

Konzeption und Test spezieller mikrobiologischer Methoden zur Erkundung der pedogenen Organismenmobilität

im Karstwasser

Univ.Ass. Dipl.Ing. Peter Holubar, Sabine Heuritsch

Teilprojekt 8.2.2. Hydromikrobiologische Zusatzarbeiten

Inhaltsverzeichnis

1.	Ausgangssituation und Zielsetzung	2
2.	Literaturrecherche	2
3.	Einleitung - Sondentechnik	3
4.	Material	4
4.1.	Mikroorganismen	4
4.2.	Verwendete Gensonden.....	4
4.3.	Medien.....	4
5.	Methode.....	5
5.1.	Immobilisierung der DNA	6
5.2.	Vorhybridisierung	6
5.3.	Haupthybridisierung.....	6
5.4.	Waschschritte	6
5.5.	Detektion	6
6.	ERGEBNISSE	6
6.1.	Veränderte Parameter zur Erhöhung der Stringenz bei Streptomyceten.....	7
6.2.	Veränderte Parameter zur Erhöhung der Stringenz bei Agrobakterien.....	9
7.	LITERATURVERZEICHNIS	11

1. Ausgangssituation und Zielsetzung

Bodenerosion dürfte weltweit gesehen dramatischere Konsequenzen für den Boden als Lebensraum haben, als etwa Dünger- und Schadstoffeintrag. Bei Ackerbau in Hanglagen wurden Erosionsfrachten von 30 t pro Hektar und Jahr gemessen. In humiden Klimagebieten werden lediglich 1-2 t Boden pro Hektar und Jahr, also etwa 0,1 - 0,2 mm, neu gebildet. Mit dem Boden werden auch Nähr- und Schadstoffe abgetragen, die dadurch in Oberflächengewässer gelangen können. Herkömmliche Methoden der Erosionsmessung bedienen sich verschiedener chemischer und physikalischer Analyseverfahren. Mikrobiologische Untersuchungen können Aufschluß über fäkale Verunreinigung von Oberflächengewässern durch Kontakt mit verunreinigtem Boden geben. Der Nachweis des Eintrages von Bodenpartikeln durch die Bestimmung von für Bodenbakterien spezifischen Keimzahlen ist jedoch schwierig. Ein möglicher Weg ist allerdings der Nachweis von Bakterien, die etwa nur mit Pflanzen vergesellschaftet existieren können. Finden sich dann solche Bakterien im Quellwasser neben einer hohen Anzahl von Coliformen, so kann aufgrund der Gegebenheiten im Karstsystem der Schluß gezogen werden, daß eine Kontamination der Quelle im Bereich des Quellaustritts oder später erfolgte. Eventuell kann aus der Anzahl der rein bodenbürtigen Mikroorganismen auch auf die Menge des eingetragenen Bodens geschlossen werden.

2. Literaturrecherche

Markerkeime

In der Geohydrologie wurden diverse Mikroorganismen als Alternative zur chemischen Tracertechnik als Markerorganismen eingesetzt:

Serratia marcescens 1,0-1,5 µm großes, begeißeltes, gram neg. Stäbchen, rosarot pigmentierte Stämme sind pathologisch unbedenklich, Mutationen (nicht pigmentiert) können allerdings im Klinikbereich hochpathogen sein

E.Coli kommt im Wasser natürlich nicht vor, Anwesenheit deutet auf

ATCC 11229 fäkale Verunreinigung, es sind auch humanpathogene Stämme bekannt

Bacillus stearothermophilus hat bei 56 °C sein optimales Wachstum, dies erlaubt die Unterscheidung zu anderen Arten, kommt allerdings auch im Boden vor

Pseudomonas violacea gelbliche bis violette Kolonien auf Gelatine, bildet Farbstoff Janthin. Keine Hinweise auf Pathogenität, allerdings sind Pseudomonaden sind typische Hospitalkeime

Bacillus acidocaldarius isoliert aus sauren, heißen Quellen in USA und auf

DSM 446/ATCC 27009Hawaii. Wächst optimal bei pH 3 und 65 °C. Stärkehydrolyse

Weitere eingesetzte Organismen:

Streptococcus faecalis (jetzt: *Enterococcus faecalis*), *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus subter*, *Bacillus aceti*, *Bacillus globigii* (jetzt: *Bacillus subtilis* ATCC 9272), *Aeromonas hydrophilia* *Salmonella typhimurium* (apathogene Variante), *Lumines vibrio* (Leuchtbakterien, kommen allerdings auch im Grundwasser vor), *Acetobacter xylenium* (Bestandteil der Kahlhaut auf stehenden Gewässern, *Mycoderma aceti*).

Einsatzgebiete der oben angeführten Markerkeime waren Kluftgrundwasserleiter, Porengrundwasserleiter, Karstwasser, Oberflächen- und Küstengewässer, die Ungesättigte Zone und Säulenversuche. Oftmals werden die Markerkeime mit anderen Tracern, etwa Driftkörpern (gefärbten Lycopodium-Sporen) oder chemischen Tracern wie Uranin eingesetzt.

Neben Bakterien wurden auch Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, *Hansenula sp.*) und Phagen (*E.coli*-Phage T1, T7, F2; ϕ X-Phage, Wildphage P1 von *Pseudomonas fluorescens*).

Die Wiederfindungsrate war bei allen diesen Versuchen minimal (10^{-6}), daher sind zur Markierung große Mengen erforderlich. Auch ist nicht in allen Fällen die pathologische Unbedenklichkeit (Mutationen!) eindeutig geklärt.

Alle diese Versuche wurden im Hinblick auf mögliche Erkenntnisse im Bereich der Hydrologie gemacht. Es wurde kein einziger Artikel gefunden, der die Möglichkeit des Erosionsmonitorings mittels Tracerkeimen zum Inhalt hatte.

3. Einleitung - Sondentechnik

Eine Hauptaufgabe dieser Arbeit bestand darin, eine Nachweismöglichkeit für *Streptomycceten*, *Agrobakterien* und *Rhizobien* zu finden und diese zu optimieren. Dazu wurde die Hybridisierungstechnik verwendet, eine seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzte Methode zum Nachweis von Bakterien.

Watson und Crick (1953) entdeckten das jedes DNA Molekül aus zwei Einzelsträngen besteht, die spezifisch durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren miteinander verbunden sind. Ihr Grundmodell bildet die Basis der Hybridisierung. Marmur und Doty (1959) haben gezeigt, daß sich die beiden Stränge einer Doppelhelix rasch trennen können, wenn die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen gestört werden. Dies kann durch Erwärmen einer DNA Lösung geschehen oder durch Säure - bzw. Alkalizugabe, die eine Ionisation der Basen zur Folge hat. Dieser Vorgang ist reversibel und das erneute verbinden zweier Einzelstränge zu einem Doppelstrang wird Hybridisierung genannt. Das Aufwinden der Helix wird auch schmelzen genannt, wobei die Schmelztemperatur T_m definiert ist als diejenige Temperatur, bei der die Helixstruktur zur Hälfte verloren gegangen ist. Für Oligonucleotide (11-25 bp) wurde eine Formel von Wallace et al. (1979) und Suggs et al. (1981) zur Berechnung der Schmelztemperatur herausgegeben.

$T_m(^{\circ}\text{C}) \approx 4 \cdot (\text{Anzahl von Guanin und Cytosin}) + 2 \cdot (\text{Anzahl von Adenin und Thymin})$

Eine zunehmende Länge von komplementären Nucleinsäuren bewirkt eine Erhöhung der Doppelstrangstabilität und favorisiert somit die Assoziation zu Basenpaaren. Variationen bei der Wahl der Temperatur, der Salz- und der Probenkonzentration beeinflussen die Hybridisierungsreaktion. Erhöhung der Temperatur oder Erniedrigung der Salzkonzentration bewirkt eine Dissoziation des Doppelstranges. Nicht passende Basenpaare, sogenannte mismatches, in nicht perfekt komplementären DNA Strängen reduzieren die thermische Stabilität der DNA Duplexmoleküle.

Um diesen Vorgang der Nucleinsäurehybridisierung nachweisen zu können, ist es notwendig, einen der beiden Hybridisierungspartner zu markieren. Diese Markierung der Gensonde kann auf verschiedene Arten erfolgen :- radioaktive Markierung- nicht radioaktive Markierung

Sowohl radioaktive (^{32}P , ^{35}S , ^{125}I oder ^3H) als auch nicht radioaktive Markermoleküle (Biotin, Fluoreszenzfarbstoffe, Digoxigenin) können in Form von modifizierten Nucleotiden enzymatisch in DNA oder RNA eingebaut werden. DNA kann man außerdem nicht radioaktiv markieren, indem man die DNA Helix chemisch modifiziert. In dieser Arbeit wird als nicht radioaktives Markermolekül Biotin (Vitamin H) und Fluorescein verwendet, beide werden in Form von Biotin-11-dUTP und Fluorescein-11-dUTP an das 5' Ende des Oligonucleotides gekoppelt. Zwischen dem Markermolekül und der Base ist jeweils ein Linker aus mindestens 11 Kohlenstoffatomen eingefügt. Dadurch treten bei der Hybridisierung keine sterischen Behinderungen auf, und die Nachweisreagentien haben freien Zugang zu den Markermolekülen. Die Mehrzahl der Markermoleküle sind immunogen und lassen sich mit Antikörpern nachweisen. Biotin läßt sich entweder mit Anti-Biotin-Antikörper oder mit Avidin nachweisen. Statt Avidin kann auch Streptavidin eingesetzt werden, das aus dem Bakterium *Streptococcus avidini* (ATCC 27419) stammt. Dieses Streptavidin ist im Gegensatz zum tierischen Avidin bei neutralem pH ungeladen und enthält keine Kohlenhydratseitenketten. Durch Verwendung von Streptavidin lassen sich daher unspezifische Bindungen an geladene Moleküle vermeiden. Die Affinität von Streptavidin zu Biotin ist allerdings um einige Größenordnungen niedriger als die von Avidin, das außerdem stabiler ist. Als Antikörper für Fluorescein dient ein Anti-Fluorescein Alkaline Phosphatase Konjugat. An der Stelle an der die Probe gebunden hat, kommt es zu einer chemilumineszenten Reaktion. Das da aus resultierende Licht wird auf einen Hyperfilm MP übertragen und es kommt an diesen Stellen zu einer Schwarzfärbung.

Eine weitere Aufgabe bestand nach der Optimierung der Gensonden darin, diese zur Erkundung der pedogenen Organismenmobilität im Karstwasser im Rahmen der Ereigniskampagnen einzusetzen. Es

erfolgte eine Beprobung der beiden Eichquellen : Steyern Quelle und Hinterer Rettenbach, es wurden auch Bodenproben aus unterschiedlichen Höhenlagen im Einzugsgebiet der Steyernquelle (700m, Vorderreuterstein 956m, Eiseneck 1298m) und im Einzugsgebiet des Hinteren Rettenbachs (Mehlboden) genommen.

Zusätzlich wurde im Labor ein Versuch mit *Agrobacterium tumefaciens* auf *Nicotiana tabacum* anhand einer Modell Bodensäule durchgeführt. Das weitverbreitete Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* infiziert Pflanzen und führt fremde Gene in sie ein. An der Infektionsstelle wächst ein Tumor aus, der als Wurzelhalsgalle (crown gall) bezeichnet wird und der den Nährstofffluß der Pflanze herabsetzt.

4. Material

4.1. Mikroorganismen

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit werden die unten angeführten Bakterienstämme verwendet.

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	DSM 30204
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	DSM 30200
<i>Streptomyces anulatus</i>	DSM 40361
<i>Streptomyces griseus</i>	DSM 40236
<i>Rhizobium meliloti</i>	DSM 30135
<i>Rhizobium trifolii</i>	DSM 30138
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2981
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50124

4.2. Verwendete Gensonden

Für die Hybridisierungsversuche werden unterschiedliche Gensonden verwendet.

Für die *Streptomyceten* wird eine Gensonde aus der Literatur genommen. (Applied and Environmental Microbiology, 1991, Vol. 57, No. 5 ; Designation of Streptomycete 16S and 23S rRNA - Based Target Regions for Oligonucleotide Probes)

Streptomyceten Sonde : 5' GCGTCGAATTAAGCCACA 3'

Für *Agrobakterien* und *Rhizobien* war eine Suche im Internet mittels Blast Server in einer bereits bestehenden Nucleotid Datenbank notwendig.

Agrobakterien Sonde : 5'TTACCCGTAGAGATATGGGGTC 3'

Rhizobien Sonde : 5'GCGGAGGCGCTCGCCCCTGC 3'

Auch für die *Eubakterien* wird nach langer Recherche eine Gensonde aus der Literatur genommen. (Applied and Environmental Microbiology, 1990, Vol. 56, No. 6 ; Combination of 16S rRNA - Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations)

Eubakterien Sonde : 5'GCTGCCTCCCGTAGGAGT 3'

4.3. Medien

Die für *Streptomyceten*, *Agrobakterien* und *Rhizobien* verwendeten Medien zur selektiven Anreicherung:

- Selektivnährmedium für *Streptomyceten*

NPPC - Agar (Nystatin, Polymyxin B Sulfat, Penicillin G, Cycloheximid)

Antibiotikastock	0,5g/l Nystatin
	50mg/l Polymyxin B Sulfat
	10mg/l Penicillin G

	500mg/l Cycloheximid
Agar	20g/l
Antibiotikastock	10ml/l

• Selektivnährmedien für *Agrobakterien*

BIOVAR 1

L-arabitol	3,04g/l
NH ₄ NO ₃	0,16g/l
KH ₂ PO ₄	0,54g/l
K ₂ HPO ₄	1,04g/l
Na-taurocholat	0,29g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25g/l
Agar	15g/l
Kristallviolett	2ml

nach dem autoklavieren Zusatz von
Cycloheximid (2%ige Lösung) 1ml

Na₂SeO₃(1%ige Lösung) 6,6ml

SCHROTH et al

Agar	20g/l	
Mannitol	10g/l	
NaNO ₃	4g/l	
MgCl ₂	2g/l	
Ca-propionat	1,2g/l	
MgHPO ₄ ·3H ₂ O	0,2g/l	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1g/l	
NaHCO ₃	0,0075g/l	
MgCO ₃	0,0075g/l	pH = 7,1

nach dem autoklavieren Zusatz von

Berberin	275mg/l
Na-selenit	100mg/l
Penicillin G	60mg/l
Streptomycinsulfat	30mg/l
Cycloheximid	250mg/l
Thyothricin	1mg/l
Bacitracin	100mg/l

• Selektivnährmedium für *Rhizobien*

YMMS - Agar (Yeast Mannitol Mineral Salt Agar)

Mannitol	10g/l	
KH ₂ PO ₄	0,5g/l	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2g/l	
NaCl	0,1g/l	
CaCO ₃	4g/l	
Hefeextrakt	0,4g/l	
Agar	15g/l	pH = 6,8 - 7,0

bei möglicher Pilzkontamination Zusatz von 0,002% Cycloheximid

• Komplexnährmedium für *Streptomyceten*, *Agrobakterien* und *Rhizobien*

NA (Nähragar)

Agar	15g/l
Nährbouillon	8g/l

5. Methode

COLONY LIFT HYBRIDISIERUNG

Die Hybridisierungsschritte erfolgen in Anlehnung an die Broschüre der Firma Amersham

5.1. Immobilisierung der DNA

- Bakterienkolonien werden mit einem sterilen Zahnstocher auf eine Membran (Hybond N⁺, Amersham) aufgebracht
- Filter wird 5 min in einem Lysepuffer (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) bei Raumtemperatur inkubiert
- Filter wird 5 min in einer Neutralisationslösung (1M Tris-HCl, pH = 7,5) bei Raumtemperatur inkubiert
- Filter an der Luft trocknen lassen, um Braunfärbung zu vermeiden
- bei 80°C für 5 min in den Hybridisierungssofen (zur Fixierung der DNA am Filter)

5.2. Vorhybridisierung

Die Aufgabe der Vorhybridisierung besteht darin, das System auf die Temperatur und Konzentrationsbedingungen einzustellen.

- 10ml Vorhybridisierungslösung bereiten

deionisiertes Formamid 5,36ml

20xSSC 2,68ml

50xFPG 268µl

1M KH₂PO₄ 336µl

10%SDS 268µl

Salmon sperm DNA 15µl

50% Dextran Sulfat 1,072ml

- das Filter mit der zu hybridisierenden Nucleinsäure in Foliensack geben und bis auf eine offene Ecke einschweißen
- durch die Öffnung Vorhybridisierungslösung einfüllen, Luftblasen entfernen und die offene Ecke verschweißen
- eingeschweißtes Filter zur Vorhybridisierung in den temperierten Hybridisierungssofen legen und für 1h hybridisieren

5.3. Haupthybridisierung

- nach Beendigung der Vorhybridisierung den Sack an einer Stelle öffnen erneut 10ml Vorhybridisierungslösung und 1µl der gelabelten Probe dazupipettieren, Ecke wieder verschweißen
- Haupthybridisierung kann zwischen 16h und 48h durchgeführt werden

5.4. Waschschritte

- nach Beendigung der Haupthybridisierung die Filter für jeweils 15 min in 1xSSC + 0,1%SDS und 0,5xSSC + 0,1%SDS waschen, um die unspezifisch gebundenen Probe zu entfernen

Die Bedingungen müssen von Fall zu Fall empirisch ermittelt werden. Dabei reduziert man von Schritt zu Schritt die Salzkonzentration der Waschlösung, während die Waschttemperatur bis zur Hybridisierungstemperatur erhöht werden kann.

5.5. Detektion

- Filter in 1:10 Verdünnung des liquid block reagents (Fa. Amersham) für 1h
- anschließend erfolgt die Zugabe des Anti - Fluorescein AP Konjugates oder des Streptavidins, 1h bei Raumtemperatur inkubieren
- Filter 3 mal 10 min in 0,3% Tween 20 waschen
- Filter auf Folie legen + 1ml Detektionslösung (CDP Star Detection Module der Firma Amersham) 2 - 5 min Einwirkzeit
- in der Dunkelkammer Filter auf einen Hyperfilm-MP (Fa. Amersham) legen und exponieren

6. ERGEBNISSE

6.1. Veränderte Parameter zur Erhöhung der Stringenz bei Streptomyceten

• Biotinsonde

Form des Auftrags : 100µl Bakteriensuspension

Tabelle 1: Veränderte Parameter bei der Untersuchungen der biotinelabelten Streptomycetensonde;
Form des Auftrags : 100µl Bakteriensuspension

	Hybridisierungs- temperatur in °C	Oligo Konzentrati- on in ng/ml	Waschlösung und Temperatur	Streptavi- din	Expositions- zeit
Blot 1a	42	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:2000	1h
Blot 2	44	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	10 min
Blot3	44	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	5 min

• Fluoresceinsonde

Form des Auftrags : 100µl Bakteriensuspension

Tabelle 2: Veränderte Parameter bei der Untersuchungen der fluoresceingelabelten Streptomycetensonde; Form des Auftrags : 100µl Bakteriensuspension

	Hybridisierungs- temperatur in °C	Oligo Konzentrati- on in ng/ml	Waschlösung und Temperatur	Anti Fluo- rescein AP Konjugat	Expositions- zeit
Blot 1b	42	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:2000	1h
Blot 4	44	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h

Da mit dem Auftrag von 100 µl Bakteriensuspension keine gut sichtbaren Blots erreicht werden konnten, wurden die Bakterien für die zukünftigen Blots punktweise mit sterilen Zahnstochern aufgetragen.

• Biotinsonde

Form des Auftrags : steriler Zahnstocher

Tabelle 3: Veränderte Parameter bei der Untersuchungen der biotinelabelten Streptomycetensonde;
Form des Auftrags : steriler Zahnstocher

	Hybridisie-	Oligo	Waschlösung	Streptavi-	Expositions
--	-------------	-------	-------------	------------	-------------

	rungs temperatur in °C	Konzentrati- on in ng/ml	und Temperatur	din	zeit
Blot 5	44	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	5 min
Blot 6	44	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	30 sec
Blot 8	46	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	30 sec
Blot 11	50	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1 min
Blot 14	50	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 52°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1 min
Blot 20	35	5	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 48°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1 min
Blot 21	35	5	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 48°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	5 min
Blot 22	35	keine Sonde Kontrolle	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 48°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1 min
Blot 23	35	keine Sonde Kontrolle	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 48°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	5 min

Mit Biotin als Markermolekül wird aufgrund der Negativkontrolle aufgehört. Es kommt ohne Zusatz von Biotin trotzdem zu Bindungen, was vermutlich auf hohen Biotingehalt in den Zellwänden von Bakterien schließen lässt.

• **Fluoresceinsonde**

Form des Auftrags : steriler Zahnstocher

Tabelle 4: Veränderte Parameter bei der Optimierung der fluoresceingelabelten Streptomycetensonde;
Form des Auftrags : 100µl Bakteriensuspension

	Hybridisie- rungs- temperatur in °C	Oligo Konzentration in ng/ml	Waschlösung und Temperatur	Anti Fluorescein AP Konjugat	Expositions- zeit
Blot 7	44	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h
Blot 9	46	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	45 min
Blot 10	46	100	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h
Blot 12	50	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h
Blot 13	50	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot 15	50	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 52°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h
Blot 16	50	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 52°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot 17	60	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h
Blot 18	60	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2,5h
Blot 19	35	5	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 48°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot 24	46	5	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 46°C Waschl.2: 0,1xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot 25	46	5	Waschl.1: 5xSSC + 0,5%SDS bei 46°C Waschl.2: 0,1xSSC + 1%SDS	1:5000	2h
Blot 26	46	5	Waschl.1: 0,5xSSC + 0,1%SDS bei 46°C Waschl.2: 0,1xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h

6.2. Veränderte Parameter zur Erhöhung der Stringenz bei Agrobakterien

• Fluoresceinsonde

Form des Auftrags : steriler Zahnstocher

Tabelle 5: Veränderte Parameter bei der Optimierung der fluoresceingelabelten Agrobakterien-sonde;
Form des Auftrags : steriler Zahnstocher

	Hybridisierungs- temperatur in °C	Oligo Konzentrati- on in ng/ml	Waschlösung und Temperatur	Anti Fluorescein AP Konjugat	Expositions- zeit
Blot 27	64	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,1xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot 28	64	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei RT Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot 29	60	10	Waschl.1: 1xSSC+ 0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,1xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot29 a	60	10	Waschl.1: 1xSSC+ 0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot 30	60	10	Waschl.1: 1xSSC+0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,25xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h
Blot30 a	60	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,125xSSC + 0,1%SDS	1:5000	2h

Zur Kontrolle der Methode wurde eine Hybridisierung mit einer fluoresceingelabelten **Eubakterien-sonde** durchgeführt.

Tabelle 6: Eubakterien-sonde; Form des Auftrags : steriler Zahnstocher

	Hybridisierungs- temperatur in °C	Oligo Konzentrati- on in ng/ml	Waschlösung und Temperatur	Anti Fluorescein AP Konjugat	Expositions- zeit
Blot31	60	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,5xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h
Blot31 a	60	10	Waschl.1: 1xSSC + 0,1%SDS bei 60°C Waschl.2: 0,125xSSC + 0,1%SDS	1:5000	1h

7. LITERATURVERZEICHNIS

AMANN R. et al.

Combination of 16S rRNA - Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. App. Environ. Microbiol., Vol 56, No. 6, p. 1919-1925

BROWN T.A

Gentechnologie für Einsteiger (1993)

KELLER G.H.

DNA Probes (1993)

MANAK M.M.

LEITCH A.R.

situ - Hybridisierung (1994)

SCHWARZACHER T.

JACKSON D.

REGNER FERDINAND

Etablierung von nicht radioaktiven Hybridisierungs- für Nucleinsäuren (1988)

SCHAAD N.W.

Laboratory Guide of Identification of Plant Pathogenic Bacteria

STACKEBRANDT E. et al.

Designation of Streptomyces 16S and 23 S rRNA - Based Target Regions for Oligonucleotide Probes; Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56, No.5, p.1468-1477

PAPANDRIKOPOULOU A.

Blotting Verfahren und Hybridisierungen

HAHN H.

TIJSSEN P.

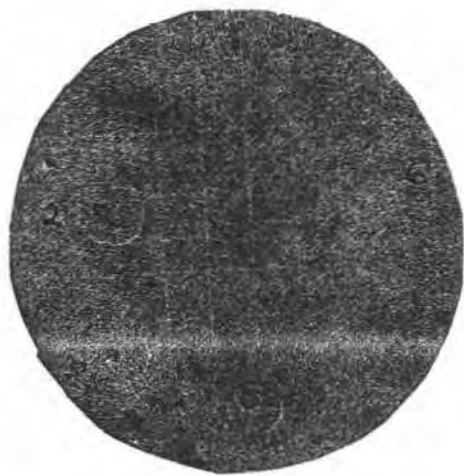
Laboratory techniques in biochemistry and molecular (1993)

Part I : Theory and nucleic acid preparation

Part II : Probe labeling and hybridisation techniques

6. ANHANG

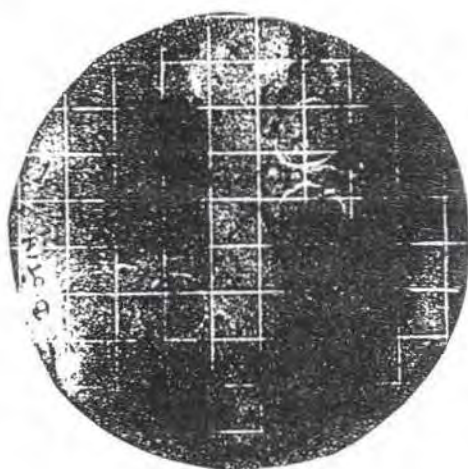
Blot 1



Auftrag :

1. *Agrobacterium rhizogenes*
2. *Agrobacterium tumefaciens*
3. *Streptomyces anulatus*
4. *Streptomyces griseus*
5. *Pseudomonas fluorescens*
6. *Enterococcus faecalis*

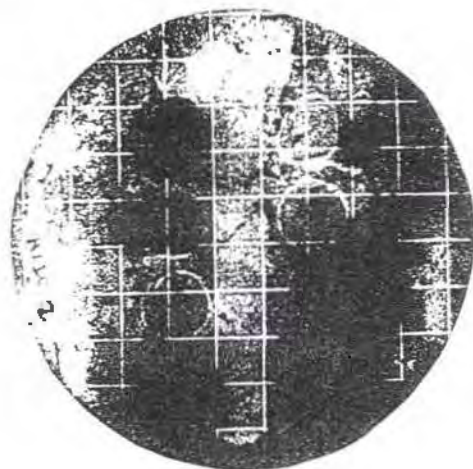
Blot 2



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Streptomyces griseus*
4. *Streptomyces anulatus*
5. *Rhizobium trifolii*
6. *Rhizobium meliloti*
7. *Enterococcus faecalis*
8. *Pseudomonas fluorescens*

Blot 3



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Streptomyces griseus*
4. *Streptomyces anulatus*
5. *Rhizobium trifolii*
6. *Rhizobium meliloti*
7. *Enterococcus faecalis*
8. *Pseudomonas fluorescens*

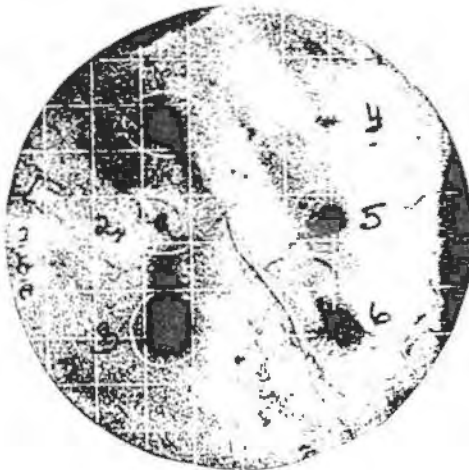
Blot 4



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Streptomyces griseus*
4. *Streptomyces anulatus*
5. *Rhizobium trifolii*
6. *Rhizobium meliloti*
7. *Enterococcus faecalis*
8. *Pseudomonas fluorescens*

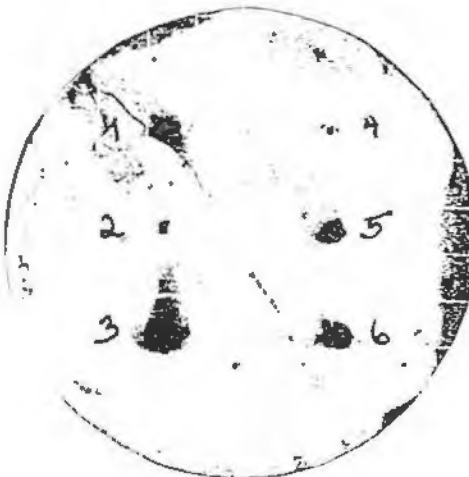
Blot 5



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

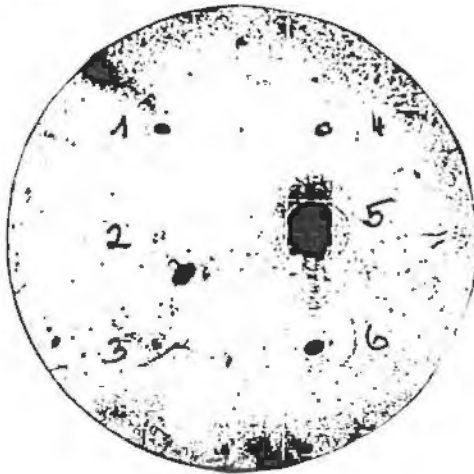
Blot 6



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

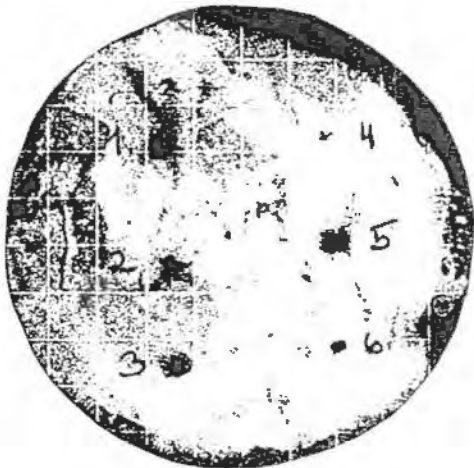
Blot 7



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

Blot 8



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

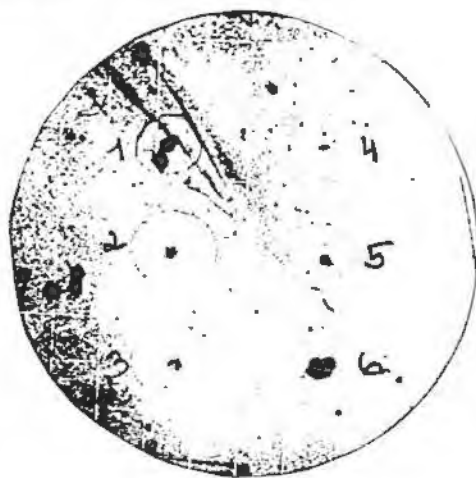
Blot 9



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

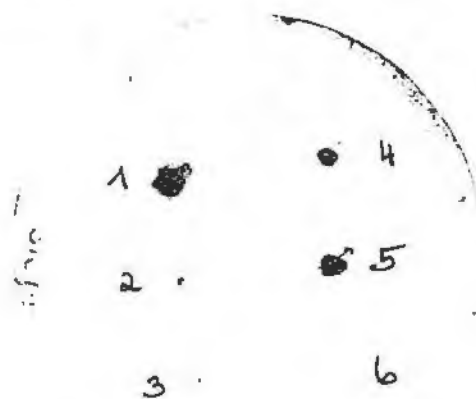
Blot 10



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

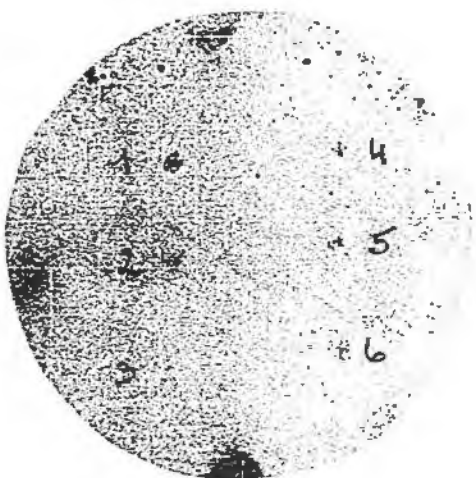
Blot 11



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

Blot 12



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

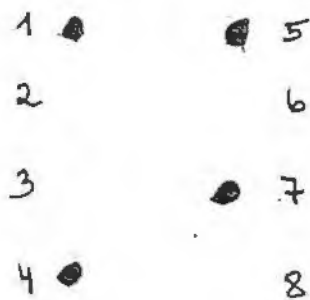
Blot 13



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*

Blot 14



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

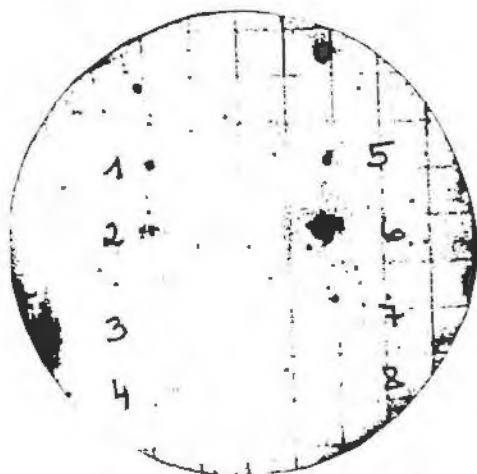
Blot 15



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

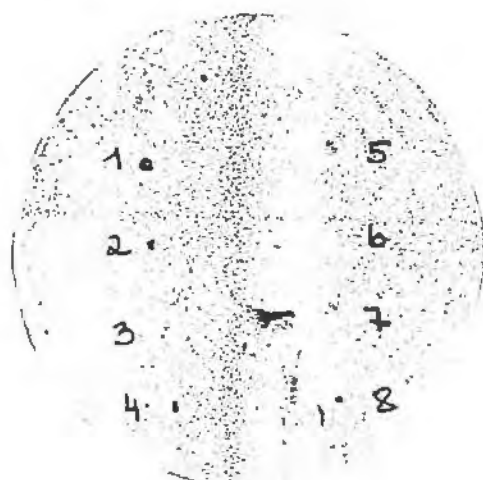
Blot 16



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

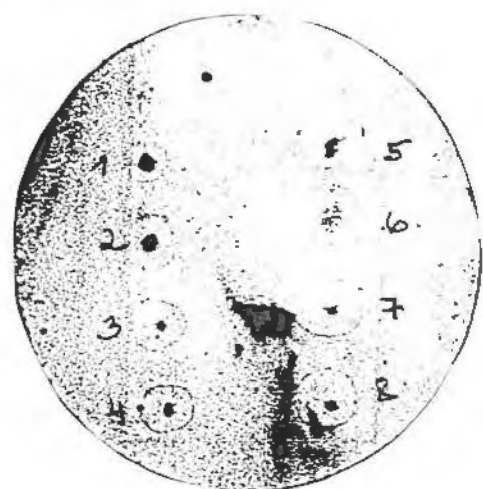
Blot 17



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

Blot 18



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium trifolii*
8. *Rhizobium meliloti*

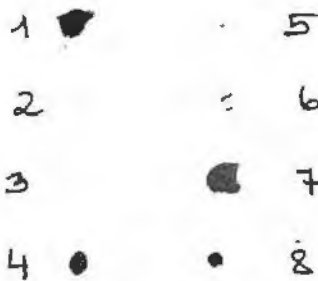
Blot 19



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

Blot 20



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

Blot 21



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

Blot 22



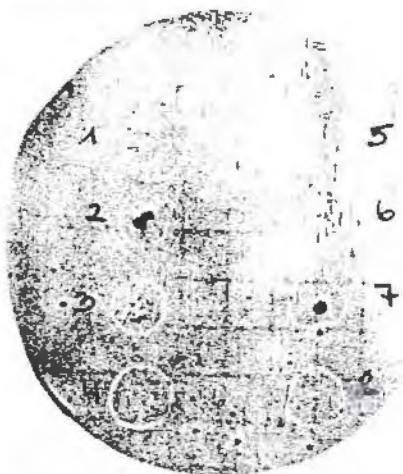
- Auftrag :
1. *Agrobacterium tumefaciens*
 2. *Agrobacterium rhizogenes*
 3. *Enterococcus faecalis*
 4. *Pseudomonas fluorescens*
 5. *Streptomyces anulatus*
 6. *Streptomyces griseus*
 7. *Rhizobium meliloti*
 8. *Rhizobium trifolii*

Blot 23



- Auftrag :
1. *Agrobacterium tumefaciens*
 2. *Agrobacterium rhizogenes*
 3. *Enterococcus faecalis*
 4. *Pseudomonas fluorescens*
 5. *Streptomyces anulatus*
 6. *Streptomyces griseus*
 7. *Rhizobium meliloti*
 8. *Rhizobium trifolii*

Blot 24



- Auftrag :
1. *Agrobacterium tumefaciens*
 2. *Agrobacterium rhizogenes*
 3. *Pseudomonas fluorescens*
 4. *Enterococcus faecalis*
 5. *Streptomyces anulatus*
 6. *Streptomyces griseus*
 7. *Rhizobium trifolii*
 8. *Rhizobium meliloti*

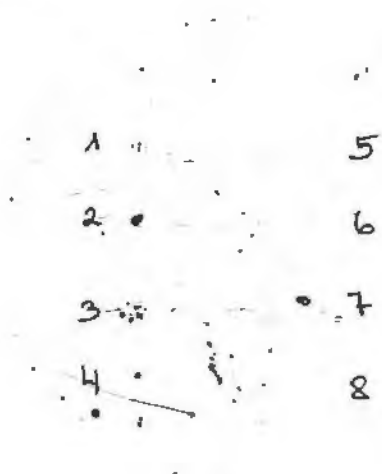
Blot 25



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium trifolii*
8. *Rhizobium meliloti*

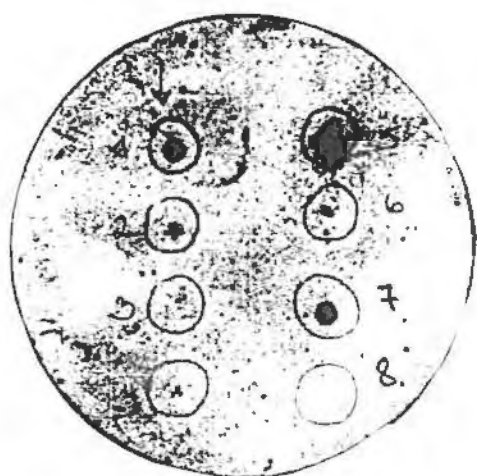
Blot 26



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium trifolii*
8. *Rhizobium meliloti*

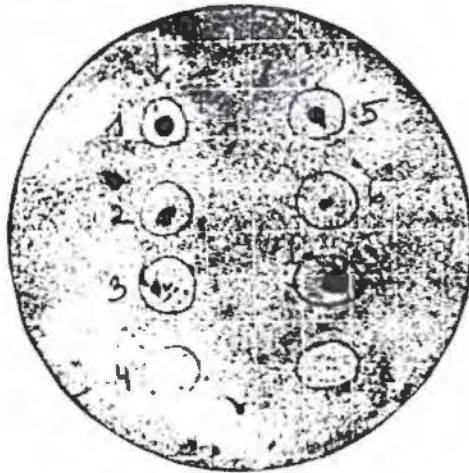
Blot 27



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium trifolii*
8. *Rhizobium meliloti*

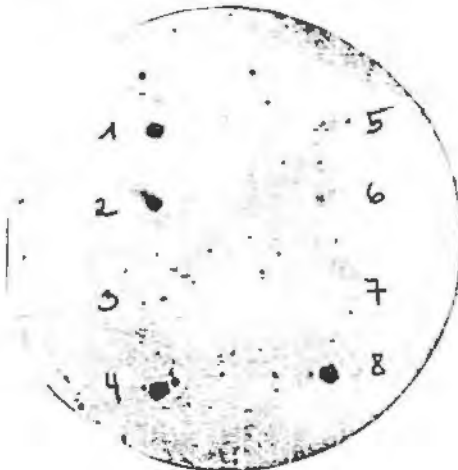
Blot 28



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium trifolii*
8. *Rhizobium meliloti*

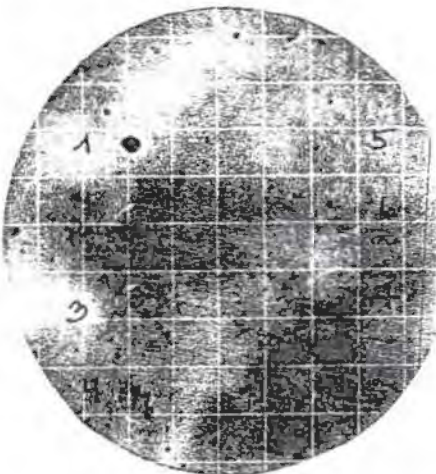
Blot 29



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

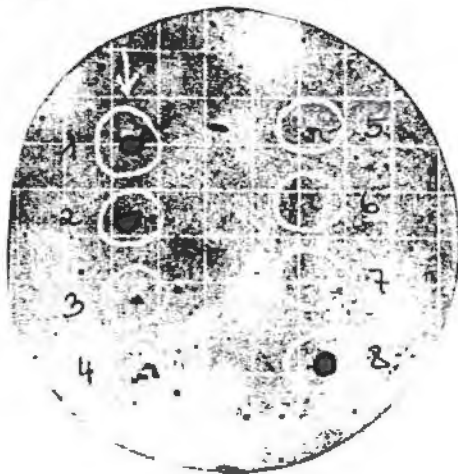
Blot 29a



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

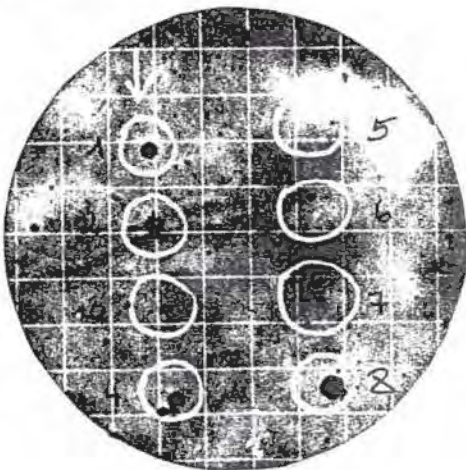
Blot 30



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

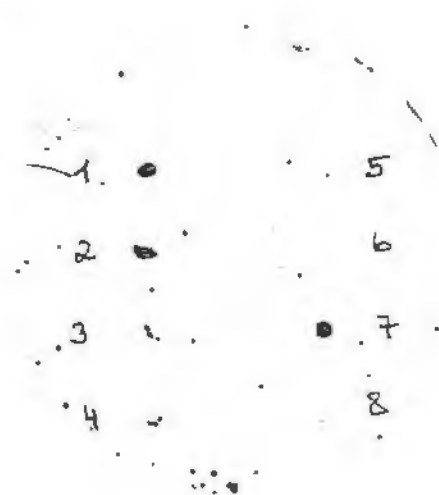
Blot 30a



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Pseudomonas fluorescens*
5. *Streptomyces anulatus*
6. *Streptomyces griseus*
7. *Rhizobium meliloti*
8. *Rhizobium trifolii*

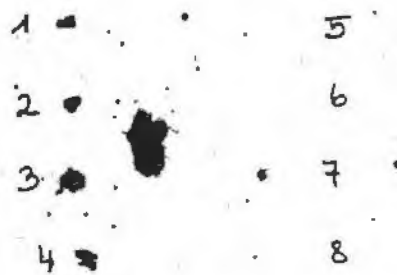
Blot 31



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces griseus*
6. *Streptomyces anulatus*
7. *Rhizobium trifolii*
8. *Rhizobium meliloti*

Blot 31a



Auftrag :

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *Agrobacterium rhizogenes*
3. *Pseudomonas fluorescens*
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptomyces griseus*
6. *Streptomyces anulatus*
7. *Rhizobium trifolii*
8. *Rhizobium meliloti*

Karstprogramm

TP 1603-8.2.2./95 : Hydromikrobiologische Zusatzarbeiten

Stellungnahme

vom 24.01.2007 zum Endbericht HOLUBAR / HEURITSCH:

Konzeption und Test spezieller mikrobiologischer Methoden zur Erkundung pedogener Organismenmobilität im Karstwasser

Bezug: Abschlußbericht HOLUBAR / HEURITSCH vom Juli 1996

Nach neuesten Erkenntnissen dürften Mikrolebewesen zu den wichtigsten und gemessen an ihrer Biomasse auch zahlreichsten Triftkörpern und Besiedlern der unterirdischen Wässer zählen. In den Quellen sind somit nicht nur die Fäkalindikatoren interessant (Projekt SCHMIDT), sondern auch die speziell aus der Pedosphäre ausgewaschenen Bakterien (Projekt HOLUBAR) sowie die stygobiont lebenden Stämme (Projekt MENNE). Für die vorliegende Studie war der Auftrag erteilt worden, die Möglichkeit des Nachweises speziell in der Podo- und Rhizosphäre beheimateter Mikrobionten im Quellwasser nachzuprüfen, die dazu vorhandene Literatur zu recherchieren und geeignete Methoden zum Nachweis vorzustellen. Herkömmliche Methoden der Erosionsmessung bedienen sich verschiedener chemischer und physikalischer Analyseverfahren. Der Nachweis des Eintrages von Bodenpartikeln durch die Bestimmung von für Bodenbakterien spezifischen Keimzahlen ist schwierig. Ein möglicher Weg ist der Nachweis von Bakterien, die etwa nur mit Pflanzen vergesellschaftet existieren können. In der Geohydrologie wurden diverse Mikroorganismen als Alternative zur chemischen Tracertechnik als Marker eingesetzt: Alle diese Versuche wurden im Hinblick auf mögliche Erkenntnisse im Bereich der Hydrologie gemacht. Es wurde kein einziger Artikel gefunden, der die Möglichkeit des Erosionsmonitorings mittels Tracerkeimen zum Inhalt hatte. Eine Hauptaufgabe der Arbeit bestand darin, eine Nachweismöglichkeit für *Streptomyces*, *Agrobakterien* und *Rhizobien* zu finden und diese zu optimieren. Dazu wurde die Hybridisierungstechnik verwendet, eine seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzte Methode zum Nachweis von Bakterien. Nach der Optimierung der Gensonden wurden diese 1996 bereits zur Erkundung der pedogenen Organismenmobilität im Karstwasser im Rahmen der Ereigniskampagnen 1996 eingesetzt.

Zusätzlich wurde im Labor ein Versuch mit *Agrobacterium tumefaciens* auf *Nicotiana tabacum* anhand einer Modell-Bodensäule durchgeführt. Das weitverbreitete Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* infiziert Pflanzen und führt fremde Gene in sie ein. An der Infektionsstelle wächst ein Tumor aus, der als Wurzelhalsgalle (crown gall) bezeichnet wird und den Nährstofffluß der Pflanze herabsetzt. Die Studie zeigt recht klar und in Kürze auf, daß die Aufgabenstellung lösbar ist und ihre Anwendung im Zuge der Quellmeß- und Ereigniskampagnen grundsätzlich empfohlen werden kann. Im Jahr 1996 wurden Gelände- und Quellenproben gezogen und Wasserproben während der Ereigniskampagne 2/96 analysiert. Der konzeptive Auftrag ist somit vollinhaltlich erfüllt und wurde 1996 mit einem Evaluierungsprogramm verlängert.

Für die Koordination des Karstprogrammes:

Anlagen: Bericht ausgedruckt (13 S., Abbildungen der Blots)
Bericht auf Diskette