



Wachstumsverhalten von *Thiothrix eikelboomii*  
und *Flectobacillus roseus* in der Kläranlage eines  
Lebensmittelherstellers

Entwicklung von Gensonden zur Detektion und Quantifizierung von  
*Flectobacillus roseus* im Belebtschlamm

Dissertation

zur Erlangung des Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereiches C Mathematik und Naturwissenschaften  
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von  
Jessica Schumacher  
aus Köln

Wuppertal  
Januar 2013

Für  
*Brunhilde und Gertrud*

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20130812-103539-0

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A46820130812-103539-0>]

Die vorliegende Dissertation entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. Walter Reineke und Priv.-Doz. Dr. Eberhard Schmidt in der Arbeitsgruppe der Chemischen Mikrobiologie im Zeitraum zwischen Juli 2009 und Juli 2012 an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachbereich C in einem Kooperationsprojekt mit a.p.f Aquasystems. Förderkennzeichen: KF2143501RH8

Gefördert vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Mein Dank gilt...

Prof. Dr. Walter Reineke und Priv.-Doz. Dr. Eberhard Schmidt für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit des freien Experimentierens, ihrer Diskussionsbereitschaft und ihrem stetigen Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit.

Dr. Christian Mandt für seine Diskussionsbereitschaft über Themengebiete aller Art.

Meinen Laborkolleginnen Petra Kolkhof und Natalie Fabis für die experimentelle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Dr. Helmut Uhlmann, Prof. Dr. Gregor Tyrchan und Uwe Uhlmann für die Kooperation und die zahlreichen Diskussion über Fadenbakterien, Klärschlamm und Kläranlagentechnik.

Sarah Hohagen und Mareike Schmidt für die experimentelle Unterstützung bei der Entwicklung der Sonde FleSH.

Meinen Freundinnen Sarah Peters und Simone Krause.

Meiner Großmutter Gertrud die mir beigebracht hat auch schwierigen Situationen immer etwas Positives abzugewinnen. Meiner Großmutter Brunhilde, die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr erlebt hat, für ihren felsenfesten Glauben in meine Fähigkeiten. Danke Omi!

Last but not least, meinen Eltern Gerhard und Anke und meiner Schwester Franziska.

## Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Anlass der Forschung.....	1
1.2	Aktueller Forschungsstand .....	2
1.2.1	Fadenbakterien im Belebtschlamm .....	2
1.2.2	Entwicklung von Methoden zum Nachweis von Bakterien in Umweltproben .....	3
1.2.3	Theoretische Grundlage zur <i>real-time</i> PCR und SYBR-Green-Assays .....	5
1.2.4	Quantifizierung von Fadenbakterien mittels quantitativer <i>real-time</i> -PCR .....	7
1.2.5	Theoretische Grundlage zur Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	7
1.2.6	Nachweis von Fadenbakterien durch FISH.....	9
1.3	Der Genus <i>Flectobacillus</i> .....	10
1.4	Der Genus <i>Thiothrix</i> .....	11
1.5	Zielsetzung des Forschungsprojektes .....	12
2	Material und Methoden .....	13
2.1	Chemikalien und Medienbestandteile.....	13
2.2	Enzyme .....	13
2.3	Antibiotika .....	14
2.4	Verschiedenes .....	14
2.5	Geräte.....	15
2.6	Software .....	16
2.7	Molekularbiologische Methoden .....	17
2.8	Verwendete Vektoren und Plasmide.....	17
2.9	Verwendete Primer für die Amplifizierung der 16S-rDNA .....	18
2.10	Verwendete Primer für die QPCR .....	18
2.11	Verwendete Oligonucleotidsonden für FISH.....	19
2.12	Verwendeter Mastermix für die quantitative PCR .....	19

2.13	Verwendete Filtersets für die Fluoreszenzmikroskopie.....	19
2.14	Verwendete Lösungen für FISH .....	20
2.14.1	Herstellung einer 4%ige Formaldehyd-Lösung (pH 7,2).....	23
2.15	Medien .....	23
2.15.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	24
2.15.2	Nährmedien zur Kultivierung von Klärschlammissolaten.....	25
2.15.3	Verdünnungsmedium .....	28
2.15.4	Versuchsmedien .....	29
2.16	Puffer und sonstige Lösungen.....	29
2.17	Färbelösungen .....	30
2.17.1	Gram-Färbung .....	30
2.17.2	Neisser-Färbung .....	30
2.17.3	PHB-Färbung.....	31
2.18	Trübungsmessung .....	31
2.19	Isolierung und Anzucht der Fadenbakterien .....	31
2.19.1	Vorbehandlung der Proben zur Isolierung der <i>Flectobacillus</i> -Isolate .....	31
2.19.2	Isolierung von <i>F. roseus</i> aus vorbehandelten Proben.....	32
2.19.3	Vorbereitung der Proben zur Isolierung der <i>Thiothrix</i> -Isolate .....	32
2.19.4	Isolierung von <i>T. eikelboomii</i> mittels Mikromanipulation.....	33
2.20	Isolation von DNA.....	33
2.20.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	33
2.20.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Klärschlammissolaten.....	34
2.20.3	Isolierung chromosomaler DNA aus Belebtschlamm .....	34
2.21	Amplifizierung der 16S-rDNA mit konventioneller PCR .....	35
2.22	<i>Real-time</i> PCR .....	36
2.22.1	Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration der Klärschlammproben .....	36
2.22.2	Vorversuche mit konventioneller PCR.....	36

2.22.3	Quantifizierung von PCR-Produkten mit der <i>real-time</i> PCR.....	37
2.22.4	Kalibrierung.....	38
2.22.5	Primertitration .....	38
2.23	Klonierung von PCR-Produkten.....	39
2.23.1	Ligation .....	39
2.23.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	39
2.24	Stammanzucht und Lagerung .....	39
2.25	DNA-Umsetzungen .....	40
2.25.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzym <i>Eco</i> RI.....	40
2.26	Agarosegelelektrophorese.....	40
2.27	Isolation von DNA aus Agarosegel .....	41
2.28	DNA-Sequenzierung.....	41
2.29	Phylogenetische Einordnung mittels BLAST-Analyse .....	41
2.30	FISH.....	41
2.30.1	Aufarbeitung der Belebtschlammproben für FISH .....	41
2.30.2	Fixierung .....	42
2.30.3	Hybridisierung.....	42
2.30.4	DAPI-Färbung (Gegenfärbung) .....	43
2.31	Färbemethoden.....	43
2.31.1	Trockenpräparat.....	43
2.31.2	Mikroskopeinstellung.....	43
2.31.3	Gramfärbung .....	43
2.31.4	Neisserfärbung.....	44
2.31.5	PHB-Färbung.....	44
2.32	Weitere durchgeführte Tests .....	44
2.32.1	API 20 NE .....	44
2.32.2	Katalase-Test.....	45

2.32.3	Oxidase-Test.....	45
2.32.4	Bestimmung der Temperaturoptima.....	45
2.32.5	Bestimmung des Wachstumsbereichs Temperatur.....	45
2.32.6	Hemmhoftest .....	46
3	Experimente und Ergebnisse .....	47
3.1	Isolierung von Fadenbakterien aus Belebtschlamm .....	47
3.1.1	Isolation von <i>F. roseus</i> aus Klärschlamm .....	47
3.1.2	Isolation von <i>T. eikelboomii</i> aus Belebtschlamm.....	47
3.2	Identifizierung der isolierten Fadenbakterien mittels 16S-rDNA-Analyse .....	47
3.2.1	Amplifizierung und Klonierung der 16S-rDNA aus fädigen Bakterien.....	48
3.2.2	Taxonomische Einordnung der Isolate mittels 16S-rDNA .....	49
3.2.3	Phylogenetische Einordnung der Isolate JSF15 und JSF17 .....	49
3.2.4	Phylogenetische Einordnung der Isolate AB23 und AB32.....	51
3.3	Charakterisierung der <i>F. roseus</i> -Isolate.....	53
3.3.1	Allgemeine Charakterisierung der <i>F. roseus</i> -Isolate.....	53
3.3.2	Biochemische Charakterisierung der Flectobacillen mit API 20NE.....	55
3.3.3	Untersuchung der Antibiotika-Resistenz der <i>F. roseus</i> -Isolate.....	58
3.4	Charakterisierung der <i>Thiothrix eikelboomii</i> -Isolate .....	60
3.4.1	Allgemeine Charakterisierung der <i>Thiothrix</i> -Isolate.....	60
3.4.2	Biochemische Charakterisierung der <i>Thiothrix</i> -Isolate mit API 20NE.....	62
3.5	Primerentwicklung für die quantitative PCR.....	64
3.5.1	Primerdesign für die Spezies <i>F. roseus</i> .....	64
3.5.2	Validierung des Primerpaares FlectobacQPCR .....	67
3.6	Test-PCR mit dem Primerpaar 021N/021rev.....	68
3.6.1	Test-PCR mit Universal-Primer Bacteria.....	69
3.7	Optimierung des <i>Flectobacillus</i> -Assays .....	70
3.7.1	Primertitration und Schmelzkurvenanalyse.....	70

3.8	Effizienz und Linearität der <i>real-time</i> PCR-Methode .....	73
3.9	Inter- und Intra-Assayabweichung.....	74
3.10	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>T. eikelboomii</i> und <i>F. roseus</i> im Belebtschlamm .....	75
3.10.1	Nachweis der Fadenbakterien mit konventioneller PCR .....	75
3.10.2	Korrelation der Beckenwerte an Produktionstagen und Wochenenden.....	76
3.10.3	Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (A).....	77
3.10.4	Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (B).....	79
3.10.5	Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (C).....	82
3.10.6	Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (D).....	86
3.10.7	Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (E) .....	89
3.10.8	Temperaturabhängigkeit der Fadenbakterien im Belebtschlamm.....	93
3.10.9	Zusammenfassung des Wachstumsverhaltens der Fadentypen.....	94
3.11	Entwicklung einer spezifischen FISH-Sonde für <i>F. roseus</i> .....	98
3.11.1	Allgemeine Anforderungen an FISH-Sonden .....	98
3.11.2	Sondendesign für die Klärschlammsolrate der Spezies <i>F. roseus</i> .....	98
3.11.3	Optimierung der Formamid-Konzentration.....	101
3.11.4	Spezifität der Sonde FleSH für verwandte Nichtzielorganismen.....	103
3.12	Anwendung der Sonde FleSH im Belebtschlamm .....	104
3.13	Mikroskopische Veränderung des Belebtschlammes in den Untersuchungszeiträumen (A) und (E).....	106
3.13.1	Mikroskopische Aufnahmen aus dem Versuchszeitraum (A).....	107
3.13.2	Mikroskopische Aufnahmen aus dem Versuchszeitraum (E) .....	108

4	Diskussion .....	110
4.1	Isolation und Kultivierung der <i>Flectobacillus</i> - und <i>Thiothrix</i> -Isolate .....	110
4.2	Charakterisierung der <i>Flectobacillus</i> - und <i>Thiothrix</i> -Isolate.....	111
4.2.1	Charakterisierung der <i>F. roseus</i> -Isolate .....	111
4.2.2	Charakterisierung der <i>T. eikelboomii</i> -Isolate .....	112
4.3	Entwicklung eines <i>real-time</i> PCR-Assay für den Nachweis von <i>F. roseus</i> in Belebtschlamm .....	113
4.3.1	Entwicklung und Validierung des Primersets FlectobacQPCR .....	113
4.3.2	Methodenoptimierung .....	114
4.4	Effizienz und Präzision des FlectobacQPCR-Assay .....	115
4.5	Nachweis von <i>T. eikelboomii</i> mittels <i>real-time</i> PCR.....	116
4.6	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>T. eikelboomii</i> und <i>F. roseus</i> im Belebtschlamm mittels <i>real-time</i> PCR .....	117
4.6.1	Wachstumsverhalten von <i>T. eikelboomii</i> im Belebtschlamm .....	118
4.6.2	Wachstumsverhalten von <i>F. roseus</i> im Belebtschlamm .....	119
4.6.3	Jahreszeitliche Veränderung der Fadenbakterienkonzentration.....	120
4.7	Die Entwicklung der <i>F. roseus</i> -spezifischen FISH-Sonde FleSH.....	121
4.7.1	FISH-Charakterisierung von <i>F. roseus</i> im Belebtschlamm .....	122
4.8	Vergleich der <i>real-time</i> PCR Ergebnisse mit den mikroskopischen Aufnahmen aus den Untersuchungszeiträumen (A-E).....	123
5	Ausblick.....	124
6	Literatur .....	125
7	Anhang .....	132
7.1	Probenübersicht aus den Messzeiträumen (A-E).....	132
7.2	Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (A) .....	134
7.3	Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (B).....	135
7.4	Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (C).....	136
7.5	Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (D) .....	137

7.6 Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (E)..... 138

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bidest.	bidestiliert
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
C	Cytosin
ca.	circa
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff der Cyanin-Farbstofffamilie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>F.</i>	<i>Flectobacillus</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin
Gal	Galactose
kBp	Kilobasenpaare
<i>M.</i>	<i>Microthrix</i>
mg	Milligramm
mL	Milliliter
min	Minuten
mmol	Millimol
mV	Millivolt
<i>N.</i>	<i>Nostocoida</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PHB	Polyhydroxybuttersäure
rpm	Umdrehungen pro Minuten
ppm	Parts per million
RNA	Ribonukleinsäure

rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
<i>T.</i>	<i>Thiothrix</i>
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
UV	Ultraviolette-Strahlung
V	Volt
vgl.	vergleiche
μL	Mikroliter
X-Gal	5'-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-1-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Die Anwesenheit von Fadenbakterien in Kläranlagen ist im Allgemeinen aufgrund ihrer Eigenschaft, Blähschlamm-Schwimmschlamm und Schaum ausbilden zu können, unerwünscht. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Kläranlagen wurden in der hier untersuchten Kläranlage eines Lebensmittelherstellers die Fadenbakterien nicht bekämpft, sondern als Teil der natürlichen Belebtschlammflora angesehen. Das Wachstumsverhalten von Fadenbakterien im Belebtschlamm ist weitestgehend unbekannt und nur wenige Fadenbakterienspezies konnten bisher isoliert und ihre biochemischen Merkmale bestimmt werden.

Um die Charakteristika und das Wachstumsverhalten der Fadenbakterien aus dieser Anlage zu untersuchen, wurden spezifische Nachweis- und Quantifizierungsmethoden entwickelt.

Hierfür wurden zunächst Fadenbakterien aus dem Belebtschlamm der Kläranlage isoliert. Die isolierten Fadenbakterien wurden durch 16S-rDNA-Analysen phylogenetisch charakterisiert und den Spezies *Flectobacillus roseus* und *Thiothrix eikelboomii* zugeordnet. *F. roseus* und *T. eikelboomii* wurden auf ihre biochemischen und physiologischen Merkmale untersucht und mit bereits publizierten Speziesvertretern verglichen.

Für die Quantifizierung von *F. roseus* und *T. eikelboomii* im Belebtschlamm wurde die *real-time* PCR als Quantifizierungsmethode ausgewählt. Die Quantifizierung von *T. eikelboomii* erfolgte hierbei modifiziert nach dem 021N-Assay von Vervaeren *et al.* (2005). Für den Nachweis und die Quantifizierung von *F. roseus* im Belebtschlamm wurden das Primerpaar FlectobacQPCR und das FlectobacQPCR-Assay entwickelt. Die Auswahl der Primerloki erfolgte auf Basis von Alignments der *F. roseus*-Isolate und weiteren *Flectobacillus*-Spezies. Die *real-time* PCR-Bedingungen wurden im Anschluss durch eine Primertitration experimentell optimiert. Die Präzision des FlectobacQPCR-Assay wurde in Untersuchungen durch die Inter- und Intra-Assay-Abweichung validiert.

Um ein besseres Verständnis für das Wachstumsverhalten der Fadenbakterien im Belebtschlamm zu entwickeln, wurden die Konzentrationen von *F. roseus* und

*T. eikelboomii* im Belebtschlamm mittels *real-time* PCR bestimmt und mit physikalischen Parametern des Belebungschlammes und dem Eintrag aus dem Kläranlagenzulauf korreliert. Im Vergleich der physikalischen Parameter mit der Konzentration von *F. roseus* zeigte sich, dass meistens, wenn der Sauerstoffgehalt und das Redoxpotential des Belebtschlammes abnahmen, die Konzentration an *F. roseus* zunahm. Für *T. eikelboomii* konnte im gesamten Untersuchungszeitraum eine signifikante Konzentrationsabnahme an den Wochenenden beobachtet werden.

Die Identifizierung und morphologische Charakterisierung von *F. roseus* im Belebtschlamm erfolgte mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Zu diesem Ziel wurde die FISH-Sonde FleSH entwickelt und die Hybridisierungsbedingungen experimentell optimiert. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden Zellen von *F. roseus* in Flocken der Belebtschlammproben sichtbar gemacht. Auf diese Weise wurde deutlich, dass die *F. roseus*-Filamente sich innerhalb und ausserhalb der Belebtschlammflocken befinden. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass *F. roseus* sich in diesem Belebtschlamm nicht pleiomorph verhält, sondern sich morphologisch einheitlich darstellt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Anlass der Forschung

Pflanzliches und tierisches Leben ist ohne Wasser undenkbar. In vielen Bereichen unseres täglichen Lebens wird sauberes und hygienisch unbedenkliches Wasser benötigt. Da es sich hierbei um eine unserer wichtigsten Ressourcen handelt, gewinnt neben der Wasseraufbereitung auch die Abwasserreinigung immer mehr an Bedeutung. Ein wichtiger Bestandteil der Abwasserreinigung in Kläranlagen ist hierbei das Belebtschlammverfahren in der biologischen Reinigungsstufe. Seit der Einführung der biologischen Klärung durch das Belebtschlammverfahren ist bekannt, dass Absatzschwierigkeiten durch das Auftreten von Blähschlamm und Schwimmschlamm mit dem massenhaften Auftreten von fadenförmigen Mikroorganismen zusammenhängen (Eikelboom, 1975). Zur Beschreibung des Phänomens wurde in diesem Zusammenhang bis in die 1960 Jahre von *Sphaerotilus* dem sog. Abwasserpilz gesprochen. Erst 1975 unterschied Eikelboom die verschiedenen im Belebtschlamm enthaltenen fadenförmigen Organismen und zeigte durch seine Forschung, dass für die Bildung von Blähschlamm und Schwimmschlamm nicht nur der eine sogenannte Abwasserpilz verantwortlich ist, sondern, dass etwa 30 verschiedene Fadenbakterien für die Entstehung dieser Phänomene von Bedeutung sind. Pilze spielen hierbei nur eine sehr untergeordnete Rolle (Lemmer *et al.*, 1996). Die Bildung von Schwimmschlamm, Blähschlamm und Schaum stellt für die Betreibung von Kläranlagen ein großes Problem dar, da es durch Schlammabtrieb zu sekundären Gewässerbelastungen kommt. Die resultierende Gewässerverschmutzung hat nicht nur ökologische Folgen, sondern führt für den Betreiber auch zu rechtlichen und somit durch eine erhöhte Abwasserabgabe auch zu finanziellen Konsequenzen. Trotz der durch Blähschlamm, Schwimmschlamm und Schaum hervorgerufenen Betriebsprobleme und der damit verbundenen Kosten wird auch heute noch von vielen Kläranlagenbetreibern erst nach Auftauchen von Betriebsstörungen eine bakteriologische Untersuchung von Klärschlamm durchgeführt und dient dann in den häufigsten Fällen nur zur kurzfristigen Behebung der Störungen. Erst in den letzten Jahren wurden gezielt Untersuchungen zur Bildung von Blähschlamm und Schwimmschlamm durchgeführt, allerdings weniger mit der Zielsetzung die komplexen Abläufe in den Biozöosen zu verstehen, als gezielte Bekämpfungsmaßnahmen gegen Fadenbakterien zu entwickeln (Kunst *et al.*, 2000). Einen anderen Ansatz verfolgte der Kläranlagenbetreiber in dessen Kooperation die

vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Die Fadenbakterien wurden hierbei nicht bekämpft oder unterdrückt, sondern als natürliche Begleitflora im Belebtschlamm angesehen, die evtl. einen Betrag zur Abwasserreinigung in biologischen Kläranlagen leistet.

## **1.2 Aktueller Forschungsstand**

### **1.2.1 Fadenbakterien im Belebtschlamm**

In der Natur gibt es zahlreiche Mikroorganismen, die sich durch fadenförmiges Wachstum auszeichnen, sei es durch das Aneinanderreihen einzelner Zellen (Fadenbakterien) oder durch die Ausbildung von Hyphen (Pilze). Bei der Mehrzahl der fadenförmigen Organismen im Belebtschlamm handelte es sich um Fadenbakterien. Das Auftreten von Fadenbakterien im Klärschlamm ist aus mikrobiologischer Sicht normal und in einem gewissen Rahmen erwünscht, da sie in der Belebtschlamm-Biozönose die Aufwuchsfläche und somit das „Rückgrat“ für die flockig aggregierenden Bakterien bilden. Probleme entstehen erst bei einer zu hohen Dominanz der Fadenorganismen, die zur Bildung von Blähschlamm, Schwimmschlamm und Schaum führt. Das Auftreten solcher Absetzprobleme ist charakterisiert durch die Ausbildung eines Fadengeflechts zwischen den Flocken, die den Eindick- und Absetzvorgang des Belebtschlammes im Nachklärbecken erheblich behindert. Folgende Bedingungen konnten mit einem massenhaften Wachstum von filamentösen Bakterien in Verbindung gebracht werden (Jenkins, 1992):

- spezielle Substrate
- niedriger Sauerstoffgehalt
- anoxische und anaerobe Zonen im Belebungsbecken
- Nährstoffmangel
- angefaultes Abwasser
- niedriger pH-Wert (< 6,5)

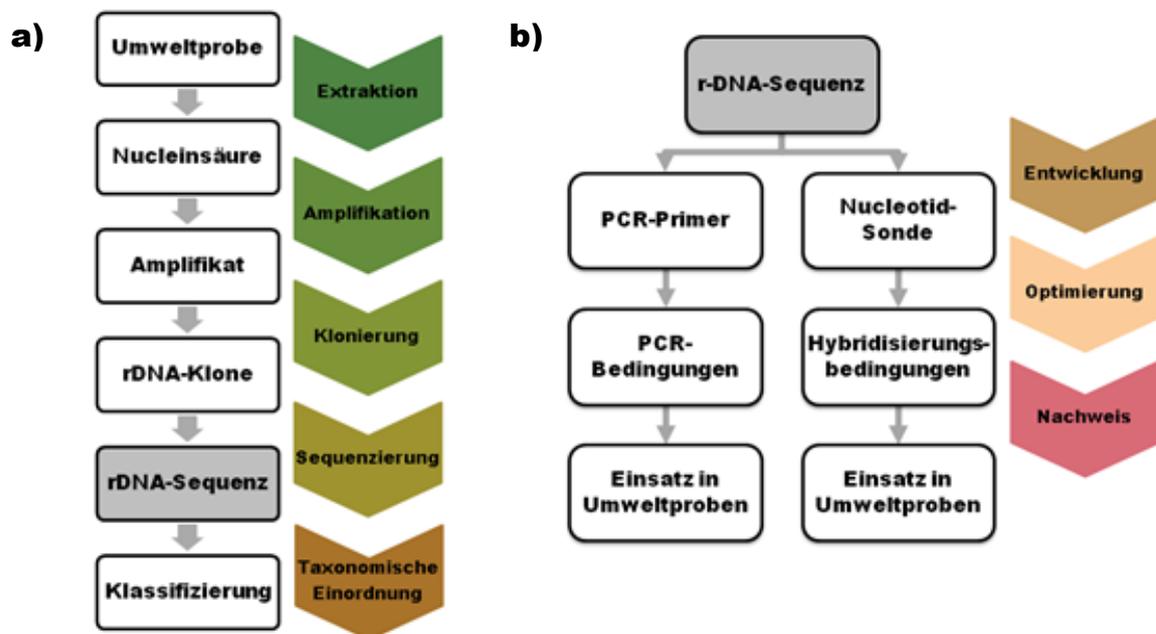
Die Bezeichnung Fadenbakterien beinhaltet Bakterien vieler unterschiedlicher Genera und Taxa, was eine allgemeingültige Aussage über mögliche Selektionsvorteile erschwert.

Ein Selektionsvorteil der Fadenbakterien aufgrund eines einzelnen bestimmten Parameters ist unwahrscheinlich (Kämpfer, 1997). Die große Variation an Nährstoffen und anderen Selektionsbedingungen in industriellen und kommunalen Kläranlagen bietet exzellente Bedingungen für die Entwicklung von filamentösen Bakterien. Eine Theorie für die Selektion bestimmter fädiger Bakterien ist ihre Fähigkeit, in relativ kurzer Zeit viel Substrat aufnehmen zu können, was ihnen in einem substratarmen Medium einen Wachstumsvorteil gegenüber den an die Belebtschlammflocken gebundenen Bakterien bietet (Nielsen *et al.*, 2003). Trotz zahlreicher Untersuchungen der vergangenen Jahre zu der Phylogenie (Aruga *et al.*, 2002; Chernousova *et al.*, 2009) und Physiologie (Rossetti *et al.*, 2003; Scheff *et al.*, 1984) fädiger Bakterien ist ihr Wachstumsverhalten im Belebtschlamm bisher immer noch weitestgehend unbekannt.

### **1.2.2 Entwicklung von Methoden zum Nachweis von Bakterien in Umweltproben**

Die mikrobiologische Charakterisierung von Bakterien war bis zur Entwicklung von Nachweismethoden auf genetischer Basis abhängig von einer erfolgreichen Kultivierung der Mikroorganismen. Traditionelle Kultivierungsmethoden sind in der Regel zeitaufwändig und nur für eine Minderheit von Bakterien anwendbar (Amann *et al.* 2001). Ein Beispiel für die Problematik bei der Kultivierung von Bakterien ist das von Staley und Konopka (1985) benannte Phänomen der „great plate anomaly“. Das Phänomen beschreibt die allgemein auftretende Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Lebendzellzahlbestimmungen und der Auszählung koloniebildender Einheiten auf Nährmedien. In den meisten Fällen ist ein Großteil der mikroskopisch sichtbaren Bakterienzellen lebensfähig aber nicht kultivierbar (Amann *et al.*, 1995). Eine spezifische Methode für die direkte Charakterisierung und Quantifizierung von Mikroorganismen in Umweltproben war daher lange Zeit eine „Wunschvorstellung“ vieler Mikrobiologen (Roszak und Colwell, 1987; Amann *et al.*, 1995). In den letzten Jahren haben sich die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) (Kanagawa *et al.*, 2000; Liu und Seviour, 2001) und die *real time* PCR (Vervaeren *et al.*, 2005; Kumari *et al.*, 2009) als Alternativen für die Kultivierung von Mikroorganismen etabliert. Die Grundlage beider Methoden ist die Kenntnis über die Zielsequenz der untersuchten Bakterien. Für die Entwicklung von Primer und Sonden wird häufig das 16S-rRNA-Gen als Housekeeping-Gen gewählt, weil

es über hoch konservierte und variable Bereiche verfügt und online große Datenbanken von 16S-rDNA-Sequenzen vorliegen. Die Analyse der 16S-rDNA-Sequenz ist im mikrobiologischen Bereich mittlerweile eine Standardmethode, um Bakterien zu klassifizieren und ermöglicht es Aussagen über die Systematik der Prokaryoten zu treffen, die über die Morphologie und Physiologie hinausgehen.



**Abbildung 1** Schemata zur Klassifizierung von Umweltisolaten und Entwicklung spezifischer Nucleotid-Sonden und Primer. Die Abbildung zeigt mögliche Vorgehensweisen für a) die Klassifizierung von Umweltisolaten auf Basis der Ribosomal-Genen und b) der Entwicklung spezifischer Nucleotid-Sonden für die Markierung bzw. Amplifizierung von Ribosomal-Genen.

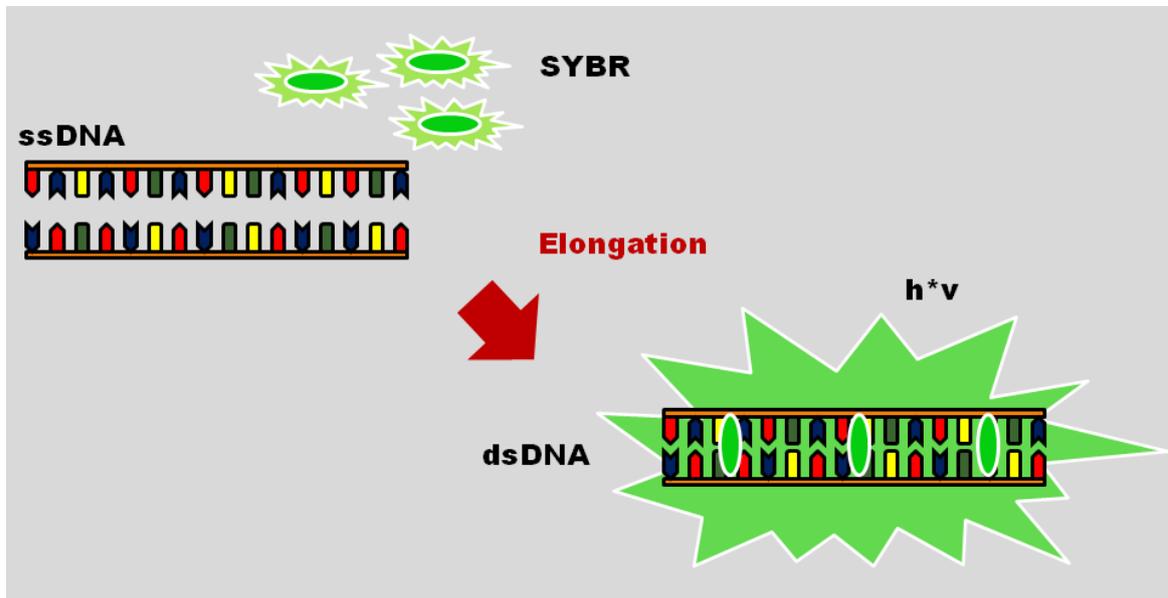
Die Abbildung 1a zeigt eine mögliche Vorgehensweise für die genetische Analyse von Umweltisolaten. Ausgehend von einer Umweltprobe werden die Bakterienstämme zunächst isoliert und im nächsten Schritt die genomische DNA der Bakterien extrahiert. Nach der Auswahl eines geeigneten Housekeeping-Gens wird mit Hilfe von Universalprimern das Gen in einer PCR amplifiziert und im Anschluss für die Anfertigung von Gendatenbanken oder Kalibrierstandards in einen Vektor kloniert. Nach erfolgreicher Amplifikation und Klonierung wird die DNA des Housekeeping-Gens sequenziert und mit Hilfe von Gen-Datenbanken den bisher bekannten Taxa und Genera zugeordnet. Wie in Abbildung 1b dargestellt ist der Ausgangspunkt für die Entwicklung von Nucleotidsonden und Primern jedweder Art die Kenntnis über die DNA-Sequenz des Zielorganismus. In der Entwicklungsphase wird mit Hilfe eines Alignments des Zielorganismus und verwandter Spezies ein geeigneter Lagebereich für die Nucleotidsonde bzw. Primer ausgewählt.

Bei der nachfolgenden Optimierung werden die idealen Reaktionsbedingungen für die jeweilige Methode ermittelt und Testreaktionen durchgeführt. Nach der erfolgreichen Entwicklung und Optimierung kann die Nucleotid-Sonde bzw. der Primer für den Nachweis des Zielorganismus in Umweltproben eingesetzt werden.

### **1.2.3 Theoretische Grundlage zur *real-time* PCR und SYBR-Green-Assays**

Die Entwicklung der modernen quantitativen PCR-Analytik begann in den 1990er Jahren des letzten Jahrtausends mit der von Higuchi *et al.* (1993) vorgestellten *real-time* PCR-Methode. Bis zum heutigen Tag hat sich die *real-time* PCR aufgrund ihrer einfachen Handhabbarkeit und der hohen Reproduzierbarkeit der Messergebnisse in den unterschiedlichsten wissenschaftlichen Disziplinen wie z.B. der Virologie und der Lebensmittelhygiene als die Methode für den quantitativen Nachweis von Mikroorganismen etabliert (Mackay *et al.*, 2002; Fach *et al.*, 2009). Grundlage einer jeden quantitativen PCR-Methode ist der Zusammenhang zwischen der Anfangskonzentration der Ziel-DNA und der Konzentration an amplifizierten PCR-Produkten während der exponentiellen Phase (Bustin, 2004-2009). In der *real-time* PCR wird dieser Zusammenhang durch den Durchbruchzyklus ( $C_T$ -Wert) dargestellt. Der Durchbruchzyklus beschreibt den Punkt, an dem die Fluoreszenz der gebildeten Amplifikate messbar über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Hierbei gilt, dass die Ausgangskonzentration der Ziel-DNA umgekehrt proportional zum Durchbruchzyklus ist. Das heißt je weniger PCR-Zyklen bis zum Durchbruchzyklus benötigt werden, desto höher ist die Anfangskonzentration der Ziel-DNA in der Probe (Bustin, 2004-2009). Die Detektion der Amplifikate erfolgt entweder spezifisch mit Hilfe von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Primern (TaqMan-Probes) oder unspezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green (Ginzinger, 2002). SYBR Green ist der zurzeit am häufigsten in der *real-time* PCR eingesetzte Farbstoff. Unspezifische Fluoreszenzfarbstoffe werden aufgrund der leichten Handhabbarkeit und ihrer Kosteneffizienz vor allem bei der Entwicklung neuer PCR-Primer und Assay verwendet. Ein Beispiel für den Einsatz von unspezifischen Farbstoffen in der quantitativen PCR sind SYBR Green-Assays. Bei SYBR Green-Assays handelt es sich um PCR-Methoden bei denen zur Detektion der PCR-Produkte der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet wird.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die Wirkungsweise des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green.



**Abbildung 2 Schematische Darstellung der Wirkungsweise des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green.** Zu Beginn der Reaktion liegt die DNA denaturiert in Form von Einzelsträngen vor und der freie SYBR-Green-Farbstoff zeigt eine schwache Eigenfluoreszenz (Hintergrundfluoreszenz). In der anschließenden Elongation verschmelzen die Einzelstränge zu einem Doppelstrang und SYBR-Green lagert sich an den Doppelstrang an.

Nach der Denaturierungsphase einer PCR liegt die DNA für die Anlagerung der Primer und der späteren Elongation in Form von Einzelsträngen (ssDNA) vor (Abbildung 2). Der SYBR Green-Farbstoff ist in dieser Phase ungebunden und weist nur eine schwache Eigenfluoreszenz (Hintergrundfluoreszenz) auf. Bei der nachfolgenden Elongation werden mit Hilfe der Polymerase DNA-Doppelstränge (dsDNA) gebildet, an die sich der SYBR Green-Farbstoff anlagert. Die Anlagerung von SYBR Green an einen DNA-Doppelstrang bewirkt einen Fluoreszenzanstieg um einen Faktor 1000 (Dragan *et al.*, 2012). Im Laufe der PCR-Reaktion wird die Ziel-DNA vervielfältigt, sodass sich proportional immer mehr SYBR Green an der DNA anlagern kann. Infolgedessen steigt die Fluoreszenz mit jedem Vervielfältigungszyklus an und kann ab dem Durchbruchzyklus detektiert werden. Aufgrund der unspezifischen Bindung von SYBR Green an doppelsträngiger DNA ist die Spezifität der Untersuchungsmethode bei dieser Nachweisform allein von der Selektivität der verwendeten Primer abhängig. Für die Absicherung der Quantifizierungsergebnisse wird daher im Anschluss an ein SYBR Green-Assay eine Schmelzpunktanalyse der gebildeten Amplifikate durchgeführt (Stratagene, 2004).

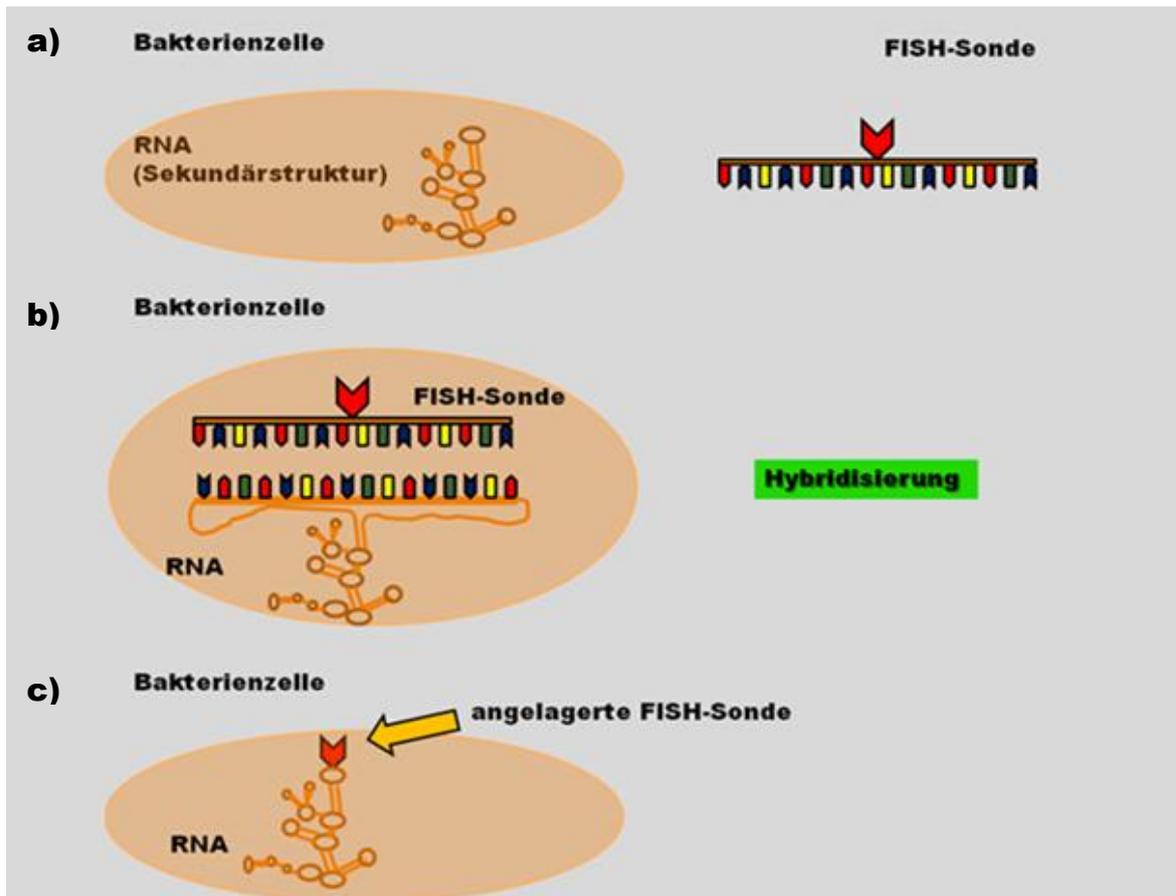
#### 1.2.4 Quantifizierung von Fadenbakterien mittels quantitativer *real-time*-PCR

Eine Quantifizierung der Gesamtbakterienpopulation und der Konzentration an spezifischen Fadenbakterien z.B. *T. eikelboomii* kann wie in der von Vervaeren *et al.* (2005) beschriebenen Methode indirekt über eine Quantifizierung der 16S-rRNA erfolgen. Weitere *real-time* PCR-Methoden für die Quantifizierung von Fadenbakterien sind bereits für *Microthrix. parvicella* (Kumari *et al.*, 2009) und für *Gordonia* spp. (Marrengane *et al.*, 2011) entwickelt worden. In den diversen Arbeiten wurde mit speziell entwickelten Primern und optimierten Assay-Bedingungen die Konzentration des jeweiligen Fadenbakteriums in Relation zur Gesamtbakterienpopulation bestimmt. Mit Hilfe der von Kumari (2009) entwickelten Methode konnten bereits erste Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten von *M. parvicella* in Belebtschlamm bei unterschiedlichen Temperaturen und Nährstoffangeboten gezogen werden. Die Untersuchungsergebnisse von Marrengane (2011) über *Gordonia* spp. lieferten ebenfalls Zusammenhänge über das Wachstum des Fadenbakteriums in seinem Lebensraum. *T. eikelboomii* zeigte in einer im Labormaßstab betriebenen Versuchskläranlage eine signifikante Korrelation mit dem im Experiment ermittelten Schlammvolumenindex und der zugeführten Substratmenge (Vervaeren *et al.*, 2005). Anhand der hier in aller Kürze vorgestellten Arbeiten ist ersichtlich, dass eine Kombination von der *real-time* PCR und einer Analyse der Umweltbedingungen im Habitat eine effiziente Möglichkeit bietet, das Wachstumsverhalten von Fadenbakterien zu untersuchen.

#### 1.2.5 Theoretische Grundlage zur Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz-*in situ*-hybridisierung (FISH) handelt es um eine molekularbiologische Methode, mit der durch fluoreszenzmarkierte Sonden spezifisch RNA-Sequenzabschnitte in Bakterien oder Zellen nachgewiesen werden können. Seit der ersten Anwendung fluoreszenzmarkierter Oligonucleotidsonden durch DeLong *et al.* (1989) hat sich die FISH als Standardmethode für die direkte Identifizierung von Bakterienzellen etabliert (Amann *et al.*, 2001). Zielmolekül sind hierbei meist molekulare Subeinheiten der Ribosomen, wie die 5S, 16S, and 23S rRNA. Sie treten in allen lebenden Organismen in hoher Kopienzahl auf und beinhalten sowohl variable wie auch hoch konservierte Sequenzabschnitte (Amann, 2001). Die aus der 16S-rDNA transkribierte 16S-rRNA spielt hierbei die größte Rolle (siehe Abschnitt 1.2.2). Für die Hybridisierung bzw.

Bindung an die Zielsequenz werden synthetisch hergestellte und mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonucleotidsonden mit einer Länge von 15-30 Basenpaaren verwendet (Amann, 2001). Die Markierung der Sonden mit den Farbstoffen wie z.B. Cy3 (Carbocyaninfarbstoff) oder FLUOS (5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester) kann sowohl am 3'- wie am 5'-Ende der Oligonucleotidsonde erfolgen.



**Abbildung 3 Schematische Darstellung einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.** a) Nach der Fixierung der Bakterienzellen ist die Membran für Hybridisierung permeabel geworden. Die Ziel-RNA liegt als Sekundärstruktur in der Bakterienzelle vor und die FISH-Sonde befindet sich noch ausserhalb der Zelle. b) Während der Hybridisierung wird die Sekundärstruktur der RNA denaturiert. Die FISH-Sonde dringt in die Bakterienzelle ein und bindet spezifisch an der Ziel-RNA. c) Nach einem Waschschriff kann die markierte Bakterienzelle mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden.

Damit die Zellen bzw. Bakterien für die Anlagerung der Oligonucleotidsonden permeabel sind, werden unterschiedliche Fixierungsmethoden für gram-positive und gram-negative Bakterien eingesetzt. Die RNA liegt nach der Fixierung noch in Form ihrer Sekundärstruktur vor (Abbildung 3a). Um die Anlagerung (Hybridisierung) einer Sonde an die Ziel-DNA zu ermöglichen, muss die DNA als Einzelstrang vorliegen (Abbildung 3b), dies wird durch das im Hybridisierungspuffer enthaltene Formamid und die

Hybridisierungstemperatur ermöglicht. Nach einer Stringenzwaschung zur Ablösung überschüssigen Sondenmaterials, wird das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 3c).

### **1.2.6 Nachweis von Fadenbakterien durch FISH**

Filamentöse Bakterien wurden lange Zeit lediglich nach morphologischen Kriterien klassifiziert (Kunst *et al.*, 2000). Die Problematik hierbei stellt sich in der Tatsache, dass sich die Morphologie von vielen Fadenbakterienspezies sehr stark ähnelt und einige der bisher bekannten Fadenbakterien sogar pleiomorphe Eigenschaften zeigen. Das heißt, dass es sich trotz morphologischer Übereinstimmung nicht zwangsläufig auch um phylogenetisch übereinstimmende Organismen handeln muss wie z.B. die Bakterien des 021N Types (Kanagawa *et al.*, 2000) oder die Bakterien der *N. limicola*-Gruppe (Liu und Seviour, 2001). Lichtmikroskopische Beobachtungen der Fadenbakterien alleine reichen also nicht aus, um eine Zuordnung der Fadenbakterien im Klärschlamm zu treffen. Um fadenförmige Organismen im Belebtschlamm voneinander unterscheiden zu können, werden alternativ zu den klassischen Färbemethoden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte FISH-Sonden eingesetzt (Kanagawa *et al.*, 2000; Kragelund, 2007; Liu und Seviour, 2001). Diese Sonden (FISH-Sonden) können, wenn die Zielsequenz bekannt ist, spezifisch für das jeweilige Fadenbakterium entwickelt werden (siehe Abschnitt 1.2.2). Der Einsatz von FISH ermöglicht die gezielte Markierung von Bakterien in komplexen Biozönosen (Paul, 2001) und erlaubt beispielsweise, so Rückschlüsse auf ihre Morphologie in unterschiedlichen Habitaten.

### 1.3 Der Genus *Flectobacillus*

Die bisher bekannten Vertreter des Genus *Flectobacillus* sind aus eutrophierten Teichen, Seen und aus Klärschlamm isoliert worden (Hwang und Cho, 2006; La Para *et al.*, 2006). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Bläh- und Schwimmschlamm in biologischen Reinigungsstufen und dem massenhaften Auftreten von *Flectobacillus* ist aufgrund fehlender Untersuchungen bisher unbekannt. Allerdings standen in der von van Veen (1973) angefertigten Untersuchung Vertreter der *Flexibacter*-Spezies im Verdacht einen Beitrag bei der Entstehung von Blähschlamm zu leisten. *Flexibacter* gehören wie *Flectobacillus* zur Familie der *Cytophagaceae*. Eine mögliche Beteiligung von *Flectobacillus* an der Bildung von Blähschlamm ist daher nicht auszuschließen. Ein Beispiel für einen möglichen Zusammenhang ist das in natürlichen Teichen und Seen beobachtete Phänomen der Fadenbakterien-Blüte, die mit einem massenhaften Wachstum der Fadenbakterien der Familie *Cytophagaceae* (*Flectobacillus*-Linie) einherging (Šimek *et al.*, 2001). Der erste Speziesvertreter des Genus *Flectobacillus* wurde von (Gromov, 1963) beschrieben und zunächst als *Microcycclus major* in den von Ørskov (1928) vorgeschlagenen Genus *Microcycclus* eingeordnet. Dort bildete der Fadentyp mit *Microcycclus aquaticus* und *Microcycclus flavus* eine Zusammenstellung heterogener Spezies auf Basis einzelner Stämme. Auf Grund der biochemischen Untersuchungen von Larkin (1977) wurde *Microcycclus major* später in den neuvorgeschlagenen Genus *Flectobacillus* eingeordnet und als Typspezies in *Flectobacillus major* umbenannt (Larkin *et al.*, 1977). Der Genus *Flectobacillus* wird aufgrund seiner phylogenetischen Merkmale der Familie *Cytophagaceae* und damit dem Phylum *Bacteroidetes* zugeordnet (Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology 2010). Bis heute ist eine Vielzahl weiterer *Flectobacillus*-Arten isoliert worden, von denen bisher nur *F. lacus* (Hwang und Cho, 2006) und *F. roseus* (Sheu *et al.*, 2009) näher charakterisiert wurden. Im Allgemeinen ist der Genus *Flectobacillus* morphologisch durch sein stäbchenförmiges und gekrümmtes Erscheinungsbild charakterisiert. Die Länge und Krümmung der Stäbchen ist hierbei stammspezifisch. Allen bisher bekannten Vertretern sind neben ihrer phylogenetischen Verwandtschaft ihre rosafarbene Pigmentierung und der Aufbau des Mureins gemeinsam.

## 1.4 Der Genus *Thiothrix*

Die Filamente des Genus *Thiothrix* treten in unterschiedlichen Habitaten wie natürlichen sulfidhaltigen Gewässern (Bland und Staley, 1978; Jones *et al.*, 1982) und Belebungsbecken von Kläranlagen (Brigmon *et al.*, 1994; Eikelboom, 1975; Kanagawa *et al.*, 2000) auf. Ein massenhaftes Auftreten der *Thiothrix*-Speziesgruppe Eikelboom Typ 021N in biologischen Kläranlagen führt zur Bildung von Blähschlamm und damit zu einer verschlechterten Sedimentation des Belebtschlammes in Nachklärbecken (Eikelboom und van Buijsen, 1981; Nielsen *et al.*, 1998). Die Bildung von Blähschlamm und die dadurch hervorgerufenen Betriebsprobleme in Kläranlagen machten die Speziesvertreter des Genus *Thiothrix* zu einem Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Trotz der jahrzehntelangen Erforschung der Bakteriengruppe ist aufgrund der schwierigen Kultivierung fadenförmiger Bakterien (Kanagawa *et al.*, 2000; Howarth *et al.*, 1999) nur wenig über die nutritiven und biochemischen Eigenschaften der *Thiothrix*-Spezies bekannt. Ein Forschungsansatz für ein besseres Verständnis des Wachstums der Fadenbakteriengruppe ist daher die *in situ* Analyse von *Thiothrix* im Belebtschlamm mit Hilfe der MAR-FISH (Nielsen *et al.*, 2003) und der *real-time* PCR (Vervaeren *et al.*, 2005). Der Genus *Thiothrix* gehört der Familie der *Thiotrichaceae* an und beinhaltet sieben Spezies (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005) die in die Eikelboom Typ 021N-Gruppe und die *T. nivea*-Gruppe unterteilt werden können (Chernousova *et al.*, 2009). Erstmals erwähnt und charakterisiert wurde der Genus *Thiothrix* von Winogradsky (1888). *Thiothrix* bedeutet übersetzt aus dem Griechischen „Schwefelhaar“ (Bergey's Manual 2005) und spiegelt die Charakteristika der Bakteriengruppe wie ihre filamentöse Morphologie und ihre Zugehörigkeit zur Gattung der Schwefelbakterien wieder. Die Speziesgruppenbezeichnung Eikelboom Typ 021N begründet sich auf der von Eikelboom (1975) eingeführten Typisierung blähschlammbildender Fadenbakterien auf Basis morphologischer Charakteristika. Hierbei wurden Mitglieder des Genus *Thiothrix* aufgrund abweichender morphologischer Kriterien zu den damals bekannten Speziesvertretern in den von Eikelboom vorgeschlagenen Typ 021N zusammengefasst. In einer späteren Analyse der 16S-rDNA konnte nachgewiesen werden, dass *Thiothrix* und die 021N-Bakterien eine monophyletische Gruppe bilden und damit eine phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Bakteriengruppen besteht (Howarth *et al.*, 1999).

## 1.5 Zielsetzung des Forschungsprojektes

Die hier vorliegende Arbeit beinhaltet die folgenden Aufgaben:

- Isolierung und Kultivierung von Fadenbakterien aus der Kläranlage (Belebungsbecken) eines regionalen Lebensmittelherstellers
- Genetische Einordnung der isolierten Fadenbakterien und der Vergleich mit bisher bekannten Arten
- Entwicklung von spezifischen *real-time* PCR-Primern bzw. FISH-Sonden für die isolierten Fadenbakterien
- Entwicklung eines *real-time* PCR-Assay und einer FISH-Methode für den Nachweis und die Quantifizierung der isolierten Fadenbakterien
- Anwendung der Assays und der FISH an Belebtschlammproben

## 2 Material und Methoden

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurden Chemikalien, Medienbestandteile und Enzymkits folgender Firmen verwendet.

### 2.1 Chemikalien und Medienbestandteile

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Medienbestandteile aufgeführt.

Tabelle 1 Chemikalien und Medienbestandteile

Chemikalien und Medienbestandteile	Hersteller
Agarose	Roche Diagnostics (Mannheim)
Chemikalien, p.a. Qualität	Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)
dNTP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Medienbestandteile	Difco (Detroit, USA), Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe)
Oligonucleotid-Sonden	Eurofins Scientific GmbH (Hamburg)
Primer	Eurofins Scientific GmbH (Hamburg)

### 2.2 Enzyme

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 2 Verwendete Enzyme

Enzyme	Firma
Biotherm Taq-Polymerase	Genecraft (Münster)
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

## 2.3 Antibiotika

In Tabelle 3 ist das in dieser Arbeit verwendete Antibiotikum aufgeführt.

**Tabelle 3** Verwendete Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Firma</b>
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotikaplättchen aufgeführt.

**Tabelle 4** Verwendete Antibiotika-Plättchen

<b>Antibiotika-Plättchen</b>	<b>Firma</b>
Kanamycin (30 µg)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Sulfamethoxazol (25 µg)	
Penicillin G (10 I.E.)	
Chloramphenicol (30 µg)	
Tetracyclin (30 µg)	
Gentamicin (10 µg)	

## 2.4 Verschiedenes

In Tabelle 5 ist das in dieser Arbeit verwendete Profilindexsystem aufgeführt.

**Tabelle 5** Profilindexsystem API 20 NE

API 20 NE	BioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen)
-----------	---

## 2.5 Geräte

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 6** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Gerätebezeichnung und Hersteller</b>
Rundschüttler	Gyrotory <sup>®</sup> Water Bath Shaker Model G76, New Brunswick Scientific, Edison, N.J. (USA)
Videodokumentationssystem	Videokamera der Firma Intas gekoppelt mit dem computer-gestützten Geldokumentationssystem PDQUEST 7.0.1. von Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Spectrophotometer	CARY 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer Varian (Darmstadt)
Thermocycler	Personal Cycler, Biometra, (Göttingen)
QPCR-System	Mx 3005P QPCR System Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Ultraschallsonde	UW 60 Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin)
Mikroskop	Olympus BH2 (Hamburg) Motic EF-UPR-III BA400/BA600
Photomikroskop	Motic BA 300, (Xiamen, China)
Umkehrmikroskop	Leitz Diavert (Wetzlar)
Digitalkamera	Canon PowerShot A520
Kugelmühle	TissueLyser LT Qiagen (Hilden)
Mikromesszelle	TrayCell <sup>™</sup> Hellma (Müllheim)

## 2.6 Software

Die Auswertung der angefallenen Rohdaten wurde mit Hilfe folgender Software durchgeführt:

- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Online-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- BioEdit (Biological sequences alignment editor) Ibis Biosciences Carlsbad, Ca (URL <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>)
- Canon Utilities ZoomBrowser EX. 5.6 version 5.6.0.27, Canon Information System Research Australia Pty. Ltd.
- Cary WinUV Kinetics Application 02.00(26), Varian GmbH, Darmstadt
- *daime* (Daims *et al.*, 2006)
- GelDoc 2000TM Gel Documentation System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Nicholas, K.B., Nicholas H.B.Jr., and Deerfield, D.W. 1997 GeneDoc (Analysis and Visualization of Genetic Variation (URL <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>)
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599
- MxPro 4.10 Software Mx3005P, Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
- Motic Images Plus version 2.0 Motic<sup>®</sup>
- *RNAfold WebServer*, Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna (URL <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)
- Quantity One 4.3.0(019), Bio-Rad Laboratories GmbH, München

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit eingesetzten Kits sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Quick Clean 5M Miniprep Kit	GenScript Corporation (Piscataway, USA)
Quick Clean DNA Gel Extraction Kit	GenScript Corporation (Piscataway, USA)
Wizard® DNA Clean-up System	Promega (USA)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

## 2.8 Verwendete Vektoren und Plasmide

In der nachfolgenden Tabelle 8 ist der in dieser Arbeit verwendete Vektor beschrieben.

Tabelle 8 Übersicht der verwendeten Vektoren und Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Genotyp/Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
pCR® 2.1-TOPO®	<i>lacZ'</i> , <i>ori</i> pUC	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

## 2.9 Verwendete Primer für die Amplifizierung der 16S-rDNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die Amplifizierung der 16S-rDNA sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9 Verwendete Primer für die Amplifizierung des 16S-rDNA-Gens

Primer	Nukleotidsequenz	Herkunft
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Edwards <i>et al.</i> , 1989
16SE	CA(GT)AAAGGAGGTGATCC	Schmidt, pers. Mitteilung
27forward	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	Blackall, 1994
1492reverse	TACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT	Blackall, 1994
8FPL-NdeI	GCCATATGGCGGCCGCTGCAGAGTT TGATCCTGGCT	Mandt, pers. Mitteilung
1492RPL_BamHI	GGGGATCCCGGCCGCCCGGGTTAC CTTGTTACGACTT	Mandt, pers. Mitteilung

## 2.10 Verwendete Primer für die QPCR

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die QPCR sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10 Primer für die quantitative PCR

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz	Herkunft
FlectobacQPCRfor	AGGGTAGCTACCAGGCAACTGG	Referenz diese Arbeit
FlectobacQPCRrev	ATCCCGTTCTTGACGCGGAAC	Referenz diese Arbeit
21Nf	CGTAGGCGGCTCTTTAAGTC(GA)GAT	Vervaeren <i>et al.</i> , 2005
21Nr	CCGACGGCTAGTTGACATCGTTTA	Vervaeren <i>et al.</i> , 2005
S-D-Bact-0509-S-17	ACTACGTGCCAGCAGCC	Rupf <i>et al.</i> , 1999
S-D-Bact-0784-A-22	GGACTACCAGGGTATCTAATCC	Rupf <i>et al.</i> , 1999

## 2.11 Verwendete Oligonucleotidsonden für FISH

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotidsonden für FISH sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11** Verwendete Oligonucleotidsonden

Oligonukleotidsonde	Sonden-Sequenz	Herkunft
FleSH	CAGTATCGTATTAGTAAC	Hohagen, 2010
G2M	GCACCACCGACCCCTTAG	Kanagawa <i>et al.</i> , 2000

## 2.12 Verwendeter Mastermix für die quantitative PCR

Für die Untersuchung mittels der QPCR wurde der Brilliant® II SYBR® Green QPCR Low ROX Mastermix nach Angaben des Herstellers verwendet.

## 2.13 Verwendete Filtersets für die Fluoreszenzmikroskopie

In Tabelle 12 sind die bei der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten Filtersets aufgeführt.

**Tabelle 12** Verwendete Filtersets für Motic EF-UPR-III BA400/BA600

Filter	Emission	Dichroitischer Spiegel	Absorption
FITC	BP 535/40m	505DCLP	D480/30x
TRITC	BP 605/55m	565DCLP	D540/25x
DAPI	BP 460/50m	400DCLP	D350/50x

LP steht für Langpassfilter und BP für Bandpassfilter.

## 2.14 Verwendete Lösungen für FISH

Zur FISH der Belebtschlammpräparate wurden die von Schade und Lemmer (2002) und Schade (2006) beschriebenen Lösungen benutzt. Alle eingesetzten Puffer und Lösungen wurden vor der Anwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Sartorius Membranfilter, 0,2 µm Porendurchmesser) und der autoklavierten Lösung oder Puffer nach dem Abkühlen zugesetzt.

### 1x PBS (pH 7,2)

NaCl	7,6	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	1,78	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,38	g
bidest. H <sub>2</sub> O	1000	mL

### 3x PBS (pH 7,2)

NaCl	22,8	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	5,3	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4,1	g
bidest. H <sub>2</sub> O	1000	mL

### 5 M NaCl-Lösung

NaCl	292	g
bidest. H <sub>2</sub> O	1000	mL

### 1 M Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)-Puffer (pH 8,0)

Tris/HCl	158	g
bidest. H <sub>2</sub> O	1000	mL

### 10 %ige SDS (Natriumdodecylsulfat)-Lösung

SDS	100	g
bidest. H <sub>2</sub> O	1000	mL

**0,5 M EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure)-Lösung (pH 8,0)**

EDTA (Titriplex III)	186	g
bidest. H <sub>2</sub> O	1000	mL

**TE-Puffer (pH 8,0)**

EDTA (Titriplex III)	0,37	g
Tris/HCl	1,6	g
bidest. H <sub>2</sub> O	1000	mL

**Hybridisierungspuffer**

1 M Tris/HCl-Lösung	20	μL
5 M NaCl-Lösung	180	μL
10 %ige SDS-Lösung	1	μL
Formamid	0-500*	μL
bidest. H <sub>2</sub> O	300-800*	mL

\* Je nach benötigter Stringenz wurden unterschiedlichen Mengen an Formamid und Wasser zugegeben.

**Waschpuffer**

1 M Tris/HCl-Lösung	1000	μL
5 M NaCl-Lösung	180-9000**	μL
10 %ige SDS-Lösung	50	μL
0,5 M EDTA-Lösung	500***	μL
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 50	mL

\*\* Die NaCl-Konzentration im Waschpuffer wurde entsprechend der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer eingestellt. \*\*\* Die EDTA wurde bei geringen Konzentrationen von NaCl ( $\leq 0,22$  mol) direkt im Waschpuffer zugegeben.

Die zur Herstellung der Hybridisierungs- und Waschpuffer verwendeten Formamid-, NaCl- und EDTA-Konzentrationen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13 Konzentration an Formamid, NaCl und EDTA im Hybridisierungs- und Waschpuffer**

Formamid [%]	Hybridisierungspuffer		Waschpuffer		EDTA [ $\mu$ L]
	Formamid [ $\mu$ L]	bidest. H <sub>2</sub> O [ $\mu$ L]	5 M NaCl [ $\mu$ L]	NaCl [Mol] (Endkonzentration)	
0	0	800	9000	0,90	0
5	50	750	6300	0,63	0
10	100	700	4500	0,45	0
15	150	650	3180	0,32	0
20	200	600	2150	0,22	500
25	250	550	1490	0,15	500
30	300	500	1020	0,10	500
35	350	450	700	0,07	500
40	400	400	460	0,05	500
45	450	350	300	0,03	500
50	500	300	180	0,02	500

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung von Hybridisierungs- und Waschpuffern bei unterschiedlichen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer.

Final wurden die folgenden Formamid-Konzentrationen für die FISH der Klärschlammproben verwendet (Tabelle 14).

**Tabelle 14 Formamid-Konzentration**

Sondenbezeichnung	Zielorganismus	Formamidkonzentration [%]
FleSH	<i>Flectobacillus roseus</i>	15
G2M	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	35

Die für die Sonde G2M verwendete Formamid-Konzentration stammt aus der Arbeit von Kanagawa *et al.* (2000). Die optimierte Formamid-Konzentration für die Sonde FleSH wurde im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Hohagen (2010) bestimmt.

Für die Gegenfärbung der FISH-Präparate wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI verwendet. Die DAPI-Stammlösung war wie folgt konzentriert.

**DAPI- Stammlösung (100 µg/mL)**

DAPI	1	mg
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 10	mL

Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Gegenfärbung der Präparate wurde die DAPI-Stammlösung auf eine Konzentration von 1 µg/mL verdünnt.

**2.14.1 Herstellung einer 4%ige Formaldehyd-Lösung (pH 7,2)**

Für die Herstellung der Formaldehyd-Lösung wurden 30 mL bidest. H<sub>2</sub>O auf 60 °C erhitzt und mit 2 g Paraformaldehyd versetzt. Die Alkalisierung der Lösung erfolgte durch Zugabe von 1 N NaOH. Im Anschluss wurden 16,6 mL von 3 x PBS-Puffer zugegeben und die Lösung erwärmt bis der Paraformaldehyd weitestgehend in Lösung gegangen war. Die endgültige Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde mit 1 N HCl durchgeführt.

**2.15 Medien**

Zur Kultivierung der verwendeten Organismen wurden unterschiedliche Medien benutzt. Die Stämme wurden sowohl in flüssigen Nährlösungen als auch auf festen Medien kultiviert. Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Anwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Sartorius Membranfilter, 0,2 µm Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Abkühlen zugesetzt. Glasgeräte wurden 4 h bei 180°C hitzesterilisiert. Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozente (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozente (v/v).

### 2.15.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden die folgenden Medien verwendet.

#### SOB-Medium (Hanahan, 1983)

Bacto-Trypton	20	g
Bacto-Yeast	50	g
NaCl	0,58	g
KCl	0,19	g
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	2,03	g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	46	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL
pH 7,2		

#### SOC-Medium (Hanahan, 1983)

SOB-Medium

D-Glucose 20 mM

#### LB-Medium (modifiziert nach Miller *et al.*, 1972)

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL

#### LB-Agar ( modifiziert nach Miller *et al.*, 1972)

LB-Medium	1000	mL
Agar	15	g

#### LB-Ampicillin-X-Gal-Agar

LB-Medium	1000	mL
Agar	15	g
X-Gal	40	µg/mL
Ampicillin	100	ug/mL

## 2.15.2 Nährmedien zur Kultivierung von Klärschlammissolaten

### 2.15.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von *Flectobacillus* sp.

#### R2A-Medium (Reasoner und Geldreich, 1985)

Hefe-Extrakt	0,5	g
Proteose Pepton	0,5	g
Casamino Acids	0,5	g
Glucose	0,5	g
lösliche Stärke	0,5	g
Natriumpyruvat	0,3	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	g
MgSO <sub>4</sub>	0,05	g
Bacto Agar	15	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL
pH 7,2		

#### TYGA (Vaara, 1979)

Trypton	5	g
Yeast-Extrakt	2,5	g
Glucose	1	g
Bacto Agar	15	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL
pH 7,0		

#### *Ancylobacter- Spirosoma*-Medium (Medium-Nr. 7, DSMZ)

Glucose	1	g
Pepton	1	g
Hefe-Extrakt	1	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL
pH 7,0		

Das R2A- und TYGA-Medium wurde zur Anzucht der Isolate JSF15 und JSF17 als festes Nährmedium und flüssiges Medium ohne Agar verwendet. Das *Ancylobacter- Spirosoma*-Medium diente zur Anzucht von *F. major*.

**2.15.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *Thiothrix* sp.****EGGC (Medium-Nr. 1191, DSMZ)**

Na-Acetat	0,3	g
Casamino Acids	0,3	g
Glucose	0,6	g
Salt solution	10	mL
Bacto Agar	15	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL

**Vitamin-Solution**

Thiamin-HCl·2H <sub>2</sub> O	50	mg
Riboflavin	10	mg
Cyanocobalamin	1	mg
Biotin	0,1	mg
Ca-Pantothenat	50	mg
Folsäure	0,2	mg
Nicotinsäure	50	mg
Pyridoxin-HCl	50	mg
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 100	mL

**Phosphate-Solution**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,48	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,308	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 20	mL

pH 7,2

**Salt-Solution**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0	g
KCl	0,5	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2	g
$\text{CaCO}_3$	0,2	g
$\text{Fe}_3\text{Cl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005	g
bidest. $\text{H}_2\text{O}$	ad. 1000	mL

Nach dem Autoklavieren wurde dem EGGC-Medium 5 mL Vitamin-Solution und 2 mL Phosphat-Solution zugegeben. Das Medium wurde zur Anzucht der Isolate AB23 und AB32 als festes Nährmedium und flüssiges Medium ohne Agar verwendet.

**I-Medium (modifiziert nach van Veen, 1973)**

Glucose	0,15	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5	g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,01	g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,05	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05	g
KCl	0,05	g
$\text{CaCO}_3$	0,1	g
Agar	12	g
bidest. $\text{H}_2\text{O}$	1000	mL
pH	7,2	

**Vitamin-Lösung**

Thiamin-HCl·2H <sub>2</sub> O	2	g
Cyanocobalamin	0,1	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 100	mL

Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 50 µL Vitamin-Lösung zugefügt. Das Medium wurde zur Anzucht der Isolate AB23 und AB32 als festes Nährmedium und flüssiges Medium ohne Agar verwendet.

### 2.15.3 Verdünnungsmedium

#### MSV-Medium (Williams und Unz, 1985b)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,11 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,085 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
EDTA	0,003 g
bidest. $\text{H}_2\text{O}$	ad. 1000 mL
pH 7,2	

#### Vitaminlösung (modifiziert nach Eikelboom, 1975)

Thiamin	100	$\mu\text{g}$
Riboflavin	100	$\mu\text{g}$
Cyanocobalamin	5	$\mu\text{g}$
Biotin	5	$\mu\text{g}$
Pantothenat	100	$\mu\text{g}$
Folsäure	5	$\mu\text{g}$
Nicotinsäure	100	$\mu\text{g}$
Pyridoxin	100	$\mu\text{g}$
bidest. $\text{H}_2\text{O}$	ad. 1000 mL	

Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 1 mL sterilfiltrierte Vitamin-Lösung zugegeben.

### 2.15.4 Versuchsmedien

#### Stärke-Agar

Pepton	8	g
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,1	g
NaCl	5	g
Stärke	10	g
Agar	15	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL

#### Tween 80-Medium

##### *Basalmedium*

Pepton	10	g
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,1	g
NaCl	5	g
Agar	9	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 1000	mL
pH	7,4	

Das Basalmedium und Tween 80 wurden 20 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlen des Basalmediums wurde Tween 80 bis zur einer Endkonzentration von 1% pro Platte zugegeben.

### 2.16 Puffer und sonstige Lösungen

#### TE-Puffer

Tris/HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

#### 5x DNA Auftragspuffer

TE-Puffer pH8	100 mM
Orange G	0,15%
Xylene Cyanol FF	0,03%
Glycerol	60%

**50x TAE-Puffer**

Tris/HCl	20	mM
Essigsäure	57,1	mL/L
EDTA (0.5 M, pH 8,0)		
pH 8,3-8,5		

**2.17 Färbelösungen****2.17.1 Gram-Färbung****Carbolgentianaviolettlösung**

Carbolgentianaviolett 10%	10	mL
Phenollösung 5%	90	mL

**Lugol'sche Lösung**

Kaliumiodid	3	g
Iod	1	g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 300	mL

**Safranin-Lösung**

Safranin	0,25	g
Ethanol (95%)	10	mL
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 100	mL

**2.17.2 Neisser-Färbung****Methylenblau-Lösung**

Methylenblau	10	g
Eisessig	5	mL
Ethanol	5	mL
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 100	mL

**Kristallviolett-Lösung**

Kristallviolett 10% (ethanolisch)	3,3	mL
Ethanol (96%)	6,7	mL
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 100	mL

**Chrysoidin-Lösung**

Chrysoidin Y 1% (wässrig)	33,3	mL
bidest. H <sub>2</sub> O	ad. 100	mL

**2.17.3 PHB-Färbung**

Sudanschwarz B 0,3 % (ethanolisch)

**2.18 Trübungsmessung**

Die Messung der optischen Dichte der Bakterienkulturen erfolgte mit dem Cary50 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>). Bei einer Extinktion über 0,3 wurde die Bakteriensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) verdünnt und die wahre optische Dichte rechnerisch bestimmt. Der Nullabgleich erfolgte mit physiologischer Kochsalzlösung.

**2.19 Isolierung und Anzucht der Fadenbakterien**

Zur Isolation der Fadenbakterien wurden von den Kläranlagenmitarbeitern jeweils 200 mL Klärschlamm aus dem Belebtschlammbecken einer gewerblichen Kläranlage (Remscheid) entnommen. Die Folgenden Abschnitte beschreiben die Aufarbeitung des Schlammes und die Isolation der einzelnen Fadentypen.

**2.19.1 Vorbehandlung der Proben zur Isolierung der *Flectobacillus*-Isolate**

Die Vorbehandlung der Proben erfolgte modifiziert nach Williams und Unz (1985b) mit jeweils 2x 5mL der Belebtschlammproben. Zur Homogenisierung wurden die Proben gevortext und mit MSV-Medium verdünnt. Im Anschluss wurde zur Zerkleinerung der Schlammflocken 30 Sekunden mit einer Ultraschallsonde bei 20W beschallt.

Zur Entfernung freischwimmender Bakterien aus den Proben wurde 3x je 5 Minuten bei 1900g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet jeweils in 20 mL MSV-Lösung resuspendiert. Zur Trennung der Belebtschlammflocken von den Filamenten der fädigen Bakterien, wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 300g durchgeführt. Dabei sedimentieren die Schlammflocken während die Filamente in Lösung bleiben. Der Überstand wurde entnommen und mikroskopisch auf die Anwesenheit fädiger Bakterien untersucht.

### **2.19.2 Isolierung von *F. roseus* aus vorbehandelten Proben**

Der im letzten Zentrifugationsschritt der Probenvorbehandlung gebildete Überstand wurde in den Verdünnungen  $10^{-1}$  -  $10^{-5}$  auf R2A-Medium, R2A-Medium (1:10) und TYGA-Medium ausplattiert und drei Tage bei 25°C inkubiert. Zur Differenzierung der fädigen und nichtfädigen Bakterien wurden die Kolonien mikroskopisch untersucht und von den Bakterien Reinkulturen angelegt.

### **2.19.3 Vorbereitung der Proben zur Isolierung der *Thiothrix*-Isolate**

Die Isolierung der *Thiothrix*-Isolate AB23 und AB32 und die Entwicklung der Probenvorbehandlungen ABZ und ABF erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von (Bremshey, 2010).

#### **2.19.3.1 Probenvorbehandlung ABZ**

Die Probenvorbehandlung nach der Methode ABZ erfolgte durch mehrmaliges Auswaschen nichtfädiger Begleitflora. Dafür wurden 50 mL einer Belebtschlammprobe in ein steriles Reaktionsröhrchen überführt und 10 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 mL MSV-Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Male wiederholt, wobei bei der letzten Wiederholung zur Anreicherung der Fadenbakterien nur noch in 10 mL MSV-Medium resuspendiert wurde.

### **2.19.3.2 Probenvorbehandlung ABF**

Für die Probenvorbehandlung nach der Methode ABF wurde der Überstand einer Klärschlammprobe über ein ausgestanztes und steriles Gaze-Filter (Durchmesser 3 cm, Porengröße 75 µm) filtriert. Dazu wurde das Gaze-Filter auf einen sterilen Rundfilter gelegt und die anfallende Flüssigkeit über ein saugfähiges Papier abgeführt. Für die Filtration wurden 3 mL Klärschlammüberstand mit einer Pipette auf den Gaze-Filter aufgetropft und anschließend tropfenweise mit 3 mL MSV-Medium gewaschen. Im Anschluss an die Filtration wurde der Gaze-Filter mit einer Pinzette vom Rundfilter abgelöst und in ein mit 1 mL MSV-Medium versetztes Reaktionsröhrchen überführt. Die Resuspension des Rückstands erfolgte durch kräftiges Durchmischen. Das so entstandene Resuspensat wurde zur Mikromanipulation der *Thiothrix*-Isolate AB23 und AB32 verwendet.

### **2.19.4 Isolierung von *T. eikelboomii* mittels Mikromanipulation**

Zur Durchführung der Mikromanipulation (modifiziert nach Williams und Unz, 1985a) wurden 30 µl einer nach der Methode ABZ bzw. ABF vorbehandelten Probe in eine sterile Petrischale pipettiert und mit 100 µl MSV-Medium versetzt. Für die Separation der Fadenbakterien wurde eine über den Bunsenbrenner ausgezogene Glaskapillare und ein Umkehrmikroskop verwendet. Die Glaskapillare wurde durch die verdünnte Bakteriensuspension geführt und die an der Kapillare haftenden Fadenbakterien auf verschiedenen Nährmedien (I, R2A und EGGC) ausgestrichen. Im Anschluss wurden die Medien 7-14 Tage bei 25°C inkubiert.

## **2.20 Isolation von DNA**

### **2.20.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Quick Clean 5M Miniprep Kit der Firma GenScript Corporation verwendet und nach Angaben des Herstellers die DNA präpariert und gereinigt. Zur Gewinnung der erforderlichen Zellen wurden 2-5 mL einer in LB-Medium versetzt mit Ampicillin angezogenen Übernachtskultur etwa 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet.

### **2.20.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Klärschlammisolaten**

Zur phylogenetischen Analyse der aus dem Klärschlamm isolierten Bakterien wurden die Isolate zunächst in jeweils 20 mL Flüssigmedium TYGA (*Flectobacillus roseus*) bzw. I-Medium (*Thiothrix eikelboomii*) kultiviert. Zur Trennung der Bakterien von der Nährlösung wurde die Zellsuspension bei 12000 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in TE-Puffer resuspendiert. Die Isolierung von chromosomaler DNA aus den Klärschlamm-Proben wurde wie in Abschnitt (2.20.3) beschrieben durchgeführt.

### **2.20.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Belebtschlamm**

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus den Klärschlamm-Proben wurde modifiziert nach der so genannten CTAB-Methode durchgeführt (Kieser *et al.*, 2000). Zur Präparation von genomischer DNA aus Klärschlamm-Proben wurden 2 mL Belebtschlamm 5 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in TE-Puffer resuspendiert und mit 0,5 g Glasperlen (0,6 mm) versetzt. Dem Resuspensat wurde für die erste enzymatische Lyse 6 µl Lysozym, 3 µl ProteinaseK zugesetzt und 1 Stunde bei 37° inkubiert. Nach der enzymatischen Lyse wurden die Proben 10 Minuten bei einer Oszillation von 50 [1/s] im TissueLyser LT (Qiagen) behandelt. Im Anschluss wurde dem homogenisierten Klärschlamm für eine zweite enzymatische Lyse 6 µl Lysozym, 3 µl ProteinaseK und 30 µl SDS 10 zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension mit 100 µl 5 M NaCl-Lösung ausgeschüttelt, mit 80 µl CTAB/NaCl versetzt und 10 Min bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde zur Abtrennung der gefällten Proteine 5 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und die DNA für die Quantifizierung mittels QPCR aus dem Überstand der Extraktion mit dem Wizard® DNA Clean-up System isoliert.

## 2.21 Amplifizierung der 16S-rDNA mit konventioneller PCR

Zur Amplifizierung der 16S-rDNA wurden die in Tabelle 9 beschriebenen Primer verwendet. Die PCR wurde in 50 µl Reaktionsvolumen mit Templat-DNA, Primern, einer Nukleotid-Mischung aus (dNTPs) sowie Taq-DNA-Polymerase (Bio&sell) durchgeführt (Tabelle 15). Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem automatischen Thermocycler (Personal Cycler, Biometra). Bei allen Versuchen wurde die Polymerase in den auf Eis gekühlten Reaktionsansatz gegeben.

**Tabelle 15 Zusammensetzung der PCR-Ansätze**

bidest. Wasser (steril)	30,5	µL
10x Puffer (Bio&sell)	5	µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol)	3	µL
dNTPs (5 µmol)	8	µL
Forward-Primer (10 pmol)	1	µL
Reverse-Primer (10 pmol)	1	µL
Matrizen-DNA	1	µL
Taq-Enzym (5 Unit/µl)	0,5	µL

Für die Amplifizierung der 16S-rDNA wurde das folgende Temperaturprogramm verwendet (Tabelle 16).

**Tabelle 16 Programm des Thermocycler zur Amplifizierung des 16S-Gen**

Schritt	Zeit	Temperatur	Reaktion
1	5 Minuten	94°C	Enzymaktivierung
2	40 Sekunden	94°C	Denaturierung
3	40 Sekunden	50°C	Annealing
4	1,5 Minuten	72°C	Elongation
5	3 Minuten	72°C	abschließende Elongation

Die Schritte 2-4 wurden in einem Zyklus 30-mal durchlaufen.

## 2.22 Real-time PCR

Für die Quantifizierung der im Belebtschlamm enthaltenen Fadenbakterien wurden die Klärschlammproben wie in Abschnitt (2.20.3) beschrieben aufgearbeitet und die genomische DNA isoliert. Im Anschluss an die Isolation wurde die DNA-Konzentration in den Klärschlammproben photometrisch bestimmt (siehe 2.22.1).

### 2.22.1 Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration der Klärschlammproben

Die Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentrationen erfolgte mittels einer Tray Cell (Hellma). Zum Ausgleich von extraktionsbedingten Konzentrationsunterschieden der genomischen DNA, wurde die Konzentration der DNA für alle Klärschlamm-Proben auf 2 ng/µl eingestellt.

### 2.22.2 Vorversuche mit konventioneller PCR

Die Überprüfung der Belebtschlammproben auf die Anwesenheit der Fadentypen wurde mit Hilfe von Test-PCR-Reaktionen und spezifischen Primern (Tabelle 10) in konventionellen Polymerasekettenreaktionen durchgeführt. Für die Vorversuche wurde das in Tabelle 17 dargestellte Temperaturprogramm verwendet.

Tabelle 17 Programm des Thermocycler zur Amplifizierung von *F. roseus* und *T. eikelboomii* (021N)

Schritt	Zeit	Temperatur	Reaktion
1	5 Minuten	95°C	Enzymaktivierung
2	30 Sekunden	95 °C	Denaturierung
3	30 Sekunden	62 °C	Annealing
4	1 Minute	72 °C	Elongation
5	3 Minuten	72 °C	abschließende Elongation

Die Schritte 2-4 wurden in einem Zyklus 30-mal durchlaufen.

Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze war identisch mit denen zur Amplifizierung der 16S-rDNA (Tabelle 15). Bei allen hier beschriebenen PCR-Reaktionen wurden immer eine Positivkontrolle und eine Negativ-Kontrolle ohne Matrizen-DNA durchgeführt.

### 2.22.3 Quantifizierung von PCR-Produkten mit der *real-time* PCR

Die Quantifizierung von *T. eikelboomii*, *F. roseus* und der Gesamtbakterienpopulation in den untersuchten Belebtschlammproben wurde in 25 µl Reaktionsvolumen (Tabelle 18) in 96-Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt) mit fluoreszenzdurchlässigen Abdeckfolien (Sarstedt) durchgeführt. Die Polymerasekettenreaktion und Fluoreszenzmessung erfolgte in einem QPCR-Thermocycler (Stratagene). Die Analyse der Standards und der Proben wurde jeweils in Triplikaten durchgeführt. Bei allen hier beschriebenen PCR-Reaktionen wurde immer eine Negativ-Kontrolle ohne Matrizen-DNA durchgeführt. Die Versuchsansätze wurden bis zur PCR-Reaktion auf Eis gelagert.

**Tabelle 18 Zusammensetzung der PCR-Ansätze für die quantitative *real-time* PCR**

bidest. H <sub>2</sub> O (steril)	5,5	µL
Brilliant® II SYBR® Green Mastermix	12,5	µL
Forward-Primer*	1,0	µL
Reverse-Primer**	1,0	µL
Matrizen-DNA (2ng/µL)	5,0	µL

(*Forward-Primer*)\* Flectobac\_QPCR\_f (200 nMol), 21Nf (300 nMol) und S-D-Bact-0509-S-17 (100nMol). (*Reverse-Primer*)\*\* Flectobac\_QPCR\_r (400 nMol), 21Nr (300 nMol) und S-D-Bact-0784-A-22 (100 nMol). Bei den Negativ-Kontrollen wurden anstelle der Matrizen-DNA 5,0 µL steriles Wasser eingesetzt.

Zur Amplifizierung der PCR-Produkte wurde das folgende Temperaturprogramm verwendet (Tabelle 19).

**Tabelle 19 Temperaturprogramm für die *real-time* PCR (*F. roseus* und *T. eikelboomii*)**

Schritt	Zeit	Temperatur	Reaktion
1	10 min	95°C	Enzymaktivierung
2	30 sec	95°C	Denaturierung
3	1 min	62°C	Annealing
4	1 min	72°C	Elongation
5	1 min	72°C	abschließende Elongation

Die Schritte 2-4 wurden in einem Zyklus 40-mal durchlaufen.

### 2.22.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung der in dieser Arbeit beschriebenen Analysen erfolgte mit Hilfe von Kalibrierstandards. Die Standardlösungen wurden hierfür aus präparierter 16S-DNA einzelner Isolate hergestellt. Als Matrizen-DNA dienten die 16S-Gene der Isolate AB23 (*T. eikelboomii*), JSF15 (*F. roseus*) und JSF22 (Gesamtbakterienpopulation *Runella* sp.). Die Kalibrierreihen umfassten Konzentrationsbereiche von  $10^8$ - $10^3$  Kopien (*T. eikelboomii*),  $10^5$ - $10^1$  Kopien (*F. roseus*) und  $10^{10}$ - $10^5$  Kopien (Gesamtbakterienpopulation) pro Reaktionsansatz.

### 2.22.5 Primertitration

Für die Ermittlung der idealen Konzentration des Primerpaares *Flectobac*QPCR, wurde eine Primertitration im Konzentrationsbereich von 100 nMol bis 900 nMol für beide Primer durchgeführt. Als Matrizen-DNA wurde 34,8 ng/ $\mu$ L genomische DNA von *F. roseus* JSF15 in die Reaktionen eingesetzt. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der in die Titration eingesetzten Konzentrationskombinationen. Die PCR-Ansätze hatten bis auf die unterschiedlichen Konzentrationen an Primern und Matrizen-DNA eine analoge Zusammensetzung wie die Quantifizierungsreaktionsansätze (Tabelle 18).

**Tabelle 20 Konzentrationskombinationen der Primertitration**

		forward-Primer				
		100 nmol	200 nmol	400 nmol	600 nmol	900 nmol
Reverse-Primer	100 nmol					
	200 nmol					
	400 nmol					
	600 nmol					
	900 nmol					

Die PCR-Reaktion erfolgte mit dem im Abschnitt (2.22.3) beschriebenen Temperaturprogramm des *Flectobacillus*-Assay.

## 2.23 Klonierung von PCR-Produkten

Im folgenden Abschnitt wird die Klonierung ausgewählter PCR-Produkte beschrieben. Für die Klonierung wurde zunächst die gewünschte DNA in einen Vektor ligiert und die rekombinanten Plasmide anschließend in einen *E. coli*-Stamm transformiert.

### 2.23.1 Ligation

Zur Ligation wurden das TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.23.2 Transformation von *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Zur Transformation von *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) Zellen wurden 100  $\mu$ l kompetente Zellen zusammen mit 10  $\mu$ l Ligationsansatz 30 min auf Eis gelagert. Nach 90 Sekunden Inkubation bei 42°C wurde der Ansatz 2 Minuten auf Eis gekühlt und im Anschluss mit 800  $\mu$ l SOC-Medium versetzt. Im Anschluss wurde 1 Stunde bei 37°C regeneriert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Amp/X-Gal-Platten ausplattiert und bei 37°C für 16-24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswahl der zur Präparation von DNA geeigneten Transformanten über Blauweißselektion.

## 2.24 Stammanzucht und Lagerung

Die *Flectobacillus*-Isolate JSF15 und JSF17 wurden über 48 Stunden in TYGA-Medium kultiviert. Die Kultivierung der *Thiothrix*-Isolate erfolgte über 10 bis 14 Tage in I-Medium. Beide Fadentypen wurden in Schikanekolben im Schüttelwasserbad bei 25°C inkubiert. Zur Reinheitsprüfung wurden die Stämme mikroskopiert und auf TYGA-Agar bzw. I-Agar ausgestrichen. *E. coli* wurde in flüssigem oder auf festem LB Medium bei 37°C angezogen. *E. coli* mit einem Plasmid wurden in LB-Medium, versetzt mit Ampicillin angezogen. Die Lagerung erfolgte über kurze Zeiträume bei 4°C. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 0,5mL einer Flüssigkultur mit 0,5 mL Glycerin durchmischt und bei -80°C gelagert.

## 2.25 DNA-Umsetzungen

### 2.25.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzym *Eco RI*

Zur Kontrolle, ob die klonierten Vektoren das gewünschte Insert von ca. 1500 bp enthalten wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* hydrolysiert. Der Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau war wie folgt zusammengesetzt (Tabelle 21).

**Tabelle 21 Reaktionsansatz eines Restriktionsverdau**

DNA	1	μL
10xPuffer	1	μL
<i>EcoRI</i>	0,5	μL
bidest. H <sub>2</sub> O (steril)		ad. 10 μL

Zur Hydrolyse mit *EcoRI* wurde der Reaktionsansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz an hydrolysiert DNA wurde unverdünnt nach Zusatz von 5 μl Blaumarker für die Gelelektrophorese verwendet. Nur diejenigen Plasmide wurden für weitere Versuche herangezogen, die ein ca. 1,5 kb großes Insert enthielten.

## 2.26 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden horizontal je nach Größe des erwarteten Fragmentes in 0,8% (w/v) bis 2,0% (w/v) Agarosegelen nach der von Sambrock & Russel (2001), beschriebenen Methode mit 1 x TAE-Puffer als Elektrophoresepuffer getrennt. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von etwa 10 V/cm durchgeführt. Als Längenstandards wurden der MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), der DNA Molecular Weight Marker XIII (Roche) und die erweiterte 100 bp-Leiter (Roth) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose 0,2 μg/mL Ethidiumbromid.

## 2.27 Isolation von DNA aus Agarosegel

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Quick Clean 5M Gel Extraction Kit der Firma GenScript Corporation gereinigt und nach Angaben des Herstellers isoliert.

## 2.28 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde durch MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

## 2.29 Phylogenetische Einordnung mittels BLAST-Analyse

Die durch die Sequenzierung erhaltenen *forward*- und *reverse*-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software BioEdit zusammengefügt. Zur systematischen Einordnung der Klärschlammisolate wurden die ermittelten Sequenzen über das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) der Online-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit 16S-rDNA-Sequenzen bekannter Mikroorganismen verglichen. Zur phylogenetischen Einordnung wurden die Sequenzen zu nächst mit der Software *Bioedit* in ein Alignment eingefügt und durch eine Neighbor-Joining-Analyse mit Hilfe des Software MEGA in Stammbäume eingerechnet.

## 2.30 FISH

Die Durchführung der FISH der Belebtschlammproben und der Reinkulturen erfolgte im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeiten von Hohagen (2010) und Schmidt (2011).

### 2.30.1 Aufarbeitung der Belebtschlammproben für FISH

Zur Probenaufarbeitung für die spätere Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurden 2 mL einer Belebtschlammprobe oder 150 µL einer Glycerin-Kultur (-80°C) in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und 2 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde

das nach der Zentrifugation entstandene Pellet zweimal mit 1 mL 1 x PBS-Puffer gewaschen und bis zum späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

### **2.30.2 Fixierung**

Die Fixierung der Belebtschlammproben erfolgte in Anlehnung an die Methode des Bayerischen Landesamts für Wasserwirtschaft (Schade und Lemmer, 2002). Für die Fixierung der gramnegativen Fadenbakterien in den Belebtschlammproben bzw. Reinkulturen wurden die untersuchten Bakteriensuspensionen im Verhältnis 1:3 mit 4 %iger Formaldehyd-Lösung vermischt und 3 Stunden bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Suspensionen 2 Minuten bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so entstandene Pellet wurde in 1 mL 1 x PBS- Puffer resuspendiert. Die Zentrifugation und Resuspendierung wurde als Wasch-Schritt einmal wiederholt. Die Lagerung der fixierten Proben erfolgte bei -20°C in einer Mischung (1:1; v/v) aus 1 x PBS-Puffer und Ethanol.

### **2.30.3 Hybridisierung**

Für die Hybridisierung der FISH-Sonden wurden die Belebtschlammproben und Reinkulturen wie in Abschnitt (2.30.2) beschrieben fixiert und im Anschluss in die Aussparung eines teflonbeschichteten Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) pipettiert. Die Trocknung der Präparate erfolgte über der Flamme eines Bunsenbrenners. Nachdem die Objektträger getrocknet und abgekühlt waren, wurden die Präparate mit Hilfe einer Ethanol-Reihe (50%, 80%, 100 % Ethanol) nachfixiert und an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurden jeweils 24 µL des auf 46 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffers und 3 µL der Oligonukleotidsonde in die Aussparungen des Objektträgers pipettiert und vermischt. Die Inkubation erfolgte über 90 Minuten in einer mit Hybridisierungspuffer gesättigten Petrischale bei 46 °C. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Präparate mit vorgewärmten Waschpuffer (46 °C) gewaschen und im Anschluss 20 Minuten im 48°C warmen Waschpuffer nachinkubiert. Abschließend wurden die Objektträger 3 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und unter Lichtausschluss an der Luft getrocknet.

### **2.30.4 DAPI-Färbung (Gegenfärbung)**

Die Anfärbung der Gesamt-DNA in den hybridisierten Belebtschlammproben erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid). Dazu wurden 25 µL einer DAPI-Lösung (10 µg/mL) auf die hybridisierte Probe aufgetragen und 20 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wurde mit sterilem bidestillierten Wasser gewaschen und das Präparat unter Lichtausschluss an der Luft getrocknet.

## **2.31 Färbemethoden**

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit durchgeführten Färbemethoden beschrieben. Für jede durchgeführte Färbung wurde zunächst ein Trockenpräparat hergestellt.

### **2.31.1 Trockenpräparat**

Die für die unterschiedlichen Färbemethoden verwendeten Trockenpräparate wurden zum Teil direkt aus dem Belebtschlamm bzw. aus in flüssigem Nährmedium angezogenen Reinkulturen hergestellt. Dazu wurden die Bakteriensuspensionen auf einen Objektträger aufgetragen und über der Flamme eines Bunsenbrenners getrocknet.

### **2.31.2 Mikroskopeinstellung**

Bei allen durchgeführten Färbungen wurde bei 1000facher Vergrößerung im Hellfeld unter Immersionsöl mikroskopiert.

### **2.31.3 Gramfärbung**

Zur Gramfärbung wurde Kristallviolettlösung auf ein zuvor hergestelltes Trockenpräparat aufgetragen und nach einer Einwirkzeit von 90 Sekunden die überschüssige Farbe-Lösung mit Wasser abgewaschen. Im Anschluss wurde zur Bildung eines blauen Farblacks Lugol'sche Lösung auf das Präparat aufgetragen und 60 Sekunden einwirken gelassen. Zur Entfärbung der gramnegativen Bakterien wurde, nach einem weiteren Waschschrift,

Ethanol auf das Präparat aufgetragen und 60 Sekunden einwirken gelassen. Um die gramnegativen Bakterien besser sichtbar zu machen, wurde mit Safranin-Lösung gegengefärbt (Kunst *et al.*, 2000).

#### **2.31.4 Neisserfärbung**

Zur Neisser-Färbung wurden zunächst die Lösungen von Methyleneblau und Kristallviolett im Verhältnis von 2:1 gemischt. Die Methyleneblau/Kristallviolett-Lösung wurde auf ein zuvor hergestelltes Trockenpräparat aufgetragen und nach 10-15 Sekunden der überschüssige Farbstoff mit Wasser abgewaschen. Im Anschluss wurde zur besseren Sichtbarkeit der neissernegativen Bakterien mit Chrysoidin-Lösung (Einwirkzeit 45 Sekunden) gegengefärbt (Kunst *et al.*, 2000).

#### **2.31.5 PHB-Färbung**

Zur PHB-Färbung wurde eine ethanolische Sudanschwarz-B-Lösung (0,3%) auf ein zuvor angefertigtes Trockenpräparat aufgetragen. Nach einer 12 minütigen Einwirkzeit wurde überschüssige Färbelösung mit Wasser abgespült und im Anschluss mit Safranin O-Lösung (Einwirkzeit 45 Sekunden) gegengefärbt (Kunst *et al.*, 2000).

### **2.32 Weitere durchgeführte Tests**

Die folgenden Tests wurden mit frisch gewachsenen Bakterien durchgeführt, dazu wurden die Isolate zunächst als Vorkulturen angezogen und bei 25 °C bis zum sichtbaren Wachstum der Bakterien bebrütet. Die Inkubation der *Flectobacillus*-Isolate erfolgte zwei Tage auf flüssigen oder festen TYGA-Medium. Die *Thiothrix*-Isolate wurden 7 bis 14 Tage auf flüssigem und festem I-Medium angezogen. Die Vorkulturen wurden im Anschluss direkt zur Durchführung der Tests verwendet oder zum Animpfen der Testkulturmedien auf eine definierte optische Dichte verwendet.

#### **2.32.1 API 20 NE**

Die Untersuchung der *Flectobacillus*-Isolate mittels des Systems API 20 NE der Firma BioMérieux erfolgte wie in der Arbeitsvorschrift vorgeschrieben. Für die

Charakterisierung der *Thiothrix*-Isolate wurde der Inkubationszeitraum auf 5 Tage erweitert und die Inkubationstemperatur auf 28°C erhöht. Die Ablesung der Enzymreaktionen erfolgte analog der Arbeitsvorschrift.

### **2.32.2 Katalase-Test**

Zur Durchführung des Katalasetest wurde mit einer vorher ausgeglühten Impföse eine Kolonie der untersuchten Bakterien auf den Deckel einer Petrischale aufgetragen und mit einem Tropfen einer 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung versetzt und verrieben.

### **2.32.3 Oxidase-Test**

Als Vorbereitung für den Oxidasetest wurde ein Filterpapier auf die Innenseite eine Petrischale gelegt und mit der Oxidase-Reagenz getränkt. Im Anschluss wurde eine Kolonie des untersuchten Bakteriums mit einem sterilen Holzstäbchen auf dem Filterpapier verrieben und nach 10 Sekunden die Reaktion abgelesen.

### **2.32.4 Bestimmung der Temperaturoptima**

Für die Bestimmung der Temperaturoptima der Isolate JSF15 und JSF17 wurden 25 mL TYGA-Medium mit einer Vorkultur des jeweiligen Isolats auf eine optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von 0,1 eingestellt. Die Bebrütung erfolgte bei 25°C, 30°C und 35°C im Schüttelwasserbad bei 100 rpm. Die Messung der optischen Dichte erfolgte zu Beginn und am Ende des Wachstums in einem einstündigen Intervall. Ab dem Beginn der exponentiellen Phase wurde in einem halbstündigen Intervall gemessen. Die Messungen der optischen Dichte erfolgte bei 600 nm.

### **2.32.5 Bestimmung des Wachstumsbereichs Temperatur**

Die Bestimmung der temperaturbezogenen Wachstumsbereiche erfolgte in einer sieben-tägigen Inkubation der Isolate bei 4°C, 25°C, 28°C und 37°C in TYGA-Medium. Das Wachstum der Bakterien wurde täglich überprüft. Die Auswertung erfolgte visuell nach dem Kriterium, ob ein Wachstum der Bakterien aufgetreten war oder nicht.

Zum Abschluss der Untersuchung wurde um eine Fremdkontamination auszuschließen eine mikroskopische Reinheitsüberprüfung vorgenommen.

### **2.32.6 Hemmhoftest**

Die Bestimmung der verschiedenen Antibiotikaresistenzen erfolgte mit Hilfe eines Hemmhoftests. Dafür wurden 200 µl einer Vorkultur des jeweiligen Isolats auf TYGA-Medium ausgestrichen und Antibiotikaplättchen auf den Nährboden aufgelegt und 48 Stunden bei 25°C inkubiert. Die Plättchen enthielten die folgenden Antibiotika:

- Kanamycin (30 µg)
- Sulfamethoxazol
- Penicillin G (10 I.E.)
- Chloramphenicol (30 µg)
- Tetracyclin (30 µg)
- Gentamicin (10 µg)

## **3 Experimente und Ergebnisse**

### **3.1 Isolierung von Fadenbakterien aus Belebtschlamm**

#### **3.1.1 Isolation von *F. roseus* aus Klärschlamm**

Für die Isolierung von *F. roseus* musste, zur Vermeidung eines Überwachsens der fädigen Bakterien durch schnell wachsende nichtfädige Bakterien, die Anzahl nichtfädiger Bakterien im Inokulum reduziert werden. Dazu wurden die Proben wie im Abschnitt (2.19.1) beschrieben mit MSV-A-Medium vorbehandelt. Die Isolierung der in dieser Arbeit untersuchten fädigen Bakterien wurde wie im Abschnitt (2.19.2) beschrieben durchgeführt. Nach drei tägiger Inkubation bei 25°C war auf den zur Kultivierung verwendeten Agar-Platten (R2A und TYGA) eine deutliche Bildung von Kolonien erkennbar. Die Agar-Platten mit den Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  waren zu dicht bewachsen, um Einzelkolonien aufzuweisen. In der Verdünnung  $10^{-3}$  waren die Kolonien deutlich genug voneinander getrennt, um Reinkulturen anlegen zu können. Die Verdünnungen  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  zeigten auch nach weiteren drei Tagen Bebrütung keine sichtbaren Kolonien. Zur Bestimmung der Morphologie der isolierten Bakterien wurden Lebendpräparate einer jeden Kolonie hergestellt und bei 100facher Vergrößerung im Hellfeld mikroskopiert. Die Isolate JSF15 und JSF17 wurden auf TYGA-Medium isoliert und kultiviert.

#### **3.1.2 Isolation von *T. eikelboomii* aus Belebtschlamm**

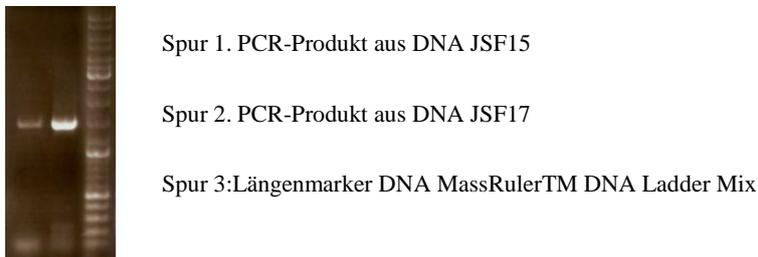
Die Isolation der *T. eikelboomii*-Isolate AB23 und AB32 erfolgte durch eine Kombination der Vorbehandlungsmethoden ABZ (siehe 2.19.3.1) bzw. ABF (siehe 2.19.3.2) und anschließender Mikromanipulation (siehe 2.19.4). Beide Isolate wurden auf dem Nährmedium I isoliert (Bremshay, 2010) und kultiviert.

### **3.2 Identifizierung der isolierten Fadenbakterien mittels 16S-rDNA-Analyse**

Für eine taxonomische Einordnung der isolierten Bakterien wurde die 16S-rDNA der Isolate mittels einer PCR-Reaktion amplifiziert und im Anschluss kloniert und sequenziert.

### 3.2.1 Amplifizierung und Klonierung der 16S-rDNA aus fädigen Bakterien

Zur Amplifizierung der 16S-rDNA aus den isolierten Bakterien wurde die genomische DNA wie im Abschnitt (2.20.2) beschrieben präpariert und als Template in die PCR-Reaktionen eingesetzt. Mit Hilfe der in Tabelle 9 aufgeführten Universal-Primer wurde für die verschiedenen Klärschlammissolate jeweils ein PCR-Produkt in der Größe des 16S-Gens (ca. 1,5 kb) amplifiziert. Die Ermittlung der Größe und der DNA-Menge der Fragmente erfolgte über eine Gelelektrophorese. Die folgende Abbildung zeigt ein Beispiel eines solchen Elektrophoresegels.



**Abbildung 4** Gelbild der 16S-Amplifikate der Isolate JSF15 und JSF17 mit den Universal-Primern 8FPL-NdeI/1492RPL-BamHI. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 9 dargestellt.

Die Abbildung 4 zeigt die PCR-Produkte der Isolate JSF15 und JSF17. Die *Flectobacillus*-Isolate wurden mit dem Primerpaar 8FPL-NdeI/1492RPL-BamHI amplifiziert. Die Amplifikation der *Thiothrix*-Isolate AB23 und AB32 erfolgte mit den Primern 27forward und 1492revers. Alle PCR-Produkte wurden zur weiteren Analyse in den pCR® 2.1-TOPO® Vektoren kloniert (siehe 2.23) und anschließend in *E. coli* DH5α transformiert (siehe 2.23.2). Zur Kontrolle, ob die ausgewählten Transformanten einen Vektor mit einem Insert in der gewünschten Größe von ca. 1,5 kb enthielten, wurde ein Restriktionsverdau mit *Eco* RI durchgeführt (siehe 2.25.1) und im Anschluss der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.26). Aus den Transformanten, die das gewünschte Insert enthielten, wurde die DNA mit Hilfe des Quick Clean 5M Miniprep Kit präpariert, mit sterilem Wasser entsprechend verdünnt und zur Sequenzierung an MWG Eurofins verschickt.

### 3.2.2 Taxonomische Einordnung der Isolate mittels 16S-rDNA

Die Amplifikation und Sequenzierung des 16S-Gens der unterschiedlichen Isolate ergab DNA-Sequenzen mit Längen von: JSF15 (1462 bp), JSF17 (1462 bp), AB23 (1439 bp), AB32 (1437 bp). Dies entspricht in etwa der gesamten Länge der 16S-rDNA-Sequenz mit ca. 1,5 kb (Brosius *et al.*, 1981). Zur phylogenetischen Einordnung der Isolate wurden ein Abgleich der Sequenzen mit der Datenbank BLAST durchgeführt und phylogenetische Stammbäume erstellt (siehe 3.2.3 und 3.2.4).

### 3.2.3 Phylogenetische Einordnung der Isolate JSF15 und JSF17

Das Ergebnis der taxonomischen Analyse mit der Online-Datenbank BLAST ergab, dass die Isolate JSF15 und JSF17 die größte phylogenetische Übereinstimmung mit den Bakterien des Genus *Flectobacillus* aufwiesen. Hierbei handelt es sich um einen Vertreter der Familie der *Cytophagaceae*. Inwiefern sich *Flectobacillus* sp. JSF15 und JSF17 von anderen *Flectobacillus*-Isolaten und den Spezies *F. major* und *F. lacus* genetisch abgrenzen, zeigt die Tabelle 22.

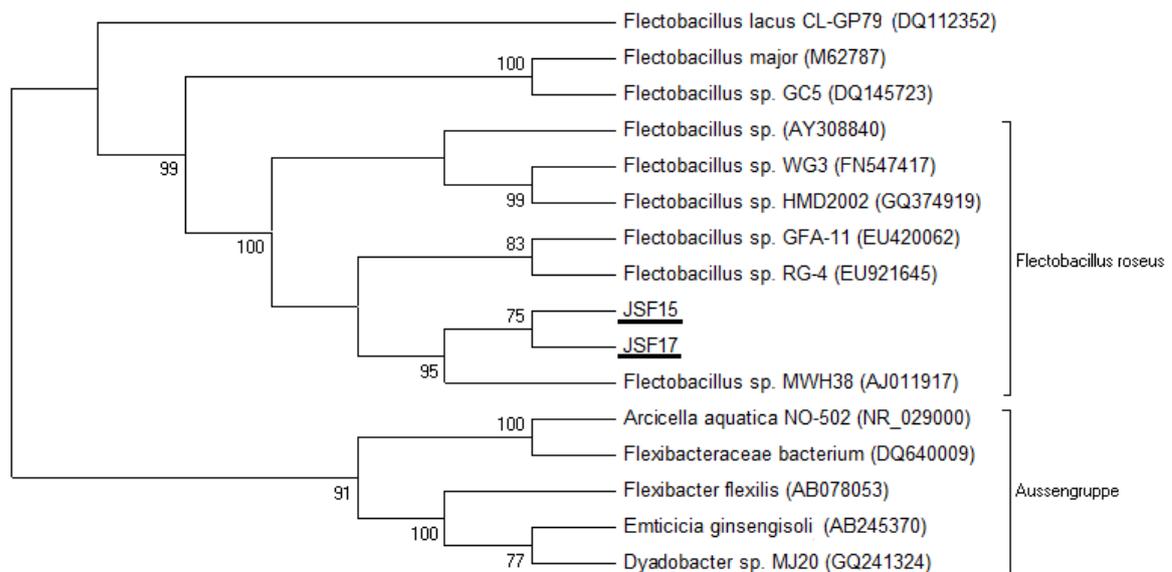
Tabelle 22 Prozentuale genetische Übereinstimmung der *Flectobacillus*-Isolate mit weiteren *Flectobacillus*-Spezies

Isolatbezeichnung	<i>Flectobacillus</i> JSF15	<i>Flectobacillus</i> JSF17
MWH38 (AJ011917)	99,7	99,4
WG3 (FN547417)	99,0	98,0
‘starch degrading’ (AY308840)	99,0	98,9
GFA-11 (EU420062)	99,4	99,2
RG-4 (EU921645)	99,2	98,9
HMD2002 (GQ374919)	98,6	98,5
<i>F. major</i> (NR 044736)	95,7	95,6
CL-GP79(NR 043554)	95,0	95,0
JSF15	100	99,4
JSF17	99,4	100

Die in dieser Tabelle dargestellten Werte geben prozentuale Übereinstimmungen der 16S-rDNA Sequenzen der Isolate JSF15 und JSF17 mit bisher bekannten *Flectobacillus*-Vertretern an. Die Werte wurden mit aus der Datenbank BLAST erstellten Alignments berechnet. Die Accession-Nummern sind in Klammer hinter der Isolatbezeichnung dargestellt.

Die Tabelle 22 zeigt, dass die *Flectobacillen* JSF15 und JSF17 die höchste genetische Übereinstimmung auf Basis der 16S-rDNA mit den Isolaten MWH38, GFA-11 und RG-4

und aufweisen. Die Übereinstimmungen der 16S-Gene der in dieser Arbeit isolierten *Flectobacillen* und den bisher anerkannten Spezies *F. major* und *F. lacus* (CL-GP79) liegen zwischen 95,0-95,6%. Nach Strackebrandt und Goebel (1994) zeigen zwei Organismen mit einer Sequenzhomologie unter 97,5 %, nicht mehr als 60-70% Übereinstimmung ihrer Gesamt-DNA und sind daher nicht als auf dem Spezieslevel verwandt anzusehen. Somit besteht aufgrund der Sequenzdiversität der Isolate JSF15 und JSF17 nur auf Genus-Stufe eine Verwandtschaftsbeziehung zu *F. major* und *F. lacus*. Desweiteren kann aufgrund der Sequenzhomologie von JSF15 und JSF17 mit den bisher weitgehend unbekanntenen Isolaten geschlussfolgert werden, dass es sich bei den *Flectobacillus*-Isolaten JSF15, JSF17, MWH38, WG3, GFA-11, RG-4, HMD2002 und *Flectobacillus* sp. `starch degrading´ um Mitglieder einer gemeinsamen Spezies handelt. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in dem in Abbildung 5 dargestellten Stammbaum wieder.



**Abbildung 5 Phylogenetischer Stammbaum nach der Isolate JSF15 und JSF17.** Der phylogenetische Baum wurde nach der „Neighbor-Joining“-Methode, auf der Grundlage der 16S-rDNA-Sequenzen der Isolate JSF15, JSF17 und nahverwandten *Flectobacillus*-Stämmen erstellt. Als Außengruppen wurden *Dyadobacter*, *Flexibacter* und *Emticicia* verwendet. Die Accession-Nummern der Referenzstämme sind jeweils hinter der Bakterienbezeichnung aufgeführt. An den Knotenpunkten des Stammbaumes sind die Bootstrap-Wert (1000 Replikate) in Prozent dargestellt. Bootstrapwerte unter 70 werden nicht dargestellt.

Der Stammbaum zeigt ein durch einen signifikant hohen Bootstrapwert (100%) gekennzeichnetes Cluster für JSF15, JSF17 und weitere Isolate (*F. roseus*-Gruppe). Damit grenzen sich diese Isolate phylogenetisch von den Spezies *F. major*, *F. lacus* und *Flectobacillus* sp. GC5 ab. Dies bestätigt die Annahme, dass es sich bei JSF15, JSF17,

MWH38, WG3, GFA-11, RG-4, HMD2002 und *Flectobacillus* sp. 'starch degrading' um eine eigene Spezies handelt. In der von Sheu *et al.* (2009) angefertigten Untersuchung wurde mit der Bezeichnung *Flectobacillus roseus* ein Namensvorschlag für die Isolate GFA-11 und RG-4 erbracht. Damit existiert eine bekannte Speziesbezeichnung in die die anderen Speziesvertreter eingliedert werden können. Aufgrund der Zugehörigkeit der JSF-Isolate zur Spezies *F. roseus* werden die Isolate in den folgenden Abschnitten als *Flectobacillus roseus* JSF15 und *Flectobacillus roseus* JSF17 bezeichnet.

### 3.2.4 Phylogenetische Einordnung der Isolate AB23 und AB32

Die Ergebnisse der 16S-DNA-Analyse für die Isolate AB23 und AB32 zeigten die höchsten genetischen Übereinstimmungen mit dem Genus *Thiothrix* und der dazugehörigen Spezies *Thiothrix eikelboomii*. Die prozentuelle Übereinstimmung der 16S-DNA der Isolate zu anderen *Thiothrix*-Spezies und *T. eikelboomii*-Stämmen zeigt die Tabelle 23.

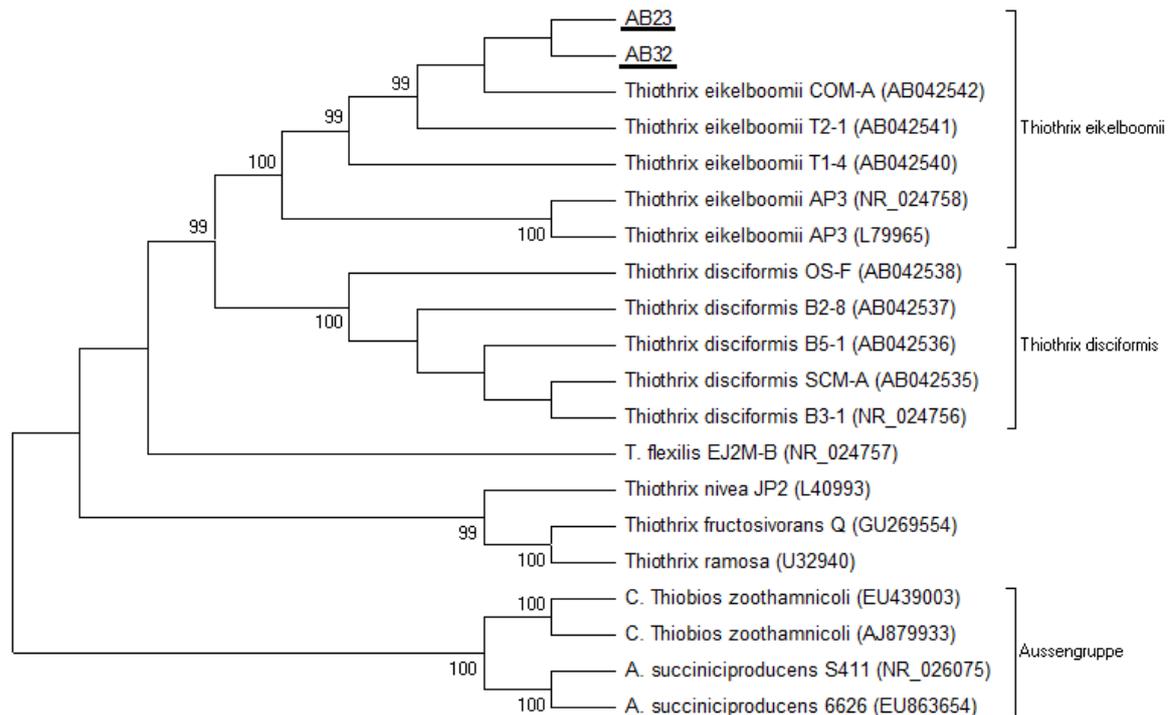
Tabelle 23 Prozentuale genetische Übereinstimmung der Isolate AB23 und AB32 mit weiteren *Thiothrix*-Spezies

Isolatbezeichnung	<i>Thiothrix</i> AB23	<i>Thiothrix</i> AB32
T2-1 (AB042541)	99,9	100
COM-A (AB042542)	99,9	100
T1-4 (AB042540)	99,4	99,6
AP3 (NR024758)	98,3	98,5
B5-1 (AB042536)	95,4	95,4
EJM-B (NR024757)	90,9	91,0
AB23	100	99,9
AB32	99,9	100

Die in dieser Tabelle dargestellten Werte geben prozentuale Übereinstimmungen der 16S-rDNA Sequenzen der Isolate AB23 und AB32 mit *Thiothrix eikelboomii*-Stämmen und anderen ausgewählten *Thiothrix*-Spezies an. Bei den Isolaten B5-1 und EJM-B handelt es sich um die *Thiothrix*-Spezies *T. disciformis* und *T. flexilis*. Die Werte wurden mit aus der Datenbank BLAST erstellten Alignments berechnet. Die Accession-Nummern sind in Klammer hinter der Isolatbezeichnung dargestellt.

AB23 und AB32 zeigen die höchste Sequenzhomologie im Bezug auf die *T. eikelboomii*-Isolate T2-1 und COM-A. Untereinander weisen die Isolate eine Sequenzübereinstimmung von 99,9 % auf. Mit 95,4 und 91 % Sequenzhomologie grenzen sich AB23 und AB32 deutlich von den Spezies *T. disciformis* und *T. flexilis* ab. Wie schon in Abschnitt (3.2.3)

beschrieben kann ab einer Sequenzübereinstimmung von 97,5 % zwischen Genus und Spezies differenziert werden (Strackebrandt und Goebel, 1994). Auf Grund dessen konnten die Isolate AB23 und AB32 der Spezies *Thiothrix eikelboomii* zugeordnet werden. Die Abgrenzung der einzelnen *T. eikelboomii*-Isolate zu den anderen *Thiothrix*-Spezies und der Außengruppe wird durch den in (Abbildung 6) dargestellten Stammbaum verdeutlicht



**Abbildung 6 Phylogenetischer Stammbaum der Isolate AB23 und AB32.** Der phylogenetische Baum wurde nach der „Neighbor-Joining“-Methode, auf der Grundlage der 16S-rDNA-Sequenzen der Isolate AB23, AB32 und nahverwandten *Thiothrix*-Stämmen erstellt. Als Außengruppen wurden *Thiobios zoothamnicoli* und *Anaerobiospirillum succiniciproducens* verwendet. Die Accession-Nummern der Referenzstämmen sind jeweils hinter der Bakterienbezeichnung aufgeführt. An den Knotenpunkten des Stammbaumes sind die Bootstrap-Wert (1000 Replikate) in Prozent dargestellt. Bootstrapwerte unter 70 werden nicht dargestellt.

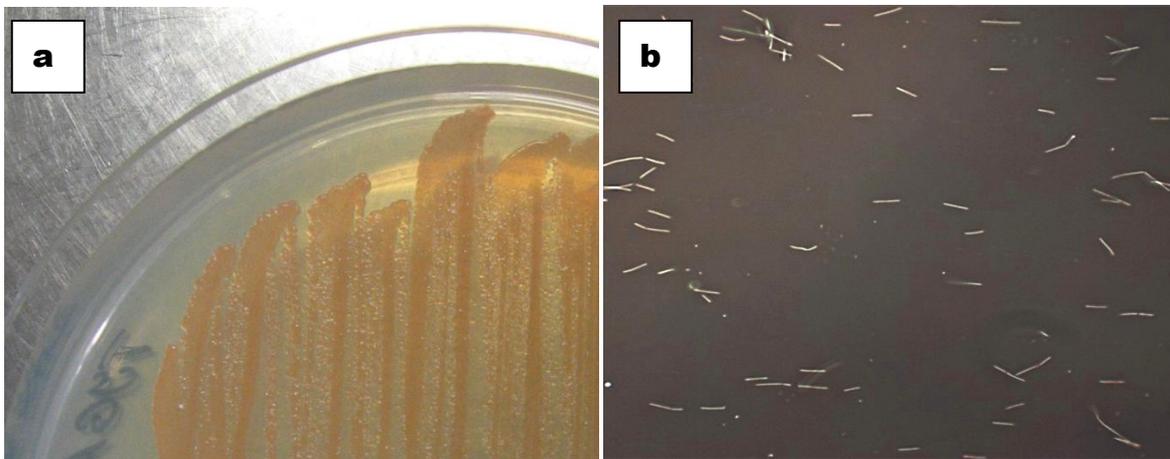
Die Abbildung 6 zeigt, dass sich AB23 und AB32 in die *T. eikelboomii*-Gruppe einreihen und ein zu den Spezies *T. disciformis*, *T. nivea*, *T. fructosivorans* und *T. ramosa* separiertes Cluster bilden. Innerhalb ihrer eigenen Spezies grenzen sich *Thiothrix eikelboomii* AB23 und AB32 am weitesten von AP3 ab. Dies spiegelt die in Tabelle 23 aufgeführte Sequenzhomologie der Isolate wieder, wo AB23 und AB32 mit 98,3 bzw. 98,5 % die geringste Übereinstimmung unter den *T. eikelboomii*-Vertretern mit AP3 (ACC.No. NR024758) aufweisen.

### 3.3 Charakterisierung der *F. roseus*-Isolate

In dem folgenden Abschnitt wird auf die morphologische und biochemische Charakterisierung der Isolate JSF15 und JSF17 eingegangen. Die in diesem Abschnitt dargestellten Versuche wurden wie im Abschnitt Material und Methoden (siehe 2.32) beschrieben durchgeführt.

#### 3.3.1 Allgemeine Charakterisierung der *F. roseus*-Isolate

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten *Flectobacillen* JSF15 und JSF17 zeigten auf TYGA- und R2A-Medium rosafarbene Kolonien mit einer Größe von 1-2 mm. Die Kolonien waren konvex und rund mit glatten Rändern. Für eine genauere morphologische Charakterisierung wurden die Isolate in flüssigem TYGA-Medium angezogen und bei 400x-facher und 1000x-facher Vergrößerung im Phasenkontrast mikroskopiert. Die Filamente hatten eine stäbchenförmige Gestalt und wiesen eine Länge von 12,5-24,5  $\mu\text{m}$  für JSF15 und 3,5–6,0  $\mu\text{m}$  für JSF17 auf. Der Zell-Durchmesser lag für *F. roseus* JSF15 bei 1,2-1,7  $\mu\text{m}$  und bei *F. roseus* JSF17 bei 1,1-1,5  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 7** Morphologische Charakterisierung von *Flectobacillus roseus*. Die Abbildung zeigt: (a) *Flectobacillus roseus* JSF15 auf dem Nährmedium TYGA. (b) *Flectobacillus roseus* JSF15 bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast.

Die Abbildung 7a zeigt die rosafarbene Pigmentierung des Isolates JSF15. Die Kolonien der JSF-Isolate wiesen eine runde und konvexe Form auf. In Abbildung 7b ist die filamentöse Morphologie des Isolates JSF15 erkennbar. Für die Bestimmung weiterer Charakteristika wurden die in Abschnitt (2.17) beschriebenen Färbemethoden angewandt.

Die isolierten *Flectobacillen* waren gram-, neisser- und PHB-negativ. Ein Wachstum der Isolate konnte bei Temperaturen zwischen 4 bis 37 °C beobachtet werden (vgl. 2.32.5). Das Temperaturoptimum der Isolate lag für JSF17 bei 25°C und für JSF15 bei 30°C (vgl. 2.32.4). Für die abschließende Untersuchung der neuen *Flectobacillus*-Isolate erfolgte ein Abgleich mit bereits publizierten *Flectobacillus*-Spezies.

**Tabelle 24 Übersicht der Charakteristika ausgewählter *Flectobacillus*-Stämme**

Isolat	JSF15	JSF17	MWH38	CL-GP79	GFA-11 <sup>T</sup>	RG-4	<i>F. major</i>
Farbe	rosa	rosa	pink	pink	rosa	rosa	rosa
Zelllänge (µm)	12,5 - 24,5	3,5-6,0	2,0-10,0*	4,7 - 10,0	1,5 - 2,5	1,5 - 2,5	2,0 - 5,0
Zellbreite (µm)	1,2 - 1,7	1,1 - 1,5	0,4 - 0,6	0,3 - 0,6	0,3 - 0,5	0,3 - 0,5	0,6 - 1,0
Oxidase	+	+	n.b.	+	+	+	+
Katalase	+	+	n.b.	+	+	+	w
Wachstumsbereich (°C)	4 - 37	4 - 37	n.b.	10 - 35	10 - 40	10 - 40	4 - 30
Optimum (°C)	30	25	n.b.	25 - 30	30	30	20-30

Die in dieser Tabelle aufgeführten Resultate für *Flectobacillus lacus* (CL-GP79) und *Flectobacillus major* DSM 103 stammen aus der Untersuchung von Hwang und Cho (2006). Die Isolate GFA-11<sup>T</sup> und RG-4 wurden im der Rahmen der Untersuchung von Sheu *et al.*, 2009 getestet. Die Ergebnisse für das Isolat MWH38 wurden von Hahn *et al.* (1999) beschrieben. MWH38 konnte Längen bis 50 µm erreichen. Die Isolate tragen die folgenden Accession-Nummern: MWH38 (AJ011917), GFA-11 (EU420062), RG-4 (EU921645), *F. major* (NR 044736) und CL-GP79(NR 043554).

Der Vergleich der *Flectobacillen* in Tabelle 24 zeigt, dass alle bisher bekannten *Flectobacillus*-Spezies eine rosafarbene bzw. pinkfarbene Pigmentierung und ein positives Test-Ergebnis auf die Enzyme Oxidase und Katalase aufweisen. Im Bezug auf ihre Länge- und Zellbreite zeigen die Isolate JSF15 und JSF17 die größte Übereinstimmung mit *F. major*, *F. lacus* und *Flectobacillus* sp. MWH38. Die Wachstumsbereiche der Isolate JSF15 und JSF17 zeigten im Niedrigtemperaturbereich (4°C) Übereinstimmungen mit *F. major* und im hohen Temperaturbereich (37-40°C) mit den *F. roseus*-Stämmen GFA-11 und RG-4 (Tabelle 24). Das Temperaturoptimum der publizierten *Flectobacillus*-Spezies liegt zwischen 20-30°C und für die JSF-Isolate bei 25 °C bzw. 30°C. In diesem Punkt differenzieren sich die Spezies kaum voneinander. Die Ergebnisse der morphologischen Charakterisierung zeigen, dass die JSF-Isolate mit ihren Merkmalen wie der Pigmentierung, dem Wachstumsbereich, dem Temperaturoptimum und der Katalase/Oxidase-Aktivität, Genus-typische Merkmale aufweisen.

### 3.3.2 Biochemische Charakterisierung der *Flectobacillen* mit API 20NE

Für die biochemische Charakterisierung der *F. roseus*-Isolate wurde das Teststreifensystem API 20NE von BioMérieux verwendet (siehe 2.32.1). Die Nachweise auf eine Amylase- und Lipase-Aktivität wurde mit Hilfe der in Abschnitt (2.15.4) aufgeführten Stärke- bzw. Tween 80-Agarplatten durchgeführt.

Tabelle 25 Substratverwertung der Isolate JSF15 und JSF17

Isolat	Amylase	Lipase	Katalase	Nitratatmung	Glucosefermentation	Arginin-Dihydrolase	Urease-Aktivität	$\beta$ -Glucosidaseaktivität	Gelatine-Hydrolyse	$\beta$ -Galactosidase	Glucose	Arabinose	D-Mannose	D-Mannitol	N-Acetylglucosamin	D-Maltose	Kaliumgluconat	Caprinsäure	Adipinsäure	Malat	Trinatriumcitrat	Phenylacetat	
JSF15	-	-	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JSF17	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+	-	-	-

(-) negativ bzw. kein Wachstum, (+) positiv bzw. Wachstum, (+/-) schwach positiv bzw. schwaches Wachstum. Die Substratverwertung wurde auf den API 20NE Streifen nach 48 Stunden abgelesen.

Die Übersicht der JSF-Isolate in Tabelle 25 zeigt, dass beide Isolate keine Lipase-, Arginin-Dihydrolase- und Protease-Aktivität und keine Nitratatmung aufwiesen. Für JSF17 konnte eine Urease-Aktivität nachgewiesen werden. *Flectobacillus roseus* JSF15 zeigte positive Ergebnisse für eine  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Der Test auf Glucosefermentation und Amylase war für beide *Flectobacillen* negativ. Beide Isolate konnten Arabinose, D-Mannose und N-Acetylglucosamin assimilieren. Die Isolate zeigten keine Assimilation von D-Maltose, Caprinsäure, Trinatriumcitrat und Phenylacetat. Unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich bei der Assimilation von D-Mannitol, Kaliumgluconat, Adipinsäure und Malat. JSF15 war in der Lage, Glucose zu assimilieren, wohingegen der Test bei JSF17 ein negatives Ergebnis zeigte. JSF17 zeigte Wachstum in Gegenwart von Malat und ein schwaches Wachstum bei der Assimilation von D-Mannitol, Kaliumgluconat und Adipinsäure. Für die abschließende Untersuchung der neuen *Flectobacillus*-Isolate erfolgte ein Abgleich mit bereits publizierten *Flectobacillus*-Spezies. Für den Vergleich der biochemischen und physiologischen Charakteristika mit anderen *Flectobacillus*-Spezies wurden die Ergebnisse aus Tabelle 25

und die Ergebnisse aus den in der Literatur beschriebenen Spezies *F. roseus*, *F. major* und *F. lacus* genutzt. Ein Vergleich mit den *Flectobacillus*-Isolaten MWH38 und WG3 konnte nicht durchgeführt werden, da bisher keine biochemischen und physiologischen Charakteristika dieser Isolate publiziert sind.

Tabelle 26 Vergleich der Enzymaktivitäten der JSF-Isolate mit bisher beschriebenen *Flectobacillus*-Spezies

Stamm/Typ-Bezeichnung	Amylase	Lipase	Katalase	Nitratatmung	Glucosefermentation	Arginin-Dihydrolase	Urease-Aktivität	$\beta$ -Glucosidaseaktivität	Gelatine-Hydrolyse	$\beta$ -Galactosidase
<i>Flectobacillus</i> sp. JSF15	-	-	+	-	-	-	-	+/-	-	+
<i>Flectobacillus</i> sp. JSF17	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Flectobacillus</i> sp. CL-GP79	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Flectobacillus</i> sp. GFA-11 <sup>T</sup> ; RG-4	s	-	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Flectobacillus major</i> DSM 103	+	+	+/-	-	+	-	v	+	+	+

Enzymaktivitäten ausgewählter *Flectobacillus*-Isolate: (-) negativ; (+) positiv, (+/-) schwach, (s) Stammspezifisch, (v) variabel. Die in dieser Tabelle aufgeführten Resultate für *Flectobacillus lacus* (CL-GP79) und *Flectobacillus major* DSM 103 stammen aus der Untersuchung von Hwang und Cho (2006). Die Isolate GFA-11<sup>T</sup> und RG-4 gehören der Spezies *Flectobacillus roseus* an und wurden im der Rahmen der Untersuchung von Sheu *et al.*, 2009 getestet. Die Isolate tragen die folgenden Accession-Nummern: GFA-11 (EU420062), RG-4 (EU921645), *F. major* (NR 044736) und CL-GP79 (NR 043554).

Der in Tabelle 26 dargestellte Vergleich der Enzym-Aktivitäten der *Flectobacillus*-Stämme zeigt, dass nur *F. major* eine Lipase-Aktivität aufwies. Bis auf *Flectobacillus roseus* JSF17 zeigen alle untersuchten *Flectobacillen* eine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Der Test auf Arginin-Dihydrolase-Aktivität war bei den hier aufgeführten Stämmen negativ. JSF17 wurde positiv auf eine mögliche Nitratatmung getestet. Das Enzym Katalase konnte bei allen *Flectobacillus* -Spezies nachgewiesen werden. CL-GP79 und *F. major* zeigten ein positives Ergebnis bei der Hydrolyse von Gelatine. Eine  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität zeigten die Isolate GFA-11T, RG-4, JSF15 und JSF17.

Eine Urease-Aktivität konnte für *F. major* und das Isolat JSF17 beobachtet werden.

Tabelle 27 Vergleich der Assimilation der JSF-Isolate mit den bisher bekannten *Flectobacillus*-Spezies

Isolat	D-Glucose	L-Arabinose	D-Mannose	D-Mannitol	N-Acetylglucosamin	D-Maltose	Kaliumgluconat	Caprinsäure	Adipinsäure	Malat	Trinatriumcitrat	Phenylacetat
JSF15	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
JSF17	-	-	+	-	+	-	+	-	+/-	+	+	+
CL-GP79	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GFA-11 <sup>T</sup> ; RG-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. major</i> DSM 103	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Assimilationsreaktionen ausgewählter *Flectobacillus*-Isolate: (-) negativ; (+) positiv, (+/-) schwach. Die in dieser Tabelle aufgeführten Resultate für *Flectobacillus lacus* (CL-GP79) und *Flectobacillus major* DSM 103 stammen aus der Untersuchung von Hwang und Cho (2006). Die Isolate GFA-11<sup>T</sup> und RG-4 wurden im der Rahmen der Untersuchung von Sheu *et al.*, 2009 getestet. Die Isolate tragen die folgenden Accession-Nummern: GFA-11 (EU420062), RG-4 (EU921645), *F. major* (NR 044736) und CL-GP79 (NR 043554).

Der Vergleich der Ergebnisse der Assimilationsreaktionen der Isolate JSF15 und JSF17 mit den anderen *Flectobacillen* zeigte, dass die Zucker L-Arabinose und D-Maltose ausschließlich von *Flectobacillus major* verwertet werden konnte (Tabelle 27). Übereinstimmendes Verhalten zeigten JSF17 und *F. major* im Bezug auf die Aufnahme der Substrate D-Mannose und N-Acetylglucosamin. Eine Assimilation von Glucose zeigten JSF15, *F. lacus* (CL-GP79) und *F. major*. Die *F. roseus*-Isolate JSF15 und JSF17 und *F. major* zeigten im Gegensatz zu den anderen Speziesvertretern ein Wachstum in Anwesenheit von Kaliumgluconat. Ein positives Testergebnis für die Assimilation von Malat, Trinatriumcitrat und Phenylalanin konnte ausschließlich bei *Flectobacillus roseus* JSF17 beobachtet werden. *Flectobacillus lacus* (CL-GP79) und JSF17 konnte als einzige *Flectobacillus*-Vertreter Adipinsäure verwerten. Außer JSF17 zeigte keines der weiteren *Flectobacillus*-Isolate eine Assimilation von Malat, Trinatriumcitrat und Phenylalanin. Caprinsäure und D-Mannitol konnte von keinem in der Tabelle 27 dargestellten *Flectobacillus*-Stamm verwertet werden. Insgesamt zeigten die *F. roseus*-Isolate GFA-11 und RG-4 eine negative Reaktion für alle im API-20NE-Test enthaltenen Assimilationsreaktionen (Sheu *et al.*, 2009).

### 3.3.3 Untersuchung der Antibiotika-Resistenz der *F. roseus*-Isolate

Neben den biochemischen Eigenschaften der *Flectobacillen* wurde auch die Auswirkung unterschiedlicher Antibiotika auf die Isolate untersucht (vgl. 2.32.6).

Tabelle 28 Antibiotika-Resistenz der *Flectobacillus*-Isolate

Antibiotikum	<i>F. roseus</i> JSF15	<i>F. roseus</i> JSF17
Kanamycin (30 µg)	R	R
Sulfamethoxazol (25 µg)	S	R
Penicillin G (10. I.E.)	R	R
Chloramphenicol (30 µg)	S	R
Tetracyclin (30 µg)	S	S
Gentamicin (10 µg)	R	R

R (resistent), S (suszeptibel)

Die Übersicht der Antibiotikaresistenzen in Tabelle 28 zeigt, dass *F. roseus* JSF15 Resistenzen gegenüber Kanamycin, Penicillin G und Gentamicin aufwies. *F. roseus* JSF17 zeigte ebenfalls Resistenzen gegenüber diesen Antibiotika und desweiteren gegenüber von Sulfamethoxazol und Chloramphenicol. Beide Isolate verhielten sich suszeptibel gegenüber von Tetracyclin. *F. roseus* JSF15 zeigte zusätzlich eine Suszeptibilität auf Sulfamethoxazol. Für die abschließende Untersuchung der neuen *Flectobacillus*-Isolate erfolgte ein Abgleich mit bereits publizierten *Flectobacillus*-Spezies.

Der Vergleich der Antibiotika-Resistenzen der Isolate erfolgte hauptsächlich mit *F. lacus* und *F. major*, da für die *F. roseus*-Isolate bisher nur für eines der getesteten Antibiotika Ergebnisse vorlagen.

**Tabelle 29** Antibiotika-Resistenzen der *Flectobacillus*-JSF-Isolate im Vergleich zu anderen *Flectobacillus*-Spezies

<b>Antibiotikum</b>	<b>JSF15</b>	<b>JSF17</b>	<b><i>F. lacus</i></b>	<b><i>F. roseus</i></b>	<b><i>F. major</i></b>
Kanamycin (30 µg)	R	R	R	R	S
Sulfamethoxazol (25 µg)	S	R	n.b	n.b	n.b
Penicillin G 10. I.E.	R	R	S	n.b	S
Chloramphenicol (30 µg)	S	R	S	n.b	n.b
Tetracyclin (30 µg)	S	S	S	n.b	S
Gentamicin (10 µg)	R	R	S	n.b	S

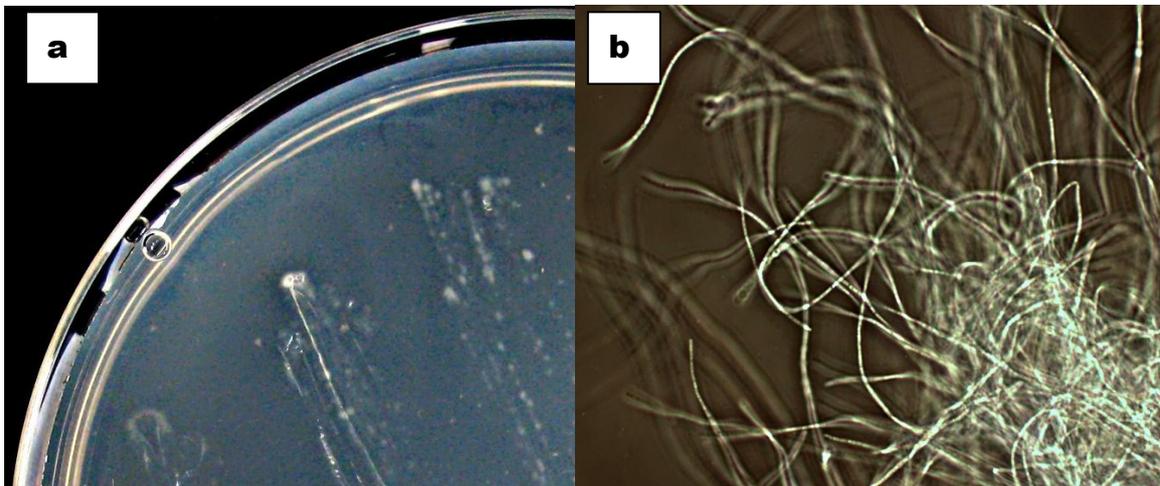
Antibiotikaresistenz ausgewählter *Flectobacillus*-Isolate: (R) Resistent, (S) Suszeptibel, (n.b) nicht bekannt. Die in dieser Tabelle aufgeführten Resultate für *Flectobacillus lacus* (CL-GP79) und *Flectobacillus major* DSM 103 stammen aus der Untersuchung von Hwang und Cho (2006). Die Ergebnisse der *Flectobacillus roseus* Isolate GFA-11<sup>T</sup> und RG-4 Sheu *et al.*, 2009 stimmten miteinander überein und wurden daher unter *Flectobacillus roseus* zusammengefasst. Die Isolate tragen die folgenden Accession-Nummern: *Flectobacillus roseus* GFA-11 (EU420062) und RG-4 (EU921645), *F. major* (NR 044736) und *Flectobacillus lacus* CL-GP79 (NR 043554).

Der Resistenzvergleich der Fadenbakterien in Tabelle 29 zeigt eine übereinstimmende Reaktion von JSF15, JSF17, *F. lacus* und *F. major* im Bezug auf das Antibiotikum Tetracyclin. Die dargestellten *Flectobacillen* zeigten bis auf *F. major* alle eine Resistenz gegenüber Kanamycin. Die Ergebnisse des Resistenzvergleichs der *Flectobacillus*-Vertreter verdeutlichen die genetischen Unterschiede der einzelnen Spezies.

### 3.4 Charakterisierung der *Thiothrix eikelboomii*-Isolate

#### 3.4.1 Allgemeine Charakterisierung der *Thiothrix*-Isolate

Die isolierten *T.eikelboomii* AB23 und AB32 zeigten auf dem Untersuchungsmedium opaque Kolonien auf. Für eine genauere morphologische Charakterisierung wurden Lebendpräparate der Isolate angefertigt und bei 400x-facher und 1000x-facher Vergrößerung im Phasenkontrast mikroskopiert. Die mikroskopische Betrachtung der Isolate zeigte die Fäden als eine für *Thiothrix*-charakteristische Aneinanderreihung rechteckiger Zellen ohne Verzweigungen. Die Fadenbakterien wiesen einen Durchmesser von 2,0-2,2  $\mu\text{m}$  und eine Länge von mehreren hundert  $\mu\text{m}$  auf.



**Abbildung 8 Phasenkontrastaufnahme von *Thiothrix eikelboomii* AB23 (Fotos Breamshey).** Die Abbildung zeigt: (a) AB23 auf dem Nährmedium I. (b) AB23 bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast.

Die Abbildung 8a zeigt Kolonien von *T. eikelboomii* AB23 auf dem Kultivierungsmedium I. Beide AB-Isolate wiesen eine Kolonieförmigkeit mit welligen Rändern und filamentöser Oberfläche auf. In Abbildung 8b ist die filamentöse Morphologie von *T. eikelboomii* AB23 dargestellt. Es konnte keine Beweglichkeit der Isolate nachgewiesen werden. Beide *Thiothrix*-Isolate waren gram- und neisser-negativ (Breamshey, 2010).

Für die abschließende Untersuchung der neuen *T. eikelboomii*-Isolate erfolgte ein Abgleich mit bereits publizierten *T. eikelboomii*-Spezies.

**Tabelle 30** Übersicht der Charakteristika der Isolate AB23 und AB32 und anderer *Thiothrix eikelboomii*-Stämme

<b>Isolat</b>	<b>AB23</b>	<b>AB32</b>	<b>AP3</b>	<b>COM-A</b>
Kolonie-Farbe	opaque	opaque	opaque	opaque
Kolonie-Form	filamentös	filamentös	filamentös	filamentös
Verzweigungen	-	-	-	-
Beweglichkeit	-	-	-	-
Zellbreite ( $\mu\text{m}$ )	2,0 - 2,2	2,0 - 2,2	1,2 – 8,0	1,0 – 8,0
Oxidase	-	-	+	n.b.
Gram-Färbung	-	-	-	-
Neisser-Färbung	-	-	-	-
PHB-Granula	+	+	+	+
Wachstumsbereich ( $^{\circ}\text{C}$ )	n.b.	n.b.	10 - 33	n.b.

(+) positiv, (-negativ), (n.b.) nicht bekannt. Die Ergebnisse der Charakterisierung für *T. eikelboomii* AP3 und COM-A wurden im Rahmen der Untersuchungen von Kanagawa *et. al.* (2000) und Howarth *et. al.* (1999) bestimmt. Die Resultate für die Isolate AB23 und AB32 stammen aus der Diplomarbeit von Bremshey (2010)

Die in Tabelle 30 dargestellten *T. eikelboomii*-Typen zeigen untereinander eine hohe Übereinstimmung, differenzieren aber in ihrer Zellbreite und Oxidase-Aktivität. Bei *T. eikelboomii* AB23 und AB32 war die gemessene Zellbreite erheblich kleiner als bei AP3 und COM-A. Desweiteren ist AP3 Oxidase-positiv wohingegen sowohl AB23 wie auch AB32 keine Oxidase-Aktivität aufwiesen (Bremshey, 2010).

### 3.4.2 Biochemische Charakterisierung der *Thiothrix*-Isolate mit API 20NE

Eine biochemische Charakterisierung der *Thiothrix*-Isolate AB23 und AB32 mit dem Testsystem API 20NE (siehe 2.32.1) konnte nur für die Enzymaktivitäten erfolgen, da die Isolate in den Assimilationsröhrchen des Teststreifen kein Wachstum aufwiesen (Bremshey, 2010).

Tabelle 31 Enzymaktivitäten der *Thiothrix eikelboomii*-Isolate AB23 und AB32

Isolat-Bezeichnung	Amylase	Lipase	Katalase	Nitratatmung	Glucosefermentation	Arginin-Dihydrolase	Urease-Aktivität	$\beta$ -Glucosidaseaktivität	Gelatine-Hydrolyse	$\beta$ -Galactosidase
AB23	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	+
AB32	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	+

(-) negativ, (+) positiv, (+/-) schwach positiv. Die Substratverwertung wurde auf den API 20NE Streifen nach 120 Stunden abgelesen (Bremshey, 2010)

Die Tabelle 31 zeigt übereinstimmende Enzymaktivitäten für die Isolate AB23 und AB32. Beide *Thiothrix eikelboomii*-Isolate zeigten positive Ergebnisse für die Tests auf eine Arginin-Dihydrolase-,  $\beta$ -Glucosidase- und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.

Für die abschließende Untersuchung der neuen *T. eikelboomii*-Isolate erfolgte ein Abgleich der Testergebnisse mit den Ergebnissen des bereits publizierten *T. eikelboomii*-Isolates AP3.

Tabelle 32 Vergleich der Enzymaktivitäten von AB23 und AB32 mit *Thiothrix eikelboomii* AP3

Isolat-Bezeichnung	Amylase	Lipase	Katalase	Nitratatmung	Glucosefermentation	Arginin-Dihydrolase	Urease-Aktivität	$\beta$ -Glucosidaseaktivität	Gelatine-Hydrolyse	$\beta$ -Galactosidase
AB23	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	+
AB32	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	+
AP3	-	-	-	+	n.b.	n.b.	-	n.b.	+	n.b.

(+) positiv, (-negativ), (+/-) schwach positiv, (n.b.) nicht bekannt. Die Ergebnisse der Charakterisierung für *Thiothrix eikelboomii* AP3 wurde im Rahmen der Untersuchungen von Howarth *et al.*, (1999) bestimmt. Die Resultate für die Isolate AB23 und AB32 stammen aus der Diplomarbeit von Bremshey (2010)

Der Vergleich der Isolate AB23 und AB32 mit dem von Howarth *et al.* (1999) isolierten *T. eikelboomii* zeigt keine Übereinstimmungen der Enzym-Aktivitäten (Tabelle 32). Im Gegensatz zu AB23 und AB32 zeigte *T. eikelboomii* AP3 ein positives Ergebnis bei der Veratmung von Nitrat und der Hydrolyse von Gelatine. Die Unterschiede bei der Gelatine-Hydrolyse und der Nitratatmung deuten an, dass es sich bei den *T. eikelboomii* AP3 und den Isolaten AB23 und AB32 um zwei unterschiedliche Stämme handelt.

### 3.5 Primerentwicklung für die quantitative PCR

Für die in diesem Abschnitt vorgestellte Entwicklung der QPCR-Primer wurde die 16S- rDNA als Zielsequenz gewählt, weil sie über hoch konservierte und variable Bereiche verfügt und online große Datenbanken von 16S-rDNA-Sequenzen vorliegen. Entscheidendes Merkmal für die Entwicklung von *real-time* PCR geeigneten Primern ist eine hohe Spezifität auf die untersuchte Spezies. Neben der Spezifität wurden folgende Ansprüche an die Primer und das Amplikon gestellt:

- die Länge der Primer sollte zwischen 15-25 bp liegen
- die Abweichung des theoretischen Schmelzpunktes zwischen den Primern sollte 2°C nicht überschreiten
- das Amplikon sollte zwischen 100-300 bp lang sein und einen GC-Gehalt von 60°C nicht überschreiten

Der Vorteil von Amplikons mit einer Länge zwischen 100-400 Basenpaaren ist eine höhere Amplifikationseffizienz. Des Weiteren werden die Einzelstränge kürzerer Amplikons besser bei 92-95°C in der Denaturierungsphase aufgetrennt, was wiederum die Anlagerung der Primer erleichtert. Die in dieser Arbeit entwickelten Primer wurden zur Vermeidung unspezifischer Nebenprodukte mit der Datenbank BLAST abgeglichen. Die Überprüfung der Primer auf Dimere und Sekundärstrukturen erfolgte mit Hilfe der Online-Software OligoCalc. Bei allen hier beschriebenen PCR-Reaktionen wurden immer eine Positivkontrolle mit spezifischer DNA und eine Negativ-Kontrolle ohne Matrizen-DNA durchgeführt.

#### 3.5.1 Primerdesign für die Spezies *F. roseus*

Zur Entwicklung spezifischer 16S-rDNA-Primer für *F. roseus* wurden Alignments der 16S-rDNA-Sequenzen der Isolate und von Vertretern des jeweiligen Genus erstellt. Zur Abgrenzung konservierter Sequenz-Bereiche wurden wie bei der Erstellung phylogenetischer Bäume *Arcicella aquatica*, *Flexibacteraceae bacterium*, *Flexibacter flexilis*, *Emticicia ginsengisoli* und *Dyadobacter* sp. MJ20 als Außengruppen in die Alignments miteinbezogen. Die Bakterien der Außengruppe wurden nach dem Kriterium

einer möglichst nahen genetischen Verwandtschaft zu Familien der *Flectobacillus* gewählt. Hierbei lagen die Übereinstimmungen der 16S-Gene der Flectobacillen zu der Außengruppe bei 85%-93%

A)

JSF15		GG*A***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
JSF17		GG*G***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus</i> sp. MWH38		GG*A***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus</i> sp. WG3	(FN547417)	GG*A***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus</i> sp.	(AY308840)	GG*A***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus</i> sp. GFA-11	(EU420062)	GG*A***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus</i> sp. HMD2002	(GQ374919)	GG*A***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus</i> sp. RG-4	(EU921645)	GG*A***	AGG*TA**T*CCAG*CA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus major</i>	(M62787)	GG*A***	CGG*TA**T*CCAG*YA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus</i> sp. GC5	(DQ145723)	GG*A***	CGG*TA**T*CCAG*TA*CTGG*T**C***
<i>Flectobacillus lacus</i>	(DQ112352)	GG*A***	CGG*TA**T*CCAG*TA*CTGG*T**C***
<i>Aricella aquatica</i> NO-502	(NR_029000)	GG*A***	CAG*TC**T*GTG*TA*CA*CA**T**C***
<i>Flexibacteraceae bacterium</i>	(DQ640009)	GG*A***	CAG*TC**T*GTG*TA*CA*CA**T**C***
<i>Flexibacter flexilis</i>	(AB078053)	AG*A***	AGG*CA**T*CACT*CA*AGTG*T**G***
<i>Emticicia ginsengisoli</i>	(AB245370)	GA*A***	AGT*TT**G*GCA*CA*TAGGC*A**G***
<i>Dyadobacter</i> sp. MJ20	(GQ241324)	GG*A***	AGG*TT**T*CA*CA*CG*GTGT*T**G***

B)

JSF15		TG*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
JSF17		TA*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
<i>Flectobacillus</i> sp. MWH38		TG*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
<i>Flectobacillus</i> sp. WG3	(FN547417)	TG*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
<i>Flectobacillus</i> sp.	(AY308840)	TG*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
<i>Flectobacillus</i> sp. GFA-11	(EU420062)	TG*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
<i>Flectobacillus</i> sp. HMD2002	(GQ374919)	TG*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
<i>Flectobacillus</i> sp. RG-4	(EU921645)	TG*T****	C*A*AGTTCGCGTCAAGAACGGGATTAG
<i>Flectobacillus major</i>	(M62787)	TG*T****	C*A*AGCTCCGCTTAAAGCCGGATTAG
<i>Flectobacillus</i> sp. GC5	(DQ145723)	TG*T****	A*A*GCACCGCTAATCTCGTGCACGAG
<i>Flectobacillus lacus</i>	(DQ112352)	TG*T****	C*G*AGTTCGCGCTAAGCCG-----
<i>Aricella aquatica</i> NO-502	(NR_029000)	TG*T****	C*A*AGCTGGTTTTCAAGCCGCGATTAG
<i>Flexibacteraceae bacterium</i>	(DQ640009)	TG*T****	C*A*AGCTGGTTTTCAAGCATTGATCTG
<i>Flexibacter flexilis</i>	(AB078053)	TG*G****	C*G*AGGCGGTAACCGTAAGGAGCCGTTC
<i>Emticicia ginsengisoli</i>	(AB245370)	GG*T****	C*G*AGCGGAAGGTAAGAGATTTCCATTAG
<i>Dyadobacter</i> sp. MJ20	(GQ241324)	GG*G****	C*G*A*GCGGTAGGCAGTGGTACAGAGAAA

**Abbildung 9 Alignment der *Flectobacillus*-Isolate, verschiedener Vertreter des Genus *Flectobacillus* und einer Außengruppe.** Dargestellt sind Ausschnitte aus einem Alignment der Flectobacillen JSF15, JSF17 und weiteren Vertreter des Genus *Flectobacillus* mit einer Außengruppe. A) zeigt die Lage des Primers FlectobacQPCRfor und B) die Lage des Primers FlectobQPCRrev. Beide Primersequenzabschnitte sind grau unterlegt. Die Basenfehlpaarungen im Lagebereich des Primerpaares sind als weiße Basen dargestellt und die Fehlpaarungen ausserhalb des Primerbereichs als graue Basen. Die Accession-Nummern der Flectobacillen und der Vergleichsorganismen sind jeweils in Klammern aufgeführt. Als Außengruppe wurden die Bakterien *Aricella aquatica* (92%), *Flexibacteraceae bacterium* (93%), *Flexibacter flexilis* (85%), *Emticicia ginsengisoli* (85%) und *Dyadobacter* sp. MJ20 (85%) verwendet (in Klammern hinter den Organismen ist die genetische Übereinstimmung des 16S-Gens zur Zielgruppe *Flectobacillus* dargestellt).

Das Alignment der 16S-rDNA-Sequenzen in Abbildung 9 zeigt zwei spezifische Bereiche für die *Flectobacillus roseus* im Abschnitt von 1226–1256 bp und 1420-1440 bp. Beide Bereiche grenzen sich deutlich in ihrer Basenabfolge von der Außengruppe ab. Im Lagebereich des Primers FlectobacQPCRrev (Abbildung 9B) ist *F. lacus* nicht vollständig sequenziert. Da die Sequenz im Anfangsbereich des *reverse*-Primers aber fünf

Basenfehlpaarungen aufweist kann davon ausgegangen werden, dass sich der Primer nicht an die DNA von *F. lacus* anlagern kann. Das Primerpaar ergibt ein theoretisches Amplifikat in Größe von 204 Basenpaaren und einem GC-Gehalt von 53%. Beide in diesem Abschnitt aufgeführten Primer wurden aufgrund ihrer Spezifität und der Länge des theoretisch gebildeten Amplikons für das Assay ausgewählt. Die folgende Darstellung zeigt die Lage der Primer FlectobacQPCR auf dem 16S-Gen des Isolates JSF15 (*F. roseus*).



**Abbildung 10 Primerkarte der *Flectobacillus* Primer.** Die Abbildung zeigt die Lage des Primerpaares FlectobacQPCR auf dem 16S Gen des Klärschlammisolates JSF15 (*F. roseus*).

Neben der Spezifität der Primer wurde auch die Einhaltung der in Abschnitt (3.5) festgelegten Bedingungen an das Primerpaar überprüft. Die Länge der Primer liegt für FlectobacQPCRfor bei 22 bp und für FlectobacQPCRrev bei 21 Basenpaaren. Der Schmelzpunkt für FlectobacQPCRfor beträgt 64,0 °C und der für FlectobacQPCRrev 61,8 °C. Beide Primer entsprachen den festgelegten Voraussetzungen (vgl. 3.5). Nach der theoretischen Entwicklung des Primerpaares wurden die Primer in die im nächsten Abschnitt beschriebenen Test-PCR-Reaktionen eingesetzt.

### 3.5.2 Validierung des Primerpaares FlectobacQPCR

Zur Überprüfung, ob die entwickelten Primer ein Amplikon in der gewünschten Größe von 204 bp ergaben, wurde die genomische DNA zweier Reinkulturen von *F. roseus* (Isolat JSF15) als Matrize in eine PCR mit dem im Abschnitt (2.22.2) beschriebenen Temperaturprogramm eingesetzt. Die Abbildung 11 zeigt ein Gelbild des mit dem Primerpaar FlectobacQPCR erhaltenen PCR-Produktes.



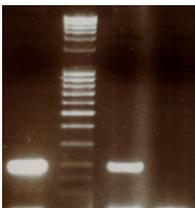
Spur 1. Positivkontrolle (1): PCR-Produkt aus DNA JSF15

Spur 2. Positivkontrolle (2): PCR-Produkt aus DNA JSF15

Spur 3: Negativkontrolle

**Abbildung 11 PCR-Produkt des Isolats JSF15 mit dem Primerpaar FlectobacQPCR.** Die Abbildung zeigt die PCR-Produkte aus der genomischen DNA von JSF15 (*F. roseus*) (1) und (2) mit den Primern FlectobacQPCRfor und FlectobacQPCRrev auf Agarosegel 2 %. Es wurden jeweils 5 µl pro Spur aufgetragen.

Unter den im Abschnitt (2.22.2) beschriebenen PCR-Bedingungen wurde nur ein einziges Amplifikat erhalten. Zur Kontrolle, ob es bei der späteren Untersuchung des Klärschlammes zum Auftreten von unerwünschten Nebenprodukten kommt, wurde die genomische DNA einer Klärschlammprobe unter denselben Bedingungen in die PCR eingesetzt. Die folgende Abbildung 12 zeigt ein Gelbild des Amplifikates, das aus der Klärschlammprobe erhalten wurde.



Spur 1. Positivkontrolle: 16S-Gen JSF17 (25 µl)

Spur 2. Längenmarker: Roth 100bp-Leiter (erweitert auf 5000 bp)

Spur 3. Klärschlamm-Probe 28.10.09: Genomische DNA (50 µl)

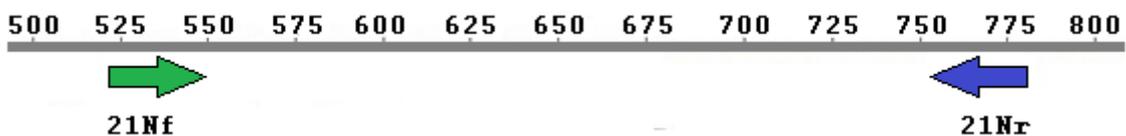
**Abbildung 12 PCR-Produkte des Isolates JSF17 und einer Klärschlammprobe mit dem Primerpaar FlectobacQPCR.** Die Abbildung zeigt PCR-Produkte vom 16S-Gen des Isolates JSF17 (*F. roseus*) und der genomischen DNA aus der Klärschlamm-Probe vom 28.10.09 mit den Primern FlectobacQPCRfor und FlectobacQPCRrev auf Agarosegel 2%.

Das aus dem Klärschlamm erhaltene Amplikon wies dieselbe Größe wie das Fragment der Positivkontrolle auf (Abbildung 12). Zur Überprüfung, ob es sich hierbei um ein spezifisches Produkt handelt, wurde das Fragment ausgeschnitten und wie in den Abschnitten (2.23) und (2.28) beschrieben kloniert und sequenziert. Der Abgleich mit der

Datenbank BLAST ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit *F. roseus* JSF15 und diversen *F. roseus*-Isolaten (MWH38, HMD2002, RG-4, GFA-11T, `starch degrading`). Die Übereinstimmung mit *F. roseus* JSF17 lag bei 99%.

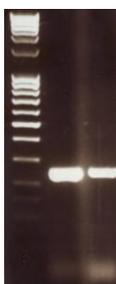
### 3.6 Test-PCR mit dem Primerpaar 021N/021rev

Für die Isolate AB23 und AB32 (*Thiothrix eikelboomii*) wurde bereits ein 16S-DNA Primerpaar und ein Assay beschrieben (Vervaeren *et al.*, 2005). Die Primer und die Annealing-Temperatur wurden für diese Arbeit übernommen. Als Primer wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Primer 21Nf und 21Nr verwendet. Die folgende Abbildung zeigt die Lage des Primerpaares 21Nf/21Nr auf dem 16S-Gen eines Vertreters des Genus *T. eikelboomii* (L79965) (Abbildung 13).



**Abbildung 13 Primerkarte der 021N-Primer.** Die Abbildung zeigt die Lage des Primerpaares 21Nf und 21Nr auf dem 16S-rDNA Gen des *T. eikelboomii* (ACC No. L79965)

Zur Untersuchung, ob bei der Untersuchung von Klärschlammproben unerwünschte Nebenprodukte auftreten, wurde die genomische DNA einer Reinkultur von *T. eikelboomii* (AB23) und einer Klärschlammprobe, mit dem im Abschnitt (2.22.2) beschriebenen Temperaturprogramm, als Matrize in eine PCR eingesetzt. Die folgende Abbildung zeigt das aus einer Klärschlammprobe mit dem Primerpaar 21Nf/21Nr erhaltene Amplifikat.



Spur 1 Längenmarker MassRuler™ DNA Ladder Mix

Spur 2 Genomische DNA (*Thiothrix eikelboomii*)

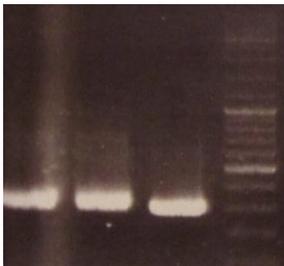
Spur 3 Genomische DNA Klärschlammprobe 22.09.09

**Abbildung 14 PCR-Produkte von *Thiothrix eikelboomii* und einer Klärschlammprobe mit dem Primerpaar 021N.** Die Abbildung zeigt die PCR-Produkte aus der Genomischen DNA von (*Thiothrix eikelboomii*) und der genomischen DNA aus einer Klärschlamm-Probe vom 22.09.09 mit den Primern 21Nf und 21Nr auf Agarosegel 2%.

Das Amplifikat wies dieselbe Größe wie das Fragment der Positivkontrolle auf (Abbildung 14). Zur Überprüfung, ob es sich hierbei um ein spezifisches Produkt handelt, wurde das Fragment ausgeschnitten und wie in den Abschnitten (2.23) und (2.28) beschrieben kloniert und sequenziert. Der Abgleich der Sequenz mit der Datenbank BLAST ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit *T. eikelboomii*-Stamm COM-A (AB042542) und eine 99%ige Übereinstimmung mit den Isolaten AB23 und AB32.

### 3.6.1 Test-PCR mit Universal-Primer Bacteria

Zur Überprüfung, ob das von Rupf *et al.* (1999) beschriebene Universalprimerpaar S-D-Bact (Tabelle 10) für die Bestimmung der Gesamtbakterienpopulation geeignet ist, wurde das Primerpaar mit unterschiedlichen Belebtschlammproben und dem 16S-Gen einer Reinkultur von *Runella* sp. (Positivkontrolle) in eine PCR eingesetzt. Für die Test-PCR wurde dasselbe Temperaturprogramm verwendet wie für die Test-PCR mit den Primerpaaren 021N und FlectobacQPCR (Tabelle 17).



Spur 1 Genomische DNA Klärschlammprobe 14.10.10  
 Spur 2 Genomische DNA Klärschlammprobe 07.07.10  
 Spur 3 Positivkontrolle 16S-rDNA *Runella* sp.

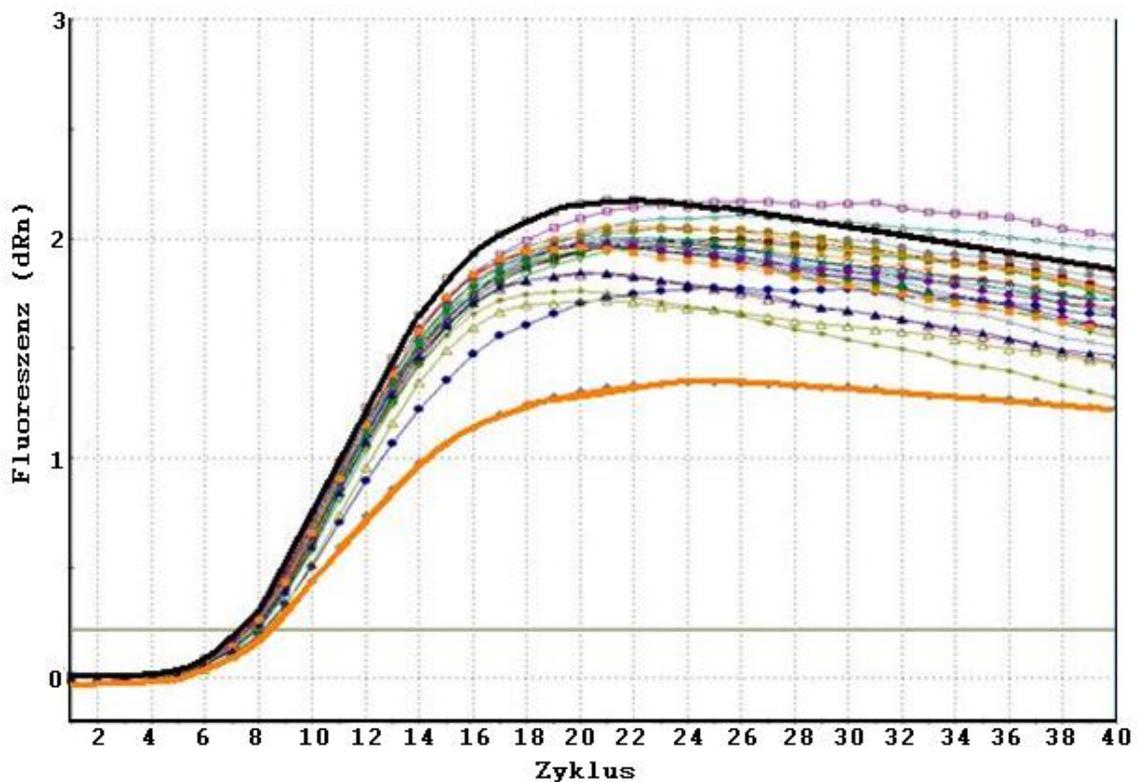
**Abbildung 15 PCR-Produkte von *Runella* sp. und Klärschlammproben mit dem Primernpaar S-D-Bact.** Die Abbildung zeigt die PCR-Produkte aus der 16S-rDNA von (*Runella* sp.) und der genomischen DNA aus den Klärschlamm-Proben vom 14.10.10 und 07.07.10 mit den Primern S-D-Bact-0509-S-17 und S-D-Bact-0784-A-22 auf Agarosegel 2%.

Die Abbildung 15 zeigt, dass die PCR-Produkte der Belebtschlammproben und der Positivkontrolle mit ca. 200 Basenpaaren eine ähnliche Größe aufwiesen. Aufgrund der erfolgreichen Amplifikation wurde das Primerpaar für die Bestimmung der Gesamtbakterienpopulation im Belebtschlamm verwendet.

### 3.7 Optimierung des *Flectobacillus*-Assays

#### 3.7.1 Primertitration und Schmelzkurvenanalyse

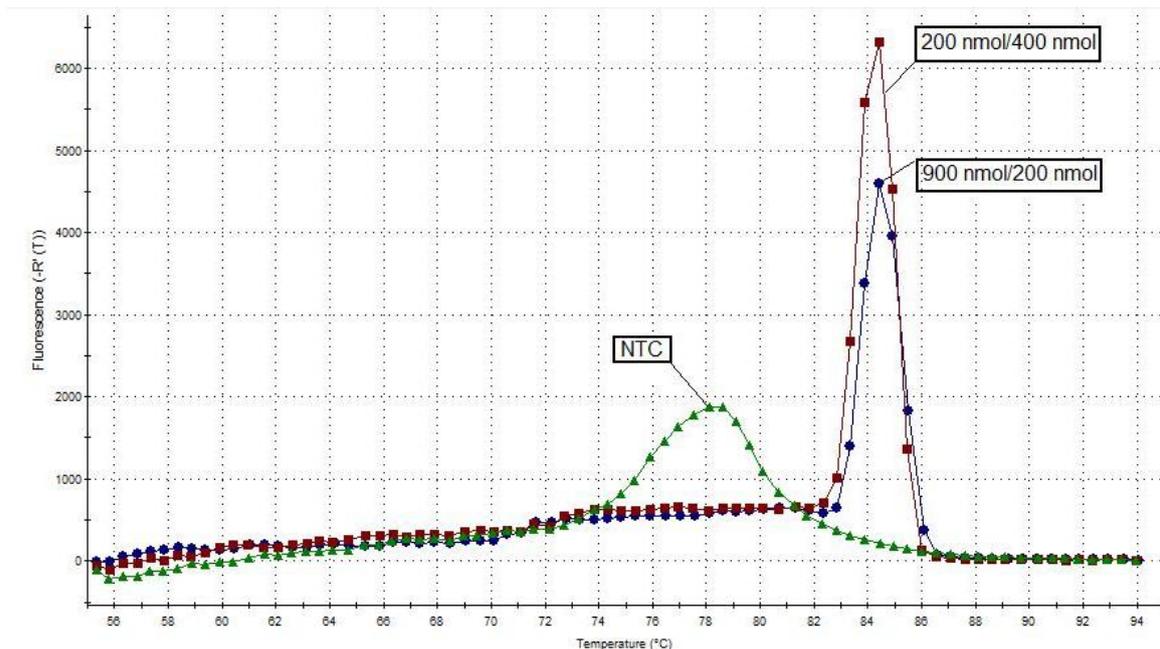
Neben der Spezifität der Primer ist die Primer-Konzentration für die Quantifizierung mittels PCR von entscheidender Bedeutung. Für die Ermittlung der optimalen Primerkonzentration des *Flectobacillus*-QPCR-Primerpaares wurde eine Primertitration im Bereich zwischen 100-900 nmol durchgeführt. Die Untersuchung der unterschiedlichen Primerkonzentrationen und der Negativ-Kontrollen erfolgte jeweils in Triplikaten. Die folgende Abbildung 16 zeigt den Anstieg der Fluoreszenzwerte im Verlauf der Amplifizierung.



**Abbildung 16** Verlauf des Fluoreszenzanstiegs während der Titration des Primerpaares FlectobacQPCR. Die Abbildung zeigt eine graphische Auftragung der Fluoreszenz (dRn) gegen die Anzahl der PCR-Cyclen für die Primertitration mit dem Primerpaar FlectobacQPCR (100-900 nmol) und 34,8 ng/μl genomischer DNA von *Flectobacillus* JSF15 als Matrice. Die Primerkonzentration mit 200 nmol FlectobacQPCR-forward und 400 nmol FlectobacQPCR-reverse (schwarz markiert) ergab den niedrigsten Ct-Wert und die höchste Fluoreszenz. Die orange markierte Kombination mit 900 nmol FlectobacQPCR-forward und 200nmol FlectobacQPCR-reverse ergab den höchsten Ct-Wert und die niedrigste Fluoreszenz. Der Durchbruchspunkt (Threshold Cycle (Ct)) wird in der Abbildung durch eine graue Linie dargestellt.

Die ideale Primer-Konzentration für eine Quantifizierung weist einen möglichst frühen Durchbruchzyklus und eine hohe Fluoreszenzintensität auf. Die in Abbildung 16

dargestellten Amplifikationsverläufe zeigen für die schwarzmarkierte Konzentrationskombination (200 nmol/400 nmol pro Reaktionsansatz) den frühesten Fluoreszenzdurchbruch und den steilsten Kurvenverlauf. Anhand des Durchbruchzyklus und der Differenz der Fluoreszenzintensität vor und nach dem SYBR Green-Experiment (dRn Last) wurde die Primerkonzentration von 200 nmol FlectobacQPCRfor und 400 nmol FlectobacQPCRrev pro Reaktionsansatz als ideal für das entwickelte Assay erachtet. Der orange markierte Kurvenverlauf in Abbildung 16 zeigt eine weniger günstigste Konzentrationskombination. Sie weist im Vergleich zur optimalen Konzentration einen späteren Ct-Wert und einen abgeflachten Kurvenverlauf auf. Essentiell für eine Quantifizierung mittels der QPCR ist neben der optimalen Primerkonzentration die Bildung eines einzigen PCR-Produktes. Zur Kontrolle, ob unerwünschte Nebenprodukte auftraten, wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurve aufgenommen. Dafür wurde schrittweise die Temperatur von 55°C auf 95°C erhöht und parallel die Fluoreszenzintensität der Reaktionsansätze gemessen.



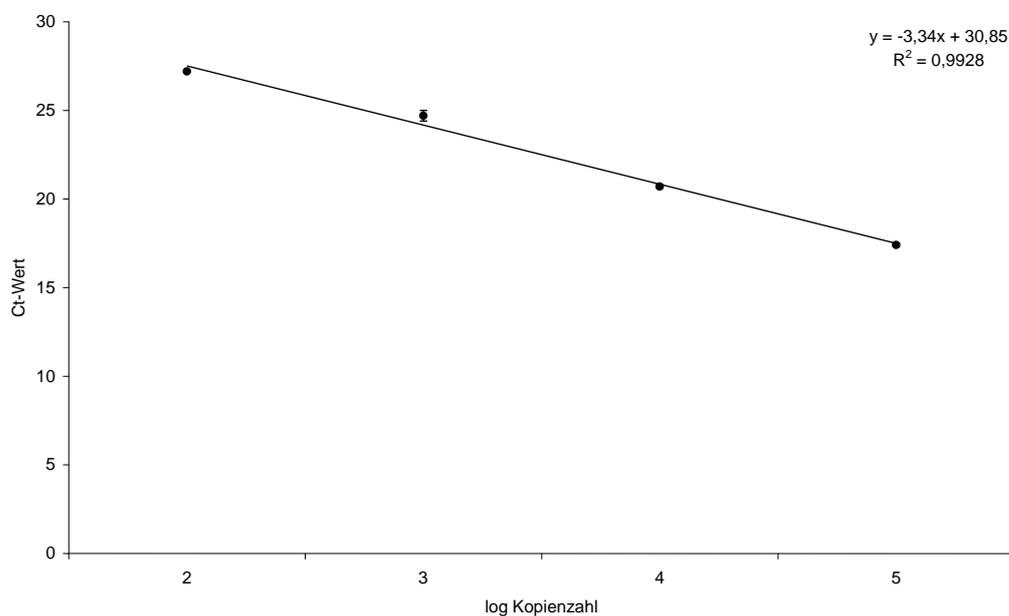
**Abbildung 17 Schmelzkurve der spezifischen PCR-Produkte nach Primertitration mit dem Primerpaar FlectobacQPCR.** Die Abbildung zeigt den Vergleich der Schmelzkurve des Primerpaar FlectobacQPCR in der optimierten Konzentration bei 200 nmol/400 nmol pro Reaktionsansatz im Vergleich zur ungeeigneten Konzentrationskombination (900 nmol/200 nmol pro Reaktionsansatz) und der Negativkontrolle (NTC). Als Matrixe wurde 34,8 ng/µl genomischer DNA von *Flectobacillus roseus* JSF15 in die PCR eingesetzt.

Die in Abbildung 17 dargestellten Schmelzkurven zeigen für die Positivkontrollen einen scharf abgegrenzten Schmelzpunkt bei 84,4°C und für die Negativkontrolle einen breiten Schmelzkurvenverlauf zwischen 77-79°C. Der Schmelzpunkt des Amplifikats stimmt mit

dem mit Hilfe von OligoCalc berechneten theoretischen Schmelzpunkt von 83,5°C annähernd überein. Bei dem in der Negativkontrolle aufgetretenen Schmelzkurvenverlauf handelt es sich um Primer-Dimere, die bei einem Primer-Überschuss oder einem Mangel an Matrizen-DNA auftreten. Primer-Dimere zeichnen sich aufgrund ihrer kurzen Nukleotidsequenz und ihrer unspezifischen Paarung durch niedrige Schmelzpunkte und breite Schmelzkurvenverläufe aus. Da keine der Konzentrationskombinationen der Positivkontrollen ein solches Produkt aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass die in den PCR-Reaktionen eingesetzten Primer keine unspezifischen Nebenprodukte bzw. Primerdimere bildeten. Anhand dieses Ergebnisses konnte davon ausgegangen werden, dass nur ein einziges spezifisches PCR-Produkt im Laufe der Amplifikation entsteht. Ähnlich wie bei der Interpretation der Amplifikationsverläufe zeigt sich auch bei den in Abbildung 17 dargestellten Schmelzkurven, dass die Primerkombination (200 nmol/400 nmol) für eine Quantifizierung am besten geeignet ist, da in dieser Kombination mehr SYBR-Green freigesetzt wird als vergleichsweise bei der Primerkombination von 900 nmol/200 nmol. Eine größere Menge an freigesetzten SYBR-Green lässt auf eine größere Menge an gebildeten Amplifikat rückschließen, was wiederum eine höhere Sensitivität des Assays bewirkt.

### 3.8 Effizienz und Linearität der *real-time* PCR-Methode

Für die Effizienz- und Linearitätsbestimmung der neuentwickelten *real-time* PCR-Methode wurden drei identische Standardreihen der Ziel-DNA innerhalb eines PCR-Laufes untersucht. Aus den ermittelten Durchbruchzyklen wurden Mittelwerte gebildet und die jeweiligen Standardabweichungen berechnet. Für die Bestimmung der PCR-Effizienz wurden die Konzentrationen der Standards (Kopienzahl der Ziel-DNA) halblogarithmisch gegen die Mittelwerte der Durchbruchzyklen aufgetragen und die Geradengleichung berechnet.



**Abbildung 18 Bestimmung der Effizienz und der Linearität der *real-time* PCR mit dem Primerpaar FlectobacQPCR.** Aufgetragen sind die Mittelwerte der Durchbruchzyklen (Ct-Wert) mit ihren Standardabweichungen und die Logarithmen der Kopienzahl (Ziel-DNA). Die Messung wurde insgesamt drei Mal durchgeführt (n=3).

Der in Abbildung 18 dargestellte Korrelationskoeffizient ( $R^2=0,9928$ ) zeigt für das neuentwickelte Assay eine hohe Linearität zwischen dem Durchbruchzyklus und der logarithmischen Kopienzahl. Um eine Aussage über die Präzision der Methode zu fällen wurde die Effizienz ( $E$ ) mit Hilfe der Formel von Rasmussen (2001) berechnet:

$$E = 10^{[1/\text{Steigung}]}$$

Die Effizienz der PCR mit dem neuentwickelten Primerpaar FlectobacQPCR betrug 1,99 und entsprach damit annähernd der optimalen Effizienz einer *real-time* PCR mit einer Verdopplung der Ziel-DNA pro Zyklus.

### 3.9 Inter- und Intra-Assayabweichung

Für die Etablierung einer neuentwickelten *real-time* PCR-Methode müssen die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit des Assays bestimmt werden. Eine Möglichkeit, um diese Faktoren zu ermitteln, ist die Bestimmung der Inter- und Intra-Assayabweichung. Für die Bestimmung der Assayabweichungen wurden die PCR-Bedingungen der neuentwickelten Methode (vgl. 2.22.3) und die Kalibrierstandards aus Abschnitt (2.22.4) verwendet. Die Bestimmung der Intra-Assay-Abweichung erfolgte jeweils in Triplikaten aus vier unabhängigen Messreihen. Für die Berechnung der Intra-Assay-Abweichung wurden die Ct-Werte der Kalibrierstandards herangezogen und für jede Messreihe der Mittelwert und die Standardabweichung der einzelnen Kalibrierstandards berechnet. Der durch das Intra-Assay-Experiment bestimmte Abweichungsbereich der neuentwickelten Methode lag bei 0,1-1%. Die Bestimmung der Inter-Assay-Abweichung erfolgte auf Basis der Ct-Werte aus vier unabhängigen Messreihen. Für die Bestimmung wurden die Ct-Werte der Kalibrierstandards aus allen vier Messreihen gemittelt und die Standardabweichungen berechnet. Der durch das Inter-Assay-Experiment bestimmte Abweichungsbereich lag bei 1-3%.

### **3.10 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Belebtschlamm**

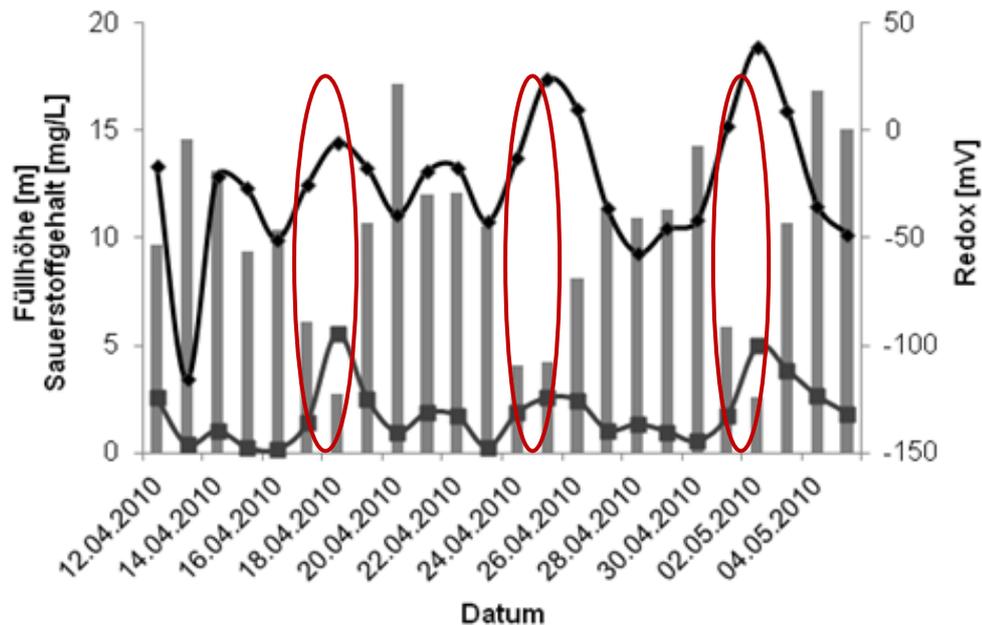
Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse über das Wachstumsverhalten von *F. roseus* und *T. eikelboomii* wurden über 6 Monate in einer unter Realbedingungen betriebenen Kläranlage eines regionalen Lebensmittelherstellers bestimmt. Als Indikator für das Wachstum der beiden Fadentypen diente hierbei die Konzentration ihrer 16S-rDNA in Relation zur 16S-rDNA der Gesamtbakterienpopulation im Belebtschlamm. Die 16S-rDNA-Konzentration wurde mittels *real-time* PCR bestimmt. Für die Bestimmung der Konzentration an *F. roseus* wurde die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und in Abschnitt (2.22.3) beschriebene Methode verwendet. Die Quantifizierung von *T. eikelboomii* wurde modifiziert nach der von (Vervaeren *et al.*, 2005) beschriebenen PCR-Methode durchgeführt (vgl. 2.22.3). Parallel zur Quantifizierung von *T. eikelboomii* und *F. roseus* wurde durch den Kläranlagenbetreiber der Sauerstoffgehalt, das Redox-Potenzial und die Temperatur im Belebtschlammbecken und die Füllhöhe des Sammelbeckens bestimmt. Das Sammelbecken der Kläranlage stand in direkter Verbindung mit den Betriebstraßen des Lebensmittelherstellers und speiste das Belebungsbecken mit Abwässern aus der Produktion. Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Konzentration der Fadenbakterien, den physikalischen Parametern und der Füllhöhe des Sammelbeckens zu untersuchen, wurden die in Tabelle 33 aufgeführten Klärschlammproben in fünf Zeiträume (A-E) unterteilt und mit den als „Beckenwerten“ zusammengefassten Parametern korreliert.

#### **3.10.1 Nachweis der Fadenbakterien mit konventioneller PCR**

Für die Quantifizierung wurden die Klärschlammproben wie in Abschnitt (2.20.3) beschrieben aufgearbeitet und zum Screening auf die gewünschten Fadenbakterientypen in eine PCR mit spezifischen Primern (Tabelle 10) eingesetzt. Nach einer visuellen Konzentrationseinschätzung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese wurden im Anschluss die Konzentrationen an *F. roseus* und *T. eikelboomii* nach den im Abschnitt (2.22.3) beschriebenen *real-time* PCR-Methoden bestimmt.

### 3.10.2 Korrelation der Beckenwerte an Produktionstagen und Wochenenden

Die Korrelation der „Beckenwerte“ aus den Untersuchungszeiträumen (A-E) ergab ein kontinuierliches Muster für die Wochenenden und die Produktionstage.

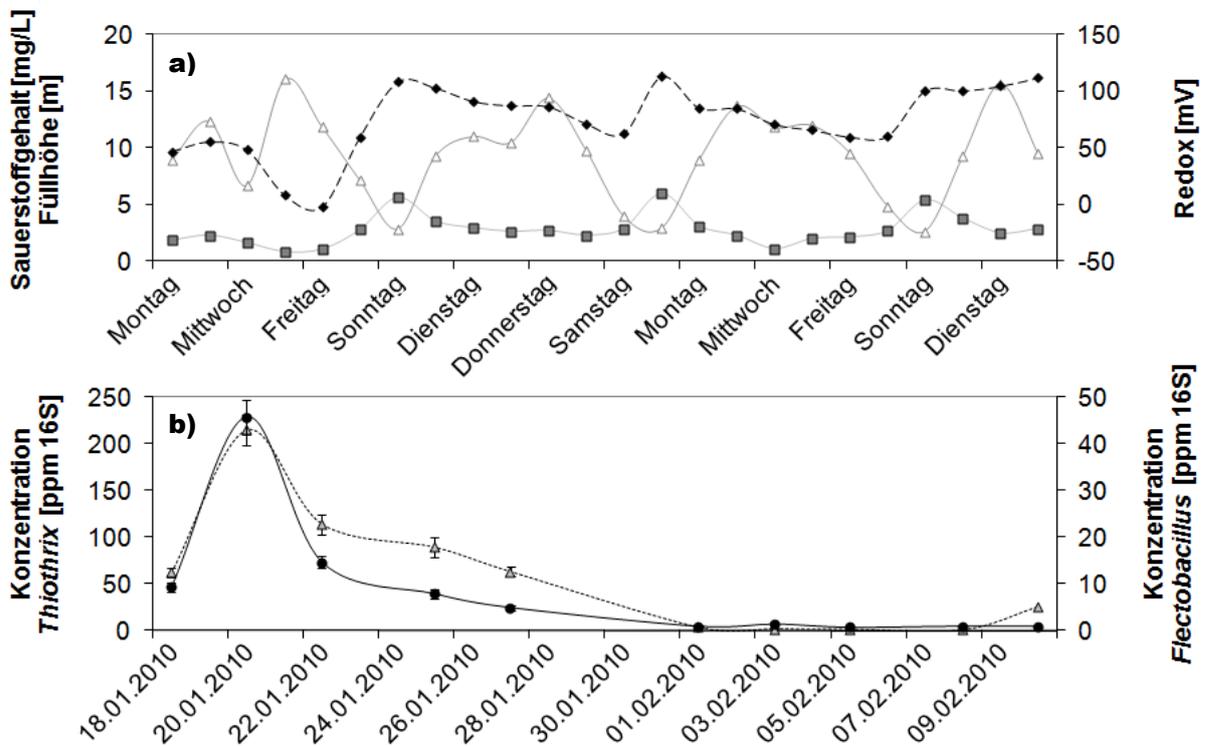


**Abbildung 19 Veränderung der Beckenwerte an den Wochenenden.** Als Beckenwerte sind die Füllhöhe des Außenbeckens (■) der Sauerstoffgehalt (■) und das Redoxpotenzial (●) dargestellt. Die rot markierten Bereiche stellen die Wochenenden im Untersuchungszeitraum (D) dar.

Wie in Abbildung 19 exemplarisch für den Zeitraum (D) dargestellt, traten im gesamten Untersuchungszeitraum (A-E) an den Wochenenden eine Verringerung der Füllhöhe des Sammelbeckens und ein Anstieg des Sauerstoffgehaltes und des Redoxwertes im Belebungsbecken auf. Desweiteren konnte für die Produktionstage ein mit der Erhöhung der Füllhöhe des Sammelbeckens verbundener Rückgang des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials beobachtet werden. Der Zusammenhang zwischen der Füllhöhe des Sammelbeckens, des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials lässt sich damit erklären, dass die Lebensmittelproduktion nur an den Werktagen von Montag bis Samstag stattfand, wobei der Samstag als Reinigungstag für die Produktionsstraßen vorgesehen war (Uhlmann persönliche Mitteilung).

### 3.10.3 Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (A)

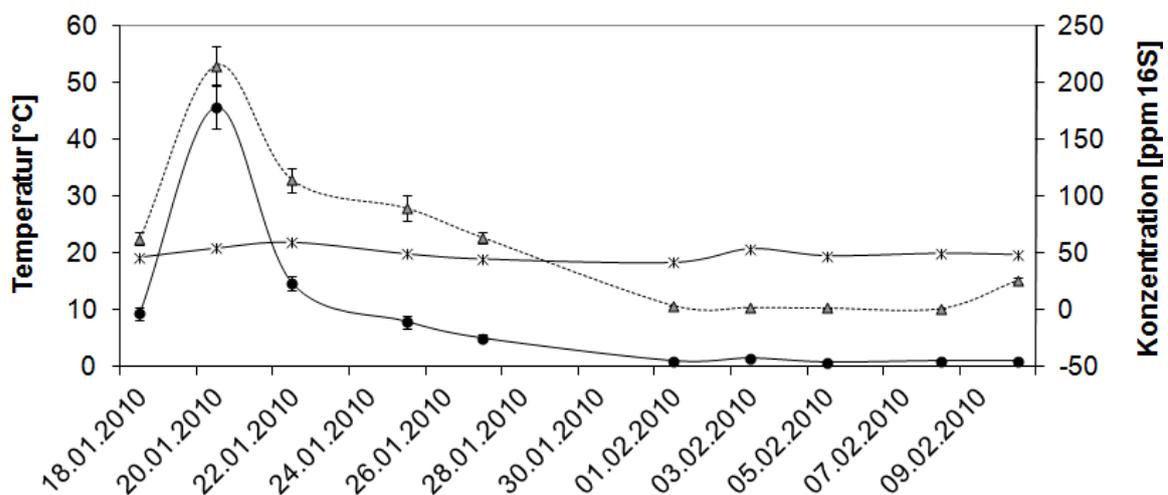
Für die Untersuchungen des Zeitraums (A) wurden die in Tabelle 33 dargestellten Klärschlammproben vom 18.01.10 bis 10.02.10 und die dazu gehörigen Beckenwerte und Temperaturen aus dieser Periode verwendet. Die Untersuchungsperiode (A) stellt einen der beiden untersuchten Winterzeiträume dar. Die Temperatur im Belebungsbecken lag in dieser Periode im Mittel bei 19,9°C.



**Abbildung 20** Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 18.01.2010 bis 10.02.2010 im Zusammenhang mit Beckenwerten. a) Als Beckenwerte sind der Sauerstoffgehalt (—■—) und der Redox-Wert (—◆—) im Belebungsbecken und die Füllhöhe (—△—) des Sammelbeckens aufgetragen. Bei der Füllhöhe handelt es sich um den Pegelstand des Sammelbeckens, das die biologische Reinigungsstufe der Kläranlage speist. Das Becken steht in direkter Verbindung zur chemisch-physikalischen Flotation und damit zur Fabrikation des Lebensmittelherstellers. b) Die Konzentration von *T. eikelboomii* (—△—) und *F. roseus* (—◆—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Die Kopienzahl der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $4,8 \cdot 10^7$  und im Maximum bei  $4,2 \cdot 10^8$  Kopien pro mL Klärschlamm.

Die Abbildung 20a stellt den Verlauf der Beckenwerte in der Periode vom 18.01.10 bis 10.02.10 dar. Der Untersuchungszeitraum (A) war durch einen starken Rückgang beider Fadentypen gekennzeichnet. Die Konzentration von *T. eikelboomii* sank im gesamten Zeitraum von anfänglichen 62 ppm am 18.01.10 auf 26 ppm am 10.02.10 ab. *F. roseus* zeigte ein ähnliches Verhalten, da auch der Gehalt dieses Bakteriums von ursprünglich

9 ppm auf 1 ppm abnahm (Abbildung 20b). In der kurzen Periode vom 18.01.2010 bis 22.01.2010 lagen der Redoxwert im Belebungsbecken im Mittel bei 31,4 mV und der Mittelwert des Sauerstoffgehalts bei 1,5 mg/L. In diesem Zeitraum erreichten beide Fadentypen am 20.01.10 ihren Maximalgehalt für den gesamten Untersuchungszeitraum (A) und sanken im Anschluss daran kontinuierlich ab (Abbildung 20b). Der Rückgang der Fadenbakterien ging mit einer Erhöhung des Redoxwertes und des Sauerstoffgehaltes im Belebungsbecken einher (Abbildung 20a). Der Redoxwert und der Sauerstoffgehalt stiegen ab dem 23.01.2010 an und lagen bis zum Ende des Messzeitraumes im Mittel bei 85,8 mV bzw. 3,1 mg/L. Neben dem Redoxpotenzial und dem Sauerstoffgehalt hat auch die Temperatur einen massgeblichen Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen. Aufgrund dessen wurden auch die Temperaturmesswerte aus dem Versuchszeitraum (A) mit den Konzentrationen der Fadenbakterien korreliert.



**Abbildung 21** Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 18.01.10 bis 10.02.2010 im Zusammenhang mit der Temperatur im Belebungsbecken. Die Temperatur (—\*) im Belebungsbecken wurde täglich durch die Mitarbeiter der Firma APF gemessen. Die Konzentration von *Thiothrix eikelboomii* (---Δ---) und *Flectobacillus roseus* (—●—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Die Kopienzahl der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $4,8 \cdot 10^7$  und im Maximum bei  $4,2 \cdot 10^8$  Kopien pro mL Klärschlamm.

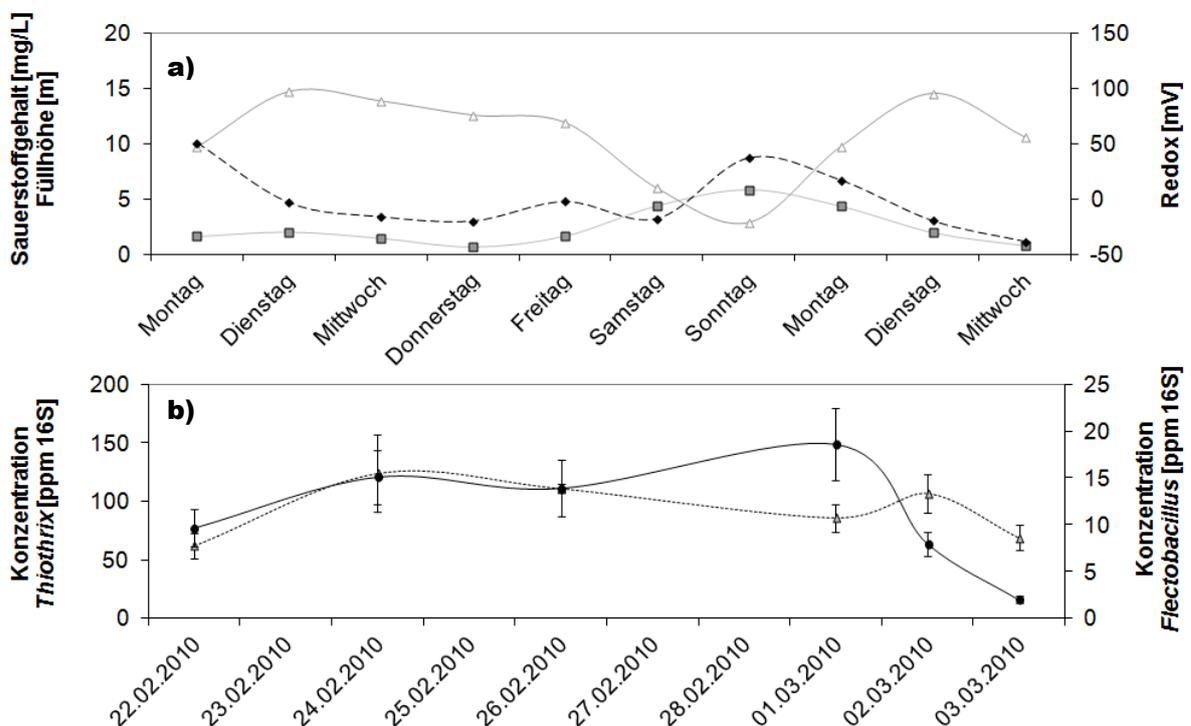
Die Abbildung 21 zeigt, dass im Untersuchungszeitraum (A) keine stärkeren Temperaturschwankungen im Belebungsbecken auftraten und daher kein direkter Zusammenhang zwischen der Abnahme der Fadenbakterien und der Temperatur bestand.

### 3.10.4 Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (B)

Im Untersuchungszeitraum (B) wurden Klärschlammproben vom 22.02.10 bis 03.03.10 (Tabelle 33) quantifiziert und mit den Beckenwerten und Temperaturen aus dem Zeitraum verglichen. Der Redoxwert des Belebtschlammes lag im Mittel bei -0,1 mV und der Sauerstoffgehalt im Mittel bei 2,5 mg/L. Die Periode (B) stellt den zweiten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Winterzeitraum dar. Das Temperaturmittel des Belebtschlammes betrug in diesem Zeitraum 20°C.

#### 3.10.4.1 Veränderungen des Habitats im Zeitraum (B)

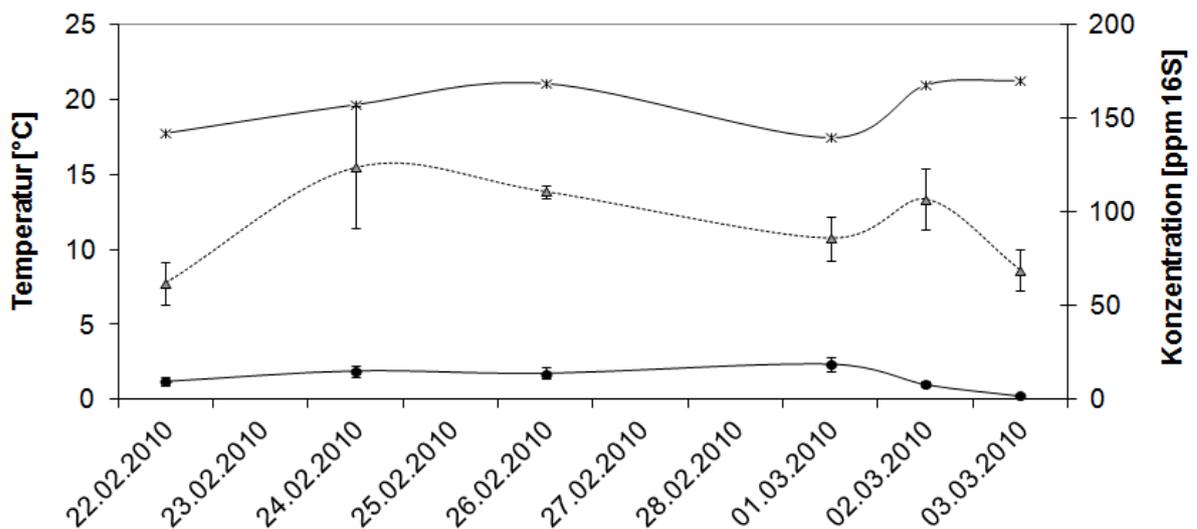
Der Untersuchungszeitraum (B) war charakterisiert durch ein Absinken des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials mit dem Verlauf der Werkswache und einer markanten Veränderung der physikalischen Parameter an dem Wochenende vom 26.02.10 auf den 01.03.10.



**Abbildung 22 Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 22.02.2010 bis 03.03.2010 im Zusammenhang mit Beckenwerten.** a) Als Beckenwerte sind der Sauerstoffgehalt (-◆-) und der Redox-Wert (-◆-) im Belebtschlamm und die Füllhöhe (-△-) des Sammelbeckens aufgetragen. Bei der Füllhöhe handelt es sich um den Pegelstand des Sammelbeckens das die biologische Reinigungsstufe der Kläranlage speist. Das Becken steht in direkter Verbindung zur chemisch-physikalischen Flotation und damit zur Fabrikation des Lebensmittelherstellers. b) Die Konzentration von *T. eikelboomii* (-△-) und *F. roseus* (-◆-) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser

Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $8,0 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $1,5 \cdot 10^9$  Kopien pro mL Klärschlamm.

Die Abbildung 22a zeigt, dass am 22.02.10 zunächst ein positives Redoxpotenzial vorlag, das mit dem Wochenverlauf schrittweise in den negativen Bereich absank. Der Rückgang des Redoxpotenzials weist auf eine vermehrte Atmung der Bakterienflora hin, was möglicherweise auf einen erhöhten Substrateintrag aus der Produktion schließen lässt. Ausnahme für die Tendenz der Redoxwerte bildete der 01.03.10. An diesem Tag lag das Redoxpotenzial im positiven Bereich und die Sauerstoffsättigung des Belebtschlammes war auf 4,3 mg/L angestiegen. Eine Erklärung für die Erhöhung der beiden Parameter vom 26.02.10 auf den 01.03.10 könnte das dazwischen liegende Wochenende sein, an dem die Produktion betriebsbedingt eingestellt wurde und eine Reinigung der Betriebsstraße erfolgte. Eine weitere Veränderung der physikalischen Bedingungen zwischen dem 26.02.10 und dem 01.03.10 zeigt das Temperaturschema aus dem Versuchszeitraum.



**Abbildung 23** Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 22.02.10 bis 03.03.2010 im Zusammenhang mit der Temperatur im Belebtsbecken. Die Temperatur (—\*) im Belebungsbecken wurde täglich durch die Mitarbeiter der Firma APF gemessen. Die Konzentration von *T. eikelboomii* (---Δ---) und *F. roseus* (—●—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $8,0 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $1,5 \cdot 10^9$  Kopien pro ml Klärschlamm.

Die Abbildung 23 zeigt, dass am 01.03.10 ein drastischer Temperatureinbruch auf 17,5°C auftrat. Der Temperaturrückgang ging mit der in Abbildung 22a dargestellten wochenendbedingten Erhöhung des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung einher.

### 3.10.4.2 Wachstumsverhalten von *F. roseus* im Zeitraum (B)

Die Konzentration an *F. roseus* verdoppelte sich zu Beginn des Untersuchungszeitraums am 22.02.10 auf den 26.02.10 und blieb bis zum 01.03.10 annähernd konstant (Abbildung 22b). Der Anstieg des Fadenbakteriums ging mit einem Abfall des Redoxpotenzials und einer Temperaturerhöhung im Belebtschlamm einher. Die Temperatur stieg hierbei von ursprünglichen 17,8°C am 22.02.10 auf 21,1°C am 26.2.10 an und das Redoxpotenzial sank von 50,7 mV auf -2,31 mV ab (Abbildung 22a und Abbildung 23). Beide Faktoren können das Wachstum von *F. roseus* im Belebtschlamm begünstigt haben, da sowohl die Temperatur als auch die Nährstoffzufuhr einen wichtigen Betrag zum Wachstum von Mikroorganismen leisten. Ab dem 02.03.10 konnte ein Rückgang von *Flectobacillus roseus* auf 8 ppm verzeichnet werden, was einen möglichen Zusammenhang mit dem erhöhten Sauerstoffgehalt und dem angestiegenen Redoxpotenzial am 01.03.10 nahe legt (Abbildung 22a). Allerdings trat am 01.03.10 auch ein Temperatureinbruch auf, bei dem die Temperatur bis auf 17,5°C absank und sich erst in den nachfolgenden zwei Untersuchungstagen wieder stabilisierte (Abbildung 23). *F. roseus* schien damit auf die veränderten Bedingungen am 01.03.10 reagiert zu haben. Eine klare Differenzierung der Umstände, die den Rückgang des Fadenbakteriums bewirkt haben, war unter den gegebenen Umständen nicht möglich.

### **3.10.4.3 Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii* im Zeitraum (B)**

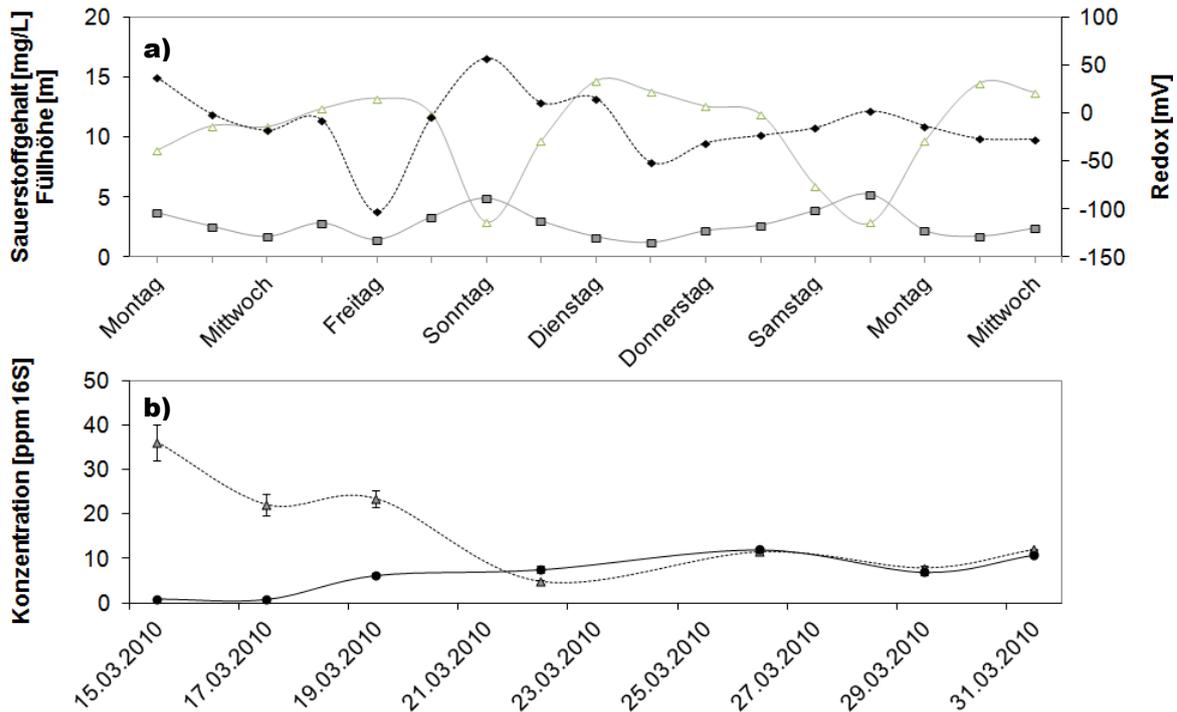
Die Konzentration an *T. eikelboomii* stieg während der ersten drei Tagen des Untersuchungszeitraums von 62 ppm auf 124 ppm an (Abbildung 22b). In diesem Zeitraum sanken das Redoxpotenzial und der Sauerstoffgehalt im Belebungsbecken ab und die Temperatur erhöhte sich auf 19,7°C (Abbildung 22a und Abbildung 23). Die Änderungen der Beckenwerte deuten vermutlich auf einen erhöhten Nährstoffeintrag aus der Produktion hin. Dies würde auch die Temperaturerhöhung in diesem Zeitraum erklären. Sowohl der Substrateintrag als auch die Temperaturerhöhung können das Wachstum von *T. eikelboomii* begünstigt haben. Am 01.03.10 sank der Gehalt an *T. eikelboomii* im Belebtschlamm ab (Abbildung 22b). Der Rückgang des Fadenbakteriums fiel mit Anstieg des Redoxwertes und des Sauerstoffgehaltes und dem Rückgang der Temperatur im Belebungsbecken zusammen. Eine mögliche Begründung für das Phänomen könnte das dem 01.03.10 vorangegangene Wochenende sein, bei dem die Produktion des lebensmittelverarbeitenden Betriebes eingestellt wurde und eine Reinigung der Produktionsstraße erfolgte. Dies könnte zu einem kurzfristigen Substratmangel und/oder einer Schädigung der Fadenbakterien geführt haben, die das Wachstum von *T. eikelboomii* negativ beeinflusst haben. Ab dem 02.03.10 gingen das Redoxpotenzial und die Sauerstoffsättigung des Belebtschlammes zurück und der Gehalt von *T. eikelboomii* sank von 107 ppm auf 69 ppm ab (Abbildung 22 a,b). Eine mögliche Begründung für den absinkenden Gehalt von *T. eikelboomii* könnte der sehr geringe Sauerstoffgehalt des Belebtschlammes am 03.03.10 sein.

### **3.10.5 Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (C)**

Im Untersuchungszeitraum (C) wurden Klärschlammproben vom 15.03.10 bis 31.03.10 (Tabelle 33) quantifiziert und mit den Beckenwerten und Temperaturen aus dem Zeitraum verglichen. Der Mittelwert des Redoxpotenzials des Belebtschlammes betrug in dieser Periode -11,6 mV und der der Sauerstoffsättigung 2,73 mg/L. Die Temperatur im Belebungsbecken lag im Mittel bei 21,9°C. Der Zeitraum (C) stellte den ersten untersuchten Frühlingszeitraum dar.

### 3.10.5.1 Veränderungen des Habitats im Zeitraum (C)

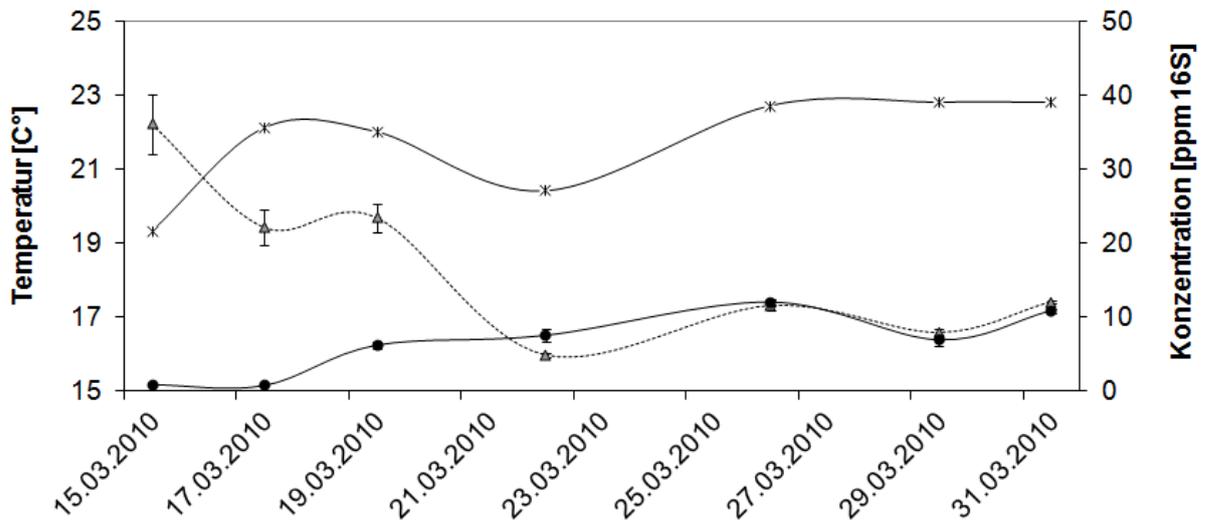
Wie bereits im dem vorigen Versuchszeitraum (B) beschrieben trat auch im Zeitraum (C) ein Anstieg des Sauerstoffgehaltes und des Redoxwertes und eine Verringerung der Füllhöhe des Sammelbeckens an den Wochenenden auf.



**Abbildung 24 Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 15.03.2010 bis 31.03.2010 im Zusammenhang mit Beckenwerten.** a) Als Beckenwerte sind der Sauerstoffgehalt (—■—) und der Redox-Wert (—◆—) im Belebtschlamm und die Füllhöhe (—△—) des Sammelbeckens aufgetragen. Bei der Füllhöhe handelt es sich um den Pegelstand des Sammelbeckens das die biologische Reinigungsstufe der Kläranlage speist. Das Becken steht in direkter Verbindung zur chemisch-physikalischen Flotation und damit zur Fabrikation des Lebensmittelherstellers. b) Die Konzentration von *T. eikelboomii* (—△—) und *F. roseus* (—◆—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $7,0 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $3,7 \cdot 10^9$  Kopien pro mL Klärschlamm.

Die Abbildung 24a zeigt, dass zu Beginn des Untersuchungszeitraums vom 15.03.10 bis zum 19.03.10 eine wertagsbegleitende Reduktion des Redoxpotenzials und des Sauerstoffpotenzials im Belebtschlamm auftrat, die bis zum anschliessenden Wochenende vorhielt.

Der wochenendbedingte Anstieg des Redoxwertes und des Sauerstoffgehaltes konnte noch ein weiteres Mal von Freitag dem 26.03.10 auf Montag dem 29.03.10 beobachtet werden.



**Abbildung 25 Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 15.03.10 bis 31.03.2010 im Zusammenhang mit der Temperatur im Belebtsbecken.** Die Temperatur (—\*) im Belebtsbecken wurde täglich durch die Mitarbeiter der Firma APF gemessen. Die Konzentration von *T. eikelboomii* (---Δ---) und *F. roseus* (—●—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $7,0 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $3,7 \cdot 10^9$  Kopien pro ml Klärschlamm.

Die Abbildung 25 zeigt, dass die Periode (C) durch zwei markante Temperaturänderungen gekennzeichnet war. Bei der ersten Veränderung handelte es sich um eine Temperaturerhöhung zu Beginn der Untersuchungsperiode. Die Temperatur stieg hierbei zwischen dem 15.03.10 und dem 17.03.10 um  $2,8^\circ\text{C}$  an und wurde von einer Reduktion des Redoxwertes begleitet (Abbildung 24a). Die zweite Temperaturveränderung konnte am 22.03.10 beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um einen Temperatureinbruch, bei der die Temperatur von  $19,3^\circ\text{C}$  am 22.03.10 auf  $20,4^\circ\text{C}$  am 22.03.10 absank. Der Temperatureinbruch ging mit einer Erhöhung des Redoxpotenzials und Sauerstoffgehaltes im Belebtsbecken einher (Abbildung 24a). Wie auch schon im Abschnitt (3.10.5.1) beschrieben ging diesem Phänomen ein Wochenende voraus, bei dem betriebsbedingt eine Reinigung der Produktionstrassen erfolgte. Der wochenendbedingte Anstieg des Redoxwertes und des Sauerstoffgehaltes konnte in dem Untersuchungszeitraum (C) noch ein weiteres Mal zwischen Freitag dem 26.03.10 und Montag dem 29.03.10 beobachtet werden.

### 3.10.5.2 Wachstumsverhalten von *F. roseus* im Zeitraum (C)

Der Gehalt an *F. roseus* stieg ab dem 19.03.10 von 1 ppm auf 6 ppm an (Abbildung 24b). Im Vorfeld des Konzentrationsanstiegs von *F. roseus* konnte eine Temperaturerhöhung von 19,3°C auf 22,1°C beobachtet werden. Der Redoxwert sowie der Sauerstoffgehalt des Belebtschlammes gingen in diesem Zeitraum zurück (Abbildung 24a). Am 22.03.10 traten eine rapide Erhöhung des Redoxpotenzials und der Sauerstoffgehaltes auf, die mit einem Temperatursturz auf 20,4°C zusammenfielen (Abbildung 25). *F. roseus* reagierte, im Vergleich zu dem ähnlichen Phänomen vom 01.03.10, nicht auf die veränderten Bedingungen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Temperatur von 20°C im Vergleich zum Temperatursturz vom 01.03.10 nicht unterschritten wurde. *F. roseus* zeigte am Montag den 29.03.10 eine leichte negative Konzentrationsschwankung, die mit einer Erhöhung des Redoxpotenzials einherging (Abbildung 24a,b). Der Mittelwert der *F. roseus*-Konzentration lag im Untersuchungszeitraum (C) bei 6 ppm.

### 3.10.5.3 Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii* im Zeitraum (C)

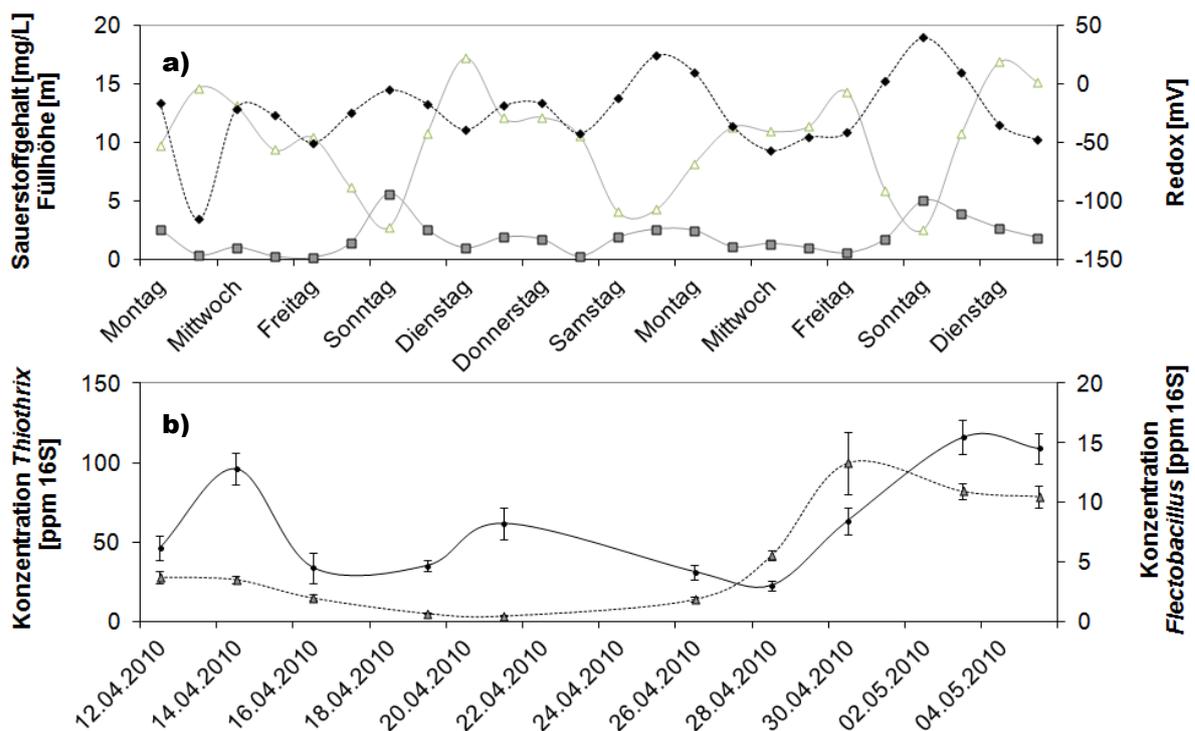
*T. eikelboomii* zeigte zum Beginn des Untersuchungszeitraums einen Gehalt von 36 ppm, der bis zum 19.03.10 auf 23 ppm zurückging. Das rückläufige Wachstum des Fadenbakteriums ging mit einem Rückgang des Sauerstoffgehalts und des Redoxpotenzial im Belebungsbecken einher (Abbildung 24a,b). Am 22.03.10 trat für *T. eikelboomii* ein rapider Konzentrationseinbruch auf, bei dem der Gehalt des Fadenbakteriums von 23 ppm auf 5 ppm zurückging. Der Vorfall fiel mit der wochenendbedingten Erhöhung der Sauerstoffsättigung und des Redoxpotenzials (Abbildung 24a) und einem Temperaturrückgang auf 20,4°C (Abbildung 25) zusammen. *T. eikelboomii* reagierte damit auf die veränderten Bedingungen des Wochenendes. Dieses Phänomen konnte noch einmal am Montag den 29.03.10 beobachtet werden. Hier trat ebenfalls ein leichter Konzentrationsabfall für *T. eikelboomii* nach dem Wochenende auf. Auch in diesem Zusammenhang zeigte sich eine Veränderung des Redoxwertes und des Sauerstoffgehaltes von Freitag auf den darauf folgenden Montag (Abbildung 24a). Im Mittel lag die Konzentration an *T. eikelboomii* im Untersuchungszeitraum (C) bei 17 ppm.

### 3.10.6 Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (D)

Im Untersuchungszeitraum (D) wurden Belebtschlammproben ab dem 12.04.10 bis 05.05.10 analysiert und mit Beckenwerte aus diesem Zeitraum verglichen. Der Untersuchungszeitraum (D) stellt damit den zweiten für den Frühling repräsentieren Zeitraum dar. Während der Periode lag der Redoxwert des Belebtschlamm im Mittel bei -24,4 mV und der Sauerstoffgehalt im Mittel bei 1,85 mg/L. Der Mittelwert der Belebungsbeckentemperatur betrug 24,0 °C.

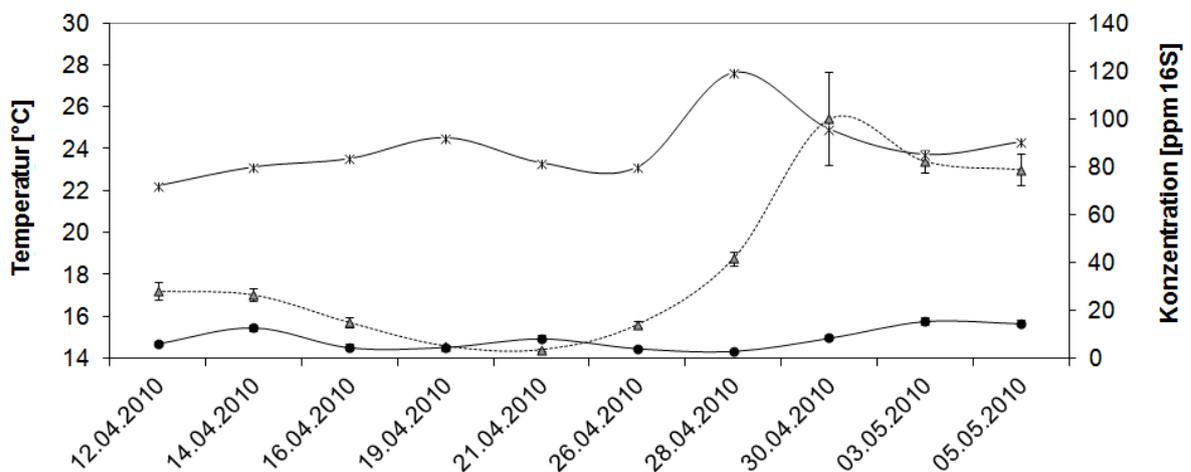
#### 3.10.6.1 Veränderungen des Habitats im Zeitraum (D)

Der wochenendbedingte Anstieg des Redoxpotenzials und des Sauerstoffgehaltes konnte im Untersuchungszeitraum (D) insgesamt an zwei Wochenenden beobachtet werden.



**Abbildung 26 Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 12.04.2010 bis 05.05.2010 im Zusammenhang mit Beckenwerten.** a) Als Beckenwerte sind der Sauerstoffgehalt (—■—) und der Redox-Wert (—◆—) im Belebtsbecken und die Füllhöhe (—△—) des Sammelbeckens aufgetragen. Bei der Füllhöhe handelt es sich um den Pegelstand des Sammelbeckens das die biologische Reinigungsstufe der Kläranlage speist. Das Becken steht in direkter Verbindung zur chemisch-physikalischen Flotation und damit zur Fabrikation des Lebensmittelherstellers. b) Die Konzentration von *T. eikelboomii* (—△—) und *F. roseus* (—◆—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $7,0 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $4,1 \cdot 10^9$  Kopien pro mL Klärschlamm.

Die Abbildung 26a zeigt, eine Reduktion des Redoxwert und der Sauerstoffsättigung in der ersten Phase des Untersuchungszeitraums. Hierbei sank das Redoxpotenzial von ursprünglichen -16,31 mV am 12.04.10 auf -50,42 mV am 16.04.10 ab. Ebenso ging die Sauerstoffsättigung des Belebtschlammes von 2,6 mg/L auf 0,13 mg/L zurück. Nach dem darauf folgenden Wochenende zeigte sich am Montag den 19.04.10 im Belebtschlamm eine wiederholte Erhöhung des Redoxpotenzialpotenzials und der Sauerstoffsättigung. Dieses Phänomen konnte in der Periode (D) nochmals von Freitag dem 30.04.10 auf Montag dem 03.05.10 beobachtet werden. Auch in diesem Fall stiegen der Sauerstoffgehalt und das Redoxpotenzial des Belebtschlammes nach dem Wochenende an.



**Abbildung 27** Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 12.04.10 bis 05.05.2010 im Zusammenhang mit der Temperatur im Belebtsbecken. Die Temperatur (—\*) im Belebungsbecken wurde täglich durch die Mitarbeiter der Firma APF gemessen. Die Konzentration von *Thiothrix eikelboomii* (---Δ---) und *Flectobacillus roseus* (—●—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $7,0 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $4,1 \cdot 10^9$  Kopien pro ml Klärschlamm.

Die Abbildung 27 zeigt, dass zu Beginn des Untersuchungszeitraums eine Erhöhung der Temperatur beobachtet werden konnte. Hierbei stieg die Temperatur von 22,2°C am 12.04.10 auf 23,5°C am 16.04.10 an. Der Temperaturanstieg war begleitet von einem Rückgang des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung des Belebtschlammes (Abbildung 26a). An dem darauf folgenden Montag (19.04.10) trat mit 24,5°C eine Temperaturspitze auf, die mit einer Erhöhung des Redoxwertes und des Sauerstoffgehaltes im Belebungsbecken einherging. Die wochenendbedingte Veränderung der physikalischen Parameter wiederholte sich nochmals von Freitag dem 30.04.10 auf Montag dem 03.05.10. In diesem Fall sank die Temperatur im Belebungsbecken ab und der Sauerstoffgehalt und das Redoxpotenzial des Belebtschlammes stiegen an (Abbildung 26a). Eine zweite starke

Temperaturerhöhung trat am Mittwoch den 28.04.10 auf und hielt bis zum 30.04.10 an. Die Temperatur stieg hierbei auf einen Spitzenwert von 27,6°C am 30.04.10 an.

### **3.10.6.2 Wachstumsverhalten von *F. roseus* im Zeitraum (D)**

Die Konzentration von *F. roseus* verdoppelte sich zu Beginn des Untersuchungszeitraums von 6 ppm am 12.04.10 auf 13 ppm am 14.04.10. Das Wachstum ging mit einer Temperaturerhöhung und einem Rückgang des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials im Belebungsbecken einher (Abbildung 26a,b). Ab dem 16.04.10 sank der Gehalt des Fadenbakteriums auf 5 ppm ab und blieb bis Montag den 19.04.10 konstant (Abbildung 26b). *F. roseus* reagierte damit nicht auf die wochenendbedingten Veränderungen der biologischen Reinigungsstufe. Die Konzentration des Bakteriums stieg in den darauffolgenden Tagen leicht an. Die geringsten *F. roseus*-Konzentrationen des Untersuchungszeitraums (D) konnten am 26.04.10 und 28.04.10 beobachtet werden. In diesem Zeitraum sanken das Redoxpotenzial und der Sauerstoffgehalt im Belebungsbecken ab (Abbildung 26a,b). Am 30.04.10 konnte wieder ein Anstieg von *F. roseus* beobachtet werden. Das Wachstum des Fadenbakteriums fiel damit in den Zeitraum in dem Höchsttemperaturen im Belebungsbecken gemessen wurden (Abbildung 27). Da sich der Gehalt von *F. roseus* nach der Temperaturspitze erhöht hat und nicht bereits mit dem vorangegangenen Absinken des Redoxpotenzials und des Sauerstoffgehaltes, kann davon ausgegangen werden dass es sich in diesem Fall um einen temperaturbedingten Anstieg handelte. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums stieg der Gehalt des Fadenbakteriums weiter an. Damit reagierte *F. roseus* zum zweiten Mal im Untersuchungszeitraum (D) nicht auf die wochenendbedingte Erhöhung des Redoxwertes und der Sauerstoffsättigung. Der Mittelwert der *F. roseus*-Konzentration lag im Untersuchungszeitraum (D) bei 8 ppm.

### **3.10.6.3 Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii* im Zeitraum (D)**

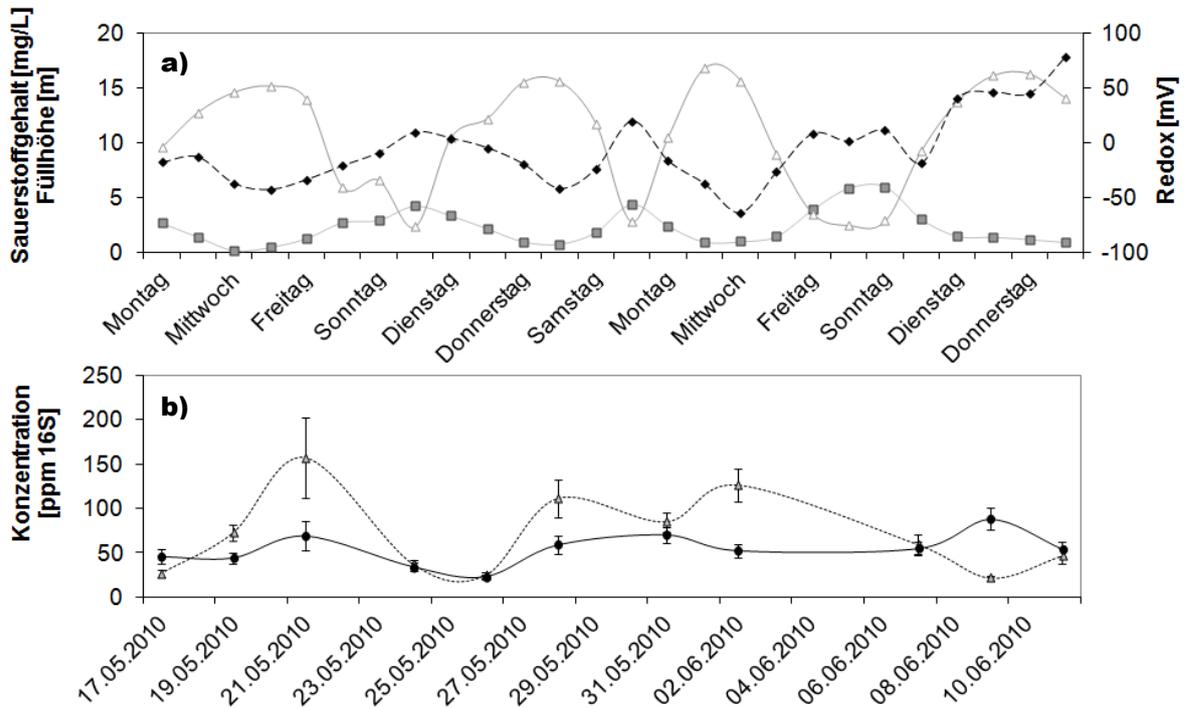
Zu Beginn des Untersuchungszeitraums konnte für *T. eikelboomii* bis zum 16.04.10 einen Konzentrationsrückgang (Abbildung 26b) beobachtet werden, der von einem Absinken des Sauerstoffgehaltes und Redoxpotenzials begleitet wurde. Wie auch schon in den vorherigen Abschnitten beschrieben trat nach dem Wochenende vom 16.04.10 auf den 19.04.10 eine leichte Erhöhung des Redoxpotenzials und des Sauerstoffgehaltes auf, der mit einem Rückgang von *T. eikelboomii* einherging (Abbildung 26a,b). *T. eikelboomii* sank hierbei von ursprünglichen 15 ppm auf 5 ppm ab. Das Fadenbakterium reagiert damit wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben auf die veränderten Bedingungen am Wochenende. Für *T. eikelboomii* konnte ab dem 28.04.10 ein signifikanter Konzentrationsanstieg beobachtet werden, der sowohl mit der drastischen Temperaturerhöhung am 28.04.10 als auch mit dem Rückgang des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung in Verbindung stehen kann (Abbildung 26 b). Die wochenendbedingten Veränderungen von *T. eikelboomii* wiederholte sich im Untersuchungszeitraum (D) noch einmal von Freitag den 30.04.10 auf Montag den 03.05.10. Der Gehalt des Fadenbakteriums sank hierbei von 100 ppm auf 82 ppm ab (Abbildung 26b). Im Mittel lag die Konzentration an *T. eikelboomii* im Untersuchungszeitraum (D) bei 40 ppm.

### **3.10.7 Abhängigkeit der Fadentypen von den Beckenwerten und der Temperatur im Untersuchungszeitraum (E)**

Im Untersuchungszeitraum (E) vom 17.05.10 bis 11.06.10 wurden die in Tabelle 33 aufgeführten Klärschlammproben quantifiziert und mit den physikalischen Parametern des Belebungsbeckens korreliert. Der Untersuchungszeitraum (E) steht repräsentativ für die Veränderung der Biozönose in den Sommermonaten. Der Redoxwert im Belebungsbecken lag im Messzeitraum im Mittel bei -6,2 mV und der Sauerstoffgehalt im Mittel bei 2,3 mg/L. Der Mittelwert der Belebtschlammtemperatur lag während des Untersuchungszeitraum (E) bei 25,7 °C. Über den gesamten jahreszeitlichen Untersuchungsverlauf (A-E) trat damit vom Zeitraum (A) bis zum Zeitraum (E) eine Temperaturerhöhung von 5,8 °C auf.

### 3.10.7.1 Veränderungen des Habitats im Zeitraum (E)

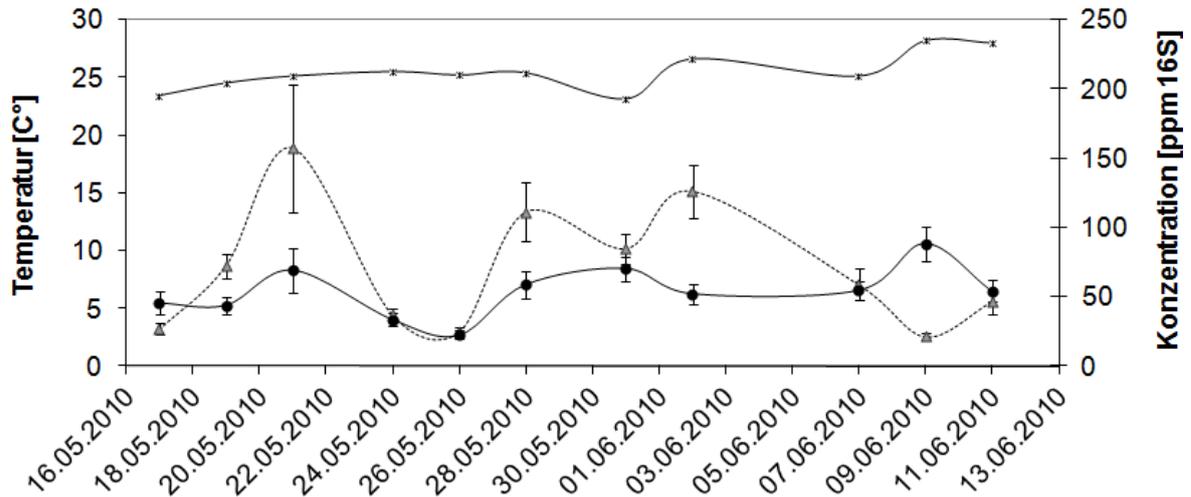
Im Untersuchungszeitraum (E) konnten neben den wochenendbedingten Veränderungen der Beckenwerte auch eine der Werkwoche folgende Reduktion der Sauerstoffsättigung des und Redoxpotenzials beobachtet werden.



**Abbildung 28** Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 17.05.2010 bis 11.06.2010 im Zusammenhang mit Beckenwerten. a) Als Beckenwerte sind der Sauerstoffgehalt ( $\square$ ) und der Redox-Wert ( $- \blacklozenge -$ ) im Belebungsbecken und die Füllhöhe ( $\triangle$ ) des Sammelbeckens aufgetragen. Bei der Füllhöhe handelt es sich um den Pegelstand des Sammelbeckens das die biologische Reinigungsstufe der Kläranlage speist. Das Becken steht in direkter Verbindung zur chemisch-physikalischen Flotation und damit zur Fabrikation des Lebensmittelherstellers. b) Die Konzentration von *T. eikelboomii* ( $--\triangle--$ ) und *F. roseus* ( $-\blacklozenge-$ ) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $2,5 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $1,1 \cdot 10^9$  Kopien pro mL Klärschlamm.

Die Abbildung 28a zeigt eine wochenendbedingte Erhöhung des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials an den Wochenenden vom 21.05.10-24.05.10 und 28.05.10-31.05.10. Diese wiederkehrenden Phänomene stimmen mit den bereits in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Veränderungen überein.

Die Montage des Untersuchungszeitraums zeigten nach den wochenendbedingten Veränderungen im Vergleich zu den vorangegangenen Freitagen erhöhte Redox- und Sauerstoffsättigungswerte auf.



**Abbildung 29** Konzentration an *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Zeitraum vom 17.05.10 bis 11.06.2010 im Zusammenhang mit der Temperatur im Belebtsbecken. Die Temperatur (—\*) im Belebtsbecken wurde täglich durch die Mitarbeiter der Firma APF gemessen. Die Konzentration von *Thiothrix eikelboomii* (---Δ---) und *Flectobacillus roseus* (—●—) sind als Kopien-Anteil der 16S-DNA dieser Fadenbakterien an der Kopien-Zahl der 16S-Gene aller in der Probe befindlichen Bakterien in ppm angegeben. Der Anteil der 16S-Gene aller Bakterien lag im Minimum bei  $2,5 \cdot 10^8$  und im Maximum bei  $1,1 \cdot 10^9$  Kopien pro ml Klärschlamm.

Die Abbildung 29 zeigt, dass die Temperatur zu Beginn des Untersuchungszeitraums anstieg und ab dem 19.05.10 bis zum 28.05.10 annähernd konstant im Bereich von 25°C blieb. Am Montag den 31.05.10 konnte dann ein Temperatureinbruch auf 23,1°C beobachtet werden. Das Absinken der Belebtsbeckentemperatur ging mit einer wochenendbedingten Erhöhung des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung einher (Abbildung 28a). Zum Ende des Messzeitraums konnte ab dem 09.06.10 eine Temperaturerhöhung des Belebtschlammes auf 28°C beobachtet werden.

### 3.10.7.2 Wachstumsverhalten von *F. roseus* im Zeitraum (E)

Zu Beginn des Untersuchungszeitraums konnte ein Wachstumsschub von *F. roseus* beobachtet werden. Die Konzentrationserhöhung des Fadenbakteriums ging mit der in Abschnitt 3.10.7.1 beschriebenen Temperaturerhöhung und dem Rückgang der Sauerstoffsättigung in der ersten Woche des Untersuchungszeitraums einher (Abbildung 28a). Am Montag den 24.05.10 ging der Gehalt des Fadenbakteriums von 69 ppm auf 34 ppm zurück. *F. roseus* reagierte damit auf die wochenendbedingten

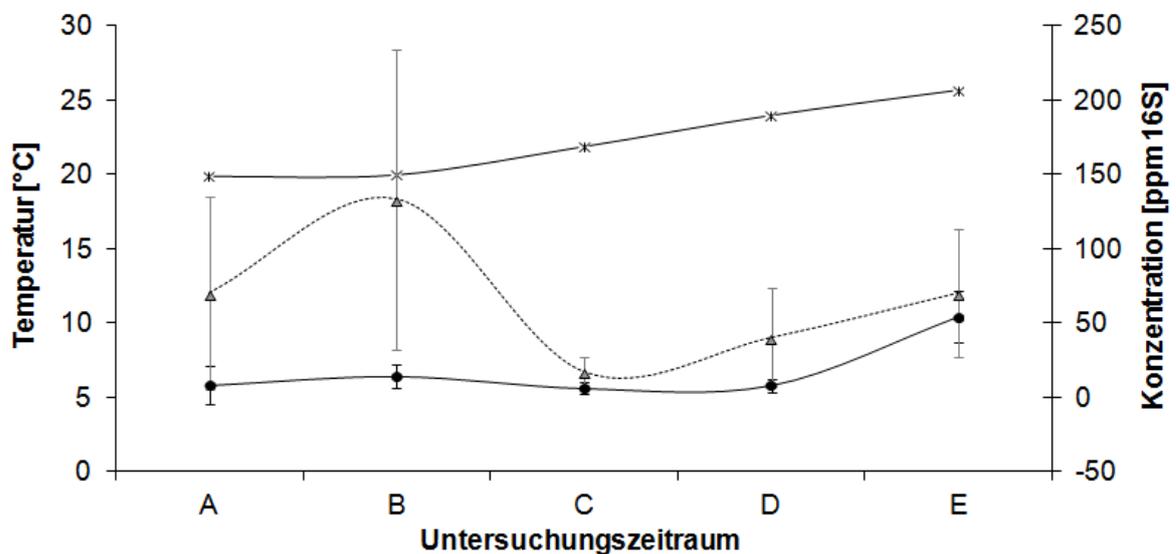
Veränderungen (Abbildung 28b). Ab dem 28.05.10 stieg der Gehalt des Fadenbakteriums wieder an und erhöhte sich bis zum Montag den 31.05.10 auf 70 ppm (Abbildung 28b). In diesem Fall reagierte *F. roseus* nicht auf die wochenendbedingten Veränderungen in der biologischen Reinigungsstufe, sondern zeigte eine höhere Konzentration als an dem vorangegangenen Freitag. Zeitgleich mit der Erhöhung des *F. roseus*-Gehaltes am 31.05.10 trat der in Abschnitt 3.10.7.1 beschriebene Temperatureinbruch auf. In den darauf folgenden Tagen zeigte *F. roseus* einen Rückgang auf ca. 50 ppm der bis zum 07.06.10 anhielt (Abbildung 28b). Das Fadenbakterium schien damit auf den Temperaturrückgang reagiert zu haben. Mit den steigenden Temperaturen ab dem 02.06.10 erhöhte sich auch die *F. roseus*-Konzentration wieder. Der Gehalt des Fadenbakteriums stieg bis zum 09.06.10 auf 88 ppm und erreichte damit die höchste Konzentration im gesamten Untersuchungszeitraum (E). Trotz der hohen Temperaturen im Belebungsbecken ging der Gehalt bis zum Ende des Messzeitraums auf 54 ppm zurück. Im Untersuchungszeitraum (E) lag der Mittelwert von *F. roseus* bei 54 ppm. Damit erreichte der Fadentyp in diesem Zeitraum die höchste Konzentration im Vergleich zu den Untersuchungsperioden (A-D).

### **3.10.7.3 Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii* im Zeitraum (E)**

Im Untersuchungszeitraum (E) konnte der wochenendbedingte Konzentrationsrückgang von *T. eikelboomii* an zwei Montagen beobachtet werden. Das erste Mal trat der Rückgang von Freitag den 21.05.10 auf Montag den 24.05.10 auf und das zweite Mal von Freitag den 28.05.10 auf Montag den 31.05.10 (Abbildung 28b). Insgesamt zeigte *T. eikelboomii* im Untersuchungszeitraum (E) starke Konzentrationsschwankungen. Im Mittel lag die Konzentration von *T. eikelboomii* im Untersuchungszeitraum (E) bei 70 ppm.

### 3.10.8 Temperaturabhängigkeit der Fadenbakterien im Belebtschlamm

Die in dem folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen die Temperaturabhängigkeit der Fadenbakterien *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Gesamtuntersuchungszeitraum (A-E). Die Temperatur im Belebungsbecken ist neben dem Zulauf aus der Fabrikation und der Aktivität der Bakterien auch von den Witterungsverhältnissen und damit von der Jahreszeit abhängig. Um einen Überblick über den jahreszeitlichen Verlauf der Fadenbakterienkonzentration in Relation zur Temperatur zu erhalten, wurden die Gehalte an *T. eikelboomii* und *F. roseus* für die Einzelmesszeiträume gemittelt und mit den Temperaturmittelwerten korreliert.



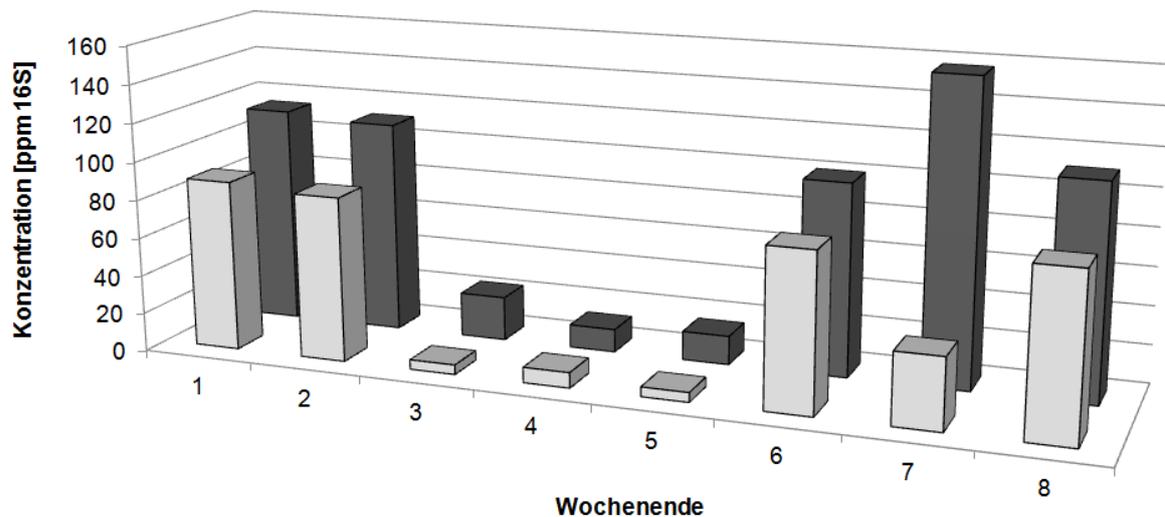
**Abbildung 30** Abhängigkeit der Konzentration an *Thiothrix eikelboomii* und *Flectobacillus roseus* zur Temperatur im Belebungsbecken. Aufgetragen sind die Temperaturmittelwerte im Belebungsbecken (—\*) und die Mittelwerte der Kopien-Zahlen von *Thiothrix eikelboomii* (-△-) und *Flectobacillus roseus* (—●—) aus den Versuchszeiträumen A), B), C), D) und E).

Die Abbildung 30 zeigt, dass die Konzentration an *F. roseus* in den Winter- und Frühlingsmonaten weitestgehend konstant blieb und erst im Untersuchungszeitraum (E) anstieg. Der Temperaturunterschied zwischen den Untersuchungszeiträumen (D) und (E) lag bei 1,7°C. Der Gehalt von *F. roseus* erhöhte sich hierbei um den Faktor sieben. *T. eikelboomii* zeigte keine eindeutige Temperaturabhängigkeit, da die Konzentration während des Winter- und Frühlingszeitraumes stark schwankte (Abbildung 30).

### 3.10.9 Zusammenfassung des Wachstumsverhaltens der Fadentypen

#### 3.10.9.1 Wochenendbedingter Rückgang von *T. eikelboomii*

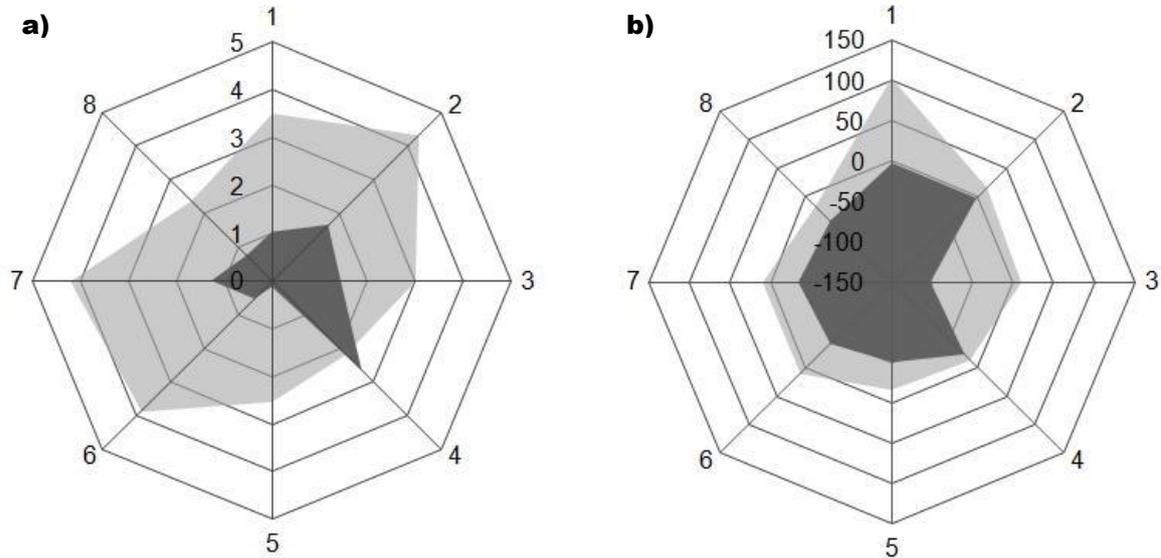
Die Korrelation der Beckenwerte und der Quantifizierungsergebnisse aus den Untersuchungszeiträumen (A-E) zeigte an den Wochenenden einen wiederkehrenden Konzentrationsrückgang von *T. eikelboomii*.



**Abbildung 31 Wochenendbedingter Konzentrationsschwund an *T. eikelboomii*.** Die Abbildung zeigt die acht im Gesamtuntersuchungszeitraum (A-E) aufgetretenen wochenendbedingten Konzentrationsschwankungen von *T. eikelboomii*. Die dunkelgrauen Balken stellen den Gehalt des Fadenbakteriums an den untersuchten Freitagen dar. Die hellgrauen Balken auf gleicher Höhe die Konzentration an den nachfolgenden Montagen. Die Montage und Freitage sind wie folgt zusammengefasst: (1) 22.01.10, 25.01.10; (2) 26.02.10, 01.03.10; (3) 19.03.10, 22.03.10; (4) 26.03.10, 29.03.10; (5) 16.04.10, 19.04.10; (6) 30.04.10, 03.05.10, (7) 21.05.10, 24.05.10; (8) 28.05.10, 31.05.10

Die Abbildung 31 zeigt den Gehalt von *T. eikelboomii* an den untersuchten Freitagen in Korrelation mit den nachfolgenden Montagen im Gesamtuntersuchungszeitraum (A-E) (Tabelle 33). Die Gehalte des Fadenbakteriums sanken jeweils von Freitag auf den folgenden Montag ab. Die Abnahme von *T. eikelboomii* konnte an acht Wochenenden von insgesamt neun untersuchten Wochenenden beobachtet werden.

Der Rückgang von *T. eikelboomii* an den Wochenenden wurde begleitet von Veränderungen der physikalischen Beckenparameter wie dem Sauerstoffgehalt und dem Redoxpotenzial des Belebtschlammes.

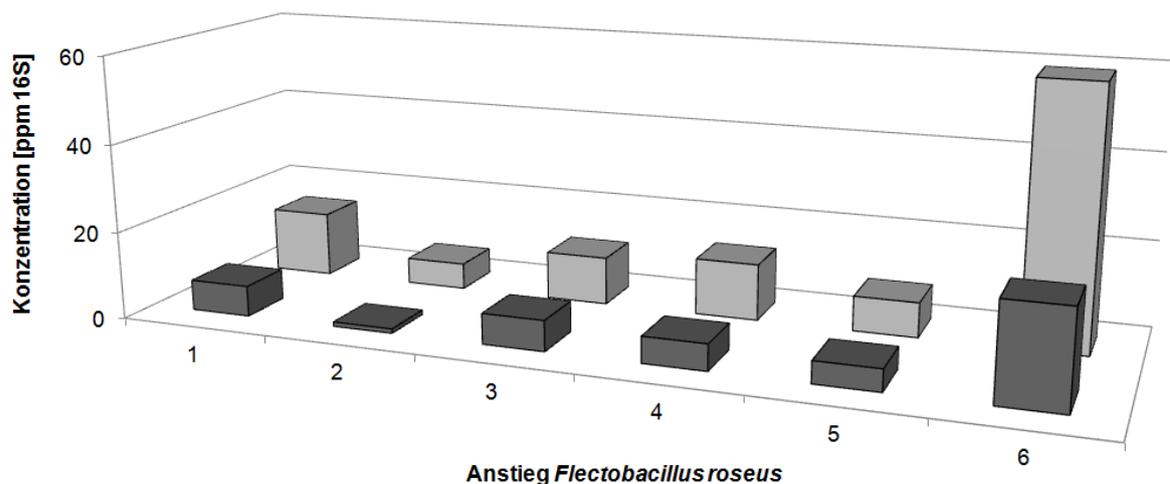


**Abbildung 32 Vergleich der Redoxpotenziale und des Sauerstoffgehaltes von Freitagen und Montagen.** Die Abbildung zeigt das Redoxpotenzial a) und die Sauerstoffsättigung b) der Montage an dem ein Konzentrationsrückgang von *T. eikelboomii* beobachtet wurde im Vergleich zu den jeweils vorangegangenen Freitagen. Die Freitage sind in der Abbildung dunkelgrau dargestellt und die Montagen hellgrau. Die Montage und Freitage sind wie folgt zusammengefasst: (1) 22.01.10, 25.01.10; (2) 26.02.10, 01.03.10; (3) 19.03.10, 22.03.10; (4) 26.03.10, 29.03.10; (5) 16.04.10, 19.04.10; (6) 30.04.10, 03.05.10, (7) 21.05.10, 24.05.10; (8) 28.05.10, 31.05.10

Die Abbildung 32 zeigt, dass an den Montagen, an dem ein Rückgang von *T. eikelboomii* verzeichnet werden konnte, in der Regel eine Sauerstofferhöhung und eine Erhöhung des Redoxpotenzials zu den vorangegangenen Freitagen auftrat. Eine Ausnahme bildete hierbei Montag der 29.03.10 (4), bei dem die Sauerstoffsättigung des Belebtschlammes unter der des vorangegangenen Freitags lag. An fünf von acht Wochenenden, an denen ein Rückgang von *T. eikelboomii* auftrat, konnte neben der Veränderung der Beckenwerte auch ein Temperaturrückgang beobachtet werden. Inwiefern die Veränderungen des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung an den Wochenenden im Zusammenhang mit dem Nährstoffmangel oder der Einleitung von Reinigungsmitteln aus der Produktion standen, ist bisher unbekannt. *T. eikelboomii* zeigte neben der Reaktion auf die wochenendbedingten Veränderungen keine weitere erkennbare Wachstumstendenz im Bezug auf das Redoxpotenzial und die Sauerstoffsättigung des Belebtschlammes.

### 3.10.9.2 Wachstumsverhalten von *F. roseus*

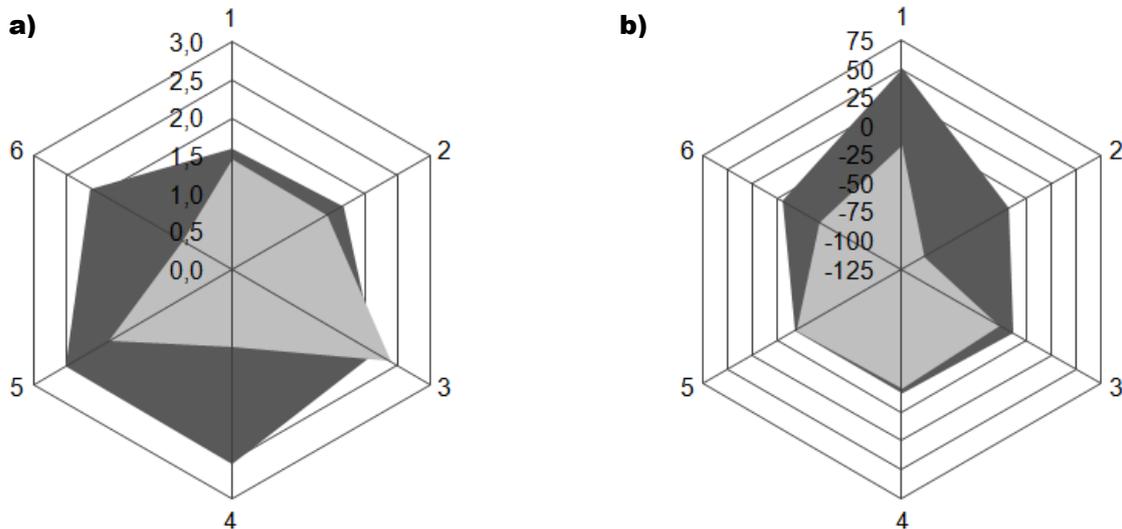
Im Gesamtuntersuchungszeitraum (A-E) konnten insgesamt zehn Konzentrationserhöhungen von *F. roseus* nachgewiesen werden (3.10). Der Vergleich der Beckenwerte und der Temperatur mit den Quantifizierungsergebnissen von *F. roseus* zeigte, dass bei sechs der zehn Konzentrationserhöhungen des Fadenbakteriums eine Abnahme der Sauerstoffsättigung und des Redoxpotenzials auftrat.



**Abbildung 33 Reaktion von *F. roseus* auf die Abnahme der Sauerstoffsättigung und des Redoxpotenzials.** Die Abbildung zeigt die Konzentrationsanstiege von *F. roseus* im Untersuchungszeitraum (A-E) die mit einer Abnahme des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung des Belebtschlamm einhergingen. Die dunkelgrauen Balken stellen den Gehalt von *F. roseus* vor der Reduktion der Beckenwerte dar und die hellgrauen nach der Reduktion. Die Daten sind wie folgt zusammengefasst: (1) 22.02.10, 24.02.10; (2) 17.03.10, 19.03.10; (3) 29.03.10, 31.03.10; (4) 12.04.10, 14.04.10; (5) 19.04.10, 21.04.10, (6) 26.05.10, 28.05.10

Die Abbildung 33 zeigt die mit einer Abnahme der Beckenwerte in Verbindung stehenden Konzentrationserhöhungen von *F. roseus*. Die Gehalte des Fadenbakteriums wurden im Abstand von 48 Stunden bestimmt. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei dem Anstieg vom 26.05.10 auf den 28.05.10 (6), hierbei stieg die Konzentration des Fadenbakteriums von ursprünglichen 22 ppm auf 59 ppm an. Die in Abbildung 33 dargestellten Konzentrationsanstiege von *F. roseus* gingen mit einer Abnahme der Sauerstoffsättigung und des Redoxpotenzial im Belebtschlamm einher. Zur Verdeutlichung dieses Zusammenhangs wurden die Sauerstoffgehalte und die Redoxpotenziale des Belebtschlamm vor dem Anstieg von *F. roseus* mit den Sauerstoffgehalten und den Redoxpotenzialen nach dem Anstieg des Fadenbakteriums korreliert (Abbildung 34).

Für den Vergleich der physikalischen Parameter wurde die Nummerierung der *F. roseus*-Anstiege aus Abbildung 33 übernommen.



**Abbildung 34 Veränderungen der Beckenwerte vor einem Anstieg von *F. roseus*.** Die Abbildung zeigt die Sauerstoffsättigung a) und das Redoxpotenzial b) des Belebtschlammes vor und nach den beobachteten Konzentrationsanstiegen von *F. roseus*. Die Tage mit einem geringeren *F. roseus*-Gehalt sind hierbei dunkelgrau dargestellt und die Tage mit einer erhöhten Konzentration hellgrau. Die Daten sind wie folgt zusammengefasst: (1) 22.02.10, 24.02.10; (2) 17.03.10, 19.03.10; (3) 29.03.10, 31.03.10; (4) 12.04.10, 14.04.10; (5) 19.04.10, 21.04.10, (6) 26.05.10, 28.05.10

Die Abbildung 34a,b zeigt, dass der Belebtschlamm an den Untersuchungstagen mit einer geringeren Konzentration an *F. roseus* (Abbildung 33) eine höhere Sauerstoffsättigung und ein höheres Redoxpotenzial aufwies als an Tagen mit einer hohen *F. roseus*-Konzentration. Ausnahme bildete hierbei der dritte Anstieg von *F. roseus*, bei dem die Sauerstoffsättigung des zweiten Messtages (31.03.10) annähernd identisch war mit dem Sauerstoffgehalt des vorangegangenen Messtages (29.03.10) (Abbildung 34a). Die physikalischen Parameter des dritten Anstieges konnten trotz ihrer Abweichungen in Zusammenhang mit dem Anstieg von *F. roseus* gebracht werden, da der Tag zwischen den beiden Messtagen eine Abnahme des Sauerstoffgehaltes anzeigte (siehe 7.4) und das Redoxpotenzial für diesen Zeitraum einen Rückgang aufwies (Abbildung 34b). Die Abnahme des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials fielen neben der Konzentrationsveränderung von *F. roseus* auch jeweils mit einer Erhöhung der Füllhöhe des Sammelbeckens (Belebtbeckenzulauf) zusammen (vgl. 7.3-7.6).

### 3.11 Entwicklung einer spezifischen FISH-Sonde für *F. roseus*

#### 3.11.1 Allgemeine Anforderungen an FISH-Sonden

Für die Entwicklung der FISH-Sonden wurden die folgenden von Amann (1995) beschriebenen Voraussetzungen berücksichtigt:

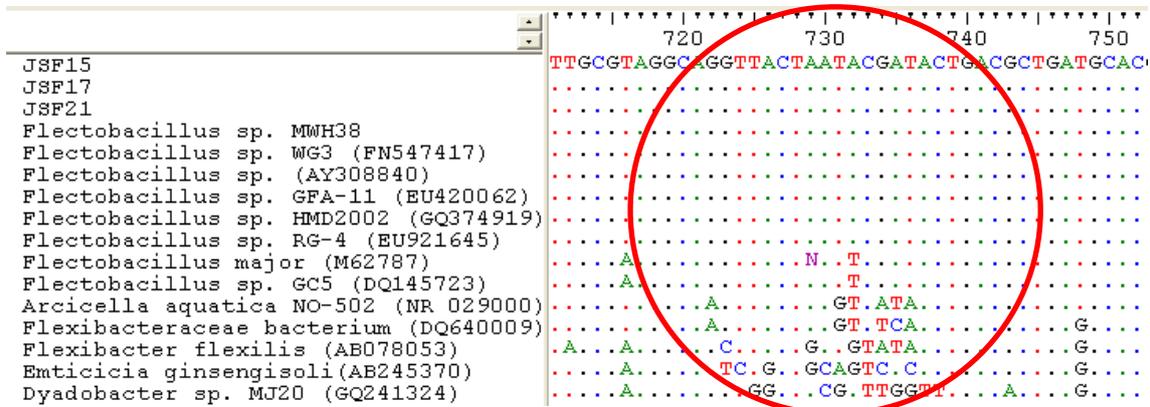
- Die Sonde sollte eine Länge von ca.  $18 \pm 3$  Basen aufweisen.
- Die Sekundärstruktur der Zielsequenz sollte bekannt sein, um einen Sondenbereich auszuwählen, der wenig sterische Hinderung aufweist.
- Gepaarte Regionen wie Helices bzw. ungepaarte Regionen wie Loops können als Zielregionen genutzt werden. Haarnadelbereiche sollten aufgrund von Sondendimerbildung vermieden werden.
- Bei einer Helixstruktur von  $> 4$  Basen sollte die Sonde nicht komplementär zu beiden Strängen der Helix sein, da sonst sterische Hinderungen auftreten.

Die neu entwickelten FISH-Sonden FleSH und RuSH wurden am 5'-Ende mit dem Indocarbocyanin-Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Nach Pernthaler *et al.* 2001 ist das die Position an einer Oligonucleotidsonde, bei der mit Cy3 die höchste Fluoreszenzausbeute erzielt werden kann.

#### 3.11.2 Sondendesign für die Klärschlammissolate der Spezies *F. roseus*

Für die Entwicklung einer *F. roseus* spezifischen FISH-Sonde, wurde die 16S-RNA aufgrund ihres großen Vorkommens in vitalen Zellen als Lokus gewählt. Da für das in dieser Arbeit entwickelte Primerpaar FlectobacQPCR (Tabelle 10) das 16S-Gen der *Flectobacillus*-Isolate bereits sequenziert worden war, konnten die Sequenz für die Suche nach einem wie von Amann (1995) beschriebenen, FISH-Sonden geeigneten Sequenzbereich genutzt werden. Mit Hilfe der Datenbank BLAST und des Programms BioEdit wurde ein Alignment der Isolate JSF15 und JSF17 sowie weiterer bekannter Vertreter des Genus *Flectobacillus* erstellt. Für die Abgrenzung der konservierten Bereiche zu genetisch ähnlichen Organismen wurde eine sogenannte Außengruppe in das Alignment mit einbezogen.

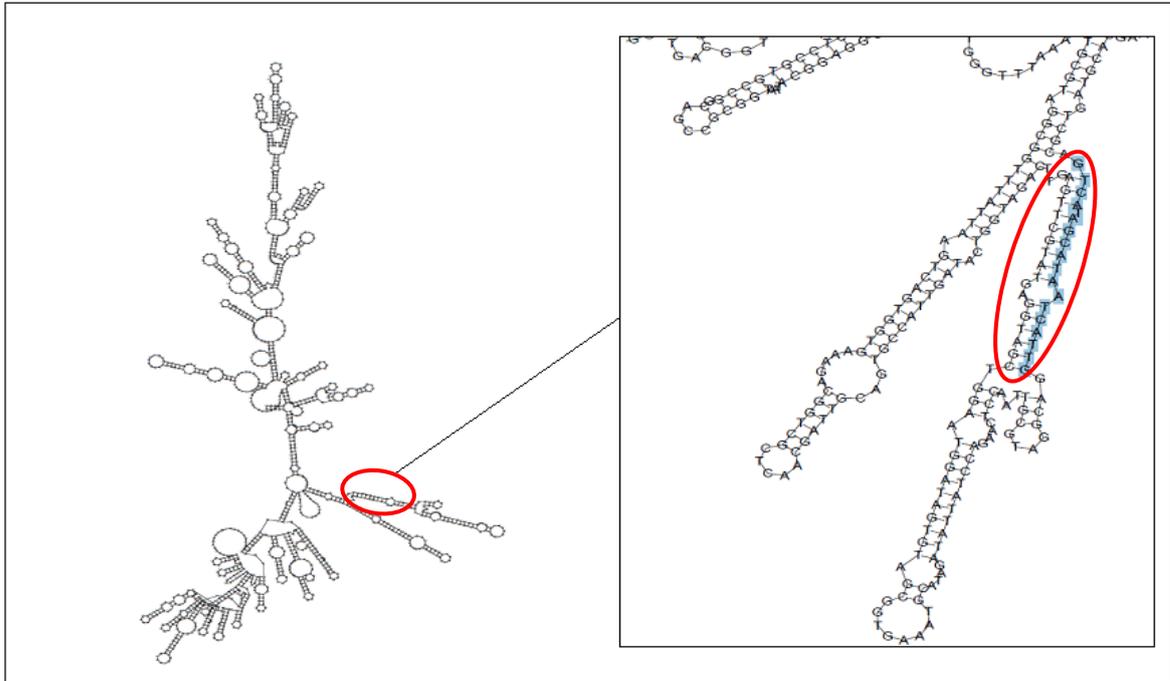
Hierbei wurden Spezies mit einer genetischen Übereinstimmung ihrer 16S-DNA zum 16S-Gen der Familie der Flectobacillen im Bereich von 85-92 % gewählt.



**Abbildung 35 Alignment der Flectobacillus-Isolate, verschiedener Vertreter des Genus Flectobacillus und einer Außengruppe.** Die Flectobacillus-Spezies und die Außengruppe werden mit den in Klammer stehenden Accession-Nummer dargestellt. Die Außengruppe beinhaltet die Familien Arcicella (92%), Flexibacteraceae (93%), Flexibacter (85%), Emticicia (85%) und Dyadobacter (85%) (in Klammern hinter den Organismen ist die genetische Übereinstimmung des 16S-Gens zur Zielgruppe Flectobacillus dargestellt). Der rot markierte Bereich im Alignment stellt den konservierten Bereich, der als Sondenbereich für die Sonde FleSH gewählt wurde dar.

Die in Abbildung 35 dargestellten *F. roseus* grenzen sich im Bereich zwischen 722-748 Basenpaaren deutlich von der Außengruppe und den anderen *Flectobacillus*-Spezies ab. Demnach können die Isolate und die weiteren *F. roseus*-Vertreter mit einer Sonde in diesem Sequenzbereich erfasst werden. *Flectobacillus* sp. GC5 weist wie *F. major* in dem Sondenlokal an Position 732 eine Basenvariation auf. Neben dieser Variation tritt bei *F. major* noch eine weitere mögliche Basenabwandlung in der Position 729 auf. Die Lage und Anzahl der Basen, die in der Sequenz von *F. major* von den Sequenzen der Isolate abweichen, wurde für die spätere Bestimmung der Spezifität der Sonde genutzt. Der Sequenzbereich eignet sich sowohl von der Länge als auch von der Abgrenzung zur genetisch ähnlichen Organismen für die Lage einer FISH-Sonde, daher wurde für die Detektion der *F. roseus*-Isolate die neuentwickelte Sonde FleSH in diesen Sequenzabschnitt gelegt. Zur endgültigen Absicherung der Spezifität wurde die neu entwickelte Sonde gegen die Datenbank BLAST abgeglichen, wobei nur Übereinstimmung von >99% (bei Basenfehlpaarungen und Sequenzlänge) bei Vertretern des Genus *Flectobacillus* auftraten. Neben dem geeigneten Sequenzbereich bestimmen auch sterische Faktoren die Spezifität einer FISH-Sonde.

Inwiefern der ausgewählte Bereich geeignet für die Lage einer Oligonucleotid-Sonde ist oder ob sterischen Hinderungen durch übergeordnete Sekundärstrukturen auftreten, wurde durch eine graphische Darstellung der Sekundärstruktur, mit Hilfe des Programmes *RNAfold WebServer* (Zuker, 2003) ermittelt (Abbildung 36).



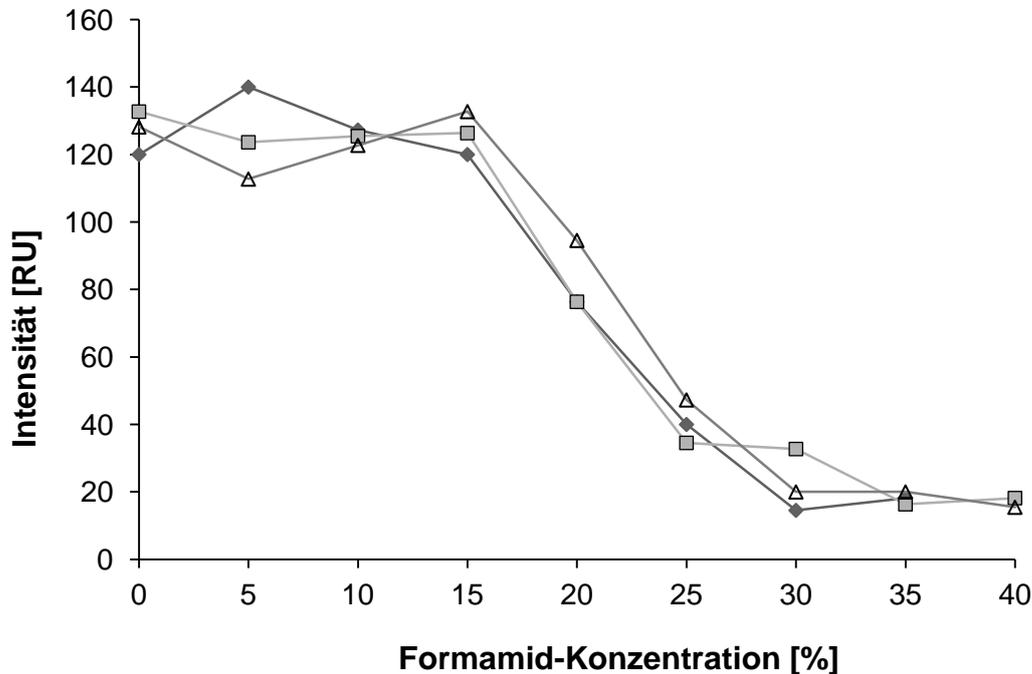
**Abbildung 36** Graphische Darstellung der Sekundärstruktur der 16Sr-RNA von Isolat JSF15 (*F. roseus*). Die dargestellte Graphik wurde mit dem Programm *RNAfold WebServer* (Zuker, 2003) erstellt und stellt die RNA-Struktur mit der kleinsten Basenpaardistanz der Boltzmann-Verteilung dar. Der rot umrandete Bereich zeigt die Lage der Sonde FleSH in der Sekundärstruktur.

Der in Abbildung 36 dargestellte Bereich zur Lage der Sonde FleSH zeigt neben den dargestellten Helices und Loops keine übergeordneten Sekundärstrukturen und entsprach damit den von Amann *et al.* (1995) beschriebenen Bedingungen. Insofern konnte davon ausgegangen werden, dass keine sterische Hinderungen bei einer Anlagerung der Sonde auftreten. Die Sonde FleSH wurde aufgrund ihrer genetischen Spezifität und der geeigneten Lage in der Sekundärstruktur als tauglich zur Detektion der *F. roseus*-Isolate betrachtet. Ein evtl. Auftreten von Haarnadelstrukturen und Dimer-Bildungen wurde mit Hilfe des Programmes *Oligo calc* ausgeschlossen.

### 3.11.3 Optimierung der Formamid-Konzentration

Neben den im vorigen Abschnitt beschriebenen sterischen Anforderungen an die Ziel-DNA und der genetischen Spezifität der Sonde, ist die Sondenbindung ebenfalls abhängig von den Hybridisierungs- und Wasch-Bedingungen. Um eine hohe SONDENSPEZIFITÄT zu erreichen, muss die Hybridisierung mit einer gewissen Stringenz erfolgen. Die Stringenz ist sowohl abhängig von der Temperatur als auch von der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers. Die beschriebene Hybridisierung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 46°C. Um eine ausreichende Stringenz für die Etablierung der neu entwickelten Oligonucleotidsonden zu gewährleisten, wurde die optimale im Hybridisierungspuffer eingesetzte Formamidkonzentration wie von (Nielsen *et al.*, 2009a) beschrieben experimentell ermittelt. Hierbei gilt nach die höchste Formamidkonzentration, die zur keiner signifikanten Schwächung der Fluoreszenzintensität in den Zielorganismen führt, als geeignet. Zur Bestimmung der optimalen Formamidkonzentration für die Sonde FleSH wurde eine Reinkultur von *F. roseus* JSF15 mit Konzentrationen von 0 bis 40% Formamid (in 5% Intervalle) im Hybridisierungspuffer hybridisiert. Die hybridisierten Zellen wurden unter einem Epifluoreszenzmikroskop fotografiert und anschließend die Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Programms *daime* berechnet (Hohagen, 2010).

Die folgende Abbildung stellen die von „*daimé*“ berechneten Fluoreszenzintensitäten für die Sonde FleSH mit dem Isolat *F. roseus* JSF15 graphisch dar.



**Abbildung 37 Fluoreszenzintensität von FleSH bei unterschiedlichen Formamidkonzentrationen des Hybridisierungspuffers.** Die Abbildung zeigt die Veränderung der Fluoreszenzintensität der FISH-Sonde FleSH mit steigender Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers. Für die Optimierung der Formamidkonzentration wurde das Isolat *Flectobacillus roseus* JSF15 mit der Sonde FleSH hybridisiert und die Fluoreszenzintensität in drei unterschiedlichen Messreihen bestimmt (Hohagen, 2010). Die Messreihen sind wie folgt dargestellt: Messung 1 (—◆—), Messung 2 (—■—) Messung 3 (—△—).

Die Abbildung 37 zeigt, dass bei der Hybridisierung mit der Sonde FleSH bei einer Konzentration von mehr als 15% Formamid im Hybridisierungspuffer eine deutliche Abschwächung der Fluoreszenz auftritt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für die Sonde FleSH eine Formamidkonzentration von 15% als ausreichend stringent für den Nachweis der Isolate festgelegt (Hohagen, 2010).

### 3.11.4 Spezifität der Sonde FleSH für verwandte Nichtzielorganismen

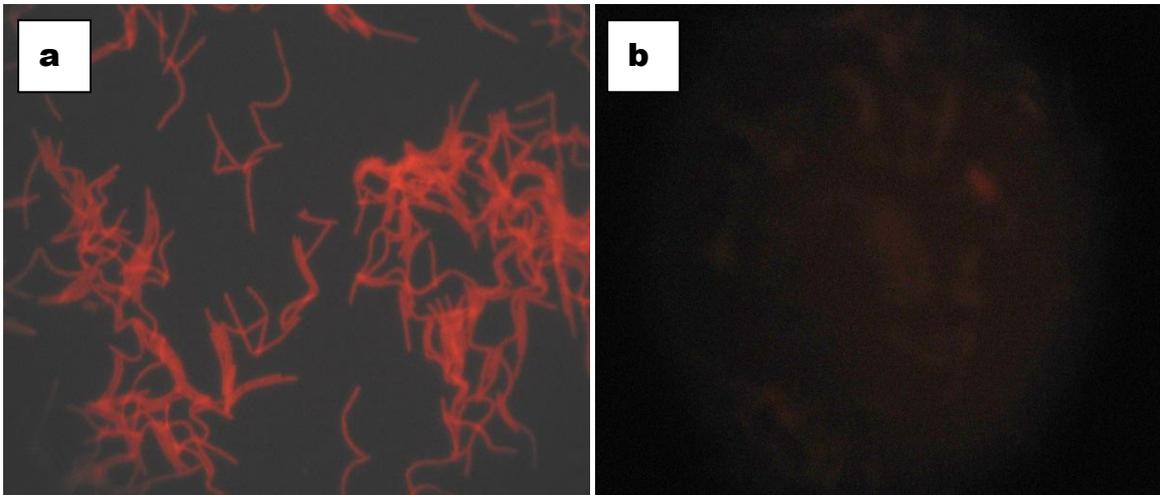
Um wie von Nielsen *et al.* (2009a) beschrieben eine endgültige Aussage über die Spezifität der Sonde im Bezug auf Nicht-Ziel-Organismen zu treffen, wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit verwandten Organismen (gleicher Genus), die eine und zwei Basenfehlpaarungen in der Zielsequenz aufweisen, durchgeführt. Hierfür wurden das im Abschnitt (3.5.1) beschriebene Alignment der *F. roseus*-Isolate verwendet. Als Nichtzielorganismus für die Sonde FleSH wurde das Bakterium *F. major* gewählt. Die folgenden Abbildungen zeigen zur Verdeutlichung der Lage und Anzahl der Basenfehlpaarungen ein Alignment der Isolate mit den ausgewählten Nichtzielorganismen und den jeweiligen Oligonucleotidsonden.



Abbildung 38 Lage der Sonde FleSH auf dem 16S-Gen der *Flectobacillus*-Isolate und *F. major* (DSM-Nr. 103). FleSH ist hier reverse-complementär dargestellt. Bei der im Sequenzabschnitt von *F. major* durch den Buchstaben N dargestellten Base kann es sich um A,T,G oder C handeln.

Die Abbildung 38 zeigt, dass sich für *F. major* zwei Basenfehlpaarungen in der Mitte des Sondenzielbereiches befinden. Da es sich bei der in Position 727 auftretenden Basenfehlpaarung um zwei Pyrimidin-Basen handelt, ist eine Ausbildung von so genannten Wobbels als unwahrscheinlich anzusehen. Nach Pernthaler *et al.* (2001) führt eine Basenfehlpaarung in der Mitte eines Sondenlokus zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit der Sondenanlagerung als eine Basenfehlpaarung am 5`-oder 3`-Ende. Inwieweit trotz der auftretenden Basenfehlpaarungen zwischen der Sonde und dem Nichtzielorganismus, eine Anlagerung von FleSH an die 16S RNA von *F. major* möglich ist, wurde experimentell bestimmt (Schmidt, 2011). Dazu wurden die Fadenbakterien wie im Abschnitt Material und Methoden (2.24) beschrieben kultiviert. Um eine ausreichende Ausbeute an RNA zu gewährleisten, wurden nur Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase zur FISH eingesetzt.

Die folgende Abbildung zeigt einen Vergleich der Fluoreszenzintensität der Ziel- und Nichtzielorganismen nach der FISH mit der Sonde FleSH.



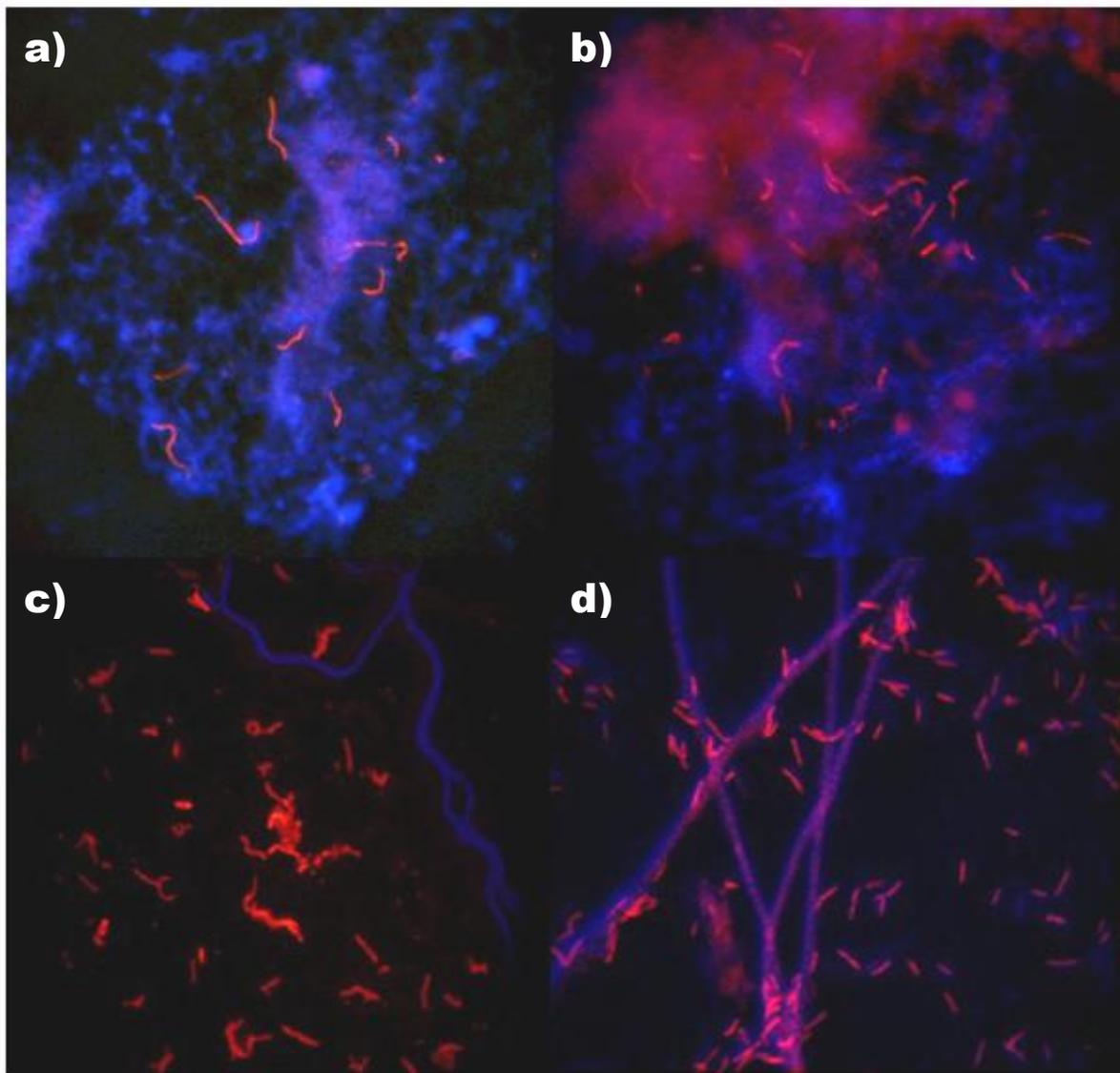
**Abbildung 39 FISH einer Kultur von *F. roseus* JSF15 und *F. major* mit der Sonde FleSH.** Die Hybridisierung erfolgte wie in Material und Methoden (2.30.3) beschrieben mit der mit Cy3 (5') markiert Sonde FleSH. Die Abbildung zeigt den Unterschied in der Spezifität der Sonde FleSH mit einem Zielorganismus und einem Nichtzielorganismus. a) *F. roseus* JSF15 (Zielorganismus) mit FleSH b) *F. major* (Nichtzielorganismus) mit FleSH. *F. major* zeigt keine Fluoreszenz.

Wie aufgrund der Anzahl und Lage der Basenfehlpaarungen erwartet, zeigt die FISH mit FleSH im Bezug auf den Nichtzielorganismus praktisch keine Fluoreszenz (Abbildung 39b). Dies entspricht insofern den Erwartungen, da die Lage und Anzahl der Basenfehlpaarungen für die Sonde FleSH, wie nach Pernthaler *et al.* (2001) beschrieben, zu einer deutlich geringeren Hybridisierungswahrscheinlichkeit führen muss. Die Stringenz der Hybridisierung für die Sonde FleSH ist ausreichend, um *F. roseus* von dem den im Sondenbereich genetisch übereinstimmenden Organismus *F. major* unterscheiden zu können.

### 3.12 Anwendung der Sonde FleSH im Belebtschlamm

Nach dem erfolgreichen Einsatz der Sonde FleSH an *F. roseus*-Kulturen wurde die Sonde auf Belebtschlammproben angewendet. *F. roseus* wurde bisher noch nicht in seinem Habitat erforscht, daher war bis zum Zeitpunkt der Untersuchungen unklar, ob sich die Fadenbakterien in den Belebtschlammflocken oder außerhalb der Flocken befinden. Ein weiteres wichtiges Untersuchungskriterium war, dass die Morphologie von *F. roseus* im Belebtschlamm und damit unter Umweltbedingungen unbekannt war und nicht ausgeschlossen werden konnte, ob es sich um pleomorphe Organismen handelt.

Zur Verdeutlichung der Lage des Fadenbakteriums in der Belebtschlammflocke wurden die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gegengefärbt. Der Farbstoff lagert sich hierbei unspezifisch an Bakterien-RNA an, was es ermöglicht, die Belebtschlammflocken, die zu einem Großteil aus Bakterien bestehen, sichtbar zu machen. Die Hybridisierung und Gegenfärbung erfolgte wie im Abschnitt (2.30) beschrieben.



**Abbildung 40** Nachweis von *Flectobacillus roseus*. im Belebtschlamm mit der FISH-Sonde FleSH. Die Abbildung zeigt die mit der FISH-Sonde FleSH (Cy3 (5')) rotmarkierten Flectobacillen in Klärschlammproben vom (a) 04.02.11 (b) 06.02.11 (c) 26.05.10 (d) 22.11.10. Die Gegenfärbung der Begleitflora erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI und zeigte eine blaue Fluoreszenz..

Die Abbildung 40 zeigt die mit der Sonde FleSH markierten *F. roseus* in unterschiedlichen Belebtschlammproben. *F. roseus* konnte mit Hilfe der Sonde FleSH und der DAPI-Gegenfärbung deutlich von anderen Klärschlammorganismen unterschieden werden.

Auf den in Abbildung 40 dargestellten Klärschlammaufnahmen ist erkennbar, dass *F. roseus* sowohl ausserhalb (Abbildung 40a,b) als auch innerhalb der Schlammflocken (Abbildung 40c,d) verortet war und unter den gegebenen Bedingungen nicht zum Pleomorphismus neigte. *F. roseus* bildte im Belebtschlamm im Vergleich zu anderen Fadenbakterienarten verhältnismässig kleine Filamente aus (siehe blau gefärbte Begleitflora in Abbildung 40c,d). Die mit Hilfe der FISH nachgewiesenen *F. roseus*-Filamente zeigten keine Vernetzung untereinander (Abbildung 40).

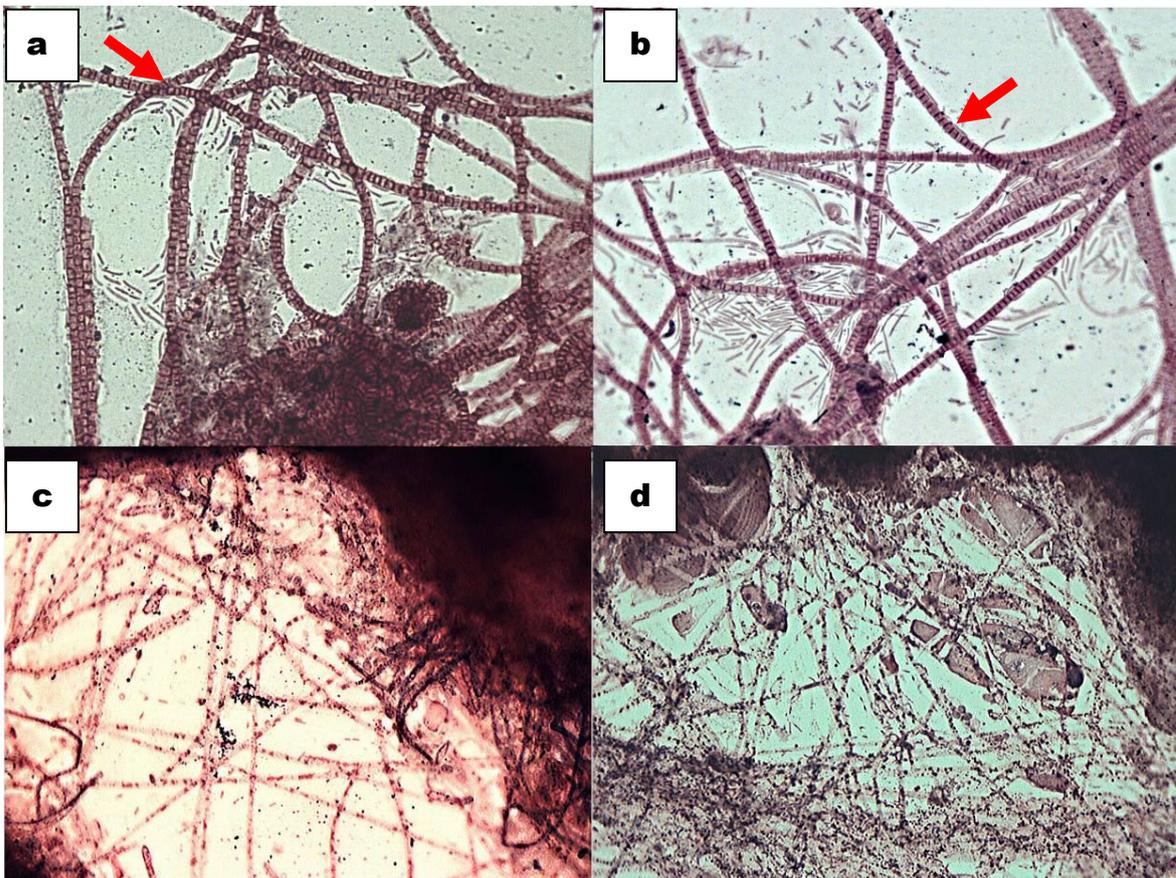
### **3.13 Mikroskopische Veränderung des Belebtschlammes in den Untersuchungszeiträumen (A) und (E)**

Neben der Untersuchung der Beckenparameter und der Quantifizierung der Fadentypen wurden die Veränderungen der Bakterienflora des Klärschlammes mit Hilfe von mikroskopischen Bildern dokumentiert. Die mikroskopischen Aufnahmen boten die Möglichkeit die Analysen auf DNA-Ebene mit den Veränderungen der Bakterienflora im Klärschlamm zu vergleichen. Die in den folgenden Abschnitten dargestellten Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen der Untersuchungszeiträume (A) und (E).

Der Untersuchungszeitraum (A) wurde aufgrund des zeitgleichen Rückgangs beider Fadenbakterienarten (siehe 3.10.3) für die Interpretation der mikroskopischen Bilder ausgewählt. Der Untersuchungszeitraum (E) wurde wegen seines hohen Gehaltes der Fadentypen (siehe 3.10.7) und der daraus resultierenden besseren mikroskopischen Nachvollziehbarkeit von Konzentrationsschwankungen ausgewählt. Aufgrund der unverwechselbaren Morphologie des Genus *Thiothrix* wurde diese Bakteriengattung für den Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen mit den Quantifizierungsergebnissen aus Abschnitt (3.10) genutzt. Für die mikroskopische Untersuchung und Fotografie der Belebtschlammproben wurde der Schlamm wie im Abschnitt (2.31) beschrieben aufgearbeitet und eine Gram-Färbung durchgeführt.

### 3.13.1 Mikroskopische Aufnahmen aus dem Versuchszeitraum (A)

Der Untersuchungszeitraum (A) wurde für die Betrachtungen der mikroskopischen Veränderungen ausgewählt, da er durch einen Rückgang beider Fadenbakterientypen charakterisiert war.



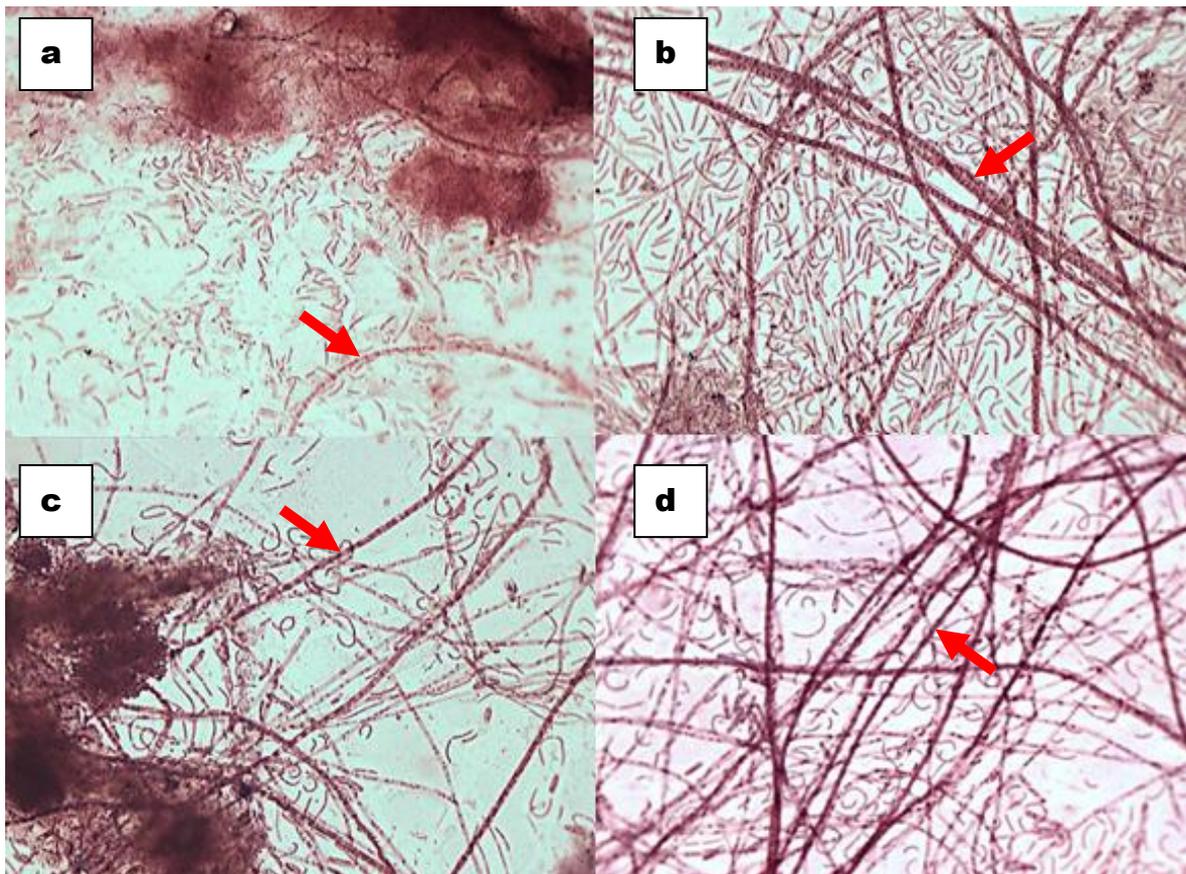
**Abbildung 41** Veränderung der Fadenbakterienpopulation im Belebtschlamm im Untersuchungszeitraum A). Die Bilder stellen Belebtschlammflocken nach einer Gram-Färbung bei 1000x Vergrößerung im Hellfeld dar. Gezeigt werden Schlammflocken von den Versuchstagen a) 22.01.10; b) 25.01.10; c) 05.02.10 und d) 10.02.10. aus dem Untersuchungszeitraum (A). Die mit Pfeilen markierten Organismen zeigen exemplarisch Fadenbakterien, die als *Thiothrix* sp. (oranger Pfeil) charakterisiert wurden.

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 41 zeigen, dass eine deutliche Veränderung der Bakterienflora in der Untersuchungsperiode auftrat. In Abbildung 41 (a) und (b) ist *Thiothrix* sp. gut erkennbar und die dominierende Fadenspezies im Belebtschlamm. Zum Zeitpunkt der Aufnahme (b) lag der Gehalt an *T. eikelboomii* bei 89 ppm (siehe 3.10.3). Auf den Fotos der nachfolgenden Versuchstagen (Abbildung 41c,d) konnte *Thiothrix* nicht mehr identifiziert werden und ein anderer bisher unbekannter Fadentyp dominierte die Biozönose. Die Quantifizierungsergebnisse aus dem

Untersuchungszeitraums zeigten in diesem Zeitraum ebenfalls einen Rückgang von *T. eikelboomii* (siehe 3.10.3).

### 3.13.2 Mikroskopische Aufnahmen aus dem Versuchszeitraum (E)

Der Untersuchungszeitraum (E) wurde aufgrund seines hohen Gehaltes beider Fadentypen für die Interpretation der mikroskopischen Aufnahmen ausgewählt.



**Abbildung 42 Veränderung der Fadenbakterienpopulation im Belebtschlamm im Untersuchungszeitraum E).** Die Bilder stellen Belebtschlammflocken nach einer Gram-Färbung bei 1000x Vergrößerung im Hellfeld dar. Gezeigt werden Schlammflocken von den Versuchstagen a) 17.05.10; b) 21.05.10; c) 26.05.10 und d) 28.05.10. Die mit Pfeilen markierten Organismen zeigen exemplarisch Fadenbakterien, die als *Thiothrix* sp. charakterisiert wurden.

Die Abbildung 42 zeigt, dass zu Beginn des Untersuchungszeitraums am 17.05.10 nur ein geringer Gehalt an *Thiothrix* sp. im Belebtschlamm vorlag. Die visuelle Einschätzung konnte durch das Ergebnis der Quantifizierung von *T. eikelboomii* bestätigt werden. Der Gehalt des Fadenbakteriums betrug zu Beginn des Untersuchungszeitraums (17.05.10) zunächst 27 ppm (siehe 3.10.7.3). Auf der mikroskopischen Aufnahme des 21.05.10 (Abbildung 42b) konnten bereits deutlich mehr Fadenbakterien dem Genus *Thiothrix*

zugeordnet werden. Das Ergebnis der visuellen Untersuchung deckte sich in diesem Punkt mit den Quantifizierungsergebnissen. Der Gehalt des Fadenbakteriums lag an diesem Messtag bei 157 ppm (siehe 3.10.7.3). Eine sichtbare Veränderung der Schlammflockenstruktur konnte in diesem Zusammenhang nicht festgestellt werden. In den folgenden Untersuchungstagen sank der Gehalt beider Fadentypen schrittweise ab und erreichte am 26.05.10 seinen Tiefpunkt (siehe 3.10.7). Die Konzentration an *T. eikelboomii* lag an diesem Tag bei 25 ppm (siehe 3.10.7.3). Der Rückgang von *Thiothrix* konnte auch mikroskopisch nachverfolgt werden (Abbildung 42c). Der Vergleich der Belebtschlammaufnahmen (Abbildung 42b,c) zeigt eine deutliche Verringerung der *Thiothrix*-Population im Belebtschlamm. Ab dem 28.05.10 konnte wieder eine Konzentrationserhöhung für beide Fadentypen beobachtet werden. Der Gehalt an *T. eikelboomii* stieg bis zum 28.05.10 auf 111 ppm an (siehe 3.10.7.3). Die mikroskopische Aufnahme dieses Tages (Abbildung 42d) zeigte ebenfalls eine große Menge an *Thiothrix*-Filamenten im Belebtschlamm und stimmte damit mit den Quantifizierungsergebnissen überein.

## 4 Diskussion

### 4.1 Isolation und Kultivierung der *Flectobacillus*- und *Thiothrix*-Isolate

Die Isolation und Kultivierung von Fadenbakterien aus dem komplexen Lebensraum Belebtschlamm ist schwierig und langwierig. Bisher liegen nur wenige Kulturen relevanter fädiger Mikroorganismen aus Belebtschlamm vor (Nielsen *et al.*, 2009b). Ein Grund für die schwierige Kultivierung von Fadenbakterien ist die Abtrennung der Mikroorganismen von der nichtfädigen Begleitflora. Filamentöse Bakterien wachsen in der Regel deutlich langsamer als nichtfädige Bakterien und werden daher schnell von anderen Mikroorganismen überwachsen (Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, 2002). Ein weiterer Faktor für die schwierige Kultivierung von Fadenbakterien ist, dass traditionelle Kultivierungsmethoden in der Regel nur für eine Minderheit von Bakterien anwendbar sind (Amann *et al.*, 2001). Mögliche Faktoren, die die Kultivierung der Bakterien beeinflussen, sind beispielsweise die Temperatur, das Substrat und der pH-Wert des Kultivierungsmediums. Bei der Kultivierung eines unbekanntes Bakteriums sind diese Parameter zunächst unklar und müssen experimentell an die Bedürfnisse des Bakteriums angepasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, zwei unterschiedliche Genera von Fadenbakterien zu isolieren und zu kultivieren. Hierbei wurde für die Isolierung der *Flectobacillus*-Isolate das von Williams und Unz (1985b) beschriebene Anreicherungsverfahren verwendet (siehe 2.19.1). Die Isolation der *Thiothrix*-Isolate erfolgte mit Hilfe der von Bremshey (2010) entwickelten Anreicherungsverfahren ABZ und ABF (vgl. 2.19.3) und anschließender Mikromanipulation (vgl. 2.19.4). Die Anreicherung der Fadenbakterien diente hierbei dem Zweck, einen Großteil der Begleitflora vor der Kultivierung abzutrennen und so das „Überwachsen“ der Fadenbakterien durch nichtfädige Organismen zu verhindern. Beide Methoden zeigten sich hierbei für die Isolation von Fadenbakterien aus Belebtschlamm geeignet. Aufgrund der unbekanntes Nahrungsansprüche der Bakterien wurden für die Isolation unterschiedliche Nährmedien verwendet. Die anschließende Kultivierung der Bakterien erfolgte dann ebenfalls auf dem jeweiligen Isolationsmedium (siehe 3.1). Die Isolation und Kultivierung von *F. roseus* und *T. eikelboomii* ermöglichten es die Fadenbakterien morphologisch und phylogenetisch zu charakterisieren und ihre biochemischen Merkmale zu bestimmen (siehe 4.2).

## 4.2 Charakterisierung der *Flectobacillus*- und *Thiothrix*-Isolate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Fadenbakterien aus dem Belebtschlamm isoliert und phylogenetisch eingeordnet. Bei den Isolaten handelte es sich um Fadenbakterien der Typen *F. roseus* und *T. eikelboomii*. Neben der Charakterisierung auf genetischer Basis wurden die morphologischen, biochemischen und physiologischen Merkmale der Isolate untersucht. In den folgenden Abschnitten wird näher auf die phylogenetische Einordnung und die Charakterisierung der isolierten Fadenbakterien eingegangen.

### 4.2.1 Charakterisierung der *F. roseus*-Isolate

Der Genus *Flectobacillus* gehört zur Familie der *Cytophagaceae* und beinhaltet die Spezies *F. roseus* (Sheu *et al.*, 2009), *F. lacus* (Hwang und Cho, 2006) und *F. major* (Larkin *et al.*, 1977). Bisher sind der Genus und seine Speziesvertreter nur wenig erforscht und ihre Rolle in der komplexen Lebensgemeinschaft des Belebtschlammes unbekannt. Aufgrund der Ergebnisse der Sequenzanalyse und der phylogenetischen Charakterisierung konnten die Isolate JSF15 und JSF17 der Spezies *F. roseus* zugeordnet werden (vgl. 3.2.3). Die phylogenetische Analyse ergab desweiteren eine hohe genetische Übereinstimmung von JSF15 und JSF17 mit vier bisher nicht kategorisierten Isolaten. Aufgrund des geringen gegenwärtigen Kenntnisstands über den Genus *Flectobacillus* wurden die unbekanntenen Isolate in die phylogenetische Charakterisierung miteinbezogen. Die phylogenetische Analyse der nicht kategorisierten Isolate MWH38 (ACC.No. AJ011917), *Flectobacillus* sp. 'starch-degrading' (ACC.No. AY308840), WG3 (ACC.No. FN547417) und HMD2002 (ACC.No. GQ374919) zeigte, dass es sich hierbei ebenfalls um Vertreter der Spezies *F. roseus* handelte (vgl. 3.2.3). Die *F. roseus*-Gruppe konnte so um sechs Stämme erweitert werden und ist mit acht Speziesmitgliedern vorerst die größte Bakterien-Gruppe im Genus *Flectobacillus*. Neben der phylogenetischen Untersuchung der Isolate wurden im Rahmen dieser Arbeit biochemische und physiologische Charakterisierungen der Fadenbakterien durchgeführt (siehe 3.3). Beide Isolate ähnelten in ihrer Koloniegröße, der Pigmentierung und dem Temperaturoptimum bereits publizierten *Flectobacillus*-Spezies (Hwang und Cho, 2006; Sheu *et al.*, 2009; Hahn *et al.*, 1999). Im Bezug auf die biochemischen Merkmale zeigte das Isolat JSF15 eine 86%ige und das Isolat JSF17 eine 50%ige Übereinstimmung mit

*F. roseus*. Untereinander wiesen die Isolate eine Übereinstimmung von 50% bezüglich ihrer biochemischen Merkmale auf (siehe 3.3.2). Die Ergebnisse der biochemischen und physiologischen Charakterisierung zeigten, dass es sich bei den Isolaten JSF15 und JSF17 trotz der 99,4%igen Übereinstimmung der 16S-rDNA um zwei zwar eng verwandte aber trotzdem unterschiedliche *Flectobacillus roseus*-Stämme handelt.

#### 4.2.2 Charakterisierung der *T. eikelboomii*-Isolate

Der Genus *Thiothrix* gehört zur Familie der *Thiotrichaceae* und beinhaltet die Spezies *T. nivea*, *T. defluvii*, *T. disciformis*, *T. fructosivorans*, *T. eikelboomii*, *T. flexilis* und *T. unzii* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005). Mittels der Sequenzanalyse und der phylogenetischen Untersuchung konnten die Isolate AB23 und AB32 der Spezies *T. eikelboomii* zugeordnet werden (siehe 3.2.4). Die größte genetische Übereinstimmung der Isolate trat hierbei zu den *T. eikelboomii*-Stämmen T2-1 und COM-A auf (siehe 3.2.4). Neben der phylogenetischen Übereinstimmung zeigten auch die Ergebnisse der morphologischen Charakterisierung der Isolate AB23 und AB32 eine große Übereinstimmung mit den anderen *Thiothrix*-Spezies (*T. nivea*, *T. fructosivorans* und *T. ramosa*). Dieses Resultat entsprach den Erwartungen, da bisher alle bekannten *Thiothrix*-Spezies ähnliche morphologische Merkmale aufweisen (Kanagawa *et al.*, 2000). Aufgrund der schwierigen Kultivierung von *T. eikelboomii* konnte bisher nur das Isolat AP3 (Kanagawa *et al.*, 2000) biochemisch charakterisiert werden. Bei AP3 handelte es sich um den *T. eikelboomii*-Vertreter mit der geringsten genetischen Übereinstimmung zu den AB-Isolaten (siehe 3.2.4). Bei dem Vergleich der biochemischen Merkmale von AB23 und AB32 mit AP3 konnten zwei Merkmalsunterschiede beobachtet werden (vgl. 3.4). Dies legt nahe, dass es sich bei *T. eikelboomii* AB23 und AB32 um einen anderen Bakterienstamm handelt als *T. eikelboomii* AP3. Für eine feinere Differenzierung der AB-Isolate und AP3 muss in zukünftigen Untersuchungen eine weitere Spezifizierung der biochemischen Merkmale durchgeführt werden.

### 4.3 Entwicklung eines *real-time* PCR-Assay für den Nachweis von *F. roseus* in Belebtschlamm

Für die gezielte Untersuchung von *F. roseus* im Belebtschlamm wurde im Rahmen dieser Arbeit das Primerpaar FlectobacQPCR entwickelt. Im den folgenden Abschnitten wird näher auf die Entwicklung des Primerpaares und des *real-time* Assays eingegangen.

#### 4.3.1 Entwicklung und Validierung des Primersets FlectobacQPCR

Das *F. roseus*-spezifische Primerpaar FlectobacQPCR wurde mit Hilfe eines Alignment der 16S-rDNA der Isolate JSF15, JSF17 und weiteren *Flectobacillus*-Spezies entwickelt (siehe 3.5). Das Alignment zeigte für die Spezies *F. roseus* zwei spezifische Loci im Bereich von 1226–1256 bp und 1420-1440 bp (Abbildung 9). Diese Loci wurden für die Lage des Primerpaares ausgewählt, da aufgrund der heterogenen Basenabfolge von *F. roseus* mit der Außengruppe und anderen *Flectobacillus*-Spezies davon ausgegangen werden konnte, dass die Bildung eines Amplifikats für nicht dem Genus zugehörige Bakterien oder eine andere *Flectobacillus*-Spezies wie *F. lacus* und *F. major* unwahrscheinlich ist (siehe 3.5.1). Die Primer entsprachen auch im Bezug auf ihre Größe und den Schmelzpunkten (GC-Gehalt) den im Vorfeld festgelegten Kriterien (vgl. 3.5.1). Die von Bustin und Nolan (2004-2009) vorgeschlagenen Kriterien dienten hierbei als Ausgangspunkt für die Entwicklung von *real-time* PCR geeigneten Primern mit einer geringen Schmelzpunktdifferenz. Die Schmelzpunkte des *forward*- und *reverse*-Primer sollten ähnlich sein, um eine unspezifische Anlagerung und eine daraus resultierende Fehlproduktbildung zu vermeiden (Raymaekers *et al.*, 2009). Neben den Kriterien, die an die Primer gestellt wurden, erfüllte auch das mit Hilfe des Primerpaares gebildete Amplifikat die gewünschten Voraussetzungen an die Produktlänge und den GC-Gehalt (vgl. 3.5.1). Ein SYBR-Green-Assay geeignetes Amplifikat sollte kleiner als 300 Basenpaare sein (Ginzinger, 2002), um eine optimale Auftrennung des PCR-Produktes während der Denaturierungsphase zu gewährleisten. Zum Abschluss der Primer-Entwicklung wurde das Primerpaar auf die Bildung unspezifischer Nebenprodukte, Primerdimere und Sekundärstrukturen überprüft (siehe 3.5). Die Untersuchung ergab, dass die Primer keine Bildung von Dimeren und Sekundärstrukturen aufzeigten und die Ausbildung von unspezifischen Nebenprodukten beim momentanen Wissensstand

unwahrscheinlich ist. Zur Kontrolle, ob in der komplexen Matrix des Belebtschlammes ein PCR-Fragment von *F. roseus* amplifiziert werden kann, wurden Test-PCR mit Belebtschlammproben durchgeführt (siehe 3.5.2; 3.10.1). Die PCR-Produkte entsprachen in ihrer Länge dem theoretischen Amplifikat (siehe 3.5.2). Um eine unspezifische Amplifikation vollständig auszuschließen, wurde ein willkürlich ausgewähltes PCR-Produkt einer Test-PCR sequenziert und mit der Datenbank BLAST abgeglichen. Die Sequenzanalyse des PCR-Produktes ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit diversen *F. roseus*-Isolaten und eine 99%ige Übereinstimmung mit dem Isolat JSF17 (vgl. 3.5.2). Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen konnte das Primerpaar FlectobacQPCR für den spezifischen Nachweis von *F. roseus* im Belebtschlamm der untersuchten Kläranlage eingesetzt werden.

### 4.3.2 Methodenoptimierung

Die Methodenoptimierung des *real-time* PCR-Assay erfolgte durch die in Abschnitt 3.7.1 beschriebene Primertitration und Schmelzkurvenanalyse. Die Primertitration ermöglicht es, die optimale Konzentration des *forward*- und *reverse*-Primers unter den gegebenen PCR-Bedingungen zu bestimmen. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen ist nicht unerheblich, da auf diese Weise die Bildung von Primerdimeren reduziert wird. Desweiteren erhöht sich unter optimierten Bedingungen die Spezifität und die Effizienz des Amplifikationsprozesses (Raymaekers *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der Primertitration ergaben eine Konzentration von 200 nmol/PCR-Ansatz des *forward*-Primers und 400 nmol/PCR-Ansatz des *reverse*-Primers als ideal für das neuentwickelte *real-time* PCR-Assay (siehe 3.7.1). Begründet wird dies aufgrund des frühen Durchbruchzyklus, dem steilen Kurvenverlauf und der hohen Fluoreszenzintensität dieser Konzentrationskombination. Ein weiterer Aspekt der Methodenoptimierung war die Schmelzkurvenanalyse (Stratagene, 2004) im Anschluss an die Amplifikation. Hierbei gilt die Bildung eines einzigen PCR-Produktes als essenziell für die Quantifizierung mittels des unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green (Raymaekers *et al.*, 2009). Werden mehrere Produkte im Laufe der Amplifikation gebildet, kann bei einer solchen Quantifizierung nicht zwischen dem gewünschten Hauptprodukt und den unspezifischen Nebenprodukten unterschieden werden. Dies würde folglich zu einem falschen Quantifizierungsergebnis führen. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte für alle Positivkontrollen ein einziges Amplifikat mit einem scharf abgegrenzten Schmelzpunkt bei

84,4°C (vgl. 3.7.1). Der Schmelzpunkt des Amplifikats stimmte mit dem berechneten Schmelzpunkt des theoretischen Amplifikats von 83,5°C annähernd überein. Die Schmelzkurvenanalyse der Negativkontrolle ergab einen breiten Schmelzkurvenverlauf zwischen 77-79°C. Hierbei handelte es sich um so genannte Primer-Dimere, die bei einem Primer-Überschuss oder einem Mangel an Matrizen-DNA wie sie in einer Negativkontrolle auftritt. Aufgrund ihrer kurzen Nukleotidsequenz und ihrer unspezifischen Paarung zeichnen sich Primer-Dimere durch niedrige Schmelzpunkte und breite Schmelzkurvenverläufe (Bustin und Nolan, 2004-2009) aus. Da keine der Positivkontrollen ein solches Produkt aufwies, wurde davon ausgegangen, dass das Primerpaar FlectobacQPCR keine unspezifischen Nebenprodukte bzw. Primerdimere bildete. Die Interpretation der Schmelzkurvenanalyse bestätigte die mit Hilfe der Amplifikationsverläufe ausgewählte Optimalprimerkombination (200 nmol/400 nmol). In dieser Kombination wurde vergleichsweise mehr SYBR-Green freigesetzt als bei anderen Kombinationen (Abbildung 17). Die größere Menge an freigesetzten Fluoreszenzfarbstoff ist ein Zeichen dafür, dass auch mehr Amplifikat in der PCR gebildet wurde was aufgrund der Detektionmethodik (Fluoreszenz) eine höhere Sensitivität des Assays bewirkt.

#### **4.4 Effizienz und Präzision des FlectobacQPCR-Assay**

Unterschiedliche Faktoren wie PCR-Inhibitoren, die Länge des Amplifikates und die Qualität der Primer können die Effizienz einer PCR beeinflussen (Raymaekers *et al.*, 2009). Nach der erfolgreichen Entwicklung und Validierung des Primerpaares FlectobacQPCR (siehe 3.5) und der anschließenden Methodenoptimierung (siehe 3.7) wurden die Effizienz des Assays und die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse bestimmt. Optimale PCR-Bedingungen basieren auf Amplifikationseffizienzen, die näherungsweise bei 100% liegen. Bei einer 100%igen PCR-Effizienz verdoppelt sich das PCR-Produkt während jedes Zyklus der exponentiellen Amplifikation (Bustin und Nolan, 2004-2009). Die Effizienz des FlectobacQPCR-Assay lag bei 1,99 und entsprach damit den Idealbedingungen von fast einer Verdopplung in jedem Zyklus (vgl. 3.8). Ein weiteres Maß für die Präzision eines neu entwickelten Assays sind die Inter- und Intra-Assay-Abweichungen der Methode. In der Regel ist eine Inter-Assay-Abweichung von 2-4% realistisch über den großen Messbereich der *real-time* PCR (Vervaeren *et. al.*, 2005, Bustin

und Nolan, 2004-2009). Der für das FlectobacQPCR-Assay ermittelte Abweichungsbereich lag zwischen 1-3% (vgl. 3.9) und entsprach damit der Norm für eine optimierte *real-time* PCR-Methode. Für die Intra-Assay-Abweichung des FlectobacQPCR-Assays konnte ein Abweichungsbereich von 0,1-1% ermittelt werden. Auch in diesem Punkt entsprach der FlectobacQPCR-Assay dem Abweichungsbereich von >2% von bereits publizierten Methoden (Pfaffl, 2001; Vervaeren *et al.*, 2005)

#### **4.5 Nachweis von *T. eikelboomii* mittels *real-time* PCR**

Die Quantifizierung von *T. eikelboomii* erfolgte modifiziert mit Hilfe der von Vervaeren *et al.* (2005) beschriebenen Methode. Hierbei wurden die ursprünglichen PCR-Bedingungen beibehalten und lediglich der Primerloкус verändert. Die Methode von Vervaeren *et al.* (2005) zielt auf die Quantifizierung eines spezifischen Bereiches auf der rRNA von *T. eikelboomii* ab. Da das 16S-rDNA-Gen die rRNA und damit auch den *Thiothrix*-spezifischen Bereich kodiert, konnte das Assay auch für die Quantifizierung des Gens verwendet werden. Aufgrund der vergleichsweise leichten Handhabbarkeit von genomischer DNA, wurde das Assay für die Quantifizierung auf Ebene des 16S-rDNA eingesetzt. Das Primerpaar 021N wurde bisher nur für Proben von Testkläranlagen im Labormaßstab verwendet und nicht für reale Klärschlammproben. Daher wurden im Vorfeld der Quantifizierung die Primer in diverse Test-PCR mit Belebtschlammproben eingesetzt (siehe 3.6; 3.10.1). Die entstandenen PCR-Produkte entsprachen in ihrer Größe dem vom Vervaeren *et al.* (2005) publizierten Amplifikat. Eins der in einer Test-PCR entstandenen Amplifikate wurde zum Ausschluss unspezifischer PCR-Produkte sequenziert und mit der Datenbank BLAST abgeglichen (siehe 3.6). Die nachfolgende Sequenzanalyse ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit *T. eikelboomii*-Stamm COM-A (ACC. No. AB042542) und eine 99%ige Übereinstimmung mit den Isolaten AB23 und AB32. Die modifizierte Methode konnte aufgrund der Spezifität der Primer für die Quantifizierung von *T. eikelboomii* im Belebtschlamm eingesetzt werden.

#### 4.6 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Belebtschlamm mittels *real-time* PCR

Seit der Erwähnung von *Thiothrix* als Typ 021N durch Eikelboom (1975) war der Fadentyp und sein massenhaftes Wachstum im Belebtschlamm Ziel zahlreicher Untersuchungen (Kanagawa *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2000; Vervaeren *et al.*, 2005). Trotz der jahrzehntelangen Erforschung des Fadenbakteriums ist sein Wachstum in der komplexen Lebensgemeinschaft des Belebtschlammes bisher weitgehend unbekannt (Nielsen *et al.*, 2000). Das Wachstumsverhalten von *F. roseus* im Belebtschlamm ist bisher gänzlich unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii* und *F. roseus* im Belebtschlamm mit Hilfe der *real-time*-PCR näher untersucht (siehe 3.10). Die Quantifizierung der Fadenbakterien ermöglichte hierbei Konzentrationsschwankungen von *F. roseus* und *T. eikelboomii* mit physikalischen Einflüssen in ihrem Habitat in Verbindung zu bringen und so ein besseres Verständnis für das Wachstumsverhalten der beiden Fadentypen zu gewinnen. Primäre Bedingungen für das Wachstum von Mikroorganismen sind unter anderem die Temperatur und der Substratgehalt des Habitats. Der mögliche Substrateintrag in das Belebungsbecken wurde im Rahmen dieser Arbeit indirekt über den Sauerstoffgehalt und das Redoxpotenzial des Belebtschlammes sowie der Füllhöhe des Sammelbeckens eingeschätzt. Hierbei galt als theoretische Grundlage, dass bei einem hohen Substrateintrag aus der Produktion der Sauerstoffgehalt des Belebtschlammes durch den mikrobiologischen Substratabbau abnimmt und das Redoxpotenzial in den negativen Bereich absinkt. Für die Produktionstage konnte ein Rückgang des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials des Belebtschlammes und eine Erhöhung der Sammelbeckenfüllhöhe beobachtet werden (vgl. 3.10.2). Bei einer bestehenden Abhängigkeit zwischen der Konzentrationen an *T. eikelboomii* und *F. roseus* und dem Substrateintrag müsste eine Veränderung des Sauerstoffgehaltes bzw. Redoxwertes mit einer Konzentrationsänderung der Fadenbakterien einhergehen. Die Korrelation der Beckenwerte zeigten im gesamten Untersuchungszeitraum für die Wochenenden eine Verringerung der Füllhöhe des Sammelbeckens und ein Anstieg des Sauerstoffgehaltes und des Redoxwertes im Belebungsbecken (siehe 3.10.2). Der Kläranlagenbetreiber wies darauf hin, dass die Lebensmittelproduktion nur an den Werktagen von Montag bis Samstag stattfand, wobei der Samstag als Reinigungstag für die Produktionsstraßen vorgesehen war

(Uhlmann persönliche Mitteilung). Im Verlauf der Untersuchung zeigte sich, dass die betriebsbedingten Veränderungen an den Wochenenden einen nicht zu unterschätzenden Effekt auf das Wachstum von *T. eikelboomii* hatten (vgl. 3.10.9.1).

#### 4.6.1 Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii* im Belebtschlamm

Die Untersuchung von *T. eikelboomii* im Untersuchungszeitäumen (A-E) ergab einen regelmäßigen Rückgang der Menge des Fadenbakteriums an den Wochenenden (siehe 3.10.9.1). Dieses Phänomen wurde begleitet von einer Erhöhung des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung des Belebtschlammes. Für den Rückgang von *T. eikelboomii* über die Wochenenden kamen zwei mögliche Faktoren in Frage. Der erste Faktor konnte ein Mangel an Substrat sein, da betriebsbedingt die Produktion an den Wochenenden eingestellt wurde. Ein weiterer möglicher Faktor war die Schädigung des Fadenbakteriums durch Desinfektions- und Reinigungsmittel aufgrund der an den Samstagen erfolgten Reinigung der Betriebsstraßen. Beide Faktoren würden den Anstieg des Redoxpotenzials und der Sauerstoffsättigung an den Wochenenden erklären. Aufgrund des bisherigen Kenntnisstandes über das Wachstum von *T. eikelboomii* ist der Schwund des Fadenbakteriums vermutlich aufgrund von Desinfektions- und Reinigungsmitteln hervorgerufen worden. Bei der Spezies *Thiothrix* handelt es sich um K-Strategen (Nielsen *et al.*, 2003), die sich durch eine hohe Substrataffinität auszeichnen und auch noch bei sehr geringer Substratkonzentration ein Wachstum aufweisen. Ein Rückgang an *T. eikelboomii* aufgrund eines Substratmangels konnte daher ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Zeiträume (A-E) ergab außer dem wochenendbedingten Rückgang keine weiteren Aufschlüsse über das Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii*. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse kann eine Abhängigkeit von *T. eikelboomii* von dem Nährstoffeintrag in die biologische Reinigungsstufe weder bestätigt noch widerlegt werden. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die indirekte Einschätzung des Substrateintrags über die Beckenwerte nicht ausreichend sensibel ist, um die geringen Substratmengen wiederzuspiegeln, die die Wachstumsveränderungen des Fadenbakteriums bedingen. Desweiteren war die Zusammensetzung der Nährstoffe aufgrund der wechselnden Produktion unterschiedlicher Lebensmittel wie z.B. Wurst, Nudeln und Räucherwaren während des gesamten Untersuchungszeitraums äußerst inhomogen, was die Nachvollziehbarkeit substratbedingter Konzentrationsveränderungen erschwerte. Um das Wachstumsverhalten von *T. eikelboomii* im Belebtschlamm besser verstehen zu

können, muss in zukünftigen Untersuchungen das Verhalten des Fadenbakteriums auf verschiedenen Substraten und seine Reaktion auf unterschiedliche Reinigungs- und Desinfektionsmittel untersucht werden.

#### 4.6.2 Wachstumsverhalten von *F. roseus* im Belebtschlamm

Aus der vergleichenden Beobachtung der Beckenwerte und der Konzentration an *F. roseus* kann auf einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationserhöhungen von *F. roseus* und der Abnahme der Sauerstoffsättigung/Redoxwertes des Belebtschlammes geschlossen werden (siehe 3.10.9.2). Im gesamten Untersuchungszeitraum (A-E) stieg die Konzentration von *F. roseus* insgesamt zehnmal an, sechsmal einhergehend mit einer Abnahme des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials des Belebtschlammes. Gleichzeitig zu der Abnahme dieser beiden Parameter stieg die Füllhöhe des Sammelbeckens (Kläranlagenzulauf) an. Eine Abnahme des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials in Kombination mit einem Anstieg des Kläranlagenzulaufs weist auf einen höheren Substrateintrag aus der Produktion hin (vgl. 3.10.2). Der Zusammenhang zwischen der Konzentration von *F. roseus* und der Abnahme des Sauerstoffgehaltes/Redoxpotenzials lassen den Rückschluss zu, dass das Fadenbakterium auf den Substrateintrag in die biologische Reinigungsstufe reagiert hat. Eine mögliche Affinität zu hohen Nährstoffkonzentrationen des Genus *Flectobacillus* zeigte sich bereits in der Untersuchung von Corno und Jürgens (2005) und bei den Isolationsorten diverser *Flectobacillus*-Spezies. Das *F. lacus*-Isolat (CL-GP79) stammt aus einem hocheutrophen Teich in Korea (Hwang und Cho, 2006). Der von Sheu *et al.*, 2009 isolierten *F. roseus*-Stamm GFA-11 wurde aus einem Fischkulturteich in Taiwan isoliert. Ein Vergleich der Isolierungsorte ergibt, dass es sich jeweils um Süßwasserreservoirs mit einem hohen Nährstoffgehalt bzw. mit einem hohen Eutrophierungsgrad handelt. Bezogen auf die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse ist eine Verbindung zwischen dem Substrateintrag aus der Produktion und dem Konzentrationsanstieg von *F. roseus* wahrscheinlich.

### 4.6.3 Jahreszeitliche Veränderung der Fadenbakterienkonzentration

Jedes Bakterium hat einen spezifischen Temperaturbereich, in dem es wächst und eine optimale Wachstumstemperatur (Nielsen und Seviour, 2010). Bakterien im Belebtschlamm von Kläranlagen unterliegen neben kurzfristigen Temperaturveränderungen wie z.B. dem Eintrag warmer Abwässer aus dem Kläranlagenzulauf auch jahreszeitlichen Temperaturveränderungen. Eine jahreszeitliche Temperaturabhängigkeit konnte für die Fadenabakterien *M. parvicella* (Kumari *et al.*, 2009) und *Gordonia* spp. (Marrengane *et al.*, 2011) beobachtet werden. Zur Überprüfung, ob *F. roseus* und/oder *T. eikelboomii* eine ähnliche Abhängigkeit aufweisen, wurde die Konzentrationen der Fadenbakterien im jahreszeitlichen Verlauf untersucht (siehe 3.10.8). Für *F. roseus* konnte ab dem Untersuchungszeitraum (E) ein Konzentrationsanstieg beobachtet werden. Der Mittelwert der Temperatur für diesen Zeitraum lag bei 25,7°C und entsprach damit dem Temperaturoptimum von *F. roseus* das zwischen 25-30°C liegt (siehe 3.3.1). Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass der Temperaturanstieg vom Untersuchungszeitraum (D) auf (E) nur 1,7°C betragen hat, was alleine nicht ausreichend ist, um einen Konzentrationsanstieg um den Faktor sieben zu begründen. Andere mögliche Faktoren, die das Wachstum des Fadenbakteriums beeinflusst haben könnten, sind der Sauerstoffgehalt und das Redoxpotenzial. In Abschnitt 4.6.2 ist ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Wachstum von *F. roseus* und dem Sauerstoffgehalt und dem Redoxpotenzial des Belebtschlammes beschrieben. In dem untersuchten Belebungsbecken konnte somit keine temperaturabhängige Zunahme von *F. roseus* nachgewiesen werden. Die Temperaturoptima der Fadenbakterienspezies *T. eikelboomii*-Spezies sind zurzeit bis auf den von Kanagawa *et al.* (2000) beschriebenen Wachstumsbereich von *T. eikelboomii* AP3 (10-33°C) unbekannt. Der Wachstumsbereich von *T. eikelboomii* AP3 erstreckt sich über einen großen Temperaturbereich und konnte daher nicht zur Eingrenzung einer Optimaltemperatur für *T. eikelboomii* im Gesamtuntersuchungszeitraum (A-E) genutzt werden. *T. eikelboomii* zeigte in diesem Zeitraum starke Konzentrationsschwankungen und wies damit keine direkt nachvollziehbare jahreszeitliche Temperaturabhängigkeit auf (vgl. 3.10.8).

#### 4.7 Die Entwicklung der *F. roseus*-spezifischen FISH-Sonde FleSH

Für die Charakterisierung und Detektion von *F. roseus* im Belebtschlamm wurden die FISH als Nachweismethode ausgewählt, da es sich hierbei um eine für die Charakterisierung von Klärschlamm Bakterien etablierte Methode handelt (Lemmer *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Kanagawa *et al.*, 2000). Die Entwicklung einer FISH-Sonde ermöglicht zudem die Erforschung nutritiver Eigenschaften von *F. roseus* in zukünftigen Untersuchungen (Nielsen *et al.*, 2003). Trotz der Vielzahl der bisher etablierten Sonden und Methoden ist der Nachweis von Bakterien in Umweltproben und eutrophen Lebensgemeinschaften mit FISH schwierig und beinhaltet unterschiedliche Fallstricke. Die Detektion der Prokaryoten mit Hilfe der FISH wird beispielsweise dadurch erschwert, dass die meisten Bakterien in aquatischen Lebensräumen sehr klein sind und nur langsam wachsen (Pernthaler *et al.*, 2001). Ein weiteres Problem ist die in vielen Habitaten auftretende Hintergrundfluoreszenz, die die Fluoreszenz einer FISH-Sonde überdecken kann (Pernthaler *et al.*, 2001). Aufgrund der schwierigen Ausgangsbedingungen für die Detektion von *F. roseus* im komplexen Habitat Belebtschlamm wurde bei der Entwicklung der FISH-Sonde FleSH ein besonderes Augenmerk auf die Spezifität der Sonde und die Optimierung der Hybridisierungsbedingungen gelegt. Für die Entwicklung der FISH-Sonde FleSH wurde die 16S-rRNA als Sondenloкус gewählt, da jedes Ribosom einer Bakterienzelle 16S-rRNA enthält und sie dementsprechend in großen Mengen in vitalen Zellen von Prokaryoten vorzufinden ist. Der hohe Gehalt an Ribosomen und damit an 16S-rRNA ermöglicht eine Art von Signalverstärkung (Pernthaler *et al.*, 2001), was wiederum den Nachweis von *F. roseus* im Belebtschlamm erleichtern sollte. Als Grundlage für die Entwicklung von FleSH wurden die von Amann (1995) vorgeschlagenen Voraussetzungen an eine FISH-Sonde und ein Alignment der Isolate und weiterer *Flectobacillus*-Spezies verwendet (siehe 3.11.2). Der Lokus von FleSH wurde so ausgewählt, dass für verwandte Nichtzielorganismen ein bzw. zwei Basenfehlpaarungen in der Mitte des Sondenbereichs auftraten. Nach Pernthaler *et al.* (2001) erschwert eine zentrierte Lage der Basenfehlpaarungen eine Hybridisierung von Nichtzielorganismen. Die Spezifität von FleSH konnte in anschließenden FISH mit dem verwandten Nichtzielorganismus *F. major* bestätigt werden (siehe 3.11.4). Neben der Auswahl eines geeigneten Sequenzbereichs wurden vor dem Einsatz von FleSH auf verwandte Organismen und den Belebtschlamm

die Hybridisierungsbedingungen wie von Nielsen *et al.* (2009a) beschrieben experimentell ermittelt (siehe 3.11.3). Eine Optimierung war unerlässlich, da die Spezifität jeder FISH neben dem Sondenlokus auch von Faktoren wie den Hybridisierungs- und Waschbedingungen abhängig ist (Pernthaler *et al.*, 2001) und die FISH-Bedingungen abhängig von der Zellstruktur und den Spezies variieren können. Aufgrund der Ergebnisse der theoretischen und experimentellen Entwicklung der Sonde wurde FleSH für den Nachweis von *F. roseus* im Belebtschlamm eingesetzt (siehe 3.12).

#### 4.7.1 FISH-Charakterisierung von *F. roseus* im Belebtschlamm

Mit Hilfe der FISH-Sonde FleSH konnte *F. roseus* erstmals im Belebtschlamm nachgewiesen und charakterisiert werden (siehe 3.12). *F. roseus* zeigte unter den gegebenen Umweltbedingungen keine Neigung zum Pleiomorphismus und entsprach morphologisch den JSF-Isolaten unter Laborbedingungen (Abbildung 7b). Für den von Corno und Jürgens (2005) beschriebenen *Flectobacillus*-Stamm und für weitere Fadenbakterienarten wie *Nostocoida limicola* I (Liu *et al.*, 2000) *Gordonia amarae* (Ramothokang *et al.*, 2006) und *Acinetobacter* sp. (Ramothokang *et al.*, 2006) konnten morphologische Veränderungen in Laborkulturen und im Belebtschlamm nachgewiesen werden. In den Publikationen von Corno und Jürgens (2005) und Šimek *et al.* (2007) wird der Einfluss von Flagellaten auf die Morphologie von *Flectobacillus* sp. beschrieben. Der untersuchte *Flectobacillus*-Stamm reagierte hierbei in Anwesenheit von Flagellaten und anderen Bakteriovoren mit der Ausbildung von größeren Filamenten. In Belebtschlamm befindet sich neben Bakterien und anderem auch eine Vielzahl von Flagellaten (Lemmer *et al.*, 1996), die einen Einfluss auf die Morphologie von *F. roseus* ausüben können. Ein möglicher Pleiomorphismus von *F. roseus* kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die FISH-Analyse der Belebtschlammproben ergab, dass *F. roseus* sowohl außerhalb als auch innerhalb der Belebtschlammflocken auftrat (siehe 3.12). *F. roseus* wies im Vergleich zu der anderen fädigen Begleitflora nur eine geringe Filamentlänge auf und zeigte keine Tendenz, eine Netzstruktur auszubilden. Die Ausbildung einer Netzstruktur der Fadenbakterien in Kombination mit ihrem massenhaften Auftreten ist der Ausgangspunkt für die Bildung von Blähschlamm, Schwimmschlamm und Schaum. Aufgrund der geringen Filamentlänge und der fehlenden Vernetzung der Fadenbakterien untereinander kann davon ausgegangen werden, dass ein massenhaftes Auftreten von *F. roseus* unter den gegebenen Bedingungen nicht zur

Ausbildung von Blähschlamm, Schwimmschlamm oder Schaum führen würde, sondern zur einer Art Fadenbakterienblüte wie sie bereits für andere Spezies der Familie *Cytophagaceae* in natürlichen Teichen und Seen beobachtet werden konnte (Šimek *et al.*, 2001).

#### **4.8 Vergleich der *real-time* PCR Ergebnisse mit den mikroskopischen Aufnahmen aus den Untersuchungszeiträumen (A-E)**

Um mögliche Konzentrationsschwankungen der Fadenbakterien mit sichtbaren Veränderungen des Belebtschlammes in Verbindung bringen zu können, wurden Aufnahmen von Belebtschlammproben ausgewählter Zeiträume mit den *real-time*-PCR-Ergebnissen von *T. eikelboomii* verglichen (siehe 3.13). Als Referenzorganismus für die visuelle Auswertung wurde der Genus *Thiothrix* ausgewählt, da dieser Typus über ein charakteristisches morphologisches Erscheinungsbild verfügt und sich mit einem Mikroskop im Belebtschlamm nachweisen lässt. Der Untersuchungszeitraum (A) wurde für den Vergleich ausgewählt, da sowohl in den mikroskopischen Aufnahmen als auch in der PCR-Quantifizierung eine Abnahme der Fadenbakterien sichtbar war (siehe 3.13). Desweiteren konnte eine Veränderung der Bakterienflora in diesem Zeitraum beobachtet werden, bei der ab dem sichtbaren Rückgang von *Thiothrix* eine unbekannte Fadenbakterienspezies den Belebtschlamm dominierte. Eine Erklärung für die Veränderungen der Bakterienflora könnte die Erhöhung des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials in diesem Zeitraum sein (siehe 3.10.3). Beides müsste den anderen Fadenbakterienspezies ein besseres Wachstum ermöglichen. Der Untersuchungszeitraum (E) wurde für die vergleichende Betrachtung ausgewählt, da in diesem Zeitraum beide Fadentypen (*T. eikelboomii*/*F. roseus*) starke Konzentrationsschwankungen zeigten (siehe 3.10.7). Der Vergleich der Ergebnisse aus diesem Zeitraum ergab eine deutliche Übereinstimmung zwischen den Quantifizierungsergebnissen von *T. eikelboomii* und den visuell eingeschätzten Konzentrationen von *Thiothrix*. Weitere Beziehungen zwischen verschiedenen Parametern konnten für diesen Zeitraum nicht beobachtet werden.

## 5 Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte FlectobacQPCR-Assay und das modifizierte 021N-Assay von Vervaeren *et. al.* (2005) konnten für die Quantifizierung von *F. roseus* und *T. eikelboomii* im Belebtschlamm etabliert werden. Das FlectobacQPCR- und das modifizierte 021N-Assay kann in Zukunft in weiteren Kläranlagen oder anderen Habitaten für die Quantifizierung der Fadenbakterien eingesetzt werden.

Die Korrelation der Fadenbakterienkonzentrationen mit dem Sauerstoffgehalt und dem Redoxpotential des Belebtschlammes ergab erste Anhaltspunkte über das Wachstumsverhalten von *F. roseus* und *T. eikelboomii* in der hier untersuchten Kläranlage. Eine Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Kläranlagen würde Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Systemen ermöglichen.

Für den Nachweis und die Charakterisierung von *F. roseus* wurde die FISH-Sonde FleSH entwickelt und erfolgreich in Klärschlammproben eingesetzt. Die Entwicklung der Sonde FleSH bietet die Möglichkeit, *F. roseus* in unterschiedlichen Habitaten nachzuweisen und zu charakterisieren.

## 6 Literatur

- Amann R, Fuchs BM, Behrens S (2001) The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**:231–236.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143–169.
- Aruga S (2002) Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1309–1316.
- Baltes W (2007) Lebensmittelchemie, 6. Auflage. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin.
- Blackall LL. (1994) Molecular identification of activated sludge foaming bacteria. *Water Sci. Technol.* **29**:35–42.
- Bland JA, Staley JT (1978) Observations on the biology of *Thiothrix*. *Arch. Microbiol.* **117**:79–87.
- Bremshey A (2010) Verbesserung von Isolierungsmethoden für Fadenbakterien und Charakterisierung der Isolate. Diplomarbeit, Bergische Universität Wuppertal.
- Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Springer, New York.
- Brigmon RL, Martin HW, Morris TL, Bitton G, Zam SG (1994) Biogeochemical ecology of *Thiothrix* spp. in underwater limestone caves. *Geomicrobiol. J.* **12**:141–159.
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**:107–127.
- Bustin SA (op. 2004-2009) *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, California.
- Chernousova E, Gridneva E, Grabovich M, Dubinina G, Akimov V, Rossetti S, Kuever J (2009) *Thiothrix caldifontis* sp. nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., gammaproteobacteria isolated from sulfide springs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:3128–3135.
- Corno G, Jurgens K (2006) Direct and indirect effects of protist predation on population size structure of a bacterial strain with high phenotypic plasticity. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:78–86.
- Daims H, Lückner S, Wagner M (2006) Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ. Microbiol.* **8**:200–213.

- 
- DeLong E, Wickham G, Pace N (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**:1360–1363.
- Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD (2012) SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *J. Fluoresc.* **22**:1189–1199.
- Dumonceaux TJ, Hill JE, Pelletier CP, Paice MG, van Kessel AG, Hemmingsen SM (2006) Molecular characterization of microbial communities in Canadian pulp and paper activated sludge and quantification of a novel *Thiothrix eikelboomii*-like bulking filament. *Can. J. Microbiol.* **52**:494–500.
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:7843–7853.
- Eikelboom DH (1975) Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Res.* **9**:365–388.
- Eikelboom DH, van Buijsen HJJ (1981) Microscopic sludge investigation manual. TNO Research Institute for Environmental Hygiene
- Eikelboom DH, van Buijsen HJJ (1983) Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung, 1. Auflage. Hirthammer, München.
- Fach P, Micheau P, Mazuet C, Perelle S, Popoff M (2009) Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *J. Appl. Microbiol.* **107**:465–473.
- Fritsche W (1998) Umwelt-Mikrobiologie. Grundlagen und Anwendungen. G. Fischer, Jena
- Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Exp. Hematol.* **30**:503–512.
- Gromov BV (1963) A new bacterium of the genus *Microcyclus*. *Dokl. Akad. Nauk.* **152**:733–734 *engl.*
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.
- Hohagen S (2010) Mikroskopische Bewertung von Abwasserproben. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Bergische Universität Wuppertal.

- Howarth R, Unz RF, Seviour EM, Seviour RJ, Blackall LL, Pickup RW, Jones JG, Yaguchi J, Head IM (1999) Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1817–1827.
- Hwang CY, Cho BC (2006) *Flectobacillus lacus* sp. nov., isolated from a highly eutrophic pond in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1197–1201.
- Jenkins D (1992) Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Water Sci. Technol.* **25**:215–230.
- Jones J, Jay F, Hilton J (1982) A note on the growth of *Thiothrix* in road drainage ditches. *J. Appl. Microbiol.* **53**:427–430.
- Kaetzke A, Jentsch D, Eschrich K (2005) Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**:207–211.
- Kämpfer P (1997) Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:169–181.
- Kanagawa T, Kamagata Y, Aruga S, Kohno T, Horn M, Wagner M (2000) Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5043–5052.
- Kieser T (2000) Practical streptomyces genetics. John Innes Foundation, Norwich.
- Kragelund C, Levantesi C, Borger A, Thelen K, Eikelboom D, Tandoi V, Kong Y, van der Waarde J, Krooneman J, Rossetti S, Thomsen TR, Nielsen PH (2007) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**:671–682.
- Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (2010) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer New York, New York, NY.
- Kumari SKS, Marrengane Z, Bux F (2009) Application of quantitative RT-PCR to determine the distribution of *Microthrix parvicella* in full-scale activated sludge treatment systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**:1135–1141.
- Kunst S, Helmer-Madhok C, Knoop S (2000) Betriebsprobleme auf Kläranlagen durch Blähschlamm, Schwimmschlamm, Schaum. Handbuch zur Identifizierung und Bekämpfung fädiger Bakterien. Springer, Berlin.

- LaPara TM, Klatt CG, Chen R (2006) Adaptations in bacterial catabolic enzyme activity and community structure in membrane-coupled bioreactors fed simple synthetic wastewater. *J. Biotechnol.* **121**:368–380.
- Larkin JM, Williams PM, Taylor R. (1977) Taxonomy of the genus *Microcyclus* Orskov 1928: Reintroduction and emendation of the genus *Spirosoma* Migula 1894 and proposal of a new genus, *Flectobacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**:147–156.
- Lemmer H (1996) *Ökologie der Abwasserorganismen*. Springer, Berlin.
- Lemmer H, Lind G, Müller E, Schade M (2005) Non-famous scum bacteria: Biological characterization and troubleshooting. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **33**:197–202.
- Liu JR, Seviour RJ (2001) Design and application of oligonucleotide probes for fluorescent *in situ* identification of the filamentous bacterial morphotype *Nostocoida limicola* in activated sludge. *Environ. Microbiol.* **3**:551–560.
- Liu JR, Burrell P, Seviour EM, Soddell JA, Blackall LL, Seviour RJ (2000) The filamentous bacterial morphotype ‘*Nostocoida limicola*’ I contains at least two previously described genera in the low G+C Gram positive bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:528–534.
- Mackay IM (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**:1292–1305.
- Marrengane Z, Kumar SKS, Pillay L, Bux F (2011) Rapid quantification and analysis of genetic diversity among *Gordonia* populations in foaming activated sludge plants. *J. Basic Microbiol.* **51**:415–423.
- Miller J (1972) *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Nielsen JL, Christensen D, Kloppenborg M, Nielsen PH (2003) Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under *in situ* conditions by microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization. *Environ. Microbiol.* **5**:202–211.
- Nielsen PH, Muro MA de, Nielsen JL (2000) Studies on the *in situ* physiology of *Thiothrix* spp. present in activated sludge. *Environ. Microbiol.* **2**:389–398.
- Nielsen PH, Daims H, Lemmer H (2009a) *FISH handbook for biological wastewater treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. IWA Publishing, New York.
- Nielsen PH, Kragelund C, Seviour RJ, Nielsen JL (2009b) Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:969–998.
- Nielsen P, Andreasen K, Wagner M, Blackall L, Lemmer H, Seviour R (1998) Variability of type 021N in activated sludge as determined by substrate uptake pattern and hybridization with fluorescent rRNA targeted probes. *Water Sci. Technol.* **37**:423–430.

- Nielsen P.H., Seviour RJ (2010) The microbiology of activated sludge. IWA, London.
- Paul JH (2001) Marine microbiology. Academic Press, San Diego.
- Pernthaler J, Glöckner F., Schönhuber W, Amann R (2001) Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: Methods in Microbiology. (Pernthaler J, Glöckner F, Schönhuber W, Amann R; eds), **30**:207–226.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. **29**:e45.
- Ramothokang T, Naidoo D, Bux F (2006) ‘Morphological shifts’ in filamentous bacteria isolated from activated sludge processes. World J. Microbiol. Biotechnol. **22**:845–850.
- Rasmussen R (ed) (2001) Quantification on the LightCycler. Rapid cycle real time PCR. Springer, Berlin
- Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R (2009) Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. J. Clin. Lab. Anal. **23**:145–151.
- Reasoner DJ, Geldreich EE (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. **49**:1–7.
- Rossetti S, Blackall LL, Levantesi C, Uccelletti D, Tandoi V (2003) Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**:1271–1276.
- Rozzak DB, Colwell RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. **51**:365–379.
- Rupf S, Merte K, Eschrich K (1999) Quantification of bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. J. Dental Res. **78**:850–856.
- Russell H, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnol. **11**:1026–1030.
- Sambrook J, Russell DW (op. 2001) Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (N.Y.)
- Schade Margit (2006) Physiologische Untersuchungen mit *In-situ*-Enzymaktivitäten fadenbildender Bakterien in Kläranlagen mit Schaumproblemen. Dissertation, Technischen Universität München.
- Schade M, Lemmer H (2002) Charakterisierung von Fadenbakterien zur Bekämpfung von Schaum in Belebungsbecken. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München
- Scheff G, Salcher O, Lingens F (1984) *Trichococcus flocculiformis* gen. nov. sp. nov. A new gram-positive filamentous bacterium isolated from bulking sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. **19**:114–119.

- Schmidt M (2011) Mikroskopische Bewertung von Fadenbakterien in Abwasserproben mit FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung). Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Bergische Universität Wuppertal.
- Schmitt T, MM (2003) Zentrales Erfassungssystem zur Beratung bei Bläh- und Schwimmschlammproblemen auf kommunalen Kläranlagen-Abschlussbericht. Technische Universität Karlsruhe
- Sheu S, Chiu TF, Cho N, Chou J, Sheu D, Arun AB, Young C, Chen CA, Wang J, Chen W (2009) *Flectobacillus roseus* sp. nov., isolated from freshwater in Taiwan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**:2546–2551.
- Šimek K, Pernthaler J, Weinbauer MG, Hornák K, Dolan JR, Nedoma J, Masín M, Amann R (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. Appl. Environ. Microbiol. **67**:2723–2733.
- Šimek K, Weinbauer MG, Hornák K, Jezbera J, Nedoma J, Dolan JR (2007) Grazer and virus-induced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community. Environ. Microbiol. **9**:789–800.
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:846–849.
- Staley JT, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. **39**:321–346.
- Stratagene (2004) Introduction to Quantitative PCR: methods and applications guide. La Jolla, Californien
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. **24**:1596–1599.
- Vaara T, Vaara M, Niemelä S (1979) Two improved methods for obtaining axenic cultures of cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. **38**:1011–1014.
- Veen WL (1973) Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. Ant. van Leeuwenhoek **39**:189–205.
- Vervaeren H, Wilde K de, Matthys J, Boon N, Raskin L, Verstraete W (2005) Quantification of an Eikelboom type 021N bulking event with fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**:695–704.
- Williams TM, Unz RF (1985a) Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa*, and Eikelboom type 021N strains. Appl. Environ. Microbiol. **49**:887–898.
- Williams T, Unz R (1985b) Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. **22**: 273-282 a+ b

Zhi Zhou, Pons M., Lutgarde R., Zilles J (2007) Automated image analysis for quantitative fluorescence *in situ* hybridization with environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2956–2962.

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**:3406–3415.

## 7 Anhang

### 7.1 Probenübersicht aus den Messzeiträumen (A-E)

Die Tabelle 33 zeigt eine Übersicht der untersuchten Klärschlammproben und die Einteilung in die fünf Untersuchungszeiträume (A-E).

Tabelle 33 Probenübersicht und Zusammenfassung in Messzeiträume (konventionelle PCR)

	Datum	<i>Flectobacillus roseus</i>	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	
Januar	18.01.2010	+	++	A
	20.01.2010	+	++	
	22.01.2010	+	++	
	25.01.2010	+	++	
	27.01.2010	+	+	
Februar	01.02.2010	-	+	B
	03.02.2010	-	+	
	05.02.2010	-	+/-	
	08.02.2010	-	+/-	
	10.02.2010	-	+/-	
	22.02.2010	+	++	
	24.02.2010	+	++	
	26.02.2010	+	++	
März	01.03.2010	+	++	C
	02.03.2010	+/-	++	
	03.03.2010	+/-	++	
	15.03.2010	+/-	++	
	17.03.2010	+/-	++	
	19.03.2010	+/-	++	
	22.03.2010	+	+	
	26.03.2010	+	+	
	29.03.2010	+	++	
	31.03.2010	+	++	
April	12.04.2010	+	++	D
	14.04.2010	+	++	
	16.04.2010	+	+	
	19.04.2010	+	+	
	21.04.2010	+	+	
	26.04.2010	+	++	
	28.04.2010	+	++	
	30.04.2010	+	++	

Visuelle Auswertung der Gelelektrophorese (+ + Starke Bande, + Bande, +/- schwache Bande). Die verschieden grau unterlegten Zeiträume zeigen die Untersuchungszeiträume (A-E) in absteigender Reihenfolge. Die Tabelle setzt sich auf der nächsten Seite fort.

Fortsetzung Tabelle 33

<b>Mai</b>	03.05.2010	+	++	<b>D</b>
	05.05.2010	+	++	
	17.05.2010	+	++	<b>E</b>
	19.05.2010	+	++	
	21.05.2010	+	++	
	24.05.2010	+	+	
	26.05.2010	+	+	
	28.05.2010	+	++	
	31.05.2010	++	++	
<b>Juni</b>	02.06.2010	+	++	
	07.06.2010	++	++	
	09.06.2010	++	++	

Visuelle Auswertung der Gelelektrophorese (+ + Starke Bande, + Bande, +/- schwache Bande). Die verschieden grau unterlegten Zeiträume zeigen die Untersuchungszeiträume (A-E) in absteigender Reihenfolge.

## 7.2 Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (A)

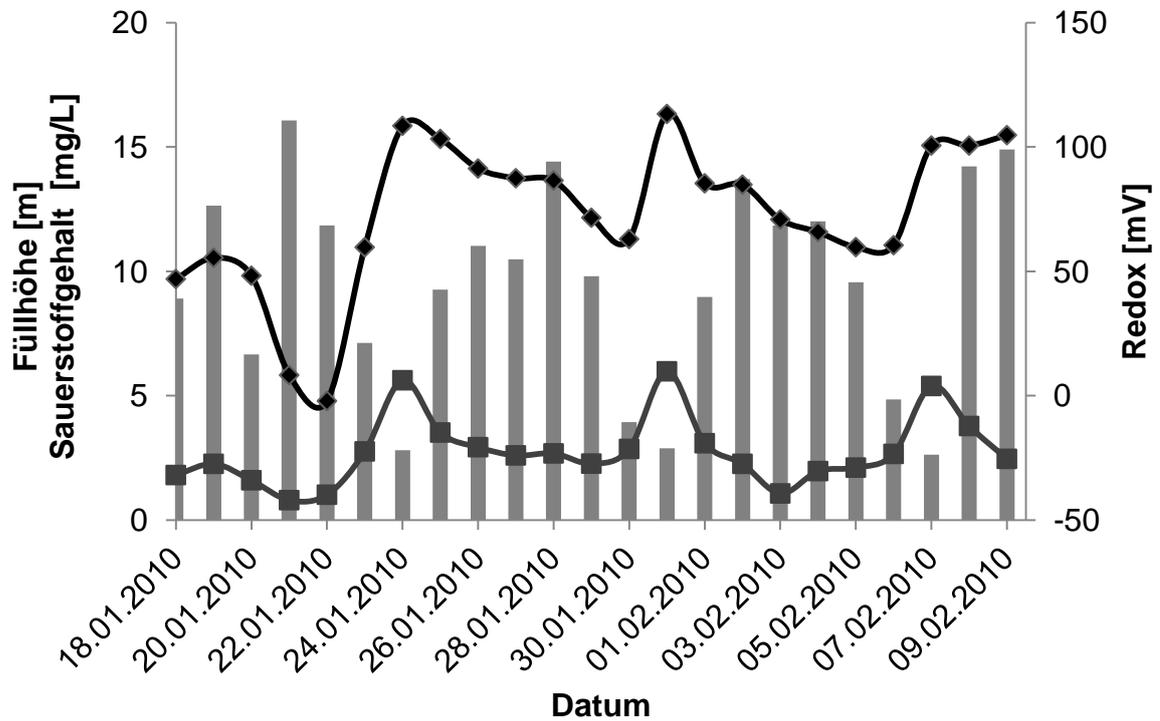
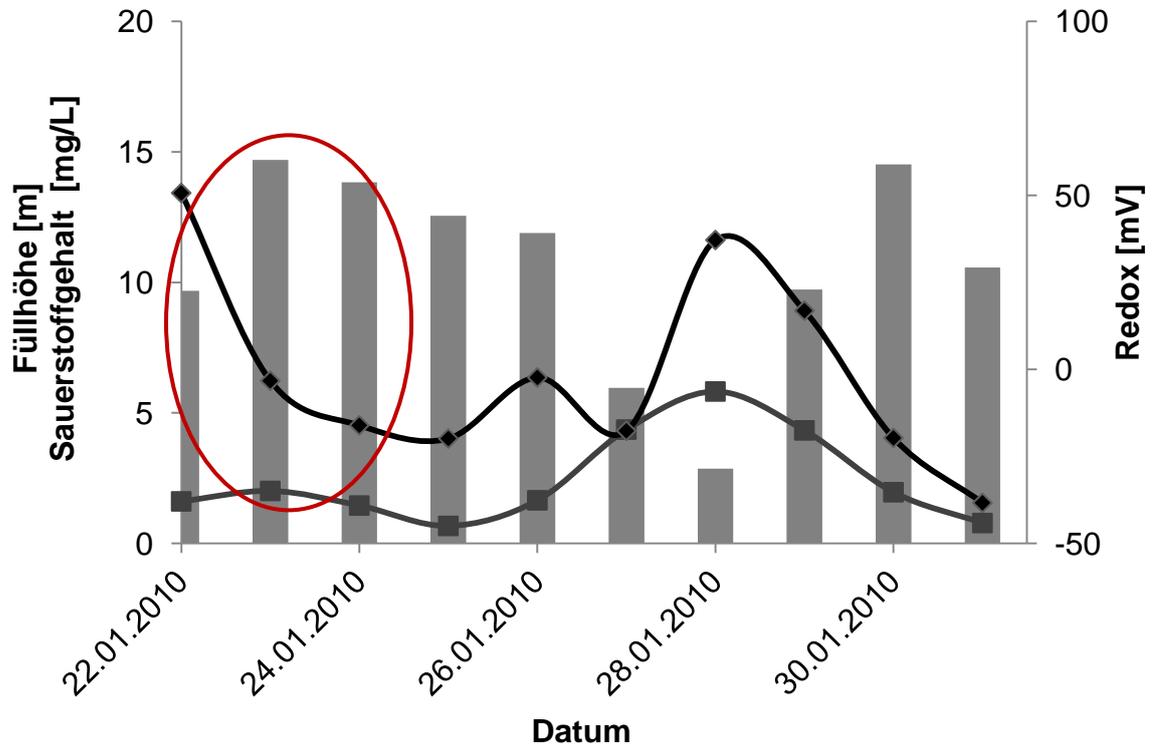


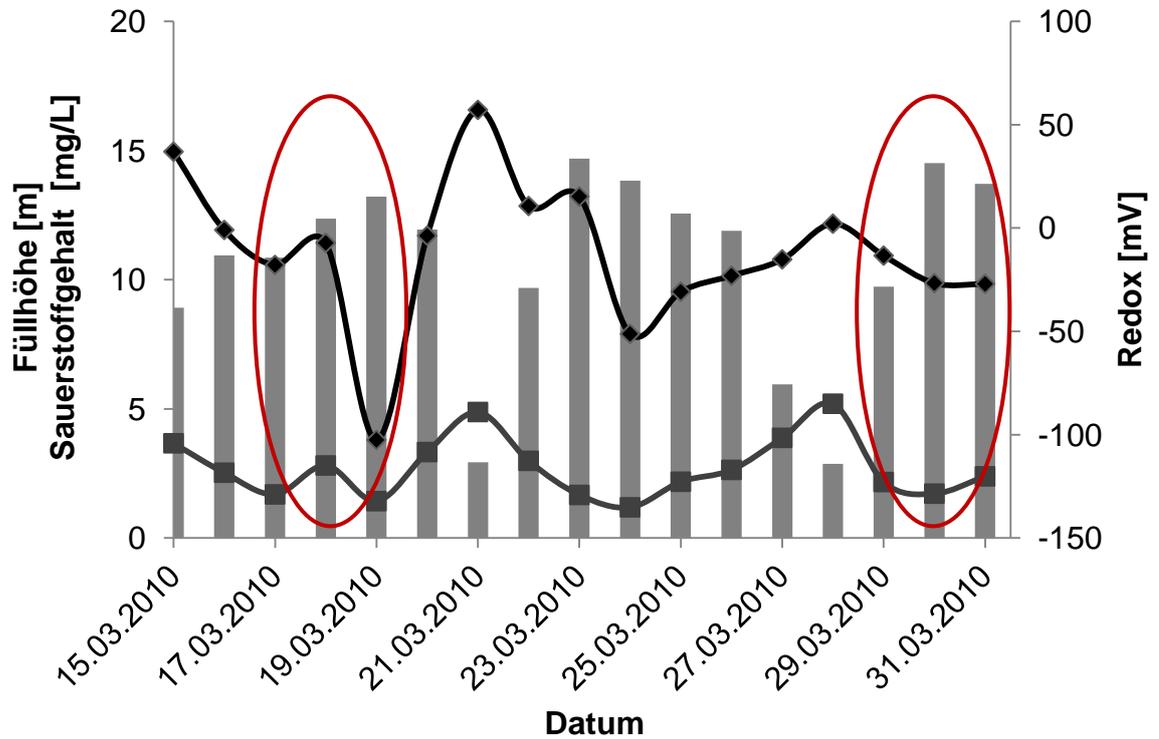
Abbildung 43 Korrelation der Beckenwerte aus Untersuchungszeitraum (A). Als Beckenwerte sind die Füllhöhe des Außenbeckens (■) der Sauerstoffgehalt (■) und das Redoxpotenzial (●) dargestellt.

### 7.3 Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (B)



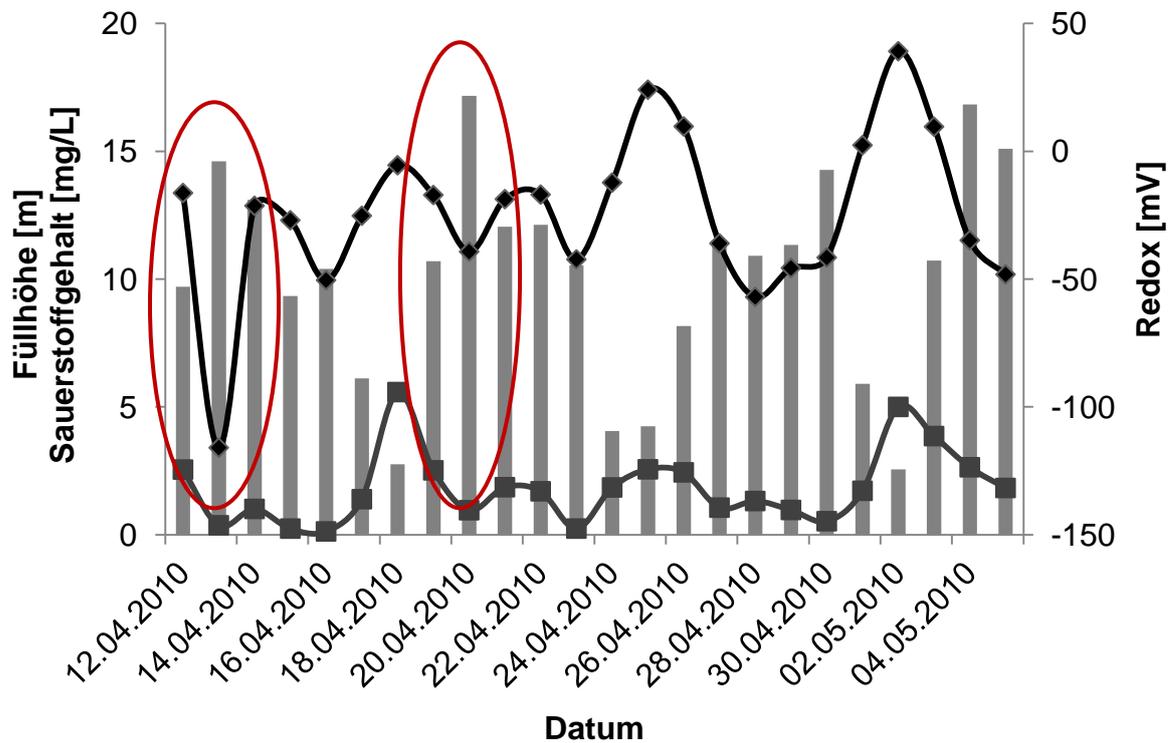
**Abbildung 44 Korrelation der Beckenwerte aus Untersuchungszeitraum (A).** Als Beckenwerte sind die Füllhöhe des Außenbeckens (■) der Sauerstoffgehalt (■) und das Redoxpotenzial (●) dargestellt. Der rot markierte Bereich stellt die Zeiträume dar in denen eine Erhöhung von *F. roseus* beobachtet werden konnte die im Zusammenhang mit einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials und einer Erhöhung der Füllhöhe standen.

#### 7.4 Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (C)



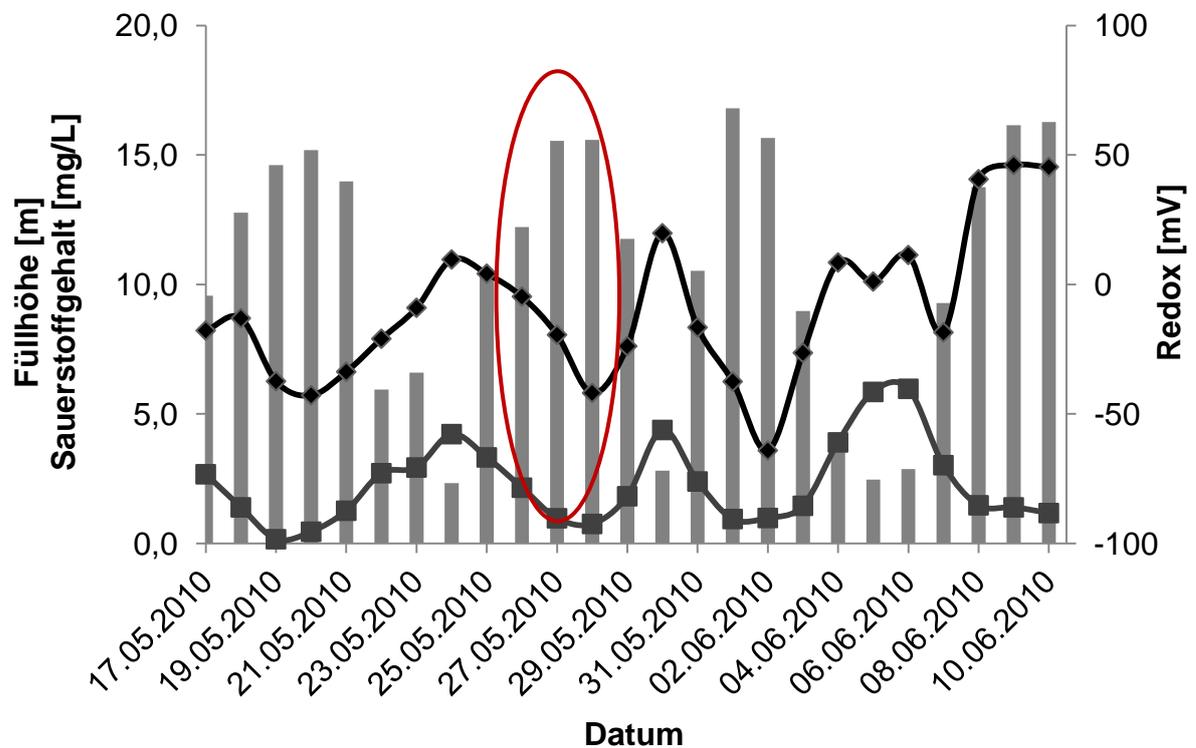
**Abbildung 45 Korrelation der Beckenwerte aus Untersuchungszeitraum (C).** Als Beckenwerte sind die Füllhöhe des Außenbeckens (■) der Sauerstoffgehalt (■) und das Redoxpotenzial (●) dargestellt. Der rot markierte Bereich stellt die Zeiträume dar in denen eine Erhöhung von *F. roseus* beobachtet werden konnte die im Zusammenhang mit einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials und einer Erhöhung der Füllhöhe standen.

## 7.5 Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (D)



**Abbildung 46 Korrelation der Beckenwerte aus Untersuchungszeitraum (A).** Als Beckenwerte sind die Füllhöhe des Außenbeckens (■) der Sauerstoffgehalt (■) und das Redoxpotenzial (●) dargestellt. Der rot markierte Bereich stellt die Zeiträume dar in denen eine Erhöhung von *F. roseus* beobachtet werden konnte die im Zusammenhang mit einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials und einer Erhöhung der Füllhöhe standen.

## 7.6 Korrelation der Beckenwerte aus dem Untersuchungszeitraum (E)



**Abbildung 47 Korrelation der Beckenwerte aus Untersuchungszeitraum (E).** Als Beckenwerte sind die Füllhöhe des Außenbeckens (■) der Sauerstoffgehalt (■) und das Redoxpotenzial (◆) dargestellt. Der rot markierte Bereich stellt die Zeiträume dar in denen eine Erhöhung von *F. roseus* beobachtet werden konnte die im Zusammenhang mit einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotenzials und einer Erhöhung der Füllhöhe standen.

**Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

---

Jessica Schumacher Wuppertal, im Januar 2013