

**Konzeption und Test spezieller
mikrobiologischer Methoden
Erkundung der pedogenen
Organismenmobilität
im Karstwasser**

**Karstprogramm
Teilprojekte 7.5.2./96**

Peter Holubar
Sabine Heuritsch
Claudia Seper

Jahresberichte 1996

Für den Inhalt verantwortlich:

Univ. Ass. Dipl.-Ing. Peter Holubar
Institut für Angewandte Mikrobiologie
Universität für Bodenkultur
Nußdorfer Lände 11
1190 Wien

Sabine Heuritsch
Claudia Seper

Impressum:

Nationalpark Kalkalpen
Endbericht 1603-7.5.2./96

Herausgeber:
Amt der Oö. Landesregierung
Nationalparkplanung
im Verein Nationalpark Kalkalpen
Obergrünburg 340
4592 Leonstein

Gefördert aus Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt

Die zur Verfügung gestellte Infrastruktur
im Forschungszentrum Molln
wurde gefördert aus Mitteln des Landes Oberösterreich

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Übersetzung vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (durch Fotokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Herausgebers reproduziert werden.



Endbericht 1996

Projekt Karstdynamik 1603

Teilprojekt 8.2.2 Hydromikrobiologische Zusatzarbeiten

„Konzeption und Test spezieller mikrobiologischer Methoden zur Erkundung der
pedogenen Organismenmobilität im Karstwasser“

Univ. Ass. Dipl. Ing. Peter Holubar

Sabine Heuritsch

Claudia Seper

INHALTSVERZEICHNIS

1 AUSGANGSSITUATION UND ZIELSETZUNG	3
2 LITERATURRECHERCHE	4
3 EINLEITUNG	5
3.1 Sondentechnik.....	5
3.2 Eichquellen.....	6
4 MATERIAL UND METHODEN.....	7
4.1 Mikroorganismen.....	7
4.2 Nährmedien.....	7
4.3 Colony-Lift Hybridisierung.....	9
4.3.1 Immobilisieren der DNA	9
4.3.2 Prähybridisierung	10
4.3.3 Haupthybridisierung	11
4.3.4 Waschschritte	12
4.3.5 Antibody Entwicklung.....	12
4.3.6 Detektion.....	13
4.4 Beprobung der Quellen	15
4.4.1 Karstquellen Monitoring „Schneeschnelze“	15
4.4.1.1 Probennahmestellen (siehe Plan im Anhang)	15
4.4.1.2 Probenaufbereitung	15
4.4.2 Karstquellen Monitoring „Herbstliches Niederswasser“	16
4.4.2.1 Probennahmestellen (siehe Plan im Anhang)	16
4.4.2.2 Probenaufbereitung	17
4.4.3 Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“	17
4.4.3.1 Probenaufbereitung	17
4.5 Bodensäulenversuche.....	17
5 VERSUCHE UND ERGEBNISSE	18
5.1 Verwendete Gensonden	18
5.2 Ergebnisse der Untersuchung zur Erhöhung der Stringenz bei den Gensonden.....	19
5.2.1 Streptomycetensonden	20
5.2.2 Agrobakteriensonde	21

5.2.3 Rhizobiensonde	22
5.2.4 Eubakteriensonde	22
5.3 Ergebnisse des Karstquellen Monitorings „Schneeschnmelze“	24
5.4 Ergebnisse des Karstquellen Monitorings „Herbstliches Niederwasser“	25
5.5 Ergebnisse der Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“	27
5.5.1 Wetterentwicklung während der Intensivkampagne	27
5.5.2 Intensivkampagne Hintere Rettenbachquelle	27
5.5.3 Intensivkampagne Steyern Quelle	28
5.5.4 Intensivkampagne Nadelöhr NÖHR	29
5.6 Bodensäulenversuch	30
5.7 Interpretation der Ergebnisse der Keimzahluntersuchungen	30
5.7.1 Ereigniskampagne „Schneeschnmelze“ 26.6.1996	30
5.7.2 Ereigniskampagne „Herbstliches Niederwasser“ 25.10.1996	30
5.7.3 Ereigniskampagne „Sommerliches Hochwasser“ 27.7. bis 30.8.1996	30
6 LITERATURVERZEICHNIS	31

1 AUSGANGSSITUATION UND ZIELSETZUNG

Bodenerosion dürfte weltweit gesehen dramatischere Konsequenzen für den Lebensraum haben, als etwa Dünger- und Schadstoffeintrag. Bei Ackerbau in Hanglagen wurden Erosionsfrachten von 30t pro Hektar und Jahr gemessen. In humiden Klimagebieten werden lediglich 1-2t 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 Oberflächenwasser gelangen können. Naturgemäß ist Bodenerosion im Karstgebiet ein entscheidender Umweltfaktor.

Herkömmliche Methoden der Erosionsmessung bedienen sich verschiedener aufwendiger und teurer chemisch-physikalischer Analyseverfahren. Herkömmliche mikrobiologische Untersuchungen können bestenfalls Aufschluß über fäkale Verunreinigungen von Oberflächengewässern durch Kontakt mit verunreinigtem Boden geben, während der Nachweis des Eintrages an Bodenpartikeln durch die Bestimmung von für Bodenbakterien spezifischen Keimzahlen jedoch schwierig ist. So ist z.B. die Bestimmung der Streptomyceten-Keimzahl einwandfrei durch Verwendung von Spezialnährböden möglich. Da aber Streptomyceten auch in Wasser und Sedimenten vorkommen können, ist ein weiterer weitaus spezifischerer Nachweis von rein bodenstämmigen Stämmen der Gattung Streptomyceten notwendig.

Finden sich dann mit solch spezifischen Methoden bestimmte Bakterienstämme im Quellwasser so muß dieses mit Bodenpartikeln verunreinigt worden sein. Durch längerfristige Beobachtung anhand von Eichquellen sollte es dann möglich sein auf den Ort der Kontamination zu schließen. Eventuell kann aus der Anzahl der rein bodenbürtigen Mikroorganismen auch auf die Menge des eingetragenen Bodens geschlossen werden.

Als Beispiel:

Bei Nachweis von hoher Fäkalcoliformen-Keimzahl und hoher Keimzahl an rein bodenbürtigen Bakterien liegt der Schluß nahe, daß aufgrund der im Karstgebiet bekannten Topologie die Kontamination im erdbodenreichen Quellaustrittsgebiet erfolgte, etwa durch Wildfütterung. Finden sich lediglich hohe Fäkalkeimzahlen so deutet dies auf Kontamination im Bereich des verkarsteten Einzugsgebietes hin.

2 LITERATURERCHE

Markerkeime

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

<i>Serratia marcescens</i>	1,0-1,5µm großes, begeißeltes, gram neg. Stäbchen, rosarot pigmentierte Stämme sind pathologisch unbedenklich, Mutationen (nicht pigmentiert) können allerdings im Klinikbereich hochpathogen sein
<i>E.coli</i> 11229	kommt im Wasser natürlich nicht vor, Anwesenheit deutet auf ATCC fäkale Verunreinigung, es sind auch humanpathogene Stämme bekannt
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	hat bei 56°C sein optimales Wachstum, dies erlaubt die Unterscheidung zu anderen Arten, kommt allerdings auch im Boden vor
<i>Pseudomonas violacea</i>	gelbliche bis violette Kolonien auf Gelatine, bildet Farbstoff Janthin. Keine Hinweise auf Pathogenität, allerdings sind Pseudomonaden typische Hospitalkeime
<i>Bacillus acidocaldarius</i> DSM 446/ATCC 27009	isoliert aus sauren, heißen Quellen in USA und auf Hawaii. Wächst optimal bei pH 3 und 65°C, Stärkehydrolyse

Weitere eingesetzte Organismen:

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

Einsatzgebiete der oben angeführten Markerkeime waren Kluftgrundwasserleiter, Porengrundwasserleiter, Kartwasser, Oberflächen- und Küstengewässer, die Ungesättigte Zone und Säulenversuche. Oftmals werden die Markerkeime mit anderen Tracern, etwa Driftkörper (gefärbte 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 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

3.1 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 (1962) 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.

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

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}J oder ^3H) als auch nichtradioaktive 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 nichtradioaktives 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 daraus resultierende Licht wird auf einen Hyperfilm MP übertragen und es kommt an diesen Stellen zu einer Schwarzfärbung.

3.2 Eichquellen

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, Hinterer Rettenbach und des Nadelörhschachtes (NÖHR). Es wurden auch Bodenproben aus unterschiedlichen Höhenlagen im Einzugsgebiet der Steyernquelle (700m, Vorderreuterstein 956m, Eiseneck 1298m) und im Einzugsgebiet des Hinteren Rettenbachs (Mehlboden) genommen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Mikroorganismen

Die für diese Untersuchung gewählten Mikroorganismen wurden bei der *Deutschen Sammlung Mikroorganismen* bezogen. Namen und DSM-Stammnummer sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1: Verwendete Mikroorganismen

Name der Spezies	Bezugsquelle
<i>Streptomyces amulatus</i>	DSM 40361
<i>Streptomyces griseus</i>	DSM 40236
<i>Streptomyces galbus</i>	DSM 40480
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	DSM 30204
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	DSM 30200
<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 Nährmedien

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
Na ₂ SeO ₃ (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
Thyrothricin	1mg/l
Bacitracin	100mg/l

• Anzuchtmedium für RhizobienYMMS - 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 RhizobienNA (Nähragar)

Agar	15g/l
Nährbouillon	8g/l

4.3 Colony-Lift Hybridisierung**4.3.1 Immobilisieren der DNA**Material

- DNA Proben
- Nylonmembran Hybond N⁺ (Fa. Amersham)
- Denaturierungslösung: 1M Tris-HCl pH 6
50 µl Lysozym (10mg/ml)
200 µl SDS (0,5%)
- Neutralisationslösung 1 M Tris-HCl pH 7,5
- Hybridisierungsofen / -schüttler RPN 2510/2511 (Fa. Amersham)
- Whatman 3 MM Filterpapier
- Plastikbox oder Petrischalen

Prinzip

Aufgrund von Vorversuchen wird zur Lyse der Bakterien Lysozym und SDS verwendet. Man erzielt damit bessere Ergebnisse als mit dem getesteten Mutanolysin (FLISS et al., 1991) und dem ebenfalls getesteten Denaturierungspuffer (KELLER und MANAK, 1993).

- Die zu analysierenden DNA Proben werden punktförmig auf die Nylonmembran aufgetragen. Bei Verwendung von Suspensionen, werden je 1-2µl auf das Filter aufgetragen. In diesem Fall ist jedoch zu beachten, daß vor dem zweiten Auftrag der Filter an der Luft getrocknet werden sollte.
- Der Filter wird danach mit der Probenaufragsseite nach oben für 10 min bei 37°C auf ein Whatman 3 MM Filterpapier, das mit 10 ml Denaturierungslösung (1M Tris-HCl, pH 6) und 50µl Lysozym befeuchtet ist, gelegt.
- Danach wird in dieselbe Lösung 200µl SDS pipettiert und abermals 10 min bei 37°C inkubiert.
- Der Filter wird für 5 min auf ein Whatman 3 MM Filterpapier, das mit Neutralisationslösung befeuchtet ist, gelegt.
- Der Hybond Filter wird auf einem frischen Filterpapier an der Luft getrocknet, um eine spätere Braunfärbung des Filters zu vermeiden.
- Der Filter wird bei 80°C für 5 min im Hybridisierungssofen gebacken (die denaturierte DNA wird auf dem Filter fixiert).

4.3.2 PrähybridisierungMaterial

- Folienschlauch und Schweißgerät
- Hybridisierungssofen / -schüttler RPN 2510/2511 (Fa. Amersham)
- Plastikbox oder Petrischalen
- Prähybridisierungslösung: (für 1l)

deionisiertes Formamid	536 ml
20 x SSC	268 ml
50 x FPG	26,8 ml
1 M KH ₂ PO ₄	33,6 ml
10% SDS	26,8 ml
50% Dextransulfat	107,2 ml
Salmon sperm DNA (20mg/ml)	1,5 ml

deionisiertes Formamid:

550 ml Formamid mit 55g AG 501-X8 1 Stunde rühren, anschließend durch ein Whatman 1 Filterpapier filtrieren.

SSC (Standard Saline Citrat Puffer)

43,88 g NaCl / 250 ml

22g Na - Citrat / 250 ml

mit Wasser auf ca. 200 ml auffüllen , auf pH 7 einstellen, dann erst auf 250 ml auffüllen .

FPG

1% Ficoll 400

1 % Polyviylpyrrolidon 300

1 % Glycin

2,5 g von jedem einwiegen und insgesamt auf 250 ml auffüllen.

50 % Dextransulfat

100g Dextransulfat in ein Becherglas überführen, langsam unter rühren zuerst 100 ml Wasser zugeben, nachdem sich das Dextransulfat vollständig gelöst hat, weitere 100 ml zugeben

Prinzip

- Vor der Prähybridisierung sollte der Filter kurz in 20 x SSC befeuchtet werden, um einen eventuell auftretenden Hintergrund zu vermeiden.
- Der Filter wird anschließend in einen bereits vorgefertigten Folienschlauch gegeben, und bis auf eine Ecke eingeschweißt.
- Durch die offene Ecke werden jeweils 10 ml Prähybridisierungslösung pipettiert, durch vorsichtiges Auspressen des Hybridisierschlauches eventuell vorhandene Luftblasen entfernt und die Ecke verschweißt.
- Der eingeschweißte Filter wird zur Prähybridisierung entweder in einen Hybridisierofen oder in ein temperiertes Wasserbad gelegt. Falls möglich sollten die Filter geschwenkt werden.
- Die Prähybridisierung erfolgt für 1 Stunde bei der ausgewählten Hybridisierungstemperatur.

Sollen mehrere Filter gleichzeitig hybridisiert werden, kann man anstelle des Folienschlauches auch eine Plastikbox verwenden. Diese sollte jedoch dicht verschlossen werden, damit es in der Nacht zu keiner Verdunstung der Lösung kommen kann.

4.3.3 Haupthybridisierung

Material

- Prähybridisierungslösung: siehe Kapitel 3.1.2
- gelabelte Probe
- Folienschlauch und Schweißgerät
- Hybridisierungsofen / -schüttler RPN 2510/2511 (Fa. Amersham)
- Plastikbox oder Petrischalen

Prinzip

- Nach Beendigung der Prähybridisierung wird der Folienschlauch an einer Stelle geöffnet, erneut 10 ml Hybridisierungslösung und 1 µl der gelabelten Probe dazu pipettiert und die Ecke wieder verschweißt.
- Die Haupthybridisierung erfolgt für 24 Stunden bei der ausgewählten Hybridisierungstemperatur

Neuerdings können Hybridisierungen in Hybridisierröhrchen (Glasröhren mit Verschuß, Fa. Amersham) durchgeführt werden, die während der Reaktion in einem temperierbaren Hybridisierungssofen ständig bewegt werden. Durch die gleichmäßige Benetzung der Filter läßt sich die Hybridisierungslösung auf ein Minimum von 3-10 ml für mehrere Filter reduzieren (PAPANDRIKOPOULOU und HAHN, 1991).

4.3.4 Waschschritte

Material

- Waschlösung: 1 x SSC + 0,1 % SDS
0,5 x SSC + 0,1 % SDS
- Hybridisierungssofen / -schüttler RPN 2510/2511 (Fa. Amersham)
- Plastikbox oder Petrischalen

Prinzip

- Nach Beendigung der Haupthybridisierung wird der Filter für jeweils 15 min in 1x SSC + 0,1% SDS, und weitere 15 min in 0,5 x SSC + 0,1% SDS bei ausgewählter Wascht- temperatur gewaschen, um die unspezifisch gebundene 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.

4.3.5 Antibody Entwicklung

Material

- Puffer A
- 0,5% BSA in Puffer A
ANMERKUNG : Puffer A sollte immer frisch zubereitet werden, um Kontaminationen mit extrazellulärer Alkaliner Phosphatase zu vermeiden.
- 0,3% (v/v) Tween 20 in Puffer A
- Gene ImagesTM CDP Star Detection Module RPN 3510 (Fa. Amersham)

Liquid Block Reagens
CDP Star Detection Reagens
Anti-Fluorescein Alkaline Phosphatase Konjugat
Detection bags

Prinzip

- Der Filter wird für 1 Stunde in einer 1:10 Verdünnung des Liquid Block Reagens (Fa. Amersham) mit Puffer A inkubiert.
- 1:2000 oder 1:5000 Verdünnung des Anti Fluorescein AP Konjugat oder des Streptavidins in frisch zubereitetem 0,5% BSA in Puffer A
1 Stunde bei Raumtemperatur schütteln.
ANMERKUNG : Verdünntes Konjugat sollte sofort verwendet werden, sonst kann es zu einem Verlust der Sensitivität führen.
- Der Filter wird 3 x 10 min in 0,3% (v/v) Tween 20 in Puffer A bei Raumtemperatur geschüttelt, um ungebundene Konjugate zu entfernen.

4.3.6 Detektion

Material

- Folienschlauch
- Gene ImagesTM CDP Star Detection Module RPN 3510 (Fa. Amersham):
Liquid Block Reagens
CDP Star Detection Reagens
Anti-Fluorescein Alkaline Phosphatase Conjugate
Detection Bags
- HyperfilmTM- MP (Fa. Amersham)
- HypercassetteTM (Fa. Amersham)

Prinzip

- Nachdem der Filter auf eine Detektionsfolie gelegt wurde, läßt man für 5 min 1ml CDP Star Detection Reagens einwirken
- Im Anschluß daran wird der Filter in eine neue trockene Folie eingeschlagen und in die HypercassetteTM gegeben.
- In der Dunkelkammer wird der Filter auf einen HyperfilmTM- MP (Fa. Amersham) gelegt und exponiert.
Nach der entsprechenden Expositionszeit wird der Hyperfilm entwickelt. Die Expositionszeit richtet sich nach der verwendeten Markierungsmethode und nach der Konzentration der eingesetzten Probe.

Wo die Probe gebunden hat, findet eine durch Alkaline Phosphatase katalysierte chemiluminescente Reaktion statt. Die gebildeten Hybride bilden auf dem Film schwarze Spots. Das Lichtsignal wird 2-3 Tage nach der Detektion schwächer.(siehe Abb.1)

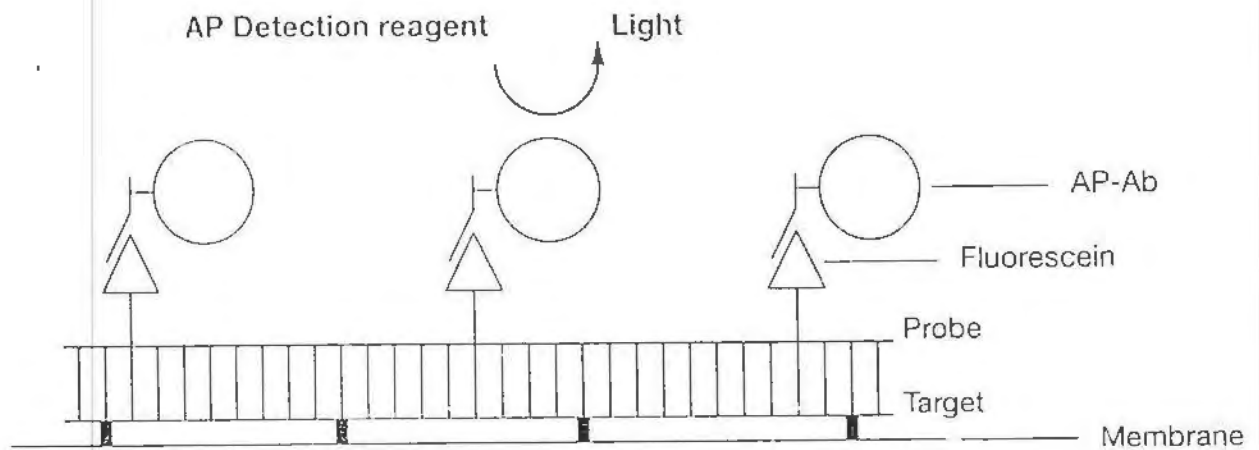


Abb1. Fluorescein Gene Images Markierungs und Detektionssystem

4.4 Beprobung der Quellen

4.4.1 Karstquellen Monitoring „Schneeschnelze“

Die Monitoringtour „Schneeschnelze“ hat am 26.6.1996 stattgefunden. Zur Beprobung wurden neben den üblichen Probennahmestellen Steyern Quelle STEY und Hintere Rettenbachquelle HRQ (=Eichquellen), noch weitere Probennahmestellen entlang des gesamten Flußverlaufes herangezogen.

4.4.1.1 Probennahmestellen (siehe Plan im Anhang)

• STEYERN QUELLE (STEY)

1. Probennahmestelle :
 - Steyern Quelle Überlauf : STEY-UE, ID 405
 - Steyern Quelle : STEY, ID 406
2. Probennahmestelle :
Klausgraben
 - Mitte Klausgraben
 - Ende Klausgraben ca. 722m
 - Vorderreuterstein ca. 956m (Bodenprobe)
Einzugsgebiet der Steyern Quelle
 - Eiseneck Nadelöhr NÖHR (Tropfwasser; Bodenprobe): 37-10-B
Einzugsgebiet der Steyern Quelle

• HINTERE RETTENBACH QUELLE (HRQ)

1. Probennahmestelle : Rettenbach Fischteiche : HRQ-HIRE6
2. Probennahmestelle : Hintere Rettenbachquelle HRQ
3. Probennahmestelle : Fischbachquelle FIQ ca. 700m
4. Probennahmestelle : Mehlboden ca. 820m (Bodenprobe)

4.4.1.2 Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung erfolgte mittels Membranfiltration.

Dazu werden sterile Cellulosenitratfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Das Probenvolumen für Schroth-, YMMS und NPPC Platten beträgt 100 ml. Durch einen angelegten Unterdruck wird die Probe filtriert und der Filter anschließend mit einer sterilen Pinzette auf eine Petrischale mit den selektiven Nährböden übertragen. Die Platten werden bei 30°C bebrütet und ausgewertet.

Auf den Nähragar Platten wird aufgrund der erwarteten Keimzahlen nur 0,1ml der Wasserprobe aufgetragen, mit der Drigalskispatel verteilt und auch bei 30°C inkubiert.

4.4.2 Karstquellen Monitoring „Herbstliches Niederwasser“

Die Monitoringtour „Herbstliches Niederwasser“ hat am 25.10.1996 stattgefunden. Zur Beprobung wurden dieselben Probennahmestellen wie beim Karstquellen Monitoring „Schneeschnelze“ herangezogen.

4.4.2.1 Probennahmestellen (siehe Plan im Anhang)

• STEYERN QUELLE (STEY)

1. Probennahmestelle :
 - Steyern Quelle Überlauf : STEY-UE, ID 405
 - Steyern Quelle : STEY, ID 406
2. Probennahmestelle :
 - Klausgraben
 - Mitte Klausgraben
 - Ende Klausgraben ca. 722m
 - Vorderreuterstein ca. 956m (Bodenprobe)
 - Einzugsgebiet der Steyern Quelle
 - Eiseneck Nadelöhr NÖHR (Tropfwasser; Bodenprobe): 37-10-B
 - Einzugsgebiet der Steyern Quelle

• HINTERE RETTENBACH QUELLE (HRQ)

1. Probennahmestelle : Rettenbach Fischteiche : HRQ-HIRE6
2. Probennahmestelle : Hintere Rettenbachquelle HRQ
3. Probennahmestelle : Fischbachquelle FIQ ca. 700m
4. Probennahmestelle : Mehlboden ca. 820m (Bodenprobe)

4.4.2.2 Probenaufbereitung

Die Wasserproben wurden noch am selben Tag verarbeitet, wobei jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Zur selektiven Anzucht wurden jeweils 100µl der Wasserprobe auf Schroth-, YMMS- und NPPC- und NA-Platten pipettiert und mit einer Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden anschließend bei 30°C inkubiert.

4.4.3 Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“

Die Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“ hat vom 27. bis 30. August 1996 stattgefunden. Zur Beprobung wurden neben den beiden Eichquellen (Steyrn Quelle STEY, Hintere Rettenbachquelle HRQ) auch der Nadelöhrschacht am Eiseneck NÖHR herangezogen.

4.4.3.1 Probenaufbereitung

Die Wasserproben wurden noch am selben Tag verarbeitet, wobei jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Zur selektiven Anzucht wurden jeweils 1 ml der Wasserprobe auf Schroth-, YMMS- und NPPC-Platten pipettiert und mit einer Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden anschließend bei 30°C inkubiert.

So wurde grundsätzlich auch mit Nähragarplatten verfahren. Die Auftragsmenge betrug hier jedoch nur 100µl.

4.5 Bodensäulenversuche

Als Modellsystem wurde eine Bodensäule (Volumen 5l) mit Tabak bepflanzt und dieser mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert. Dies führt an der Infektionsstelle zu der Bildung einer krebsähnlichen Geschwulst, da die Bakterien den Stoffwechsel der Pflanze parasitisch verändern. Aus dem Weinbau (Regner, 1988) weiß man, daß derart infizierte Pflanzen *Agrobacterium tumefaciens* an den Boden abgeben. In diesem Versuch sollte nun versucht werden bei unterschiedlichen Beregnungsmengen die Anzahl an Agrobakterien im Bodensäuleneluat zu bestimmen und auf etwaige Korrelation zu untersuchen.

5 VERSUCHE UND ERGEBNISSE

5.1 Verwendete Gensonden

Eine DNA-Hybridisierungssonde muß hochspezifisch sein, damit sie sich sinnvoll einsetzen läßt, und sie sollte ausschließlich mit der gesuchten Nukleinsäurezielsequenz hybridisieren.

Bevor die Suche nach Gensonden im Internet erfolgte, wurde eine Literaturrecherche im Sondenbereich gestartet (BLAST_Server). Dabei wurde lediglich eine für Streptomyceten spezifische Sonde von STACHEBRANDT et al.(1991) beschrieben, die von nun an als „*Strepto 1*“ Sonde bezeichnet wird, und eine für Eubakterien spezifische Sonde nach AMANN R.I. et al. (1990). Da aber mit der aus der Literatur gewählten Streptomyceten Sonde keine annähernd guten Ergebnisse erzielt werden konnte, wurde eine Suche im Internet angeschlossen. Diese aus dem Internet gefundene Gensonde für Streptomyceten wird von nun an als „*Strepto 2*“ Sonde bezeichnet.

Name : Strepto 1
Sequenz : 5' GCGTC GAATT AAGCC ACA 3'
Länge : 18 Basen
Konzentration : 692,4 µg
T_m : 54°C
OD : 24
MW : 6234
Verwendung : Spezifische Sonde für Streptomyceten

Name : Strepto 2
Sequenz : 5' ATTAG TGGCG AACGG GTGAG TAACA CGTGG GCAA 3'
Länge : 34 Basen
Konzentration : 723 µg
T_m : 104°C
OD : 21,5
MW : 7312
Verwendung : Spezifische Sonde für Streptomyceten

Name : Rhizo
Sequenz : 5' GCGGA GGCGC TCGCC CCTGC 3'
Länge : 20 Basen
Konzentration : 698,3 µg

T_m : 82,5°C
OD : 19,2
MW : 6671
Verwendung : Spezifische Sonde für *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti*

Name : Agro
Sequenz : 5' TTACC CGTAG AGATA TGGGG TC 3'
Länge : 22 Basen
Konzentration : 696,8 µg
 T_m : 62,7°C
OD : 21,5
MW : 7367
Verwendung : Spezifische Sonde für Agrobakterien

Name : Eub338
Sequenz : 5' GCTGC CTCCC GTAGG AGT 3'
Länge : 18 Basen
Konzentration : 1088,8 µg
 T_m : 64,4°C
OD : 31,5
MW : 6070
Verwendung : Spezifische Sonde für Eubakterien

5.2 Ergebnisse der Untersuchung zur Erhöhung der Stringenz bei den Gensonden

Die Methode der Colony Lift Hybridisierung mit biotin- und fluoresceingelabelten Sonden wurde an einer Reihe von fixierten Bakterien aus Laborkulturen getestet.

Um zu erreichen, daß die Gensonden so wenig wie möglich mit anderen als den vorgesehenen Bakterien hybridisieren und somit sicher abzugrenzen sind, werden strengere (stringentere) Reaktionsbedingungen für die Ausbildung von DNA-DNA Hybriden geschaffen.

Die Bedingungen müssen von Fall zu Fall empirisch ermittelt werden. Dabei kann man von Schritt zu Schritt die Salzkonzentration der Waschlösung reduzieren, während die Waschtemperatur und auch die Hybridisierungstemperatur bis zur ungefähr berechenbaren Schmelztemperatur und etwas darüber erhöht werden können.

Falls die optimalen Bedingungen für eine Hybridisierung nicht bekannt sind, sollte man zuerst mit niedrigen stringenten Bedingungen beginnen. Falls danach die Hintergrundsignale zu hoch sein sollten, kann der Filter mit stringenteren Bedingungen behandelt werden.

5.2.1 Streptomycetensonden

Bei der Streptomycetensonde 1 war die ungefähr berechnete Schmelztemperatur T_m 54°C. Vergleichend wurden Hybridisierungen bei 35°C, 42°C, 44°C, 46°C, 50°C und 60°C durchgeführt.

Weitere Parameter, die aber nicht die Stringenz sondern die Intensität des Signales beeinflussen, wurden auch verändert. Dazu zählen die Gensondenkonzentration (5ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml), die Antikörperkonzentration (1:2000; 1:5000) und die Expositionszeit (1min bis 2,5 h) bei der Detektion. Die Versuche wurden sonst wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

Bei der Streptomycetensonde 2 wurde nur ein Versuch bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C durchgeführt, jedoch mit unterschiedlichen Waschkonzentrationen (0,1 x SSC und 0,1% SDS; 0,1 x SSC und 0,125% SDS; 1 x SSC und 0,125% SDS).

Die biotinelabelte Strepto 1 gab unspezifische Bindungen mit Nichtstreptomyceten-Arten. Eine Negativkontrolle ergab ohne Einsatz einer biotinelabelten Sonde ein positives Signal, wie in Abb.2 ersichtlich ist. Dieses falsch positive Signal ist vermutlich auf den hohen Biotingehalt in den Zellwänden von Bakterien zurückzuführen. Daher wurde Biotin für die weiteren Sonden (Agrobakteriensonde, Rhizobiensonde, Eubakteriensonde) nicht mehr als Markermolekül verwendet. Statt dessen wurden fluoresceingelabelte Sonden synthetisiert.

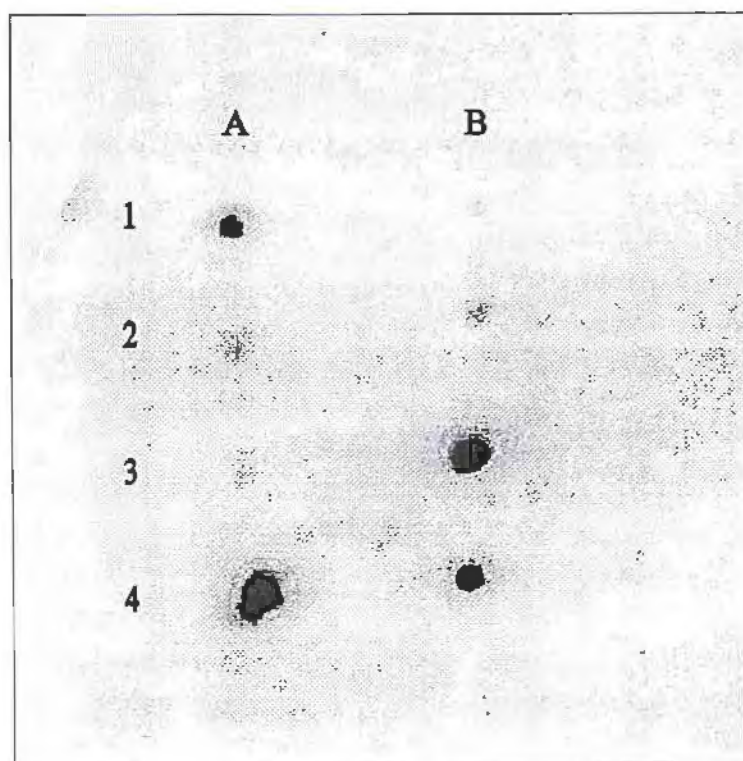


Abb.2 A1 *A. tumefaciens* A3 *P. fluorescens* B1 *S. griseus* B3 *R. meliloti*
A2 *A. rhizogenes* A4 *E. faecalis* B2 *S. amylatus* B4 *R. trifolii*

Die neuentwickelte Strepto 2-Sonde zeigt bessere Ergebnisse muß allerdings noch hinsichtlich der verwendeten Lysebedingungen und der Stringenz optimiert werden.

5.2.2 Agrobakteriensonde

Bei der Agrobakteriensonde war die berechnete Schmelztemperatur T_m 66°C. In diesem Fall wurden nur zwei verschiedene Temperaturen gewählt, nämlich 60°C und 64°C. Diese Versuche finden mit einer fluoresceingelabelten Gensonde bei einer Konzentration von 10 ng/ml und bei unterschiedlichen Waschkonzentrationen (1 x SSC und 0,1% SDS; 0,1 x SSC und 0,1% SDS; 0,5 x SSC und 0,1% SDS; 0,25 x SSC und 0,1% SDS; 0,125 x SSC und 0,1% SDS) statt. Die Versuche wurden auch hier wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Wie in Abb. 3 gezeigt wird, wurde das beste Hybridisierungsergebnis bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C und mit folgenden Waschbedingungen : 1 x SSC und 0,1% SDS; 0,1 x SSC und 0,1% SDS erzielt.

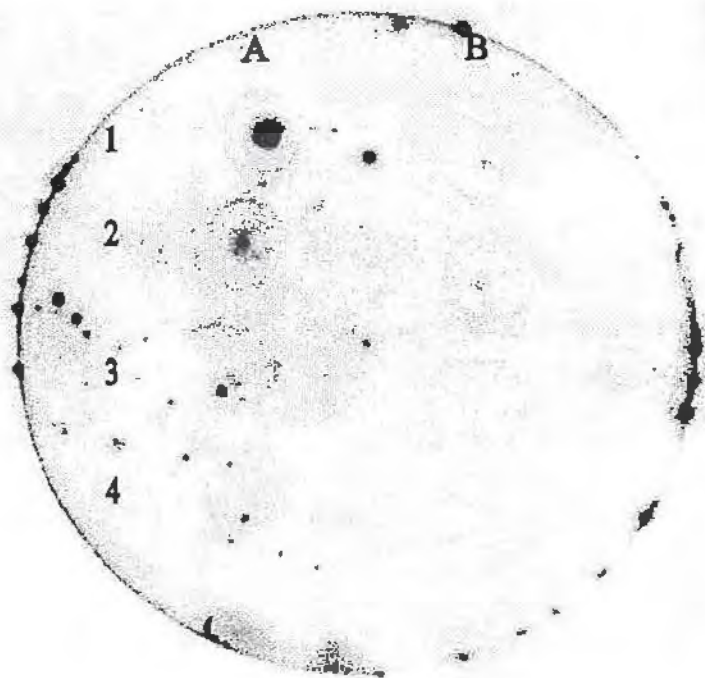


Abb.2 :A1 *A. tumefaciens* A3 *P. fluorescens* B1 *S. griseus* B3 *R. meliloti*
 A2 *A. rhizogenes* A4 *E. faecalis* B2 *S. amylatus* B4 *R. frifolii*

Die Agrobakteriensonde zeigt spezifische Bindung an die beiden Agrobakterien, allerdings auch ganz schwache Bindung an die ebenfalls getesteten Rhizobienarten. Andere Bakterienarten binden nicht. Dies läßt sich durch die nahe genetische Verwandtschaft der Agrobakterien und Rhizobien erklären. Ausgehend von dieser Sonde wird nun abgeklärt, ob tatsächlich identische DNA-Sequenzen vorliegen, oder ob lediglich die Stringenzbedingungen variiert werden müssen.

5.2.3 Rhizobiensonde

Bei der Rhizobiensonde war die berechnete Schmelztemperatur T_m 63°C. Es wurde ein einziger Versuch mit einer Hybridisierungstemperatur von 60°C, einer Gensondenkonzentration von 10ng/ml

und unterschiedlichen Waschkonzentrationen durchgeführt (1 x SSC und 0,1% SDS; 0,1 x SSC und 0,1% SDS; 0,25 x SSC und 0,1% SDS; 0,125 x SSC und 0,1% SDS).

Die Antikörperkonzentration war 1:5000 und es wurde für 1,5 Stunden exponiert. Die Versuche wurden wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

Generell:

Für alle getesteten Sonden stellte sich das Problem der vollständigen Lyse der Bakterien als kritisch heraus. Vor allem grampositive Bakterien sind schwer zu lysieren, wie aus eigener Erfahrung und der Literatur bekannt ist. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es kein einheitliches Lyseprotokoll für Grampositive, sondern lediglich für einzelne Gruppen (z.B. Staphylokokken, etc.). Die erfolgreiche Lyse der Zellwände und damit das Freilegen der DNA ist aber der wesentlichste Schritt der Vorbehandlung. Solange nicht ein vollständig sicheres Protokoll dazu gefunden wurde, ist es nicht sinnvoll die nachgeschalteten Schritte, also etwa die Stringenzbedingungen, zu optimieren. Deshalb laufen nun Versuche um dieses Standardprotokoll zu erarbeiten.

5.2.4 Eubakteriensonde

Die Eubakteriensonde dient eigentlich als Referenz, ob die Methode auch tatsächlich funktioniert. Da alle in dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen zur Familie der Eubakterien gehören, sollten bei dieser Gensonde alle Stämme ein DNA-DNA Hybrid bilden.

Bei der Eubakteriensonde war die ungefähr berechnete Schmelztemperatur T_m 60°C. Es wurde ein Versuch bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C, einer Gensondenkonzentration von 10ng/ml und unterschiedlichen Waschkonzentrationen (1 x SSC und 0,1% SDS; 0,5 x SSC und 0,1% SDS; 0,125 x SSC und 0,1% SDS) durchgeführt. Der Versuch wurde sonst wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

Die Hybridisierung mit einer fluoresceingelabelten Sonde für Eubakterien (Eub338) führte anfangs nur zu einem sehr schwachen Signal der beiden gram positiven Streptomyceten. Nach einer anschließenden Veränderung der Lysebedingungen (Lysozym und SDS) führte die Hybridisierung mit der Eubakteriensonde (Eub338) als Positivkontrolle zu einem sichtbaren Signal in allen verwendeten Organismen (Abb3)

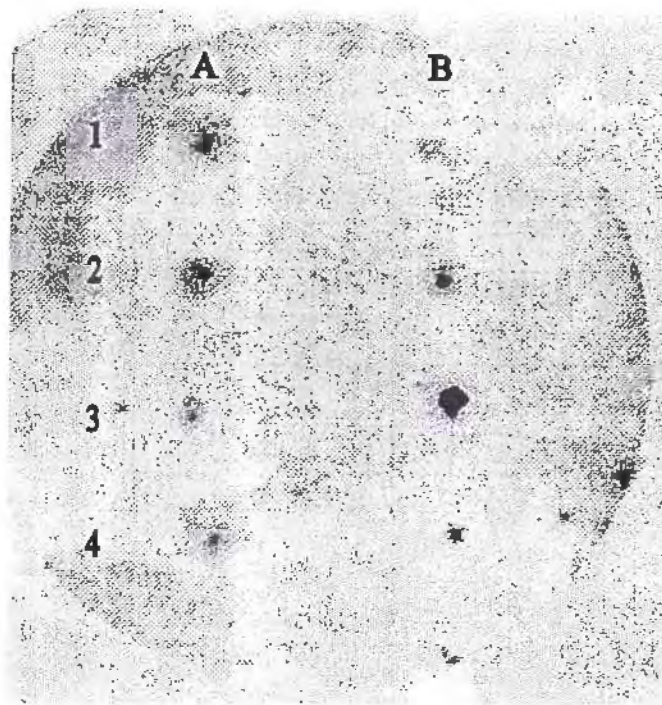


Abb.3 : A1 *A. tumefaciens* A3 *P. fluorescens* B1 *S. griseus* B3 *R. meliloti*
A2 *A. rhizogenes* A4 *E. faecalis* B2 *S. anulatus* B4 *R. frifolii*

5.3 Ergebnisse des Karstquellen Monitorings „Schneesmelze“

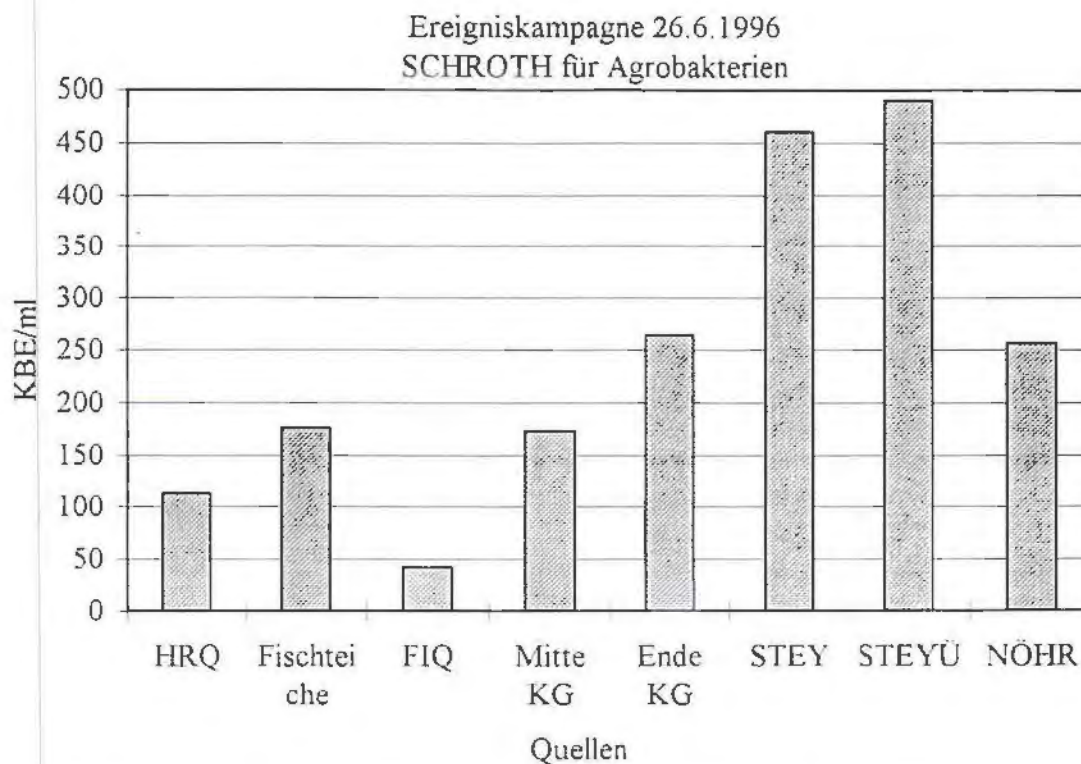


Abb. 4 : Agrobakterienkeimzahl / ml bei der Ereigniskampagne „Sommerliches Hochwasser“

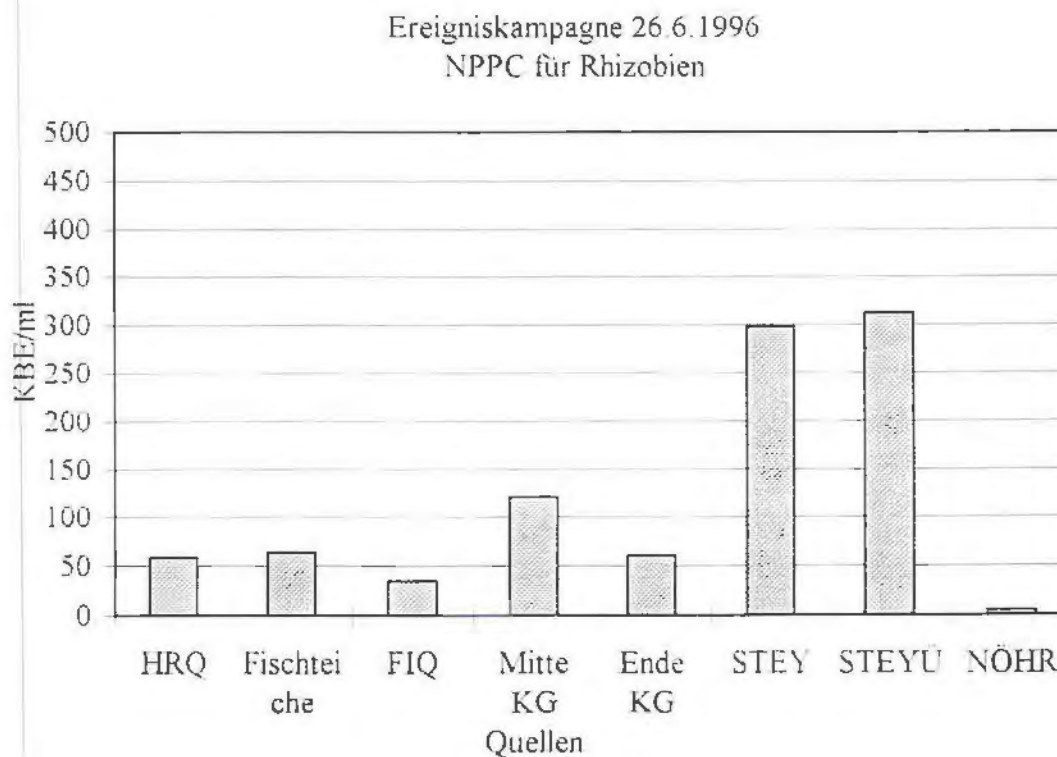


Abb.5 : Rhizobienkeimzahl / ml bei der Ereigniskampagne „Sommerliches Hochwasser“

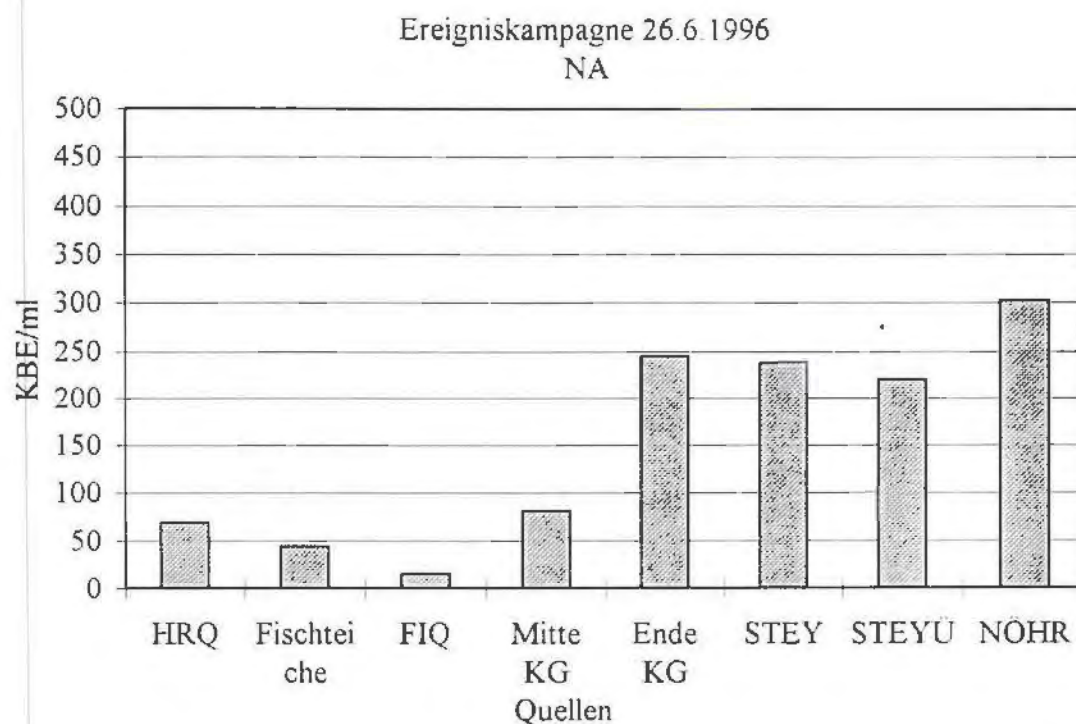


Abb. 6 : Gesamtkeimzahl / ml bei der Ereigniskampagne „Sommerliches Hochwasser“

5.4 Ergebnisse des Karstquellen Monitorings „Herbstliches Niederwasser“

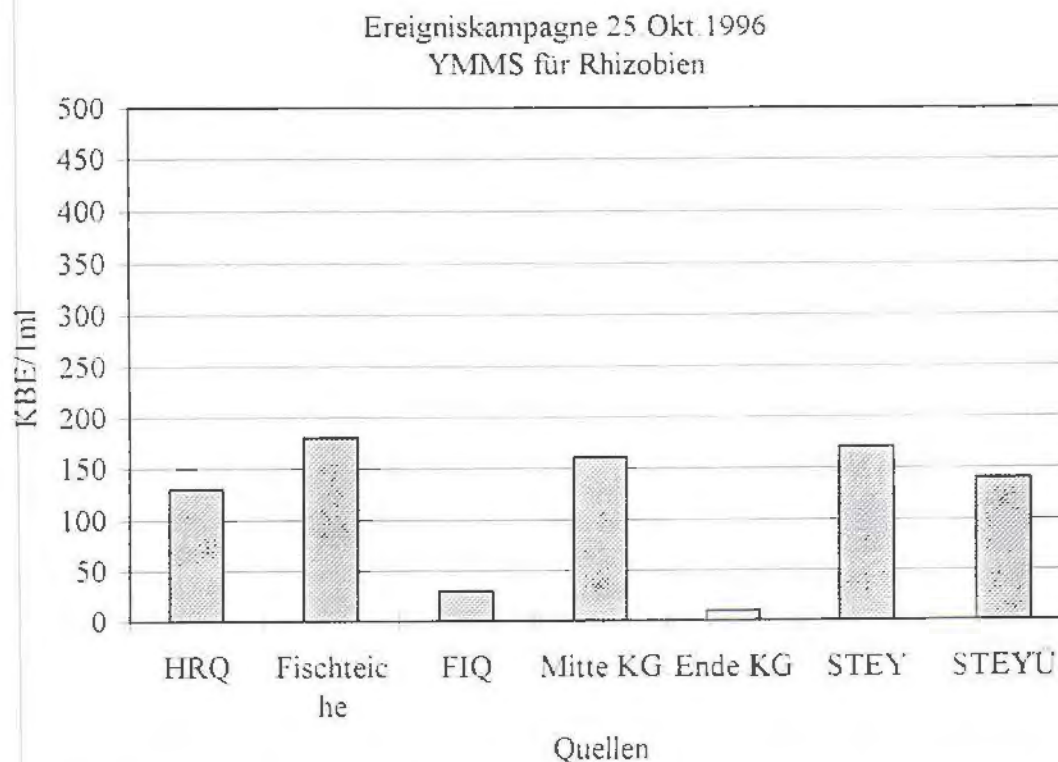


Abb. 7 : Rhizobienkeimzahlen / ml bei der Ereigniskampagne „Herbstliches Niederwasser“

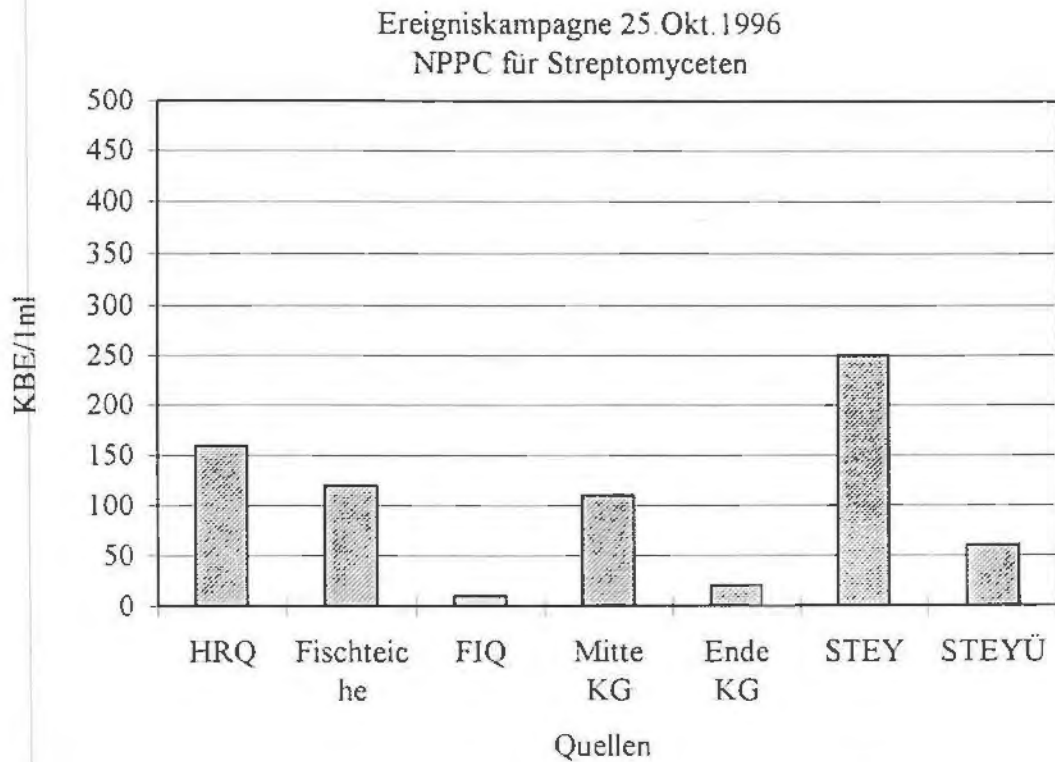


Abb.8 : Streptomycetenkeimzahlen / ml bei der Ereigniskampagne „Herbstliches Niederwasser“

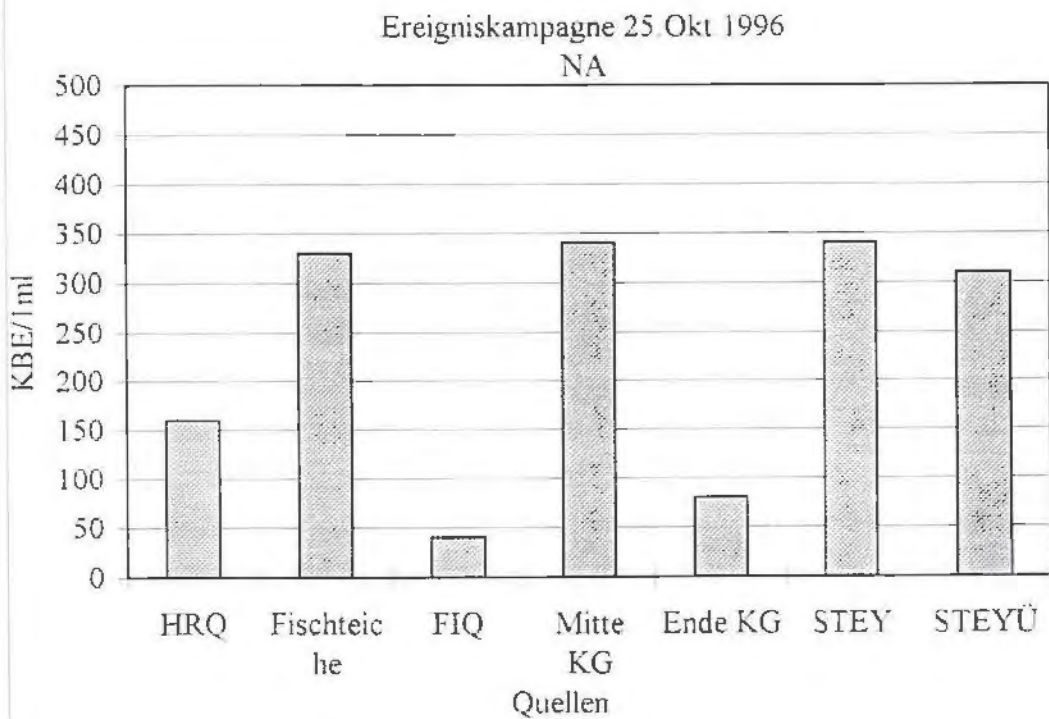


Abb. 9 Gesamtkeimzahl / ml bei der Ereigniskampagne „Herbstliches Niederwasser“

5.5 Ergebnisse der Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“

5.5.1 Wetterentwicklung während der Intensivkampagne

(Auszug aus dem Protokoll)

Am 26.8.1996 um 17.20 Uhr fiel in Salzburg starker Gewitterregen, der das Gebiet um Molln um ca. 20.00 Uhr in abgeschwächter Form erreicht hat, und daher auf die Quellen keine merkbaren Einflüsse hatte.

Am 27.8.1996, dem Beginn der Intensivkampagne, herrschte relativ warmes, trockenes Wetter, das sich in einer lauen Föhnacht fortsetzte. Die Beprobung wurde regulär um 18.00 Uhr begonnen und für die Probennahme bis zum Einsetzen von Niederschlägen sechstündig weitergeführt.

Erst am 28.8.1996 um ca. 11.40 Uhr setzte in Molln starker Regen ein, der etwa bis 17.00 Uhr anhielt. Bei nicht allzu starker Abkühlung traten nachts immer wieder kurze, unergiebig Schauer auf.

Am 29.8.1996 waren die Niederschläge abgeklungen und es wurden auch keine weiteren mehr prognostiziert, sodaß am 30.8.1996 die Messungen um 15.00 Uhr eingestellt wurden.

5.5.2 Intensivkampagne Hintere Rettenbachquelle

Tab.1 : Ergebnisse der Intensivkampagne (HRQ)

Datum	Proben nahmezeit	Gesamtkeimzahl KBE/ml Nähragar	Agrobakterien KBE/ml Schroth	Streptomyceten KBE/ml NPPC	Rhizobien KBE/ml YMMS
27.8.1996	18.00	230	1	159	213
28.8.1996	0.00	170	20	236	107
	6.00	240	53	169	153
	12.00	290	21	93	77
	18.00	410	45	198	232
29.8.1996	0.00	500	22	190	139
	6.00	240	27	158	51
	12.00	180	29	97	59
	18.00	320	1	146	103
30.8.1996	0.00	290	1	97	196
	6.00	470	19	142	210
	12.00	350	3	120	134

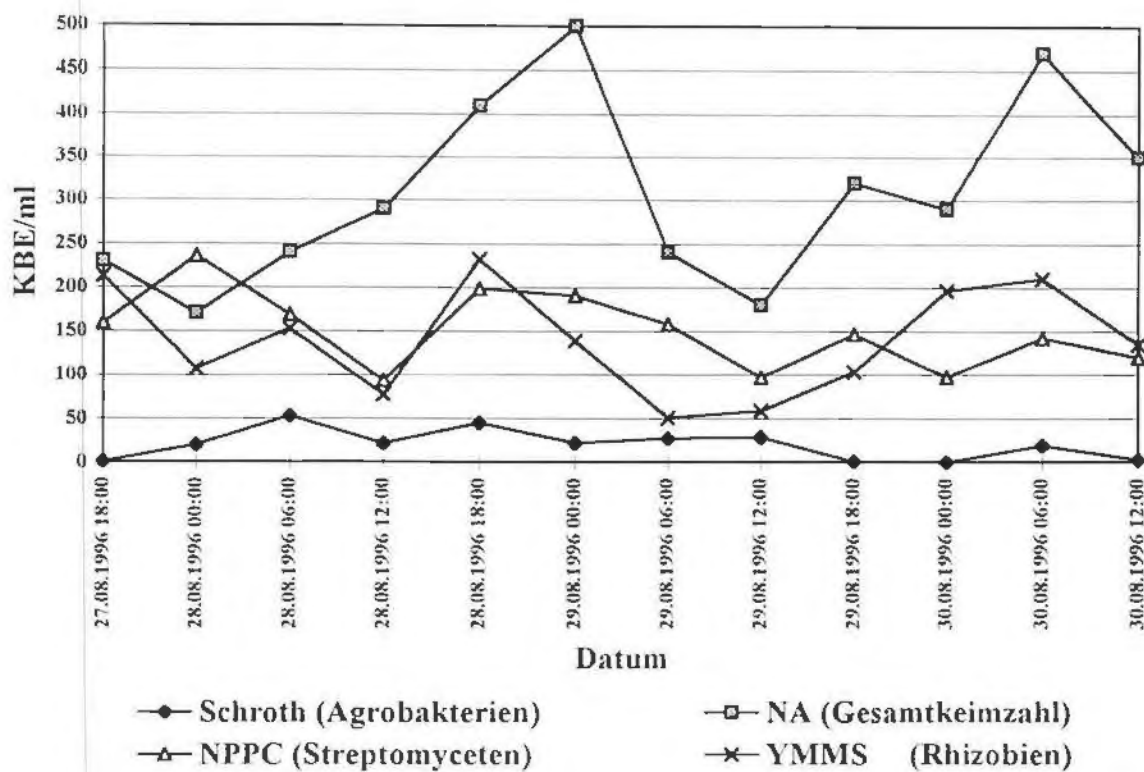


Abb. 10 : Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“ - Hintere Rettenbachquelle (HRQ)

5.5.3 Intensivkampagne Steyern Quelle

Tab.2 : Ergebnisse der Intensivkampagne (STEY)

Datum	Proben nahmezeit	Gesamtkeimzahl KBE/ml Nähragar	Agrobakterien KBE/ml Schroth	Streptomyceten KBE/ml NPPC	Rhizobien KBE/ml YMMS
27.8.1996	18.00	2830	1079	1160	1134
28.8.1996	0.00	880	10	528	522
	6.00	970	694	792	654
	12.00	930	238	400	478
	18.00	1550	8	722	298
29.8.1996	0.00	3000	333	1132	768
	6.00	2880	160	1154	592
	12.00	4180	187	1090	540
	18.00	4400	113	1016	752
30.8.1996	0.00	3240	189	1140	534
	6.00	2230	241	1168	1416
	12.00	2500	57	1395	1084

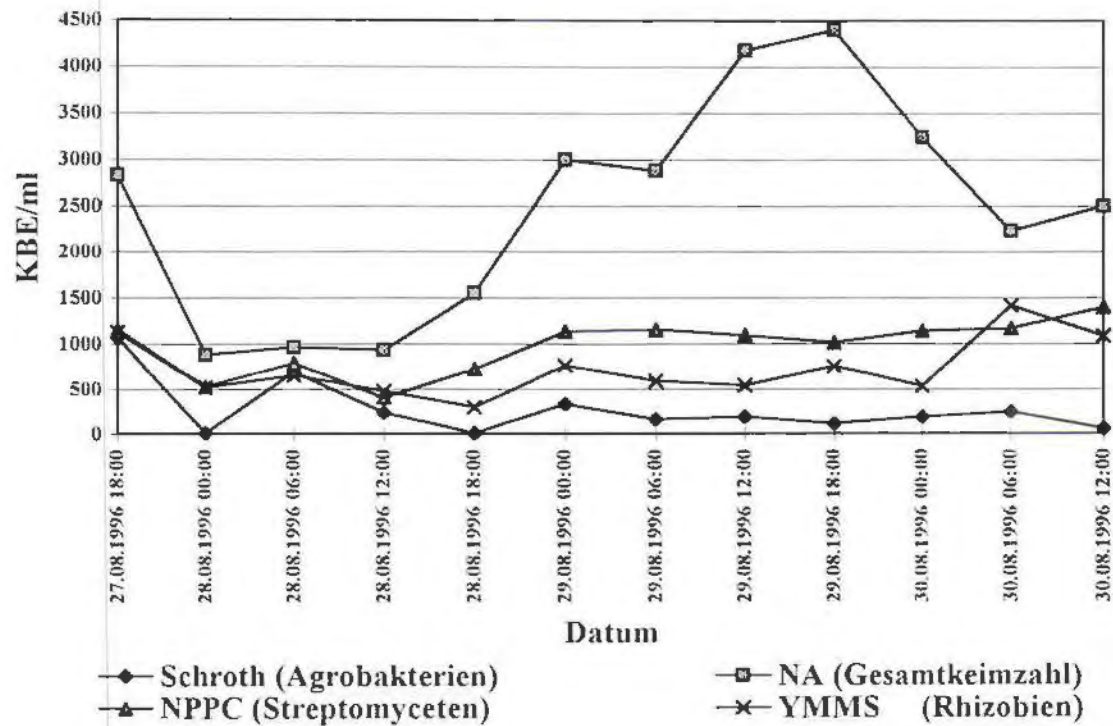


Abb. 11 : Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“ - Steyern Quelle (STEY)

5.5.4 Intensivkampagne Nadelöhr NÖHR

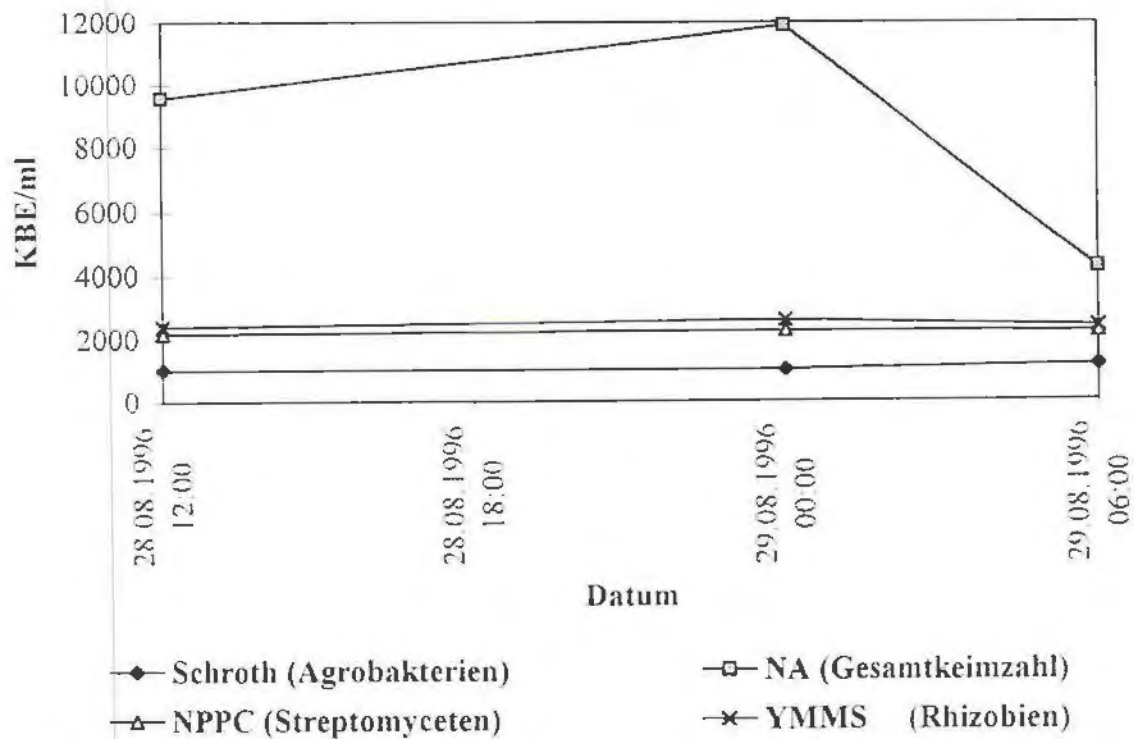


Abb. 13: Intensivkampagne „Sommerliches Hochwasser“ Nadelöhr (NÖHR)

5.6 Bodensäulenversuch

Der Bodensäulenversuch erbrachte leider keinerlei auswertbare Ergebnisse. Die spezifischen Keimzahlen schwankten einerseits sehr stark und waren andererseits in keinster Weise mit der Befeuchtungsmenge korrelierbar. Dies kann wahrscheinlich auf das geringe Volumen der Bodensäule zurückgeführt werden. Dadurch ergeben sich ausgeprägte Auswaschungs- und Randgängigkeitseffekte.

Die Vergrößerung des Maßstabes, also etwa Lysimeterversuche könnten hier zum Erfolg führen. Die Wichtigkeit einer Skalierung der Methode an einem standardisierten Modell, wie sie ein Lysimeter darstellt muß hier betont werden.

5.7 Interpretation der Ergebnisse der Keimzahluntersuchungen

5.7.1 Ereigniskampagne „Schneesmelze“ 26.6.1996

Die Steyrnquelle STEY und der Steyrnquellüberlauf STEYÜ zeigen im Vergleich zu den anderen beprobten Quellen deutlich erhöhte Keimzahlen. Bei der Agrobakterien- und der Rhizobienkeimzahl ist dieser Unterschied besonders gut zu erkennen, bei der Gesmtkeimzahl liegt lediglich das Nadelöhr NOHR über STEY und STEYÜ.

Aufgrund der Probleme mit der Membranfiltrationsmethode bei der Bestimmung der Keimzahlen wurde nach dieser Kampagne die Methode des Ausplattierens angewandt.

5.7.2 Ereigniskampagne „Herbstliches Niederwasser“ 25.10.1996

Bei der zweiten Ereigniskampagne ergab sich kein eindeutiges Überwiegen einer Probenahmestelle. Allerdings zeigt STEY bei der Streptomycetenkeimzahl wiederum einen erhöhten Wert.

5.7.3 Ereigniskampagne „Sommerliches Hochwasser“ 27.7. bis 30.8.1996

Aus den Diagrammen ist ganz deutlich ersichtlich, daß am Eiseneck/Nadelöhrschacht die höchsten Keimzahlen auftreten. Erklärbar ist dies dadurch, daß der Nadelöhrschacht (NOHR) nur wenige Meter Überdeckung hat und sich in dem Gebiet Probenflächen von anderen Teilnehmern des Karstquellen Monitorings befinden. Aufgrund der dadurch ausgelösten mechanischen Erosionsvorgänge, durch das ständige Betreten der Probenflächen, und natürlich auch das Vorhandensein vieler Nager und anderer Kleintiere kommt es daher zu diesen extrem hohen Werten. Im Gebiet der Steyrn Quelle (STEY) nimmt die Keimzahl der Bodenbakterien, im Vergleich zum Nadelöhrschacht (NOHR) ab, was auf einen Verdünnungseffekt schließen läßt. Doch kommt vor allem durch die offenen Ponoren im Feichtau Almbereich (1200-1500m) und das Weidevieh und Wild viel Losgetrampeltes in die Karstquellen.

In der Hinteren Rettenbachquelle (HRQ) sind die Verdünnungen viel höher ausgefallen als bei der Steyern Quelle (STEY), da die Einzugsgebietsfläche dieser Quelle eine stark verkarstete mit vorwiegend Kahl- und Latschenkarst ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- AMANN R. Combination of 16S rRNA - targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations
Appl. Environ. Microbiol. Vol 56, No.6, P 1919-1925
- BERTRAM S. Gentechnische Methoden
GASSEN H.-G. Gustav Fischer Verlag (1991)
- BROWN T. A. Gentochnologie für Einsteiger
- FLISS H. A rapid and efficient method of lysis Lysteria and other gram
EMOND E. positiv bacteria using Mutanolysin
SIMARD R. E. BioTechniques 11, Nr.4, p 453-457
- KELLER G.H. DNA probes
MANAK M. M. Background - Applications - Procedures
- LEITCH A. R. In situ Hybridisierung
SCHWARZACHER T.
JACKSON D.
- MARMUR J. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid
DOTY P. from ist thermal denaturation temperature
J. Mol. Bio. 5, 109-118 (1962)
- REGNER F. Etablierung von nicht radioaktiven Hybridisierungstechniken für
Nukleinsäuren
Diplomarbeit (1988)
- SCHAAD N. W. Laboratory guide of identification of plant pathogenic bacteria
- STACKEBRANDT E. Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA - based target
WITT D. regions for oligonucleotide probes

- KEMMERLING C. Appl. Environ. Microbiol. Vol 56, No 5, p 1468-1477
KROPPESTEDT R.
LIESACK W.
- SUGGS S. V. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation
HIROSE T. of cloned DNA sequences
MIYAKE T. Academic Press 683, New York (1981)
KAWASHIMA E. H.
JOHNSON M. J.
ITAKURA K.
WALLACE R. B.
- TIJSSEN P. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology
 (1993)
 Part I : Theory and nucleic acid preparation
 Part II : Probe labeling and hybridisation techniques
- WATSON J. D. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid
CRICK F. H. C. Nature 177, 788-800 (1953)