

Moleküle im Einsatz

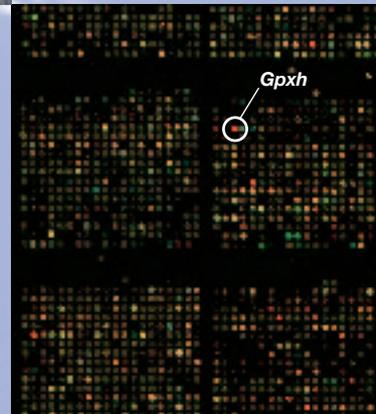
Charakterisierung von Reaktivchemikalien
anhand ihrer primären Wirkmechanismen **9**



Bakterielle Biosensoren
zur Bestimmung von
Arsen im Trinkwasser **12**



Abwegene als
Schadstoffindikatoren **15**



induziert unverändert abreguliert

Neue Wege bei der Analyse
der Trinkwasserqualität **18**



Vom Ökosystem via Molekül zum Ökosystem

Moleküle im Einsatz

2 Editorial

Leitartikel

3 Molekulare Strategien in der Umwelt –
 135 Jahre spannende Forschung

Forschungsberichte

6 Genominseln und horizontaler
 Gentransfer zwischen Bakterien

9 Charakterisierung von
 Reaktivchemikalien anhand ihrer
 primären Wirkmechanismen

12 Bakterielle Biosensoren zur Bestimmung
 von Arsen im Trinkwasser

15 Abwehrgene als Schadstoffindikatoren

18 Neue Wege bei der Analyse der
 Trinkwasserqualität

20 Das Anammox-Verfahren zur
 Stickstoffentfernung in Kläranlagen

22 Genetische Diversität von Daphnien in
 alpinen Seen

In Kürze

24 Publikationen (3193–3311)

27 Bücher

28 Vermischte Meldungen

Herausgeberin Vertrieb und ©:
 EAWAG, Postfach 611, CH-8600 Dübendorf
 Tel. +41-1-823 55 11
 Fax +41-1-823 53 75
<http://www.eawag.ch>

Redaktion Martina Bauchrowitz, EAWAG

Abbildungen Y. Lehnhard, EAWAG; P. Nadler, Künsnacht

Copyright Nachdruck möglich nach Absprache mit der
 Redaktion.

Erscheinungsweise dreimal jährlich in Deutsch,
 Englisch und Französisch. Chinesische Ausgabe in
 Zusammenarbeit mit INFOTERRA China National Focal
 Point.

Fotos Titelblatt EAWAG

Konzept Inform, 8004 Zürich

Satz, Bild und Layout Peter Nadler, 8700 Künsnacht

Gedruckt auf rezykliertem Papier

Abonnemente und Adressänderungen
 NeuabonnentInnen willkommen!
 Bitte Bestelltalon in der Heftmitte beachten.

ISSN 1420-3979



Rik I.L. Eggen, Leiter der Abtei-
 lung «Umweltmikrobiologie und
 molekulare Ökotoxikologie»

Die Molekularbiologie ist heutzutage aus vielen Forschungsbereichen nicht mehr wegzudenken. Beispielsweise werden in der Medizin krankheitsauslösende Prozesse auf Molekülebene erforscht. Sind die Mechanismen identifiziert, wird es möglich, spezifische Arzneimittel zu entwickeln. Sie werden entweder präventiv angewendet wie z.B. Impfungen oder werden, wenn die Krankheit bereits ausgebrochen ist, gezielt und möglichst nebenwirkungsfrei zur Heilung eingesetzt. Unbekannter ist dagegen, dass molekulare Ansätze auch in der Umweltforschung eine immer grössere Rolle spielen.

Die EAWAG engagiert sich für die nachhaltige Nutzung aquatischer Ökosysteme – Fließgewässer, stehende Gewässer und Grundwasser. Aquatische Ökosysteme sind sehr komplex und bieten Lebensraum für viele verschiedene Lebewesen, vom einzelligen Bakterium über mehrzellige Algen bis hin zu höheren Pflanzen und Tieren. Die Organismen leben in ständiger Wechselwirkung miteinander und mit ihrer Umgebung, die ihrerseits auch sehr dynamisch ist und sich ständig verändert. Man denke an natürliche Veränderungen wie z.B. tages- und jahreszeitliche Schwankungen. Hinzu kommen anthropogene Eingriffe, die durch die stetig wachsende Weltbevölkerung kontinuierlich zunehmen. Probleme wie der Eintrag von Schadstoffen in die Gewässer, die knapper werdenden Trinkwasserressourcen oder die Zunahme von Pathogenen in Oberflächengewässern von Entwicklungsländern sind nicht mehr zu übersehen. Hier braucht es Ansätze, die es einerseits möglich machen, die komplexe aquatische Umwelt für die Zukunft präventiv zu schützen, gleichzeitig aber akute Probleme gezielt und «ohne Nebenwirkungen» zu behandeln. Die

EAWAG versucht daher, Vorgänge im Ökosystem auf Molekülebene zu analysieren, um Auswirkungen durch anthropogene Eingriffe besser verstehen, voraussagen und verhindern zu können. Dabei ist uns bewusst, dass wir entscheidende Erkenntnisse nur gewinnen, wenn der Weitblick auf das gesamte Ökosystem nicht verloren geht.

Ein essenzieller Bereich ist die molekulare Grundlagenforschung, wobei die EAWAG so unterschiedliche Aspekte wie die genetische Diversität von Daphnien in alpinen Seen und die Wirkmechanismen von Schadstoffen auf molekularer Ebene untersucht. Daneben nimmt die angewandte Forschung an der EAWAG einen grossen Stellenwert ein. Auch hier werden vermehrt molekulare Methoden eingesetzt. Beispiele aus diesem Bereich sind die Entwicklung von Biosensoren zum Nachweis von Schadstoffen, die Identifizierung eines Bakteriums, das seit kurzem zur Stickstoffentfernung aus Abwasser in Kläranlagen eingesetzt wird und die Erarbeitung einer molekularen Methode zum Nachweis von Krankheitserregern im Trinkwasser.

Treten Sie ein in die Welt der Moleküle und lassen Sie sich davon überzeugen, dass die Molekularbiologie einen wesentlichen Beitrag zum nachhaltigen Umgang mit aquatischen Ökosystemen liefern kann.



Molekulare Strategien in der Umwelt – 135 Jahre spannende Forschung

Seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts ist die Molekularbiologie eine eigene Disziplin. Ihre Wurzeln hat sie im Bereich der Mikrobiologie, die anfänglich vor allem die Lebensprozesse und damit auch das Funktionieren der Ökosysteme untersuchte. Während der heutige biotechnologische und medizinische Einsatz der Molekularbiologie den meisten Menschen bekannt ist, stehen die molekularen Ansätze im Kontext der problemorientierten Umweltforschung noch meist im Hintergrund. Dies zu Unrecht, denn ihre Ansätze sind für die Lösung aktueller Probleme von grossem Nutzen.

Bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts haben Forscher die biologische Umsetzung definierter Stoffe durch Mikroorganismen studiert. Triebfeder für die meisten Studien war die Urzeugungstheorie, die davon ausging, dass Leben immer wieder spontan entstehen könnte. Gleichsam als Abfallprodukt lieferten diese Arbeiten erste molekulare Erkenntnisse zum Stoffwechsel der Mikroorganismen. Auch der französische Forscher Béchamp [1], ein Zeitgenosse von Louis Pasteur, war Anhänger der Urzeugungstheorie. Er untersuchte unterschiedliche Umweltproben auf ihre Kapazität, spezifische Substanzen umzusetzen, und beschrieb u.a. die Methanbildung aus Ethanol. Seiner Meinung nach waren dafür Mikroorganismen verantwortlich, die im Versuchsgefäss neu entstanden waren und denen er den Namen *Microzyma cretae* gab. Es ist Pasteurs genialen Experimenten zu verdanken, dass die Urzeugungstheorie

widerlegt werden konnte. Die vermeintliche spontane Schöpfung entpuppte sich als Anreicherung bereits vorhandener Mikroorganismen.

In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts verfolgte der deutsche Wissenschaftler Felix Hoppe-Seyler die molekulare Strategie in der Umweltforschung konsequent weiter. Als erster Professor für Physiologische Chemie an der Universität Strassburg koppelte er das molekulare Verständnis von biologischen Prozessen an energetische Überlegungen. Er erkannte, dass bei jeder biochemischen Umsetzung Energie frei wird, die von den Mikroorganismen zum Wachstum und im Zellstoffwechsel genutzt werden kann. Bemerkenswert ist, dass die heutige, allseits anerkannte klassische Thermodynamik damals erst im Entstehen begriffen war (erst 1878 führte Josiah Gibbs den Begriff der freien Energie ein) [2]. Der Forschungsansatz von Hoppe-Seyler ist in den folgenden Jahren noch verfeinert worden.

Radioaktive Isotope markieren die Stoffwechselprodukte

Der nächste Durchbruch erfolgte in den dreissiger und vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts mit der Entdeckung der radioaktiven Isotope ^{11}C und ^{14}C durch den Chemiker Samuel Ruben und den Physiker Martin Kamen [3]. Beide Forscher hatten das Potenzial dieser Isotope für die Forschung sofort erkannt. Versuche mit ^{11}C erwiesen sich jedoch als schwierig, da dieses Isotop lediglich eine Halbwertszeit von 21 Minuten hat. Erst durch den Einsatz des Isotops ^{14}C mit einer Halbwertszeit

von ~5700 Jahren war es möglich, die Zwischenprodukte bei biochemischen Umsetzungen auch in komplexen Systemen zu verfolgen und die Assimilationsprodukte spezifischer Organismen in einem Ökosystem zuzuordnen. Mit Hilfe der Mikro-Autoradiographie können Organismen, die eine biochemische Umsetzung im Ökosystem katalysieren, direkt sichtbar werden (Abb. 1). Wegbereiter dieser Methode war in den 60er Jahren das Ehepaar Luise und Thomas Brock [4].

Nachweis spezifischer Mikroorganismen

In den 70er und 80er Jahren legten die Biologen, und unter ihnen vor allem die mikrobiellen Ökologen, ihr Hauptaugenmerk auf die Entwicklung von Methoden, mit denen Mikroorganismen direkt in komplexen Umweltproben identifiziert werden können.

Spezifische Verbindungen: Manche Substanzen kommen nur bei bestimmten Organismengruppen vor. Ein Beispiel ist das Elektronen übertragende Coenzym F_{420} , das mit einer Ausnahme lediglich bei den Methan produzierenden Bakterien gefunden wird. Diese Substanz ist besonders interessant, weil sie fluoresziert und die Bakterien dadurch einfach nachweisbar sind (Abb. 2).

Immunologische Verfahren: Der Nachweis bestimmter Bakterienarten durch immunologische Verfahren, die in der medizinischen

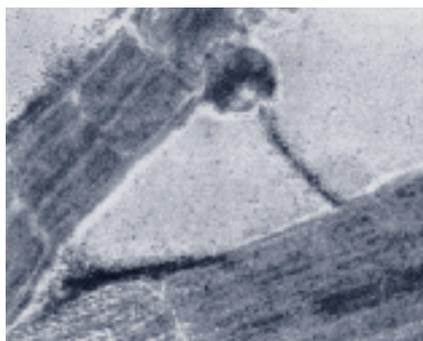
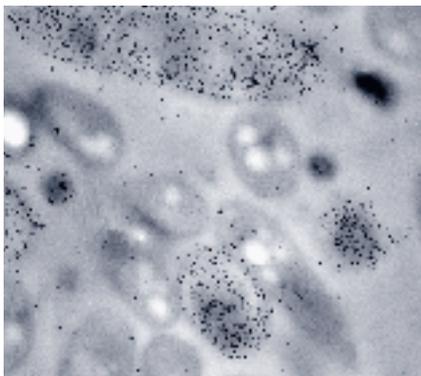


Abb. 1: Autoradiogramm von epiphytischen Bakterien (sichtbar als schwarze Kolonie links unten), die auf marinen Rotalgen leben. Den Bakterien wurde ^{14}C -Glutamat als Kohlenstoffquelle angeboten [aus 4].



Abb. 2: F_{420} , ein Elektronen übertragendes Coenzym, das fast ausschließlich in Methan produzierenden Bakterien vorkommt. Es fluoresziert nach Anregung durch ultraviolettes Licht. Diese Eigenschaft erlaubt die direkte Identifizierung von Methanbakterien in natürlichen Populationen, hier von *Methanobacterium formicicum*.



Fotos: Wageningen Agricultural University, The Netherlands

Abb. 3: Mit Goldkolloiden (schwarze Punkte), die an Antikörper gebunden sind, können in elektronenmikroskopischen Dünnschnitten Bakterien immunologisch identifiziert werden. Hier ist spezifisch das Essigsäure verwertende Bakterium *Methanosaeta concilii* in einem auf Propionsäure gewachsenen Biofilm markiert.

Mikrobiologie bereits breite Anwendung gefunden hatten, wurde gegen Ende der 70er Jahre vermehrt auch in Umweltsystemen eingesetzt. Für die Sichtbarmachung der Antikörper auf dem Zielorganismus standen bereits zu dieser Zeit viele Markierungsmöglichkeiten offen. Sie reichten von der radioaktiven Markierung über Enzyme, die bestimmte Reaktionen katalysieren (ELISA-Technik), bis hin zu spezifischen Schwermetallen und fluoreszierenden Farbstoffen. Mit Antikörpern können sogar individuelle Proteine, meist Enzyme, in einem komplexen System in einer Einzelzelle nachgewiesen werden (Abb. 3 und 4). Nachteil der immunologischen Techniken ist, dass die Organismen oder Eiweissmoleküle, die von den Antikörpern erkannt werden sollen, zunächst isoliert werden müssen. Sie werden für die Produktion der Antikörper gebraucht.

RNA- und DNA-Sonden: Ein Quantensprung gelang mit der Entwicklung der RNA- und DNA-Sonden in der ersten Hälfte der 80er Jahre. Dazu waren zwei Voraussetzungen nötig. Erstens musste die RNA als universelles Molekül zur Ableitung von Verwandtschaftsbeziehungen unter Organismen erkannt und erforscht werden. Carl Woese [5] und Norman Pace [6] waren die Pioniere auf diesem Gebiet. Zweitens musste die DNA ausserhalb der Zelle im Reagenzglas vervielfältigt werden können. Mit der so ge-

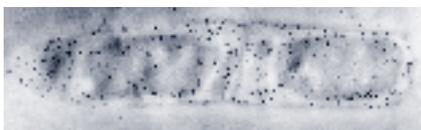


Abb. 4: *Methanosaeta concilii* im elektronenmikroskopischen Dünnschnitt. Das Enzym Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase ist immunologisch mit Goldkolloiden markiert. Die schwarzen Punkte sind über die ganze Zelle verteilt, ein starker Hinweis, dass es sich um ein in der Zellflüssigkeit lösliches Enzym handelt.

nannten Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR («polymerase chain reaction»), gelang Kary Mullis 1985 [7] die grosse Entdeckung (Abb. 5). Die Sonden werden so konstruiert, dass sie spezifische RNA- oder DNA-Abschnitte erkennen. Je nachdem, ob es sich dabei um variable oder konservierte Regionen handelt, können einzelne Arten oder ganze Organismengruppen identifiziert werden. Sind die Sonden darüber hinaus mit Fluoreszenzfarbstoffen verknüpft, können die markierten Mikroorganismen direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der PCR können ausserdem unbekannte Gensequenzen aus einem Ökosystem isoliert und anschliessend mit bereits bekannten DNA-Sequenzen verglichen werden. Aufgrund der immensen Datenbanken ist die Chance heute relativ gross, dass die unbekannt Sequenzen spezifischen Funktionen oder Organismengruppen zugeordnet werden können.

Wodurch werden Organismen negativ beeinflusst?

Neben den Fragen zum Prozessverständnis – wer macht was, wo und wie – hat sich in den letzten Jahrzehnten ein neuer Komplex entwickelt, der sich mit Ursachen und Auswirkungen von Umweltschäden beschäftigt. Dazu gehört auch die Problematik rund um giftige Chemikalien, die in die Umwelt gelangen und sich negativ auf die Organismen auswirken können. Die Dringlichkeit, dieses Gebiet zu erforschen und Problemlösungen zu erarbeiten, hat einerseits zu grossen Fortschritten in der analytischen Chemie geführt – heute können die verschiedensten

Schadstoffe selbst bei tiefsten Konzentrationen in einer komplexen Matrix bestimmt werden. Andererseits bilden unsere Kenntnisse der Steuerung molekularer biologischer Prozesse die Basis für die Konstruktion so genannter Biosensoren. Diese zeigen geringste Schadstoffbelastungen durch Expression spezifischer Enzyme oder fluoreszierender Proteine an. Darüber hinaus eröffnete die Sequenzanalyse ganzer Genome die Möglichkeit, spezifische Gengruppen zusammenzustellen und sie auf so genannte DNA-Chips aufzutragen. Mit diesem Chip können dann die Reaktionen der Gene auf Chemikalien oder andere Umwelteinflüsse untersucht werden.

Das molekulare Verständnis des Lebens in einer sich immer wieder ändernden Umwelt ist in den letzten anderthalb Jahrhunderten einen langen Weg gegangen. Gerade die letzten 20 Jahre waren durch eine rasante Wissensexplosion im angewandten Bereich gekennzeichnet, zu der auch wir an der EAWAG unseren Beitrag geleistet haben. Einige Beispiele aus dieser Arbeit möchten wir in diesem Heft vorstellen.

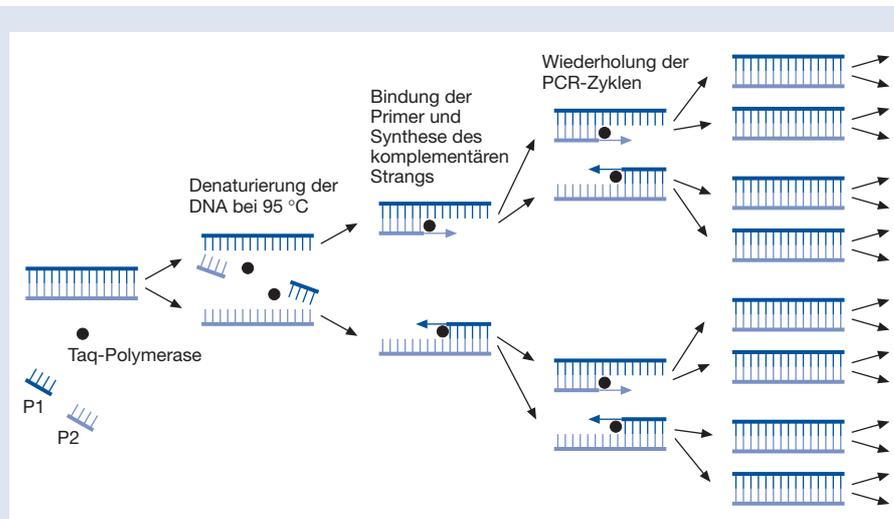


Abb. 5: Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte durch die PCR-Methode. Die zu vervielfältigende DNA wird mit zwei Primern (P1 + P2) und dem Enzym Taq-Polymerase vermischt. Diese Mischung durchläuft ca. 30 Temperaturzyklen in einem PCR-Automaten. Ein Temperaturzyklus dauert etwa 4 Minuten und setzt sich aus 3 Arbeitsschritten zusammen. 1. Schritt: die DNA wird bei 95 °C denaturiert; 2. Schritt: die Temperatur wird auf maximal 37 °C abgesenkt, so dass die Primer an die DNA binden; 3. Schritt: bei 72 °C synthetisiert die Taq-Polymerase den komplementären DNA-Strang.

den biologischen Strukturen. B. Escher (siehe S. 9) hat mit ihrer Arbeitsgruppe eine ganze Reihe schadstoffinduzierter Reaktionen untersucht und beschreibt die primären Wirkungsmechanismen solcher Reaktivchemikalien.

Stickstoffeliminierung und einwandfreies Trinkwasser

Eine Gruppe von Ingenieuren und Mikrobiologen (siehe Artikel von C. Fux und Kollegen auf S. 20) haben gemeinsam neue Wege zur Stickstoffeliminierung aus Abwasser untersucht. Der in den Niederlanden entdeckte Anammox-Prozess, bei dem Ammonium ohne Sauerstoff mit Nitrit direkt in Luftstickstoff umgewandelt wird, eignet sich vorzüglich für die Behandlung von Abwässern mit hohen Ammoniumgehalten. Allerdings galt es zunächst, die Mikroorganismen, die für diese Umsetzung verantwortlich sind, zu identifizieren. Dies gelang mit spezifischen Gensonden. Mit Hilfe eines Pilotreaktors konnte anschliessend die Praxistauglichkeit des Anammox-Prozesses bestätigt werden, sodass dem grosstechnischen Einsatz des Anammox-Verfahrens auf Kläranlagen nun nichts mehr im Wege steht.

Die biologische Qualität von Trinkwasser wird auch heute noch mit Kultivierungsmethoden bestimmt, die in ihren Grundlagen z.T. noch aus dem 19. Jahrhundert stammen. Problematisch ist, dass diese Kultivierungsmethoden sehr zeitaufwändig sind, frühestens nach 24, oft aber erst nach 72 Stunden liegen die Ergebnisse vor. Akut auftretende Kontaminationen lassen sich damit nicht mehr rechtzeitig unter Kontrolle bringen. Die PCR-Methode würde hier einen grossen Fortschritt bringen. In rund vier Stunden könnten Kontaminationen erkannt und die nötigen Massnahmen eingeleitet werden. A. Rust und W. Köster zeigen in ihrem Artikel auf S. 18 auf, wie diese Methode zur Sicherung der Trinkwasserqualität eingesetzt werden kann.

Gentransfer und genetische Diversität

Zwei weitere Artikel behandeln evolutionäre Aspekte. Die Gruppe von J.R. van der Meer (siehe S. 6) konnte als erste zeigen, wie grosse DNA-Stücke zwischen Bakterien ausgetauscht werden. Diese DNA-Stücke werden als Genominseln bezeichnet; sie können mehr als 10% des gesamten Erbmateriale ausmachen und die Empfängerbakterien mit zusätzlichen Eigenschaften, z.B. bestimmte Schadstoffe abzubauen, ausstatten. Der so genannte horizontale Gentransfer gibt den Bakterien die Möglichkeit, wichtige evolutionäre Schritte mit gros-

sen Erfolgchancen in wenigen Generationen zu durchlaufen. M. Winder und P. Spaak (siehe S. 22) haben die genetische Diversität von Wasserflöhen in unterschiedlich hoch gelegenen alpinen Seen untersucht. Sie wollten prüfen, ob sich die gängige Schulmeinung – je höher der See, desto geringer die Artenvielfalt der Planktongemeinschaften – auch auf die genetische Diversität von Populationen anwenden lässt. Ihr Fazit ist, dass genetische Diversität nicht mit zunehmender Höhe abnimmt, sondern dass sie auch in höheren Lagen noch gross sein kann.

«More is different»

Der rasante Fortschritt bei den molekularen Methoden birgt die Gefahr in sich, dass der Blick für das Ganze verloren geht und versucht wird, mit einigen detaillierten Informationen das Funktionieren eines ganzen Ökosystems zu erklären. Wichtig ist, die molekularen Strategien zum Prozessverständnis einzusetzen und dieses Verständnis am Gesamtsystem zu reflektieren. Bereits 1972 stellte Philip W. Anderson in seinem Artikel «More is different» fest, dass die Zerlegung eines Systems in die Einzelteile nicht genügt, um das Funktionieren des Ganzen zu verstehen [8]. Es braucht beides, dessen sind wir uns an der EAWAG bewusst.



Alexander Zehnder, Mikrobiologe, Direktor der EAWAG und Professor für Gewässerschutz und Wassertechnologie an der ETH Zürich. Sein wissenschaftliches Interesse gilt der Umweltmikrobiologie und der Anwendung von mikrobiellen Prozessen in der Umweltbiotechnologie. Seit einigen Jahren beschäftigt er sich auch mit der nachhaltigen Entwicklung, insbesondere in Bezug auf das Wasser.

- [1] Béchamp A. (1868): Lettre de M. Béchamp à M. Dumas. *Annales de Chimie et de Physique* 13, 103–111.
- [2] Hoppe-Seyler F. (1887): Die Methangährung der Essigsäure. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift der Physiologischen Chemie* 11, 561–568.
- [3] Kamen M.D. (1963): Early history of carbon-14. *Science* 140, 584–590.
- [4] Brock T.D., Brock M.L. (1966): Autoradiography as a tool in microbial ecology. *Nature* 209, 734–736.
- [5] Woese C.R., Fox G.E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5088–5090.
- [6] Pace N.R., Stahl D.H., Lane D.J., Olson G.J. (1985): Analyzing of natural populations by RNA sequences. *ASM News* 51, 4–12.
- [7] Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239, 487–491.
- [8] Anderson P.W. (1972): More is different. *Science* 177, 393–396.

Genominseln und horizontaler Gentransfer zwischen Bakterien

Für gewöhnlich betrachtet man Chromosomen als stabile Moleküle, die für jede der neuen Tochterzellen sorgfältig kopiert werden müssen. Von wenigen Kopierfehlern – Mutationen – einmal abgesehen, geschieht mit der DNA nicht viel. Oder doch? Von bakteriellen Chromosomen ist inzwischen bekannt, dass sie so genannte «Genominseln» beherbergen, Bereiche, die sich selbst aus dem Chromosom herauschneiden können, unter bestimmten Umständen in andere Bakterienzellen gelangen und sich dort in das Chromosom des Empfängers wieder einfügen. Ihre Funktion? Sehr häufig stellen sie dem Empfängerbakterium zusätzliche Fähigkeiten zur Verfügung, um eukaryotische Wirte zu infizieren oder Verunreinigungen in der Umwelt abzubauen.

Vor fast zehn Jahren begannen wir den Vorgang des horizontalen Gentransfers bei Bakterien zu untersuchen (siehe Glossar). Unser Ziel war, herauszufinden, wie häufig bestimmte Gentypen zwischen verschiedenen Bakterien in der natürlichen Umgebung übertragen werden. Als Modell für unsere Studien wählten wir das Bakterium *Pseudomonas* sp. Stamm B13, das aus Klärschlamm isoliert wurde und 3-Chlorbenzoat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann (Abb. 1). Als dieser Stamm 1974 erstmals beschrieben wurde, war er einer der wenigen Bakterienstämme, die chlorierte Verbindungen abbauen konnten. Dies hatte beträchtliche Aufmerksamkeit erregt, da viele chlorierte Aromaten die natürliche Umwelt verschmutzen. Noch viel interessanter wurde der Stamm B13 allerdings wegen einer weiteren spektakulären Eigenschaft, die wir entdeckten: Diese Bakterien sind in der Lage, ihre Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat spontan auf andere Bakterienarten zu übertragen, und

das sogar im Mikrokosmos von Abwasserreinigungsreaktoren [1]. Eine der seltsamsten Entdeckungen jedoch war, dass die Rate des horizontalen Gentransfers in Anwesenheit von 3-Chlorbenzoat scheinbar anstieg. Zu diesem Zeitpunkt deuteten wir diese Ergebnisse so, dass 3-Chlorbenzoat das Wachstum jener Bakterien begünstigte, die die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat erhalten hatten. Ausserdem hatten wir nur wenig Vorstellung davon, wie diese Gene tatsächlich von B13 auf andere Stämme verteilt wurden.

Die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat liegen auf einer Genominsel

Aus diesem Grund untersuchten wir den Mechanismus für den Gentransfer genauer. Roald Ravatn, der seine Dissertation über dieses Thema schrieb, entdeckte, dass die «Empfängerbakterien» tatsächlich ein grosses DNA-Fragment mit über 100 000 Basenpaaren vom Stamm B13 erhielten. Dieses

Fragment wurde als *c/c*-Element (Abb. 2A) bezeichnet und enthält die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat [2]. Es war an ein oder zwei spezifischen Orten des Empfängerchromosoms eingebaut worden. Der Stamm B13 selbst trägt zwei Kopien des *c/c*-Elements in seinem Chromosom, die nach dem Transfer zu einem neuen Bakterium nicht verloren schienen (Abb. 2B). Roald Ravatn identifizierte auch den Faktor, der für das Herausschneiden des *c/c*-Elements und den darauf folgenden Wiedereinbau verantwortlich ist. Es handelt sich um ein als «Integrase» bezeichnetes Enzym. Der Vergleich der biochemischen Zusammensetzung der Integrase vom Stamm B13 mit anderen Proteinen ergab, dass diese zum einen mit Integrasen von bakteriellen Viren (Bakteriophagen) verwandt ist, welche ihr Genom in die Chromosomen infizierter Zellen einschleusen, und zum anderen mit Integrasen von so genannten Genominseln (siehe Glossar) [3]. Das Gen für die B13-Integrase ist am rechten Ende des *c/c*-Elements lokalisiert (Abb. 2A).

Seit einigen Jahren hat die Entdeckung weiterer Genominseln enorm zugenommen, was in erster Linie auf die zahlreichen Projekte zur Sequenzierung ganzer Genome zurückzuführen ist. Grosse Labors entschlüsselten die vollständige Nukleotidsequenz von derzeit etwa 100 bakteriellen Genomen. Durch den Einblick in die gesamte Nukleotidsequenz konnte man zeigen, dass viele Bakterien Genominseln tragen und sogar mehrere unterschiedliche Kopien besitzen. Die Genominseln zeichnen sich aus durch die Anwesenheit eines Gens für eine Integrase und einen spezifischen Ort auf dem Chromosom, an dem sie sich einfügten (Abb. 2B). Unter Zusammenfassung aller erhältlichen Informationen schlossen wir, dass auch das *c/c*-Element eine Genominsel ist.

Wann bewegt sich eine Genominsel?

Mit dem Wissen, dass die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat auf einer Ge-



Abb. 1: Spezifischer Abbaupfad des chlorierten Aromaten 3-Chlorbenzoat. Das Produkt 3-Oxo adipat wird im allgemeinen Zellstoffwechsel weiter abgebaut.

Glossar

Genominseln

Instabile Bereiche auf Bakterienchromosomen, die sich manchmal selbst von einem Bakterium direkt in das Genom eines anderen einschleusen. Sie erhöhen die Lebensfähigkeit des Bakteriums und können in verschiedene Untertypen eingeteilt werden: z.B. «ökologische Inseln» in Umweltbakterien, «pathogenetische Inseln» in pathogenen Bakterien mit zusätzlichen Funktionen für Infektion, Toxinsynthese oder Adhäsion [4].

Grün-Fluoreszierendes-Protein oder GFP

Reporterprotein; Zellen, in denen GFP synthetisiert wird, fluoreszieren und können unter dem Epifluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Horizontaler Gentransfer

Austausch von DNA zwischen Bakterien; im Gegensatz zum vertikalen Gentransfer, der das Erben eines Gens von einem Vorfahren beschreibt. Bakterielle Reproduktion wird gewöhnlich als asexuell bezeichnet, weil Bakterien kein Äquivalent zur genetischen Verschmelzung zweier verschiedener Zellen haben, wie sie für die sexuelle Reproduktion bei Eukaryonten charakteristisch ist. Dennoch haben Bakterien die Fähigkeit, Abschnitte der DNA mit anderen Bakterien auszutauschen. Da diese Abschnitte im Genom eines Bakteriums fixiert werden und neue Eigenschaften verleihen können, könnte der Austausch von Genen zwischen Bakterien als eine Form bakterieller Sexualität betrachtet werden.

Promotor

Regulierende Region eines Gens vor der kodierenden Region. Die Aktivierung des Promotors führt zur Transkription der kodierenden Region und nachfolgend zur Synthese des entsprechenden Proteins.

nominsel liegen, wendeten wir uns erneut unserer früheren Beobachtung zu, die einen verstärkten Transfer des *clc*-Elements bei Anwesenheit von 3-Chlorobenzoat vermuten liess. Zu diesem Zeitpunkt im Jahr 1999 begann Vladimir Sentchilo seine Dissertation mit der Fragestellung, welche Faktoren in Umwelt oder Zelle den Transfer des *clc*-Elements stets die Aktivierung des Integrases vorausgeht, gingen wir von der Annahme aus, dass wir die Aktivierung des Integrases als Indikator für das darauffolgende Herausschneiden und den Transfer des *clc*-Elements ansehen konnten.

Deshalb konzentrierte sich Vladimir Sentchilo auf das Integrasesgen und entwickelte spezifische Reporterbakterien (ähnlich den Arsen-Biosensoren, siehe S. 12). Diese Reporterbakterien trugen einen molekularen Schalter, bestehend aus dem Promotor

(siehe Glossar) für das Integrasesgen, gekoppelt an das Reporterger für das Grün-Fluoreszierende-Protein (= GFP, siehe Glossar). Die Anwesenheit von GFP in der Zelle würde also anzeigen, dass der Promotor des Integrasesgen aktiviert worden war und

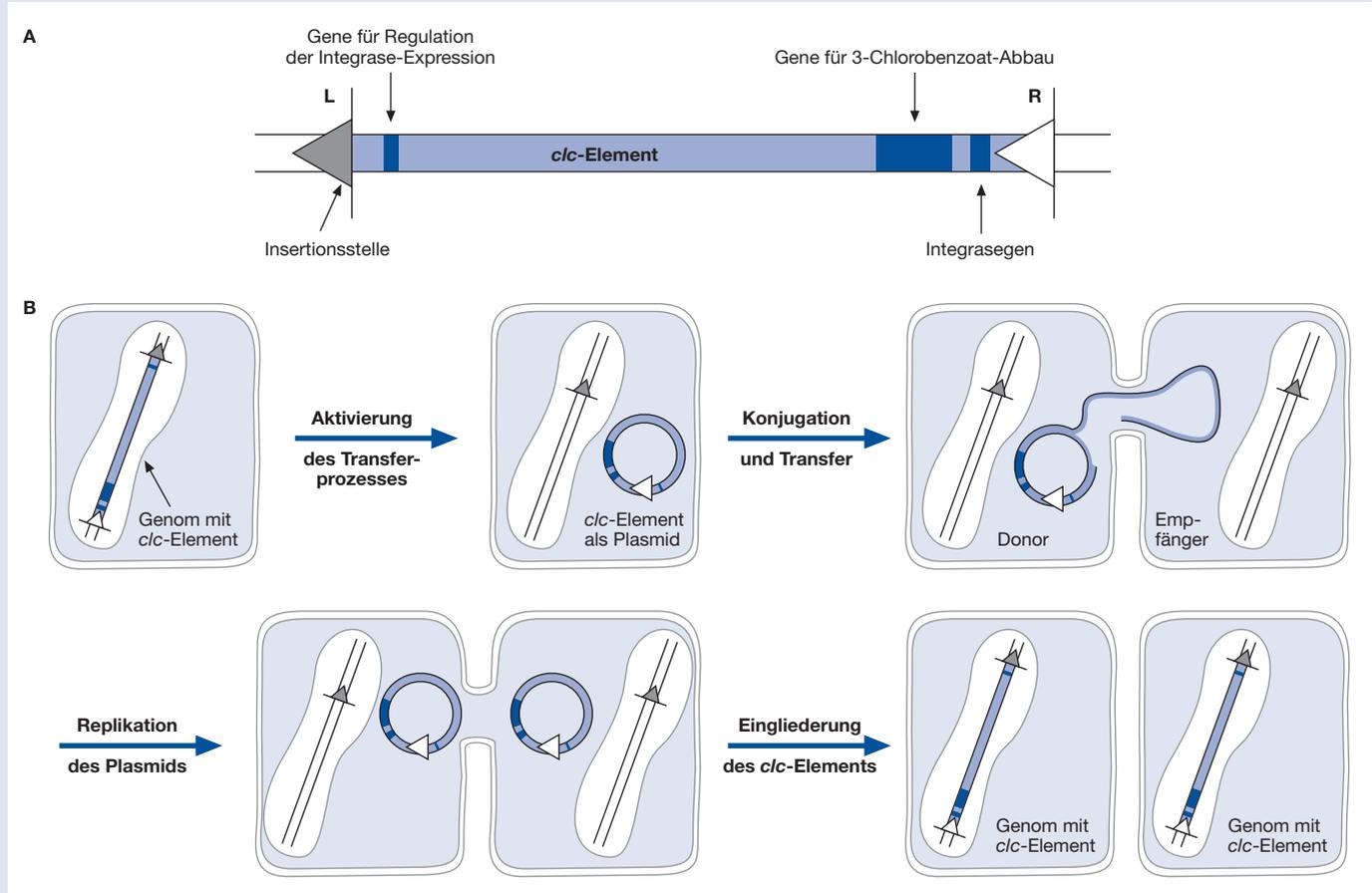


Abb. 2: Das *clc*-Element (A) und sein hypothetisches Eigenleben (B). Ist das *clc*-Element einmal aktiviert, wird es durch die Integrase aus dem Genom ausgeschnitten und liegt dann als ringförmiges DNA-Molekül (= Plasmid) in der Bakterienzelle vor. Kommt diese Zelle mit einem zweiten Bakterium ohne *clc*-Element in Kontakt, wird das *clc*-Element als Einzelstrang auf die zweite Bakterienzelle übertragen. Nach einem Replikationsschritt integriert sich das *clc*-Element an den vorbestimmten Insertionsstellen in die Genome beider Zellen. Auch beim Einbau des *clc*-Elements spielt die Integrase wieder eine ausschlaggebende Rolle.

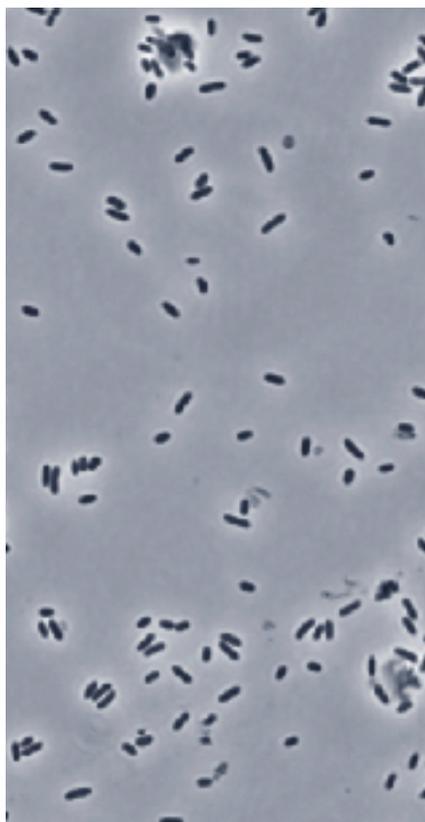


Abb. 3: Nur in wenigen Bakterienzellen einer Kultur von *Pseudomonas* sp. Stamm B13 ist der Transferprozess des *cIc*-Elements aktiviert. Vergleiche das linke Phasenkontrastbild (schwarz auf grau) mit dem gleichen Ausschnitt bei dem sich die aktivierten Bakterien als helle Zellen gegen einen schwarzen Hintergrund abheben.

dass der Transfervorgang hierauf ablaufen würde.

Zu unserem Erstaunen beobachteten wir nur sehr wenige fluoreszierende Zellen in der Kultur des transgenen Stamms B13 (Abb. 3). Dies deutete darauf hin, dass der Transfermechanismus nur in einem kleinen Teil der Population aktiviert wurde. Vor allem aber fingen die Zellen dann an zu fluoreszieren, wenn sie sich nicht mehr aktiv vermehrten, d.h. wenn die Nährstoffe knapp wurden. Wurde die Bakterienkultur allerdings mit 3-Chlorobenzoat als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt, so war die Zahl der fluoreszierenden Zellen unter Hungerbedingungen (also wenn 3-Chlorobenzoat aufgebraucht war) höher als bei der Verwendung anderer Kohlenstoffquellen. Dieses Ergebnis bekräftigte unsere Ausgangsbeobachtung und zeigte darüber hinaus, dass 3-Chlorobenzoat den Transfer des *cIc*-Elements zu einem sehr frühen Zeitpunkt – nämlich durch die Aktivierung des Integrases – stimuliert. Dagegen ist immer noch unklar, weshalb das Integrasegen in manchen Bakterien aktiviert wird und in anderen nicht.

Vladimir Sentchilo konnte ausserdem zwei Proteine identifizieren, die die Expression des Integrases zu beeinflussen scheinen und die vielleicht mit Signalen aus der Zelle oder der Umwelt interagieren. Interes-

santerweise liegen die Gene, die für diese beiden Proteine kodieren, auch auf dem *cIc*-Element (Abb. 2A) und ein Datenbankvergleich zeigte in einer Vielzahl anderer Bakterien ähnliche Proteine. Um die Funktion der Genominsel im Stamm B13 und ihre Evolution in Bezug zu anderen Genominseln besser zu verstehen, wird derzeit in Zusammenarbeit mit dem Institut Pasteur in Paris und dem Zentrum für Genomforschung der Universität Bielefeld, Deutschland, das gesamte *cIc*-Element sequenziert. Mit diesem Wissen hoffen wir, eine bessere Vorstellung darüber zu gewinnen, wie der Transfer des B13-Elements und anderer Genominseln reguliert wird.

Erwünschte und unerwünschte Auswirkungen

Wenn sich herausstellen sollte, dass bestimmte chemische Verbindungen in der Umwelt, wie 3-Chlorobenzoat, tatsächlich als Auslöser für einen Gentransfer agieren, könnte das weit reichenden Einfluss auf die Verteilungsrate bestimmter Genfunktionen in Bakteriengesellschaften haben. Im Hinblick auf den Abbau von Umweltgiften wäre es wohl nicht allzu problematisch, wenn die Gene für deren Abbau weiter verbreitet würden, würde das doch einen rascheren Abbau der Verschmutzungen bewirken. Dagegen dürfte es keine wirklich attraktive

Perspektive sein, pathogene Eigenschaften schneller zu verbreiten, die andere Bakterien mit zusätzlichen Fähigkeiten zur Infizierung eukaryotischer Wirte ausstatten würden. Anscheinend haben selbst die Genome jener Lebewesen, die wir gewöhnlich als die kleinsten Organismen ansehen, noch kleinere Einheiten, so etwa die Genominseln mit einem sehr merkwürdigen Eigenleben.



Jan Roelof van der Meer, Mikrobiologe und Leiter der Gruppe «Molekulare Mikrobiologie» in der Abteilung «Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie». Forschungsgebiete: Evolution, Abbau von Umweltgiften, Entwicklung von Biosensoren und mikrobielle Ökologie.

Koautoren: Vladimir Sentchilo, Muriel Gaillard

- [1] Ravatn R., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. (1998): Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2126–2132.
- [2] Ravatn R., Studer S., Springael D., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. (1998): Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *Journal of Bacteriology* 180, 4360–4369.
- [3] van der Meer J.R., Ravatn R., Sentchilo V. (2001): The *cIc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Archives of Microbiology* 175, 79–85.
- [4] Hacker J., Carniel E. (2001): Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports* 2, 376–381.

Charakterisierung von Reaktivchemikalien anhand ihrer primären Wirkmechanismen

Bilder von toten Fischen, die mit dem Bauch nach oben an das Ufer gespült werden, wer kennt sie nicht. Sie führen uns auf drastische Weise vor Augen, welche fatalen Auswirkungen Unfälle mit Chemikalien auf Lebewesen in Gewässern haben können. Unsere Umwelt wird jedoch auch durch geringe Chemikalienkonzentrationen kontinuierlich und leider meist unbemerkt beeinflusst. Deshalb ist es wichtig herauszufinden, wie genau Schadstoffe in Lebewesen reagieren. Ziel unserer Arbeit ist es, die verschiedenen primären Wirkmechanismen von Reaktivchemikalien mit Hilfe eines bakteriellen Testsystems zu erkennen, um so eine Risikoklassifizierung der Chemikalien vornehmen zu können.

Das ökotoxikologische Risiko von Reaktivchemikalien kann mit klassischen Testmethoden nur unzureichend abgeschätzt werden. Dies liegt daran, dass Reaktivchemikalien oft schnell hydrolysieren und dass klassische Methoden meist nur einen Teil des breiten Wirkungsspektrums von Reaktivchemikalien erfassen. Die Erkennung des Wirkmechanismus ist jedoch gerade für Reaktivchemikalien von grosser Bedeutung, da der Wirkmechanismus entscheidend das Risikopotenzial bestimmt. Aus diesem Grund entwickeln wir derzeit ein umfassendes bakterielles Testsystem, das die verschiedensten Wirkmechanismen von Reaktivchemikalien abdecken soll.

Schadstoffe schädigen Biomoleküle

Letztlich lassen sich alle toxischen Effekte zurückführen auf primäre Interaktionen der

Schadstoffe mit drei verschiedenen Klassen von Biomolekülen: Membranlipide, Proteine und die Erbsubstanz DNA [1]. Die Wechselwirkungen reichen von schwachen van-der-Waals-Wechselwirkungen über spezifische Wechselwirkungen, wie z.B. die Bildung von Wasserstoffbrücken oder gegenseitige Anziehung von Ladungen, bis hin zur Bildung chemischer Bindungen (Abb. 1). Schwache Wechselwirkungen führen in der Regel zu unspezifischen reversiblen Effekten und sind nur bei hydrophoben Umweltchemikalien relevant. Spezifische Wechselwirkungen werden z.B. bei Enzyminhibitionen beobachtet, wenn der Schadstoff wie ein Schlüssel ins Schloss passt und so das Enzym für das eigentliche Substrat versperrt. Unser spezielles Interesse jedoch gilt den Reaktivchemikalien, die mit den Biomolekülen am Zielort kovalente – meist irreversible – chemische Bindungen einge-

hen. Zu den Reaktivchemikalien zählt man eine grosse Anzahl von Substanzen mit verschiedenen reaktiven funktionellen Gruppen. Dazu gehören u.a. die reaktiven Sauerstoffspezies (siehe Artikel von B. Fischer, S. 15) und die so genannten elektrophilen Chemikalien, auf die wir uns im vorliegenden Artikel konzentrieren.

Die Zelle wappnet sich gegen Elektrophile

Elektrophile Chemikalien sind aufgrund ihrer Elektronenkonstellation elektronenarme Substanzen, die bevorzugt mit nukleophilen (= elektronenreichen) Gruppen in Peptiden, Proteinen oder DNA reagieren. Bevorzugte Ziele sind Thiolgruppen in Peptiden und Proteinen sowie gewisse Sauerstoff- und Stickstoffgruppen in der DNA (Abb. 2). Im ungünstigsten Fall werden Proteine durch Elektrophile so sehr geschädigt, dass sie ihre eigentlichen Funktionen nicht mehr ausüben können, während Reaktionen zwischen Elektrophilen und DNA zur Instabilität der DNA und zu Mutationen führen können, die schlimmstenfalls Krebs auslösen. Die Reaktionen an beiden Zielorten können bis zum Tod führen.

Doch die Zellen wappnen sich gegen solche Angriffe. Glutathion, ein intrazelluläres Tripeptid (Abb. 2), fängt elektrophile Schadstoffe ab, so dass sie anschliessend wieder aus der Zelle herausgeschleust werden können. Auch für DNA-Schäden gibt es eine

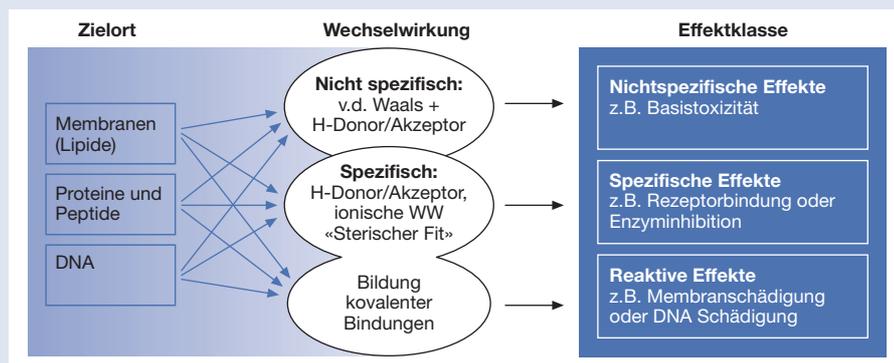


Abb. 1: Einteilung der toxischen Effekte nach Interaktionen der Schadstoffe mit Biomolekülen am Zielort.

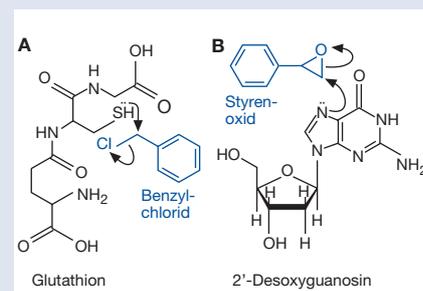


Abb. 2: Zwei Beispiele für primäre Wirkmechanismen reaktiver Umweltschadstoffe. Durch chemische Reaktionen mit Proteinen (A) oder DNA (B) kommt es zu toxischen Effekten.

Struktur	Geschädigte Biomoleküle	
Epoxide		
Styrenoxid	R = phenyl	DNA
2,3-Epoxypropylbenzen	R = benzyl	DNA
2-(4-Nitrophenyl)-Oxiran	R = p-nitrophenyl	DNA und Proteine
1,2-Epoxybutan	R = C ₂ H ₅	DNA
Epichlorhydrin	R = CH ₂ Cl	DNA und Proteine
2-Methyl-2-Vinylloxiran		DNA und Proteine
Reaktive Organochlorine		
Benzylchlorid	R = H	DNA und Proteine
3-Methylbenzylchlorid	R = m-CH ₃	DNA und Proteine
4-Nitrobenzylchlorid	R = p-NO ₂	DNA und Proteine
2,3-Dichlor-1-propen		DNA und Proteine
trans-1,4-Dichlor-2-buten		DNA und Proteine
Substanzen mit aktivierten Doppelbindungen		
Acrolein	R = H	Proteine
Ethylacrylat	R = O-C ₂ H ₅	Proteine
2-Hydroxyethylacrylat	R = O-C ₂ H ₄ -OH	Proteine
Isobutylacrylat	R = HO-sec-C ₄ H ₉	Proteine
Acrylnitril		Proteine
Acrylamid		Proteine

Tab. 1: Die 18 verwendeten Umweltschadstoffe und ihre primären Wirkmechanismen.

Vielfalt von Reparaturmechanismen, die Fehler in der DNA-Sequenz erkennen und reparieren. Bei hohen Schadstoffkonzentrationen und/oder längerer Exposition sind solche Verteidigungssysteme allerdings überfordert und es tritt ein toxischer Effekt auf.

Evaluierung verschiedenster *E.-coli*-Mutanten und Effektparameter

Methoden, die die Aktivität dieser Verteidigungssysteme anzeigen, eignen sich also

besonders gut als Testsysteme zur Identifizierung der primären Wirkmechanismen von Elektrophilen. Man muss allerdings berücksichtigen, dass die Toxizität einer elektrophilen Substanz nicht nur durch ihre chemische Reaktivität sondern auch durch die Konzentration der Substanz am intrazellulären Wirkort bestimmt wird. Die Konzentration am Wirkort wiederum ist abhängig davon, wie viele Moleküle der elektrophilen Substanz überhaupt in den Organismus aufgenommen werden, wie der Schadstoff innerhalb des Organismus verteilt wird und

ob der Organismus es schafft, den Schadstoff rasch in ein weniger schädliches Produkt umzuwandeln. Diese Prozesse haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des jeweiligen Schadstoffs. Bei einem einzelligen Organismus kann man jedoch davon ausgehen, dass im Fall von hydrophilen Substanzen die Schadstoffkonzentration am Wirkort genauso hoch ist wie die extrazellulär herrschende Schadstoffkonzentration. Wir haben daher mit dem Bakterium *Escherichia coli* gearbeitet. Dies war auch deshalb von Vorteil, weil zahlreiche Mutanten von *E. coli* verfügbar sind. Insgesamt wurde eine breite Palette verschiedener *E.-coli*-Stämme evaluiert. Dabei wurden 17 unterschiedlich wirkende elektrophile Substanzen (Tab. 1) getestet und folgende Effektparameter gemessen: die Wachstumsinhibition, die intrazelluläre Glutathionkonzentration, das Auftreten von DNA-Strangbrüchen und die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen [2].

Zwei *E.-coli*-Stammpaare als Biosensoren

Als besonders erfolgreich hat sich die Verwendung von zwei *E.-coli*-Stammpaaren herausgestellt. Die Stämme MJF276 (Glutathion⁺) und MJF335 (Glutathion⁻) unterscheiden sich lediglich in ihrer Fähigkeit, Glutathion zu synthetisieren, sind aber ansonsten genetisch identisch. Auch das zweite Stammpaar ist, bis auf die Fähigkeit, DNA-Schäden zu reparieren, genetisch identisch: in MV4108 (DNA⁻) sind mehrere Gene mutiert, die für DNA-Reparaturenzyme kodieren, wogegen dieselben Gene in MV1161 (DNA⁺) intakt sind.

Flüssigkulturen dieser Stammpaare wurden mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden elektrophilen Substanzen versetzt. Anschliessend wurde die Wachstumsinhibition gemessen. Dabei zeigte sich, dass solche Reaktivchemikalien, die auf Proteinebene angreifen, deutliche Wachstumsunterschiede zwischen dem Gluta-

thion⁺- und dem Glutathion⁻-Stamm erzeugten, wogegen das Wachstum des DNA⁺- und des DNA⁻-Stamms nicht verändert war (Abb. 3A). Zu dieser Chemikalien-Gruppe gehören die sechs untersuchten Substanzen mit aktivierter Doppelbindung (Tab. 1). Dagegen induzierten jene Reaktivchemikalien, die auf eine Schädigung der DNA abzielen, deutliche Wachstumsunterschiede beim DNA⁺/DNA⁻-Stammpaar, wobei das Wachstum des DNA⁻-Stamms, im Gegensatz zum DNA⁺-Stamm, eindeutig inhibiert wird (Abb. 3B). Diese Substanzen, zu denen drei der untersuchten Epoxide gehören (Tab. 1), erzeugten jedoch keine Wachstumsunterschiede zwischen dem Glutathion⁺- und dem Glutathion⁻-Stamm. Ausserdem konnten wir eine dritte Gruppe von Substanzen als unspezifisch reaktiv identifizieren, weil sie sowohl auf Proteine wie auch auf DNA-Ebene angreifen (Tab. 1) und Wachstumsunterschiede innerhalb beider Stammpaare hervorriefen (Abb. 3C).

Validierung und Weiterentwicklung des Testsystems

Die Resultate dieser Studie eignen sich nicht nur für eine Klassifizierung der Wirkmechanismen, sondern auch für die Beschreibung von Effekten in aquatischen Organismen. Dies wird deutlich, wenn man die EC₅₀-Werte der an *E. coli* untersuchten Substanzen gegen EC₅₀-Werte aufträgt, die aus Experimenten an aquatischen Organismen stammen. Es zeigt sich, dass eine lineare Korrelation zwischen den verschiedenen EC₅₀-Werten besteht (Abb. 4). Als EC₅₀-Wert wird diejenige Konzentration eines Schadstoffs bezeichnet, bei der ein 50%iger Effekt auftritt – in unserem Fall Wachstumsinhibition bei *E. coli* und Algen sowie Letalität bei Wasserflöhen und Fischen.

Die beschriebene Studie ist erst ein Anfang in der Bewertung von Reaktivchemikalien anhand ihres primären Wirkmechanismus. Einerseits sollen die vorgestellten Stammpaare in ökotoxikologischen Testbatterien

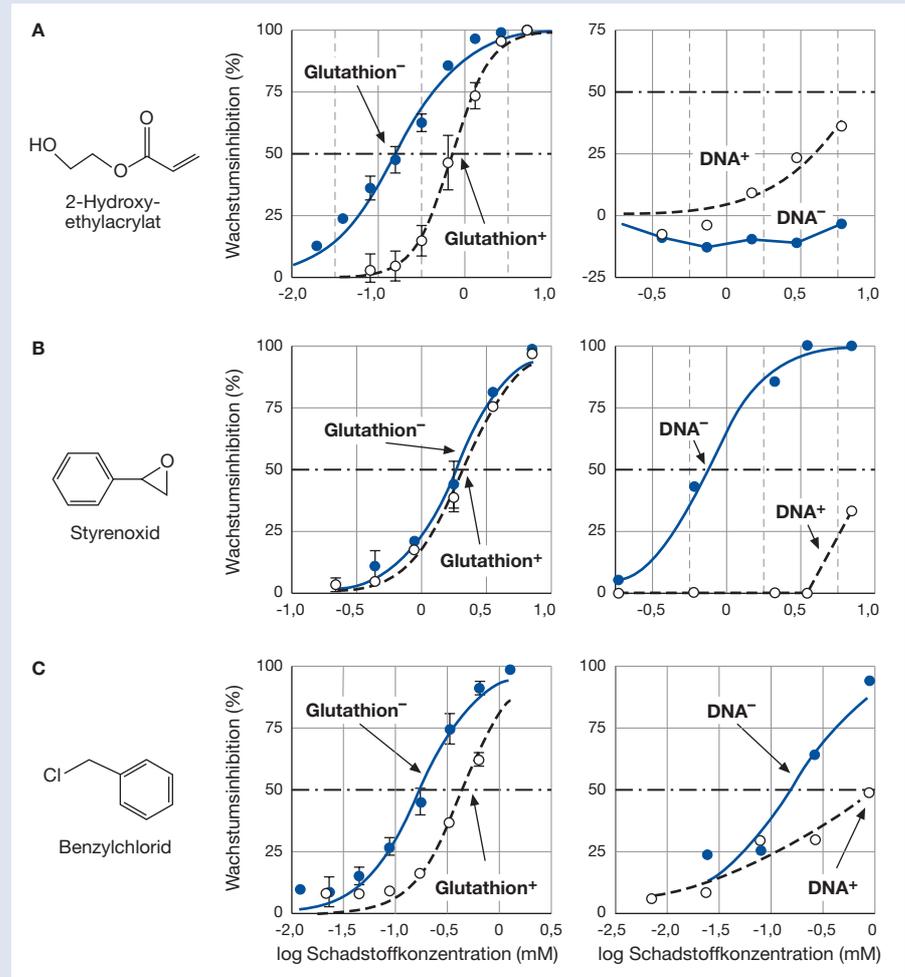


Abb. 3: Wachstumskurven der beiden *E. coli*-Stammpaare Glutathion⁺/Glutathion⁻ und DNA⁺/DNA⁻ bei verschiedenen Schadstoffkonzentrationen.

A: 2-Hydroxyethylacrylat als Beispiel eines Protein schädigenden Schadstoffs,

B: Styrenoxid als Beispiel eines DNA-schädigenden Schadstoffs und

C: Benzylchlorid als Beispiel eines unspezifisch reaktiven Schadstoffs, der sowohl mit Proteinen als auch mit DNA reagiert.

Anwendung finden, andererseits sollen die Konzepte weiterentwickelt und auf andere Wirkmechanismen ausgedehnt werden. Eine differenzierte ökotoxikologische Risikobewertung ist jedoch erst möglich, wenn es ausserdem gelingt, die Kausalkette zu schliessen zwischen den primären Interaktionen auf molekularer Ebene und den beobachtbaren Effekten auf Populations- oder Ökosystemebene.



Beate Escher, Chemikerin und Leiterin der Arbeitsgruppe «Wirkmechanismus-orientierte Chemikalienbewertung» in der Abteilung «Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie». Privatdozentin für Umweltchemie und Ökotoxikologie an der ETH Zürich. Forschungsthemen: Aufnahme und Verteilung von Chemikalien in Organismen, toxische Wirkmechanismen, Methoden der Chemikalienbewertung.

Koautoren: Angela Harder, Paolo Landini, Christian Niederer, Nicole Tobler

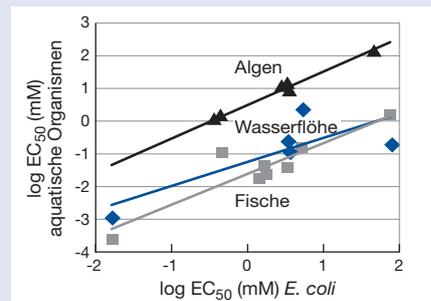


Abb. 4: Toxizitätsdaten (EC₅₀-Werte) der untersuchten Schadstoffe. EC₅₀-Werte für *E. coli* werden mit EC₅₀-Werten für Algen, Wasserflöhe und Fische verglichen.

[1] Escher B.I., Hermens J.L.M. (2002): Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. Environmental Science & Technology 36, 4201–4217.

[2] Harder A. (2002): Assessment of the risk potential of reactive chemicals with multiple modes of toxic action. Dissertation ETH Zurich, 78 p.

Bakterielle Biosensoren zur Bestimmung von Arsen im Trinkwasser

Weltweit stellt Arsen eine der bedeutendsten anorganischen Verunreinigungen im Trinkwasser dar. Besonders alarmierend ist die Situation in Bangladesch, wo über eine Million Menschen schon heute an Arsenvergiftung leiden. Um jeden einzelnen der etwa neun Millionen Trinkwasserbrunnen in privaten Haushalten zu untersuchen, ist eine kostengünstige, zuverlässige und sensible Methode erforderlich. Aus diesem Grund hat ein Team der EAWAG einen neuen Biosensor für Arsen entwickelt. Der Papierstreifen-Test verwendet genetisch veränderte Bakterien, die sogar bei niedrigen Arsenkonzentrationen eine Blaufärbung produzieren. Die EAWAG hat für diesen Biosensor ein Patent angemeldet.

Anorganisches Arsen ist eine weltweit verbreitete Verunreinigung im Trinkwasser [1–3]. Gewöhnlich geochemischer Herkunft, kommen Arsenat und Arsenit im Grundwasser in Konzentrationen von bis zu 1 oder 2 mg pro Liter vor. Der zulässige Grenzwert für Arsen im Trinkwasser liegt in den meisten Ländern bei 10 µg oder 50 µg pro Liter. Bei anhaltender Belastung durch Arsen – selbst bei niedrigen Konzentrationen um 50 µg Arsen pro Liter – ist das Risiko, an einer Arsenvergiftung oder an einem durch Arsen ausgelöstem Krebsleiden zu erkranken, stark erhöht. Daher ist es wichtig, dass arsenhaltiges Wasser nicht als Trinkwasser verwendet wird. Unglücklicherweise haben jedoch gerade jene Regionen der Welt mit der höchsten Arsenbelastung im Trink-

wasser gleichzeitig die schlechteste wissenschaftliche Infrastruktur, so z.B. Bangladesch und Vietnam [1, 2]. Ausserdem ist die Trinkwasserversorgung in beiden Ländern sehr lokal organisiert, d.h., die einzelnen Haushalte haben alle ihren eigenen Brunnen mit Handpumpe. Es hat sich nun herausgestellt, dass ein einmaliger Nachweis der Trinkwasserbelastung durch Arsen in solchen Brunnen nicht ausreichend ist, da die Arsenkonzentrationen lokal und jahreszeitlich stark schwanken. Aus diesem Grund ist die regelmäßige Überwachung der Trinkwasserqualität eine wesentliche Strategie zur Linderung der durch Arsen hervorgerufenen Probleme, solange keine wirksamen Methoden der Arseneliminierung zur Verfügung stehen.

Bestimmung der Arsenkonzentration

Arsen wird herkömmlich mittels kolorimetrischer Verfahren bestimmt, etwa mit der Quecksilberbromid-Färbemethode. Diese Methode, die als Basis in mehreren kommerziellen Feldmessungskits verwendet wird, ist jedoch erwiesenermassen im Bereich um 70 µg Arsen pro Liter und darunter nicht genau genug. Ausserdem entstehen Arsingas und Schwermetallabfälle (Zn, Hg, Sn). Dagegen ist der Nachweis von Arsen durch die Atomabsorptions-Spektrophotometrie oder die Atomfluoreszenz-Spektroskopie sehr genau und zuverlässig, setzt aber den Einsatz beträchtlicher finanzieller Mittel voraus. Deshalb entwickelte die EAWAG ein einfaches, genaues und kostengünstiges Testsystem für Arsen, das genetisch veränderte Bakterien als Biosensoren einsetzt. Wie war das möglich?

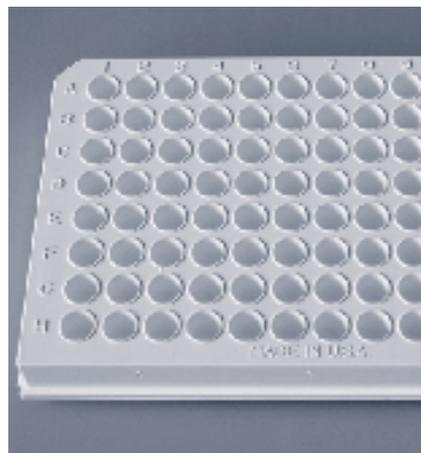
Die Abwehrstrategien von Bakterien gegen Arsen nutzen

Arsen ist nicht allein für Mensch und Tier schädlich. Selbst in einfachen Organismen wie Bakterien findet man eine Arsenunverträglichkeit. Bakterien wehren sich jedoch mit einigen relativ wirksamen biochemischen Strategien gegen Arsen, das in die Zelle eindringt (Abb. 1). Zwei gut bekannte



Fotos: J.R. van der Meer, EAWAG

Bakterienzellen des Licht produzierenden Biosensors müssen stets gekühlt aufbewahrt werden.



Beim Test werden die Zellen auf einer Mikrotiterplatte mit verschiedenen Wasserproben versetzt.



Im Luminometer wird die Stärke der Lichtemission und damit die Belastung der Wasserproben mit Arsen bestimmt.

Bakterienproteine sind gegen Arsenit- und Arsenationen im Einsatz: Das eine Protein funktioniert als Pumpe und befördert, eingebaut in die bakterielle Zellwand, jegliches Arsenit aus dem Zellinneren nach aussen, wo es keinen Schaden mehr anrichten kann. Das andere Protein ist die «Arsenatreduktase», die Arsenat zu Arsenit reduziert. Ausserdem ist ein weiteres Zellprotein nötig, um bei Anwesenheit von Arsen im Zellinneren die Abwehrreaktion auszulösen. Dieses als ArsR bezeichnete Protein ist ein Protein zur Arsenerkennung. Es hat zwei verschiedene Bindungskapazitäten. Ist kein Arsenit in der Zelle, heftet es sich an ein spezifisches Element der DNA und verhindert dadurch, dass die Gene für die Arsenabwehr vom Transkriptionsapparat abgelesen werden (Abb. 1). Die Unterdrückung ist jedoch nicht

vollständig, so dass kleine Mengen der ArsR, der Arsenatreduktase und der Arsenitpumpe stets vorhanden sind. Sobald Arsenit in die Zelle gelangt oder durch die Arsenitreduktase aus Arsenat gebildet wird, ändert ArsR sein Verhalten. Es heftet sich sofort an die Arsenverbindung und verliert damit die Affinität für die Andockstelle an der DNA mit dem Ergebnis, dass das Protein von der DNA «abfällt». Als Folge davon unterdrückt ArsR den Abwehrmechanismus nicht mehr und die Zelle produziert die Arsenpumpe und die Arsenatreduktase in grösseren Mengen.

Für die Entwicklung des Arsenbiosensors machten wir uns diese biochemischen Fähigkeiten von ArsR zunutze. Unser Interesse bestand allerdings nicht darin, dass der Abwehrmechanismus bei Anwesenheit von Arsen in der Zelle ausgelöst wurde, sondern darin, ein anderes, leicht messbares Protein oder Enzym zu erhalten. An dieser Stelle kommt die Gentechnologie ins Spiel, mit deren Hilfe Bakterienzellen soweit verändert werden, dass sie eine Lichtreaktion, ein Fluoreszenzsignal oder eine kolorimetrische Reaktion produzieren, wenn sie mit Arsenit in Berührung kommen [4]. Dazu verknüpften wir das Gen für das ArsR-Protein, die DNA-Bindungsstelle für das ArsR-Protein und das Reportergen, das für das Licht produzierende Enzym Luciferase

kodiert (Abb. 1). Nach Einschleusung dieser DNA-Konstruktion in *Escherichia-coli*-Bakterien lag der Biosensor im Prinzip fertig vor [5].

Ein präziser, Licht produzierender Biosensor

Wie wird der neue bakterielle Biosensor eingesetzt? In der einfachsten Variante werden die Biosensorzellen in flüssigem Nährmedium bis zu einer Dichte von etwa 2×10^8 Zellen je ml herangezüchtet. Die Bakterien werden abzentrifugiert, in einer glycerolhaltigen Salzlösung resuspendiert, in kleinere Portionen aufgeteilt und bei -80°C eingefroren. So behandelt, bleiben die Bakterien mehr als fünf Jahre lebensfähig. Für den Test werden die Zellen aufgetaut, zur Revitalisierung mit frischem Nährmedium verdünnt und mit der zu testenden Wasserprobe vermischt. Gleichzeitig wird eine Standardkalibrierung mit bekannten Arsenitkonzentrationen zwischen 0 und $0,5 \mu\text{M}$ (0 und $40 \mu\text{g}$ Arsen pro Liter) durchgeführt. Das Volumen der Untersuchungsmischung kann dabei mit $200 \mu\text{l}$ sehr gering sein, und knapp 100 Tests können gleichzeitig auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt werden. Für die Untersuchung inkubiert man die Zellen mindestens 30 Minuten bei 30°C . Ist die Wasserprobe mit Arsen belastet, wird die bakterielle Luciferase produziert. Nach der

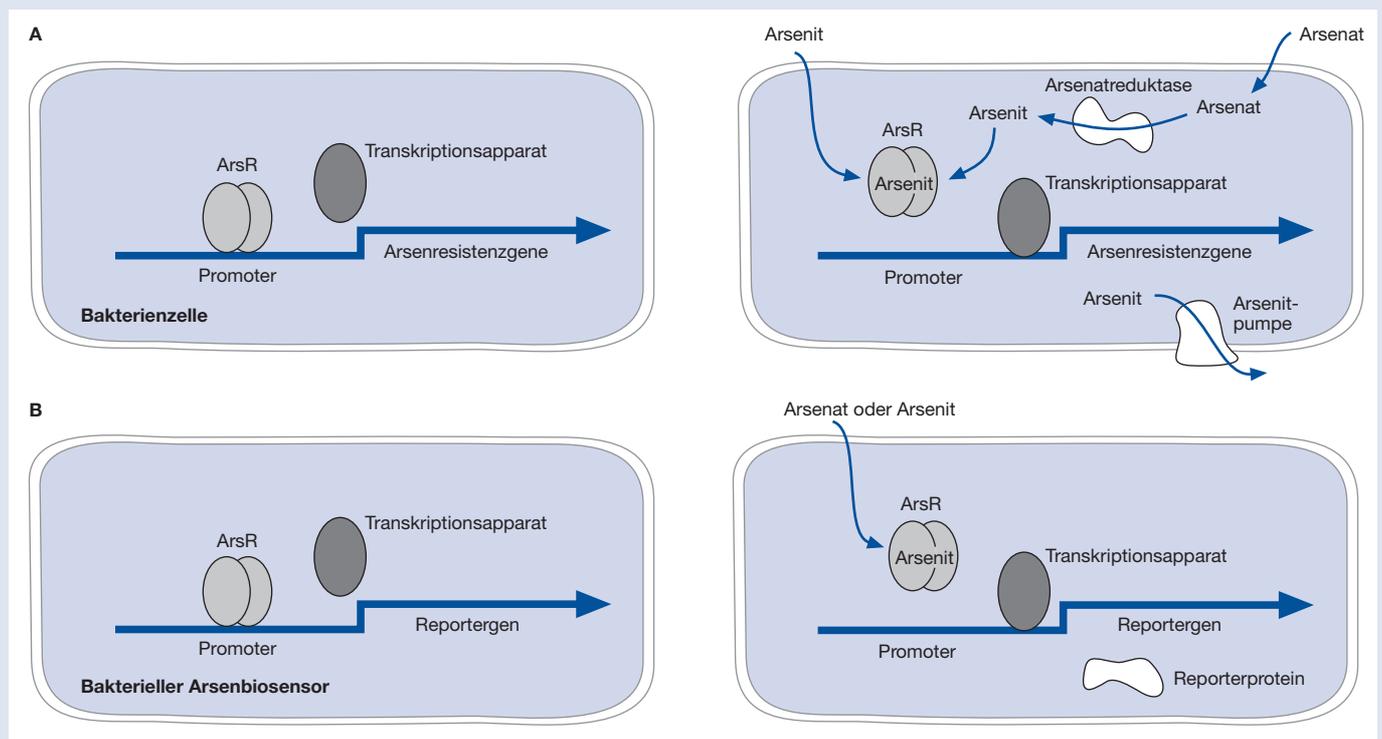


Abb. 1: Das Prinzip der bakteriellen Arsenabwehr (A) und des transgenen bakteriellen Arsenbiosensors (B). Bindet das ArsR-Protein an die DNA sind die nachfolgenden Arsenresistenzgene oder das Reportergen inaktiv. Sobald jedoch Arsenit in die Zelle gelangt oder aus Arsenat gebildet wird, heftet es sich an das ArsR-Protein, das daraufhin von der DNA abfällt. Damit kann der Transkriptionsapparat die vorher inaktiven Gene ablesen, so dass schliesslich die Arsenresistenzproteine (Arsenitpumpe und Arsenatreduktase) oder das jeweilige Reporterprotein (Luciferase, Grün-Fluoreszierendes-Protein oder β -Galaktosidase) gebildet werden.

Inkubation wird ein Tropfen Substrat für die bakterielle Luciferase (n-Dekanal) zugefügt, gemischt und die Lichtemission mit einem Luminometer gemessen. Die Eichkurve ist bei diesen Biosensorbakterien normalerweise zwischen 0 und 0,5 μM Arsenit linear (Abb. 2). Bei hohen Konzentrationen oder bei unbekanntenen Proben müssen verschiedene Verdünnungen getestet werden, um eine exakte Messung zu gewährleisten.

Ein einfacher Papierstreifen-Biosensor

Allerdings ist die Anwendung des oben beschriebenen Biosensors aus zwei Hauptgründen nicht einfach genug und bleibt ans Labor gebunden: Zum einen muss ein ziemlich teures Luminometer installiert werden, und zum anderen ist es bedenklich, im Feld mit flüssigen Bakterienkulturen zu hantieren. Daher versuchten wir, ein weiteres Biosensorsystem zu entwickeln, bei dem die genetisch veränderten Bakterienzellen auf kleinen Papierstreifen fixiert werden [5]. An Stelle des Luciferase-Reportergens, enthält dieses zweite System ein Gen für das Enzym β -Galaktosidase, das bei Anwesenheit von Arsen eine Farbreaktion hervorruft. Diese Biosensorzellen werden ebenso im Nährmedium gezüchtet, jedoch nach der Ernte mit einer Lösung gemischt, die verschiedene Zucker, Aminosäuren und Gelatine enthält. Geringe Mengen dieser Mischung werden mit einer Pipette auf Papierstreifen aufgebracht (Abb. 3) und vorsichtig bei kontrollierten Temperaturen und partiellem Vakuum getrocknet. Die Zellen auf dem Papierstreifen bleiben, gelagert bei Temperaturen zwischen -20 und 30 $^{\circ}\text{C}$, einen Monat lang aktiv. Für die Untersuchung wird ein Papierstreifen in ein Gefäß mit 1 ml Wasserprobe gelegt, 30 Minuten lang bei 30 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und herausgenommen. Ein Tropfen Substrat für das Enzym β -Galaktosidase wird auf den Papierstreifen

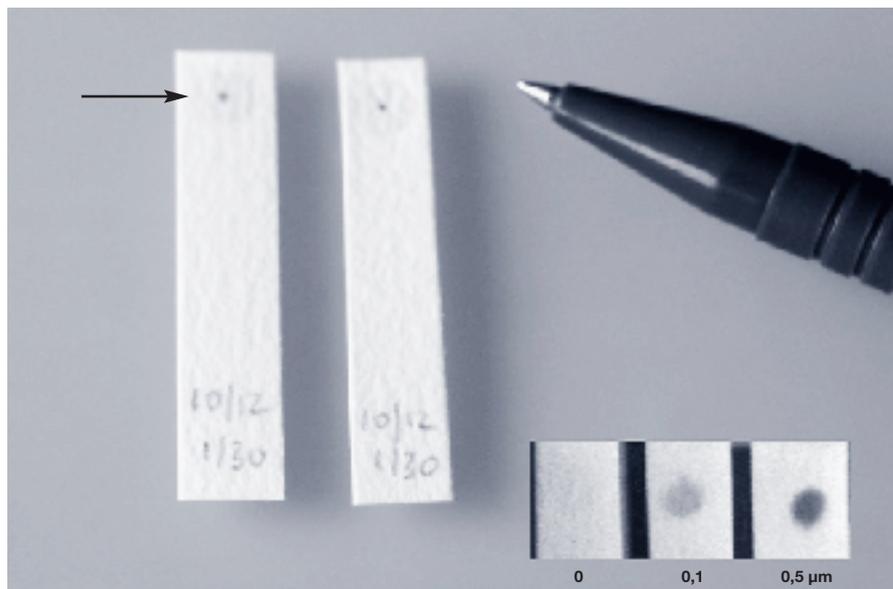


Abb. 3: Der Arsen-Papierstreifen-Test: Papierstreifen (4 cm x 0,5 cm) mit den aufgetragenen Bakterienzellen (Pfeil). Nach der Inkubation mit arsenithaltigen Proben produzieren die Zellen das Reporterprotein β -Galaktosidase. Die Aktivität dieses Enzyms kann durch Umwandlung eines Substrats in ein blaues Molekül sichtbar gemacht werden (unten rechts, hier als graublau Spots repräsentiert). Die Farbintensität hängt von der Arsenitkonzentration ab.

gegeben und – abhängig von der Menge an β -Galaktosidase – in ein blaues Produkt verwandelt. Die Farbintensität ist ein Mass für die Menge an Arsen, der die Zellen ausgesetzt waren. Im Vergleich mit einer Standardlösung von 10 μg oder 50 μg Arsenit pro Liter kann man beurteilen, ob die Arsenkonzentration über oder unter dem Grenzwert für Trinkwasser liegt (Abb. 3). Damit ist der Papierstreifen-Biosensor zwar weniger genau und hat eine kürzere Haltbarkeit als der flüssige Biosensor, ist jedoch für eine Anwendung im Feld besser geeignet.

Unbeantwortete Fragen

So weit die Laborpraxis. Viele wichtige Fragen und Probleme bleiben, ehe wir daran denken können, die Biosensoren ausserhalb des Labors routinemässig einzusetzen. Zum Beispiel: Wie kann die Qualität der Biosensorzellen (etwa ihr sofortiges Aktivationspotenzial) garantiert werden? Wie tauglich sind Biosensormessungen im Vergleich zu chemischen Verfahren? Beeinflusst die chemische Zusammensetzung der Wasserprobe die Reaktion des Biosensors? Wären lokale Behörden in Entwicklungsländern ausreichend qualifiziert, den Biosensortest zuverlässig durchzuführen? Was geschieht mit den genetisch veränderten Biosensorbakterien nach dem Test? Antworten auf diese Fragen können nur gewonnen werden, wenn man Schritt für Schritt vorgeht. Die EAWAG hat deshalb beim Europäischen Patentamt ein Patent für den Arsen-Biosensor beantragt und sucht derzeit nach möglichen Partnern in der Industrie, die sich für eine Lizenz der Arsen-

Biosensortechnologie interessieren und die Weiterentwicklung finanziell unterstützen würden.

Jan Roelof van der Meer, Portrait siehe Seite 8.

Koautorin: Judith Stocker

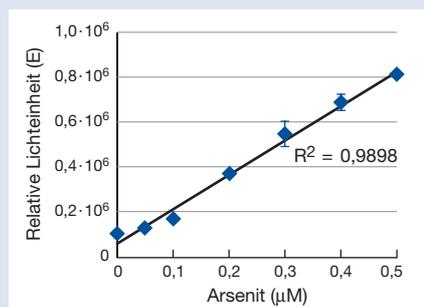


Abb. 2: Beispiel einer Eichkurve mit dem Licht produzierenden flüssigen Biosensor. Steigende Mengen Arsenit (in einem Bereich zwischen $0,05$ und $0,5$ μM) führen zu einer linearen Zunahme der Lichtproduktion durch die Biosensorzellen.

- [1] Hug S., Wegelin M., Gechter D., Canonica L. (2000): Nutzung von arsenhaltigem Grundwasser – katastrophale Folgen für Bangladesh. EAWAG news 49, 18–20.
- [2] Berg M. (2002): Arsen im Trinkwasser – neuer Brennpunkt Vietnam. EAWAG news 53, 12–14.
- [3] Pfeifer H.-R., Zobrist J. (2002): Arsen im Trinkwasser – auch ein Schweizer Problem? EAWAG news 53, 15–17.
- [4] Jaspers M.C.M., Totevova S., Demnerova K., Harms H., van der Meer J.R. (1999): The use of whole-cell living biosensors to determine the bioavailability of pollutants to microorganisms. In: Bavaye P., Block J.C., Goncharuk V.V. (eds.) Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 153–158.
- [5] Stocker J., Balluch D., Gsell M., Harms H., Feliciano J., Daunert S., Malik K.A., van der Meer J.R. (in press): Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid field measurements of arsenite and arsenate in potable water. Environmental Science & Technology.

Abwehrgene als Schadstoffindikatoren

Von der Grundlagenforschung zur Anwendung

Durch Belastung mit bestimmten Schadstoffen werden in Zellen von Pflanzen und Tieren verschiedene giftige Sauerstoffderivate gebildet, darunter so genannter Singulett-Sauerstoff. Glücklicherweise besitzen die Zellen meist sehr spezifische molekulare Abwehrmechanismen, die ihnen helfen, mit dieser Gefahr umzugehen. An der EAWAG wird derzeit genauer untersucht, wie sich die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* bei Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff verhält. Langfristiges Ziel ist es, einen Biosensor zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff zu entwickeln und damit indirekt auf die Schadstoffbelastung schliessen zu können.

Molekularer Sauerstoff ist die Grundlage allen höheren Lebens, denn durch die Atmung gewinnen Pflanzen und Tiere die für das Wachstum und den Zellstoffwechsel nötige Energie. Sauerstoff kann aber auch lebensbedrohend sein, dann nämlich, wenn in den Zellen so genannte reaktive Sauerstoffspezies (Kasten und Abb. 1) entstehen, die stark oxidierend wirken [1]. Gelingt es der Zelle nicht, diesen oxidativen Stress abzuwehren, werden lebenswichtige Zellbestandteile wie Lipide, Proteine oder die DNA geschädigt und die Zelle stirbt ab. Beschleunigt wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter anderem dann, wenn Organismen mit Schwermetallen oder bestimmten organischen Schadstoffen, wie z.B. Herbizide und halogenierte Substanzen, in Kontakt kommen. Dieser Schadstoffeffekt kann zusätzlich verstärkt werden, wenn die Sonneneinstrahlung besonders intensiv ist. Meist haben die Zellen jedoch spezielle Abwehrstrategien gegen die reaktiven Sauerstoffspezies entwickelt [2].

Molekulare Abwehrszenarien

Vereinfacht beschrieben, läuft eine molekulare Abwehrreaktion nach folgendem Schema ab [3]: Die Zelle besitzt Sensoren, mit der sie eine Stresssituation, z.B. die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wahrnehmen kann. Daraufhin werden so genannte Stressgene aktiviert und vom Transkriptionsapparat abgelesen, wobei je nach Aktivierungsstärke mehr oder weniger viele Genkopien (messenger RNA = Boten-

RNA = mRNA) entstehen. Schliesslich kommt es zur Synthese der entsprechenden Stressproteine. Sie haben entweder die Aufgabe, die Stressursache direkt zu entfernen – also im Fall der reaktiven Sauerstoffspezies, diese in unschädliche Sauerstoffspezies umzuwandeln – oder die durch den Stress bereits geschädigten Zellkomponenten zu reparieren. Dabei werden einerseits, unabhängig von der Stressursache, allgemeine Stressproteine gebildet, andererseits aber auch sehr spezifische Stressproteine synthetisiert, die gezielt, schnell und effizient einzelne Stressfaktoren abwehren können [4]. Die genetischen Aktivierungsmuster geben daher oft Aufschluss über die Art und die Stärke eines in der Zelle herrschenden Stresses. Heute wird die Expression (Aktivierungsstärke) spezifischer Gene bereits erfolgreich in biologischen Sensoren zur Bestimmung und Quantifizierung von Schadstoffen in der

Reaktive Sauerstoffspezies

Molekularer, natürlich vorkommender Sauerstoff ist aufgrund seiner Elektronenkonstellation reaktionsträge und daher für Lebewesen unschädlich. Er kann jedoch physikalisch durch Energieübertragung oder chemisch durch Elektronentransfer aktiviert werden. Solche angeregten Sauerstoffmoleküle werden als reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet, sie sind sehr reaktionsfreudig. Ihre Bildung kann in aeroben Organismen schon unter normalen physiologischen Bedingungen stattfinden. Durch Transfer von Elektronen, z.B. aus der Atmungskette in den Mitochondrien, entstehen Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale (Abb. 1) [1]. Wird dagegen Energie, beispielsweise Sonnenenergie, auf molekularen Sauerstoff übertragen, entsteht so genannter Singulett-Sauerstoff (Abb. 1). Singulett-Sauerstoff unterscheidet sich chemisch nicht von molekularem Sauerstoff, sondern nur durch seine veränderte Elektronenkonstellation; er reagiert rasch mit zellulären Bestandteilen und bildet organische Hydroperoxide. Vor allem die ungesättigten Fettsäuren in Membranen reagieren sehr schnell mit Singulett-Sauerstoff, was zur Bildung von Lipidperoxiden und einer Schädigung der Membran führen kann. Eine effiziente und spezifische Abwehr gegen Singulett-Sauerstoff und dadurch verursachte Schäden ist daher äusserst wichtig für alle Organismen.

Umwelt eingesetzt, wie beispielsweise bei dem an der EAWAG entwickelten Arsenbiosensor (siehe Artikel von J.R. van der Meer, S. 12). Ziel des hier beschriebenen Projektes ist die Entwicklung eines entsprechen-

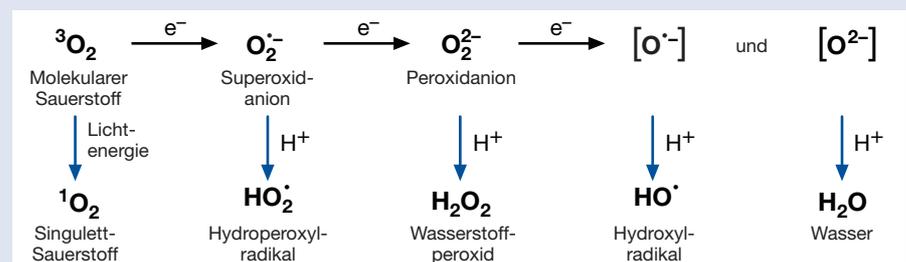


Abb. 1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies aus molekularem Sauerstoff durch unvollständige Reduktion oder Übertragung von Lichtenergie. Die in Klammern abgebildeten Sauerstoffspezies sind nicht stabil und gehen sofort über in ihre protonierten Formen.

Zellulärer Stress	Schadstoff	Induktionsfaktor
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ (2 mM)	2,8
Superoxidanion	Menadion (5 µM)	6,4
Organische Hydroperoxide	Tert-Butylhydroperoxid (0,1 mM)	4,7
Singulett-Sauerstoff	Bengalrosa im Licht (5 µM)	78,9
Bengalrosa (Kontrolle)	Bengalrosa im Dunkeln (5 µM)	3,1
Inhibition der Photosynthese	DBMIB (Herbizid) (1 µM)	9,5
Hitzeschock	25 °C → 40 °C Wechsel	1,3
Salz/osmotischer Stress	NaCl (200 mM)	1,5

Tab. 1: Aktivierung des *Gpxh*-Gens in *Chlamydomonas* unter verschiedenen Stressbedingungen. 60 Minuten lang wurden *Chlamydomonas*-Kulturen verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Induktionsfaktor = *Gpxh*-Expression in der gestressten Kultur dividiert durch *Gpxh*-Expression in der Kontrollkultur. Als Mass für die *Gpxh*-Expression wurde die durch den Transkriptionsapparat gebildete Menge an mRNA bestimmt.

den Biosensors zum Nachweis von Schadstoffen im Wasser, welche in den Zellen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies auslösen. Da noch sehr wenig über die Abwehrmechanismen gegen Singulett-Sauerstoff (Kasten und Abb. 1) bekannt ist, konzentrieren wir uns auf diese reaktive Sauerstoffspezies.

DNA-Chips liefern erste Hinweise

Photosynthetische Organismen leiden in besonderen Mass unter oxidativem Stress [2], denn der photosynthetische Apparat ist eine wichtige Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies. Aus diesem Grund haben wir für unsere Studien einen photosynthetisierenden Modellorganismus ausgewählt, nämlich die einzellige, begeißelte Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Diese Grünalge weist den gleichen zellulären Aufbau wie höhere Algen und Pflanzen auf, ist einfach zu kultivieren und gut für die Anwendung molekularer Methoden zugänglich [5]. Ein besonderer Vorteil ist überdies, dass seit kurzem DNA-Chips mit der genetischen Information von *C. reinhardtii* erhältlich sind. Mit Hilfe von DNA-Chips ist es möglich, die Expressionsmuster eines Grossteils der

Gene eines Organismus zu untersuchen [3, 6] und somit wie in unserem Fall noch unbekannte, spezifische Abwehrgene aufzuspüren.

Auf den von uns verwendeten DNA-Chips waren insgesamt 2792 Gene von *C. reinhardtii* fixiert. Um spezifische, gegen Singulett-Sauerstoff gerichtete Abwehrgene von unspezifischen Genen gegen oxidativen Stress zu unterscheiden, wurden die Experimente mit DNA-Chips entweder mit Singulett-Sauerstoff oder mit H₂O₂, einer weit verbreiteten reaktiven Sauerstoffspezies, durchgeführt. Ein Vergleich der beiden Expressionsmuster ergab deutliche Unterschiede, es konnten einige Gene gefunden werden, die durch Singulett-Sauerstoff, nicht aber durch H₂O₂ aktiviert werden (siehe Abbildung eines DNA-Chips auf der Titelseite: jeder Punkt entspricht einem *Chlamydomonas*-Gen; induzierte Gene sind rot, reprimierte Gene grün und Gene mit unveränderter Expression gelb eingefärbt).

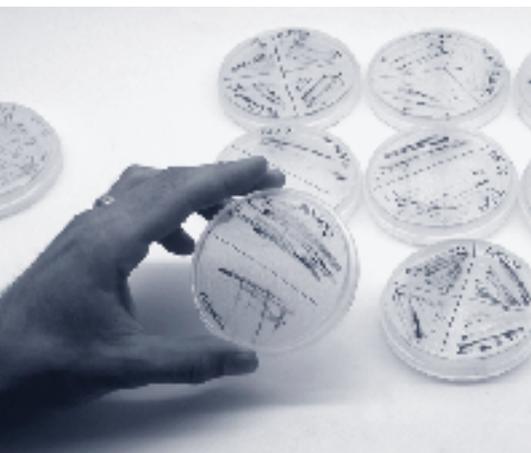
Spezifische Induktion durch Singulett-Sauerstoff

Die am stärksten und spezifischsten durch Singulett-Sauerstoff induzierten Gene wurden weiter auf ihre mögliche Expression

und Funktion in anderen Stresssituationen untersucht. Dabei stellte sich ein Gen als besonders interessant heraus: Es handelt sich um ein Glutathion-Peroxidase-homologes Gen (*Gpxh*), dessen verwandte Gene in anderen Organismen am Abbau von organischen Hydroperoxiden beteiligt sind [7]. Obwohl das *Gpxh*-Gen auch durch andere reaktive Sauerstoffspezies induziert wird, ist die Expression bei Stress durch Singulett-Sauerstoff am stärksten (Tab. 1) [8]. Dies deutet darauf hin, dass Singulett-Sauerstoff in *Chlamydomonas* durch einen spezifischen Rezeptor wahrgenommen wird und es in der Folge zur gezielten Aktivierung spezifischer Abwehrgene gegen Singulett-Sauerstoff kommt.

Der *Gpxh*-Promoter unter der Lupe

Um eine klarere Vorstellung vom Induktionsmechanismus des *Gpxh*-Gens zu erhalten, nehmen wir derzeit die Promotorregion dieses Gens genauer unter die Lupe. Der Promotor ist der DNA-Abschnitt vor der eigentlichen kodierenden Sequenz, der die Expression des jeweiligen Gens kontrolliert. Er enthält spezielle Regulationselemente, an die so genannte Transkriptionsfaktoren

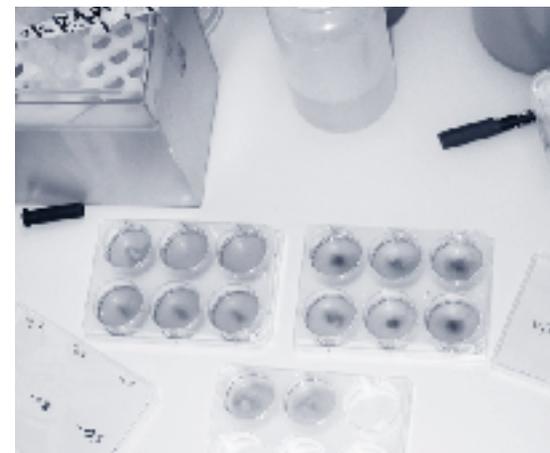


Fotos: M. Bauchrowitz, EAWAG

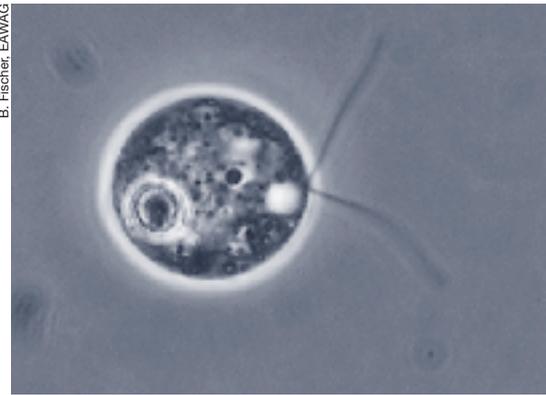
Kultivierung von *Chlamydomonas* auf festem Nährmedium in Petrischalen ...



... oder in flüssigem Nährmedium bei konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen.



Für die Induktionsexperimente werden die Algenzellen auf Zellkulturplatten überführt.



Die zweigeisslige Alge *Chlamydomonas reinhardtii* unter dem Mikroskop (100fache Vergrößerung).

binden können, was eine Aktivierung des Gens zur Folge hat. Diese Regulationselemente besitzen eine genaue Basenabfolge, die nur durch den dazugehörigen Transkriptionsfaktor erkannt werden (Abb. 2). Auch in der *Gpxh*-Promotorregion wurde durch Sequenzvergleich mit anderen Genen ein solches Regulationselement gefunden. Einen ersten Hinweis darauf, dass dieses Element eine wichtige Rolle bei der Induktion durch Singulett-Sauerstoff spielt, erhielten wir durch ein Experiment, bei dem wir das *Gpxh*-Regulationselement aus der Promoterregion entfernten. Das so veränderte Gen war anschliessend nicht mehr durch Singulett-Sauerstoff aktivierbar [8]. In einem zweiten Schritt wollten wir herausfinden, was passiert, wenn das *Gpxh*-Regulationselement in die Promotorregion eines anderen Gens eingebaut wird, welches normalerweise nicht durch Singulett-Sauerstoff induziert wird. Zu diesem Zweck wurde das β -Tubulingen von *Chlamydomonas* verwendet; es kodiert für das Strukturprotein Tubulin, das in der Geissel vieler Mikroalgen und auch bei *Chlamydomonas* vorkommt. Und

tatsächlich war das transgene β -Tubulingen, in dessen Promotorregion wir das *Gpxh*-Regulationselement eingeschleust hatten, schwach durch Singulett-Sauerstoff induzierbar. Diese beiden Experimente deuten auf eine tragende Rolle des *Gpxh*-Regulationselement in der Genaktivierung durch Singulett-Sauerstoff hin. Obwohl das Element starke Homologie zu zwei bekannten und gut charakterisierten Elementen in Säugern aufweist, konnte es trotz intensiver Analyse noch nicht eindeutig einem dieser beiden Elemente zugeordnet werden. Möglicherweise sind die Sequenzelemente zwischen Säugern und Algen nicht vollständig konserviert oder es handelt sich beim *Gpxh*-Regulationselement um ein neues, bisher unbekanntes Regulationselement. Erst wenn der entsprechende Transkriptionsfaktor isoliert und charakterisiert ist, kann diese Frage eindeutig beantwortet werden.

Weitere Forschung ist auch nötig, um sorgfältiger abzuklären, ob in *Chlamydomonas* ein spezifischer Mechanismus für die Induktion von *Gpxh* durch Singulett-Sauerstoff

existiert. Ist dies der Fall, könnte das *Gpxh*-Regulationselement als Bestandteil eines molekularen Schadstoffindikators zur Anwendung kommen. Mit einem solchen Biosensor wäre es möglich diejenigen Schadstoffe nachzuweisen, die in der Zelle die Bildung von Singulett-Sauerstoff auslösen.



Beat Fischer, Molekularbiologe und Doktorand in der Abteilung «Umwelt-Mikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie»

Koautor: Rik Eggen

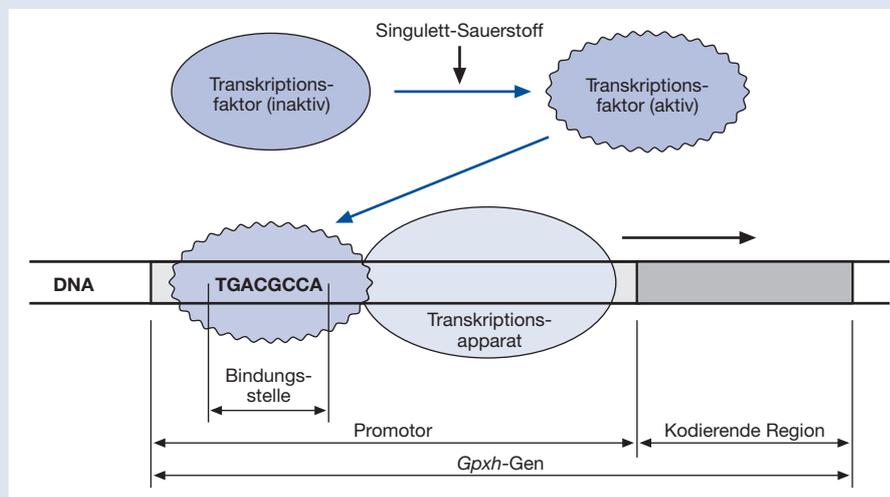


Abb. 2: Hypothetischer Aktivierungsweg des *Gpxh*-Gens durch Singulett-Sauerstoff. Bei Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff in der Zelle geht die inaktive Form des Transkriptionsfaktors über in die aktive Form und bindet an das *Gpxh*-Regulationselement. Erst dann kann sich der Transkriptionsapparat anlagern und das *Gpxh*-Gen ablesen.

- [1] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999): Free radicals in biology and medicine. Oxford science publications, 3rd edition. Clarendon Press, Oxford, New York, 968 p.
- [2] Mendez-Alvarez S., Leisinger U., Eggen R.I.L. (1999): Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. International Microbiology 2, 15–22.
- [3] Eggen R.I.L. (2001): Biologische Tracer in der Ökotoxikologie. EAWG news 52, 8–9.
- [4] Gille G., Sigler K. (1995): Oxidative stress and living cells. Folia Microbiologica 40, 131–52.
- [5] Rochaix J.-D., Michel G.-C., Sabeeha M. (1998): The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. Advances in photosynthesis, Vol. 7. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 760 p.
- [6] Rockett J.C., Dix D.J. (2000): DNA arrays: technology, options and toxicological applications. Xenobiotica 30, 155–177.
- [7] Leisinger U., Rüfenacht K., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (1999): Structure of a glutathione peroxidase homologous gene involved in the oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Science 149, 139–149.
- [8] Leisinger U., Rüfenacht K., Fischer B., Pesaro M., Spengler A., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (2001): The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. Plant Molecular Biology 46, 395–408.

Neue Wege bei der Analyse der Trinkwasserqualität

Die langwierige Suche nach der schnellen Alternativmethode

Trinkwasser wird routinemässig auf das Vorkommen von Bakterien mit der Kultivierungsmethode untersucht. Problematisch bei dieser Methode ist der grosse Zeitbedarf. Die Ergebnisse liegen frühestens nach einem Tag vor. An der EAWAG wird deshalb momentan eine schnellere Methode entwickelt. Der Einsatz neuer, molekularer Techniken scheint dabei viel versprechend, die Ausarbeitung der Methode ist jedoch eine knifflige Angelegenheit.

Bereits seit vielen Jahrzehnten werden routinemässig bakterielle Parameter bestimmt, um die hygienische Qualität von Trinkwasser zu überprüfen. Dabei werden so genannte Indikatororganismen nachgewiesen, z.B. die Darmbakterien *Escherichia coli* [1]. Man geht davon aus, dass diese harmlosen Bakterien gemeinsam mit eventuellen Krankheitserregern ausgeschieden werden und ins Trinkwasser gelangen können. Für den Nachweis von *E. coli* bewährt sich seit Jahrzehnten die einfache und kostengünstige Kultivierungsmethode. Allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwändig: Im allergünstigsten Fall dauert es 24 Stunden, bis ein Resultat vorliegt. Es gibt aber Situationen, in denen der Wasserversorger schneller wissen müsste, ob das abgegebene Trinkwasser tatsächlich hygienisch einwandfrei ist. Beispielsweise könnte es bei tagelangem heftigem Regen vorkom-

men, dass eine oder mehrere Quellen einer Wasserversorgung schlecht filtriertes und fäkal kontaminiertes Wasser liefern, das unter ungünstigen Umständen ins Trinkwasser gelangen könnte. In diesem Fall müsste der Wasserversorger sofort die nötigen Massnahmen für die Dekontamination des Trinkwassersystems (Desinfektion, Spülung) einleiten und darüber hinaus die Bevölkerung alarmieren, das Wasser abzukochen. Kommt das Analyseergebnis jedoch erst nach 24 Stunden, kann es bereits zu spät sein. Aus diesem Grund wird derzeit an der EAWAG eine schnellere Nachweismethode entwickelt, die auf neueren molekularbiologischen Techniken basiert.

Die *E.-coli*-Referenzmethode

Trinkwasser wird zu den Lebensmitteln gerechnet und unterliegt daher der Schweizerischen Hygieneverordnung [2]. Darin ist

festgehalten, dass zum Qualitätsnachweis die Referenzmethoden aus dem Schweizerischen Lebensmittelbuch heranzuziehen sind [3]. Andere Untersuchungsmethoden sind dann zulässig, «wenn sie nachweislich zu gleichen Beurteilungen führen wie die Referenzmethoden» [2]. Als Referenzmethode zum Nachweis von *E. coli* in Trinkwasser gilt die Kultivierungsmethode (Abb. 1 oben). Die Hygieneverordnung gibt für *E. coli* den Toleranzwert «nicht nachweisbar in 100 ml Wasserprobe» vor. Deshalb werden bei der Kultivierungsmethode 100 ml Wasserprobe durch einen Filter filtriert, auf dem *E. coli* und andere Bakterien zurückgehalten werden. Der Filter wird anschliessend auf eine Agarplatte gelegt, wobei die einzelnen Bakterienzellen zu zählbaren Kolonien heranwachsen können. Ob eine Kolonie tatsächlich aus *E.-coli*-Bakterien besteht, wird über eine Enzymreaktion bestätigt, bei der die *E.-coli*-Kolonien blau angefärbt werden (siehe Titelseite).

Die neu entwickelte Alternativmethode

Bei der Suche nach einer schnelleren Alternativmethode bieten sich Techniken aus der Molekularbiologie an. Besonders viel versprechend erschien uns der Einsatz der

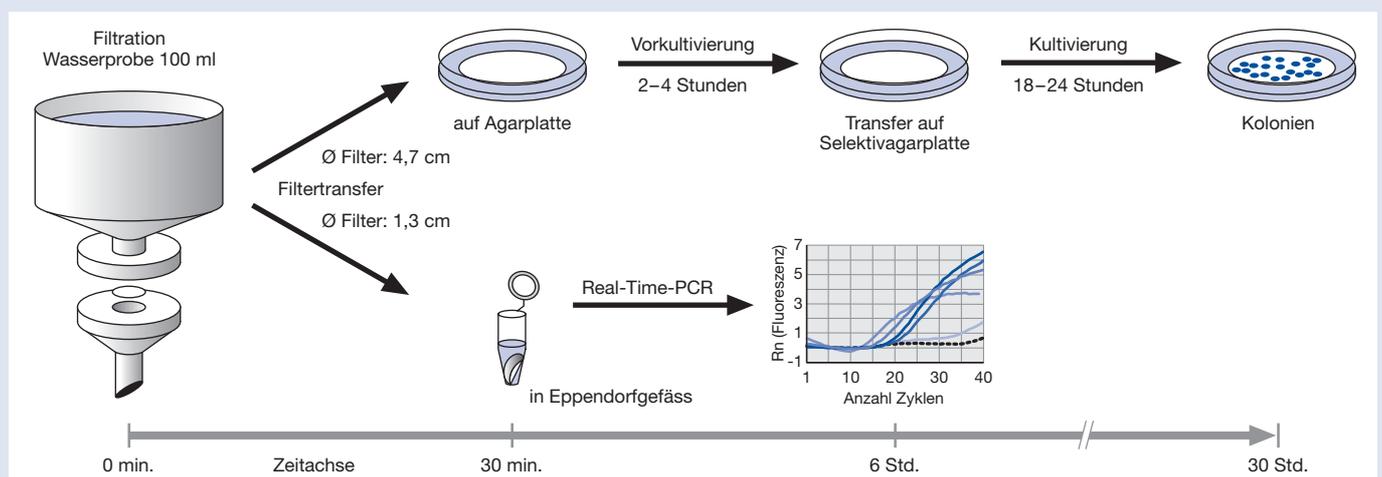


Abb. 1: Arbeitsschritte und Zeitbedarf der Kultivierungsmethode (oben) und der neu entwickelten Alternativmethode, basierend auf der PCR-Technologie (unten).

«Polymerase Chain Reaction» (PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion, Abb. 1 unten). Dabei werden kurze, für *E. coli* definierte Abschnitte der Erbsubstanz (DNA) in sich wiederholenden Temperaturzyklen vervielfältigt. Mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs, der sich in die doppelsträngige DNA einlagert, können die synthetisierten DNA-Fragmente anschliessend sichtbar gemacht werden. Bei der von uns eingesetzten «Real-Time-PCR-Methode» wird die Fluoreszenz direkt gemessen und auf den Computer übertragen. Das Resultat ist die Anzahl der Temperaturzyklen, die durchlaufen werden müssen, damit das Nachweinsniveau für die Fluoreszenz erreicht wird. Bezogen auf eine zu analysierende Wasserprobe bedeutet dies: je mehr *E.-coli*-Zellen (d.h. je mehr DNA) in der Probe vorhanden sind, desto weniger Temperaturzyklen sind notwendig, um die synthetisierten DNA-Frag-

mente nachzuweisen. Ein wichtiger Punkt in unserem PCR-Protokoll ist die Vorbehandlung der Probe mit dem Enzym DNase, das eventuell vorhandene freie DNA von toten Bakterien abbaut. Damit sollten falsche Positivresultate ausgeschlossen werden.

Der Unterschied wird deutlich

Um nun die Übereinstimmung der neu entwickelten PCR-Methode mit der Kultivierungsmethode zu testen, wurde Trinkwasser im Labor mit *E.-coli*-Zellen kontaminiert und bei 4 °C gelagert. Während eines Monats wurden davon immer wieder Proben entnommen und mit beiden Methoden analysiert. Am Anfang des Experiments (Zeitpunkt 0) konnten mit beiden Methoden Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 2A+B). Dann aber nahm die Zahl der Bakterien, die mit der Kultivierungsmethode erfasst wurden, rapide ab. Wir erwarteten deshalb für die PCR-Methode, dass die Fluoreszenz erst nach einer grösseren Anzahl Temperaturzyklen nachweisbar ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Selbst nach einem Monat wurden mit der PCR-Methode immer noch *E.-coli*-Zellen nachgewiesen. Diese Zellen waren offenbar nicht mehr fähig, auf dem Kulturmedium zu wachsen.

Solche Bakterienzellen, die nicht mehr kultiviert werden können, aber mit anderen Methoden noch identifizierbar sind, werden oft als «viable but not culturable» (VBNC, lebensfähig aber nicht kultivierbar) bezeichnet. Unter den Mikrobiologen sind kontroverse Diskussionen im Gange, ob im Falle von Indikatoren wie *E. coli* oder von krankmachenden Bakterien die Detektion von VBNC-Stadien relevant ist oder nicht. Es gibt Hinweise, dass solche Bakterien wieder «zum Leben erweckt» bzw. infektiös werden können [4], andere Untersuchungen beweisen das Gegenteil [5, 6]. Wahrscheinlicher scheint uns in unserem Experiment ein kontinuierliches Absterben, das je nach «Vorgeschichte» der *E.-coli*-Zelle unterschiedlich lange dauern kann.

Was sich bewährt hat, ist schwer zu ersetzen

Aus diesem einfachen Experiment geht hervor, dass die beiden Methoden nicht zu gleichen Beurteilungen führen und daher die PCR-Methode keine Alternative zur Kultivierungsmethode ist. Die Prinzipien, auf denen die beiden Methoden basieren, nämlich Vermehrungsfähigkeit im Fall der Kultivierungsmethode und Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte bei der PCR-Methode, sind vermutlich zu unterschiedlich, als dass eine genügende Übereinstimmung der Resultate erzielt werden könnte. Dies

macht bewusst, wie sehr die Festlegung von bakteriologischen Toleranzwerten von der Analysemethoden abhängt.

In der Literatur gibt es Vorschläge, bei der PCR-Methode eine kurze Vorkultivierung der Bakterien von einigen Stunden einzuführen. Mit dieser Massnahme stimmen die Ergebnisse besser mit jenen der Referenzmethode überein [7]. Generell sind Diskussionen im Gange und Normierungsvorschläge publiziert oder in Bearbeitung, die es erlauben, die Validierung von Alternativmethoden zukünftig zu vereinheitlichen [8]. Isoliert betrachtet, könnte die hier vorgestellte PCR-Methode als «neue» Methode etabliert werden. Dazu müsste aber genau herausgefunden werden, in welchen physiologischen Zuständen eine *E.-coli*-Zelle erfasst wird. Die Anwendungspalette für unsere neu entwickelte PCR-Methode scheint daher momentan eher im Forschungsbereich als bei der routinemässigen Trinkwasserüberwachung zu liegen.

Dank

Dem Institut Bachema in Schlieren sei herzlich gedankt für Initiierung und Finanzierung dieses Forschungsprojektes!



Annette Rust entwickelte die vorgestellte Methode im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der Abteilung «Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie».

Koautor: Wolfgang Köster

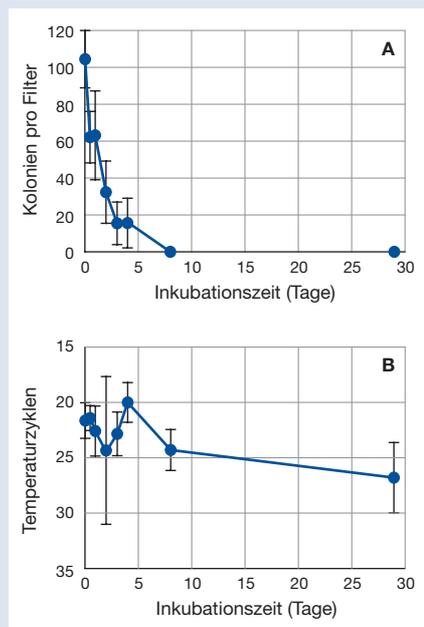


Abb. 2: Resultate der *E.-coli*-Bestimmung von künstlich kontaminiertem Trinkwasser mit der Kultivierungsmethode (A) und der PCR-Methode (B). Es wurden stets Kontrollen mit nicht kontaminiertem Wasser durchgeführt; Kultivierungsmethode: = 0 Kolonien, PCR-Methode: innerhalb von 40 Temperaturzyklen wurde das Nachweinsniveau nicht erreicht.

- [1] Köster W., Egli T., Rust A. (2002) Krankheitserreger im (Trink-)wasser? EAWAG news 53, 26–28.
- [2] Verordnung des EDI vom 26. Juni 1995 über die hygienischen und mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände, Räume, Einrichtungen und Personal (Hygieneverordnung, HyV), in 817.051, S. 1–16.
- [3] Ettl W. (Ed.) (2000): Kapitel 56, Mikrobiologie. In: Schweizerisches Lebensmittelbuch, Bundesamt für Gesundheit, Bern.
- [4] Colwell R.R. (2000): Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6, 121–125.
- [5] Smith R.J., Newton A.T., Harwood C.R., Barer M.R. (2002): Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* do not infect or colonize mice. *Microbiology* 148, 2727–2726.
- [6] Bogosian G., Bourneuf E.V. (2001): A matter of bacterial life and death. *EMBO reports* 21, 770–774.
- [7] Frahm E., Obst U. (2003): Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 52, 123–131.
- [8] Hübner P., Gautsch S., Jemmi T. (2002): In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 93, 118–139.

Das Anammox-Verfahren zur Stickstoffentfernung in Kläranlagen

Ergebnis der fruchtbaren Zusammenarbeit von Mikrobiologen und Verfahrenstechnikern

Die Schweiz als Rhein-Anliegerstaat hat sich verpflichtet, den Stickstoffexport in die Nordsee zu verringern. Auf Kläranlagen wird dies heutzutage meist durch eine kostspielige Erweiterung der biologischen Hauptstufe erreicht. In den 90er Jahren deuteten aber mehrere Berichte darauf hin, dass auch unter ganz unerwarteten Betriebsbedingungen Stickstoff eliminiert werden kann. Dies ist auf eine erst seit kurzem bekannte Bakteriengattung zurückzuführen, die auch in einer Schweizer Kläranlage gefunden wurde. Auf der Basis dieses Wissens entwickelten die Verfahrenstechniker anschliessend ein neues Verfahren, das eine nachhaltige Stickstoffentfernung ermöglicht.

Unter Stickstoffelimination versteht man die Umwandlung von biologisch verfügbaren Stickstoffverbindungen wie Ammonium (NH_4^+), Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) zu elementarem Stickstoff (N_2), der als harmloses Endprodukt in die Luft ausgast. In Kläranlagen wird heute fast ausschliesslich die biologische Nitrifikation/Denitrifikation zur Stickstoffelimination verwendet (siehe Kasten). Dabei verzichtet man in Schweizer Kläranlagen häufig auf den Denitrifikationsschritt, so dass noch eine relativ grosse Menge Stickstoff meist in Form von Nitrat in die Gewässer eingeleitet wird. Als Rhein-

Anrainer-Staat hat sich die Schweiz jedoch in der Gewässerschutzverordnung von 1998 verpflichtet, den Stickstoffeintrag in den Rhein bis zum Jahr 2005 um 2000 Tonnen zu verringern und muss daher in naher Zukunft handeln. Der Ausbau aller Schweizer Kläranlagen mit einer ausreichenden Nitrifikation/Denitrifikationsstufe wäre recht teuer und ausserdem ist der Betrieb dieses Verfahrens relativ energie- und ressourcenaufwändig [1]. Deshalb sind neue, schonendere Verfahren gefragt.

Den unbekanntem Mikroorganismen auf der Spur

In den 80er und 90er Jahren gab es mehrere Hinweise, dass Ammonium nicht nur mittels Nitrifikation/Denitrifikation eliminiert werden kann, sondern dass es vermutlich Mikroorganismen gibt, die Ammonium ohne Sauerstoff, jedoch mit Nitrit zu gasförmigem Stickstoff oxidieren können. Holländische und deutsche Wissenschaftler konnten diese Mikroorganismen erstmals identifizieren. Es handelt sich um Bakterien der Ordnung Planctomycetales: *Brocadia anammoxidans* und *Kuenenia stuttgartiensis* [2, 3]. Auch in der Schweizer Kläranlage Kölliken, die ohne Denitrifikationszone betrieben wird, konnte das Phänomen der anaeroben Ammoniumoxidation beobachtet werden. Unsere dortigen Untersuchungen zeigten, dass sich in dieser Kläranlage ein mehrfach geschichtetes Biofilmsystem ausgebildet hatte. In solchen Biofilmen ergeben sich starke Sauerstoffgradienten, z.B. kann die oberste

Schicht sauerstoffreich, die unterste auf dem Trägermaterial jedoch anaerob sein [4]. Wir nahmen deshalb an, dass die gesuchten Mikroorganismen in den untersten Schichten des Biofilms zu finden waren. Dank spezifischer Sonden und der FISH-Technik (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) [5] wiesen wir dort tatsächlich grössere Mengen eines Planctomyceten-artigen Bakteriums nach (Abb. 1). Bis heute ist es jedoch weltweit nicht gelungen, mit den klassischen Methoden der Mikrobiologie diese neuen Bakterien in Reinkultur zu isolieren. Wir konnten aber eine Probe des Biofilms so weit anreichern, dass etwa 90% aller Bakterien Planctomyceten waren [6]. Bei den Bakterien aus der Kläranlage in Kölliken handelt es sich ebenfalls um die Art *Kuenenia stuttgartiensis*. Mit Hilfe molekularbiologischer und physiologischer Versuche konnte eindeutig gezeigt werden, dass *K. stuttgartiensis* Ammonium unter anaeroben Bedingungen zu Stickstoff oxidiert [3, 6]; dieser Prozess wird deshalb als «anaerobe Ammoniumoxidation» (Anammox) bezeichnet.

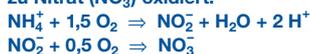
Anaerobe Ammoniumoxidation – ein nachhaltiger Prozess zur Stickstoffelimination

Auf diesem Wissensstand konnten nun die Verfahrenstechniker aufbauen. Auf Kläranlagen mit Schlammvergärung wird besonders ammoniumreiches Abwasser pro-

Nitrifikation

= Aerobe Ammoniumoxidation durch nitrifizierende Bakterien.

Ammonium (NH_4^+) wird durch Sauerstoff (O_2) über das Zwischenprodukt Nitrit (NO_2^-) zu Nitrat (NO_3^-) oxidiert:



Denitrifikation

= Nitratatmung durch denitrifizierende Bakterien.

Nitrat wird unter Zugabe von organischem Kohlenstoff (z.B. Methanol) bei anaeroben Bedingungen zu elementarem Stickstoff (N_2) reduziert:



Anammox

= Anaerobe Ammoniumoxidation durch Anammox-Bakterien.

Ammonium wird unter anaeroben Bedingungen mit Nitrit zu elementarem Stickstoff oxidiert:

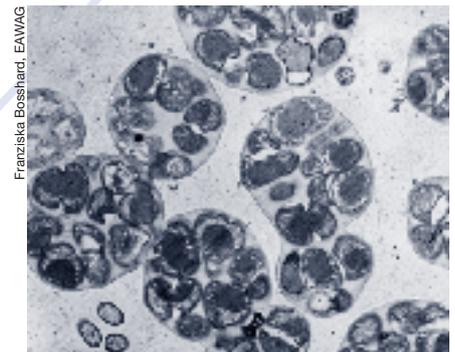


Abb.1: Cluster von Anammox-Bakterien unter dem Elektronenmikroskop.

Das Anammox-Verfahren auf dem Prüfstand

Um die Praxistauglichkeit dieses zweistufigen Verfahrens zu ermitteln, hat die EAWAG in Zusammenarbeit mit der Kläranlage Werdhölzli (Zürich) und weiteren Partnern eine zweistufige Pilotanlage (4 m³) gebaut und betrieben [7]. Diese Versuche ergaben einen umfassenden Einblick in den neuen Prozess und bestätigten seine Praxistauglichkeit. Ausserdem wurden an dieser Pilotanlage die Grundlagen für die Dimensionierung und den Betrieb einer grosstechnischen Anlage erarbeitet.

Leider besteht heute noch eine gewisse Zurückhaltung gegenüber dem neuen Verfahren, vor allem wegen der geringen Wachstumsgeschwindigkeit der Anammox-Bakterien und der mangelnden Praxiserfahrung. Aufgrund der zahlreichen Vorteile kann aber trotzdem in den nächsten Jahren mit den ersten grosstechnischen Anammox-Reaktoren auf Kläranlagen gerechnet werden.



Christian Fux, Verfahrenstechniker, hat Anfang 2003 seine Doktorarbeit über das Anammox-Verfahren in der Abteilung «Ingenieurwissenschaften» der EAWAG abgeschlossen. Seither ist er als Postdoktorand am «Advanced Wastewater Management Centre» der Universität Queensland in Australien tätig.

Koautoren: Konrad Egli, Jan Roelof van der Meer, Hansruedi Siegrist

duziert, es enthält noch 15–20% der Stickstofffracht des zugeführten Abwassers. Heutzutage wird dieses Faulwasser wieder mit dem Zulauf aus der Kanalisation vermischt und im Belebtschlammbecken der Hauptstufe gereinigt. Anstelle dieser «Rückbelastung» könnte das Faulwasser mit geringem Ressourcen- und Energieaufwand separat mit dem neuen Anammox-Prozess behandelt werden. Hierzu braucht es Nitrit, das im Faulwasser nicht vorhanden ist, jedoch als Zwischenprodukt bei der Nitrifikation (siehe Kasten) produziert wird. Folglich bietet sich ein zweistufiger Prozess an (Abb. 2). In einem ersten belüfteten Reaktor wird Ammonium teilweise zu Nitrit oxidiert (*partielle Nitrifikation*), welches in einem nachgeschalteten Behälter mit dem verbleibenden Ammonium unter Sauerstoff-

ausschluss zu elementarem Stickstoff reduziert wird (*Anammox*). Das ganze Verfahren nennt sich deshalb «partielle Nitrifikation/Anammox» oder kurz Anammox-Verfahren. Bisher wird es allerdings nur bei ammoniumreichen Abwässern eingesetzt. Dank der genetischen Methoden können die Anammox-Bakterien jederzeit einfach nachgewiesen werden, was in der Anlaufphase und bei Prozessstörungen des Reaktors wichtige Information liefert.

Gegenüber der herkömmlichen Nitrifikation/Denitrifikation hat das Anammox-Verfahren einige Vorteile (Abb. 3):

- Die Sauerstoffzugabe kann um 60% reduziert werden. Damit wird auch der Energieaufwand gesenkt, der zum Einblasen des Sauerstoffs benötigt wird.

- Die Anammox-Bakterien benötigen zum Wachsen keine organische Kohlenstoffquelle. Im Gegensatz dazu muss beim Nitrifikation/Denitrifikationsverfahren organischer Kohlenstoff beispielsweise in Form von Methanol hinzugegeben werden.

- Die Anammox-Bakterien produzieren wenig Biomasse, so dass die zu entsorgende Schlammmenge gering ist.

Damit verbraucht das neue Anammox-Verfahren nicht nur weniger Energie und Ressourcen, sondern ist daneben auch noch preiswerter als das konventionelle Nitrifikation/Denitrifikationsverfahren.

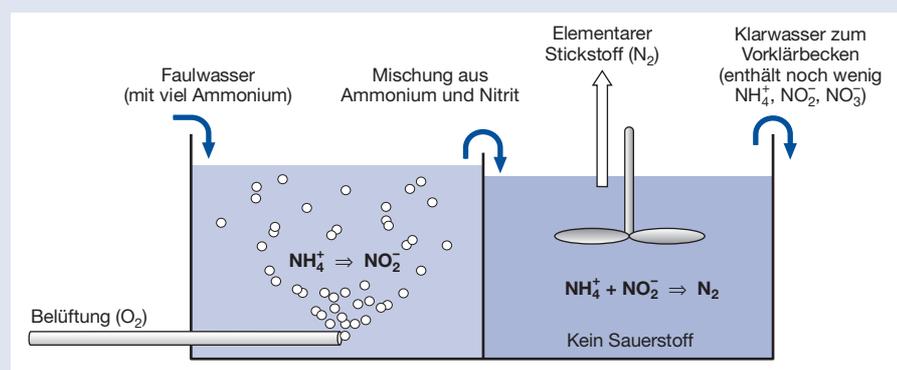


Abb. 2: Das Anammox-Verfahren.

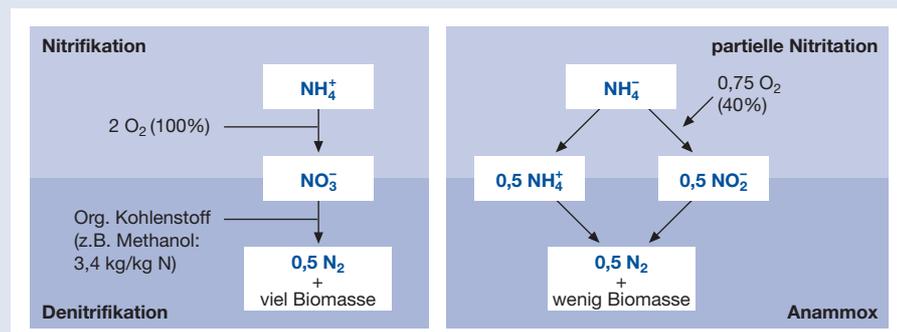


Abb. 3: Vergleich des Anammox-Verfahrens (rechts) mit der konventionellen Stickstoffeliminierung durch das Nitrifikation/Denitrifikations-Verfahren (links).

[1] BUWAL (1996): Stickstofffrachten aus Abwasserreinigungsanlagen. Schriftenreihe Umwelt Nr. 276, 67 S.

[2] Strous M., Fuerst J.A., Kramer E.H.M., Logemann S., Muyzer G., van de Pas-Schoonen K.T., Webb R., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. (1999): Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400, 446–449.

[3] Schmid M., Twachtman U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.-H., Wagner M. (2000): Molecular evidence for genus-level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic & Applied Microbiology* 23, 93–106.

[4] Koch G., Egli K., van der Meer J.R., Siegrist H. (2000): Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor. *Water Science and Technology* 41, 191–198.

[5] Zepp K. (2001): RNA – ein Tracer zum Nachweis von Mikroorganismen. *EAWAG news* 52, 12–13.

[6] Egli K., Fanger U., Alvarez P., Siegrist H., van der Meer J.R., Zehnder A.J.B. (2001): Enrichment and characterization of a new anammox bacterium from a rotating biological contactor treating an ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology* 175, 198–207.

[7] Fux C., Böhrer M., Huber P., Brunner I., Siegrist H. (2002): Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *Journal of Biotechnology* 99, 295–306.

Genetische Diversität von Daphnien in alpinen Seen

Bereits seit mehr als 100 Jahren wird die Diversität des Zoo- und Phytoplanktons alpiner Seen eingehend untersucht. Heute ist allgemein akzeptiert, dass die Artenvielfalt der Planktongemeinschaften mit zunehmender Höhenlage abnimmt. Wir wollten wissen, ob sich diese Aussage auch auf Populationsebene übertragen lässt und haben dies an einem typischen Zooplanktonorganismus, dem Wasserfloh, untersucht. Dazu bestimmten wir die genetische Diversität von 11 Wasserflohpopulationen aus unterschiedlich hoch gelegenen Bergseen. Es zeigte sich, dass die genetische Diversität sehr heterogen war.

Die extremen Umweltbedingungen in alpinen Gebieten haben zur Folge, dass nur wenige Pflanzen- und Tierarten an ein Leben in diesen Regionen angepasst sind. Daher nimmt die Biodiversität – genau genommen die Artenvielfalt – mit zunehmender Höhenlage ab. Es ist jedoch unklar, ob dies auch für einen weiteren Teilaspekt der Biodiversität, nämlich für die genetische Diversität zutrifft. Dieser Frage sind wir genauer nachgegangen und untersuchten die planktonisch lebenden Wasserflohpopulationen (*Daphnia*) in verschiedenen Schweizer Bergseen. Diese Organismen sind für eine derartige Studie besonders interessant, weil sie sich sowohl asexuell durch Parthenogenese (Jungfernzeugung) als auch sexuell vermehren können [1].

Jungfernzeugung und Dauereier

Unter günstigen Umweltbedingungen ist die Parthenogenese die normale Fortpflan-

zungsart der Daphnien, bei der Mutterorganismen genetisch identische Töchter ausbilden (so genannte Klone). Sie haben somit die Möglichkeit, sich innerhalb kürzester Zeit explosionsartig zu vermehren. In alpinen Seen können sie so die relativ kurze Wachstumsperiode sehr effizient nutzen. Werden die Umweltbedingungen jedoch schlechter, z.B. bei niedrigen Temperaturen oder Futtermangel, produzieren die Daphnien Männchen und bilden sexuelle Weibchen aus. Sexuell befruchtete Eier werden im Brutraum von einer resistenten Hülle eingeschlossen, dem so genannten Ehippium, und bei der nächsten Häutung abgeworfen. Die Ehippium können jahrelang abgelagert im Sediment überdauern. Unter günstigen Bedingungen schlüpfen aus diesen Dauereiern wiederum parthenogenetische Weibchen und der Lebenszyklus beginnt von vorne. Sind die Bedingungen das ganze Jahr über gut, werden keine Dauereier ge-

bildet und es folgt eine parthenogenetische Generation der nächsten.

Umwelt, Fortpflanzung und genetische Diversität

In unserem Projekt wollten wir herausfinden, wie sich Umweltbedingungen, Fortpflanzungsart und genetische Diversität in alpinen Seen zueinander verhalten. Zu diesem Zweck untersuchten wir 11 unterschiedlich hoch gelegene Bergseen in den Schweizer Alpen, deren Umweltbedingungen mit zunehmender Höhenlage immer rauer werden. In vier aufeinander folgenden Jahren (1997–2000) wurden die Daphnienpopulationen dieser Seen jeweils im Spätsommer oder Frühherbst beprobt.

Bei unseren Experimenten gingen wir von folgenden Überlegungen aus:

- Alpine Seen sollten einen hohen Anteil sexueller Individuen haben, da Daphnien nur in Form von Dauereiern den kalten, futterarmen Winter überstehen können.
- Bei Daphnien ist die genetische Diversität vor allem vom sexuellen Austausch genetischen Materials abhängig. Wir nahmen daher an, dass Populationen in Seen, in denen sich Daphnien überwiegend sexuell vermehren, eine höhere genetische Diversität haben.
- Da die Umweltbedingungen in alpinen Seen mit zunehmender Höhe immer extremer werden, erwarteten wir ausserdem, dass die genetische Diversität der Daphnienpopulationen mit zunehmender Höhenlage ansteigen und nicht wie die Artendiversität abnehmen würde. Folglich sollten alpine Seen eine höhere genetische Diversität aufweisen als Tieflandseen.

Sexuelle Individuen meist in der Überzahl

Die relativen Anteile asexueller und sexueller Daphnien waren in den untersuchten alpinen Seen sehr unterschiedlich und reichten von 2 bis 90 % (Abb. 1 unten). In 8 der 11 untersuchten Bergseen gab es mehr sexuelle als asexuelle Daphnien. In den beiden am tiefsten gelegenen alpinen Seen, dem

Die genetische Untersuchungsmethode

Die Allozymelektrophorese ist eine bewährte Methode, um die genetische Diversität von Populationen zu untersuchen [2]. Sie beruht auf folgendem Prinzip: Im Genom eines Organismus kann die genetische Information für ein Enzym einmal oder mehrmals vorhanden sein. Liegen mehrere Gene vor, sind die einzelnen Gene im Lauf der Evolution meist durch Mutationen verändert worden. Dies hat zur Folge, dass in den Zellen mehrere Enzyme, so genannte Allozyme, mit leicht veränderten Aminosäuresequenzen gebildet werden, die aber dennoch die gleiche Funktion wie das Ausgangsenzym wahrnehmen. Im einfachsten Fall liegen 2 Allozyme vor, die sich lediglich durch eine Aminosäure von einander unterscheiden. Hat die neue Aminosäure eine andere Ladung, wandern die beiden Allozyme unterschiedlich schnell im elektrischen Feld und können so gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch eine anschliessende Reaktion mit dem entsprechenden Substrat nachgewiesen werden. Koppelt man den Substratumsatz mit einer Farbreaktion, kann das Enzym als Bande im Gel direkt sichtbar gemacht werden. Diese Methode zeigt, wie viele verschiedene Enzymvariationen in einer Population vorhanden sind und ist ein Mass für die genetischen Diversität.

uns untersuchten Bergseen fanden wir zwischen 2 und 42 verschiedene Klone (Abb. 1 oben). Im Melchsee und im Lago Cadagno war die klonale Diversität am höchsten.

Eine genauere Beschreibung der genetischen Diversität ist möglich, wenn neben der klonalen Diversität auch noch die Häufigkeit der einzelnen Klone einbezogen wird. Denn eine Population mit 10 gleich häufig vorkommenden Klonen ist diverser als eine Population, bei der einer von 10 Klonen dominant ist und 99% aller Individuen ausmacht. Deshalb haben wir für jede der 11 untersuchten Populationen den Simpson-Index ($D_{Sim} = 1 - \sum p_i^2$, p_i = Anteil eines Klons i in der Population) berechnet (Abb. 1 oben). Dieser Index gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei zufällig ausgewählte Individuen eine unterschiedlich genetische Struktur haben. Hohe D_{Sim} -Werte (nahe bei 1) deuten darauf hin, dass viele Klone mit etwa gleicher Häufigkeit vorkommen und zeigen eine hohe Diversität an. Niedrige D_{Sim} -Werte (nahe bei 0) besagen, dass ein Klon in der Population dominant ist und lassen auf eine niedrige Diversität schliessen. Hier zeigte sich, dass die Diversität der Daphnienpopulationen in vielen Seen relativ hoch war, jedoch im Oberen Arosasee, Leisee und Riffelsee II sehr niedrig war.

nicht mit der genetischen Diversität, egal ob als klonale Diversität oder als Simpson-Index ausgedrückt. Zudem konnten wir keine Korrelation zwischen der genetischen Diversität der Daphnien und der Höhenlage der untersuchten alpinen Seen feststellen. Wir verglichen unsere Daten mit der genetischen Diversität der Daphnienpopulationen in zwei Tieflandseen, dem Greifensee ($D_{Sim} = 0,96$) und dem Vierwaldstättersee ($D_{Sim} = 0,48$). Dabei zeigte sich, dass die genetische Diversität einiger Bergseen ebenso niedrig sein kann wie im Vierwaldstättersee und dass andere Bergseen eine fast ebenso hohe Diversität aufweisen wie der Greifensee.

Diese Untersuchung [3] war ein erster Schritt, die genetische Diversität einer wichtigen Zooplanktonart in alpinen Seen zu untersuchen und Faktoren zu finden, welche die genetische Diversität beeinflussen. Anscheinend führt jedoch die sexuelle Fortpflanzung bei Daphnien nicht unbedingt zu einer höheren genetischen Diversität. Es ist daher anzunehmen, dass andere Faktoren, wie z.B. das Vorkommen bestimmter Daphnienarten und Daphnienhybriden, einen grösseren Einfluss haben, oder dass nur wenige Klone an diese extremen Umweltbedingungen in alpinen Seen angepasst sind. Ausserdem scheint eine hohe genetische Diversität nicht unbedingt ausschlaggebend zu sein, um das Überleben von Daphnien in alpinen Seen dauerhaft zu sichern. Wahrscheinlich kommen hier weitere Strategien wie Plastizität im Verhalten und im Lebenszyklus ins Spiel, die den Daphnien helfen, die rauen alpinen Umweltbedingungen zu überdauern.

Unteren und dem Oberen Arosasee, fanden wir fast ausschliesslich asexuelle Weibchen, wohingegen im höchst gelegenen Riffelsee II nahezu nur sexuelle Individuen vorkommen. Allerdings ist die Verteilung sexueller und asexueller Daphnien in den dazwischen liegenden Seen sehr heterogen, so dass sich kein Muster ablesen lässt. Erstaunlich war, dass im Gegensatz zu Daphnienpopulationen in Tieflandseen, wo die Männchen oft weniger als 1% ausmachen, in den von uns untersuchten Bergseen bis zu 30–40% Männchen vorkamen. Darüber hinaus war der Anteil sexueller Männchen in den alpinen Seen immer höher als der Anteil sexueller Weibchen.

Die genetische Diversität

Um die genetische Diversität in den verschiedenen Daphnienpopulationen zu bestimmen, wurden bis zu 80 einzelne Daphnien pro See mit der Allozymmethode (siehe Kasten) untersucht. Einen ersten Anhaltspunkt gibt die klonale Diversität. Sie beschreibt die Anzahl unterschiedlicher Klone innerhalb einer Population. In den 11 von

Die räumlich genetische Struktur der Daphnien ist komplex

Der hohe Anteil von sexuellen Individuen in alpinen Seen war erstaunlich und ist ein Anzeichen dafür, dass Daphnien in vielen alpinen Seen nur als Dauereier den rauen Winter überstehen können. Allerdings korrelierte der Anteil von sexuellen Individuen

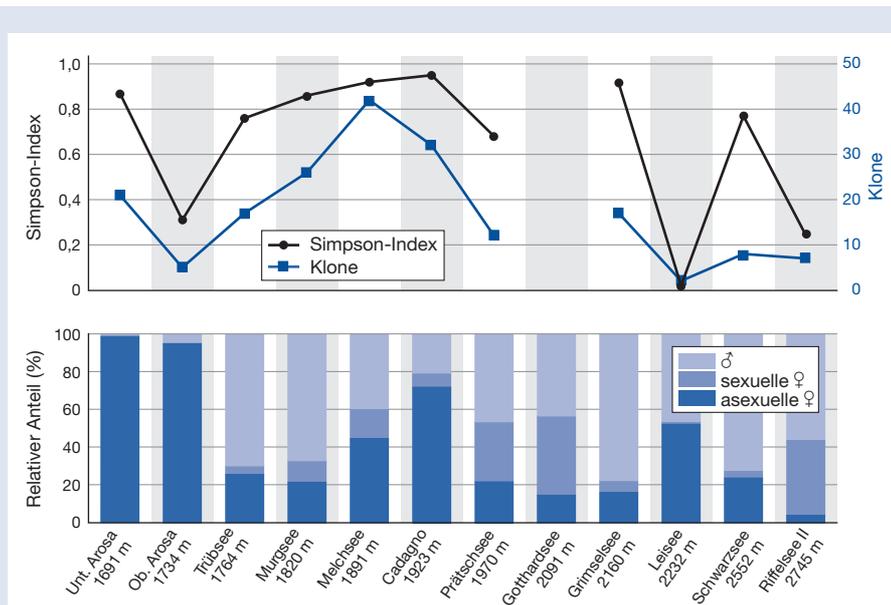


Abb 1: Untersuchung der Daphnienpopulationen in 11 unterschiedlich hoch gelegenen Schweizer Bergseen. Unteres Diagramm: relative Anteile der sexuellen und asexuellen Individuen; oberes Diagramm: genetische Diversität ausgedrückt als Anzahl Klone und durch den Simpson-Index.



Monika Winder schloss kürzlich ihre Doktorarbeit zum Thema «Zooplanktonökologie in alpinen Seen» in der Abteilung Limnologie ab. Seither arbeitet sie als Postdoktorandin an der Universität Washington, Seattle, USA.



Piet Spaak, Biologe und Leiter der Arbeitsgruppe «Evolutionsökologie» in der Abteilung «Limnologie». Privatdozent für Evolutionsökologie an der ETH Zürich. Forschungsthemen: Genetische Diversität bei Daphnien, alpine Seen und Räuber-Beute-Beziehungen.

- [1] De Meester L. (1996): Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: patterns and processes. *Ecoscience* 3, 385–399.
- [2] Monaghan M. (2002): Habitatfragmentierung und genetische Diversität. *EAWAG news* 54, 28–30.
- [3] Winder M., Monaghan M.T., Spaak P. (2001): Have human impacts changed alpine zooplankton diversity over the past 100 years? *Arctic Antarctic and Alpine Research* 33, 467–475.

Separata bitte mit dem in der Mitte eingehafteten Talon bestellen.

- [3193] **Andrade A.P., Witholt B., Hany R., Egli T., Li Z.** (2002): Preparation and Characterization of Enantiomerically Pure Telechelic Diols from methyl-Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules* 35, 684–689.
- [3194] **Andrade A.P., Neuenschwander P., Hany R., Egli T., Witholt B., Li Z.** (2002): Synthesis and Characterization of Novel Copoly(ester-urethane) Containing Blocks of Poly-[(R)-hydroxyoctanoate] and Poly-[(R)-3-hydroxybutyrate]. *Macromolecules* 35, 4946–4950.
- [3195] **Brun R.** (2002): Learning From Data: Parameter Identification in the Context of Large Environmental Simulation Models. Diss. ETHZ No. 14 575, Zurich.
- [3196] **Leisinger U.** (2002): Regulation of Gene Expression Upon Oxidative Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. Diss. ETHZ No. 14 434, Zurich.
- [3197] **Monaghan M.T.** (2002): Habitat Fragmentation in Alpine Streams: Implications for Genetic Structure and Species Richness of Aquatic Insects. Diss. ETHZ No. 14 561, Zurich.
- [3198] **Behringer J.** (2002): Legitimität durch Verfahren? Bedingungen semi-konventioneller Partizipation. Dissertation Universität Stuttgart, S. Roderer Verlag, Regensburg.
- [3199] **Egli T.** (2002): Microbial Degradation of Pollutants at Low Concentrations and in the Presence of Alternative Carbon Substrates: Emerging Patterns. In: «Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals», S.N. Agathos, W. Reineke (Eds.). Kluwer Academic Publ., pp. 131–139.
- [3200] **Egli T., Witschel M.** (2002): Enzymology of the Breakdown of Synthetic Chelating Agents. In: «Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals», S.N. Agathos, W. Reineke, (Eds.). Kluwer Academic Publ., pp. 205–217.
- [3201] **Yang H., Zehnder A.J.B.** (2002): Water Scarcity and Food Import: A Case Study for Southern Mediterranean Countries. *World Development* 30 (8), 1413–1430.
- [3202] **van der Nat D., Tockner K., Edwards P.J., Ward J.V.** (2002): Quantification of Large Woody Debris in Large Floodplain Rivers: An Area-Based Approach Using Differential GPS and GIS. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28, 332–335.
- [3203] **Robinson C.T., Uehlinger U., Guidon F., Schenkel P., Skvare R.** (2002): Limitation and Retention of Nutrients in Alpine Streams of Switzerland. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28, 263–272.
- [3204] **Malard F., Hofmann A., Tockner K., Uehlinger U.** (2002): Iron Concentration in the Water of a Glacial River System. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28, 134–139.
- [3205] **Hieber M., Robinson C.T., Uehlinger U., Ward J.V.** (2002): Are Alpine Lake Outlets Less Harsh Than Other Alpine Streams? *Arch. Hydrobiol.* 154 (2), 199–223.
- [3206] **Rechberger H., Graedel T.E.** (2002): The Contemporary European Copper Cycle: Statistical Entropy Analysis. *Ecol. Economics* 42, 59–72.
- [3207] **Gerecke A.C., Schärer M., Singer H.P., Müller S.R., Schwarzenbach R.P., Sägesser M., Ochsenbein U., Popow G.** (2002): Sources of Pesticides in Surface Waters in Switzerland: Pesticide Load Through Waste Water Treatment Plants – Current Situation and Reduction Potential. *Chemosphere* 48, 307–315.
- [3208] **Hug F., Baccini P.** (2002): Physiological Interactions Between Highland and Lowland Regions in the Context of Longterm Resource Management. *Mountain Res. & Develop.* 22 (2), 168–176.
- [3209] **Kovar K., Chaloupka V., Egli T.** (2002): A Threshold Substrate Concentration is Required to Initiate the Degradation of 3-Phenylpropionic Acid in *Escherichia coli*. *Acta Biotechnol.* 22 (3–4), 285–298.
- [3210] **Laj C., Kissel C., Mazaud A., Michel E., Muscheler R., Beer J.** (2002): Geomagnetic Field intensity, North Atlantic Deep Water Circulation and Atmospheric $\Delta^{14}\text{C}$ During the Last 50 kyr. *Earth and Planetary Sci. Lett.* 200, 177–190.
- [3211] **Mavrocordatos D., Fortin D.** (2002): Quantitative Characterization of Biotic Iron Oxides by Analytical Electron Microscopy. *American Mineralogist* 87, 940–946.
- [3212] **Nguyen H.M., Pham H.V., Giger W., Berg M.** (2002): Simultaneous Determination of Polar and Apolar Organophosphorus Pesticides and Triazine Herbicides by Solid-phase Microextraction (SPME) in Aqueous Samples. *Anal. Sci.* 17 (Suppl.), a375–a378.
- [3213] **Duong H.A., Pham H.V., Gallard H., Berg M.** (2001): Determination of the Breakpoint in Chlorine Dosage for Typical Groundwater Sources in Hanoi Area. *J. Anal. Sci. of the Vietnam Anal. Sci. Soc.* 6 (4), 63–66. (in Vietnamese)
- [3214] **Duong H.A., Hoang M.H., Pham H.V., Berg M., Giger W.** (2001): Evaluation of GC/MS/HS Method for Analysis of Volatile Organic in Water. *J. Anal. Sci. of the Vietnam Anal. Sci. Soc.* 6 (2), 31–36. (in Vietnamese)
- [3215] **Min N.H., Ha P.N., Viet P.H., Giger W., Berg M.** (2000): Determination of Polar and Non-polar Pesticides in Aqueous Solutions by Solid Phase Microextraction (SPME) and Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC/MS). Workshop on Management, Use and Assessment of Environmental Pollution of Pesticides, CEC, Hanoi, Sept. 28–29.
- [3216] **Boller M., Wagner W.** (2001): Urban Water Management in Switzerland. Conference-Proceedings EurAqua, Sixth Scientific and Technical Review, Laboratorio Nacional de Engenharia Civil, LNEC, Lisbon, Portugal, Lisbon 20–21 October 1999.
- [3217] **Tockner K., Ward J.V., Edwards P.J., Kollmann J., Gurnell A.M., Petts G.E.** (2001): Der Tagliamento (Norditalien): Eine Wildflusssau als Modellökosystem für den Alpenraum. Bayer. Akad. für Naturschutz und Landschaftspflege, Laufen/Salzach. *Laufener Seminarbeiträge* 3 (01), S. 25–34.
- [3218] **Meyer A., Würsten M., Schmidt A., Kohler H.-P.E., Witholt B.** (2002): Hydroxylation of Indole by Laboratory-Evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277 (37), 34161–34167.
- [3219] **Friedrich J., Dinkel C., Friedl G., Pimenov N., Wijsman J., Gomoiu M.-T., Cociasu A., Popa L., Wehrli B.** (2002): Benthic Nutrient Cycling and Diagenetic Pathways in the Northwestern Black Sea. *Estuarine, Coastal & Shelf Sci.* 54, 369–383.
- [3220] **Hügel K., Larsen T., Gujer W.** (2002): Ökobilanzen als Massstab für die Ressourceneffizienz in der Abwasserentsorgung. *Schriftenreihe Wasserforschung* 7, 129–141.
- [3221] **Brun R., Kühni M., Siegrist H., Gujer W., Reichert P.** (2002): Practical Identifiability of ASM2d Parameters – Systematic Selection and Tuning of Parameter Subsets. *Water Res.* 36, 4113–4127.
- [3222] **Granina L., Müller B., Wehrli B., Martin P.** (2000): Oxygen, Iron, and Manganese at the Sediment-Water Interface in Lake Baikal. *Terra Nostra* 2000/9, Baikal, First Workshop and Symposium, pp. 87–93.
- [3223] **Hieber M.** (2002): Alpine Streams: Aspects of Biocomplexity. Diss. ETHZ No. 14 601, Zurich.
- [3224] **Tockner K., Paetold A., Karas U.** (2002): Leben in der Flussdynamik zwischen Trockenfall und Hochwasser. In: «Rundgespräche der Kommission für Ökologie». Bd. 24. Verlag F. Pfeil, München, S. 37–46.
- [3225] **Winder M., Spaak P.** (2002): Effects of Natural UV Radiation on the Life History of Alpine

- Daphnia*. Verh. Internat. Verein. Limnol. 28, 355–359.
- [3226] **Robinson C.T., Gessner M.O.** (2000): Leaf Breakdown in an Alpine Spring Brook. Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 744–747.
- [3227] **Ackermann G.E., Brombacher E., Fent K.** (2002): Development of a Fish Reporter Gene System for the Assessment of Estrogenic Compounds and Sewage Treatment Plant Effluents. Environ. Toxicol. Chem. 21 (9), 1864–1875.
- [3228] **Frutiger A., Meier Bürgisser G.M.** (2002): Life History Variability of a Grazing Stream Insect (*Liponeura cinerascens minor*; Diptera: Blephariceridae). Freshwater Biol. 47 (9), 1618–1632.
- [3229] **Golet E.M., Alder A.C., Giger W.** (2002): Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. Environ. Sci. Technol. 36 (17), 3645–3651.
- [3230] **Gessner M.O., van Ryckegem G.** (2002): Water Fungi as Decomposers in Freshwater Ecosystems. In: «Encyclopedia of Environmental Microbiology», G. Bitton, (Ed.). John Wiley & Sons, pp. 3353–3363.
- [3231] **Escher B.I., Hermens J.L.M.** (2002): Modes of Action in Ecotoxicology: Their Role in Body Burdens, Species Sensitivity, QSARs, and Effects. Environ. Sci. Technol. 36 (20), 4201–4217.
- [3232] **Gessner M.O., Newell S.Y.** (2002): Biomass, Growth Rate, and Production of Filamentous Fungi in Plant Litter. In: «Manual of Environmental Microbiology», 2nd ed., C.J. Hurst et al., (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., pp. 390–408.
- [3233] **Ruckstuhl S., Suter M.J.F., Kohler H.P.-E., Giger W.** (2002): Leaching and Primary Biodegradation of Sulfonated Naphthalenes and their Formaldehyde Condensates from Concrete Superplasticizers in Groundwater Affected by Tunnel Construction. Environ. Sci. Technol. 36 (15), 3284–3289.
- [3234] **Graça M.A.S., Cressa C., Gessner M.O., Feio M.J., Callies K.A., Barrios C.** (2001): Food Quality, Feeding Preferences, Survival and Growth of Shredders from Temperate and Tropical Streams. Freshwater Biol. 46, 947–957.
- [3235] **Gessner M.O., Chauvet E.** (2002): A Case for Using Litter Breakdown to Assess Functional Stream Integrity. Ecol. Appl. 12 (2), 498–510.
- [3236] **Hieber M., Gessner M.O.** (2002): Contribution of Stream Detritivores, Fungi, and Bacteria to Leaf Breakdown Based on Biomass Estimates. Ecology 83 (4), 1026–1038.
- [3237] **Baldy V., Chauvet E., Charcosset J.-Y., Gessner M.O.** (2002): Microbial Dynamics Associated with Leaves Decomposing in the Mainstem and Floodplain Pond of a Large River. Aquatic Microbial Ecology 28, 25–36.
- [3238] **Buesing N., Gessner M.O.** (2002): Comparison of Detachment Procedures for Direct Counts of Bacteria Associated with Sediment Particles, Plant Litter and Epiphytic Biofilms. Aquatic Microbial Ecology 27 (1), 29–36.
- [3239] **Gessner M.O.** (2001): Mass Loss, Fungal Colonisation and Nutrient Dynamics of *Phragmites australis* Leaves During Senescence and Early Aerial Decay. Aquat. Bot. 69, (2–4), 325–339.
- [3240] **Lotter A.F., Appleby P.G., Bindler R., Dearing J.A., Grytnes J.-A., Hofmann W., Kamernik A., Lami A., Livingstone D.M., Ohlendorf C., Rose N., Sturm M.** (2002): The Sediment Record of the Past 200 Years in a Swiss High-alpine Lake: Hagelseewli (2339 m a.s.l.). J. Paleolimnol. 28, 111–127.
- [3241] **Cameron N.G., Schnell A., Raution M.L., Lami A., Livingstone D.M., Appleby P.G., Dearing J.A., Rose N.** (2002): High-resolution Analyses of Recent Sediments from a Norwegian Mountain Lake and Comparison with Instrumental Records of Climate. J. Paleolimnol. 28, 79–93.
- [3242] **Catalan J., Ventura M., Brancelj A., Granados I., Thies H., Nickus U., Korhola A., Lotter A.F., Barbieri A., Stuchlik E., Lien L., Bitusik P., Buchaca T., Camarero L., Goudsmit G.H., Kopacek J., Lemcke G., Livingstone D.M., Müller B., Raution M.L., Sisko M., Sorvari S., Sporka F., Struncky O., Toro M.** (2002): Seasonal Ecosystem Variability in Remote Mountain Lakes: Implications for Detecting Climatic Signals in Sediment Records. J. Paleolimnol. 28, 25–46.
- [3243] **Berg M., Hug S., Zobrist J.** (2002): Arsen, eine neue Herausforderung für Wasserfachleute. CHemie 10, 3–13.
- [3244] **Heller Hansraj C.** (2000): Trophic Cascading in Lake Lucerne, Switzerland the Influence of Top-Down Controls on the Pelagic Food Web. Christine Heller Hansraj. Diss. ETHZ Nr. 13 631, Zurich.
- [3245] **Spaak P., Eggenschwiler L. Bürgi H.** (2000): Genetic Variation and Clonal Differentiation in the *Daphnia* Population of the Greifensee, a Pre-Alpine Swiss Lake. Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 1919–1923.
- [3246] **Wick L.M., Weilenmann H., Egli T.** (2002): The Apparent Clock-Like Evolution of *Escherichia coli* in Glucose-Limited Chemostats Is Reproducible at Large but Not at Small Population Sizes and Can Be Explained with Monod Kinetics. Microbiology (UK) 148, 2889–2902.
- [3247] **Roth C.M., Goss K.U., Schwarzenbach R.P.** (2002): Adsorption of a Diverse Set of Organic Vapors on the Bulk Water Surface. J. Colloid Interface Sci. 252 (1), 21–30.
- [3248] **Zurbrügg C., Drescher S., Rytz I., Sinha M., Enayetullah I.** (2002): Decentralised Composting in Dhaka, Bangladesh – Production of Compost and its Marketing. In: «Appropriate Environmental and Solid Waste Management and Technologies for Developing Countries» 2nd Ed., G. Kocasoy et al., (Eds.). Proceedings International Solid Waste Association (ISWA), Istanbul, pp. 1285–1292.
- [3249] **Zurbrügg C., Drescher S., Sharatchandra H.C.** (2002): Decentralised Composting in India – Lessons Learned. Conf. Proc. 28th WEDC Internat. Conf. on Sustainable Environmental Sanitation and Water Services, November 18–22, 2002, Calcutta India.
- [3250] **Ahmed N., Zurbrügg C.** (2002): Organic Waste Management in Karachi, Pakistan. Conf. Proc. 28th WEDC Internat. Conf. on Sustainable Environmental Sanitation and Water Services, November 18–22, 2002, Calcutta India.
- [3251] **Drescher S., Zurbrügg C.** (2002): Dezentrale Kompostierung in Indien. Müllmagazin 3, 17–21.
- [3252] **Schweigert N., Eggen R.I.L., Escher B.I., Burkhardt-Holm P., Behra R.** (2002) Ecotoxicological Assessment of Surface Waters: A Modular Approach Integrating *in vitro* Methods. Altex Altern. Tierexp. 19, 30–37.
- [3253] **Ammann A.A.** (2002): Speciation of Heavy Metals in Environmental Water by Ion Chromatography Coupled to Icp-MS. Anal. Bioanal. Chem. 372 (3), 448–452.
- [3254] **Wahli T., Knuesel R., Bernet D., Segner H., Pugovkin D., Burkhardt-Holm P., Escher M., Schmidt-Posthaus H.** (2002): Proliferative Kidney Disease in Switzerland: Current State of Knowledge. J. Fish Dis. 25 (8), 491–500.
- [3255] **Kuehn K.A., Gessner M.O., Wetzel R.G. K.S.** (2000): Standing Litter Decomposition of the Emergent Macrophyte *Eriarthus giganteus* (Plumegrass). Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 3846–3847.
- [3256] **Malard F., Ward J.V. Robinson C.T.** (2000): An Expanded Perspective of the Hyporheic Zone. Verh. Internat. Verein. Limnol. 27, 431–437.
- [3257] **Ackermann G.E., Schwaiger J., Negele R.D., Fent K.** (2002): Effects of Long-Term Nonylphenol Exposure on Gonadal Development and Biomarkers of Estrogenicity in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 60 (3–4), 203–221.
- [3258] **Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P., Kolganova T.V., Zehnder A.J.B., Nozhevnikova A.N.** (2001): *Methanosarcina lacustris* Sp. Nov., a New Psychrotolerant Methanogenic Archaeon from Anoxic Lake Sediments. Syst. Appl. Microbiol. 24, (3), 362–367.
- [3259] **Bossard P. Roberts R.** (2001): Editorial. Aquat. Sci. 63, (3), 1–3.
- [3260] **Beardall J., Berman T., Heraud P., Kadiri M.O., Light B.R., Patterson G., Roberts S., Sulzberger B., Sahan E., Uehlinger U., Wood B.** (2001): A Comparison of Methods for Detection of Phosphate Limitation in Microalgae. Aquat. Sci. 63, (1), 107–121.
- [3261] **Bossard P., Gammeter S., Lehmann C., Schanz F., Bachofen R., Bürgi H.R., Steiner D., Zimmermann U.** (2001): Limnological Description of the Lakes Zurich, Lucerne, and Cadagno. Aquat. Sci. 63, (3), 225–249.
- [3262] **Callieri C., Morabito G., Huot Y., Neale P.J., Litchman E.** (2001): Photosynthetic Response of Pico- and Nanoplanktonic Algae to UVB, UVA and PAR in a High Mountain Lake. Aquat. Sci. 63, (3), 286–293.
- [3263] **Neale P.J., Bossard P., Huot Y.** (2001): Incident and *in situ* Irradiance in Lakes Cadagno and Lucerne: A Comparison of Methods and Models. Aquat. Sci. 63, (3), 250–264.
- [3264] **Neale P.J., Litchman E., Sobrino C., Callieri C., Morabito G., Montecino V., Huot Y., Bossard P., Lehmann C., Steiner D.** (2001): Quantifying the Response of Phytoplankton Photosynthesis to Ultraviolet Radiation: Biological Weighting Functions Versus *in situ* Measurements in Two Swiss Lakes. Aquat. Sci. 63, (3), 265–285.

- [3265] **Kohler J., Schmitt M., Krumbeck H., Kapfer M., Litchman E., Neale P.J.** (2001): Effects of UV on Carbon Assimilation of Phytoplankton in a Mixed Water Column. *Aquat. Sci.* 63, (3), 294–309.
- [3266] **Käch A.** (2002): Microbial Degradation of Quaternary Ammonium Alcohols – Hydrolysis Products of Esterquat Surfactants Used as Fabric Softeners. Diss. ETHZ No. 14 575, Zurich.
- [3267] **Bott M.** (2002): Iron Sulfides in Baldegensee During the Last 8000 Years: Formation Processes, Chemical Speciation and Mineralogical Constraints from EXAFS Spectroscopy. Diss. ETHZ No. 14 767, Zurich.
- [3268] **Füchslin H.P.** (2002): Microbial Competition and Mixed Substrate Utilisation in the Laboratory: Towards a Better Understanding of Microbial Behaviour in the Environment. Diss. ETHZ No. 14 641, Zurich.
- [3269] **Golet E.M.** (2002): Environmental Exposure Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage, River Water and Soil. Diss. ETHZ No. 14 690, Zurich.
- [3270] **Jaspers M.C.M.** (2002): Using Reporter Bacteria to Study the Bioavailability of Pollutants in Aqueous Environments. Diss. ETHZ No. 14 620, Zurich.
- [3271] **Bloesch J.** (2001): The International Association for Danube Research (IAD): Its Role in Danube Research in the Perspective of the Future. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27, 3939–3941.
- [3272] **Binder C., Bader H.-P., Scheidegger R., Baccini P.** (2001): Dynamic Models for Managing Durables Using a Stratified Approach: The Case of Tunja, Colombia. *Ecolog. Economics* 38 (2), 191–207.
- [3273] **Burkhardt-Holm P.** (2002): Proliferative Kidney Disease: Why is it of Interest for the Swiss Project «Fishnet»? *J. Fish Diseases* 25 (8), 441–442.
- [3274] **Burkhardt-Holm P.** (2002): Projekt «Fischnetz»: Die Spannung steigt. *Wasser, Boden, Luft, Umwelttechnik* 38 (3), 22–23.
- [3275] **Hartmann F., Bader H.-P., Scheidegger R., Baccini P.** (2001): Water Transport in a Bottom Ash Landfill from a Municipal Solid Waste («MSW») Incinerator. *J. Solid Waste Technol. & Management* 27 (2), 76–81.
- [3276] **Bader H.-P., Real M., Scheidegger R., Baccini P.** (2001): Grossmassstäbliche Einführung von Solarzellen: Dynamische Modellierung von Energie und Stoffflüssen. In: «Sustainability in the Information Society», Part 2: Methods/Workshop Papers, L.M. Hilty, P.W. Gilgen (Eds.), *Metro-polis Verlag, Marburg*, pp. 797–802.
- [3277] **Real M., Bader H.-P., Scheidegger R.** (2001): Minimizing the Environmental Impact of Large-scale Rural PV. *RenewableENERGYWorld* 4 (1), 41–54.
- [3278] **Reichert P., Schervish M., Small M.J.** (2002): An Efficient Sampling Technique for Bayesian Inference with Computationally Demanding Models. *Technometrics* 44 (4), 318–327.
- [3279] **Simoni S.F., Bosma T.N.P., Harms H., Zehnder A.J.B.** (2000): Bivalent Cations Increase Both the Subpopulation of Adhering Bacteria and their Adhesion Efficiency in Sand Columns. *Environ. Sci. Technol.* 34 (6), 1011–1017.
- [3280] **Lorke A., Umlauf L., Jonas T., Wüest A.** (2002): Dynamics of Turbulence in Low-speed Oscillating Bottom-boundary Layers of Stratified Basins. *Environ. Fluid Mechanics* 2, 291–313.
- [3281] **Holm P.** (2001): Das Projekt «Netzwerk Fischrückgang Schweiz»: Ziele, Chancen und Hindernisse. In: «Fortbildungskurs für Fischereiaufseher, 30. August bis 1. September 2000 in Jongny/Vevey (VD)». *Mitt. zur Fischerei Nr. 68, BUWAL, Bern*.
- [3282] **Kulbe T., Melles M., Verkulich S.R., Pushina Z.V.** (2001): East Antarctic Climate and Environmental Variability over the Last 9400 Years Inferred from Marine Sediments of the Bungee Oasis. *Arctic, Antarctic, & Alpine Res.* 33 (2), 223–230.
- [3283] **Müller B.** (2002): Biolandbau – eine Lösung für das Phosphorproblem der Mittellandseen? *Kommunalmagazin* 19 (10), 27–30.
- [3284] **Tockner K., Peter A.** (2002): Totholz spielt im Ökosystem der Gewässer eine wichtige Rolle. *Kommunalmagazin* 19 (10), 31.
- [3285] **Sarnthein M., Kennett J.P., Allen J.R.M., Beer J., Grootes P., Laj C., McManus J., Ramesh R.** (2002): Decadal-to-millennial-scale Climate Variability – Chronology and Mechanisms: Summary and Recommendations. *Quaternary Sci. Reviews* 21, (10) 1121–1128.
- [3286] **Thompson L.G., Mosley-Thompson E., Davis M.E., Henderson K.A., Brecher H.H., Zagorodnov V.S., Mashiotta T.A., Lin P.-N., Mikhailenko V.N., Hardy D.R., Beer J.** (2002): Kilimanjaro Ice Core Records: Evidence of Holocene Climate Change in Tropical Africa. *Science* 298 (5593), 589–593.
- [3287] **Köster W., Egli T.** (2002): Molekulare Methoden in der mikrobiellen Trinkwasseranalytik. *BIOspektrum* 8 (4), 368–372.
- [3288] **Köster W.** (2002): Krankheitserreger im Trinkwasser. *Oekoskop Nr. 2*, 14–18.
- [3289] **Kipfer R., Peeters F.** (2002): Using Transient Conservative and Environmental Tracers to Study Water Exchange in Lake Issyk-Kul. In: «Lake Issyk-Kul: Its Natural Environment», J. Klerkx, B. Imanackunov (Eds.), *NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences, Vol 13. Kluwer Academic Publ., Dordrecht NL*, pp 89–100.
- [3290] **Beer J., Muscheler R., Wagner G., Kubik P.W.** (2001): Past Climate Changes Derived from Isotope Measurements in Polar Ice Cores. *Proc. IAEA Internat. Conf. on «Study of Environmental Change using Isotope Techniques»*, Vienna 23.–27.4.2001, *C&S Papers Series 13/P*, 265–273.
- [3291] **Uehlinger U., Naegeli M., Fisher S.G.** (2002): A Heterotrophic Desert Stream? The Role of Sediment Stability. *Western North Amer. Naturalist* 62 (4), 466–473.
- [3292] **Uehlinger U., Tockner K., Burgherr P.** (2002): Vielfalt im Gebirgsbach – Resultate aus dem Val-Roseg-Projekt. *Hotspot* 6, 9.
- [3293] **Holm P.** (2002): Fische in Not – Detektivarbeit im Projekt Fischnetz. *Hotspot* 6, 11.
- [3294] **Friedl G.** (2002): Staudämme stören den Nährstoffkreislauf. *Hotspot* 6, 12.
- [3295] **Uehlinger U., Robinson C.** (2002): Auswirkungen künstlicher Hochwasser auf die Ökologie des Spöl. *Cratschla H. 2*, 20–21.
- [3296] **Karagounis I., Bundi U.** (2002): Ein nachhaltiges Gemeindewerk – was nun? *PUSCH – praktischer umweltschutz schweiz: Thema Umwelt H. 2, S. 4–6*.
- [3297] **Bundi U.** (2002): Gewässer integral aufwerten. *PUSCH – praktischer umweltschutz schweiz: Thema Umwelt H. 3, S. 2–3*.
- [3298] **Bundi U., Karagounis I.** (2002): Ziel: Nachhaltige Gemeindewerke. *PUSCH – praktischer umweltschutz schweiz: Thema Umwelt H. 2, S. 2–3*.
- [3299] **van der Nat D., Schmidt A.P., Tockner K., Edwards P.J., Ward J.V.** (2002): Inundation Dynamics in Braided Floodplains: Tagliamento River, Northeast Italy. *Ecosystems* 5, 636–647.
- [3300] **Tockner K., Stanford J.A.** (2002): Riverine Flood Plains: Present State and Future Trends. *Environ. Conservation* 29 (3), 308–330.
- [3301] **Baur K.I.** (2002): The Immobilisation of Heavy Metals and Metalloids in Cement-stabilised Waters: A Study Focusing on the Selenium Oxyanions SeO_3^{2-} and SeO_4^{2-} . Diss. ETHZ No. 14 840, Zurich.
- [3302] **Hoehn E.** (2002): Hydrogeological Issues of Riverbank Filtration – A Review. In: «Riverbank Filtration: Understanding Contaminant Biogeochemistry and Pathogen Removal», C. Ray (Ed.), *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht NL*, pp. 17–41.
- [3303] **Golet E.M., Strehler A., Alder A.C., Giger W.** (2002): Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-phase Extraction. *Anal. Chem.* 74 (21), 5455–5462.
- [3304] **Nesatyy V.J., Ross N.W.** (2002): Recovery of Intact Proteins from Silver Stained Gels. *Analyst* 127, (9) 1180–1187.
- [3305] **Aldrich A.P., Kistler D., Sigg L.** (2002): Speciation of Cu and Zn in Drainage Water from Agricultural Soils. *Environ. Sci. Technol.* 36 (22), 4824–4830.
- [3306] **Arcott D.B., Tockner K., Ward J.V.** (2001): Thermal Heterogeneity along a Braided Floodplain River (Tagliamento River, Northeastern Italy). *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 58 (12), 2359–2373.
- [3307] **Tockner K., Ward J.V., Edwards P.J., Kollmann J.** (2002): Riverine Landscapes: An Introduction. *Freshwater Biol.* 47 (4), 497–500.
- [3308] **Ward J.V., Tockner K., Arcott D.B., Claret C.** (2002): Riverine Landscape Diversity. *Freshwater Biol.* 47 (4), 517–539.
- [3309] **Schertenleib R.** (2002): Globale Wasserproblematik. *Umwelt Focus Nr. 4*, 45–49.
- [3310] **Tockner K., Malard F., Uehlinger U., Ward J.V.** (2002): Nutrients and Organic Matter in a Glacial River-floodplain System (Val Roseg, Switzerland). *Limnol. Oceanogr.* 47 (1), 266–277.
- [3311] **Volkland H.-P.** (2001): From Biocorrosion to Bioprotection a New Approach in Corrosion Control. by Hans-Peter Volkland. Diss. ETHZ No. 14 293, Zurich.

Bücher

Baumann P. (2002): Die Entwicklung des Fischnährtier-Bestandes in schweizerischen Fließgewässern zwischen 1980 und 2000. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 39 S. + Anhänge.

Baumgartner B., Belevi H. (2001): A systematic overview of urban agriculture in developing countries, Sandec Report, 34 p.

Bloesch J. (2001): «Auf zu neuen Ufern» – Forschungsaktivitäten der IAD. Jubiläumsschrift «25 Jahre Österreichisches Nationalkomitee der Internationalen Arbeitsgemeinschaft Donauforschung – Donauforschung neu». Schriftenreihe Bundesamt für Wasserwirtschaft, Bd. 12, Wien, S. 91–109. ISBN 3-901605-12-6.

Bohl E., Peter A., Kindler T., Haidvogel G. (2001): Fisch- und Krebsatlas Liechtensteins. Schriftenreihe Amt für Umweltschutz des Fürstentums Liechtenstein, Bd. 2, 83 S.

Bosma T.N.P., Harms H., Zehnder A.J.B. (2001): Biodegradation of xenobiotics in environment and technosphere. In: «The handbook of environmental chemistry, Vol. 2, Part K, Biodegradation and persistence», B. Beek (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 163–202. ISBN 3-540-62576-3.

Bratrich C., Truffer B. (2001): Green electricity certification for hydropower plants – concept, procedure, criteria. Green Power Publ. Issue 7, EAWAG Kastanienbaum 124 p. ISBN 3-905484-06-4.

Bratrich C., Truffer B. (2001): Ökostrom-Zertifizierung von Wasserkraftanlagen – Konzepte, Verfahren, Kriterien. – EAWAG, Forschungszentrum für Limnologie, Kastanienbaum. Ökostrom Publ. Bd. 6, EAWAG Dübendorf, 113 S. ISBN 3-905484-05-6.

Bucher R. (2002): Feinsedimente in schweizerischen Fließgewässern; Einfluss auf die Fischbestände. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 87 S.

Detli R., Markard J. (2001): Kennzeichnung von Elektrizität. Mögliches Vorgehen gemäss Art. 12 EMG. Forschungsprogramm Energiewirtschaftliche Grundlagen, Bundesamt für Energie, Bern, Januar, 80 S.

Escher M. (2002): Zwischenbericht «Projekt Schwarze Forellen», Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 7 S.

Frutiger A., Müller R. (2002): Der Rote Sumpfkrebs im Schübelweiher (Gemeinde Küsnacht ZH) – Auswertung der Massnahmen 1998–2001 und Erkenntnisse. EAWAG, Dübendorf, 26 S.

Gehrels H., Peters N.E., Hoehn E., Jensen K., Leibundgut C., Griffioen J., Webb B., Zaadnoor-

dijk W.J. (Eds.) (2001): Impact of Human Activity on Groundwater Dynamics. IAHS-Publ. 269. Internat. Assoc. of Hydrological Sciences, Wallingford, UK, 369 p. ISBN 1-901502-56-2.

Gujer W. (2002): Siedlungswasserwirtschaft, 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 421 S. ISBN 3-540-43404-6.

Klingel F. (2001): Nam Dinh Urban Development Project – Septage Management Study. Colenco Urban Development Internat., Nam Dinh City, Vietnam; EAWAG SANDEC, Dübendorf, 54 p.

Küttel S., Peter A., Wüest A. (2002): Temperaturpräferenzen und -limiten von Fischarten Schweizerischer Fließgewässer. Rhone-Thur-Projekt, EAWAG, Kastanienbaum, Publ. Nr. 1, 36 S.

Markard J. (2001): Fokusgruppen-Erhebung zur Kennzeichnung von Elektrizität – Informationsbedürfnisse von Konsumentinnen und Konsumenten. Bundesamt für Energie BFE, Ittigen, 40 S.

Markard J., Peter A., Truffer B. (2001): Ökostrom aus den Alpen – Die Wasserkraft im liberalisierten Markt. Alpenreport, Band 2, CIPRA, Schaan, 317–323.

Montangero A., Strauss M. (2001): Faecal Sludge Treatment. Lecture Notes, IHE Delft, February 8, 24 p.

Montangero A., Strauss M. (2001): Gestion des boues de vidange. Atelier de planification, CREPA, Ouagadougou, Burkina Faso, 37 p.

Moosmann L., Jorde K., Schneider M., Meier W., Peter A., Wüest A. (2002): Restwasserbemessung für Ökostrom mit Beispiel Brenno (Bleniotal, TI). Ökostrom Publ. Bd. 9. EAWAG, Kastanienbaum, 121 S. ISBN 3-905484-08-0.

Pianta R., Boller M. (2001): Bericht über quantitative und qualitative Eigenschaften von Karstquellwasser und dessen Aufbereitung zu Trinkwasser mittels Membrantechnologie. EAWAG, Dübendorf.

Reichert P., Borchard D., Henze M., Rauch W., Shanahan P., Somlyódy L., Vanrolleghem P. (Eds.) (2001): River water quality model No. 1. IWA Sci. & Technol. Report No. 12, London, 144 p. ISBN 1-900222-82-5.

Santiago S., Becker K., Chèvre N., Pardos M., Benninghoff C., Dumas M., Thybau E., Garrivier F. (2002): Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. S. Santiago (Ed.). Groupe de travail «Tests écotoxicologiques» de la Commission internat. pour la protection des eaux du Léman. SOLUVAL SANTIAGO, Couvet, 55 p.

Schager E., Peter A. (2002): Bachforellensömerlinge – Phase II. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 218 S.

Schälchli U. (2002): Innere Kolmation; Methoden zur Erkennung und Bewertung. Fischnetz-Publ., EAWAG, Dübendorf, 24 S.

Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (2002): Environmental Organic Chemistry, 2nd Edition. Wiley Interscience, Hoboken, USA, 1313 p. ISBN 0-471-35053-2.

Schweigert N., Eggen R.I.L., Escher B.I., Holm P., Behra R. (2001): Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz – Vorschläge zur Vorgehensweise im Modul Ökotoxikologie. EAWAG Dübendorf, 29 S.

Spreng D., Truffer B., Wüstenhagen R. (2001): Perspektiven für die Wasserkraftwerke in der Schweiz: Die Chancen des Ökostrommarktes. Bundesamt für Energie, Bern, 66 S.

Strehler A. (2002): Immissionsstudie: Beschreibung der Immissionsdatenbank. Fischnetz-Publ. EAWAG, Dübendorf, 20 S.

Truffer B., Bloesch J., Bratrich C., Gonser T., Markard J., Hoehn E., Peter A., Wehrli B., Wüest A. (2002): Ökostrom aus Wasserkraft – ein transdisziplinäres Forschungsprojekt. Schlussbericht (1997–2001). EAWAG Kastanienbaum, Ökostrompublikationen, Bd. 10 EAWAG, Kastanienbaum. 80 S. ISBN 3-905484-09-9.

Truffer B., Bruppacher S., Behringer J. (2002): Nachfrage nach Ökostrom: Ergebnisse einer Fokusgruppenerhebung in den Städten Bern, Zürich und Stuttgart. Ökostrom Publ. Bd. 8 EAWAG, Kastanienbaum, 103 S. ISBN 3-9054884-07-02.

Truffer B., Seiler B. (2001): Umweltzertifizierung von Kleinwasserkraftanlagen. Grundlagen und Konzepte für ein vereinfachtes Verfahren für kleine Wasserkraftwerke. ENET Publikation Nr. 210057. Programm Kleinwasserkraftwerke, Bundesamt für Energie, Bern, 130 S.

Ward J.V., Kondratieff B.C., Zuellig R.E. (2002): An Illustrated Guide to the Mountain Stream Insects of Colorado, 2nd Ed. University Press of Colorado. 195 p. ISBN 0870816535.

Wegelin M., Meierhofer R., del Rosario Torres X., Gremion B., Mäusezahl D., Hobbins M., Indergand-Echeverria S., Grimm B., Aristanti C. (2002): Solar Water Disinfection – a Guide for the Application of SODIS. SANDEC Report No. 06/02, EAWAG, Dübendorf/Switzerland. 80 p. ISBN 3-906484-24-6.

Abschluss Runder Tisch «Wasser»

Im Januar 2003 endete das Pilotprojekt «Runder Tisch – Science et Cité» zum Thema Wasser mit einem Schlussevent an der EAWAG und der Veröffentlichung des Schlussberichtes. Bürger und Forschende der EAWAG haben drei Jahre den Dialog erprobt, Wege zur gegenseitigen Verständigung gefunden und in einigen Grundsätzen festgehalten.

Am Podiumsgespräch zum Thema «Ist ein Dialog zwischen Gesellschaft und Wissenschaft nötig?» diskutierten sie mit Charles Kleiber, Staatssekretär für Wissenschaft und Forschung. Er vertrat als Präsident die Anliegen der Stiftung Science et Cité. EAWAG-Direktor Alexander Zehnder, der am Runden Tisch teilgenommen hatte, sowie der Cité-Vertreter Alfred Meier-Jucker berichteten über ihre Erfahrungen mit dem Dialog. Christine Burgener, Gemeindepräsidentin von Thalwil ZH, erläuterte, warum die Politik Interesse an derartigen Plattformen hat.

Der an der Schlussveranstaltung vorgestellte Schlussbericht listet einige Grundsätze auf, wie derartige Gesprächsplattformen zwischen Gesellschaft und Wissenschaft möglichst konstruktiv gestaltet werden können. Wichtig ist die Wahl der Diskussionsthemen, die eng

an die Arbeit der Forschungsinstitution geknüpft sein und sich durch einen Bezug zur Gesellschaft auszeichnen sollen. Überdies benötigt der Dialog Zeit, um das notwendige Klima gegenseitiger Toleranz und des Verständnisses gedeihen zu lassen.

An der EAWAG wurden erste Schritte zur Umsetzung des Dialogs bereits vollzogen: Die Bürger des «Runden Tisches» nahmen an der Planung der EAWAG für die Budgetperiode 2004 bis 2007 teil.

Der Schlussbericht ist abrufbar unter:

www.eawag.ch/news/science_et_cite/schlussbericht.pdf



Studenten in der Praxis: Fallstudie Thur

Moderne Umweltforschung lässt sich nicht in einem Trockenschwimmkurs lernen. Deshalb bearbeiteten Studenten der Umweltwissenschaften der ETH Zürich von Oktober 2002 bis Februar 2003 ein reales Umweltproblem und übten dabei die interdisziplinäre Teamarbeit. In der Fallstudie ging es um die Thur, die im Rahmen der

Thurkorrekturen in den letzten 140 Jahren in ein enges Korsett gezwängt wurde und seit September 2001 in einem gross angelegten Programm revitalisiert wird. Die dort gemachten Erfahrungen sind nicht nur für künftige Grossprojekte, sondern auch für die angehenden Fachleute wegweisend.

In sechs Arbeitsgruppen haben die Studierenden gemeinsam mit Forschern der ETH Zürich und der EAWAG die verschiedensten Aspekte rund um die Thurrevitalisierung analysiert und sich beispielsweise Gedanken darüber gemacht, wie der Erfolg von Revitalisierungsprojekten abgeschätzt werden kann, wie betroffene Grundeigentümer vom Nutzen der Revitalisierungsprojekte überzeugt werden können, wie man Ökologie und Hochwasserschutz in Einklang bringen kann und ob der Klimawandel die Hochwassersituation an der Thur stärker beeinflusst als eine veränderte Landnutzung.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen wurden im Februar bei einer Gewässerbegehung der Öffentlichkeit vorgestellt. Sie sollen in das Revitalisierungsprojekt einfließen, und deshalb prüft das Thurgauer Amt für Wasserversorgung die «Fallstudie Thur» derzeit genauer.

Weitere Informationen: www.eawag.ch/thur



Erste Diplomierte im PEAK-Kurs «Ökotoxikologie»

Ziel der Ökotoxikologie ist es, die schädlichen Wirkungen von Chemikalien zu erfassen und wo immer möglich zu verhindern. Fachleute in Industrie, Verwaltung und Wissenschaft sind verantwortlich für einen sorgsamen Umgang mit diesen Stoffen. Sie benötigen gutes Basiswissen in Ökotoxikologie und müssen den aktuellen Stand der Technik kennen. Der 1994 von der EAWAG und der EPF Lausanne ins Leben gerufene Ökotoxikologie-Kurs «coetox» (collaboration en écotoxicologie) dient der Aus- und Weiterbildung dieser Fachleute und will den Erfahrungsaustausch fördern. Am 2. Juni 2003 konnten die ersten Absolventinnen und Absolventen ihre Teilnahmebestätigungen in Empfang nehmen. Mit der Präsentation ihrer Studienarbeiten haben sie den Schlusspunkt auf ihre umfassende Weiterbildung gesetzt.

Der gesamte Kurs erstreckt sich über drei Jahre und umfasst 5 Module, die in deutscher oder französischer Sprache präsentiert werden. Im März 2004 startet ein neuer coetox-Kurs. Weitere Informationen: www.eawag.ch/events/peak

