ansatz, der die höchsten Poly-P Werte der inkubierten Proben aufwies, die niedrigsten Zellzahlen (Abb. 23). Der hohe Poly-P Gehalt kann sich somit nur durch eine gesteigerte Aktivität der Bakterien erklären.

Deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen finden sich auch auf Gruppenniveau.

Abb. 24 Relative Anteile der verschiedenen Bakteriengruppen an den *Eubacteria* in den Freilandproben und Inkubationsansätzen

Abb. 24 zeigt deutliche Unterschiede zwischen den bakteriellen Lebensgemeinschaften in den verschiedenen Ansätzen. Während die Bakteriengruppen der Feldprobe zu Beginn des

Inkubationsexperimentes zu 97 % durch die eingesetzten gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden erfasst werden können, zeigt sich in allen anderen Ansätzen eine zum Teil sehr grosse "black-box". Beispielsweise können 68 % der EUB-hybridisierbaren Zellen im anaerob/aeroben Ansatz nicht durch die eingesetzten Oligonukleotidsonden zugeordnet werden. Die Verschiebungen innerhalb der Bakteriengemeinschaften können insbesondere in den geänderten Wachstumsbedingungen begründet sein. Neben Unterschieden finden sich aber auch Ähnlichkeiten. So sind die *Gammaproteobacteria*, und das *Cytophaga-Flavobacteria*-Cluster die dominierenden Gruppen, gefolgt von den *Betaproteobacteria* und den *Planctomycetes*. Ausnahme ist die anaerobe, nicht beeinflusste Probe, bei der die *Betaproeobacteria* mit einem Anteil von ca. 30 % der EUB-hybridisierbaren Zellen dominieren. Die Gruppe der *Alphaproteobacteria* hat in allen Proben einen Anteil von unter 8 % und ist somit nicht dominierend innerhalb der Bakteriengemeinschaften.

In ihrer relativen Zusammensetzung zeigen die anaerob begaste Probe, die anaerob/aerob wechselnd + Acetat-Probe und die Feldprobe vom Inkubationsende sehr große Übereinstimmungen, wenngleich die absoluten Werte dieser Proben sich deutlich voneinander unterscheiden (Abb. 24). Da zum Zeitpunkt des Inkubationsendes im Scharmützelsee anoxische Verhältnisse auftraten, könnte hier eine mögliche Ursache für die ähnliche Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften zu finden sein.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Induzierung der Poly-P Bildung nicht mit einer Dominanz einer bestimmten bakteriellen Großgruppe gekoppelt ist. Dies untermauert die Hypothese, dass in den untersuchten Gewässersedimenten eine Vielzahl verschiedener Bakterien zur Poly-P Speicherung befähigt sind.

Auch Candidatus *Accumulibacter* spielt in den untersuchten Proben keine entscheidende Rolle. Der Anteil der PAO846 hybridisierbaren Zellen liegt in allen Proben unter 0,4 %. Ein Einfluß von Candidatus *Accumulibacter* ist somit im Inkubationsexperiment nicht nachweisbar, auch eine Wachstumsförderung dieser Bakterien durch Optimierung ihrer Lebensbedingungen erscheint nicht möglich. Denkbar wäre eine Konkurrenz mit Glycogen akkumulierenden Organismen, die zwar Acetat aufnehmen, aber kein Poly-P speichern (OEHMEN et al., 2006).

Der Anteil der HGC-hybridisierbaren Zellen liegt stets unter 5 % (Abb. 24). Mittels HGC69a Sonde können insbesondere *Actinobacteria* detektiert werden. Einige Vertreter der *Actinobacteria*, insbesondere der Gattung *Tetrasphaera*, sind favourisierte PAOs in verschiedenen Belebtschlämmen (KONG et al., 2005). In den durchgeführten Inkubationsexperimenten spielen auch diese PAO keine nennenswerte Rolle. Ähnliche Versuchansätze mit einer derartigen Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft lassen sich bisher in der Literatur nicht finden, ein Datenvergleich ist daher nicht möglich.

III.4 Zwischen-Fazit: Mikrobielle Populationen in Poly-P reichen Gewässersedimenten

Um PAO in Gewässersedimenten zu detektieren, war es naheliegend, Sedimente auszuwählen, die einen hohen Poly-P Gehalt aufweisen. Zu diesem Zweck wurden Gewässer mit unterschiedlicher Morphometrie und Hydrologie beprobt. Der Scharmützel-, der Stechlin- und der Arendsee zeigten sich als geeignete Studienobjekte (Kap. III.1.1). Die mikrobielle Bakteriengemeinschaft dieser Sedimente wurde daraufhin intensiv untersucht. Zunächst wurde mittels Fingerprint Technik die mikrobielle Diversität in den Proben auf unterschiedlichem phylogenetischem Niveau visualisiert. In allen Proben war eine hohe Bandenzahl erkennbar, die auf eine ausgeprägte mikrobielle Diversität schließen lässt (Kap. III.1.5.1). Die Interpretation solcher Bandenmuster unterliegt bestimmten Fehlerquellen. Eine Bande auf dem DGGE-Gel kann beispielsweise verschiedene Bakterienspezies repräsentieren, die identische partielle 16S rDNA Sequenzen aufweisen (VALLAEYS et al., 1997). Andererseits kann eine Bakterienspezies multiple rRNA Operons besitzen, wodurch mehrere Banden auf dem DGGE-Gel erscheinen (NÜBEL et al., 1996; RAINEY et al., 1996; CILIA et al., 1996).

Die Verwendung von Primern spezifisch für die PAO-Vertreter Candidatus *Accumulibacter* ergab das Vorhandensein dieser Organismen, nicht nur in den Poly-P-reichen Sedimenten, sondern in allen beprobten Gewässersedimenten (Abb. 17). In aktuellen Studien konnte Candidatus *Accumulibacter* in Salz- und Süßwasser und in den assoziierten Sedimenten nachgewiesen werden und vereinzelt ebenfalls in Bodenproben (KUNIN et al., 2008, PETERSON et al., 2008).

In Gewässersedimenten finden sich "Mikro-Nischen", die ein fluktuierendes aerobes/ anaerobes Milieu aufweisen und mehr oder weniger ausgeprägt sind. Gekoppelt mit einer guten Substratverfügbarkeit durch aussedimentierendes Material sind insbesondere an der Sedimentoberfläche ähnliche Bedingungen vorstellbar wie in Belebtschlämmen. Potentielle PAO finden hier optimale Lebensbedingungen, wenngleich in der Gesamtheit der Sedimentfläche diese Mikro-Nischen möglicherweise nur einen kleinen Anteil bilden. Auch in der Rhizosphäre verschiedenster Makrophyten (LASKOV et al., 2006), sowie in der Umgebung von Makrozoobenthos (z.B. Tubificiden-Röhren, LEWANDOWSKI et al. 2005) wären geeignete Habitate für PAO zu finden. Da für alle untersuchten Gewässersedimente solche Nischen vorstellbar sind, erklärt sich das ubiquitäre Vorkommen von Candidatus *Accumulibacter*.

Um die mikrobiellen Lebensgemeinschaften der ausgewählten Gewässersedimente genauer zu erfassen, wurde für die Proben vom Juni 2004 für jeden der drei beprobten Seen jeweils eine 16S rDNA Klonbibliothek erstellt (Kap. III.1.5.3). Die Auswertung der Sequenzen zeigte eine große phylogenetische Diversität und untermauerte damit die Befunde der Fingerprintprofile. Jedoch konnten keine typischen PAO detektiert werden. Die ausgewertete Anzahl an Klonen reicht allerdings bei weitem nicht aus, um genaue Aussagen über die mikrobielle Diversität – insbesondere der PAO - zu treffen, auch ist eine quantitative Auswertung der Daten nur bedingt möglich. Zudem sind PCR basierte Methoden stets mit Artefakten behaftet, die in einer möglichen selektiven DNA Extraktion und PCR Amplifikation beruhen (VON WINTZINGERODE et al., 1997). Durch die extreme Vervielfältigung der template DNA können sich kleine Artefakte letztendlich in der Auswertung der Sequenzen potenzieren. Dennoch wird offensichtlich, dass in den untersuchten Proben keine bestimmten Bakteriengattungen dominieren.

Der nächste Schritt zur Detektion und Charakterisierung von potentiellen PAO in Gewässersedimenten musste demzufolge die Quantifizierung verschiedener Bakteriengruppen, insbesondere aber von Candidatus Accumulibacter sein, denn die zum Teil hohen Poly-P Gehalte in den Sedimenten können nur mit einem hohen Anteil von Poly-P Speicherern erklärt werden. Inwieweit hier bestimmte Bakterien eine dominierende Rolle spielen, sollte durch den Einsatz von unterschiedlichen Oligonukleotidsonden geklärt werden (Kap. III.1.5.2). Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methode liegt in der Vermeidung PCR-basierter Artefakte. Da Candidatus Accumulibacter mittels Fingerprintprofilen nachgewiesen wurde, kamen die spezifischen Oligonukleotid-Sonden PAO462 und PAO846 zur Quantifizierung dieser PAOs in den Gewässersedimenten zum Einsatz (CROCETTI et al., 2000). Ein signifikanter Anteil von Candidatus Accumulibacter wäre für die Gewässersedimente vorstellbar, da sowohl hohe Poly-P Gehalte ermittelt wurden als auch DNA von Candidatus Accumulibacter ubiquitär nachgewiesen werden konnte. Doch die Quantifizierung mittels CARD-FISH ergab in allen untersuchten Proben einen Anteil dieser Mikroorganismen an der bakteriellen Gemeinschaft von weniger als einem Prozent. Somit kann nur ein Bruchteil des Poly-P in den Sedimenten durch die metabolische Aktivität dieser Bakterien erklärt werden. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch für den Anteil von Candidatus Accumulibacter an der mikrobiellen Gemeinschaft in kommunalen Kläranlagen (BEER et al., 2006). WONG et al. (2005) konnten in japanischen kommunalen Kläranlagen zwar einen Anteil von Candidatus Accumulibacter bis zu 31% nachweisen, allerdings zeigte ein Großteil dieser Zellen keine Poly-P Akkumulation. Die Ursache könnte in den komplexen Lebensbedingungen liegen, die sich in Gewässern oder großen Kläranlagen einstellen, die nicht umfassend im Labormaßstab simuliert werden können.

Weitere in den Belebtschlämmen mit EBPR favourisierte PAO sind Vertreter der Gattung *Tetrasphaera*, die in das Phylum der *Actinobacteria* einzuordnen sind (KONG et al., 2005; BEER et al., 2006). Neben der Gattung *Tetrasphaera* (MASZENAN et al., 2000; HANADA et al., 2002) wurde für weitere Vertreter der *Actinobacteria* die Fähigkeit zur Poly-P Speicherung nachgewiesen, z.B. *Microlunatus phosphovorus* (SANTOS et al., 1999). Da in den drei

untersuchten Gewässersedimenten der Anteil der *Actinobacteria* zwischen 2-8 % bezogen auf die *Eubacteria* lag, scheinen diese PAO ebenfalls keine entscheidende Rolle in den Sedimenten zu spielen. Eine Quantifizierung auf Gattungsniveau erschien angesichts der geringen Abundanz der *Actinobacteria* nicht notwendig.

Bei der Untersuchung der drei ausgewählten Gewässer wurde der Stechlinsee mehrmals beprobt (Kap. III.2). Der oligotrophe Stechlinsee ist durch sporadisch auftretende hohe Poly-P Gehalte in der obersten Sedimentschicht charakterisiert. Die Quantifizierung mittels CARD FISH zeigte einen hohen Anteil der *Betaproteobacteria*. Wie im Seenvergleich lag der Anteil von Candidatus *Accumulibacter* unter einem Prozent. Zugleich konnte während der Sommermonate ein Großteil der mikrobiellen Gemeinschaft nicht durch die eingesetzten Großgruppen-spezifischen Oligonukleotidsonden detektiert werden. Im Jahresgang zeigen sich also wieder ähnliche Tendenzen, wie in den Ergebnissen des Gewässervergleiches. Keiner der in den Belebtschlämmen favorisierten PAO scheint, eine wichtige Rolle im Sediment zu spielen. Vielmehr deutet sich auch hier wieder eine große mikrobielle Diversität an. Inwieweit das detektierte Poly-P insbesondere aus heterotrophen Mikroorganismen stammt, oder ob und gegebenenfalls zu welchem Anteil es auch aus phototrophen Organismen, wie Cyanobakterien und Algen stammt, konnte in den bisherigen Untersuchungen nicht geklärt werden.

Um das Potenzial der benthischen heterotrophen Mikroorganismen in Hinblick auf die Poly-P Synthese zu überprüfen, wurden Inkubationsexperimente mit Sedimentkernen des Scharmützelsees durchgeführt (Kap. III.3). Durch das Versuchsdesign konnte 1.) ein Einfluß autotropher Organismen auf die Poly-P Bildung ausgeschlossen werden, da die mehrwöchige Inkubation unter Lichtausschluß durchgeführt wurde, und 2). Poly-P konnte nicht durch sedimentierendes Material in das Sediment eingetragen werden, da ausschließlich Sedimentkerne inkubiert wurden. Ein Teil der Kerne wurde alternierend aerob/anaerob begast, ein Ansatz wurde zusätzlich mit Acetat versetzt. Somit wurde ein Milieu geschaffen, das möglichst optimal auf die Lebensbedingungen der PAO ausgerichtet ist, so dass das Potenzial der Population zur Poly-P Akkumulation voll ausgeschöpft werden kann. Wie erwartet zeigte sich in diesen Proben ein Anstieg des Poly-P Gehaltes. Allerdings hatte die Zugabe von Acetat keinen Effekt auf die Poly-P Akkumulation. Möglicherweise wurde hier das Wachstum anderer Bakteriengruppen stimuliert, die nicht zur Poly-P Akkumulation befähigt sind, z. B. Glykogen-akkumulierende Organismen (u.a. CROCETTI et al., 2002; ZENG et al., 2003, OEHMEN et al., 2006). Im anaeroben Milieu können auch Archaea Populationen eine Rolle spielen, die nicht durch die eingesetzten Oligonukleotidsonden erfasst wurden. Die acetoklastische Spaltung von Acetat wurde beispielsweise für Methanosaeta spp. beschrieben (SCHWARZ et al., 2007). Ferner erreichten die Laborproben nicht ganz den Poly-P Gehalt, der sich in der Freilandprobe am Versuchsende eingestellt hatte. Möglicherweise konnten in den Inkubationsexperimenten nicht die notwendigen physiologischen Rahmenbedingungen simuliert werden, um das Poly-P Bildungspotential der Bakteriengemeinschaft komplett auszuschöpfen. Der wichtigste Grund könnte jedoch im Eintrag von organisch-P und Poly-P in das Sediment der Freilandprobe durch sedimentierendes Material liegen. Dieser Punkt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden, da die Sedimentfallen vor allem im Stechlinsee nicht den erhofften Materialertrag brachten. Da langkettiges Poly-P in den Sedimentfallen von Scharmützel- und Arendsee detektiert werden konnte, ist von einem zusätzlichen Eintrag von Poly-P in das Sediment durch Sedimentationsprozesse auszugehen (Kap. III.1.3). Immerhin zeigt der Vergleich der Inkubationsproben mit den Freilandproben, dass der Großteil des Poly-P im Sediment innerhalb der benthischen Lebensgemeinschaft ohne externen Eintrag durch Sedimentationsprozesse gebildet werden kann. Das Ergebnis der Fingerprint Technik ist erstaunlich, da kaum Unter-schiede zwischen den mikrobiellen Populationen in den verschiedenen Proben zu finden waren (Abb. 22). Angesichts der unterschiedlich eingestellten Milieus und der relativ langen Inkubationsdauer wären deutliche Unterschiede in den Bandenmustern zu erwarten gewesen. Die wahrscheinlichste Ursache liegt in methodischen Artefakten basierend auf den DNA-basierten Techniken. Denn im Gegensatz zur DGGE zeigen sich durch Anwendung der CARD-FISH deutliche Unterschiede in der Abundanz der detektierten Bakteriengroßgruppen zwischen den verschiedenen Proben. Doch wie schon in den Untersuchungen der Feld-proben im Gewässervergleich, sowie im jahreszeitlichen Verlauf dominiert keine der untersuchten mikrobiellen Gruppen. Auch mit dem Vorkommen der Actinobacteria (Anteil < 5 % bezogen auf die Eubacteria) und Candidatus Accumulibacter (Anteil < 1% bezogen auf die Eubacteria) kann die Poly-P Synthese durch diese Gruppen nicht erklärt werden.

Es bleibt somit festzuhalten, dass der Einsatz von DGGE, 16S rDNA Klonbibliotheken und CARD-FISH nicht den erhofften Erfolg brachte. Die für die Poly-P Akkumulation verantwortlichen Mikroorganismen konnten nicht phylogenetisch identifiziert werden, wenngleich mittels DAPI Färbung Bakterien mit Poly-P Granula in den untersuchten Sedimenten detektiert werden konnten. In der Literatur finden sich vereinzelt Studien zur Detektion Poly-P Granula. von Sedimentbakterien mit Insbesondere durch Transmissionselektronenmikroskopie gekoppelt mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (TEM-EDX) konnten intrazelluläre Poly-P Granula nachgewiesen werden (UHLMANN & BAUER, 1988; HUPFER et al., 1995). Die Quantifizierung und phylogenetische Einordnung dieser Bakterien ist mittels TEM-EDX jedoch nicht möglich.

Die bisherige Auswertung der vorliegenden Arbeit legt nahe, dass nicht bestimmte bakterielle Vertreter (wie in vielen Studien an Belebtschlämmen mit EBPR) für die Poly-P Synthese verantwortlich sind, sondern dass eine Vielzahl von bentischen Mikroorganismen Poly-P akkumulieren. Es musste daher eine Möglichkeit gefunden werden, diese Bakterien gezielt aus den Sedimentproben zu separieren und phylogenetisch zu charakterisieren. Die Methode der Wahl war die Laser-Mikrodissektion, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig für umweltmikrobiologische Proben angewandt wurde (GLOESS et al., 2008).

III.5 Detektion und Charakterisierung von PAOs mittels Laser-Mikrodissektion

Insbesondere bei der Untersuchung von Mischpopulationen in Umweltproben ist es sehr schwierig, Bakterien aus *in situ* Proben phylogenetisch einzuordnen.

Für die vorliegende Arbeit erschien daher die Etablierung der Laser-Mikrodissektion für Umweltproben, insbesondere Sediment- und Klärschlammproben notwendig, da sie eine gezielte Selektion und Identifizierung der Poly-P Speicherer aus *in situ* Proben erlaubt. Die selektierten Zellen können molekularbiologisch bearbeitet und phylogenetisch charakterisiert werden (Abb. 25). Theoretisch können an den selektierten Mikroorganismen auch Kultivierungsversuche durchgeführt werden. Diese Möglichkeiten bietet keine der anderen bisher in den Belebtschlämmen bzw. Gewässersedimenten zur Detektion von PAO eingesetzten molekularbiologischen Methoden.



Abb. 25 Arbeitsschema zur Detektion unbekannter Poly-P-Speicherer aus Umweltproben mittels Laser-Mikrodissektion und deren Identifikation durch Sequenzierung

III.5.1 Nachweis Poly-P speichernder Mikroorganismen durch DAPI-Färbung

Zum Nachweis von Poly-P in den Sedimentbakterien wurden die ausgewählten Proben mit einer konzentrierten DAPI-Lösung gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop und dem entsprechenden Filter erscheinen Bakterienzellen blau, durch Interkalieren von DAPI mit DNA (PORTER & FEIG, 1980). Vorhandenes Poly-P leuchtet intensiv gelb (STREICHAN et al., 1990, KAWAHARASAKI et al., 1999, LIU et al., 2001, SERAFIM et al., 2002). Für marine Gewässersedimente wurde das Auftreten sogenannter "unidentifizierter gelber Objekte" (UYO, unidentified yellow objects) beschrieben. Die Fluoreszenz variierte von schwach bis stark gelb und auch die Größe und Form war sehr divers (EPSTEIN & ROSSEL, 1995). Ob es sich dabei teilweise um Poly-P speichernde Bakterien handelte, wurde in der Studie jedoch nicht geklärt. Den direkten Nachweis erbrachten LIU et al. (2001) an Belebtschlämmen. Mit DAPI gefärbte und intensiv gelb fluoreszierende Bakterien zeigten im TEM-EDX Poly-P Granula.

Insbesondere in den Belebtschlammproben konnten viele leuchtend gelbe Zell-Cluster beobachtet werden (Abb. 26). Dies war zu erwarten, da die Anlagen für die Etablierung der PAO optimiert sind. In den Gewässern konnten ebenfalls verschiedene Poly-P positive Zellen detektiert werden. Diese lagen aber häufig als Einzelzellen verteilt auf dem Filter vor, ihr Anteil war deutlich geringer als im Belebtschlamm (Abb. 26).

Poly-P lässt sich auch durch Neisser-Färbung visualisieren (JENKINS et al., 1993). Neissernegative Bakterien erscheinen im Hellfeld gelblich bis hellbraun, Neisser-positive Zellen enthalten dunkle Granula (Poly-P-Granula).

In den Gewässersedimenten brachte der Einsatz der Neisser-Färbung kein Ergebnis, möglicherweise aufgrund der geringen Größe der Sedimentbakterien.



Abb. 26 DAPI Färbungen von Umweltproben. A und B: Belebtschlamm aus der Kläranlage Wassmannsdorf; C: Stechlinsee; D: Fuchskuhle, Nordost-Becken; E und F: Scharmützelsee; G und H: Inkubationsexperiment, aerob/anaerob+Acetat

Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung der Laser-Mikrodissektion ist die mikroskopische Differenzierung der interessierenden Bakterien im Gegensatz zu den anderen Mikroorganismen in der zu bearbeitenden Probe. Die intensive Gelbfärbung in den Zellen war das Auswahlkriterium für PAO (siehe Kap. III.5.1). Die entsprechenden Zellen wurden im mikroskopischen Bild am Computer durch eine spezielle Software markiert, mittels pulsierendem UV Laser ausgeschnitten und in ein entsprechendes Reaktionsgefäß katapultiert (Abb. 27). Da das Schneiden und Katapultieren ein photochemischer Prozeß ohne Hitzeentwicklung ist, bleiben Biomoleküle, wie z. B. DNA, unbeschädigt. Auch die Umgebung, in den vorliegenden Experimenten der Polycarbonatfilter mit der abfiltrierten Probe, bleibt intakt. Die Laser-Mikrodissektion ist ferner eine "non-contact" Methode, da nur fokussiertes Licht verwendet wird (laser pressur catapulting Technologie, LPC) (BURGE-MEISTER, 2005). Dadurch kann, bei sauberer Arbeitsweise und Kontrollproben, Kontaminationsfreiheit gewährleistet werden. Zusammenfassend zeigt sich, dass diese Methode alle Voraussetzungen erfüllt, um Poly-P akkumulierende Bakterien aus Gewässersedimenten und Belebtschlämmen zu separieren und phylogenetisch zu klassifizieren.

Folgende Proben wurden erfolgreich molekularbiologisch bearbeitet und ausgewertet:

- I. Belebtschlamm, Kläranlage Wassmannsdorf, Januar 2006
- II. Sediment aus dem Stechlinsee, Juni 2004

Da aus den Belebtschlämmen eine wesentlich größere Anzahl an Poly-P-speichernden Zellen ausgeschnitten werden konnte, war auch die DNA Extraktion erfolgreicher. Deshalb konnten sowohl mit den Primerpaaren 8f/907r als auch 341f/907r erfolgreiche PCR-Reaktionen durchgeführt werden. Die extrahierte DNA aus dem Stechlinsee konnte nur mit dem Primerpaar 341f/907r amplifiziert werden. Zwischen beiden im Belebtschlamm eingesetzten Primerpaaren gab es Unterschiede in der phylogenetischen Auswertung der klonierten und sequenzierten 16S rRNA Gensequenzen. Vertreter der Alphaproteobacteria, der Actinobacteria und der Firmicutes wurden mit beiden Primerpaaren detektiert, mittels Primerpaar 8f/907r konnten außerdem Vertreter der Betaproteobacteria und der Bacteroidetes identifiziert werden. Diese Differenzen resultieren möglicherweise aus PCR-Artefakten durch Unterschiede in der Primerselektivität (HICKS et al., 1992). Weitere Fehlerquellen sind 1.) die undefinierte Effizienz des entwickelten DNA Extraktionsprotokolles und 2.) die geringe Menge an erhaltenem PCR-Produkt, insbesondere für das Stechlinsee-Sediment. Hier mußte ein Kompomiß gefunden werden, um einerseits ausreichend PCR-Produkt für eine anschließende Klonierung zu erhalten und andererseits die Zyklenzahl in der PCR so gering wie möglich zu halten.



Abb. 27 Selektion und Separation Poly-P akkumulierender Bakterien aus den Proben. A) Auswahl Poly-P positiver Zellen, B) Justieren des Lasers, C) Ausschneiden der markierten Zellen auf dem Filter, D) Kontrolle der ausgeschnittenen Filterstücke mit den Poly-P positiven Zellen im Deckel des Reaktionsgefäßes

Die Auswertung der 16S rRNA Gensequenzen zeigte, dass sowohl aus dem Stechlinsee-Sediment als auch aus dem Belebtschlamm insbesondere Mitglieder der Alphaproteobacteria und der Actinobacteria isoliert wurden, wobei im Stechlinsee-Sediment die größere Diversität an PAO zu finden war (Tab. 12). Dies entspricht auch der Tatsache, dass das Sediment durch seine vielfältigen Mikronischen und -zonen eine hohe mikrobielle Diversität ermöglicht (TANKERE et al., 2002). Aus beiden Habitaten konnte eine relativ große Zahl an Propionibacterium-verwandten Sequenzen gefunden werden. Einige Vertreter der Gattung Propionibacterium sind zur Poly-P-Speicherung befähigt (KJELSTAD et al., 1991), ebenso wie Vertreter der Gattung Paracoccus (BARAK & VAN RIJN, 2000), die in der Belebtschlamm-16S rDNA Klonbibliothek dominierten. Andere separierte Bakterien, bei denen Poly-P Speicherung in der Literatur beschrieben ist, gehören zu den Gattungen Micrococcus, Staphyloccus Rhodococcus. Corynebacterium und (Belebtschlamm-16S rDNA Klonbibliothek) sowie Pseu-domonas (Stechlinseesediment-16S rDNA Klonbibliothek). Ferner wurden in der Stechlinsee-16S rDNA Klonbibliothek Bakteriengattungen identifiziert,

deren Fähigkeit zur Poly-P-Speicherung bisher noch nicht bekannt war (Gattungen *Hyphomicrobium* und *Microbacterium*) (Tab. 12).

Keiner der bisher favorisierten PAO aus den Belebtschlämmen konnte aus den untersuchten Proben separiert werden. Allerdings wurden pro Probe nur ca. hundert (Stechlinsee) bis mehrere hundert (Klärschlamm) Poly-P positive Zellen ausgeschnitten. Dies ist keinesfalls ausreichend, um möglichst viele Poly-P Speicherer zu identifizieren. Es stellt lediglich einen Einblick in die Diversität der Poly-P Speicherer in den Proben dar. Die bisherigen Befunde durch den Einsatz von DGGE, 16S rDNA Klonbibliotheken und FISH werden aber durch die Ergebnisse der Mikrodissektion untermauert. In Sedimenten scheint die Poly-P Speicherung unter Bakterien weit verbreitet zu sein, ferner gibt es nicht ein oder mehrere dominierende PAO, wie es aus den bisherigen Belebtschlammuntersuchungen bekannt sind.

Tab. 12 Phylogenetische Zuordnung und jeweilige Anzahl der analysierten Klone (Primerpaar 341f/907r) aus Klärschlamm und Stechlinsee-Sediment. Für Vertreter von Gattungen, in Fettschrift dargestellt, wurde Poly-P Speicherung in der Literatur beschrieben. Vertreter von Gattungen, mit grauem Hintergrung dargestellt, wurden bereits in Klärschlamm gefunden.

Klärschlamm	Anzahl	Stechlinsee-Sediment	Anzahl
Alphaproteobacteria	29	Alphaproteobacteria	17
Paracoccus (Barak & van Rijn, 2000)	29	Hyphomicrobium (Layton et al., 2000)	4
		Novosphingobium (Fujii et al., 2002)	2
		undefinierte Alphaproteobacteria	11
		Betaproteobacteria	1
		undefinierte Betaproteobacteria	1
		Gammaproteobacteria	6
		Pseudomonas (z.B. Sidat et al., 1999)	5
		undefinierte Gammaproteobacteria	1
Actinobacteria	30	Actinobacteria	43
Micrococcus (Friedberg & Avidad, 1968)			
Melasniemi et al., 1998)	17	Microbacterium (Hollender et al., 2002)	11
Propionibacterium (Kjeldstad et al., 1991)	8	Propionibacterium (Kjeldstad et al., 1991)	28
Propionicimonas	1	Streptomyces	1
Corynebacterium (Klauth et al., 2006)	2	Clavibacter	1
Rhodococcus (Stratton et al., 2002; Alvarez			
et al., 2004)	1	Cellulomonas	1
undefinierte Actinobacteria	1	undefinierte Actinobacteria	1
Firmicutes	12	Firmicutes	3
Clostridium (Dudley et al., 1980)	6	Thermicanus	3
Staphylococcus (Melasniemi et al., 1998)	6		
		Bacteroidetes	10
		Chryseobacterium (Kämpfer et al., 2003)	2
		undefinierte Bacteroidetes	8
Unidentifiziert	1	Unidentifiziert	4

IV GESAMTBETRACHTUNG

Sedimente stellen einen sehr komplexen Lebensraum dar. Insbesondere die Sediment-Wasser-Grenze ist die biologisch aktivste Zone in Gewässern und gekennzeichnet durch eine Vielzahl unterschiedlicher Umsetzungsprozesse. Die Kopplung biologischer und geochemischer Prozesse steht inzwischen außer Frage, wenngleich das Verständnis und die Untersuchung der verschiedenen gekoppelten Kreisläufe eine große Herausforderung darstellt. Im Augenmerk vieler Studien liegt insbesondere der P-Kreislauf, da P in vielen Gewässern als wichtiger produktionsbegrenzender Faktor anzusehen ist. Ein Weg ist die Umsetzung von P zu Poly-P. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Poly-P in Gewässersedimenten einen beträchtlichen Anteil des Gesamt-P-Pools darstellen kann (s. Kap. 1.2). Die zugrundeliegenden Mechanismen, insbesondere die Frage nach den dafür verantwortlichen Organismen ist noch völlig unklar. Insbesondere Bakterien, die mit der erhöhten biologischen P-Eliminierung aus Abwasser in Verbindung gebracht werden, könnten auch in Gewässersedimenten eine wichtige Rolle spielen. Die Klärung dieser Fragen war Zielstellung der vorliegenden Arbeit. Die eingangs aufgeführten Hypothesen werden hier noch einmal aufgeführt und in Kontext zu den erzielten Ergebnissen gebracht.

a. Unterschiede in limnologischen Parametern verschiedener Gewässern beeinflussen den mikrobiellen Poly-P Pool im Sediment.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Beprobung unterschiedlicher Seesedimente (Kap. III.1.1). Dabei wurden Poly-P Gehalte zwischen 0 und 21 % bezogen auf TP ermittelt. Die Gewässer mit den höchsten Poly-P Gehalten sind sowohl oligotroph (Stechlinsee) als auch mesotroph (Arendsee, Schamützelsee). Auch die chemischen Parameter, wie Sauerstoffverfügbarkeit oder organische Substanz lassen keine Rückschlüsse auf eine Koinzidenz mit dem Poly-P Gehalt im Sediment zu. Während in der Literatur HUPFER et al. (2004) zu einem ähnlichen Ergebnis kommen, lässt sich in den Untersuchungen von AHLGREN (2006 b) durchaus eine starke Assoziation des Poly-P Gehaltes mit dem trophischen Status und der Wassergualität erkennen. In der letzteren Arbeit wurden jedoch im Vergleich zu den anderen Arbeiten relativ wenige Seen beprobt. Insbesondere der oligotrophe Stechlinsee, dessen planktische Primärproduktion P-limitiert ist (KOSCHEL, 1976), zeigt Rekordwerte im benthischen Poly-P Gehalt von bis zu 21 %. Durch die geringe Stoffproduktion weist das Hypolimnion ganzjährig eine Sauerstoffsättigung von > 60 % auf. Dies könnte das Wachstum von PAO an der Sedimentoberfläche begünstigen, insbesondere in den Grenzschichten zwischen aeroben und anaeroben Redoxbedingungen. Auch aussedimentierendes Material könnte zum benthischen Poly-P Pool beitragen. Beprobungen im saisonalen Verlauf zeigten aber auch starke Schwankungen im Poly-P Gehalt des Stechlinsee-Sedimentes innerhalb weniger Tage (Kap. III.2.1). Poly-P gehört zu den labilen biogenen Verbindungen. Sie können schnellen Transformationsprozessen unterliegen (HUPFER et al., 1995). Auch die Beprobung könnte eine Rolle spielen. Bilden sich scharfe Gradienten in den obersten Sedimentschichten, so können bereits 1-2 mm Unterschied in den beprobten Sedimentschichten einen signifikanten Einfluß auf den ermittelten Poly-P Gehalt zeigen.

b. Voraussetzung für die mikrobielle Poly-P Speicherung sind alternierende Milieubedingungen.

Wie bereits unter Hypothese a. beschrieben, konnten unter Freilandbedingungen keine Korrelationen zwischen Sauerstoffsättigung im Tiefenwasser und Poly-P Gehalt an der Sedimentoberfläche festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu konnte unter Laborbedingungen die Poly-P Synthese durch alternierende Redoxbedingungen induziert werden (Kap. III.3). Maximale Poly-P Gehalte wurden in den aeroben Ansätzen ermittelt. Durch die achtwöchige Vorinkubation war diese Bakteriengemeinschaft der keiner externen Störung durch Anderung Inkubationsbedingungen ausgesetzt, im Gegensatz zu den Ansätzen, bei denen andere Redoxbedingungen eingestellt wurden. Möglicherweise spielen in den inkubierten Sedimenten auch andere Bakteriengruppen eine wichtige Rolle, die nicht auf alternierende Redoxbedingungen angewiesen sind. Anaerobie hingegen führte zum Abbau bzw. zur geringeren Bildung von Poly-P (Kap. III.3), dies entspricht den Erwartungen gemäß dem biochemischen Modell der Poly-P Akkumulation (Kap. I.3.2).

c. In Gewässersedimenten lassen sich Poly-P speichernde Bakterien nachweisen, wie sie aus Kläranlagen mit biologischer P-Elimination bekannt sind. In Sedimenten mit hohen Poly-P-Gehalten treten diese verstärkt in Erscheinung.

Die Anwendung des bisherigen Kenntnisstandes über Poly-P speichernde Bakterien aus den Belebtschlämmen auf Gewässersedimente brachte nicht den erhofften Erfolg. Die Bakterien, die mit der erhöhten biologischen P-Eliminierung in Belebtschlämmen in Verbindung gebracht werden (Candidatus *Accumulibacter* und Vertreter der *Actinobacteria*) zeigten keine Dominanz in den untersuchten Proben, wenngleich Candidatus *Accumulibacter* mittels DGGE in allen untersuchten Sedimentproben nachgewiesen werden konnte, unabhängig vom Poly-P Gehalt. Die Quantifizierung mittels spezifischer Oligonukleotidsonden ergab einen Anteil von < 1% in allen untersuchten Proben. Auch *Actinobacteria* haben innerhalb der Bakteriengemeinschaft keine zentrale Rolle in der Poly-P Synthese. Ihr Anteil lag stets < 8 % (Kap. III.1.5.2, Kap. III.2.2 und Kap. III.3.1.2).

d. Poly-P speichernden Bakterien in Gewässersedimenten zeigen eine größere Diversität als ihre Vertreter in den Belebtschlämmen.

Diversitätsanalysen erfolgten durch den Einsatz der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese, Erstellung von Klonbibliotheken von 16S rRNA-Genfragmenten und Anwendung der Laser-Mikrodissektion. Die CARD-FISH ermöglichte unter Verwendung verschiedener spezifischer Oligonukleotidsonden die Quantifizierung auf unterschiedlich hohem phylogenetischem Niveau. Es zeigte sich in allen untersuchten Sedimenten eine sehr große bakterielle Diversität (Kap. III.1.5.2, Kap. III.2.2 und Kap. III.3.1.2). Sowohl in den Freilandproben als auch in den Inkubationsexperimenten konnte ein hoher Poly-P Gehalt nicht mit einem guantitativen Anstieg bestimmter Bakteriengruppen in Verbindung gebracht werden. Inwieweit spezielle Bakteriengruppen unter bestimmten Umweltbedingungen aktiver sind und somit eine vermehrte Poly-P Synthese zeigen, konnte durch die eingesetzten molekularbiologischen Methoden nicht geklärt werden. Die Ergebnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass die Fähigkeit zur Poly-P Akkumulation innerhalb der benthischen mikrobiellen Lebensgemeinschaft innerhalb von weit verbreitet ist und sich nicht auf das Auftreten einiger weniger PAO zurückführen lässt. Diese Hypothese wurde durch den Einsatz der Laser-Mikrodissektion untermauert. Sowohl in Belebtschlammproben als auch im Stechlinsee Sediment wurden bekannte und vor allem unbekannte Poly-P Speicherer phylogenetisch identifiziert (Kap. III.5.2). Inwieweit diese Vertreter eine zentrale Rolle für die Poly-P Synthese spielen, muß in weiterführenden Studien geklärt werden.

V LITERATURVERZEICHNIS

Ahn, C. H., Park, H.-D., Lee, Y. O. & Park, J. K. (2008). Appearance of novel G-Bacteria belonging to *Acidobacteria* in a dairy watewater treatment plant. *Environmental Technology*. Vol. 29, pp. 497-504.

Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S. & Hirata, A. (2002). Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Research.* Vol. 36, pp. 403-412.

Ahlgren, J., Reitzel, K., Danielsson, R., Gogoll, A. & Rydin, E. (2006 a). Biogenic phosphorus in oligotrophic mountain lake sediments: differences in composition measured with NMR spectroscopy. *Water Research*. Vol. 40, pp. 3705-3712.

Ahlgren, J. (2006 b). Organic Phosphorus Compounds in Aquatic Sediments. Analysis, Abundance and Effects. *Acta Univeritatis Upsaliensis*. Dissertation.

Akiyama, M., Crooke, E. & Kornberg, A. (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267, pp. 22556-22561.

Allgaier, M. & Grossart, H.-P. (2006). Diversity and seasonal dynamics of Actinobacteria populations in four lakes in northeastern Germany. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72, pp. 3489-3497.

Alvarez, H. M., Mayer, F., Fabritius, D. & Steinbüchel, A. (2004). Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Archives of Microbiology*. Vol. 165, pp. 377–386.

Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K. (1995). Phylogenetic Identification and *In Situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*. Vol. 59, pp. 143-169.

Amann, R. I. & Ludwig, W. (1994). Typing *in situ* with probes. In: Priest, F. G., Ramos-Comenzana, A. & Tindall, B. (eds.), Bacterial Diversity and Systematics, Plenum Press, New York, pp. 115-135.

Amann, R., Krumholz, L. & Stahl, D. (1990). Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental-Studies in Microbiology. *Journal of Bacteriology*. Vol. 172, pp. 762-770.

Angeles, G., Berrio-Sierra, J., Joseleau, J. P., Lorimier, P., Lefébvre, A. & Ruel, K. (2006). Preparative laser capture microdissection and single-pot cell wall material preparation: a novel method for tissue-specific analysis. *Planta*. Vol. 224, pp. 228–232.

Anslinger, K., Bayer, B., Mack, B. & Eisenmeyer, W. (2006). Sex-specific fluorescent labelling of cells for laser microdissection and DNA profiling. *International Journal of Legal Medicine*. Vol. 121, pp. 54–56.

Bae, H. C., Costa-Robles, E. H., & Casida, L. E. (1972). Microflora of soil as viewed by transmission electron microscopy. *Applied Microbiology*. Vol. 23, pp. 637-648.

Barak, Y. & van Rijn, J. (2000). Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, pp. 1209-1212.

Barnard, J. L. (1975). Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Water Research.* Vol. 9, pp. 485-490.

Baas-Becking, L. G. M. (1934). Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon.

Beer, M.; Stratton, H.; Griffiths, P. & Seviour, R. (2006). Which are the polyphosphate accumulating organisms in full-scale activated sludge enhanced biological phosphate removal systems in Australia? *Journal of Applied Microbiology.* Vol. 100, pp. 233-243.

Behrens, S., Loesekann, T., Pett-Ridge, J., Weber, P. K., Ng, W.-O., Stevenson, B. S., Hutcheon, I. D., Relman, D. A. & Spormann, A. M. (2008). Linking Microbial Phylogeny to Metabolic Activity at the Single-Cell Level by Using Enhanced Element Labeling-Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *In Situ* Hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, pp. 3143–3150.

Bell, R. T. & Ahlgren, I. (1987). Thymidine incorporation and microbial respiration in the surface sediment of a hypereutrophic lake. *Limnology and Oceanography*. Vol. 32, pp. 476–482.

Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G. W. & Blackall, L. L. (2002). Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*. Vol. 148, pp. 2309–2318.

Blackall, L., Crocetti, G., Saunders, A. & Bond, P. L. (2002). A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 81, pp. 681-691.

Bond, P. L., Blackall, L. L., Keller, J., Wagner, M. & Erhart, R. (1999). Identification of Some of the Major Groups of Bacteria in Efficient and Nonefficient Biological Phosphorus Removal Activated Sludge Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, pp. 4077-4084.

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. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61, pp. 1910-1916.

Böstrom, B., Pettersson, A.-K. & Ahlgren, I. (1989). Seasonal dynamics of a cyanobacteriadominated microbial community in surface sediments of a shallow, eutrophic lake. *Aquatic Sciences*. Vol. 51, pp. 153–178.

Boström, B., Andersen, J. M., Fleischer, S. & Jansson, M. (1988). Exchange of phosphorus across the sediment-water interface. *Hydrobiologia*. Vol. 170, pp. 229-244.

Boström, B., Jansson, M. & Forsberg, C. (1982). Phosphorus release from lake sediments. *Archiv* für *Hydrobiologie*, *Beihefte Ergebnisse der Limnologie*. Vol. 18, pp. 5-59.

Bratbak, G. (1985). Bacterial Biovolume and Biomass Estimations. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 49, pp. 1488-1493.

Braun-Howland, E. B., Danielson, S. A. & Nierzwicki-Bauer, S. A. (1992). Development of a rapid method for detecting bacterial cells *in situ* using 16S rRNA- targeted probes. *BioTechniques.* Vol. 13, pp. 928- 933.

Brinkhoff, T. & Muyzer, G. (1997). Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63, pp. 3789-3796.

Brown, R. W. & Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 101, pp. 16085–16087.

Brunberg, A. (1995). Microbial activity and phosphorus dynamics in eutrophic lake sediments enriched with *Microcystis* colonies. *Freshwater Biology.* Vol. 33, pp. 541-555.

Burgemeister, R. (2005). New aspects of laser microdissection in research and routine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol. 53, pp. 409-412.

Caraco, N. F., Cole, J. J. & Likens, G. E. (1993). Sulfate control of phosphorus availability in lakes. *Hydrobiologia*. Vol. 253, 275-280.

Carman, R., Edlund, G. & Damberg, C. (2000). Distribution of organic and inorganic phosphorus compounds in marine and lacustrine sediments: a ³¹P NMR study. *Chemical Geology*. Vol. 163, pp. 101–114.

Casper, P., Gonsiorczyk, T. & Koschel, R. (2000). Der Einfluss mikrobieller Prozesse auf die P-Freisetzung aus den Sedimenten oligo- bis eutropher Seen im Stechlinsee- und Feldberger Seengebiet. *Beiträge angewandte Gewässerökologie Norddeutschland.* Vol. 4, pp.139-146.

Casper, S. J. (1985): Lake Stechlin - a temperate oligotrophic lake. *Monographs in Biology*. Vol. 58. Dordrecht, Boston, Lancaster.

Cech, J.S. & Hartman, P. (1993). Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological Phosphate removal systems. *Water Research*. Vol. 27, pp. 1219–1225.

Cech, J.S. & Hartman, P. (1990). Glucose induced break down of enhanced biological phosphate removal. *Environmental Technology*. Vol. 11, pp. 651–656.

Cilia, V., Lafay, B. & Christen, R. (1996). Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*. Vol.13, pp. 451-461.

Clode, P. L., Stern, R. A. & Marshall, A. T. (2007). Subcellular imaging of isotopically labeled carbon compounds in a biological sample by ion microprobe (NanoSIMS). *Microscopy Research and Technique*. Vol. 70, pp. 220–229.

Cohan, F. M. (2002). What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*. Vol. 56, pp. 457–487.

Cole J. J. (1999). Aquatic Microbiology for Ecosystem Scientists: New and Recycled Paradigms in Ecological Microbiology. *Ecosystems.* Vol. 2, pp. 215-225.

Comeau, Y., Hall, K., Hancock, R. & Oldham, W. (1986). Biochemical Model for Enhanced Biological Phosphorus Removal. *Water Research*. Vol. 20, pp. 1511-1521.

Crocetti, G. R., Banfield, J. F., Keller, J., Bond, P. L. & Blackall, L. L. (2002). Glycogenaccumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*. Vol. 148, pp. 3353–3364.

Crocetti G. R., Hugenholtz, P., Bond, P., Schuler, L. A., Keller, J., Jenkins, D. & Blackall, L. L. (2000). Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, pp. 1175-1182.

Curran, S. & Murray, G. I. (2002). Tissue microdissection and its applications in pathology. *Current Diagnostic Pathology*. Vol. 8, pp.183–192.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 I-III is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 22, pp. 434-444.

Davelaar D. (1993). Ecological significance of bacterial polyphosphate metabolism in sediments. *Hydrobiologia*. Vol. 253, pp. 179-192.

Demanèche, S., Jocteur-Monrozier, L., Quiquampoix, H. & Simonet, P. (2001). Evaluation of Biological and Physical Protection against Nuclease Degradation of Clay-Bound Plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, pp. 293-299.

De Montigny C. & Prairie, Y. T. (1993). The relative importance of biological and chemical processes in the release of phosphorus from a highly organic sediment. *Hydrobiologia*. Vol. 253, pp. 141-150.

De Wit, R. & Bouvier, T. (2006). Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*. Vol. 8, pp. 755-758.

Dudley, D. J., Guentzel, M. N., Ibarra, M. J., Moore, B. E. & Sagik, B. P. (1980). Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 39, pp.118-126.

Einsele W. (1936). Über die Beziehungen des Eisenkreislaufs zum Phosphatkreislauf im eutrophen See. *Archiv für Hydrobiologie*. Vol. 29, pp. 664-686.

Epstein, S. S. & Rossel, J. (1995). Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 117, pp. 289-298.

Fagerbakke, K. M., Heldal, M. & Norland, S. (1996). Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 10, pp. 15–27.

Fenchel, T. & Finlay, B. J. (2004). The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. *BioScience*. Vol. 54, pp. 777–784.

Fernández-Medarde, A., Porteros, A., de las Rivas, J., Núñez, A., Fuster, J. J. & Santos, E. (2007). Laser microdissection and microarray analysis of the hippocampus of Ras-GRF1 knockout mice reveals gene expression changes affecting signal transduction pathways related to memory and learning. *Neuroscience*. Vol. 146, pp. 272-285.

Finlay, B. J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*. Vol. 296, pp. 1061–1063.

Fleischer, S., Bengtsson, M. & Johansson, G. (1988). Mechanism of the aerobic Fe(III)-P solubilization at the sediment-water interface. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*. Vol. 23, pp. 825-1829.

Fleischer, S. (1986). Aerobic uptake of Fe(III)-precipitated phosphorus by microorganisms. *Archiv für Hydrobiologie.* Vol. 107, pp. 269-277.

Fleischer, S. (1983). Microbial Phosphorus release during Enhanced Glycolysis. *Naturwissenschaften*. Vol. 70, pp. 415.

Fleischer, S. (1978). Evidence for the Anaerobic Release of Phosphorus from Lake Sediments as a Biological Process. *Naturwissenschaften*. Vol. 65, pp. 109-110.

Friedberg, I. & Avigad, G. (1968). Structures Containing Polyphosphate in *Micrococcus lysodeikticus*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 96, pp. 544–553.

Fuhs, G. W. & Chen, M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology*. Vol. 2, pp.119-138.

Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T. & Kikuchi, S. (2003). *Novosphingobium tardaugens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 53, 47-52.

Fujimura, S., Kato, S., Oda, M., Miyahara, M., Ito, Y., Kimura, K., Kawamura, T., Ohnuma, M., Tateno, H. & Watanabe, A. (2006). Detection of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain administered with yogurt drink in gastric mucus layer in humans. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 43, pp. 578–581.

Fukase, T., Shibata, M. & Miyaji, Y. (1985). The role of the anaerobic stage on biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*. Vol. 17, pp. 69–80.

Fukushima, T., Uda, N., Onuki, M., Satoh, H. & Mino, T. (2007). Development of the Quantitative PCR Method for *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis' and Its Application to Activated Sludge. *Journal of Water and Environment Technology*. Vol.5, pp. 37-43.

Gächter R. & Meyer, J. S. (1993). The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments. *Hydrobiologia*. Vol. 253, pp. 103-121.

Gächter R., Meyer, J. S. & Mares, A. (1988). Contribution of bacteria to release and fixation of phosphorus in lake sediments. *Limnology and Oceanography*. Vol. 33, pp. 1542-1558.

Gächter R. & Mares, A. (1985). Does settling seston release soluble reactive phosphorus in the hypolimnion of lakes? *Limnology and Oceanography*. Vol. 30, pp. 364-371.

García Martín, H., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K. W., McHardy, A. C., Yeates, C., He, S., Salamov, A. A., Szeto, E., Dalin, E., Putnam, N. H., Shapiro, H. J., Pangilinan, J. L., Rigoutsos, I., Kyrpides, N. C., Blackall, L. L., McMahon, K. D. & Hugenholtz, P. (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnology*. Vol. 24, pp. 1263-1269.

García-Ruiz R., Lucena, J. & Niell, F. X. (1999). Do bacteria regenerate phosphorus while decomposing seston? *Marine Freshwater Research*. Vol. 50, pp. 459-466.

Gich, F., Schubert, K., Bruns, A., Hoffelner, H. & Overmann, J. (2005). Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 71, pp. 5908-5919.

Gloess, S., Grossart, H.-P., Allgaier, M., Ratering, S. & Hupfer, M. (2008). Use of Laser Microdissection for Phylogenetic Characterization of Polyphosphate-Accumulating Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, pp. 4231-4235.

Goedkoop, W. & Pettersson, K. (2000) Seasonal changes in sediment phosphorus forms in relation to sedimentation and benthic bacterial biomass in Lake Erken. *Hydrobiologia*. Vol. 431, pp. 41–50.

Golterman, H. L. (2004). The Chemistry of Phosphate and Nitrogen Compounds in Sediments. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht.

Golterman, H. L. (2001). Phosphate release from anoxic sediments or "What did Mortimer really write?". *Hydrobiologia*. Vol. 45, pp. 99–106.

Golterman, H. L. (1998). The distribution of phosphate over iron-bound and calcium-bound phosphate in stratified sediments. *Hydrobiologia*. Vol. 364, pp. 75-81.

Grossart H.-P. & Simon, M. (1997). Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton, and zooplankton. *Limnology and Oceanography*. Vol. 42, pp. 1651-1659.

Haase, A., Brahic, M., Stowring, L. & Blum, H. (1984). Detection of viral nucleic acids by *in situ* hybridization. *Methods in Virology*. Vol. 7, pp. 189–226.

Hahn, M. W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Höfle, M. G., Boenigk, J. & Stadler, P. (2003). Isolation of Novel Ultramicrobacteria Classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69, pp. 1442-1451.

Hanada, S., Liu, W., Shintani, T., Kamagata, Y. & Nakamura, K. (2002). *Tetrasphaera elongata* sp nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 52, pp. 883-887.

Hardoyo, Yamada, K., Shinjo, H., Kato, J. & Ohtake, H. (1994). Production and Release of Polyphosphate by a Genetically Engineered Strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 60, pp. 3485-3490.

Harris, J. K., Kelley, S. T. & Pace, N. R. (2004). New Perspective on Uncultured Bacterial Phylogenetic Division OP11. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, pp. 845-849.

He, S., Gall, D. L. & McMahon, K. D. (2007). "*Candidatus* Accumulibacter" Population Structure in Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludges as Revealed by Polyphosphate Kinase Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73, pp. 5865-5874.

Hesselmann, R. X. P., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J. R. & Zehnder, A. J. B. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 22, pp. 454-465.

Hesselmann, R., Hahn, D., van der Meer, J. & Zehnder, A. (1998). Erhöhte biologische Phosphatelimination aus Abwasser-Die Suche nach den Organismen. *EAWAG news,* Vol. 45, pp. 18-20.

Hicks, R. E., Amann, R. I. & Stahl, D. A. (1992). Dual Staining of natural bacterioplankton with 4, 6 –diamidino-2-phenylindole and fluorescent oliogonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 58, pp. 2158-2163.

Hobbie, J., Daley, R. & Jasper, S. (1977). Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 33, pp. 1225-1228.

Höll, K. (1930). Über Schlammablagerungen, insbesondere über das Vorkommen von "natürlichem belebten Schlamm" und seine Eigenschaften. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. Vol. 81, pp. 198-210.

Hollender, J., Dreyer, U., Kornberger, L., Kämpfer, P. & Dott, W. (2002). Selective enrichment and characterization of a phosphorus-removing bacterial consortium from activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 58, pp. 106-111.

Hooper, L. V. (2004). Laser microdissection: exploring host-bacterial encounters at the front lines. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 7, pp 290–295.

Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. & Wagner, M. (2008). Quantification of Target Molecules Needed To Detect Microorganisms by Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) and Catalyzed Reporter Deposition-FISH. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, pp. 5068-5077.

Huang, W. E., Ferguson, A., Singer, A. C., Lawson, K., Thompson, I. P., Kalin, R. M., Larkin, M. J., Bailey, M. J. & Whiteley, A. S. (2009). Resolving Genetic Functions within Microbial Populations: In Situ Analyses Using rRNA and mRNA Stable Isotope Probing Coupled with Single-Cell Raman-Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75, pp. 234-241.

Huang, W. E., Stoecker, K., Griffiths, R., Newbold, L., Daims, H., Whiteley, A. S. & Wagner,
M. (2007). Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence *in situ* hybridization for single cell analysis of identity and function. *Environmental Microbiology*.
Vol. 9, pp. 1878–1889.

Huang, W. E., Griffiths, R. I., Thompson, I. P., Bailey, M. J. & Whiteley, A. S. (2004). Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells. *Analytical Chemistry*. Vol. 76, pp. 4452-4458.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998). Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology*. Vol. 180, pp. 4765-4774.

Hupfer, M. & Lewandowski, J. (2008). Oxygen controls the phosphorus release from lake sediments- a long lasting paradigm in limnology. *International Review of Hydrobiology*. Vol. 93, pp. 415-432.

Hupfer, M., Glöss, S., Schmieder, P. & Grossart, H.-P. (2008): Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments. *International Review of Hydrobiology*. Vol. 93, pp. 1-30.

Hupfer M., Rübe, I. B. & Schmieder, P. (2004). Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: A ³¹P-NMR study. *Limnology and Oceanography*. Vol. 49, pp. 1-10.

Hupfer M., Gächter, R. & Rüegger, H. (1995). Polyphosphate in lake sediments: P-31 NMR-Spectroscopy as a tool for its identification. *Limnology and Oceanography*. Vol. 40, pp. 610-617.

Jeon C. O., Lee, D. S. & Park, J. M. (2003). Microbial communities in activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *Water Research*. Vol. 37, pp. 2195-2205.

Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S. S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*. Vol. 296, pp. 1127–1129.

Kämpfer, P., Dreyer, U., Neef, A., Dott, W. & Busse, H.-J. (2003). *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 53, pp. 93-97.

Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Bohringer, J., Wagner, M. & Amann, R. (1996). Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial Ecology*. Vol. 32, pp. 101-121.

Kawaharasaki, M., Tanaka, T., Kanagawa, T. & Nakamura, K. (1999). *In situ* identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4 ',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *Water Research*. Vol. 33, pp. 257-265.

Kepner, R. L. & Pratt, J. R. (1994). Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present. *Microbiological Reviews*. Vol. 58, pp. 603-615.

Khoshmanesh, A., Hart, B., Duncan, A. & Beckett, R. (2002). Luxury uptake of phosphorus by sediment bacteria. *Water Research*. Vol. 36, pp. 774-778.

Khoshmanesh, A., Hart, B., Duncan, A. & Beckett, R. (1999). Investigation of biotic uptake and release of phosphorus by a wetland sediment. *Environmental Technology*. Vol. 20, pp. 85-91.

Kiørboe, T., Grossart, H.-P., Ploug, H. & Tang, K. (2002). Bacterial colonization of aggregates: mechanisms and rates. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, pp. 3996-4006.

Kjeldstad, B., Heldal, M., Nissen, H., Bergan, A. & Evjen, K. (1991). Changes in polyphosphate composition and localization in *Propionibacterium acnes* after near-ultraviolet irradiation. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 37, pp. 562–567.

Klauth, P., Pallerla, S. R., Vidaurre, D., Ralfs, C., Wendisch, V. F. & Schoberth, S. M. (2006). Determination of soluble and granular inorganic polyphosphate in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 72, pp. 1099-1106.

Klitgaard, K., Molbak, L., Jensen, T., Lindboe, C. & Boye, M. (2005). Laser capture microdissection of bacterial cells targeted by fluorescence *in situ* hybridization. *Biotechniques*. Vol. 39, pp. 864-868.

Kong, Y., Nielsen, J. & Nielsen, P. (2005). Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, pp. 4076-4085.

Kong, Y., Nielsen, J. & Nielsen, P. (2004). Microautoradiographic Study of *Rhodocyclus*-Related Polyphosphate-Accumulating Bacteria in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, pp. 5383-5390.

Kong, Y., Beer, M., Rees, G. & Seviour, R. (2002). Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. *Microbiology*. Vol. 148, pp. 2299-2307.

Kornberg A. (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*. Vol. 177, pp. 491-496.

Kornberg A. (1994). Inorganic polyphosphate: a molecular fossil come to life. In: *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*, edited by S. Torriani-Gorini, S. Silver, and E. Yagil, Washington, D.C., pp. 204-208.

Kortstee, G., Appeldoorn, K., Bonting, C., van Niel, E. & van Veen, H. (2000). Recent developments in the biochemistry and ecology of enhanced biological phosphorus removal. *Biochemistry*. Vol. 65, pp. 394-404.

Koschel, R. (1976) Der Einfluss des Phosphorangebotes auf die Primärproduktion des Phytoplanktons in einem geschichteten Klarwassersee (Stechlinsee, DDR). *Limnologica*. Vol. 10, pp. 325-346.

Kulaev I. & Kulakovskaya, T. (2000). Polyphosphate and Phosphate Pump. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 54, pp. 709-734.

Kulaev, I. (1979). The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley and Sons. pp. 1-255.
Kunin, V., He, S., Warnecke, F., Peterson, S. B., Garcia Martin, H., Haynes, M., Ivanova, N. Blackall, L. L., Breitbart, M., Rohwer, F., McMahon, K. D., Hugenholtz, P. (2008). A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal. *Genome Research*. Vol. 18, pp. 293-297.

Kuroda, A. & Ohtake, H. (2000). Molecular Analysis of Polyphosphate Accumulation in Bacteria. *Biochemistry*. Vol. 65, pp. 362-367.

Küsel, A. C., Sianoudis, J., Leibfritz, D., Grimme, L. H. & Mayer, A. (1989). ³¹P *in vivo* NMR investigations on the function of polyphosphates as phosphate-source and energy-source during the regreening of the green alga *Chlorella fusca*. *Archives of Microbiology*. Vol. 152, pp. 167-171.

Lachance, M. A. (2004). Here and There or Everywhere? BioScience. Vol. 54, pp. 884-885.

Laczko, E. (1988). Abbau von planktischen Detritus in den Sedimenten voralpiner Seen: Dynamik der beteiligten Mikroorganismen und Kinetik des biokatalysierten Phosphoraustausches. – Dissertation ETH No. 8371 Zürich.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley, Chichester, United Kingdom. pp. 115–175.

Laskov, C., Horn, O. & Hupfer, M. (2006). Environmental factors regulating the radial oxygen loss from roots of *Myriophyllum spicatum* and *Potamogeton crispus*. *Aquatic Botany*. Vol. 84, pp. 333-340.

Lawerence, B. A., Suarez, C., DePina, A., Click, E., Kolodny, N. H., Allen, M. M. (1998). Two internal pools of soluble polyphosphate in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6308: an *in vivo* ³¹P NMR spectroscopic study. *Archives of Microbiology*. Vol. 169, pp. 195–200.

Layton, A. C., Karanth, P. N., Lajoie, C. A., Meyers, A. J., Gregory, I. R., Stapleton, R. D., Taylor, D. E. & Sayler, G. S. (2000). Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, pp. 1167-1174. Lee, N., Nielsen, P., Aspegren, H., Henze, M., Schleifer, K. & la Cour Jansen, J. (2003). Long-term population dynamics and in situ physiology in activated sludge systems with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 26, pp. 211-227.

Lee, N., Nielsen, P., Andreasen, K., Juretschko, S., Nielsen, J., Schleifer, K. & Wagner, M. (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, pp. 1289-1297.

Levantesi, C., Serafim, L. & Crocetti, G. (2002). Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor. *Environmental Microbiology*. Vol. 4, pp. 559-569.

Lewandowski, J., Schadach, M. & Hupfer, M. (2005). Impact of macrozoobenthos on twodimensional small-scale heterogeneity of pore water phosphorus concentrations: *in-situ* study in Lake Arendsee (Germany). *Hydrobiologia*. Vol. 549, pp. 43-55.

Liu, W., Nielsen, A., Wu, J., Tsai, C., Matsuo, Y. & Molin, S. (2001). *In situ* identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. *Environmental Microbiology*. Vol. 3, pp. 110-122.

Lohmann, H. (1911). Über das Nannoplankton und die Zentrifugierung kleinster Wasserproben zur Gewinnung desselben in lebendem Zustande. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. Vol. 4, pp. 201-239.

Loy, A., Maixner, F., Wagner, M. & Horn, M. (2007). probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Research*. Vol. 35, pp. 800-804.

Lu, H., Oehmen, A., Virdis, B., Keller, J. & Yuan, Z. G. (2006). Obtaining highly enriched cultures of Candidatus *Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources. *Water Research*. Vol. 40, pp. 3838–3848.

Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 15, pp. 155-173.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. & Schleifer, K.-H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology*. Vol. 142, pp. 1097–1106.

Maszenan, A., Seviour, R., Patel, B., Schumann, P., Burghardt, J., Tokiwa, Y. & Stratton, H. (2000). Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 50, pp. 593-603.

McLaughlin, K., Silva, S., Kendall, C., Stuart-Williams, H. & Paytan, A. (2004). A precise method for the analysis of δ^{18} O of dissolved inorganic phosphate in seawater. *Limnology and Oceanography: Methods*. Vol. 2, pp. 202-212.

Melasniemi, H., Hernesmaa, A., Pauli, A. S.-L., Rantanen, P. & Salkinoja-Salonen, M. (1998). Comparative analysis of biological phosphate removal (BPR) and non-BPR activated sludge bacterial communities with particular reference to *Acinetobacter*. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol. 21, pp. 300-306.

Mino, T., van Loosdrecht, M. & Heijnen, J. (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research*. Vol. 32, pp. 3193-3207.

Mortimer, C. (1941). The exchange of dissolved substances between mud and water in lakes. *Journal of Ecology*. Vol. 29, pp. 280-329.

Mudaly, D., Atkinson, B. & Bux, F. (2000). Microbial community profile of a biological excess phosphorus removal (BEPR) activated sludge system using a cultivation-independent approach. *Water SA*. Vol. 26, pp. 343-352.

Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (2000). Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*. Vol. 155, pp. 335-350. Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. & Orrego, C. (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62, pp. 2676-2680.

Muylaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M. & Vyverman, W. (2002). Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus topdown variables in four eutrophic shallow lakes. *Applied and Environmental Microbiology. Vol.* 68, pp. 4740-4750.

Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S. & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. Vol. 13, pp. 3131–3145.

Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* Vol. 73, pp.127-141.

Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. & Waver, C. (1995). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *In* A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), Molecular microbial ecology manual, 2nd ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. p.3.4.4.1–3.4.4.22.

Muyzer, G., de Waal, E. & Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 95, pp. 695-700.

Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K. & Kamagata, Y. (1995). *Microlunatus Phosphovorus* Gen. Nov., Sp. Nov., A New Gram-Positive Polyphosphate-Accumulating Bacterium Isolated from Activated-Sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 45, pp. 17-22.

Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. & Schleifer, K.-H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*. Vol. 144, pp. 3257–3266.

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

Nichols, D., Lewis, K., Orjala, J., Mo, S., Ortenberg, R., O'Connor, P., Zhao, C., Vouros, T., Kaeberlein, T. & Epstein, S. S. (2008). Short Peptide Induces an "Uncultivable" Microorganism To Grow *In Vitro. Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, pp. 4889-4897.

Nixdorf, B., Rücker, J., Deneke, R. & Zippel, P. (1995). Limnologische Zustandsanalyse von Standgewässern im Scharmützelseegebiet, Teil I. *Aktuelle Reihe*. 1/95, 52 S.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. & Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneties of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. Vol. 178, pp. 5636-5643.

Oehmen, A., Saunders, A. M., Vives, M. T., Yuan, Z. & Keller, J. (2006). Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *Journal of Biotechnology*. Vol. 123, pp. 22-32.

Ohle, W. (1938). Die Bedeutung der Austauschvorgänge Schlamm und Wasser für den Stoffkreislauf der Gewässer. *Vom Wasser*. Vol. 13, pp. 87–97.

Okunuki, S., Nakamura, K., Kawaharasaki, M., Tanaka, H., Uchiyama, H. & Noda, N. (2007). Quantification of *Rhodocyclus*-Related and Actinobacterial Polyphosphate-Accumulating Organisms in an Enhanced Biological Phosphorus Removal Process Using Quenching Probe PCR. *Microbes and Environment*. Vol. 22, pp. 106-115.

Onda, S., Hiraishi, A., Matsuo, Y. & Takii, S. (2002). Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratory-scale anaerobic/aerobic activated sludge system. *Journal of General and Applied Microbiology*. Vol. 48, pp. 43-54.

Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K. D. & DeLong, E. F. (2001): Methane-consuming *Archaea* revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*. Vol. 293, pp. 484–487.

Overmann, J., Coolen, M. J. L. & Tuschak, C. (1999). Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. *Archives of Microbiology*. Vol. 172, pp. 83–94.

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. L. & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbiolal Ecology*. Vol. 9, pp. 1-55.

Peplies, J., Lachmund, C., Glöckner, F. O. & Manz, W. (2006). A DNA microarray platform based on direct detection of rRNA for characterization of freshwater sediment-related prokaryotic communities. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72, pp. 4829-4838.

Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. (2002). Fluorescence *In Situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, pp. 3094-3101.

Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W. & Amann, R. (2001). Fluorescence *in situ* hybridization. *In* J. Paul (ed.). Methods in Microbiology: Marine Microbiology, vol. 30. Academic Press Ltd, London.

Peterson, S. B., Warnecke, F., Madejska, J., McMahon, K. D. & Hugenholtz, P. (2008). Environmental distribution and population biology of Candidatus Accumulibacter, a primary agent of biological phosphorus removal. *Environmental Microbiology*. Vol. 10, pp. 2692-2703.

Pijuan, M., Saunders, A., Guisasola, A., Baeza, J., Casa, C. & Blackall, L. L. (2004). Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 85, pp. 56-67.

Pomeroy, L. (2001). Caught in the food web: complexity made simple? *Scienta Marina*. Vol. 65, pp. 31-40.

Porter, K. & Feig, Y. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*. Vol. 25, pp. 943-948.

Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. & Murrell, J. C. (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*. Vol. 403, pp. 646–649.

Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Janssen, P. H., Hippe, H. & Stackebrandt, E. (1996). *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology*. Vol. 142, pp. 2087-2095.

Rao, N. & Kornberg, A. (1996). Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 178, pp. 1394-1400.

Reitzel, K., Ahlgren, J., Gogoll, A., Jensen, H. S. & Rydin, E. (2006). Characterization of phosphorus in sequential extracts from lake sediments using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 63, pp. 1686–1699.

Ricciardi-Rigault, M., Bird, D. F. & Prairie, Y. T. (2000). Changes in sediment viral and bacterial abundances with hypolimnetic oxygen depletion in a shallow eutrophic Lac Brome (Quebec, Canada). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 57, pp. 1284–1290.

Roden, E. E. & Edmonds, J. W. (1997). Phosphate mobilization in iron-rich anaerobic sediments: microbial Fe(III) oxide reduction versus iron-sulfide formation. *Archiv für Hydrobiologie*. Vol. 139, pp. 347–378.

Rönicke, H., Beyer, M. & Elsner, W. (1998). Seekreideaufspülung am Arendsee – ein neues Restaurierungsverfahren für überdüngte Hartwasserseen. *GAIA*. Vol. 7, pp. 117-126

Röske, I., Röske, K. & Uhlmann, D. (1998) Gradients in the taxonomic composition of different microbial systems: Comparison between biofilms for advanced waste treatment and lake sediments. *Water Science and Technology*. Vol. 37, pp. 159-166.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1994). *In situ* probing of gram- positve bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA targeted oligonucleotides. *Microbiology*. Vol. 140, pp. 2849- 2858.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*. Vol. 230, pp. 1350-1354.

Sannigrahi, P. & Ingall, E. (2005). Polyphosphates as a source of enhanced P fluxes in marine sediments overlain by anoxic waters: evidence from ³¹P NMR. *Geochemical Transactions*. Vol. 6, pp. 52–59.

Santos, M., Lemos, P., Reis, M. & Santos, H. (1999). Glucose metabolism and kinetics of phosphorus removal by the fermentative bacterium *Microlunatus phosphovorus*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, pp. 3920-3928.

Schallenberg, M. & Kalff, J. (1993). The ecology of sediment bacteria in lakes and comparisons with other aquatic ecosystems. *Ecology*. Vol. 74, pp. 919–934.

Schallenberg, M., Kalff, J. & Rasmussen, J. (1989). Solutions to Problems in Enumerating Sediment Bacteria by Direct Counts. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 55, pp. 1214-1219.

Schulz, H. & Schulz, H. (2005). Large sulfur bacteria and the formation of phosphorite. *Science*. Vol. 307, pp. 416-418.

Schwarz, J. I. K., Lueders, T., Ekert, W. & Conrad, R. (2007). Identification of acetateutilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA. *Environmental Microbiology*. Vol. 9, pp. 223-237.

Schwarz, J. I. K. (2006). Identifizierung aktiver mikrobieller Populationen mit Hilfe stabiler Isotope. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Germany.

Serafim, L., Lemos, P., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H. & Reis, M. (2002). Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 51, pp. 1-18.

Sianoudis, J., Küsel, A. C., Mayer, A., Grimme, L. H. & Leibfritz, D. (1986) Distribution of polyphosphates in cell-compartments of *Chlorella fusca* as measured by ³¹P-NMR spectroscopy. *Archives of Microbiology*. Vol. 144, pp. 48–54.

Sidat, M., Bux, F. & Kasan, H. (1999). Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. *Water SA*. Vol. 25, pp. 175-179.

Simon, M., Grossart, H.P., Schweitzer, B. & Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 28, pp. 175-211.

Sørensen, T. (1948). A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Biologiske Skrifter / Kongelige Danske Videnskabernes Selskab*. Vol. 5, pp. 1-34.

Speirs, L., Nittami, T., McIlroy, S., Schroeder, S. & Seviour, R. J. (2009). Filamentous Bacterium Eikelboom Type 0092 in Activated Sludge Plants in Australia Is a Member of the Phylum *Chloroflexi. Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75, pp. 2446-2452.

Speksnijder, A. G., Kowalchuk, G. A., de Jong, S., Kline, E., Stephen, J. R. & Laanbroek, H. J. (2001). Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, pp. 469-472.

Staley, J. T. & Konopka, A. (1985). Measurements of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 39, 321-346.

Stante, L., Cellamare, C., Malaspina, F., Bortone, G. & Tilche, A. (1997). Biological phosphorus removal by pure culture of *Lampropedia* spp. *Water Research*. Vol. 31, pp. 1317-1324.

Stratton, H. M., Brooks, P. R., Griffiths, P. C. & Seviour, R. J. (2002). Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foam. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol. 28, pp. 264-267.

Streichan, M., Golecki, J. R. & Schön, G. (1990). Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 73, pp. 113–124.

Tankéré, S. P. C., Bourne, D. G., Muller, F. L. L. & Torsvik, V. (2002). Microenvironments and microbial community structure in sediments. *Environmental Microbiology*. Vol. 4, pp. 97–105.

Tezuka, Y. (1989). The C:N:P ratio of phytoplankton determines the relative amounts of dissolved inorganic nitrogen and phosphorus released during aerobic decomposition. *Hydrobiologia*. Vol. 173, pp. 55-62.

Thomas, M. R. & O'Shea, E. K. (2005). An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 102, pp. 9565–9570.

Torella, F. & Morita, R. Y. (1981). Microcultural study of bacterial size change and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in sea water. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 41, pp. 518-527.

Torsvik, V. & Ovreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. Vol.5, pp. 240-245.

Tuominen, L., Kairesalo, T., Hartikainen, H. & Tallberg, P. (1996). Nutrient fluxes and microbial activity in sediment enriched with settled seston. *Hydrobiologia*. Vol. 335, pp. 19-31.

Uhlmann, D., Appelt, C., Ulrich, K. & Paul, L. (2000). Microbial and chemical composition of the upper sediment layers in a man-made lake. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*. Vol. 27, pp. 866-870.

Uhlmann, D., Röske, K., Ulrich, K. & Paul, L. (1998). Bacteria in the bottom sediment of a drinking water reservoir. *International Review of Hydrobiology*. Vol. 83, pp. 269-280.

Uhlmann, D. & Bauer, H. (1988). A Remark on Microorganisms in Lake Sediments with Emphasis on Polyphosphate-accumulating Bacteria. *Internationales Revue der gesamten Hydrobiologie*. Vol. 73, pp. 703-708.

Vadstein, O. & Olsen, Y. (1989). Chemical composition and phosphate uptake kinetics of limnetic bacterial communities cultured in chemostats under phosphorus limitation. *Limnology and Oceanography*. Vol. 34, pp. 939-946.

Vadstein, O., Jensen, A., Olsen, Y. & Reinertsen, H. (1988). Growth and phosphorus status of limnetic phytoplankton and bacteria. *Limnology and Oceanography*. Vol. 33, pp. 489-503.

Vallaeys, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A. & Soulas, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 24, pp. 279–285.

Van Groenestijn, J. W., Deinema, M. H. & Zehnder, A. J. B. (1987). ATP production from polyphosphate in *Acinetobacter* strain 210A. *Archives of Microbiology*. Vol. 148, pp. 14–19.

Van Loosdrecht, M. C. M., Smolders, G. J., Kuba, T. & Heijnen, J. J. (1997). Metabolism of micro-organisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 71, pp. 109–116.

Veiji, M. I. & Albright, L. J. (1986). Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 32, pp. 121-126.

Vollenweider, R. A. (1976). Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*. Vol. 33, pp. 53-83.

von Wintzingerode, F., Göbel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 21, pp. 213-229.

Waara, T., Jansson, M. & Pettersson, K. (1993). Phosphorus composition and release in sediment bacteria of the genus *Pseudomonas* during aerobic and anaerobic conditions. *Hydrobiologia*. Vol. 253, pp. 131-140.

Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. & Schleifer, K. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 60, pp. 792-800.

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. & Schleifer, K. (1993). Probing Activated Sludge with Oligonucleotides Specific for Proteobacteria: Inadequacy of Culture-Dependent Methods for

Describing Microbial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59, pp. 1520-1525.

Wallner, G., Fuchs, B., Spring, S., Beisker, W. & Amann, R. (1997). Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63, pp. 4223-4231.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173, pp. 697-703.

Wentzel, M. C., Lötter, L. H., Ekama, G. A., Loewenthal, R. E. & Marais, G. v. R. (1991). Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal. *Water Science and Technology*. Vol. 23, pp. 567–576.

Whitaker, R. J., Grogan, D. W. & Taylor, J. W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*. Vol. 301, pp. 976-978.

Whitfield, J. (2005). Biogeography: is everything everywhere? *Science*. Vol. 310, pp. 960–961.

Wobus, A., Bleul, C., Maassen, S., Scheerer, C., Schuppler, M., Jacobs, E. & Röske, I. (2003). Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 46, pp. 331-347.

Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 87, pp. 4576-4579.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. Microbiological Reviews. Vol. 51, pp. 221-271.

Wolter, K.-D. (1994). Restauration of eutrophic lakes by phosphorus precipitation – Lake Gross-Glienicker, Germany. Kap. *Restauration of lake ecosystems – a holistic approach*. International Waterfowl and Wetland Research Bureau. Slimbridge. pp. 109-118.

Wong, M.-T., Mino, T., Seviour, R. J., Onuki, M. & Liu, W.-T. (2005). *In situ* identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorus removal plants in Japan. *Water Research*. Vol. 39, pp. 2901–2914.

Zeng, R., Saunders, A., Yuan, Z., Blackall, L. L. & Keller, J. (2003). Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 83, pp. 140-148.

Zilles, J., Peccia, J., Kim, M., Hung, C. & Noguera, D. (2002). Involvement of *Rhodocyclus*-Related Organisms in Phosphorus Removal in Full-Scale Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 68, pp 2763-2769.

ANHANG A - PUBLIKATIONEN

- A1. Use of Laser Microdissection for Phylogenetic Characterization of Polyphosphate-Accumulating Bacteria.
 Gloess, S., Grossart, H.-P., Allgaier, M., Ratering, S. & Hupfer, M. (2008)
 Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74, pp. 4231-4235
- Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments.
 Hupfer, M., Glöss, S., Schmieder, P. & Grossart, H.-P. (2008): International Review of Hydrobiology. Vol. 93, pp. 1-30.
- A3. Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments.
 Hupfer, M., Gloess, S., P. & Grossart, H.-P. (2007): *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 47, pp. 299-311.

A1. Use of Laser Microdissection for Phylogenetic Characterization of Polyphosphate-Accumulating Bacteria.

Gloess, S., Grossart, H.-P., Allgaier, M., Ratering, S. & Hupfer, M. (2008) Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74, pp. 4231-4235

Use of Laser Microdissection for Phylogenetic Characterization of Polyphosphate-Accumulating Bacteria[∇]

Stefanie Gloess,¹ Hans-Peter Grossart,¹ Martin Allgaier,¹[†] Stefan Ratering,²* and Michael Hupfer¹*

Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Alte Fischerhütte 2, D-16775 Stechlin-Neuglobsow, Germany,¹ and Institute of Applied Microbiology, Justus-Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany²

Received 12 November 2007/Accepted 22 April 2008

Our novel approach for taxonomic identification of uncultured bacteria harboring specific physiological features in complex environmental samples combines cell collection by laser microdissection and subsequent DNA analysis. The newly developed approach was successfully tested for collection and phylogenetic characterization of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge and lake sediment.

In order to examine the ecological role of bacteria in a (eco)system, it is often necessary to detect and identify these microorganisms in situ, particularly if their specific metabolic capabilities need to be studied. For this purpose, different methods are available; however, currently all of them have distinct disadvantages and limitations. For example, PCRbased techniques using cultivation-independent approaches are very useful for exploring the diversity of microorganisms in environmental samples, but often their metabolic functions remain unknown. More recently, techniques based on fluorescence in situ hybridization (FISH), such as Raman-FISH (17), FISH-secondary-ion mass spectrometry (31), and FISH-microautoradiography (26, 32), have been developed to overcome such problems. These techniques work with substrates labeled with either stable or radioactive isotopes to help identify microbiota and to study their ecophysiology. For the design and application of specific oligonucleotide probes used in FISH, however, knowledge of the target (e.g., 16S rRNA) sequence is essential. The identification of microorganisms involved in specific metabolic processes in a complex environmental sample can also be achieved by additional methods, e.g., separation via stable isotope probing (33) based on the selective recovery of "heavy" ¹³C-labeled biomarkers (e.g., DNA or RNA). However, this probing technique is restricted by the somewhat limited availability of labeled substrates. In addition to the restriction of limited availability of highly enriched commercial compounds, the actual addition of external substrates and incubation time may affect the activity and composition of the natural bacterial community.

Hence, we aimed to develop an alternative approach for direct phylogenetic characterization of bacteria with specific metabolic functions from various environmental samples, in

[†] Present address: DOE Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Dr., Walnut Creek, CA 94598.

our case activated sludge and lake sediment. Our novel approach is based on the precise collection of single microorganisms and overcomes all of the abovementioned methodological limitations. In this study, we have separated polyphosphate (poly-P)-accumulating bacteria (PAO) from poly-P-containing sludge and lake sediment. PAO are key players in the phosphorus (P) cycle in sewage treatment plants with enhanced biological P removal. Hence, for optimization of sewage treatment processes, a fundamental understanding of the bacterial sludge community, especially of PAO, is necessary. To date, only a few bacteria of this group have been isolated and characterized; however, they are often of minor relevance for P cycling in full-scale plants (1, 8, 24). Thus, their occurrence in aquatic sediments as well as their role in biotic P transformation is poorly understood and highly controversial (19). In an attempt to specifically characterize PAO in sludge and lake sediment, we used laser microdissection and subsequent phylogenetic characterization to precisely describe members of this bacterial group. Laser microdissection is a powerful technique which has been used previously to analyze eukaryotic cells for a variety of scientific applications (6), e.g., forensics (4), botany (3), pathology (reviewed in reference 7), neurosciences (10), and medical biology (13). It has also been used to analyze pathogenic bacteria in histological tissues, using fluorescently labeled oligonucleotide probes or specific primers (16, 23). To our knowledge, this is the first study using laser microdissection for phylogenetic characterization of specific bacteria in aquatic samples.

Methodological approach. Activated sludge was obtained from the Wassmannsdorf wastewater treatment plant (near Berlin, Germany) in January 2006. Sediment cores were collected (June 2004) from the deepest point of the oligotrophic Lake Stechlin with a modified Kajak sampler (Uwitech, Mondsee, Austria) equipped with Plexiglas tubes (diameter, 6 cm). The uppermost sediment (ca. 5 mm) was immediately removed using a 50-ml plastic syringe equipped with a flexible tube. To obtain a representative composite sample, six replicate cores were pooled. Poly-P was detected and quantified in both samples by ³¹P nuclear magnetic resonance analyses according to a standard protocol (18). Poly-P accounted for 0.81 and 2.97 mg P g⁻¹ dry weight in Lake Stechlin and activated sludge, respectively. This high poly-P content provided a good basis for

^{*} Corresponding author. Mailing address for Stefan Ratering (microdissection): Institute of Applied Microbiology, Justus-Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany. Phone: 49 641 9937354. Fax: 49 641 9937359. E-mail: Stefan .Ratering@agrar.uni-giessen.de. Mailing address for Michael Hupfer (poly-P bacteria): Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Müggelseedamm 310, D-12587 Berlin, Germany. Phone: 49 30 64181 605. Fax: 49 30 64181682. E-mail: hupfer@igb-berlin.de.

^v Published ahead of print on 2 May 2008.

further detection, separation, and identification of potential PAO in these samples.

Detection of PAO. Bacterial cells were extracted from activated sludge and sediment with sodium pyrophosphate (0.1%)[wt/vol]) by gentle sonication and shaking in an overhead shaker (level 3) (Reax 2; Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany) for 30 min. After 30 min of sedimentation, the supernatant was removed and sonicated, and the extracts were fixed in 99% ethanol (1:1 [vol/vol]). PAO were identified by examination of their intracellular poly-P granules, using epifluorescence microscopy (magnification, $\times 400$), after extracts were filtered onto a 0.2-µm polycarbonate filter (Nuclepore; Whatman, Germany) and stained with 5 μ g ml⁻¹ DAPI (4',6'-diaminido-2-phenylindole dihydrochloride) for 30 min. At this high DAPI concentration, poly-P granules show an intensive yellow fluorescence (36). This characteristic attribute was our criterion for cell separation via laser microdissection, which was performed within 48 h after DAPI staining.

Collection of PAO by laser microdissection. Laser microdissection and pressure catapulting were performed with a P.A.L.M. MicroBeam system in combination with a P.A.L.M. RoboMover controlled by P.A.L.M. RoboSoftware v2.0 (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Germany). The MicroBeam system included an Axiovert 200 M microscope (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany) equipped with a 100-W mercury lamp. The polycarbonate filters were inspected with an FS18 fluorescence filter (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Germany) at a magnification of ×400. Single bacterial cells with blue fluorescence and yellow poly-P granules were excised and catapulted into the lid of a 200-µl adhesive-cap tube (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Germany) under sterile conditions. For Lake Stechlin sediment, PAO were spread across the whole filter, from which ca. 100 individual cells were selected for phylogenetic analyses. In contrast, sewage sludge PAO often occurred in microcolonies and aggregates, and hence, more cells could be separated (>400 cells). Although single cells were excised, all cells of each sample were pooled in one tube for further phylogenetic analysis. As negative controls, pieces of a sterile polycarbonate filter were used.

DNA extraction and PCR. All molecular work was performed under sterile conditions in a laminar flow biosafety cabinet. Before and after work, the cabinet and all instruments were irradiated for several hours with UV light and cleaned with DNA decontamination reagent (DNA-ExitusPlus; Appli-Chem, Darmstadt, Germany). To ensure that no contaminating cells or DNA was present in the Palm adhesive caps or PCR tubes (Biopur Safe-Lock; Eppendorf, Hamburg, Germany), empty tubes were tested by PCR with universal bacterial 16S rRNA gene primers as described below. Since we obtained positive amplification from negative PCR controls for DNA extracted with a Qiagen Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) especially designed for laser microdissection, we extracted DNA from each sample directly in the capture cups. For this purpose, a sterile water-buffer solution was pipetted into the lids of adhesive-cap tubes containing either microdissected cells or negative controls.

With very small amounts of extracted DNA, contaminating DNA can have a large effect on PCR-based analyses. Therefore, in order to avoid this potential problem, DNA extraction and PCR buffers were incubated with DNase I (0.5 to 0.75 U) at room temperature for 12 min, followed by DNase inactivation by incubation at 95° C for 15 min.

In order to directly extract DNA, a DNase I-digested waterbuffer solution was pipetted into the lids of adhesive-cap tubes with either microdissected cells or negative controls. The water-buffer solution contained 10 μ l water, 1 μ l 10× PCR buffer (Qiagen, Hilden, Germany), and 0.75 U DNase I (AppliChem, Darmstadt, Germany) per sample. After pipetting of the DNase I-digested water-buffer solution onto the sample, the adhesive-cap tubes were vortexed with the lid upside down. Further cell-cracking steps were as follows: (i) centrifugation for 2 min at 16,000 × g, (ii) sonication for 2 min, (iii) centrifugation for 5 min at 16,000 × g, and (iv) freeze-thaw. Steps i to iii were performed at room temperature. For the freeze-thaw step, the tubes were incubated three times each for 3 min at 98°C and then in liquid nitrogen.

PCR amplification of 16S rRNA genes was performed using the bacterial primer pair 341f and 907r (30) (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany), as this primer set allows for a rough but rapid phylogenetic analysis. The reaction mixture contained 250 nM of each primer, 0.5 µg of bovine serum albumin (Roth, Karlsruhe, Germany), a 200 µM concentration of each deoxynucleoside triphosphate (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 2 mM MgCl₂, 1 µl of 10× PCR buffer, and 0.2 U HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). Ultrapure water (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany) was used to bring the reaction volume up to $11 \mu l$. Note that to avoid contamination by traces of Escherichia coli DNA, the PCR master mix was incubated with DNase I (final concentration, 0.51 U) at room temperature for 12 min, followed by a DNase inactivation and polymerase activation step at 95°C for 15 min.

Four microliters of the cell-cracked sample and 11 μ l of the DNase-digested PCR master mix were transferred into a new sterile Biopur Eppendorf cap. Both the DNase-digested waterbuffer solution and PCR master mix were checked for PCR amplification without the addition of template. Solutions showing DNA amplification were discarded. PCR amplification was performed in a Gradient Cycler PT200 instrument (MJ Research), using the following thermal profile: (i) initial denaturation at 95°C for 2 min, (ii) denaturation at 95°C for 1 min, (iii) annealing at 55°C for 40 s, (iv) extension at 72°C for 1 min 30 s (48 cycles of steps 2 to 4 were performed), and (v) final extension at 72°C for 10 min. Cooling down at 4°C completed the reaction.

The greater number and increased cell size of separated sewage sludge bacteria led to more extracted and amplified DNA than that obtained from Lake Stechlin sediments.

We also tested primer pair 8f and 907r to try to maximize PCR product length; however, this primer pair did not amplify Lake Stechlin sediment-derived DNA. For sewage sludge DNA, both primer pairs revealed PCR products but gave different results for phylogenetic community composition. Whereas members of the *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes* were detected with both primer sets, the primer pair 8f-907r additionally revealed the occurrence of members of the *Betaproteobacteria* and *Bacteroidetes*. This bias might be caused by differences in primer selectivity of the forward primer 8f (14), although detection of similar clones in Lake



FIG. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree of representative sequences derived from the 16S rRNA gene clone libraries for sewage sludge and Lake Stechlin sediment, using the primer pair 341f-907r. Sequences from this study are shown in bold. Sequences from sewage sludge are additionally marked by asterisks. GenBank accession numbers are given. The scale bar corresponds to 10 base substitutions per 100 nucleotide positions.

Stechlin sediment suggests that they may have a role in poly-P accumulation.

Other sources of error may have been (i) the undefined efficiency of the above-described DNA extraction procedure for environmental samples and (ii) the small amounts of PCR products obtained, especially for sediment samples, despite optimizing the PCR cycle number. Nevertheless, the protocol described above proved to be sufficient for cloning and subsequent phylogenetic analysis of microdissected cells, whether they were derived from sludge or sediment.

Clone libraries. For construction of clone libraries, the 16S rRNA gene PCR products obtained using the primer pair 341f and 907r were purified using SureClean (Bioline GmbH, Luck-enwalde, Germany) and then cloned into competent *E. coli* cells, using pGEM-T Easy vector system II (Promega GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's proto-

col. For each clone library, over 100 clones were picked and the plasmids purified with the Wizard Plus Minipreps DNA purification system (Promega GmbH, Mannheim, Germany). Clones with an incomplete insert and sequences of poor quality were excluded from further analyses. Between 72 and 84 clones of each clone library were processed for sequencing.

Sequencing and phylogenetic classification of PAO. For sequencing, a Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit and an ABI Prism 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) were used. The cloned 16S rRNA gene fragments were partially sequenced (about 400 to 550 bp for most and 250 to 300 bp for some) with primer M13f (29) or 341f. Phylogenetic classifications were determined by BLAST searches (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and the sequence classification tool of the Ribosomal Database Project RDP II (http://rdp.cme.msu.edu/). Clone libraries constructed

 TABLE 1. Phylogenetic classification of clones (obtained with primer pair 341f-907r) from sewage sludge and Lake Stechlin sediment^a

Sample and organism	No. of
	clones
Sewage sludge	
Alphaproteobacteria	
Paracoccus (5)	
Actinobacteria	
Micrococcus (11, 28)	
Propionibacterium (21)	
Propionicimonas	
Corvnebacterium (22)	
Rhodococcus (2, 35)	
Undefined Actinobacteria	
Firmicutes	
Clostridium (9)	6
Staphylococcus (28)	6
Unidentified organisms	1
I ake Stechlin sediment	
Alphanroteobacteria	17
Hyphophoteobacteria	17 4
Novosphingobium (12)	2
Undefined Alphaproteobacteria	
Retanroteohacteria	
Undefined Retarrateobacteria	
Gammanroteobacteria	1
Pseudomonas (34)	
<u>I seudomonus</u> (54)	
Actinobactoria	1
Microbacterium (15)	43
Provionibastorium (15)	11 20
<u>Tropionibucierium</u> (21)	20
Claviba et av	1
Callylowonga	1
<u>Undefined</u> Actively extension	I 1
Undefined Actinobacteria	1
Firmicules	
I nermicanus	
Bacteroiaetes	10
<u>Cnryseodacterium</u> (20)	2
Undefined Bacteroidetes	8
Unidentified organisms	4

^{*a*} Poly-P storage has been described for particular members of the taxa shown in bold. Members of the underlined genera have previously been detected in sewage sludge.

for PAO found in both sewage sludge and Lake Stechlin sediment were dominated by members of the Alphaproteobacteria and Actinobacteria (Fig. 1; Table 1). In Lake Stechlin sediment, a more diverse population of PAO was found, which is in accordance with the fact that sediments consist of different microniches and zones (37). In contrast, sewage sludge is more adept at harboring specific microbial communities due to its more uniform composition and conditions. In both samples, relatively large numbers of Propionibacterium-related sequences were found. Poly-P storage has been described previously for some members of the genus Propionibacterium and for the genus *Paracoccus*, which dominated the sludge clone library. Other known poly-P bacteria detected belonged to the genera Micrococcus, Rhodococcus, Corynebacterium, and Staphylococcus (present in the sewage sludge), as well as Pseudomonas (present in Lake Stechlin sediment). Since the full genome of "Candidatus Accumulibacter phosphatis" was recently studied by metagenomic analysis of an enrichment culture from enhanced biological phosphorus removal sludge

(27), it was slightly surprising that no trace of this bacterial group was found.

In summary, our study shows that PAO could be identified in both samples by use of laser microdissection and subsequent phylogenetic analyses of the excised cells. In addition to already known PAO, several new bacterial taxa for which poly-P storage has not yet been described were identified in the lake sediment clone library (e.g., the genera Hyphomicrobium and Microbacterium). However, the phylogenetic characterization of PAO is an indication of the potential ability to store poly-P and cannot be taken as evidence of a real physiological role. In this study, intracellular poly-P was visualized by DAPI staining only. Therefore, additional studies, preferably with cultures, are necessary to verify the intracellular presence and formation of poly-P in these bacterial groups. Furthermore, the development and use of highly specific oligonucleotide probes (e.g., for FISH) would reveal more detailed information about the relative abundances of PAO in natural bacterial communities and their contribution to the actual poly-P content measured. Nevertheless, our clone libraries suggest that poly-P accumulation by sewage sludge and sediment bacteria is a common feature to both bacterial communities.

The Palm MicroBeam technology coupled with molecular analyses is an excellent approach for the phylogenetic classification of hitherto unknown putative PAO from environmental samples.

Our results show that this approach is a powerful tool for direct identification of uncultured sediment and other aquatic bacteria with microscopically detectable specific features. This approach has the potential to select different bacterial groups from a variety of environments by using markers other than intracellular poly-P granules, e.g., intracellular polyhydroxybutyrate, FISH probes (medical microbiology [23]), or specific radiolabeled substrates (microautoradiography).

Nucleotide sequence accession numbers. The partial sequences of 16S rRNA genes obtained in this study were deposited in GenBank under accession numbers EU152875 to EU152914, EU196056 to EU196127, and EU515684 to EU515781.

We thank Peter Schmieder for his assistance with the nuclear magnetic resonance investigations carried out at the Research Institute of Molecular Pharmacology, Berlin, Germany. We also thank Christiane Herzog for her valuable help with chemical-analytical work and Monika Degebrodt for running the sequencer. Sylvia Schnell and Udo Jäckel (Institute of Applied Microbiology, University of Giessen) contributed to this study by their inspiring discussions. Gabriele Friedemann (Palm Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Germany) is thanked for her introduction to P.A.L.M. MicroBeam technology and for usage of P.A.L.M. instruments.

REFERENCES

- Ahn, J., S. Schroeder, M. Beer, M., S. McIlroy, R. C. Bayly, J. M. May, G. Vasiliadis, and R. J. Seviour. 2007. Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor. Appl. Environ. Microbiol. 73:2257–2270.
- Alvarez, H. M., F. Mayer, D. Fabritius, and A. Steinbüchel. 2004. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. Arch. Microbiol. 165:377–386.
- Angeles, G., J. Berrio-Sierra, J. P. Joseleau, P. Lorimier, A. Lefebvre, and K. Ruel. 2006. Preparative laser capture microdissection and single-pot cell wall material preparation: a novel method for tissue-specific analysis. Planta 224:228–232.
- Anslinger, K., B. Bayer, B. Mack, and W. Eisenmeyer. 2006. Sex-specific fluorescent labelling of cells for laser microdissection and DNA profiling. Int. J. Legal Med. 121:54–56.
- 5. Barak, Y., and J. van Rijn. 2000. Atypical polyphosphate accumulation by

the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. **66**:1209–1212.

- Burgemeister, R. 2005. New aspects of laser microdissection in research and routine. J. Histochem. Cytochem. 53:409–412.
- Curran, S., and G. I. Murray. 2002. Tissue microdissection and its applications in pathology. Curr. Diagn. Pathol. 8:183–192.
- de-Bashan, L. E., and Y. Bashan. 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). Water Res. 38:4222–4246.
- Dudley, D. J., M. N. Guentzel, M. J. Ibarra, B. E. Moore, and B. P. Sagik. 1980. Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. Appl. Environ. Microbiol. 39:118–126.
- Fernández-Medarde, A., A. Porteros, J. de las Rivas, A. Núñez, J. J. Fuster, and E. Santos. 2007. Laser microdissection and microarray analysis of the hippocampus of Ras-GRF1 knockout mice reveals gene expression changes affecting signal transduction pathways related to memory and learning. Neuroscience 146:272–285.
- Friedberg, I., and G. Avigad. 1968. Structures containing polyphosphate in Micrococcus lysodeikticus. J. Bacteriol. 96:544–553.
- Fujii, K., M. Satomi, N. Morita, T. Motomura, T. Tanaka, and S. Kikuchi. 2003. Novosphingobium tardaugens sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:47–52.
- Fujimura, S., S. Kato, M. Oda, M. Miyahara, Y. Ito, K. Kimura, T. Kawamura, M. Ohnuma, H. Tateno, and A. Watanabe. 2006. Detection of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain administered with yogurt drink in gastric mucus layer in humans. Lett. Appl. Microbiol. 43:578–581.
- Hicks, R. E., R. I. Amann, and D. A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6'-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. Appl. Environ. Microbiol. 58:2158–2163.
- Hollender, J., U. Dreyer, L. Kornberger, P. Kämpfer, and W. Dott. 2002. Selective enrichment and characterization of a phosphorus-removing bacterial consortium from activated sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:106–111.
- Hooper, L. V. 2004. Laser microdissection: exploring host-bacterial encounters at the front lines. Curr. Opin. Microbiol. 7:290–295.
- Huang, W. E., K. Stoecker, R. Griffiths, L. Newbold, H. Daims, A. S. Whiteley, and M. Wagner. 2007. Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function. Environ. Microbiol. 9:1878–1889.
- Hupfer, M., B. Rübe, and P. Schmieder. 2004. Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: a ³¹P NMR study. Limnol. Oceanogr. 49:1–10.
- Hupfer, M., S. Gloess, and H.-P. Grossart. 2007. Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments. Aquat. Microb. Ecol. 47:299–311.
- Kämpfer, P., U. Dreyer, A. Neef, W. Dott, and H.-J. Busse. 2003. Chryseobacterium defluvii sp. nov., isolated from wastewater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:93–97.
- Kjeldstad, B., M. Heldal, H. Nissen, A. S. Bergan, and K. Evjen. 1991. Changes in polyphosphate composition and localization in *Propionibacterium* acnes after near-ultraviolet irradiation. Can. J. Microbiol. 37:562–567.
- 22. Klauth, P., S. R. Pallerla, D. Vidaurre, C. Ralfs, V. F. Wendisch, and S. M.

Schoberth. 2006. Determination of soluble and granular inorganic polyphosphate in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 1099–1106.

- Klitgaard, K., L. Molbak, T. K. Jensen, C. F. Lindboe, and M. Boye. 2005. Laser capture microdissection of bacterial cells targeted by fluorescence in situ hybridization. BioTechniques 6:864–868.
- Kong, Y. H., J. L. Nielsen, and P. H. Nielsen. 2005. Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. Appl. Environ. Microbiol. 71:4076–4085.
- 25. Layton, A. C., P. N. Karanth, C. A. Lajoie, A. J. Meyers, I. R. Gregory, R. D. Stapleton, D. E. Taylor, and G. S. Sayler. 2000. Quantification of Hyphomicrobium populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66:1167–1174.
- Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65:1289–1297.
- 27. Martin, H. G., N. Ivanova, V. Kunin, F. Warnecke, K. W. Barry, A. C. McHardy, C. Yeates, S. M. He, A. A. Salamov, E. Szeto, E. Dalin, N.-H. Putnam, H. J. Shapiro, J. L. Pangilinan, I. Rigoutsos, N. C. Kyrpides, L. L. Blackall, K. D. McMahon, and P. Hugenholtz. 2006. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. Nat. Biotechnol. 24:1263–1269.
- Melasniemi, H., A. Hernesmaa, A. S.-L. Pauli, P. Rantanen, and M. Salkinoja-Salonen. 1998. Comparative analysis of biological phosphate removal (BPR) and non-BPR activated sludge bacterial communities with particular reference to *Acinetobacter*. J. Ind. Microbiol. 21:300–306.
- 29. Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. 101:20-78.
- Muyzer, G., and N. B. Ramsing. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. Water Sci. Technol. 32:1–9.
- Orphan, V. J., C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan, and E. F. DeLong. 2001. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. Science 293:484–487.
- Ouverney, C. C., and J. A. Fuhrman. 1999. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. Appl. Environ. Microbiol. 65:1746–1752.
- Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell. 2000. Stableisotope probing as a tool in microbial ecology. Nature 403:646–649.
- Sidat, M., F. Bux, and H. Kasan. 1999. Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. Water SA 25:175–179.
- Stratton, H. M., P. R. Brooks, P. C. Griffiths, and R. J. Seviour. 2002. Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foam. J. Ind. Microbiol. 28:264–267.
- Streichan, M., J. R. Golecki, and G. Schön. 1990. Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal. FEMS Microbiol. Ecol. 73:113–124.
- Tankéré, S. P. C., D. G. Bourne, F. L. L. Muller, and V. Torsvik. 2002. Microenvironments and microbial community structure in sediments. Environ. Microbiol. 4:97–105.

A2. METHODS FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF POLYPHOSPHATE AND POLYPHOSPHATE ACCUMULATING MICROORGANISMS IN AQUATIC SEDIMENTS.

Hupfer, M., Glöss, S., Schmieder, P. & Grossart, H.-P. (2008): *International Review of Hydrobiology*. Vol. 93, pp. 1-30.

Internat. Rev. Hydrobiol. **93** 2008 1 1–30

DOI: 10.1002/iroh.200610935

MICHAEL HUPFER^{*,1}, STEFANIE GLÖSS¹, PETER SCHMIEDER² and HANS-PETER GROSSART¹

¹Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Müggelseedamm 310, D-12561 Berlin, Germany; e-mail: hupfer@igb-berlin.de

² Research Institute of Molecular Pharmacology, Robert-Rössle-Straße 10, D-13125 Berlin, Germany

Review

Methods for Detection and Quantification of Polyphosphate and Polyphosphate Accumulating Microorganisms in Aquatic Sediments

key words: phosphorus diagenesis, polyphosphate accumulating organisms (PAO), activated sludge, ³¹P-NMR, molecular methods

Abstract

It has been speculated that the microbial P pool is highly variable in the uppermost layer of various aquatic sediments, especially when an excessive P accumulation in form of polyphosphate (Poly-P) occurs. Poly-P storage is a universal feature of many different organisms and has been technically optimised in wastewater treatment plants (WWTP) with enhanced biological phosphorus removal (EBPR). In the recent past, new insights into mechanisms of P elimination in WWTP almost exclusively depended on the development and application of novel methods like ³¹P-NMR spectroscopy and molecular methods for identifying Poly-P accumulating microorganisms (PAO). The aim of the present review is to compile current methods potentially available for detection and quantification in natural sediments. The most powerful tool for reliable Poly-P quantification in sediments is the liquid ³¹P-NMR technique which has been successfully used for Poly-P measurements in a variety of aquatic sediments. But the microorganisms as well as mechanisms involved in Poly-P storage and cycling are largely unknown. Therefore, we also intend to stimulate future studies focusing on these encouraging topics in sediment research via the implementation of novel methods.

1. Introduction and Motivation

1.1. Microbial P Fixation in Aquatic Sediments

Recent literature shows that phosphorus (P) release from various aquatic sediments into the ambient water is a more complex process than previously described by the pioneering work of EINSELE and MORTIMER (EINSELE, 1936; MORTIMER, 1941). Microbially induced changes in pH and redox potential strongly affect the ability of lake sediments to bind inorganic P (RODEN and EDMONDS, 1997; GÄCHTER and MÜLLER, 2003). In addition, sediment bacteria regenerate inorganic nutrients through decomposition of particulate organic matter (BOSTRÖM *et al.*, 1988; WETZEL, 1999). Given the high activity and the high number of microorganisms (UHLMANN *et al.*, 1998; HAGLUND *et al.*, 2003) in aquatic surface sediments a substantial portion of P must be stored in microbial cells in form of nucleic acids, phospholipids, sugar phosphate, and other organic P compounds. Therefore, some authors have

* Corresponding author

The review is dedicated to Professor Dietrich Uhlmann in Dresden (Germany) for his inspiring approach to link researches on aquatic ecosystems and sewage purification.



© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 1434-2944/08/1-01-1

speculated that microorganism are directly involved in the exchange of P across the sediment water interface by changing their intracellular P pools (*e.g.*, BOSTRÖM *et al.*, 1988; GÄCHTER and MEYER, 1993; DAVELAAR, 1993; INGALL and JAHNKE, 1997; SANNIGRATHI and INGALL, 2005). Other authors, however, doubt or ignore the relevance of microbial biomass as an important link for P cycling in sediments (*e.g.*, GOLTERMAN, 2004).

An obvious approach to evaluate the contribution of bacteria to the total P pool in sediments are estimations based on bacterial numbers, organic carbon content, and C:P ratios (e.g., GÄCHTER et al., 1988; LACZKO, 1988; BOSTRÖM et al., 1989; GÄCHTER and MEYER, 1993; GOLTERMAN, 2004). Unfortunately, specific cell volume, carbon content per biovolume, and C:P ratios are extremely variable both within and between bacterial species. This leads to enormous uncertainties of such estimations. Additionally, sharp gradients in bacterial abundance and biomass in the uppermost layers of lake sediments further complicate the precise determination of the microbial P pool in aquatic sediments. Nevertheless, recent literature indicates that bacteria contribute to a significant portion of total organic carbon and, hence, P pool in lake sediments. Data on total counts of bacteria by epifluorescence microscopy even range in orders of 10⁹ and 10¹¹ cells g⁻¹ dry weight (dw) whereas the carbon content amounts to up to 20% (SCHALLENBERG and KALFF, 1993; GÄCHTER et al., 1988). Bacterial P contents given in the literature have been comprehensively summarized by GÄCHTER and MEYER (1993) and ranges between 4 and 42 μ g P mm⁻³ biomass. The atomic C:P ratios of bacteria vary with their physiological state and P availability (CHRZANOWSKI et al., 1996; VADSTEIN et al., 2003). Hence, typical mean atomic C:P ratios in aquatic bacteria vary from 28 (VADSTEIN et al., 1988), 44 (CHRZANOWSKI et al., 1996), 48 (FENCHEL and BLACKBURN, 1979) to 50 (FAGERBAKKE et al., 1996). These ratios normally exclude an excessive accumulation of P in form of Poly-P. Using data of Bell and Ahlgren (1987), GÄCHTER et al. (1988), LACZKO (1988) and GOEDKOOP and PETTERSSON (2000) the calculated contribution of bacterial biomass to the total P in surficial lake sediments (≤ 1 cm) of Swiss and Swedish lakes ranged between 2.2 and 52.5%. BOSTRÖM et al. (1989) found that 11% of total P is bound in the biomass P in the sediment of Lake Vallentunasjön. In their investigation, however, the microbial biomass was strongly dominated (60-90%) by cyanobacteria (Microcystis wesenbergii and M. viridis) and therefore may be not representative for other lake sediments. An outlier in this context is the calculation of GOLTERMAN (2004). For a hypothetical sediment he applied extremely low bacterial numbers (10^8 bacte) ria g⁻¹ dw based on findings by KUSNETSOV, 1970) and low biomass to volume ratios but a very high bacterial C:P ratio of 129. Consequently, in his calculation the content of bacterial carbon and P in the sediment is up to three orders of magnitude lower than in the above cited studies. The contribution of bacteria to total organic C and total P decreases with increasing sediment depth (e.g., GÄCHTER et al., 1988; LACZKO, 1988) and bacterial numbers at the sediment surface are highly variable throughout the season (BOSTRÖM et al., 1989; BRUNBERG, 1995). Huge changes in cell-bound P occur in parallel to changes in bacterial physiology, thus, growth and death of bacteria may lead to varying dynamics of P uptake and release in sediments.

Experimental data (GÄCHTER *et al.*, 1988; WAARA *et al.*, 1993; BRUNBERG, 1995), theoretical considerations (DAVELAAR, 1993; GÄCHTER and MEYER, 1993), and detection of linear Poly-P in limnetic sediments (HUPFER *et al.*, 2004; CARMAN *et al.*, 2000; REITZEL *et al.*, 2006a, b) give some indications that sediment microorganisms are involved in temporary P fixation by Poly-P synthesis and storage. A sudden increase in concentration of pore water P, which even resulted in authigenic mineral formation in various marine sediments, has been explained by bacterial Poly-P hydrolysis during changing redox conditions (SCHULZ and SCHULZ, 2005). Hence, differences in reaction kinetics should be considered when comparing biologically and chemically mediated redox effects on P mobilisation. Speculations that Poly-P storing bacteria are involved in P fixation in sediments are supported by observations in waste water treatment plants with enhanced biological P elimination (WWTP/EBPR).

1.2. Analogies between Poly-P Storage in Activated Sludge and in Aquatic Sediments

Oscillating redox conditions in WWTP/EBPR favour the growth of Poly-P accumulating organisms (PAO) which are responsible for a high biological P elimination (SEVIOUR et al., 2003). According to a conceptual model of COMEAU et al. (1986) the energy of Poly-P hydrolysis under anaerobic conditions is used to take up labile organic carbon sources (e.g., b. c)low molecular fatty acids, alcohols, and sugars) and to store them in form of polyhydroxyalkanoates (PHA), e.g., Poly-β-hydroxybutyrate (PHB). This enables some aerobic bacteria to implement an "emergency energy supply" for the maintenance of important cellular functions. In the subsequent aerobic phase, bacteria use the stored PHB as a source of carbon and energy for growth and other cellular functions including Poly-P re-synthesis. The exact mechanism for the observed excessive P enrichment in activated sludge has been controversially discussed in the literature for a long time. Some researchers have even doubted the biological nature of the observed P enrichment in activated sludge, favouring an explanation based on physicochemical mechanisms including complex interactions with biological processes (e.g., ARVIN, 1985). In the recent past, new insights into the functioning of P elimination in WWTP/EBPR were strongly linked to the development of novel methods like ³¹P-NMR and molecular biological methods for the detection of Poly-P and microorganisms responsible for biological P elimination (SERAFIM et al., 2002). Today, it is well accepted that PAO are the main actors of P removal in WWTP/EBPR and that Poly-P and carbon metabolisms are strongly coupled with each other (see review of SEVIOUR, 2003). It is clear that the ecotechnological process of biological P removal uses the potential of naturally occurring organisms by optimisation of their environmental condititions. Comparable natural habitats in aquatic ecosystems are aggregates in the water column and in the benthic "fluffy layer".

It is assumed that fluctuating redox conditions prevailing at the sediment-water interface may also favour Poly-P storing heterotrophic bacteria (DAVELAAR, 1993; GÄCHTER and MEYER, 1993). This agrees with the classical work of HöLL (1930) who postulated that some lake sediments could be considered as "natural activated sludge". The analogies between activated sludge and sediment surface in natural aquatic systems are simplified in Figure 1. Changing redox conditions in activated sludge are technically realised by transporting sludge from one to another reactor. Redox conditions at the sediment surface, however, are changed by natural processes without translocation of particle associated bacteria. Lake sediments usually comprise chemical gradients with strong vertical zonation of electron donors and acceptors. The resulting redox gradient leads to an ecologically well-defined distribution of microbial populations (HANSELMANN, 1986). The most likely ecological niches of Poly-P storing bacteria in sediments are micro-zones where oxygen and/or nitrate are simultaneously available from the overlying water and labile organic matter like short chain organic acids is introduced from deeper sediment horizons. Variations in redox gradients frequently occur and are controlled by hydrodynamic conditions in the overlying water, e.g., stratification of the water body, bioturbation, and sedimentation events of organic matter rich particulates. Hence, redox fluctuations may occur sporadically or even in regular temporal patterns. Such habitats could be (1) littoral surface sediments with diurnal changes of oxygen concentration, (2) the uppermost layer of profundal sediments with changes of oxygen availability and supply with organic matter, and (3) microzones around macrophytes roots and macrozoobenthos tubes. These and other possible processes for the ocurrence of Poly-P at the sediment surface of aquatic ecosystems are summarised in FARRELLY et al. (in press).

The often-proposed parallelism between Poly-P storing organisms in benthic habitats and activated sludge systems seems to be likely but direct proofs are still scarce. Yet, it is not clear whether environmental conditions in the sediment favour Poly-P storage and whether Poly-P in sediments may originate from benthic or pelagic heterotrophic and autotrophic organisms. The scepticism of some authors with respect to excessive microbial P storage is

M. HUPFER et al.



Figure. 1. Simplified model of bacterial Poly-P accumulation in activated sludge systems with EBPR (left). Alternating redox conditions are obtained by the transport of waste water between an anerobic and an aerobic reactor in an optimized temporal regime. Similar conditions may occur at the sediment surface (right) by small scale shifts of the redox boundary layer but presumably in an irregular temporal pattern (right). SCFA – short chain fatty acids. For detailed explanations see text.

mainly based on lacking or inaccurate methods for detecting Poly-P in sediments (GOLTER-MAN, 2006). However, by using similar or even identical methods, which have been applied in WWTP/EBPR, it is in principal possible to determine the importance of microbial P storage and to identify key-organisms also in natural sediments. Until now it is still a mystery whether PAO known from Poly-P storage in activated sludge are also present in natural sediments and if yes, which role they play there.

Since Poly-P storage in WWTP/EBPR has been intensively investigated throughout the last four decades by utilizing a wide range of methods, we aim to evaluate the most promising methods for their potential application in future sediment studies. We have supplemented the review by yet unpublished results for testing some of the methods for their applicability in sediment research.

2. Methods for Visualisation of Poly-P in Environmental Samples

2.1. Light and Epifluorescence Microscopy (Cytochemical Methods)

Granules in microorganisms were termed as "metachromatic" or "volutin granules" named after *Spirillum volutans* (GRIMME, 1902) and their high affinity to cationic stains. Light absorption significantly changes when cationic stains strongly bind to the anionic "volutin granules" which allows to differentiate between cells and "volutin granules" after staining. Today we know that some granules consist of Poly-P. Neisser (GURR, 1965), Loeffler's Methylen Blue (MURRAY *et al.*, 1994), and Toluidine Blue staining (ONDA and TAKII, 2002) are among the most commonly used cytochemical methods to document the presence of Poly-P with light microscopy. When using Loeffler's Methylen Blue or Toluidin Blue, Poly-P appears to be pink-violet on a blue cell background. The characteristic positive reaction of the Neisser staining method is a purple-black granule in a yellowish-brown background of counterstained cells. The latter procedure is more effective than other light microscopic staining techniques since it yields the highest contrast between granules and cells. We have also found Neisser positive spots in sediment bacteria indicating that Poly-P storage is occurring in these bacteria. Figure 2 (A and B) compares filamentous bacteria in activated sludge with those in sediments from a drinking water reservoir. The common DNA stain "DAPI" (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dehydrochloride) also stains Poly-P granules with an intensive yellow fluorescence when used at high concentrations (>20 μ g mI⁻¹, TUSSEN *et al.*, 1982; STREICHAN *et al.*, 1990). The DAPI staining is not highly specific for Poly-P granules since other polymeric ions such as lipids also show yellow fluorescence after DAPI staining. However, the lipid fluorescence signal is relatively weak and may fade in a few seconds (STRE-ICHAN *et al.*, 1990). The presence of Poly-P metabolisms can be also visualized after staining the lipid-like polyhydroxybutyrate (PHB) by Nile Blue and Sudan Black (MURRAY *et al.*,



Figure 2. Microscopic observations of Poly-P like granules in microorganisms of activated sludge and lake sediments. Light microscopic investigations of Neisser-stained samples of (A) activated sludge in a WWTP in Mondsee and (B) sediment of the Radeburg reservoir (laboratory experiment). Epifluorescence microscopy investigations of DAPI-stained samples of activated sludge in (C) a laboratory scale plant Bad Liebenwerda and (D) surface sediment (0–0.5 cm) of Lake Kleiner Montiggler See (modi fied from HUPFER, 1993).

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

1994). For differentiation between PHB and Poly-P double staining techniques were developed (REES *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 2001). Figure 2 (C and D) represents two epifluorescence images after DAPI staining which demonstrate that bacteria from activated sludge and lake sediments are characterized by several yellow cellular inclusions (presumably Poly-P). Quantification of Poly-P by any of the mentioned staining techniques is not reliable since all available dyes are rather unspecific. In addition, many bacteria in aquatic systems are rather small which further limits detection of cellular Poly-P inclusions by these methods. Hence, the use of cytochemical methods alone has to be judged with caution (see review SERAFIM *et al.*, 2002).

2.2. Electron Microscopy in Combination with Energy Disperse X-Ray Analysis

Combining electron microscopy (EM) with energy dispersive X-ray analysis (EDX) allows direct quantification of dry mass and elemental contents of individual cells and their inclusions (Heldal et al., 1993; Goldberg et al., 2001; Pallerla et al., 2005). By using the EM-EDX technique first evidences of intracellular Poly-P granules and other P enrichments have been provided for cultivated bacteria (SICKO-GOAD et al., 1975; BAXTER and JENSEN, 1980) and for activated sludge (BUCHAN, 1981). Poly-P granules are visible as electron dense structures, which are darker than the surrounding cell material. P shows a characteristic X-ray radiation that can easily be detected by a conventional EDX-spectroscopy system for elements with an atomic number higher than 10. The method allows the concurrent determination of several elements in the microanalysis mode at a defined local position or in the mapping mode giving the elemental distribution in an extended section (e.g., RÖSKE et al., 1995). The relative concentration of various elements can be estimated from the peak intensity in the X-ray spectra using an internal calculation programme (KRIVTSOV et al., 2005). Homogenised samples are directly put onto a grid coated with a carbon film (SCHÖN-BORN et al., 2001; UHLMANN and BAUER, 1988) or are fixed in glutaraldehyde, dehydrated, and embedded in a resin to prepare ultra-thin sections (e.g., STREICHAN et al., 1990; BODE et al., 1993; GOLDBERG et al., 2001; EIXLER et al., 2005). The low mass of some elements in the ultra-thin section of cells demands the use of more sensitive techniques for elemental analysis, e.g., electron energy loss spectroscopy (EELS; BODE et al., 1993; BUCKING et al., 1998). In general, excessive preparation techniques for X-ray analysis should be avoided because of unpredictable losses of P and other elements from cells (HELDAL, 1993; BRUN-BERG, 1995). Number and size of Poly-P granules inside cells are highly variable. Electron microscopy has been frequently used to determine the localisation of Poly-P inside the cell. Poly-P in elevated concentrations has been observed in the cell's periplasm, on the surface, and in the cytoplasm (SERAFIM et al. 2002). The observed maximum diameters of Poly-P granules ranged between 0.3 µm for planktonic bacteria (JENSEN and CORPE, 1993), 0.4 µm in cultivated Microcystis aeruginosa (JACOBSON and HALMANN, 1982), 0.4 µm for Acinetobacter strain 210 A (BONTING et al., 1993a), and even 1.5 µm for activated sludge bacteria (SCHÖNBORN et al., 2001). Many investigations of activated sludge samples have shown that bacteria involved in removal of excess P may differ considerably in their morphology and metabolisms (BUCHAN, 1981; STREICHAN et al., 1990). Ca, Mg, and K are the other main elements of Poly-P granules (BONTING et al., 1993a; SCHÖNBORN et al., 2001; GOLDBERG et al., 2001). These cations presumably act as counter-ions of the P-anions. Studies in a laboratory-scale plant by SCHÖNBORN et al. (2001) suggest that Poly-P stabilized by Mg and K is involved in release and uptake of P whereas Ca-stabilized Poly-P is stable even under changing redox conditions. This notion is supported by the fact that both Mg and K are released and taken up simultaneously with P in activated sludge (PATTARKINE and RANDALL, 1999). An example of Poly-P in microorganisms from activated sludge using X-ray analysis is shown in Figure 3A.



Figure 3. PAO in activated sludge and lake sediment visualised by combined electron microscopy (TEM) and X-ray spectroscopy. (A) Activated sludge from the laboratory scale plant Bad Liebenwerda (modified from Röske and UHLMANN 1992). (B) First direct evidence of Poly-P storing microorganisms in the surface sediment (0–1 mm) of the Saidenbach Reservoir (10 m water depth, 30 September 1987, section of a Fig. in UHLMANN and BAUER 1988). Both X-ray analyses (spectrometer KEVEX-7000) of granules (see white triangles) demonstrate that phosphorus is the element with the highest mass density. The Cu peak is caused by the grid material.

UHLMANN and BAUER (1988) were the first to provide evidence of Poly-P storing bacteria in sediments. Figure 3 B shows a transmission electron microscopy (TEM) micrograph of a bacterium from the sediment surface of the Saidenbach Reservoir with a P rich granule. The Ca:P ratio found in these Poly-P granules substantially differs from that in minerals (UHLMANN and BAUER, 1988). In many cells, however, no Poly-P accumulation could be found. Until now, bacteria with P rich inclusions have been detected in our own investigations in the sediments of numerous lakes. These Poly-P storing bacteria greatly differ in size



Figure 4. Transmission electron microscopy (TEM) micrographs of bacteria with Poly-P granules (X-ray microanalysis shows P in the highest intensity) from the sediment surface (0–0.5 cm) of several European lakes. (A/B) Lake Arendsee/GER, 9 November 1994, 48 m water depth, (C) Lake Baldegg/CH, 23 September 1993, 40 m, (D) Lake Baldegg/CH, 3 November 1993, 67 m, (E) Lake Baldegg, 22 February 1994, 40 m, (F) Lake Kleiner Montiggler See/I, 28 September 1990, 10 m, (G) Reservoir Saidenbach/GER, 30 November 1993, 45 m, (J) Lake Rotsee/CH, 13 April 1994, 16 m, (I) Lake Zürich/CH, 30 June 1994, 133 m (Scales equal 1 μm).

and morphology (Fig. 4) and sometimes resemble those found in activated sludge (*e.g.*, bacteria containing two Poly-P granules at their polar part). Similar to findings in activated sludge samples Ca was found as a counter-ion for Poly-P (HupFER *et al.*, 1995). The high abundance of Poly-P storing microorganisms in several sediment samples is shown in Figure 4 and is in good accordance with distinct signals of Poly-P measured by ³¹P-NMR in the same sample (compare HupFER *et al.*, 2004). However, quantification of the microbial Poly-P content in a whole sediment sample by electron microscopy remains impossible.

In general, the combined EM and X-ray analysis is a reliable method to confirm the existence of PAO in a sample and enables one to detect P rich inclusions in biological structures. By using ³¹P-NMR PALLERLA *et al.* (2005) have corroborated that Poly-P was the major constituent in P rich granules separated from *Corynebacterium glutamicum*. Contrary to this, HENSGENS *et al.* (1996) have investigated the inclusions in the sulphate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas* by X-ray analysis and concluded that P-rich granules do not only consist of Poly-P but also of other P compounds. The analysis of isolated granules by ³¹P-NMR, gel electrophoresis, and chromatography demonstrates that these granules contain α glucose 1, 2, 3, 4, 6 pentakis (diphosphate). Therefore, the exact identification and reliable quantification of Poly-P in natural samples require additional physico-chemical methods.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

3. Methods for Quantification of Poly-P in Environmental Samples

3.1. Extraction Procedures

Since the 1950s several extraction procedures for Poly-P have been tested for various biological samples (*e.g.*, LANGEN and LISS, 1958; FITZGERALD and NELSON, 1966). A wide variety of fractionation methods has been proposed to distinguish between different intracellular P compounds as well as between chemically precipitated and biologically stored P (*e.g.*, MINO *et al.*, 1985; DE HAAS *et al.*, 2000).

Discrimination between chemical and biological bound P in activated sludge has been performed by UHLMANN *et al.* (1990) and RÖSKE and SCHÖNBORN (1994) using a modified fractionation method of PSENNER *et al.* (1984). This method was initially developed for lake sediments and includes a five step sequential fractionation to distinguish the following fractions: (1) Loosely adsorbed P and P in pore water (H₂O),

(2) Reductant-soluble P mainly bound to Fe-hydroxides (BD-P),

(3) P bound to Fe- or Al-oxides (NaOH-soluble reactive P),

(4) Organic P and inorganic intracellular P (NaOH-non reactive P),

(5) P bound to carbonates and in apatite (HCl-P).

P in the remaining fraction is rather refractory and can easily be determined after digestion. In combination with ³¹P-NMR UHLMANN et al. (1990) found that the dominant NaOHsoluble reactive P fraction of activated sludge from WWTP/EBPR mainly contains Poly-P. Figure 5 shows the comparison of P fractions (Psenner-scheme) of a Poly-P storing culture of Acinetobacter 210 A, of activated sludge from a laboratory-scale plant with EBPR, and of activated sludge of a WWTP with combined biological and chemical $(Fe_2(SO_4)_3)$ P elimination. Most P in biological samples (culture and activated sludge were obtained from a laboratory scale plant in Bad Liebenwerda) is detected as non-reactive P (NRP) in the NaOH-extract. NRP is the difference between total P and soluble reactive P (SRP) detectable with the molybdenum-blue standard method. In the WWTP of Münchehofe, however, more than 60% of the extracted P was bound as reductive soluble P (iron bound P). The NaOH-NRP fraction from activated sludge without iron addition was the most variable fraction under alternating redox conditions. From this and other investigations we conclude that Poly-P represents an important fraction of NaOH-NRP of conventional P extraction procedures, especially in aquatic sediments. In addition, dissolved Poly-P is detectable as non-reactive P, which can be demonstrated by the addition of pure Poly-P to the sediment (HUPFER et al., 1995). However, the NaOH-NRP is not considered to be a reliable measure for Poly-P since several organic P forms are also part of the NaOH-NRP fraction. This has been shown by ³¹P-NMR measurements of NaOH extracts of activated sludge and sediments (see Figure 5). In lake sediments a substantial portion (up to 50%) of non-reactive P was identified as Poly-P (HUPFER et al., 1995). The simple hot extraction (100 °C, 1 h) according to FITZGERALD and NELSON (1966) agrees well with the NaOH-NRP fraction (UHLMANN et al., 1990) in samples of activated sludge. In hot water, however, a substantial portion of Poly-P is already hydrolysed to ortho-P. In activated sludge with iron addition the hot water extract greatly underestimates the real Poly-P content because of precipitation of ortho-P and Poly-P fragments. Similar underestimations can also be expected when using the hot water extraction for aquatic sediments with high amounts of inorganic P binding sites.

WAARA *et al.* (1993) have carried out laboratory experiments with the bacterial isolate *Pseudomonas* sp. exposed in sediments of Lake Vallentunasjön. An increasing bacterial biomass stimulated by glucose addition led to a ca. 30% increase in the NaOH-NRP fraction. In laboratory experiments with and without additions of *Microcystis* sp. BRUNBERG (1995) demonstrated that variations in bacterial biomass and cellular P content cause measurable changes of total P in the sediment (especially of the NaOH-NRP fraction). This notion is supported by findings from laboratory experiments with sediments of Lake Erken (TÖRN-

M. HUPFER et al.



□ CW-P ■ BD-P ■ NaOH-SRP ■ NaOH-NRP ■ HCI-/Res-P

Figure 5. Contribution of different P binding forms to total phosphorus, determined by sequential fractionation according to PSENNER *et al.* (1984) (A) *Acinetobacter* 210A, (B) WWTP Münchehofe with addition of $Fe_2(SO_4)_3$, (C) Laboratory plant with EBPR Bad Liebenwerda, anaerobic stage, and (D) aerobic stage. For further explanations see text.

BLOM and RYDIN, 1998). Microbial activity and bacterial biomass production immediately increased in response to the deposition of seston and resulted in increasing SRP uptake rates from the overlying water and an increase in the NaOH-NRP pool at the sediment surface. These results are further supported by GOEDKOOP and PETTERSSON (2000) who found a significant relationship between seasonal changes in bacterial biomass and in the NaOH-NRP fraction in sediments of the same lake. Since the amount of NaOH-NRP and chlorophyll *a* correlate well in settling seston, discrimination between potential P uptake by bacteria and the supply with phototrophic organisms via sedimentation is difficult. Their general conclusion, however, that NaOH-NRP is a "conservative measure of Poly-P" is too far-reaching.

For a detailed differentiation and determination of Poly-P fractions more refined and adapted extraction procedures with no or little changes of the Poly-P pool are necessary.

3.2. Basic Dyes

In addition to the direct visualisation of Poly-P (chapter 2.1), stains such as Toluidine Blue can be used for photometric quantification of Poly-P (LORENZ and SCHRÖDER, 1999). A solution of Toluidine Blue has an absorption maximum at 630 nm but only shows a second peak at 530 nm in the presence of Poly-P. Hence, calculating the absorbance ratio between 530 and 630 nm allows for quantification of Poly-P. Disadvantages of this method are:

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- (1) The chain length of Poly-P must be higher than 10 to show a sufficient metachromatic reaction.
- (2) Interactions between the dye and Poly-P are influenced by several compounds competing with the binding to Poly-P. Our own tests have shown that ionic strength above a critical value suppressed the reaction whereas high pH values led to a reaction even without the presence of Poly-P.

LORENZ *et al.* (1997) described a method for the quantification of Poly-P by Mn^{2+} induced quenching of the fluorescence of the calcium indicator Fura-2. Poly-P competes with the metal ion indicator Fura-2 for the binding sites of the metal ions and causes a change in the fluorescence signal. The effect of Mn^{2+} ions is gradually diminished in the presence of increasing Poly-P concentrations. Furthermore, the effect of Poly-P on Mn^{2+} induced quenching is increased with decreasing chain length. Therefore, a major advantage of the Fura-2 method in comparison to the Toluidine Blue method is the ability to reliably measure pyrophosphate, tripolyphosphate, and other short-chain Poly-P fractions. This technique allows the simultaneous processing of large quantities of samples (*e.g.*, through a plate reader) and, alternatively, the detection of Poly-P after extraction or chromatographic separation (LORENZ and SCHRÖDER, 1999). A disadvantage of this method for Poly-P quantification, however, is the dependency of Mn^{2+} induced quenching of Fura-2 fluorescence on the chain lengths. Furthermore, applications of basic dyes for the quantification of Poly-P in environmental samples have yet to be performed.

3.3. Enzyme Assays

The use of Poly-P dependent enzyme reactions offers the possibility to detect and quantify Poly-P with high specificity and sufficient sensitivity (LORENZ and SCHRÖDER, 1999, KULAEV et al., 2004). Concentrations of Poly-P have been successfully determined by application of Poly-P glucokinase from Propionibacterium shermanii (CLARK et al., 1986). The formed glucose-6-phosphate is stoichiometrically converted by the glucose-6-phosphate dehydrogenase and the resulting concentration of NADPH can be measured with high sensitivity. To further increase the sensitivity of enzymatic reactions, radioactive substances can be used in combination with different separation techniques such as thin-layer chromatography or gel electrophoresis (LORENZ and SCHRÖDER, 1999). VAN GROENESTIIN et al. (1987) also developed an enzyme assay for activity measurement of the Poly-P AMP phosphotransferase (PPAPT) from Acinetobacter strain 210A which is a key enzyme for the formation of ATP from Poly-P. This approach is alternatively used for the indirect determination of Poly-P. The exact reaction scheme is given in Figure 6. Assuming that all enzymes and chemicals are available in surplus, the produced NADPH₂ directly correlates with the initial pool of dissolved Poly-P. The Poly-P concentration is then calculated from the final concentration of NADPH₂ or the reaction rate. The determination of the ADP concentration might even shorten the assay.

The residuals of Poly-P in cell-free extracts need to be eliminated by a pre-extraction procedure and the reaction rates depend on the chain lengths of Poly-P (BONTING *et al.* 1991). Our own measurements confirm that Poly-P of higher chain length (up to 35 molecules) is faster degraded than Poly-P with chains lengths of only 2 and 3. An inhibition by shorter Poly-P, however, was not observed. Calibration tests show that the method allows quantification of Poly-P concentrations higher than 1 mg P L⁻¹ (Fig. 6). Preliminary comparisons between hot water and NaOH extracts of activated sludge were in good agreement with ³¹P-NMR measurements when the shortening of Poly-P average chain length in the NaOH extract to only 6 was taken into account. In contrast to ³¹P-NMR measurements, the PPAPT method requires smaller sample volumes and results in a *ca*. one order of magnitude higher sensitivity. However, the PPAPT method still includes several uncertainties such as a) reduced reliability in the presence of a mixture of Poly-P chains with different length and b) interferences with the



Figure 6. Calibration curves (maximum extinction of NADPH₂) for the quantitative determination of Poly-P 35 (Sigma, chain length 35) and Graham salt (sodium Poly-P, Merck, mean chain length 20) by using the Poly-P to AMP phosphotransferase (PPAPT) assay according to VAN GROENESTUN *et al.* (1987). The transformation of Poly-P to NADPH is catalysed by the following enzymes: AK – adenylate kinase, HK – hexokinase, G6PDH – glucose-6-P-dehydrogenase (from HuPFER *et al.*, 1996).

matrix of the extracts. Further tests of the PPAPT method are needed for reliable Poly-P determination in extracts of natural samples such as activated sludge and lake sediments.

3.4. Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

The ³¹P-NMR spectroscopic technique was used for the detection and study of Poly-P in different organisms, including bacteria, yeasts, fungi, and algae (*e.g.*, NAVON *et al.*, 1977; SIANOUDIS *et al.*, 1986; ROBERTS, 1987; DOI *et al.*, 1989; BONTING *et al.*, 1993b). Furthermore, ³¹P-NMR has been widely used to study the Poly-P storage in activated sludge (*e.g.*, FLORENTZ *et al.*, 1984; UHLMANN *et al.*, 1990; JING *et al.*, 1992; RÖSKE and SCHÖNBORN, 1994) and phytoplankton samples (FEUILLADE *et al.*, 1995).

The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopic technique exploits a magnetic property of atomic nuclei, the nuclear spin. When brought into a strong magnetic field the energy of the nuclear spin splits into several levels. This allows the absorption of energy

that is sent to the sample in form of radio waves. Modern NMR experiments are almost exclusively performed using the "pulsed" or FT-NMR technique, where a radio frequency pulse excites all nuclei at the same time. After the end of the pulse the response of the sample is recorded as a time-dependent signal that can be transformed into a spectrum using the Fourier transformation. The frequency that is detected is characteristic for a particular type of nucleus $(e.g., {}^{31}P)$ and is very sensitive to the chemical environment of the nucleus. Since each nucleus gives rise to a separate signal with different positions in the spectrum, a detailed description of the molecule is obtained. The frequencies of the signals are expressed as chemical shifts (δ), which is the measure of the position of a resonance signal relative to a standard (in case of ³¹P usually 85% phosphoric acid). It is calculated by $\delta = (v_{sample} - v_{sample})$ $v_{\text{reference}}/v_{\text{reference}} \times 10^6$ where v is the measured resonance frequency. Chemical shifts are dimensionless, expressed as parts per million (ppm) and thus independent of the strength of the magnetic field used for the measurement. Beside the chemical shift an interaction between the different nuclei, the scalar coupling, can be of importance. Mediated by the electrons of the bonds between the nuclei this interaction can lead to a splitting of the signals that can help to evaluate the spectra. More importantly, scalar couplings allow the use of multidimensional NMR techniques that can be powerful tools for the structure elucidation of natural compounds.

Beside Poly-P phosphonates, phosphate, phosphate monoesters, phosphate diesters, and pyrophosphate are visible in ³¹P-NMR spectra. The principle of ³¹P-NMR and the chemical shifts of P compounds are well described in review articles, methodological papers, and textbooks (*e.g.*, VAN WAZER and DITCHFIELD, 1987; TURNER *et al.*, 2003; CADE-MENUN, 2005).

Poly-P is generally reflected by three resonance peaks: terminal P (PP1) at about -8 ppm, penultimate P (PP2-3) at about -23 ppm, and internal P (PP4) at about -24 ppm (Fig. 7A). The chemical shift of PP1 may overlap with β -P of nucleotide diphosphate and with γ -P of nucleotide triphosphate. Only the phosphoryl group at the β -position of nucleotide triphosphate has a resonance signal in the region at ca. -23 ppm. If this signal is mainly due to ATP, similar signal intensities will be expected from two other phosphoryl groups in α - and γ -position, resulting in shifts of about -13 and -8 ppm, respectively. The ³¹P-NMR spectrum in Figure 7B shows a mixture of Graham salt and ATP in alkaline extract. Resonance signals of other important organic P compounds such as phosphate monoester (e.g., nucleotides, sugar phosphate, phosphatidic acid, hexa-inositol phosphate, choline phosphate), and phosphate diester (nucleic acid, phospholipids) do not interfere with the resonance signals of Poly-P (compare Fig. 7A-E). GOLTERMAN (2006) discussed the difficulties to distinguish inositol hexaphosphate (phytic acid), a ring-shaped Poly-P and long chain Poly-P by means of ³¹P-NMR. As shown in Figure 7 C inositol hexaphosphate gives some signals in the monoester-region which is in accordance with other studies (e.g., TURNER and MCKELVIE, 2002). Therefore, a single outstanding signal at -24 to -26 ppm strongly indicates the presence of inorganic Poly-P. The advantage of ³¹P-NMR is that all P species can be simultaneously characterised without the need of any complex cleaning and chromatographic separation procedure. Drawbacks of the method, however, are the heterogeneous physical and chemical properties of the samples, the high detection limit, and the natural association of P with paramagnetic ions such as iron and manganese.

³¹P-NMR measurements were carried out with solid samples (solid-state NMR), *in vivo* or after extraction (liquid-state NMR). The main advantage of the solid-state NMR is the minimal sample preparation. However, the solid-state NMR is limited by the low natural P concentrations and the disturbance of the Poly-P detection by paramagnetic metals (see above). To circumvent these biases, demineralisation procedures have been used for removal of paramagnetic metals and minerals (carbonates and silicates) and the organic fraction has been concentrated (SANNIGRAHI and INGALL, 2005). Nevertheless, the solid-state spectra show other artefacts (such as spinning sidebands) with broad peaks overlapping the chemical shifts of several P nuclei.



www.revhydro.com

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

For biological samples *in vivo* ³¹P-NMR is used as a rapid and non-invasive technique for studying metabolic processes in intact cells under physiological conditions (BONTING *et al.*, 1993b). The simultaneous detection of Poly-P signals and other P metabolites makes the *in vivo* ³¹P-NMR an extremely powerful tool for on-line detection of changes in Poly-P concentration under various experimental conditions (*e.g.*, LAMBERT *et al.*, 2002; RÖSKE and SCHÖNBORN, 1994). Depending on its binding with other cell structures and compounds, in particular with proteins and metal cations, Poly-P is "visible" or "invisible" by NMR based methods. Poly-P detected by *in vivo* NMR represents only the most mobile fraction of total Poly-P. The chance to detect Poly-P in lake sediments by means of solid state or *in vivo* NMR is very low, because interferences with the matrix and a relatively low P content are likely in these environments.

The most appropriate method to detect Poly-P in lake sediments, thus, is the liquid state ³¹P-NMR after chemical extraction. Various extraction procedures have been used to separate different P species from other cellular structures, to concentrate P, and to reduce the interference with paramagnetic ions. Drawbacks of the chemical extraction are the risks of hydrolysis and other changes of the original chemical structure (TURNER et al., 2003). Chelex and EDTA are frequently used additions to release P from paramagnetic ions, thereby reducing line broadening and improving spectral quality (CADE-MENUN and PRESTON, 1996; CADE-MENUN et al., 2002). Furthermore, the fragmentation of Poly-P in the presence of alkaline sediment extraction can be delayed by a pre-extraction step with EDTA and a subsequent 2-hour extraction with 0.2 M NaOH and 0.067 mM EDTA (HUPFER et al., 1995). However, most extraction procedures must be regarded as a compromise between sufficient extraction efficiency and the protection of P compounds. To improve the detection sensitivity, solutions can be concentrated after extraction either by freeze-drying (e.g., CADE-MENUN and PRESTON, 1996) or by rotary evaporation (e.g., HUPFER et al., 2004). Lyophilization, however, may be the best method since hydrolysis artefacts become more severe with increasing temperatures (CADE-MENUN et al., 2002; TURNER et al., 2003). To minimize the effect of Poly-P hydrolysis, samples should be analysed as soon as possible after dissolution (CADE-MENUN, 2005). Our own measurements, however, demonstrate that Poly-P concentrations in concentrated sediment extracts do not change when stored frozen at -20 °C.

When using ³¹P-NMR, concentrations of single P compounds ($[P_s]$) need to be calculated as shown in the following Eq.

$$[P_s] = [TP] \times I_s / I_{tot.}, with$$

single signal (I_s) total integral of all signals over the whole range (I_{tot}) total P concentration of the extract ([TP])

According to FLUCK (1963) it is even possible to estimate the average chain length (n) of Poly-P molecules by comparing peak areas for terminal (I_t) and for middle Poly-P atoms (I_m):

$$n = 2(I_t + I_m)/I_t$$

The calibration and the determination of the chain length of Poly-P were validated by a synthetic Poly-P (HUPFER *et al.*, 1995). Recovery experiments with Poly-P spiked sediment extracts have shown that the end and middle groups should be summarised for Poly-P quantification to account for Poly-P fragmentation to shorter chain lengths during extraction. This procedure assumes that middle groups are definitely detectable. Depending on the NMR equipment, the accumulated scans, and the chemical characteristics of each sample the minimal concentration for quantification of a single P compound should be at least 10 mg P L⁻¹.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
M. HUPFER et al.

Figure 7 (C and D) represents ³¹P-NMR spectra of alkaline extracts of activated sludge and lake sediment. Beside many other P compounds, Poly-P middle groups are clearly detectable in the spectra. Confusion with ATP is impossible since no or low signals of γ -ATP (–13 ppm) can be detected. Poly-P measured by NMR most likely occurs exclusively in living or dead microorganisms because Poly-P cannot be abiotically generated during extraction and enzymatic hydrolysis of free Poly-P is usually fast under natural conditions. Therefore, ³¹P-NMR is the most reliable method for detection and quantification of Poly-P in environmental samples.

Evidences for the occurrence of Poly-P comes from a couple of ³¹P-NMR studies on marine (SANNIGRAHI and INGALL, 2005) and limnetic sediments (HUPFER *et al.*, 1995; CAR-MAN *et al.*, 2000; HUPFER *et al.* 2004; REITZEL *et al.*, 2006a, b; GLOESS *et al.*, subm.). An extensive ³¹P-NMR study of sediments from 22 European lakes with different trophic state and morphometry showed that Poly-P storage is not a rare or episodic phenomenon. In the top 0.5 cm of the sediment, the maximum percentage of Poly-P was 11.4% of total P (HUPFER *et al.*, 2004). ³¹P-NMR analysis of sediment cores demonstrated that Poly-P was not only detectable at the sediment surface but also in anoxic layers of Lake Sønderby (REITZEL *et al.*, 2006a) and Lake Erken (REITZEL *et al.*, 2006b).

3.5. Additional Methods for Poly-P Quantification

Chromatographic and filtration methods serve to separate extracts of Poly-P into more defined fractions or to remove other P compounds for purification (see overview by LORENZ and SCHRÖDER, 1999). By means of thin-layer chromatography chains of condensed phosphate up to a length of 8 can be separated. In two dimensions this technique even allows for the separation of linear and cyclic P compounds. In contrast, anion exchange chromatography quantitatively separates linear Poly-P chains of up to 8 and clearly differentiates up to a chain length of 12 (MATSUHASHI, 1963) whereas the separation of condensed phosphates with low molecular weights is rather limited. Alternatively, high-performance liquid chromatography (HPLC) has been used for a more effective and sensitive separation and determination of Poly-P. This technique can accurately separate linear Poly-P up to a chain length of 35 (BABA et al., 1985). Furthermore, separation of Poly-P is possible by ion pair chromatography on a reverse phase column and the fractionation of higher molecular weight Poly-P on a size exclusion column (MÜSSIG-ZUFIKA and JEKEL, 1992). The most effective and, hence, commonly used method for separation of Poly-P is gel electrophoresis (CLARK and WOOD, 1987). High percentage polyacrylamide gels (15-20%) allow for differentiation between Poly-P up to a chain length of 100. Moreover, higher chain length Poly-P can be distinguished by using low percentage polyacrylamide gels (chain length 100 to 800) or agarose gels (chain length 500 to 1700). The main advantage of these gels is that they allow an easy and rapid collection of Poly-P fractions for further analysis. Gel filtration of Poly-P with purified water as an eluent and concomitant removal of salt is a practicable and effective method for separation of a wide range of Poly-P compounds. Gel filtration is also a simple and effective method for the separation of orthophosphate, pyrophosphate, and oligophosphate from Poly-P mixtures. Nevertheless, its application to detect Poly-P in natural samples such as sediments is not known.

4. Methods for Identifying and Quantification of Poly-P Accumulating Microorganisms

Useful tools for comprehensive understanding of ecology and physiology of PAO in WWTP are described in the following paragraphs. Little is known about PAO in lake sedi-

ments, however, several molecular methods originally established for identification of PAO in activated sludge have been shown to be also useful in lake sediments. The majority of these methods is used for the analysis of dominance patterns in the entire natural bacterial community (cultivation and clone library: *e.g.*, TAMAKI *et al.*, 2005; FISH: *e.g.*, RÖSKE *et al.*, 1998; UHLMANN *et al.*, 1998; DGGE: *e.g.*, KOIZUMI *et al.*, 2003; see also review by SPRING *et al.*, 2000) or of certain genera or groups (MAR-FISH: *e.g.*, GRAY *et al.*, 2000; DGGE: *e.g.*, CHAN *et al.*, 2002; FISH: *e.g.*, CASPER *et al.*, 2003). Certain physiological groups can be characterized based on specific enzymes which are only present in these bacteria, *e.g.*, methane monooxygenase in methanotrophs (COSTELLO and LIDSTROM, 1999). Specific enzymes or their respective genes can be used as molecular markers even when bacteria are closely related to each other. Further, molecular methods allow the design of specific probes or primers. For PAO, however, it is difficult to use key-enzymes of the Poly-P metabolism since the ability to store Poly-P seems to be widespread among prokaryotes.

4.1. Cultivation Techniques

Many studies of PAO in activated sludge are based on microbiological and molecular methods. About 30 years ago, bacteria of the genus *Acinetobacter* were frequently isolated and suggested to be important PAO (*e.g.*, FUHS and CHEN, 1975; BUCHAN, 1983). Until now, several PAO of various genera were isolated from activated sludge, *e.g.*, *Microlunatus phosphovorus* (NAKAMURA *et al.*, 1995), members of the genus *Tetrasphaera* (MASZENAN *et al.*, 2000; HANADA *et al.*, 2002), *Lampropedia* spp. (STANTE *et al.*, 1997) or *Gemmatimonas aurantiaca* (ZHANG *et al.*, 2003).

Cultivation provides the advantage that all isolates can be characterized with respect to their biochemical and physiological properties. Growth tests including different substrate availabilities revealed a rather limited utilization of substrates by the isolated bacteria. Additional staining tests showed the presence of Poly-P granules (*e.g.*, MASZENAN *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2003). While isolates can be characterized by chemotaxonomic methods, such as fatty acid profiles, sequencing of the whole 16S rRNA gene is used for their phylogenetic classification.

Strong selectivity of bacterial media, however, often prohibits achieving reliable information about the "real" microbial composition in the environment (*e.g.*, WAGNER *et al.*, 1993). Due to these restrictions of all cultivation based techniques a variety of cultivation independent methods has been developed to study the ecology of PAO in activated sludge (see reviews by DABERT *et al.*, 2002; SEVIOUR *et al.*, 2003) and more recently in natural aquatic ecosystems.

4.2. Cultivation Independent Methods

4.2.1. Fluorescence in situ Hybridisation (FISH)

During the last decade fluorescence *in situ* hybridisation became a powerful tool for analysing the phylogenetic composition of microbial communities by using specific oligonucleotide probes which are complementary to more or less conserved regions of the bacterial 16S or 23S rRNA. Enumeration of fluorescently labelled cells enables *in situ* detection and quantification of yet uncultured bacteria from the subspecies up to the kingdom level. However, the design of new oligonucleotide probes is based on the existing databases of already sequenced organisms. Thus, due to the relatively low number of PAO sequences in these databases it cannot be ensured that newly designed probes reliably fit all target organisms. Another serious limitation of the method is the detection of rare species or groups by

M. HUPFER et al.

means of specific probes since a reliable quantification of only a few positive cells may be inaccurate. Other possible biases of the FISH method, especially in sediments, are fixation and hybridisation conditions as well as unspecific binding of the probes to particle surfaces. The strength of FISH signals further depends on the amount of cellular rRNA molecules (AMANN *et al.*, 1995). Some of these biases can be avoided by using the improved protocol of the catalysed reporter deposition (CARD-)FISH method (PERNTHALER *et al.*, 2002).

The combination of FISH methods and Poly-P staining techniques (e.g. DAPI or Neisser, see chapter 3.1) in activated sludge showed that members of the α -Proteobacteria and Actinobacteria contain intracellular Poly-P granules (KAWAHARASAKI et al., 1999). The design of new and more specific oligonucleotide probes and the combination of different molecular methods directed the attention to yet uncultured organisms. Both, members of the genus *Rhodocyclus* (β -*Proteobacteria*) and of the *Actinobacteria* are potential key players in EBPR. Staining with Neisser, Methylene blue or DAPI indicated that bacteria closely related to Rhodocyclus are able to store Poly-P inside their cells (CROCETTI et al., 2000; ONUKI et al., 2002; ONDA et al., 2002). But not in all EBPR processes these bacteria are a dominant fraction of the bacterial community. Further the use of an oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter (Aca23a) provided evidence that this genus does not necessarily play the suggested key role in WWTP/EBPR (WAGNER et al., 1994; KÄMPFER et al., 1996; MUDALY et al., 2000; LIU et al., 2001; KONG et al., 2002). In many WWTP the coexistence and co-operation of several phylogenetically different microbial groups seems to be crucial for the observed EBPR in activated sludge. Furthermore, different substrate availability in certain types of sludge stimulates the growth of several chemotaxonomic groups in different ways (LIU et al., 2001).

4.2.2. Clone Libraries

To circumvent the above mentioned restrictions of FISH methods, other molecular approaches have been applied to study the diversity of PAO. Clone libraries enable a high phylogenetic resolution of specific (mostly dominant) bacteria. The obtained sequences can be used to construct phylogenetic trees which allow statements about the phylogenetic relationship among members of a given microbial community. Clone libraries from activated sludge revealed that β - and also *a*-*Proteobacteria* frequently occur. Members of the γ -*Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, and the *Cytophaga-Flexibacter* group of the *Bacteroides* (CFB) were less frequently found (BOND *et al.*, 1995; MCMAHON *et al.*, 2002; JEON *et al.*, 2003). Within the β -*Proteobacteria*, clones were found to be closely related to the genus *Rhodocyclus* (BOND *et al.*, 1995; HESSELMANN *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2001; MCMAHON *et al.*, 2002). However, LIU *et al.* (2001) found that the CFB group was the most common group in their studied system. Although clone libraries result in a high phylogenetic resolution of the detected species, it has to be kept in mind that frequency of PCR-amplified sequences does not reflect the in situ abundance of the corresponding bacterial species. DNA extraction procedures, PCR conditions, drift, and selection as well as or our poor knowledge of the studied systems can lead to enormous biases.

4.2.3. DGGE

To get a quick overview on differences between specific microbial communities, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is a useful tool. PCR products of the same length are loaded onto a polyacrylamide gel with a denaturing gradient of urea and formamide (or of increasing temperature, TGGE) and separated according to their sequence (Muyzer *et al.*, 1993). By doing so a GC clamp (ca. 40 bases of guanins and cytosins) prevents the separation of the double stranded DNA into their single strands. The obtained banding pattern reflects the microbial diversity, *i.e.* many bands account for a high microbial diversity. But the interpretation of such banding patterns must be done carefully since even a single DGGE band may represent multiple bacterial species with identical partial 16S rDNA sequences (VALLAEYS *et al.*, 1997). On the other hand, one species can possess multiple heterogeneous rRNA operons, yielding several bands on a DGGE gel (NÜBEL *et al.*, 1996; RAINEY *et al.*, 1996). Further biases may result from DNA extraction and PCR (see 4.2.2.) which can cause other significant artefacts.

DGGE analysis revealed diverse microbial communities in activated sludge from WWTP/EBPR both with and without community changes over time (ONDA *et al.*, 2002; ONUKI *et al.*, 2002). Differences in reactor operation conditions seem to significantly influence the development of the microbial community. The subsequent sequencing of excised bands yielded various sequences belonging to the genus *Rhodocyclus* (AHN *et al.*, 2002; ONDA *et al.*, 2002; ONDA *et al.*, 2002; ONDA *et al.*, 2002; ONDA *et al.*, 2002). Unfortunately, DGGE does not yield reliable information on the abundance of specific bacteria, *e.g.*, PAO. Hence, the combination with FISH or CARD-FISH is a promising strategy to achieve detailed information on composition and abundance of PAO. Additional combination of FISH with specific oligonucleotide probes for *Rhodocyclus*-like organisms and Poly-P staining dyes such as DAPI showed that these bacteria are important for EBPR (AHN *et al.*, 2002; ONUKI *et al.*, 2002).

4.2.4. MAR-FISH

The above mentioned methods are appropriate tools to analyse the dynamic and diversity of microbial communities. However, for a more detailed investigation on the ecological function of selected bacterial species or groups, e.g., PAO, more elaborate methods are necessary. The combination of microautoradiography with FISH (MAR-FISH) allows the simultaneous analysis of both the microbial community structure and in situ substrate uptake patterns of individual microbial cells. Substrate-incorporation can be studied by the use of radio-labelled substrates, e.g., ³³P_i, [¹⁴C]acetate or [¹⁴C]butyrate (LEE et al., 1999). In fullscale activated sludge different morphotypes of β -Proteobacteria hybridisised with the oligonucleotide probe BET42a and assimilated radio-labelled P. In contrast, y-Proteobacteria (probe GAM42a) did not incorporate radioactive P (LEE et al., 1999) suggesting that this group of bacteria is not able to accumulate Poly-P actively. Hybridisation with oligonucleotide probes specific for Rhodocyclus-related bacteria shows that these bacteria constitute a considerable fraction of the bacterial sludge community and assimilate acetate, propionate, pyruvate, and glutamic acid, intracellularly. Furthermore, they incorporate PHA under anaerobic conditions but accumulate ³³P_i aerobically (Kong et al., 2002; Kong et al., 2004). This is in agreement with existing biochemical models of Poly-P storage (van LOOSDRECHT et al., 1997; MINO et al., 1998). KONG et al. (2004), however, found that bacteria other than those related to *Rhodocyclus*, mainly α - and γ -*Proteobacteria* incorporate ³³P_i although displaying a minor fraction of the total bacterial community in activated sludge. In addition, members of the Actinobacteria assimilate orthophosphate and store Poly-P granules. This has been shown by cultivation-dependent approaches for different actinobacterial isolates, e.g., Microlunatus phosphovorus (SANTOS et al., 1999) and Tetrasphaera elongata (ONDA and TAKII, 2002). By using MAR-FISH for Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge samples Kong et al. (2005) could demonstrate that these bacteria take up ³³P_i aerobically and store Poly-P after anaerobic uptake of amino acids. However, they do not assimilate acetate or store PHA and, hence, deviate from the typical biochemical of PAO. Their high absolute number and relative abundance in microbial communities of diverse fullscale WWTP indicates an importance in EBPR similar to that of Rhodocyclus-related bacteria.

M. HUPFER et al.

The application of molecular techniques in WWTP/EBPR allowed for successful phylogenetic and physiological characterization of several PAO. Even though there are still many open questions concerning the ecological function of specific PAO, the presented molecular methods, especially in combination with other microbiological and chemical methods, lead to an increasing knowledge on physiology and ecological function of PAO in WWTP/EBPR. In contrast, PAO in natural sediments are almost unknown. Our own studies using a combination of molecular (CARD-FISH, clone libraries, and DGGE) and chemical techniques (³¹P-NMR) point to the fact that PAO are common members of the bacterial community in a variety of limnetic sediments consisting of a broad range of phylogenetic groups. We now have many techniques available to elucidate the ecological of PAO also in natural aquatic sediments.

5. Summary and Outlook

A large set of tools has been developed for the investigation of activated sludge in WWTP and is now available for detection and quantification of Poly-P in natural environmental samples (Fig. 8). In Table 1 the potential and limitations of the reviewed methods are summarized. Exciting advances in method development have provided new insights into the processes of P removal in WWTP/EBPR. The introduction of ³¹P-NMR measurements of Poly-P in WWTP revealed an additional P removal solely due to the formation of bacterial Poly-P. In addition, the successful implementation of molecular techniques to characterize microbial communities in activated sludge systems showed that certain key organisms (e.g., Acinetobacter spp.), which were formerly held responsible for most of the Poly-P storage in WWTP/EBPR, are only of minor importance. Our review demonstrates that comparative investigations of sediment and activated sludge are suitable to adapt and validate methods formerly established for waste water research. On the other hand, application of sequential P fractionation – originally developed for sediment research – is of practical importance for investigations in activated sludge systems. The occurrence of Poly-P in the uppermost sediment layer was demonstrated by the liquid ³¹P-NMR technique in a variety of natural limnetic and marine sediments. The often-proposed analogy between Poly-P storing organisms in benthic and activated sludge systems seems to be likely but direct proofs are still scarce. The following methological approaches are promising to evaluate which organisms are responsible for Poly-P storage in sediments and to explore their importance for overall P cycling:

- (1) Despite many advances in liquid ³¹P-NMR measurements, sample preparation still needs further improvements for reliable process studies. The commonly used extraction procedures result in interferences with other chemical compounds and in a shortening of chain lengths due to hydrolysis. Therefore, modified or novel pre-purification and separation methods should be developed. The reliable quantification by ³¹P-NMR methods enables one to monitor Poly-P dynamics under field conditions as well as in laboratory experiments. Special experiments are necessary to verify whether and under which environmental conditions (*e.g.*, light, oxygen, redox gradients, substrates etc.) storage and release of Poly-P occur at the sediment surface. To test whether PAO in sediments are of pelagic or benthic origin, seston, settling seston and sediments must be monitored in the field.
- (2) The precise identification of genera or species of PAO in sediments is essential for further experiments elucidating their ecological function in the internal P cycle. The spectrum of molecular methods has been greatly improved in the recent past and successfully applied to studies of activated sludge. By using similar or even identical methods it should be possible to identify the organisms responsible for Poly-P storage in natural sediments. New approaches are necessary to separate and phylogenetically characterize

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Polyphosphates and Microorganisms in Sediments



Fig. 8. Overwiew about the most important methods available for the detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments (compare Table 1, explanation see text).

individual PAO with visible Poly-P inclusions. Separation of single bacteria is now possible, *e.g.*, by laser microdissection (GLOESS *et al.*, subm.) or flow-cytometry. For molecular identification of PAO in natural systems the identification of PAO by means of simultaneous hybridization with phylogenetic (rRNA-directed) and Poly-P specific (mRNA-directed, *e.g.*, Poly-P kinase) probes seems to be very promising.

(3) The contribution of Poly-P to release and transformation of P during diagenesis should be related to the reductive dissolution of P sorbed to iron oxihydroxides or other mobilization processes. New insights into the physiology of PAO and rates of Poly-P cycling in sediments by the combination of up-to-date methods allow for extending conceptual or mathematical models for P exchange between sediment and water.

7. Acknowledgements

Part of this work was supported by the German Federal Ministry of Education, Science and Technology (BMBF, 02WF0469). We thank CHRISTIANE HERZOG (IGB Berlin) for chemical analysis, Prof. R. GIOVANOLI and B. WILD (University Bern) for the investigations with electron microscop and BRIGITTE SCHLEGEL (FMP Berlin) for assisting in NMR spectroscopy. We thank KIRSTEN POHLMANN (IGB Berlin), ISOLDE RÖSKE (Technical University of Dresden), KASPER REITZEL (University of Southern Denmark, Odense), ROLAND PSENNER (University Innsbruck) and three anonymous reviewers for many helpful comments on a former version of the manuscript.

Table 1 Overview about the most important methods available for the detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms (PAO) in aquatic sediments (compare Fig. 8, for further details see text). The given references are mainly linked to studies on Poly-P or PAO and contain further methodological details in respect to their application for natural sediment samples.

		М.	HUPFER et al.				
References	STREICHAN <i>et al.</i> , 1990 ONDA and TAKKI, 2002	Schönborn <i>et al.</i> , 2001 Eixler <i>et al.</i> , 2005	UHLMANN <i>et al.</i> , 1990 GOEDKOOP and PETTERSSON, 2000	LORENZ and SCHRÖDER, 1999	VAN GROENESTIJN et al., 1987 HUPPER et al., 1996	Hupfer <i>et al.</i> , 2004 Cade-Menun, 2005	LORENZ and SCHRÖDER, 1999
Limitations	Unspecific staining No phylogenetic information on PAO Limited visulaization in the complex sediments matrix	No quantification of Poly-P Little phylogenetic information on PAO	Insufficient specificity for Poly-P	Chain length of Poly-P must be >10 Reaction is biased by several compounds and pH	Complex and not well established procedure Hydrolysis is influenced by Poly-P chain length Interferences with sediment matrix	Inefficient extraction and hydrolysis of Poly-P Limited sensitivity Time-consuming	No experiences with natural sediments
Potential information	Evidence of PAO Proportion of PAO Identification and separation of PAO for molecular biological investigations	Identification of P rich cellular inclusions Morphology and size of microorganisms and granules	Discrimination between chemical and biogenic P Combination with P-uptake experiments possible	Photometric quantification of Poly-P Combination with separation and purification possible	Quantification of Poly-P with high sensitivity and specificity Combination with purification steps possible	Non-invasive and quantitative determination of Poly-P in sediment extracts Separation of Poly-P not necessary	Separation of Poly-P from other P compounds Discrimination of Poly-P with different chain lengths
Technique/Method	Visualisation Light and epifluorescence microscopy	Electron microscopy with EDX	Quantification Extraction procedures	Basic dyes	Poly-P d Poly-P d	³¹ P-NMR spectroscopy	Chromatographic methods

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.revhydro.com

22

MASZENAN et al., 2000 HANADA et al., 2002 MUYZER et al., 1993 WOBUS et al., 2003 ONUKI et al., 2002 HESSELMANN et al., Kong et al., 2004 ESCHENHAGEN et al., 2003 1999 Limited specificity of available FISH probes Restricted information on abundance and community composition of PAO due to High numbers of picked and sequenced Only phylogenetically characterised clones for quantification necessary for representative substrate uptake In situ conditions are necessary Unculturability of many PAO Limited specificity of probes Short sequences with limited selectivity of culture media. phylogenetic resolution (e.g., Rhodocyclus) bacteria detectable Multiple bands PCR artefacts PCR artefacts according to their biochemical and physiological properties Studies on specific Isolation and characterisation of bacteria In situ detection and quantification of uncultured bacteria from the subspecies bacteria at different phylogenetic levels coupled with substrate uptake (e.g., ³³P₁) bacterial communities (fingerprint) at different phylogenetic levels In situ characterisation of bacteria Construction of phylogenetic trees Rapid analysis and comparison of High phylogenetic resolution of metabolic pathways possible to the kingdom level Participation independent methods bacteria Multivation independent methods un un hybridisation (FISH) un u bybridisation (FISH) bybrid Cultivation techniques MAR-FISH DGGE

Polyphosphates and Microorganisms in Sediments

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.revhydro.com

23

8. References

- AMANN, R. I., W. LUDWIG and K.-H. SCHLEIFER, 1995: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143–169.
- AHN, J., T. DAIDOU, S. TSUNEDA and A. HIRATA, 2002: Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. Water Res. **36**: 403–412.
- ARVIN, E., 1985: Biological removal of phosphorus from wastewater. CRC critical reviews in Environmental Control 15: 25–64.
- BABA, Y., N. YOZA and S. OHASHI, 1985: Simultaneous determination of phosphate and phosphonate and phosphonate by flow injection analysis and high-performance liquid chromatography with a series detection system. – J. Chromatogr. **318**: 319–324.
- BAXTER, M. and T. JENSEN, 1980: A study of methods for in situ X-ray energy dispersive analysis for polyphosphate bodies in *Plectonema boryanum*. Arch. Microbiol. **126**: 213–215.
- BELL, R. T. and I. AHLGREN, 1987: Thymidine incorporation and microbial respiration in the surface sediment of a hypereutrophic lake. Limnol. Oceanogr. **32**: 476–482.
- BODE, G., F. MAUCH, H. DITSCHUNEIT and P. MALFERTHEINER, 1993: Identification of structures containing polyphosphates in *Helicobacter pylori*. – J. Gen. Microbiol. **139**: 3029–3033.
- BOND, P. L., P. HUGENHOLTZ, J. KELLER and L. L. BLACKALL, 1995: Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. – Appl. Environ. Microbiol. 61: 1910–1916.
- BONTING, C. F. C., G. J. J. KORTSTEE and A. J. B. ZEHNDER, 1991: Properties of polyphosphate: AMP Phosphortransferase of Acinetobacter strain 210A. J. Bacteriol. **173**: 6484–6488.
- BONTING, C. F. C., G. J. J. KORTSTEE, A. BOEKESTEIN and A. J. B. ZEHNDER, 1993a: The elemental composition dynamics of large polyphosphate granules in *Acineteobacter* strain 210A. Arch. Microbiol. **159**: 428–434.
- BONTING, C. F. C., G. J. J. KORTSTEE and A. J. B. ZEHNDER, 1993b: Properties of polyphosphatase of *Acinetobacter-johnsonii*-210A. Antonie van Leeuwenhoek **64**: 75–81.
- BOSTRÖM, B., J. M. ANDERSEN, S. FLEISCHER and M. JANSSON, 1988: Exchange of phosphorus across the sediment-water interface. Hydrobiologia 170: 229–244.
- BOSTRÖM, B., A.-K. PETTERSSON and I. AHLGREN, 1989: Seasonal dynamics of a cyanobacteria-dominated microbial community in surface sediments of a shallow, eutrophic lake. – Aquat. Sci. 51: 153–178.
- BRUNBERG, A.-K., 1995: Microbial activity and phosphorus dynamics in eutrophic lake-sediments enriched with *Microcystis* colonies. Freshw. Biol. **33**: 541–555.
- BUCHAN, L., 1981: The location and nature of accumulated phosphorus in seven sludges from activated-sludge plants which exhibited enhanced phosphorus removal. – Water SA 7: 1–7.
- BUCHAN, L., 1983: Possible biological mechanism of phosphorus removal. Wat. Sci. Tech. 15: 87–103.
 BUCKING, H., S. BECKMANN, W. HEYSER and I. KOTTKE, 1998: Elemental contents in vacuolar granules of ectomycorrhizal fungi measured by EELS and EDXS. A comparison of different methods and preparation techniques. Micron 29: 53–61.
- CADE-MENUN, B. J. and C. M. PRESTON, 1996: A comparison of soil extraction procedures for ³¹P NMR spectroscopy. – Soil Sci. 161: 770–785.
- CADE-MENUN, B. J., C. W. LIU, R. NUNLIST and J. G. MCCOLL, 2002: Soil and Litter Phosphorus-31
 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Extractants, Metals, and Phosphorus Relaxation Times.
 J. Environ, Qual. 31: 457–465.
- CADE-MENUN, B. J., 2005: Using phosphorus-31 Nuclear Magnetetic Resonance spectroscopy to characterize organic phosphorus in environmental samples. – *In*: TURNER, B. L., E. FROSSARD, and D. S. BALDWIN (eds.), Organic Phosphorus in the Environment. CABI Publishing.
- CARMAN, R., G. EDLUND and C. DAMBERG, 2000: Distribution of organic and inorganic phosphorus compounds in marine and lacustrine sediments: a ³¹P NMR study. – Chem. Geol. **163**: 101–114.
- CASPER, P., O. C. CHAN, A. L. S. FURTADO and D. D. ADAMS, 2003: Methane in an acidic bog lake: The influence of peat in the catchment on the biogeochemistry of methane. Aquat. Sci. **65**: 36–46.
- CILIA, V., B. LAFAY and R. CHRISTEN, 1996: Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. Mol. Biol. Evol. 13: 451–461.
- CHAN, O. C., M. WOLF, D. HEPPERLE and P. CASPER, 2002: Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificially partitioned acidic bog lake. FEMS Microbiol. Ecol. 42: 119–129.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- CHRZANOWSKI, T. H., M. KYLE, J. J. ELSER and R. W. STERNER, 1996: Element ratios and growth dynamics of bacteria in an oligotrophic Canadian shield lake. – Aquat. Microb. Ecol. 11: 119–125.
- CLARK, J. E., H. BEEGEN and H. G. WOOD, 1986: Isolation of intact chains of polyphosphate from *Propionibacterium shermanii* grown on glucose or lactate. J. Bacteriol. 168: 1212–1219.
- CLARK, J. E. and H. G. WOOD, 1987: Preparation of standards and determination of sizes of long-chain polyphosphates by gel electrophoresis. – Anal. Biochem. 161: 280–290.
- COMEAU Y., K. J. HALL, R. E. W. HANCOCK and W. K. OLDHAM, 1986: Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. Water Res. 20: 1511–1521.
- COSTELLO, A. M. and M. LIDSTROM, 1999: Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. – Appl. Environ. Microbiol. 65: 5066–5074.
- CROCETTI, G. R., P. HUGENHOLTZ, P. L. BOND, A. SCHULER, J. KELLER, D. JENKINS and L. L. BLACKALL, 2000: Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation. – Appl. Environ. Microbiol. 66: 1175–1182.
- DABERT, P., J.-P. DELGENES, R. MOLETTA and J. J. GODON, 2002: Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. – Rev. Environ. Sci. Biotechn. 253: 179–192.
- DAVELAAR, D., 1993: Ecological significance of bacterial polyphosphate metabolism in sediments. Hydrobiologia 253: 179–192.
- DE HAAS, D. W., M. C. WENTZEL and G. A. EKAMA, 2000: The use of simultaneous chemical precipitation in modified activated sludge systems exhibiting biological excess phosphate removal Part 1: Literature review. – Water SA **26**: 439–452.
- DOI, Y., Y. KAWAGUCHI, Y. NAKAMURA and M. KUNIOKA, 1989: Nuclear magnetic-resonance studies of poly(3-hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes-eutrophus*. – Appl. Environ. Microbiol. 55: 2932–2938.
- EINSELE, W., 1936: Über die Beziehungen des Eisenkreislaufs zum Phosphatkreislauf im eutrophen See. Arch. Hydrobiol. **29**: 664–686.
- EIXLER, S., Ú. SELIG and U. KARSTEN, 2005: Extraction and detection methods for polyphosphate storage in autotrophic planktonic organisms. – Hydrobiologia **533**: 135–143.
- ESCHENHAGEN, M., M. SCHUPPLER and I. RÖSKE, 2003: Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. – Water Res. 37: 3224–3232.
- FAGERBAKKE, K. M., M. HELDAL and S. NORLAND, 1996: Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. Aquat. Microb. Ecol. 10: 15–27.
- FENCHEL, T. and T. H. BLACKBURN, 1979: Bacteria and mineral cycling. Academic press, London, 225 pp.
- FEUILLADE, J., G. BIELICKI and J.-P. RENOU, 1995: ³¹P-NMR study of natural phytoplankton samples. Hydrobiologia 301: 391–398.
- FITZGERALD, G. B. and T. C. NELSON, 1966: Extraction and enzymatic analysis for limiting or surplus phosphorus in algae. – J. Phycol. 2: 32–37.
- FLORENTZ, M., P. GRANGER and P. HARTEMANN, 1984: Use of ³¹P-Nuclear magnetic resonance spectroscopy and electron microscopy to study phosphorus metabolism of microorganisms from wastewaters. Appl. Environ. Microb. 47: 519–525.
 FLUCK, E. 1963: Die kernmagnetische Resonanz und ihre Anwendung in der Anorganischen Chemie. –
- FLUCK, E. 1963: Die kernmagnetische Resonanz und ihre Anwendung in der Anorganischen Chemie. Springer, 290 pp.
- FUHS, G. W. and M. CHEN, 1975: Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge processes for the treatment of wastewater. – Microb. Ecol. 2: 119–138.

Gächtrer, R., J. S. MEYER and A. MARES, 1988: Contribution of bacteria to release and fixation of phosphorus in lake sediments. – Limnol. Oceanogr. **33**: 1542–1558.

- GACHTER, R. and J. S. MEYER, 1993: The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments. Hydrobiologia **253**: 103–121.
- GÄCHTER, R. and B. MÜLLER, 2003: Why the phosphorus retention of lakes does not necessarily depend on the oxygen supply to their sediment surface. – Limnol. Oceanogr. **48**: 929–933.
- GLOESS, S., M. ALLGAIER, H.-P. GROSSART and M. HUPFER, 2007: Use of laser microdissection for the molecular identification of polyphosphate accumulating sediment bacteria. submitted to Applied and Environmental Microbiology.
- GOEDKOOP, W. and K. PETTERSSON, 2000: Seasonal changes in sediment phosphorus forms in relation to sedimentation and benthic bacterial biomass in Lake Erken. – Hydrobiologia **431**: 41–50.

- GOLDBERG, J., H. GONZALEZ, T. E. JENSEN and W. A. CORPE, 2001: Quantitative analysis of the elemental composition and the mass of bacterial polyphosphate bodies using STEM EDX. – Microbios **106**: 177–188.
- GOLTERMAN, H. L., 2004: The chemistry of phosphate and nitrogen compounds in sediments. Kluwer Academic Publishers Dordrecht Boston London, 259 pp.
- GOLTERMAN, H. L., 2006: Reviewing problems and possibilities for analysis of Phytate and polyphosphates. – Arch. Hydrobiol. **166**: 525–534.
- GRAY, N. D., R. HOWARTH, R. W. PICKUP, J. G. JONES and I. M. HEAD, 2000: Use of combined microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*. – Appl. Environ. Microbiol. 66: 4518–4522.
- GRIMME, A., 1902: Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, dem Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. – Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 32: 161–165.
- GURR, E., 1965: The rational use of dyes in biology. Hill, London, United Kingdom, 216 pp.
- HAGLUND, A. L., P. LANTZ, E. TORNBLOM and L. TRANVIK, 2003: Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment. FEMS Microbiol. Ecol. 46: 31–38.
- HANADA, S., W.-T. LIU, T. SHINTANI, Y. KAMAGATA and K. NAKAMURA, 2002: *Tetrasphaera elongata* sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 883–887.
- HANSELMANN, K. W., 1986: Microbially mediated processes in environmental chemistry (lake sediments as model systems). CHIMIA **40**: 146–159.
- HELDAL, M., 1993: Measurement of elemental content and dry weight of single cells: X-ray microanalysis, pp. 387–394. – *In*: KEMP, P. F., B. F. SHERR, E. B. SHERR, and J. J. COLE (eds.), Handbook of methods in Aquatic microbial ecology. – Lewis publishers.
- HENSGENS, C. M. H, H. SANTOS, C. H. ZHANG, W. H. KRUIZINGA and T. A. HANSEN, 1996: Electrondense granules in Desulfovibrio gigas do not consist of inorganic triphosphate but of a glucose pentakis(diphosphate). – Eur. J. Biochem. 242: 327–331.
- HESSELMANN, R. X. P., C. WERLEN, D. HAHN, J. R. VAN DER MEER and A. J. B. ZEHNDER, 1999: Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. Syst. Appl. Microbiol. 22: 454–465.
- HILL, W. E., L. D. BENEFIELD and S. R. JING, 1989: ³¹P-NMR spectroscopy characterization of polyphosphates in activated-sludge exhibiting enhanced phosphorus removal. – Water Res. 23: 1177–1181.
- Höll, K., 1930: Über Schlammablagerungen, insbesondere über das Vorkommen von "natürlichem belebtem Schlamm" und seine Eigenschaften. Zbl. Bakt. Parasitenkunde **81, II:** 198–210.
- HUPFER, M., 1993: Untersuchungen zur Phosphatmobilität in Gewässersedimenten. PhD thesis TU Dresden, 148 pp.
- HUPFER, M., R. GÄCHTER and H. RÜEGGER, 1995: Poly-P in lake sediments. ³¹P-NMR spectroscopy as a tool for its identification. Limnol. Oceanogr. **40**: 610–617.
- HUPFER, M., A. SCHÖNBORN and C. BRÜCKNER, 1996: Testung des Poly-P: AMP-Phosphortransferase-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung von Polyphosphaten. – Tagungsband Fachgruppe Wasserchemie. 3pp
- HUPFER, M., B. RÜBE and P. SCHMIEDER, 2004: Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: A ³¹P NMR study. Limnol. Oceanogr. 49: 1–10.
 HUPFER, M., C. HERZOG and J. LEWANDOWSKI, 2005: Is a large sedimentary phosphorus surplus a nec-
- HUPFER, M., C. HERZOG and J. LEWANDOWSKI, 2005: Is a large sedimentary phosphorus surplus a necessary prerequisite for a high phosphorus release rate? – Berichte des IGB **22**, 59–66.
- HUPFER, M., S. GLOESS, H.-P. GROSSART, 2007: Polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments. – Aquat. Microb. Ecol. (in press)
- INGALL, E. and R. JAHNKE, 1997: Influence of water-column anoxia on the elemental fractionation of carbon and phosphorus during sediment diagenesis. Mar. Geol. **139**: 219–229.

JACOBSON, L. and M. HALMAN, 1982: Polyphosphate metabolism in the blue-green algae *Microcystis aeruginosa.* – J. Plankton Res. 4: 481–488.

JENSEN, T. E. and W. A. CORPE, 1993: Elemental composition of the polyphosphate bodies in microbial cells from a small lake. – Arch. Hydrobiol. **127**: 385–393.

- JEON, C. O., D. S. LEE and J. M. PARK, 2003: Microbial communities in activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. – Water Res. 37: 2195–2205.
- JING, S. R., L. D. BENEFIELD and W. E. HILL, 1992: Observations relating to enhanced phosphorus removal in biological systems. Water Res. 26: 213–223.

- KÄMPFER, P., R. ERHART, C. BEIMFOHR, J. BOHRINGER, M. WAGNER and R. AMANN, 1996: Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. – Microb. Ecol. 32: 101–121.
- KAWAHARASAKI, M., H. TANAKA, T. KANAGAWA and K. NAKAMURA, 1999: *In situ* identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. Water Res. **33**: 257–265.
- KOIZUMI, Y., H. KOJIMA and M. FUKUI, 2003: Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. FEMS Microbiol. Ecol. **46**: 147–157.
- KONG, Y. H., M. BEER, G. N. REES and R. J. SEVIOUR, 2002: Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. – Microbiology 148: 2299–2307.
- KONG, Y. H., J. L. NIELSEN and P. H. NIELSEN, 2004: Microautoradiographic study of *Rhodocyclus*-related polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. – Appl. Environ. Microbiol. **70**: 5383–5390.
- KONG, Y. H., J. L. NIELSEN and P. H. NIELSEN, 2005: Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. – Appl. Environ. Microbiol. 71: 4076–4085.
- KRIVTSOV, V., E. G. BELLINGER and D. C. SIGEE, 2005: Elemental composition of *Microcystis aeruginosa* under conditions of lake nutrient depletion. Aquatic Ecology 39: 123–134.
- KULAEV, I. S., V. M. VAGABOV and T. V. KULAKOVSKAYA, 2004: The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley and Sons, 277 pp.
- KUSNETSOV, S. I., 1970: The microflora of lakes. University of Texas Press, Austin and London, 503 pp. LACZKO, E., 1988: Abbau von planktischen Detritus in den Sedimenten voralpiner Seen: Dynamik der beteiligten Mikroorganismen und Kinetik des biokatalysierten Phosphoraustausches. – Diss ETH No. 8371 Zürich, 201 pp.
- LAMBERT, C., D. WEUSTER-BOTZ, R. WEICHENHAIN, E. W. KREUTZ, A. A. DEGRAAF and S. M. SCHO-BERTH, 2002: Monitoring of inorganic polyphosphate dynamics in *Corynebacterium glutamicum* using a novel oxygen sparger for real time ³¹P *in vivo* NMR. – Acta. Biotechnol. **22**: 245–260.
- LANGEN, P. and E. LISS, 1958: Über Bildung und Umsatz der Polyphosphate der Hefe. Biochem. Z. **330**: 455–466.
- LEE, N., P. H. NIELSEN, K. H. ANDREASEN, S. JURETSCHKO, J. H. NIELSEN, K.-H. SCHLEIFER and M. WAG-NER, 1999: Combination of fluorescent *in sinu* hybridization and microautoradiography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. – Appl. Environ. Microbiol. 65: 1289–1297.
- LIU, W. T., A. T. NIELSEN, J. H. WU, C. S. TSAI, Y. MATSUO and S. MOLIN, 2001: In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. – Environ. Microbiol. 3: 110–122.
- LORENZ, B., J. MÜNKNER, M. P. OLIVEIRA, J. M. LEITÃO, W. E. G. MULLER and H. C. SCHRÖDER, 1997: A novel method for determination of inorganic polyphosphates using the fluorescent dye fura-2. – Anal. Biochem. **246**: 176–184.
- LORENZ, B. and H. C. SCHRÖDER, 1999: Methods for investigation of inorganic polyphosphates and polyphosphate-metabolising enzymes. – *In*: SCHRÖDER, H. C. and W. E. G. MÜLLER (eds.), Inorganic polyphosphate – Biochemistry, Biology, Biotechnology. – Springer, Berlin Heidelberg, New York, 317 pp.
- MASZENAN, A. M., R. J. SEVIOUR, B. K. C. PATEL, P. SCHUMANN, J. BURGHARDT, Y. TOKIWA and H. M. STRATTON, 2000: Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 593–603.
- MATSUHASHI, M., 1963: Die Trennung von Polyphosphaten durch Anionenaustausch-Chromatographie.-Anwendung auf die Hefe-Polyphosphate. – Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **333**: 28–34.
- MCMAHON, K. D., M. A. DOJKA, N. R. PACE, D. JENKINS and J. D. KEASLING, 2002: Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. – Appl. Environ. Microbiol. 68: 4971–4978.
- MINO, T., T. KAWAKAMI and T. MATSUO, 1985: Location of phosphorus in activated sludge and function of intracellular polyphosphates in biological phosphorus removal process. – Wat. Sci. Tech. 17: 93–106.

- MINO, T., M. C. M. VAN LOOSDRECHT and J. J. HEIJNEN, 1998: Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. Water Res. **32**: 3193–3207.
- MORTIMER, C. H., 1941: The exchange of dissolved substances between mud and water in lakes. J. Ecol. 29: 280–329.
- MUDALY, D. D., B. W. ATKINSON and F. BUX, 2000: Microbial community profile of a biological excess phosphorus removal (BEPR) activated sludge system using a cultivation-independent approach. Water SA 26: 343–352.
- MURRAY, R. G. E.; R. N. DOETSCH and C. F. ROBINOW, 1994: Determinative and cytological light microscopy, pp. 22–41. – *In:* GERHARDT, P., R. G. E. MURRAY, W. A. WOOD and N. R. KRIEG (eds.), Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C: American Society for Microbiology.
- MÜSSIG-ZUFIKA, M. and M. JEKEL, 1992: Methods for differentiated determination of orthophosphate, condensed phosphates and polyphosphates. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 6: 353–356.
- MÜSSIG-ZUFIKA, M., A. KORNMÜLLER, B. MERKELBACH and M. JEKEL, 1994: Isolation and analysis of intact polyphosphate chains from activated sludges associated with biological phosphates removal. Water Res. 28: 1725–1733.
- MUYZER, G., E. C. DEWAAL AND A. G. UITTERLINDEN, 1993: Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genescoding for 16s ribosomal-RNA. – Appl. Environ. Microbiol. 59: 695–700.
- NAKAMURA, K., A. HIRAISHI, Y. YOSHIMI, M. KAWAHARASAKI, K. MASUDA and Y. KAMAGATA, 1995: *Microlunatus phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated-sludge. – Int. J. Syst. Bacteriol. **45**: 17–22.
- NAVON, G., S. OGAWA, R. G. SHULMAN and T. TAMANE, 1977: High-resolution P-31 Nuclear Magnetic-resonance studies of metabolism in aerobic *Escherichia-coli*-cells. – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 888–891.
- NÜBEL, U., B. ENGELEN, A. FELSKE, J. SNAIDR, A. WIESHUBER, R. I. AMANN, W. LUDWIG and H. BACK-HAUS, 1996: Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. – J. Bacteriol. **178**: 5636–5643.
- ONDA, S. and S. TAKII, 2002: Isolation and characterization of a Gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium. J. Gen. Appl. Microbiol. **48**: 125–133.
- ONDA, S., A. HIRAISHI, Y. MATSUO and S. TAKII, 2002: Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratory-scale anaerobic/aerobic activated sludge system. J. Gen. Appl. Microbiol. **48**: 43–54.
- ONUKI, M., H. SATOH and T. MINO, 2002: Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate. Wat. Sci. Tech. 46: 145–153.
- PALLERLA, S. R., S. KNEBEL, T. POLEN, P. KLAUTH, J. HOLLENDER, V. F. WENDISCH and S. M. SCHOBERTH, 2005: Formation of volutin granules in *Corynebacterium glutamicum*. – FEMS Microbiol. Lett. 243: 130–140.
- PATTARKINE, V. M. and C. W. RANDALL, 1999: The requirement of metal cations for enhanced biological phosphorus removal by activated sludge. Wat. Sci. Tech. 40: 159–165.
- PERNTHALER, A., J. PERNTHALER and R. AMANN, 2002: Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 3094–3101.
- PSENNER, R., R. PUCSKO and M. SAGER, 1984: Die Fraktionierung organischer und anorganischer Phosphorverbindungen von Sedimenten – Versuch einer Definition ökologisch wichtiger Fraktionen. – Arch. Hydrobiol. Suppl. **70**: 111–155.
- RAINEY, F. A., N. L. WARDRAINEY, P. H. JANSSEN, H. HIPPE and E. STACKEBRANDT, 1996: *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. Microbiology-UK **142**: 2087–2095.
- REES, G. N., G. VASILIADIS, J. W. MAY and R. C. BAYLY, 1992: Differentiation of polyphopshtae and poly-β-hydroxybutyrate granules in an *Acinetobacter* sp. isolated from activated sludge. FEMS Microbiol. Lett. **94**: 171–174.
- REITZEL, K., J. AHLGREN, A. GOGOLL and E. RYDIN, 2006a: Effects of aluminium treatment on phosphorus, carbon, and nitrogen distribution in lake sediment: a ³¹P NMR study – Water Res. **40**: 647–654.
- REITZEL, K., J. AHLGREN, H. DEBRABANDERE, M. WALDEBÄK, A. GOGOLL and L. TRANVIK, 2006b: Degradation rates of organic phosphorus in lake sediments. – Biogeochemistry DOI 10.1007/S10533-006-9049-z

- ROBERTS, M F., 1987: Polyphosphate *In*: BURT, C. T. (ed.), Phosphorus NMR in biology. CRC Press Boca Raton, Florida: pp. 85–94.
- RODEN, E. E. and J. W. EDMONDS, 1997: Phosphate mobilization in iron-rich anaerobic sediments: Microbial Fe(III) oxide reduction versus iron-sulfide formation. – Arch. Hydrobiol. **139**: 347–378.
- RÖSKE, I. and D. UHLMANN, 1992: Eine einfache Methode zur Unterscheidung von Polyphosphat und chemisch gebundenem Phosphat in Belebtschlämmen aus Anlagen mit weitergehender Abwasserbehandlung. – gwf Wasser Abwasser 133: 87–91.
- Röske, I. and C. SCHÖNBORN, 1994: Interactions between chemical and advanced biological phosphorus elimination. Water Res. 28: 1103–1109.
- RÖSKE, I., C. SCHÖNBORN and H. D. BAUER, 1995: Influence of the addition of different metals to an activated sludge system on the enhanced biological phosphorus removal. – Internat. Rev. ges. Hydrobiol. 80: 605–621.
- RÖSKE, I., K. RÖSKE and D. UHLMANN, 1998: Gradients in the taxonomic composition of different microbial systems: Comparison between biofilms for advanced waste treatment and lake sediments. – Wat. Sci. Tech. 37: 159–166.
- SANNIGRAHI, P. and E. INGALL, 2005: Polyphosphates as a source of enhanced P fluxes in marine sediments overlain by anoxic waters: Evidence from ³¹P NMR. – Geochem. Trans. 6: 52–59.
- SANTOS, M. M., P. C. LEMOS, M. A. M. REIS and H. SANTOS, 1999: Glucose metabolism and kinetics of phosphorus removal by the fermentative bacterium *Microlunatus phosphovorus*. – Appl. Environ. Microbiol. 65: 3920–3928.
- SCHALLENBERG, M. and J. KALFF, 1993: The ecology of sediment bacteria in lakes and comparisons with other aquatic ecosystems. – Ecology 74: 919–934.
- SCHÖNBORN, C., H.-D. BAUER and I. RÖSKE, 2001: Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules. Water Res. **13**: 3190–3196.
- SCHULZ, H. N. and H. D. SCHULZ, 2005: Large sulfur bacteria and the formation of phosphorite. Science **307**: 416–418.
- SERAFIM, L. S., P. C. LEMOS and C. LEVANTESI, 2002: Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. – J. Microbiol. Meth. 51: 1–18.
- SEVIOUR, R. J., T. MINO and M. ONUKI, 2003: The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. FEMS Microbiol. Rev. 27: 99–127.
- SIANOUDIS, J., A. C. KÜSEL, A. MAYER, L. H. GRIMME and D. LEIBFRITZ, 1986: Distribution of polyphosphates in cell-compartiments of *Chlorella fusca* as measured by ³¹P-NMR spectroscopy. – Arch. Microbiol. 144: 48–54.
- SICKO-GOAD, L. M., R. E. CRANG and T. E. JENSEN, 1975: Phosphate-metabolism in blue-green algae IV: In situ analysis of polyphosphate bodies by X-ray energy dispersive analysis. – Cytobiol. 11: 430–437.
- SPRING, S., R. SCHULZE, J. OVERMANN and K.-H. SCHLEIFER, 2000: Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. – FEMS Microbiol. Rev. 24: 573–590.
- STANTE, L., C. M. CELLAMARE, F. MALASPINA, G. BORTONE and A. TILCHE, 1997: Biological phosphorus removal by pure culture of *Lampropedia* spp. – Water Res. 31: 1317–1324.
- STREICHAN, M., J. R. GOLECKI and G. SCHÖN, 1990: Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal. – FEMS Microbiol. Ecol. 73: 113–124.
- TAMAKI, H., Y. SEKIGUCHI, S. HANADA, K. NAKAMURA, N. NOMURA, M. MATSUMURA and Y. KAMAGA-TA, 2005: Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. – Appl. Environ. Microbiol. 71: 2162–2169.
- TIJSSEN, J. H., H. BEEKES and J. VAN STEVENINCK, 1982: Localization of polyphosphates in *Sac-chromyces fragiles*, as revealed by 4',6-diamindino-2-phenylindole fluorescence. Biochim. Biophys. Acta **721**: 394–398.
- TÖRNBLOM, E. and E. RYDIN, 1998: Bacterial and phosphorus dynamics in profundal Lake Erken sediments following the deposition of diatoms: a laboratory study. – Hydrobiologia **364**: 55–63.
- TURNER, B. L. and I. D. MCKLEVIE, 2002: A novel technique for the pre-concentration and extraction of inositol hexakisphosphate from soil extracts with determination by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. – J. Environ. Qual. 31: 466–470.
- TURNER, B. L., N. MAHIEU and L. M. CONDRON, 2003: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. Soil. Sci. Am. J. 67: 497–510.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- UHLMANN, D. and H. D. BAUER, 1988: A remark on microorganisms in lake-sediments with emphasis on polyphosphate-accumulating bacteria. Internat. Rev. ges. Hydrobiol. **73**: 703–708.
- UHLMANN, D., I. RÖSKE, M. HUPFER and G. OHMS, 1990: A simple method to distinguish between polyphosphate and other phosphate fractions of activated-sludge. Water Res. 24: 1355–1360.
- UHLMANN, D., K. RÖSKE, K. U. ULRICH and L. PAUL, 1998: Bacteria in the bottom sediment of a drinking water reservoir. – Internat. Rev. Hydrobiol. 83: 269–280.
- VADSTEIN, O., A. JENSEN, Y. OLSEN and H. REINERTSON, 1988: Growth and phosphorus status of limnetic phytoplankton and bacteria. – Limnol. Oceanogr. 33: 489–503.
- VADSTEIN, O., L. M. OLSEN, A. BUSCH, T. ANDERSEN and H. R. REINERTSEN, 2003: Is phosphorus limitation of planktonic heterotrophic bacteria and accumulation of degradable DOC a normal phenomenon in phosphorus-limited systems? A microcosm study. – FEMS Microbiol. Ecol. 46: 307–316.
- VALLAEYS, T., E. TOPP, G. MUYZER, V. MACHERET, G. LAGUERRE, A. RIGAUD and G. SOULAS, 1997: Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. – FEMS Microbiol. Ecol. 24: 279–285.
- VAN GROENESTIJN, J. W., M. H. DEINEMA and A. J. B. ZEHNDER, 1987: ATP production from polyphosphate in Acinetobacter strain 210A. – Arch. Microbiol. 148: 14–19.
- VAN LOOSDRECHT, M. C. M., G. J. SMOLDERS, T. KUBA and J. J. HEINEN, 1997: Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. – Antonie van Leeuwenhoek 71: 109–116.
- VAN WAZER, J. R. and R. DITCHFIELD, 1987: Phosphorus compounds and their ³¹P chemical shifts, pp. 1–23 *In*: C. T. BURT (ed.), Phosphorus NMR in biology. CRC Press.
- WAARA T., M. JANSSON and K. PETTERSON, 1993: Phosphorus composition and release in sediment bacteria of the genus *Pseudomonas* during aerobic and anaerobic conditions. – Hydrobiologia 253: 131–140.
- WAGNER, M., R. AMANN, H. LEMMER and K.-H. SCHLEIFER, 1993: Probing activated-sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. – Appl. Environ. Microbiol. 59: 1520–1525.
- WAGNER, M., R. ERHART, W. MANZ, R. AMANN, H. LEMMER, D. WEDI and K.-H. SCHLEIFER, 1994: Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. – Appl. Environ. Microbiol. 60: 792–800.
- WETZEL, R. G., 1999: Organic phosphorus mineralization in soils and sediments, pp. 225–245. In: K. R. REDDY, G. A. O'CONNOR and C. L. SCHELSKE (eds.), Phosphorus Biogeochemistry in subtropical ecosystems. Lewis Publishers.
- WOBUS, A., C. BLEUL, S. MAASSEN, C. SCHEERER, M. SCHUPPLER, E. JACOBS and I. RÖSKE, 2003: Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. – FEMS Microbiol. Ecol. 46: 331–347.
- WOOD, H. G. and J. E. CLARK, 1988: Biological aspects of inorganic polyphosphates. Annu. Rev. Biochem. 57: 235–260.
- ZHANG, H., Y. SEKIGUCHI, S. HANADA, P. HUGENHOLTZ, H. KIM, Y. KAMAGATA and K. NAKAMURA, 2003: Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1155–1163.

Manuscript received October 31th, 2006; revised April 19th, 2007; accepted June 6th, 2007

A3. POLYPHOSPHATE-ACCUMULATING MICROORGANISMS IN AQUATIC SEDIMENTS.

Hupfer, M., Gloess, S., P. & Grossart, H.-P. (2007): *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 47, pp. 299-311.

REVIEW

Polyphosphate-accumulating microorganisms in aquatic sediments

Michael Hupfer, Stefanie Gloess, Hans-Peter Grossart*

Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Müggelseedamm 310, 12561 Berlin, Germany

ABSTRACT: The direct contribution of microorganisms to the mobilisation and immobilisation of phosphorus (P) in aquatic sediments has been controversially discussed for more than a decade. Some authors have speculated that the microbial P pool is highly variable in the uppermost sediment layer, especially when excessive P accumulation in the form of polyphosphate (Poly-P) occurs. Poly-P storage is a widespread ability of many different organisms in nature. The phenomenon of Poly-P storage has been technically optimised in wastewater treatment plants (WWTP) providing conditions for enhanced biological phosphorus removal. New insights into the functioning of P elimination in WWTP were strongly linked to the development of novel methods, like ³¹P nuclear magnetic resonance, for the detection of Poly-P and molecular biological methods for the identification of the specific microorganisms responsible for biological P elimination. Our review summarises current literature on Poly-P in aquatic systems and discusses different potential habitats and mechanisms for Poly-P storage in sediments that are more diverse than in WWTP. Poly-P in sediments may originate from benthic or pelagic hetero- and autotrophic organisms. Poly-P-accumulating organisms in sediments may be of high ecological importance, since they insert phosphorus into the benthic food chain and affect the permanent P mineral deposition in sediments by physiologically inducing rapid P release. Although several studies indicate that Poly-P substantially contributes to total P in the uppermost sediment layer (up to 10%), its origin and the microorganisms and mechanisms involved in Poly-P storage and cycling are largely unknown. Therefore, we also aim to stimulate future studies focusing on these important areas of sediment research.

KEY WORDS: Polyphosphate · Polyphosphate-accumulating organisms · Microbial diversity · Sediments · Phosphorus cycle · Diagenesis · Waste water treatment plant

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Recent literature shows that microbial activity in surface sediments affects the phosphorus (P) release from sediments into water by various mechanisms (e.g. Boström et al. 1988, Roden & Edmonds 1997, Gächter & Müller 2003). The uppermost millimetres of the sediment surface are 'hot spots' for microbial transformation processes in aquatic ecosystems, often harbouring extremely high numbers of bacteria. Therefore, it has been speculated that bacteria are directly involved in P exchange across the sediment–water interface, especially under fluctuating environmental conditions, such as the presence and absence of oxygen (e.g. Boström et al. 1988, Davelaar 1993, Gächter & Meyer 1993, Ingall & Jahnke 1997). These ideas are supported by several studies in wastewater treatment plants (WWTP), which have shown that several types of microorganisms are able to take up P in excess and store it inside the cell in the form of polyphosphate (Poly-P; e.g. Hesselmann et al. 1999). Oscillating redox conditions in WWTP favour the growth of Poly-P-accumulating organisms (PAOs), which are responsible for the high biological P elimination. Poly-P storage accounted for up to 10% of total dry mass in a pure culture of *Acinetobacter* 210A (Deinema et al. 1985).

P in the biomass of sediment microorganisms as a regulator for the dynamics of benthic P fluxes has been controversially discussed throughout the last 2 decades. Experimental data (Gächter et al. 1988, Waara et al. 1993, Brunberg 1995), theoretical considerations (Davelaar 1993, Gächter & Meyer 1993) and detection of Poly-P in limnetic (Hupfer et al. 2004, Reitzel et al. 2006a) as well as marine sediments (Carman et al. 2000, Sannigrahi & Ingall 2005) provide strong indication that sediment microorganisms are indeed directly involved in P fixation. Other authors, however, guestion the relevance of microbial biomass as an important link for P cycling in sediments. For example, Golterman (2004) wrote: 'a rough estimate based on bacterial numbers in sediments shows that bacterial phosphate (including Poly-P) is not likely to be present in quantities for an important release'.

In general, the relative importance of microbial processes for P exchange across the sediment-water interface is difficult to determine because chemical and bacterial processes are tightly coupled and because sediment characteristics of different lakes show high variability. Our present knowledge of the origin and possible uptake and release mechanisms associated with Poly-P mediated by sediment microorganisms is very scarce, in particular for marine systems. The present review is focussed on summarising the main literature on microbial Poly-P storage in aquatic sediments and stimulating future studies on its ecological function.

INORGANIC POLYPHOSPHATE: A MOLECULE WITH MANY FUNCTIONS

This catchline coined by Kornberg et al. (1999) points to the multiple functions of Poly-P for living organisms. Inorganic Poly-P was already identified in yeast cells >100 yr ago (Liebermann 1890). It is a linear polymer comprised of a few up to several hundred residues of orthophosphate linked by high-energy phosphoanhydride bonds. This cell compound was considered a 'fossil molecule' for a long time because the importance of Poly-P as an energy storage component decreased during evolution from prokaryotes to eukaryotes (Kulaev & Kulakovskaya 2000). A number of enzymes of the Poly-P metabolism can still be found in prokaryotes, but not in eukaryotes. Poly-P most likely functioned in primitive organisms as ATP does in modern ones. Recent studies show that Poly-P is not only a nutrient storage component or convertible energy source, but fulfils several additional functions in various types of organisms, e.g. in cellular homeostasis and osmotic regulation (regulation of membrane transport), regulation of gene or even enzyme activities, stress response (e.g. Pick et al. 1990, Seviour et al. 2003, Kulaev et al. 2004), and detoxification of heavy metals by chelation (Kornberg 1995). Poly-P is localised in the cytoplasm and vacuoles either as granules, freely dissolved in the cytoplasm, or bound to cytoplasmic compounds such as RNA. Highly polymerised Poly-P, however, is located in the cytoplasm membrane, in the cell wall, or other organelle membranes (Kulaev et al. 2004).

Poly-P occurs ubiquitously in bacteria, fungi, protozoa, insects, algae, higher plants and even in mammals. Its accumulation is common in natural freshwater and marine phytoplankton (e.g. Miyata & Hattori 1986, Feuillade et al. 1995). The highest biomass-specific amounts of Poly-P, however, have been found in microorganisms, which store it as a nutrient and energy reserve, especially under fluctuating environmental conditions (Kulaev & Kulakovskaya 2000). Many genera of microorganisms in aquatic ecosystems are able to rapidly take up P beyond their physiological need ('luxury uptake'). Synthesis and storage of Poly-P are common among microorganisms (especially for cyanobacteria; McDignum et al. 2005), when P is sufficiently available after phases of acute P starvation ('overplus uptake'). The increased stress due to limited P availability implies the synthesis of a high-affinity uptake system for orthophosphate and additional enzymes, which transform orthophosphate into insoluble Poly-P inside the cell. These adaptations may provide competitive advantages when inorganic nutrients become limiting (e.g. McDignum et al. 2005, Eixler et al. 2006). Additionally, laboratory experiments have demonstrated that Poly-P storage in autotrophic microorganisms can also be influenced by various other environmental conditions, e.g. light (Sianoudis et al. 1986), sulphur (Lawerence et al. 1998) and nitrogen availability (Küsel et al. 1989). For heterotrophic microorganisms (both eukaryotes and prokaryotes), it has been further shown that Poly-P synthesis is linked to responses to physical and chemical stress in the environment (Brown & Kornberg 2004, Thomas & O'Shea 2005).

Much of the evidence that Poly-P represents an important energy source for microorganisms has been mainly derived from investigations of activated sludge. Biochemical models have been developed based on these studies to describe Poly-P cycling under alternating redox conditions (Comeau et al. 1986, Wentzel et al. 1991). According to these models the energy of Poly-P hydrolysis is used to take up labile organic carbon sources (e.g. low molecular fatty acids, alcohols and sugars) under anaerobic conditions and to store them in the form of polyhydroxyalkanoates (PHAs), in particular Poly- β -hydroxybutyrate (PHB). By doing so, some aerobic bacteria implement an 'emergency supply' for the maintenance of the major cellular functions. In the subsequent aerobic phase, bacteria use

the stored PHA as a source of carbon and energy for growth and other cell functions, including Poly-P resynthesis. The temporal separation of uptake and consumption of organic resources for growth is a highly efficient eco-physiological adaptation to alternating redox conditions. It offers a competitive advantage over other obligate aerobic bacteria that exclusively use external carbon sources.

The following section discusses mechanisms of microbial Poly-P accumulation, and conditions under which they may occur in natural aquatic sediments.

MICROBIAL POLYPHOSPHATE STORAGE IN AQUATIC SEDIMENTS

Potential ecological niches for PAO

Speculations that Poly-P bacteria are directly involved in the P exchange across the sediment-water interface are based on several studies in wastewater treatment plants/enhanced biological phosphorus removal (WWTP/EBPR). The phenomenon of excess P storage in WWTP and laboratory-scale reactors, without any addition of chemicals was discovered in the 1960s and has been intensively studied ever since (see review of Seviour et al. 2003). Alternating anaerobic and aerobic conditions favours growth of Poly-Pstoring bacteria in WWTP; thus, a high efficiency of P removal from the wastewater is achieved by withdrawing the sludge containing the P-enriched bacteria. In this regard, the optimisation of the EBPR technology led to an increase in the P content in activated sludge from 1–2% up to 3–8% of the total dry weight (Röske & Uhlmann 2005).

The role of bacteria in the observed elevated P enrichment in the activated sludge has been controversially discussed in the literature for a long time. The following facts, however, are now widely accepted

- PAOs are the main actors of P elimination in WWTP/ EBPR (Seviour et al. 2003)
- Poly-P degradation is coupled with the capacity for carbon storage (Santos et al. 1999)
- PAOs need labile organic matter, since it stimulates the cellular storage of the PHB/PHA used for Poly-P synthesis (Potgieter & Evans 1983)
- Nitrate prevents the release of Poly-P in the absence of oxygen because denitrifying bacteria substantially decrease the supply of organic substrates (Kortstee et al. 1994), and even store Poly-P themselves (Barak & van Rijn 2000)
- Sulphate reduction hinders Poly-P-storing bacteria by competition for organic acids (Yamamoto-Ikemoto et al. 1994), and by the toxic effects of the generated sulphide

• The low molecular mass fraction of Poly-P is exclusively utilised as an energy source under anaerobic conditions (Mino et al. 1985).

Toerien et al. (1990) stated that the optimised biological P elimination in activated sludge systems must depend on microorganisms that are favoured by oscillating redox conditions in nature. It is therefore assumed that the fluctuating redox conditions prevailing at the sediment-water interface may favour Poly-Pstoring heterotrophic bacteria (Davelaar 1993, Gächter & Meyer 1993). Lake sediments usually comprise strong vertical gradients of electron donors and acceptors. The resulting redox gradient leads to an ecologically well-defined distribution of microbial populations (Hanselmann 1986). Possible ecological niches of Poly-P-storing bacteria in sediments are microzones in which oxygen and/or nitrate are available from the overlying water together with labile organic matter such as short-chain organic acids from deeper horizons. Variations in redox gradients frequently occur, and are controlled by hydrodynamic conditions in the overlying water, such as stratification of the water body, bioturbation and sedimentation events of material rich in organic matter. Redox fluctuations may show sporadic or even regular temporal patterns, and in this regard microbial Poly-P storage may be induced by alternating redox conditions, particularly in the following microhabitats

- Littoral sediments: Diurnal changes of oxygen concentrations in the overlying water are caused by oxygen depletion due to respiration at night and oxygen over-saturation by photosynthesis during day time (Dodds 2003). Furthermore, diurnal and seasonal changes in the depth of oxygen penetration into littoral sediments have been observed
- Surficial sediments: The oxygen penetration depth into sediments is controlled by periodic internal seiches in stratified lakes (Lorke et al. 2003), and by the circulation frequency of the water body in polymictic lakes. However, oxygen penetration depth and the consequent shift of redox zones in the sediment also depend on variations in the vertical flux of organic carbon to the sediment. In addition, organic P can account for a high portion (up to 50%) of total P in detritus-rich sediments (e.g. Penn et al. 1995)
- Resuspended sediments: Repeated resuspension of sediment particles (and their attached microorganisms) is often accompanied by alternating changes of aerobic and anaerobic conditions (Gerhardt & Schink 2005)
- Microzones in the rhizosphere of macrophytes and tubes of macrozoobenthos: The aerenchyma of macrophyte roots and bioirrigation of tubes by the inhabiting zoobenthos transport oxygen to deeper horizons and supply the surrounding pore water with

organic acids that support the growth of aerobic bacteria (Aller 1994, Bodelier 2003). The supply by oxygen follows diurnal (macrophytes) or pulsative patterns (macrozoobenthos).

Storage of Poly-P is not solely limited to heterotrophic organisms, and autotrophs may also substantially contribute to the Poly-P pool in sediments. It has been well documented that different genera of phototrophic organisms are able to store P in excess in the form of Poly-P (e.g. Pick et al. 1990, Sudo et al. 1997, Eixler et al. 2006). Photoautotrophic organisms potentially contribute to P binding in aquatic sediments by Poly-P accumulation. The following scenarios are likely to occur in sediments

- Benthic microalgae and photoautotrophic bacteria (periphyton) store Poly-P in euphotic zones of aquatic environments (e.g. littoral sediments, riverbed sediments, wetland sediments)
- Pelagic algae are also able to store large quantities of Poly-P (Reynolds 1984). Studies on Poly-P metabolism, however, have been mostly carried out with cyanobacteria (e.g. Sicko-Goad & Jensen 1976, Jacobson & Halman 1982), and it has been shown that Poly-P storage in cells of *Microcystis aeruginosa* preferentially occurs in settling colonies (Reynolds et al. 1981). Settling of aggregated living microalgae, residues of zooplankton, and microalgae, which are intensively colonised by bacteria, fungi and micrograzers, might introduce substantial amounts of Poly-P into the sediments
- Several cyanobacteria are able to store Poly-P as a nutrient source in the sediment during their life cycle, which consists of benthic and pelagic stages. For example, *Microcystis* sp. colonies overwinter and survive for extended periods when buried in sediments (Preston et al. 1980, Brunberg 1995). The biomass of Microcystis sp. in the benthos of Lake Vallentunasjön temporarily encompassed >90% of the total living benthic biomass (Brunberg 1995). In the eutrophic Green Lake, colonies of a benthic population of Gleotrichia echinulata contained large Poly-P bodies and ascended from the sediments into the pelagic zone (Barbiero & Welch 1992). Their epilimnetic growth in Lake Erken has been shown to largely depend on these internal P reserves, which have been acquired during the benthic phase of their life cycle (Istvanovics et al. 1990).

Evidence and quantification of polyphosphate in aquatic sediments

The contribution of Poly-P on P fixation and release in sediments has been estimated by observations at a laboratory scale. Fleischer (1986) demonstrated that facultative anaerobic bacteria (Pseudomonas fluorescens) are able to rapidly assimilate P from solubilisation of Fe(III), with a rapid release under subsequent anaerobic conditions. This author speculated that Poly-P stored in bacteria is the source of most of the released P. Likewise, Gächter et al. (1988) observed that bacteria isolated from the sediments of eutrophic Lake Sempach bind and release P similarly to sewage sludge bacteria when exposed to alternating aerobicanaerobic conditions. Furthermore, in situ experiments in Lake Sempach indicate that P release from the sediment cannot conclusively be explained by iron dissolution alone. Waara et al. (1993) have carried out laboratory experiments with the bacterial isolate *Pseudomonas* sp., which was exposed in sediments of Lake Vallentunasjön. In contrast to the findings by Fleischer (1986), they did not find the expected rapid release of P from the cells under anaerobic conditions. Stimulation of bacterial biomass by glucose addition, however, clearly led to a ca. 30% increase in the nonreactive NaOH-extractable P (NaOH-NRP), which in activated sludge mainly includes Poly-P (Uhlmann et al. 1990). In laboratory experiments with and without addition of *Microcystis* sp., Brunberg (1995) found that variations in bacterial biomass and cellular P content cause measurable changes of total P in the sediment (especially of the NaOH-NRP fraction). This notion is supported by the findings of Törnblom & Rydin (1998), who used sediments from Lake Erken in laboratory experiments. Microbial activity and bacterial biomass production immediately increased in response to the deposition of seston and resulted in increasing P uptake rates from the overlying water and an increase in the NaOH-NRP pool at the sediment surface. These results are further supported by Goedkoop & Pettersson (2000), who found a significant relationship between seasonal changes in bacterial biomass and in the NaOH-NRP fraction of the same sediment. Since the amount of NaOH-NRP also correlates well with the chlorophyll *a* content of settling seston, discrimination between potential P uptake by bacteria and the supply with photoautotrophic organisms via sedimentation is impossible. All the above-mentioned conclusions are based on the interpretation of indirect results, and not on direct evidence and quantification of Poly-P. More recently, it has been shown that the NaOH-NRP fraction does not serve as a 'conservative measure of Poly-P' (Goedkoop & Pettersson 2000), because it contains a wide spectrum of different P-binding forms.

Direct evidence for microbial Poly-P storage in aquatic sediments has been obtained using a variety of chemical methods, summarised in Table 1. Uhlmann & Bauer (1988) presented the first direct evidence of Poly-P storing bacteria in the sediment of a eutrophic reservoir by direct observation with transmission elec-

Location	Main results	Method	Source
Lake sediments			
Reservoir Saidenbach (Germany)	Detection of P-rich inclusions in sediment bacteria (0–1 cm)	EM and X-ray	Uhlmann & Bauer (1988)
Lake Lucerne,	Poly-P: max. 50 % of non-reactive P in	EM and X-ray,	Hupfer et al. (1995)
Lake Baldegg (Switzerland)	NaOH extracts (0–0.5 cm)	NMR/LS	
Lake Gömmaren,	Poly-P: Distinct signals in 0–7 and 8–16 cm	NMR/LS	Carman et al. (2002)
Lake Långsjön (Sweden)	(L. Gömmaren) and in 0–5 cm (L. Långsjön)		
Twenty-two European lakes (Germany, Austria, Switzerland)	Poly-P: max. 11% of total P (0–1 cm); no Poly-P was evident in deeper layers (>2 cm); detection of Poly-P in trap material	NMR/LS	Hupfer et al. (2004)
Lake Sønderby (Denmark)	Poly-P: 3.2% of total P (0–1 cm); evidence also in anoxic layers up to $23-24$ cm depth	NMR/LS	Reitzel et al. (2006a)
Lake Erken (sweden)	Poly-P: 8.3% of total P (0–1 cm); Poly-P traces up to 5–6 cm depth; detection of Poly-P in trap material	NMR/LS	Reitzel et al. (2007)
Marine sediments			
Effingham Inlet/west coast of Vancouver Island	Poly-P: 8% of the total P (1-2 cm) from an oxic site; no Poly-P in deeper samples and in anoxic site	NMR/SS	Sannigrathi & Ingall (2005)
Nambian Shelf	Poly-P-storing sulphur bacteria (<i>Thiomargarita namibiensis</i>) are responsible for phosphorite deposition	Toluidine Blue staining, EM	Schulz & Schulz (2005)
Marine sinking particles from several oceans	Poly-P: max. 2% of total P	NMR/LS	Paytan et al. (2003)

Table 1. Poly-P in sediments. NMR/LS: liquid-state nuclear magnetic resonance; NMR/SS: solid-state NMR; EM: electron microscopy

tron microscopy (TEM). Poly-P granules are visible as electron dense structures that are darker than the surrounding cell material. The combination of TEM with an energy dispersive X-ray microanalysis allows the direct quantification of the elemental composition of these inclusions (Fig. 1). In addition to P, which has the highest signal intensity, Ca, Mg and K are often other main elements of Poly-P granules (Goldberg et al. 2001). The visible inclusions and their elemental composition in lake sediments are similar to those of bacteria from activated sludge. However, a reliable quantification of the microbial Poly-P content in a whole sediment sample by electron microscopy is impossible. By combining X-ray microanalysis with Poly-P quan-



Fig. 1. Left panel: Transmission electron microscopy micrograph of bacteria with Poly-P granules (arrow) from sediment surfaces (0 to 0.5 cm) of Lake Baldegg (Switzerland). Right panel: X-ray microanalysis of elemental composition of an electron dense inclusion (modified from Hupfer et al. 1995)

tification by means of ³¹P NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy, Hupfer et al. (1995) found that Poly-P granules identified by electron microscopy corresponded to distinct signals of Poly-P in NMR spectra in the surface sediments of 2 Swiss Lakes. ³¹P NMR spectroscopy is a powerful tool to distinguish several P compounds, such as phosphonates, phosphate, phosphate monoesters, phosphate diesters, pyrophosphate and Poly-P (Cade-Menun 2005).

An example of Poly-P quantification by means of ³¹P NMR in a surficial sediment is shown in Fig. 2. An extensive ³¹P NMR survey of sediments from 22 European lakes with different trophic status and morphometry has shown that Poly-P storage is not a rare or episodic phenomenon. In the top 0.5 cm of the sediment, the percentage of Poly-P ranged between 1.5 and 11.4 % of total P (Hupfer et al. 2004). In this study, Poly-P was not detected in deeper layers of most of the selected sediment cores. Con-

trary to this, the ³¹P NMR analysis of a sediment core of Lake Sønderby (Reitzel et al. 2006a) demonstrated that Poly-P might not only be detectable in substantial amounts at the sediment surface, but also in anoxic layers up to 24 cm depth. Traces of Poly-P were also evident in the anoxic layers (5 to 6 cm depth) in Lake Erken (Reitzel et al. 2007). The relative contribution of Poly-P in settling seston traps increased between 8 and 15 m, whereas no Poly-P could be detected in the phytoplankton at the same time. The authors explain the accumulation of Poly-P in traps by the colonisation of settling seston by Poly-P-storing bacteria. Khoshmanesh et al. (2002) concluded from laboratory investigations that microorganisms from a wetland sediment in Australia were able to form Poly-P under aerobic conditions whenever low molecular dissolved organic carbon was available. Their conclusion was derived from ³¹P NMR and TEM investigations that showed the presence of Poly-P only in acetate-amended experiments, but not in the controls. Moreover, Carman et al. (2000) have investigated various marine and lacustrine sediments by ³¹P NMR spectroscopy and found distinct signals of Poly-P middle groups in 2 of 3 investigated lake sediments, even in thick layers between 0 and 5 (7) cm depth. It is remarkable that no Poly-P was detected in Baltic Sea sediment samples from sites with permanent anoxic conditions in the overlying water. Similar findings have been reported by Sannigrahi & Ingall (2005), who used solid-state ³¹P NMR for comparison of 2 sites in a fjord in British Columbia. In these studies, Poly-P was only evident at oxic sediment surfaces, but



Fig. 2. ³¹P nuclear magnetic resonance spectra of NaOH extracts from surface sediments (0 to 1 cm) of Lake Erken (21 m water depth) taken in April 2004 (redrawn from Reitzel et al. 2006b). The table shows the quantification of the detected P species. The total P content of the sediment sample was 3100 μ g P g⁻¹ dry wt

not at anoxic ones. The authors calculated that Poly-P release might explain a substantial portion of the observed higher P release from sediments with overlying anoxic waters.

In a marine study by Schulz & Schulz (2005), further evidence is provided for benthic P fluxes resulting from Poly-P utilisation by the sulphide-oxidising bacterium Thiomargarita nambiensis in shelf sediments of the Namibian coast. High numbers of intracellular Poly-P inclusions were found by histological staining and electron microscopy under oxic conditions. Very high pore water P concentrations (ca. 8 mg l⁻¹) occurred in a narrow layer densely populated by this bacterium. The observed rates of P release by separated cells under anoxic conditions in the laboratory as well as thermodynamic considerations suggest an episodic P release by bacteria. This mechanism may potentially be responsible for the observed high P peak in the pore water and the extensive hydroxyapatite deposits in sediments of the Namibian coast.

Detection, quantification and characterisation of PAO

Although little is known about the phylogeny, ecology and physiology of PAOs in sediments, several methods have been used for their detection, quantification and characterisation in activated sludge. These approaches are also suitable for similar studies in lake sediments. The combination of molecular, e.g. fluorescence in situ hybridisation (FISH) and Poly-P staining techniques (DAPI or Neisser staining; see Serafim et al. 2002) in activated sludge showed that members of the Alphaproteobacteria and Actinobacteria contain intracellular Poly-P granules (Kawaharasaki et al. 1999). The design of new, more targeted oligonucleotide probes and the combination of different molecular methods such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and clone libraries have highlighted the importance of hitherto uncultured PAO. In particular, bacteria closely related to the genus Rhodocyclus (Betaproteobacteria) and some Actinobacteria seem to play an important ecological role in WWTP. By using FISH, the percentages of specific bacterial groups, including PAO, have been determined in laboratoryscale and full-scale plants (Table 2). The subsequent application of post-FISH Neisser, methylene blue, or DAPI staining indicated that bacteria closely related to Rhodocyclus indeed store Poly-P inside their cells (Crocetti et al. 2000, Onda et al. 2002, Onuki et al. 2002). In addition, clone libraries from activated sludge revealed many clones related to the genus Rhodocyclus (Bond et al. 1995, Hesselmann et al. 1999, Liu et al. 2001, McMahon et al. 2002), indicating their important role for Poly-P accumulation in WWTP. This finding is also supported by DGGE and subsequent sequencing of excised bands, since many sequences from WWTP belong to the genus Rhodocyclus (Ahn et al. 2002, Onda et al. 2002, Onuki et al. 2002).

Recently, the combination of FISH with microautoradiography (MAR-FISH) has enabled researchers to simultaneously study both structure and *in situ* substrate uptake patterns of individual microbial cells within a given bacterial community. In accordance with the above-mentioned studies, different morphotypes of *Betaproteobacteria*, in particular *Rhodocyclus*related bacteria, accumulate $^{33}P_i$ aerobically in activated sludge of full-scale WWTP (Kong et al. 2002, 2004). This finding is in good agreement with existing biochemical models of Poly-P storage (van Loosdrecht et al. 1997, Mino et al. 1998).

Moreover, bacteria other than those related to *Rhodocyclus*, mainly *Alpha*- and other *Betaproteobac*teria, also incorporate ³³P_i, but constitute only a minor fraction of the total bacterial community in activated sludge (Kong et al. 2004). Members of the *Actinobacte*ria also assimilate orthophosphate and store Poly-P granules. This has been shown in cultivation-dependent approaches for different isolates, e.g. *Microlunatus phosphovorus* (Santos et al. 1999) and *Tetrasphaera elongata* (Onda & Takii 2002), and more recently with the cultivation-independent MAR-FISH method for *Tetrasphaera*-related bacteria in activated sludge. These *Tetrasphaera*-related bacteria aerobically took up ³³P_i and stored Poly-P after anaerobic uptake of amino acids. In contrast to the existing biogeochemical models for typical PAO (see above), these bacteria do not assimilate acetate or store PHA (Kong et al. 2005). However, they often exhibit high percentages of the total microbial community in diverse full-scale WWTP, indicating an importance in the EBPR similar to that of *Rhodocyclus*-related bacteria. Differences in substrate availability in different types of waste stimulate the growth of several chemotaxonomic groups in different ways (Liu et al. 2001). Until now, it remains ambiguous whether other genera besides *Rhodocyclus* and *Tetrasphaera* are responsible for EBPR.

Despite 30 yr of research, many questions still remain unanswered regarding the phylogeny and ecological role of specific microbial communities in activated sludge from WWTP/EBPR. Almost all PAOs are extremely difficult to isolate, and to date no pure culture of a typical PAO exists. These methodological restrictions further complicate the studies of diversity and ecology of PAOs in natural sediments. A high bacterial diversity has been found in natural sediments when using culture-independent molecular methods (e.g. Wobus et al. 2003). Our own results, also obtained by culture-independent approaches, show that potential PAOs are always present in a variety of sediment samples of lakes and rivers in northeastern Germany (S. Gloess, M. Hupfer, H.-P. Grossart unpubl. results). However, information on the abundance, physiology and ecological role of PAOs in natural sediments is still scarce.

ECOLOGICAL RELEVANCE OF POLY-P ACCUMULATING ORGANISMS IN SEDIMENTS

Sediments act as sinks and sources for P. As a limiting factor, P controls the primary productivity in many aquatic ecosystems. The internal P cycle often delays the response of aquatic systems to changes in external P load by buffering due to simultaneous retention and mobilisation of P in sediments. For a long time, the exchange of P between sediment and water has mainly been explained by abiotic factors, e.g. its coupling to the redox-sensitive iron cycle in conjunction with oxygen availability in the overlying water (Einsele 1936, Mortimer 1941). More recently, however, benthic bacteria have been incorporated into these schemes, based on their potential influence on the ability of lake sediments to retain inorganic P, mainly by reducing iron and sulphate (Roden & Edmonds 1997, Gächter & Müller 2003). Today, it is well accepted that benthic microorganisms are directly involved in the transformation of P via both the transfer of inorganic P to organic P (biosynthesis) and of organic P to soluble compounds (mineralization).

teria, Spirochaetes), BET42a (Betaprofeobacteria), GAM42a (Gammaproteobacteria), HGC69a (Actinobacteria), CF319 (Cytophaga-Flavobacterium-group of the Bac-teroidetes), Aca23a (Acinetobacter), PAO462/PAO651/PAO846 (members of the Candidatus 'Accumulibacter' cluster), MP2 (Microlunatus phosphovorus), Actino1011 (Tetrasphaera japonica, EBPR clones Ebpr19, Ebpr20 [Actinobacteria]). SBR: sequence batch reactor; VFA: volatile fatty acid; A/O: anoxic/oxic; WWTP: wastewater (Tetrasphaera japonica, EBPR clones Ebpr19, Ebpr20 [Actinobacteria]). SBR: sequence batch reactor; VFA: volatile fatty acid; A/O: anoxic/oxic; WWTP: wastewater treatment plants, EBPR: enhanced biological phosphorus removal Table 2. Relative fractions of different microbial groups in percent of total cell counts (DAPI) or of eubacteria (EUB). Studies have been performed using fluorescent in situ hybridisation (FISH) with various 16S and 23S rRNA oligonucleotide probes in laboratory-scale and full-scale plants (for details see section 'Detection, quantification and characterisation of PAO'). The following oligonucleotide probes (www.microbial-ecology/probebase) have been used: ALF1b (Alphaproteobacteria, some Deltaproteobac-

Laboratory-scale with EBPR	ALF 1b	BET 42a	GAM 42a	HGC 69a	CF 319	Aca 23a	PAO 462	PAO 651	PAO 846	PAO mix	MP2	Actino 1011	Counts relative to:	Source
SBR sludge fed with acetate (run P1)	14	77	-	-		0		20					EUB	Kong et al. (2002)
SBR sludge fed with a mixture of VFAs	25	54	12	ŊŊ			25			53			EUB	Levantesi et al. (2002)
(A/O)- and Phoredox-sludge	12 - 17	22	7.5-8.5	12-17	12 - 17	3^{-5}			3^{-5}		3^{-5}	10	DAPI	Eschenhagen et al. (2003)
SBR sludge (named P)	4	45	$\stackrel{\scriptstyle <}{}_{1}$	35									DAPI	Bond et al. (1999)
SBR sludge fed with acetate	7	64	< 0.1	10	4						3		DAPI	Kawaharasaki et al. (1999)
and peptone														
SBR sludge fed with acetate	9.5	41.3	6.8	17.9	4.5				35.2			16.7	DAPI	Liu et al. (2001)
SBR sludge fed with glucose,	14	30	12	14		S								
high P loading														
SBR sludge fed with acetate,	15	34	12	16		4							EUB	Sudiana et al. (1999)
high P loading														
SBR sludge	12	80		28	14								EUB	Crocetti et al. (2000)
SBR fed with acetate	e	89	2	$^{<1}$	2 •	< 0.01								
SBR fed with a mixture	6	34	7	20	16	5							EUB	Hesselmann et al. (1999)
Full-scale						ALF	BET	GAM	HGC	СF	Aca	PAO	Counts	Source
						1b	42a	42a	69a		23a	mix	relative to:	
Municipal WWTP with EBPR			Aerobic	zone		13	33	10	17	1	1		DAPI	Kämpfer et al. (1996)
			Anaerok	oic zone		13	25	12	27	1	1			
Process plant without N recyclin	ig with E	BPR	End of a	erobic st	age	10	25	3	6			18	DAPI	Zilles et al. (2002)
Aerated-anoxic Orbal process pl	lant with	EBPR	End of a	erobic st	age	4	12	£	15	4		13		
Municipal WWTP			Aeratior	n basin/h	igh load	10	42	34					EUB	Wagner et al. (1994)
			Aeratior	1 basin/lo	w load	37	37	Ł					EUB	
Municipal WWTP (1-state-syster	m)		No infor	mation		12	59.5	24.1	8.8	22.8			DAPI	Manz et al. (1994)
SBR-treating dairy sewage			No infor	mation		2.1	6.0	6.5	22.9	85			DAPI	

By assembling the available information on the potential role of PAO in P regeneration in aquatic sediments, we propose the following simplified scenario (Fig. 3). The settling of seston-associated PAO influences P sedimentation rates and the seasonal patterns of Poly-P occurrence at the sediment surface (Fig. 3, transfer process a). For example, Gächter & Mares (1985) have observed that settling particles in lakes do not always lose P, but also act as sinks for soluble P. It has been hypothesised that even decaying algae and their decomposers with low P contents can take up orthophosphate during sedimentation. The stripping of P from the water by sedimentation of PAO could thus efficiently decrease the availability of P for epilimnetic primary production.

Upon sedimentation, microbial Poly-P likely becomes a highly variable P pool in sediments, which is controlled by several uptake and release mechanisms: at the oxic and detritus-rich sediment surface, settled organic P, including Poly-P, can be released from decaying algae and bacteria by means of (alkaline) phosphatase activities or by physiological responses of living cells to dramatic changes in environmental parameters following sedimentation. On the other hand, P uptake for bacterial growth could be due to decomposition of non-living organic matter, by enzymatically catalysed dissolution of iron-bound P (Fig. 3, transfer process b), or direct uptake from the sediment pore water (Fleischer 1986, Boström et al. 1988). Heterotrophic benthic Poly-P bacteria have a dual function in P turnover. On the one hand, they influence the organic P pool by hydrolysis and subsequent P uptake in their biomass during the decomposition of organic matter. On the other hand, they regulate the P availability through metabolism of inorganic Poly-P. Another general ecological function of bacteria is to assimilate and re-introduce organic matter into the food chain (Davelaar 1993). The consumption of detritus and associated microorganisms by meio- and macrozoobenthos increases the P regeneration due to mineralization of P-containing organic matter (Andersson et al. 1988). It is well documented that benthic animals excrete dissolved P in substantial quantities (e.g. Devine & Vanni 2002). Furthermore, benthivorous fishes, as top predators in the benthic food chain, translocate P from the sediment into the water by P excretion (Persson & Svensson 2006). These P regeneration pathways in the food chain will be reinforced when benthic animals graze on P-rich PAO instead of bacteria with much lower P content (Fig. 3, transfer process c).

Temporal fluctuations of the oxic/anoxic boundary layer within the sediment can lead to a strong induction of microbial P release (Fig. 3, transfer process d). This mechanism could result in rapid increases in P concentrations of the sediment pore water, which are



Retention

Fig. 3. Simplified scheme of the supposed functions of biomass P, including Poly-P in P diagenesis in aquatic sediments. Transfer processes between the most important P pools are shown (partially based on Boström et al. [1988] and Roden & Edmonds [1997]). a: increase of P sedimentation; b: enzymatic dissolution of iron-bound P; c: P transfer in the benthic food chain; d: rapid P release under changed redox conditions; e: formation of FE(II) minerals (e.g. vivianite); f: formation of Ca-P minerals (e.g. hydroxyapatite); g: permanent deposition of Poly-P (see section 'Ecological relevance of PAO in sediments')

at times higher than those mediated by iron-controlled P release alone. Such high P concentrations can even induce authigenic P mineral precipitation such as vivianite (Fig. 3, transfer process e) and hydroxyapatite (Fig. 3, transfer process f). The presence of high concentrations of Ca^{2+} or Fe^{2+} is a key condition to attain saturation for mineral formation. In anaerobic, ironrich sediments microbial reduction of Fe(III) oxide produces Fe²⁺. The concentration of Fe²⁺ in the pore water depends on the sulphate concentration in the system and the extent of sulphate reduction (Roden & Edmonds 1997). High sulphate concentrations in marine and in some lacustrine systems favour the formation of sulphide and the subsequent immobilisation of iron as FeS₂, which prevents the precipitation of Fe(II)-P minerals. In calcite-rich sediments the formation of apatite-like minerals can indeed be induced by bacterial P release (Schulz & Schulz 2005). In general, mineral formation increases the permanent burial of P and removes P from the biosphere for geological time scales.

P retention in sediments is also influenced by Poly-P enclosed in the cells of dormant or dead PAO and by the production and accumulation of non-metabolisable organic P (Fig. 3, transfer process g) (Gächter & Meyer 1993, Ingall & Jahnke 1997). It has been proposed that the metabolism by PAO could be an alternative way for the redox-sensitive P cycling in sediments (e.g. Davelaar 1993, Ingall et al. 2005). The pathways illustrated in Fig. 3 show that the ecological consequences of P regeneration in sediments differ from each other when P is initially stored in PAO and not bound to iron. In fact, Poly-P seems to be a highly variable P pool in sediments. Sediment core studies have shown that the contribution of Poly-P to the release of P during diagenesis should not be disregarded when compared with the dissolution of P bound to iron hydroxides (Hupfer et al. 2004, Reitzel et al. 2007). Some preliminary studies suggest that microbial Poly-P formation in natural sediments can be induced by alternating anoxic and oxic conditions (Khoshmanesh et al. 2002, Hupfer et al. 2004).

Although there is substantial information on the topic, the ecological role of PAOs in natural sediments remains highly speculative, since up to now most of the PAOs are neither phylogenetically, nor physiologically characterised.

CONCLUSIONS AND FUTURE RESEARCH NEEDED

Major statements of our review are

• Modern Poly-P detection methods revealed that Poly-P in aquatic sediments can frequently account for a substantial fraction of total P in surface sediments (maximum ca. 10% of total P). A relationship between the occurrence and content of Poly-P in sediments and the trophy or other lake and sediment characteristics has not yet been shown

- Poly-P in sediments may originate from various sources, such as benthic or pelagic hetero- and autotrophic organisms. Aggregates of settling seston potentially colonised by microorganisms could act as efficient carriers for Poly-P deposition to the sediment surface. Field experiments need to test whether Poly-P in sediments is of pelagic or benthic origin
- The reliable quantification of Poly-P by ³¹P NMR methods enables the monitoring of Poly-P dynamics under laboratory and field conditions in specific habitats, especially when the detection sensitivity can be further increased. Further experiments are necessary to verify under which conditions storage and release of Poly-P occur at the sediment surface (e.g. light, oxygen, redox gradients, substrates)
- The combination of TEM with energy-dispersive X-ray microanalysis has shown that Poly-P in sediments often occurs inside microbial cells. Since benthic and activated sludge systems are characterised by periodic or episodic changes of redox conditions and the availability of various carbon sources, a certain parallelism between PAO in benthic and activated sludge systems has been proposed. Although such a parallelism seems likely, direct proof is still missing. In addition, potential mechanisms and niches of microbial Poly-P accumulation in aquatic sediments are more diverse than in activated sludge. These differences may also result in distinct differences in the physiology and ecology of PAO from both systems
- Poly-P bacteria have the potential to control a significant portion of the P fluxes between the sediment and the overlying water by redox-dependent changes of their physiology. The metabolism of PAOs and their rapid P release may even result in authigenic P mineral formation and, thus, in an increase of the permanent P deposition in sediments
- The combination of different methodological approaches allows studies on the dominant PAO in sediments; in particular, the detection and separation of PAOs from natural sediment samples allows their precise phylogenetic characterisation. This knowledge will contribute to our understanding of the ecological function of PAO in the internal P cycle of aquatic systems. Until now, however, it has been uncertain whether key organisms known to carry out Poly-P storage in activated sludge play a similar role in natural sediments
- Once the physiology of PAOs and their role in Poly-P cycling in sediments are sufficiently understood, it will be possible to combine these findings with our current knowledge on geochemical cycles. This will

be an important step to further improve the existing quantitative models for P exchange between sediments and the overlying water.

Acknowledgements. Kirsten Pohlmann (IGB), Isolde Röske (TU Dresden) and Kasper Reitzel (University of Southern Denmark Odense) are warmly acknowledged for many helpful comments on the manuscript. Furthermore, we thank Paul del Giorgio and 2 anonymous reviewers for their many suggestions on an earlier version of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Ahn J, Daidou T, Tsuneda S, Hirata A (2002) Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. Water Res 36:403–412
- Aller RC (1994) Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. Chem Geol 114:331–345
- Andersson G, Graneli W, Stenson J (1988) The influence of animals on phosphorus cycling in lake ecosystems. Hydrobiologia 170:267–284
- BarakY, van Rijn J (2000) A typical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans.* Appl Environ Microbiol 66:1209–1212
- Barbiero RP, Welch EB (1992) Contribution of benthic bluegreen algal recruitment to lake populations and phosphorus translocation. Freshw Biol 27:249–260
- Bodelier PLE (2003) Interactions between oxygen releasing roots and microbial processes in flooded soils and sediments. In: de Kroon H, Visser EJW (eds) Root ecology. Ecol Stud 168:331–262
- Bond PL, Hugenholtz P, Keller J, Blackall LL (1995) Bacterial community structures of phosphate-removing and nonphosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. Appl Environ Microbiol 61:1910–1916
- Bond PL, Blackall LL, Keller J, Wagner M, Erhart R (1999) Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. Appl Environ Microbiol 65: 4077–4084
- Boström B, Andersen JM, Fleischer S, Jansson M (1988) Exchange of phosphorus across the sediment–water interface. Hydrobiologia 170:229–244
- Brown RW, Kornberg A (2004) Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. Proc Natl Acad Sci USA 101:16085–16087
- Brunberg AK (1995) Microbial activity and phosphorus dynamics in eutrophic lake-sediments enriched with *Microcystis* colonies. Freshw Biol 33:541–555
- Cade-Menun BJ (2005) Using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy to characterize organic phosphorus in environmental samples. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) Organic phosphorus in the environment. CABI Publishing, Wallingford
- Carman R, Edlund G, Damberg C (2000) Distribution of organic and inorganic phosphorus compounds in marine and lacustrine sediments: a ³¹P NMR study. Chem Geol 163: 101–114
- Comeau Y, Hall KJ, Hancock REW, Oldham WK (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. Water Res 20:1511–1521

- Crocetti GR, Hugenholtz P, Bond PL, Schuler A, Keller J, Jenkins D, Blackall LL (2000) Identification of polyphosphateaccumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. Appl Environ Microbiol 66:1175–1182
- Davelaar D (1993) Ecological significance of bacterial polyphosphate metabolism in sediments. Hydrobiologia 253: 179–192
- Deinema MH, Van Loosdrecht M, Scholten A (1985) Some physiological characteristics of *Acinetobacter* spp. accumulating large amounts of phosphate. Water Sci Technol 17:119–125
- Devine JA, Vanni MJ (2002) Spatial and seasonal variation in nutrient excretion by benthic invertebrates in a eutrophic reservoir. Freshw Biol 47:1107–1121
- Dodds WK (2003) The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. J Phycol 39: 840–849
- Einsele W (1936) Über die Beziehungen des Eisenkreislaufs zum Phosphatkreislauf im eutrophen See. Arch Hydrobiol 29:664–686
- Eixler S, Karsten U, Selig U (2006) Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. Phycologia 45: 53–60
- Eschenhagen M, Schuppler M, Röske I (2003) Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. Water Res 37:3224–3232
- Feuillade J, Bielicki G, Renou JP (1995) ³¹P-NMR study of natural phytoplankton samples. Hydrobiologia 301:391–398
- Fleischer S (1986) Aerobic uptake of Fe(III)-precipitated phosphorus by microorganisms. Arch Hydrobiol 107:269–277
- Gächter R, Mares A (1985) Does settling seston release soluble reactive phosphorus in the hypolimnion of lakes? Limnol Oceanogr 30:364–371
- Gächter R, Meyer JS (1993) The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments. Hydrobiologia 253:103–121
- Gächter R, Müller B (2003) Why the phosphorus retention of lakes does not necessarily depend on the oxygen supply to their sediment surface. Limnol Oceanogr 48:929–933
- Gächter R, Meyer JS, Mares A (1988) Contribution of bacteria to release and fixation of phosphorus in lake sediments. Limnol Oceanogr 33:1542–1558
- Gerhardt S, Schink B (2005) Redox changes of iron caused by erosion, resuspension and sedimentation in littoral sediment of a freshwater lake. Biogeochemistry 74:341–356
- Goedkoop W, Pettersson K (2000) Seasonal changes in sediment phosphorus forms in relation to sedimentation and benthic bacterial biomass in Lake Erken. Hydrobiologia 431:41–50
- Goldberg J, Gonzalez H, Jensen TE, Corpe WA (2001) Quantitative analysis of the elemental composition and the mass of bacterial polyphosphate bodies using STEM EDX. Microbios 106:177–188
- Golterman HL (2004) The chemistry of phosphate and nitrogen compounds in sediments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Hanselmann KW (1986) Microbially mediated processes in environmental chemistry (lake sediments as model systems). Chimia 40:146–159
- Hesselmann RXP, Werlen C, Hahn D, van der Meer JR, Zehnder AJB (1999) Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. Syst Appl Microbiol 22:454–465

- Hupfer M, Gächter R, Rüegger H (1995) Poly-P in lake sediments. ³¹P-NMR spectroscopy as a tool for its identification. Limnol Oceanogr 40:610–617
- Hupfer M, Rübe B, Schmieder P (2004) Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: a ³¹P NMR study. Limnol Oceanogr 49:1–10
- Ingall E, Jahnke R (1997) Influence of water-column anoxia on the elemental fractionation of carbon and phosphorus during sediment diagenesis. Mar Geol 139:219–229
- Ingall E, Kolowith L, Lyons T, Hurtgen M (2005) Sediment carbon, nitrogen and phosphorus cycling in an anoxic fjord, Effingham Inlet, British Columbia. Am J Sci 305:240–258
- Istvanovics V, Pettersson K, Pierson D (1990) Partitioning of phosphate uptake between different size groups of planktonic microorganisms in Lake Erken. Mitt Int Ver Theor Angew Limnol 24:231–235
- Jacobson L, Halman M (1982) Polyphosphate metabolism in the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. J Plankton Res 4:481–488
- Kämpfer P, Erhart R, Beimfohr C, Bohringer J, Wagner M, Amann R (1996) Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. Microb Ecol 32:101–121
- Kawaharasaki M, Tanaka H, Kanagawa T, Nakamura K (1999) In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNAtargeted oligonucleotide probes and 4', 6-diamidino-2phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. Water Res 33:257–265
- Khoshmanesh A, Hart BT, Duncan A, Beckett R (2002) Luxury uptake of phosphorus by sediment bacteria. Water Res 36: 774–778
- Kong YH, Beer M, Rees GN, Seviour RJ (2002) Functional analysis of microbial communities in aerobic– anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. Microbiology 148: 2299–2307
- Kong YH, Nielsen JL, Nielsen PH (2004) Microautoradiographic study of *Rhodocyclus*-related polyphosphateaccumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. Appl Environ Microbiol 70: 5383–5390
- Kong YH, Nielsen JL, Nielsen PH (2005) Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphateaccumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. Appl Environ Microbiol 71: 4076–4085
- Kornberg A (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. J Bacteriol 177:491– 496
- Kornberg A, Roa NN, Ault-Riché D (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. Annu Rev Biochem 68:89–125
- Kortstee GJJ, Appeldoorn KJ, Bonting CFC, Van Niel EWJ, Van Veen HW (1994) Biology of polyphosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. FEMS Microbiol Rev 15:137–153
- Kulaev IS, Kulakovskaya TV (2000) Polyphosphate and phosphate pump. Annu Rev Microbiol 54:709–734
- Kulaev IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV (2004) The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley & Sons, New York
- Küsel AC, Sianoudis J, Leibfritz D, Grimme LH, Mayer A (1989) ³¹P *in vivo* NMR investigations on the function of

polyphosphates as phosphate-source and energy-source during the regreening of the green alga *Chlorella fusca*. Arch Microbiol 152:167–171

- Lawerence BA, Suarez C, DePina A, Click E, Kolodny NH, Allen MM (1998) Two internal pools of soluble polyphosphate in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6308: an *in vivo* ³¹P NMR spectroscopic study. Arch Microbiol 169:195–200
- Levantesi C, Serafim LS, Crocetti GR (2002) Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor. Environ Microbiol 4:559–569
- Lieberman L (1890) Detection of metaphosphoric acid in the nuclein of yeast. Pfluegers Arch 47:155–160
- Liu WT, Nielsen AT, Wu JH, Tsai CS, Matsuo Y, Molin S (2001) *In situ* identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. Environ Microbiol 3:110–122
- Lorke A, Müller B, Maerki M, Wüest A (2003) Breathing sediments: the control of diffusive transport across the sediment-water interface by periodic boundary-layer turbulence. Limnol Oceanogr 48:2077–2085
- Manz W, Wagner M, Amann R, Schleifer KH (1994) *Insitu* characterization of the microbial consortia active in two waste-water treatment plants. Water Res 28: 1715–1723
- McDignum M, Matthijs HCP, Pel R, Laanbroek HJ, Mur LR (2005) Nutrient limitation of freshwater cyanobacteria. In: Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM (eds) Harmful cyanobacteria. Springer, Heidelberg, p 65–86
- McMahon KD, Dojka MA, Pace NR, Jenkins D, Keasling JD (2002) Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. Appl Environ Microbiol 68:4971–4978
- Mino T, Kawakami T, Matsuo T (1985) Location of phosphorus in activated sludge and function of intracellular polyphosphates in biological phosphorus removal process. Water Sci Technol 17:93–106
- Mino T, van Lodsdrecht MCM, Heijnen JJ (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. Water Res 32:3193–3207
- Miyata K, Hattori A (1986) A simple fractionation method for determination of phosphorus components in phytoplankton: application to natural populations of phytoplankton in summer surface waters of Tokyo bay. J Oceanogr Soc Japan 42:255–265
- Mortimer CH (1941) The exchange of dissolved substances between mud and water in lakes. J Ecol 29:280–329
- Onda S, Takii S (2002) Isolation and characterization of a Gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium. J Gen Appl Microbiol 48:125–133
- Onda S, Hiraishi A, Matsuo Y, Takii S (2002) Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratory-scale anaerobic/aerobic activated sludge system. J Gen Appl Microbiol 48:43–54
- Onuki M, Satoh H, Mino T (2002) Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate. Water Sci Technol 46:145–153
- Payton A, Cade-Menum BJ, McLaughlin K, Faul KL (2003) Selective phosphorus regeneration of sinking marine particles: evidence from ³¹P NMR. Mar Chem 82:55–70
- Penn MR, Auer T, Van Orman EL, Korienek JJ (1995) Phosphorus diagenesis in lake sediments: investigations using fractionation techniques. Mar Freshw Res 46:89–99

- Persson A, Svensson JM (2006) Effects of benthivorous fish on biogeochemical processes in lake sediments. Freshw Biol 51:1298–1309
- Pick U, Bental M, Chitlaru E, Weiss M (1990) Polyphosphatehydrolysis—A protective mechanism against alkaline stress? FEBS Lett 274:15–18
- Potgieter DJJ, Evans BW (1983) Biochemical changes associated with luxury phosphate uptake in a modified Phoredox activated sludge system. Water Sci Technol 15:105– 115
- Preston T, Stewart WDP, Reynolds CS (1980) Bloom-forming cyanobacterium *Microcyctis aeruginosa* overwinters on sediment surface. Nature 288:365–367
- Reitzel K, Ahlgren J, Gogoll A, Rydin E (2006a) Effects of aluminium treatment on phosphorus, carbon, and nitrogen distribution in lake sediment: a ³¹P NMR study. Water Res 40:647–654
- Reitzel K, Ahlgren J, Gogoll A, Jensen HS, Rydin E (2006b) Characterization of phosphorus in sequential extracts from lake sediments using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Can J Fish Aquat Sci 63:1686–1699
- Reitzel K, Ahlgren J, DeBrabandere H, Waldebäk M, Gogoll A, Tranvik L (2007) Degradation rates of organic phosphorus in lake sediments. Biogeochemistry 82:15–28
- Reynolds CS (1984) The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge
- Reynolds CS, Jaworski GHM, Cmiech HA, Leedale GF (1981) On the annual cycle of blue-green alga, *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. Elenkin. Philos Trans R Soc Lond, B 293:419–477
- Roden EE, Edmonds JW (1997) Phosphate mobilization in iron-rich anaerobic sediments: microbial Fe(III) oxide reduction versus iron-sulfide formation. Arch Hydrobiol 139:347–378
- Röske I, Uhlmann D (2005) Biologie der Wasser- und Abwasserbehandlung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Sannigrahi P, Ingall E (2005) Polyphosphates as a source of enhanced P fluxes in marine sediments overlain by anoxic waters: evidence from 31 P NMR. Geochem Trans 6:52–59
- Santos MM, Lemos PC, Reis MAM, Santos H (1999) Glucose metabolism and kinetics of phosphorus removal by the fermentative bacterium *Microlunatus phosphovorus*. Appl Environ Microbiol 65:3920–3928
- Schulz HN, Schulz HD (2005) Large sulfur bacteria and the formation of phosphorite. Science 307:416–418
- Serafim LS, Lemos PC, Levantesi C (2002) Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. J Microbiol Meth 51:1–18
- Seviour RJ, Mino T, Onuki M (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. FEMS Microbiol Rev 27:99–127
- Sianoudis J, Küsel AC, Mayer A, Grimme LH, Leibfritz D (1986) Distribution of polyphosphates in cell-compartments of *Chlorella fusca* as measured by ³¹P-NMR spectroscopy. Arch Microbiol 144:48–54

Editorial responsibility: Paul del Giorgio, Montréal, Québec, Canada

- Sicko-Goad LM, Jensen TE (1976) Phosphate-metabolism in blue-green alage. II. Changes in phosphate distribution during starvation and the 'polyphosphate overplus' phenomenon in *Plectonema boryanum*. Am J Bot 63:183–188
- Sudiana IM, Mino T, Satoh H, Nakamura K, Matsuo T (1999) Metabolism of enhanced biological phosphorus removal and non-enhanced biological phosphorus removal sludge with acetate and glucose as carbon source. Water Sci Technol 39:29–35
- Sudo H, Yamada A, Nakamura K, Matsunaga T (1997) Phosphorus accumulation by a marine photosynthetic bacterium, *Chromatium* sp. Biotechnol Lett 19:783–786
- Thomas MR, O'Shea EK (2005) An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. Proc Natl Acad Sci USA 102:9565–9570
- Toerien DF, Gerber A, Lötter LH, Cloete TE (1990) Enhanced biological phosphorus removal in activated sludge systems. Adv Microb Ecol 11:173–230
- Törnblom E, Rydin E (1998) Bacterial and phosphorus dynamics in profundal Lake Erken sediments following the deposition of diatoms: a laboratory study. Hydrobiologia 364:55–63
- Uhlmann D, Bauer HD (1988) A remark on microorganisms in lake-sediments with emphasis on polyphosphate-accumulating bacteria. Int Rev Hydrobiol 73:703–708
- Uhlmann D, Röske I, Hupfer M, Ohms G (1990) A simple method to distinguish between polyphosphate and other phosphate fractions of activated-sludge. Water Res 24: 1355–1360
- van Loosdrecht MCM, Smolders GJ, Kuba T, Heijnen JJ (1997) Metabolism of micro-organisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. Antonie van Leeuwenhoek 71:109–116
- Waara T, Jansson M, Petterson K (1993) Phosphorus composition and release in sediment bacteria of the genus *Pseudomonas* during aerobic and anaerobic conditions. Hydrobiologia 253:131–140
- Wagner M, Erhart R, Manz W, Amann R, Lemmer H, Wedi D, Schleifer KH (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. Appl Environ Microbiol 60:792–800
- Wentzel MC, Lötter LH, Ekama GA, Loewenthal RE, Marais GvR (1991) Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal. Water Sci Technol 23: 567–576
- Wobus A, Bleul C, Maassen S, Scheerer C, Schuppler M, Jacobs E, Röske I (2003) Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. FEMS Microbiol Ecol 46:331–347
- Yamamoto-Ikemoto R, Matsui S, Komori T (1994) Ecological interactions among denitrification, poly-P accumulation, sulfate reduction, and filamentous sulfur bacteria in activated sludge. Water Sci Technol 30:201–210
- Zilles JL, Peccia J, Kim MW, Hung CH, Noguera DR (2002) Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. Appl Environ Microbiol 68: 2763–2769

Submitted: October 19, 2006; Accepted: April 17, 2007 Proofs received from author(s): May 24, 2007

ANHANG B – WEITERE ANGABEN

B1. Dank

- B2. Lebenslauf
- B3. Erklärung

B1. DANK

An erster Stelle möchte ich Dr. Michael Hupfer und Dr. Hans-Peter Grossart für die Überlassung dieses spannenden Themas, die Betreuung meiner Arbeit und die gewährten Freiräume danken. Für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und Geduld bei der Erstellung der Dissertation bin ich sehr dankbar.

Prof. Dr. Meinhard Simon danke ich für die kurzfristige Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit.

Dank gebührt auch Prof. Dr. Rainer Koschel, der immer dann "wenn die Säge klemmte" und wichtige Gerätschaften angeschafft werden mussten, einen Finanzierungsweg fand, ebenso wie Dr. Jörg Gelbrecht, dem ich ebenfalls danken möchte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biogeochemie und der Außenstelle Neuglobsow, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere Christiane Herzog, Elke Mach und Monika Degebrodt danke ich für die tatkräftige Unterstützung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Dr. Martin Allgaier für seinen humorvollen moralischen Beistand bei vielen Höhen und Tiefen im Laboralltag. Danke für die vielschichtigen Diskussionen, konstruktiven Ratschläge und das Korrekturlesen der Manuskripte!

Prof. Sylvia Schnell und Dr. Stefan Ratering danke ich für den Aufenthalt in der Arbeitsgruppe Bodenmikrobiologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen und die Einarbeitung in das Mikrodissektions-System.

Dr. Peter Schmieder danke ich für die Möglichkeit, das NMR-Spektrometer am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin zu nutzen, Dr. Michael Hupfer danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen.

Bei Antje Kreutzer möchte ich mich für die vielen unvergesslichen Stunden auf ihrem Hof bedanken, in denen ich auch nach stressigen Labortagen innere Ausgeglichenheit und Zufriedenheit finden konnte.

Nicht zu vergessen ist der Rückhalt durch meine Familie. Für Eure Unterstützung in allen Lebenslagen, die sicherlich nicht selbstverständlich ist, vielen Dank!

Besonderer Dank gilt meinem Mann Carsten, der mich stets bestärkte, auch wenn ich an mir gezweifelt habe. Danke für Deine einzigartige moralische und tatkräftige Unterstützung und Dein Verständnis für die vielen Stimmungsschwankungen in der "heißen Phase" dieser Arbeit, die zusätzlich mit den Geburten unserer beiden Kinder verbunden war! Oma Ruth, Opa Gerhard und "mein Großer", auch wenn Ihr die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr erleben durftet, so bin ich auch Euch zu großem Dank verpflichtet!

Ebenso sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

B2. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Stefanie Glöß
Geburtsdatum:	03.02.1979
Geburtsort:	Plauen
Familienstand:	verheiratet, zwei Kinder
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Berufstätigkeit

Jan. 2004 - April 2007	Wissenschaftliche	Angestellte	am	Leibniz-Institut	für	
	Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB), Berlin					
Universitätsausbildung						
1997 - 2003	Studium der Biologie Diplomarbeit am Inst	an der Justus itut für Angewa	-Liebig- andte M	Universität Giesse likrobiologie	ən	
	Titel der Arbeit: "Die A Partialdruckes auf un einem Grünlandbode Abschluss: Diplom-B	Auswirkung ein hterschiedliche en" iologin	nes erh mikrob	öhten CO ₂ - ielle Kenngrößen	in	
2001 - 2003	Studium der Agrarwis Universität Giessen	ssenschaften a	an der J	lustus-Liebig-		

Schulausbildung

1990 - 1997	Diesterweg-Gymnasium Plauen
	Abschluss: Abitur
1985 - 1990	Grundschule Thoßfell

B3. ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.