

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

Entwicklung und Anwendung von Mikrohybridisierungsverfahren zur Detektion und Identifizierung von Enterokokken in der Wasser- und Lebensmittelanalytik

Thomas Michael Behr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

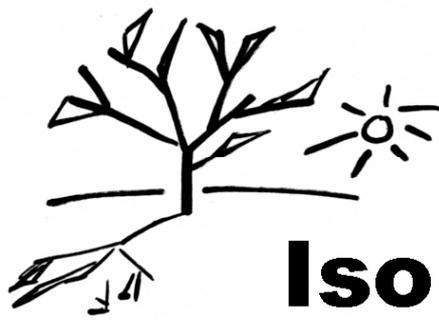
Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer
2. Priv.-Doz. Dr. D. Knopp

Die Dissertation wurde am 24. Januar 2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 5. März 2002 angenommen.



Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Behr, T., C. Koob, M. Schedl, A. Mehlen, H. Meier, D. Knopp, E. Frahm, U. Obst, K.-H. Schleifer, R. Nießner, and W. Ludwig (2000)** A Nested Array of rRNA Targeted Probes for the Detection and Identification of Enterococci by Reverse Hybridization. *System. Appl. Microbiol.* **23**:563-572
- Schedl, M., T. Behr, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, R. Nießner, and D. Knopp (2000)** Optimization of Reverse Hybridization in Microplates Coated with rRNA Targeted Oligonucleotide Probes. *System. Appl. Microbiol.* **23**:573-581

INHALTSVERZEICHNIS

A	<u> EINLEITUNG</u>	<u> 1</u>
1	Geschichte und Phylogenie der Enterokokken	1
2	Physiologische Charakteristika der Enterokokken	4
3	Vorkommen der Enterokokken	6
4	Bedeutung der Enterokokken	6
4.1	Bedeutung als Probiotikum	6
4.2	Bedeutung als Lebensmittelverderber	7
4.3	Bedeutung als Pathogene	7
4.4	Bedeutung in der hygienischen Trinkwasser- und Lebensmittelkontrolle	8
5	Detektion der Enterokokken	10
6	Ziele dieser Arbeit	13
B	<u> MATERIAL UND METHODEN</u>	<u> 14</u>
1	Mikroorganismen	14
2	Nährmedien	15
3	Zellanzucht und Stammhaltung	17
4	DNS-Isolierung	17
4.1	DNS-Isolierung nach Marmur (1961, mod.)	17
4.2	DNS-Isolierung nach Wisotzkey <i>et al.</i> (1990, mod.)	19
4.3	DNS-Isolierung nach Stahl und Flesher (1987, mod.)	20
4.4	DNS-Isolierung nach Zhou <i>et al.</i> (1996, mod.)	21
4.5	DNS-Isolierung mit FastDNA™Kit MH / Beadbeating	22
5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
6	Agarosegelelektrophorese	23
7	Oligonukleotide für PCR- und Sequenziertechniken	25
7.1	PCR-Primer	25
7.2	Sequenzierprimer	26
8	<i>In vitro</i> Amplifikation und Markierung von DNS mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki <i>et al.</i> (1988)	26
8.1	Allgemeines	26
8.2	PCR-Systeme	27
8.2.1	TaqPCR Core Kit™ (Qiagen, Hilden, D)	27
8.2.2	Expand High Fidelity™ (Roche, Mannheim, D)	28
8.2.3	Ex Taq™ (TaKaRa Shuzo Co., Otsu, J)	28
8.3	Markierung der DNS während der PCR	29
8.3.1	Markierung mit Digoxigenin (DIG)	29
8.3.2	Markierung mit Fluorescein (FLUOS)	29
8.3.3	Markierung mit Cy3 bzw. Cy5	29
8.3.4	Markierung mit Biotin	30
8.4	Aufreinigung der PCR-Produkte	30
9	Sequenzanalyse von DNS	30
9.1	Sequenzierreaktion	30
9.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	31
10	Auswertung der Sequenzdaten und Sondenkonstruktion	32

10.1	Alignmenterstellung	32
10.2	Stammbaumrekonstruktion	32
10.3	Sondenkonstruktion	33
11	Reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte	34
11.1	System 1a: Reverse Hybridisierung ohne Tetramethylammoniumchlorid (TMACI) (Koob, 1997, mod.)	34
11.2	System 2: Reverse Hybridisierung mit TMACI in der Waschlösung (Koob, 1997, mod.)	36
11.3	System 3: Reverse Hybridisierung mit TMACI in Hybridisierungs- und Waschlösung (Graf, 1998, mod.)	37
11.4	Denaturierung der Amplifikate	38
11.4.1	<i>Thermische Denaturierung</i>	38
11.4.2	<i>Alkalische Denaturierung</i>	38
11.4.3	<i>Thermische Denaturierung in der Mikrotiterplatte</i>	38
12	Reverse Hybridisierung auf DNS-Chips	39
12.1	System 1b: Reverse Hybridisierung ohne TMACI (Anonym, 2000, mod.)	39
12.2	System 2: Reverse Hybridisierung mit TMACI in der Waschlösung	42
12.3	System 3: Reverse Hybridisierung mit TMACI in Hybridisierungs- und Waschlösung	43
13	Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung (FISH) (Manz et al., 1992, mod.)	44
14	Analyse von Speiseeisproben	46
C	ERGEBNISSE	47
1	Sequenzanalyse ribosomaler DNS	47
2	Entwicklung eines rRNS-gerichteten Sondensatzes für Enterokokken	49
3	Reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte	56
3.1	Immobilisierung	56
3.1.1	<i>Trägermaterial</i>	56
3.1.2	<i>Modifikation der Oligonukleotide</i>	56
3.1.3	<i>Immobilisierungsbedingungen</i>	58
3.2	Denaturierungsbedingungen	58
3.3	Hybridisierungs- und Waschbedingungen	59
3.4	Automatisches Waschen	63
4	Reverse Hybridisierung auf DNS-Chips	63
4.1	Sondenverlängerung am 5'-Ende	64
4.2	Hybridisierungs- und Waschbedingungen	65
4.3	Detektion	68
4.3.1	<i>Cy-markiertes dUTP</i>	68
4.3.2	<i>Biotinmarkiertes dUTP</i>	69
5	Evaluierung der Enterokokkensonden in der Mikrotiterplatte und auf DNS-Chips	70
6	Evaluierung von Sonden für in Kläranlagen relevante Bakterien	76
7	Untersuchung von Realproben	84
7.1	Untersuchung von Klärschlammproben	84
7.1.1	<i>Untersuchung auf Enterokokken</i>	84
7.1.2	<i>Untersuchung auf Ammonium- und Nitritoxidierer</i>	86
7.2	Untersuchung von Quellwasser	91
7.3	Untersuchung von Speiseeis	95

<u>D</u>	<u>DISKUSSION</u>	99
1	Sequenzanalyse	99
2	Hierarchischer SONDENSATZ für Enterokokken	101
2.1	Allgemeines	101
2.2	Sondenkonstruktion und -evaluierung	103
2.3	Besonderheiten	107
2.3.1	<i>Besonderheiten einiger Sonden in der Mikrotiterplatte</i>	<i>107</i>
2.3.2	<i>Besonderheiten einiger Sonden auf DNS-Chips</i>	<i>108</i>
2.3.3	<i>Besonderheiten einiger Sonden</i>	<i>108</i>
3	Sonden für in Kläranlagen relevante Bakterien	110
4	Reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte	111
4.1	Immobilisierung	111
4.1.1	<i>Trägermaterial</i>	<i>111</i>
4.1.2	<i>Modifikation der Oligonukleotide</i>	<i>113</i>
4.2	Denaturierungsbedingungen	115
4.3	Hybridisierungs- und Waschbedingungen	115
4.4	Hybridisierungsdauer	117
4.5	Detektion	117
4.6	Lagerfähigkeit und Rehybridisierung	117
5	Reverse Hybridisierung auf DNS-Chips	118
5.1	Arrayer	118
5.2	Immobilisierung	118
5.3	Sondenverlängerung am 5'-Ende	119
5.4	Hybridisierungs- und Waschbedingungen	120
5.5	Detektion	121
6	Untersuchung von Realproben	121
7	Ausblick	124
<u>E</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	125
<u>F</u>	<u>LITERATUR</u>	126
<u>G</u>	<u>ANHANG</u>	138

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Adenosin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
C	Cytosin, Cytidin
Cy	Cyanin-Farbstoff
B	Belgien
D	Deutschland
dAMP	Desoxyadenosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DK	Dänemark
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EAU	Uganda
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Frankreich
FA	Formamid
FLUOS	Fluorescein
g	Fallbeschleunigung
G	Guanin, Guanosin
GB	Großbritannien
GC	Mol% Guanin + Cytosin

H ₂ O _{dest.}	vollentsalztes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser (MilliQ, Millipore, Eschborn, D)
IND	Indien
IR	Infrarot
J	Japan
kb	Kilobase
KBE	koloniebildende Einheit
M	molar (mol / l)
mod.	modifiziert
OD	optische Dichte
OT	Objekträger
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pers.	persönlich
POD	Meerrettichperoxidase
PCR	Polymerasekettenreaktion
rDNS	DNS kodierend für rRNS
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Finnland
sp.	Species (Einzahl)
spp.	Species (Mehrzahl)
SSC	Standard-Saline-Citrat
ssp.	Subspezies
T	Thymin, Thymidin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _D	Dissoziationstemperatur
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
TMACl	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil, Uridin
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v / v	Volumen / Volumen
Vol	Volumen
w / v	Masse / Volumen

A EINLEITUNG

Enterokokken spielen in vielen Bereichen der Mikrobiologie eine wichtige Rolle. Einerseits werden einige Stämme zur Fermentation von Lebensmitteln oder als Probiotikum eingesetzt, andererseits können Enterokokken am Lebensmittelverderb beteiligt sein. In der hygienischen Trinkwasser- und Lebensmitteluntersuchung finden sie als Indikatororganismen Verwendung. Sie sind aber auch häufig Auslöser nosokomialer Infekte, die besonders in letzter Zeit durch vermehrtes Auftreten multiresistenter Stämme zu Problemen führen (Franz *et al.*, 1999).

1 Geschichte und Phylogenie der Enterokokken

1899 wurde von Thiercelin ein neuer grampositiver *Diplococcus* intestinaler Herkunft beschrieben, der später als *Enterococcus proteiformis* die neue Gattung *Enterococcus* begründete (Thiercelin und Jouhaud, 1903). Aufgrund seiner Anordnung in Ketten wurde er später in *Streptococcus faecalis* umbenannt und der Gattung *Streptococcus* zugeordnet (Andrewes und Horder, 1906).

Lancefield (1933) entwickelte ein serologisches Verfahren zur Typisierung von Streptokokken, wobei die Einteilung aufgrund von Gruppenantigenen erfolgte. Streptokokken fäkaler Herkunft besaßen z.B. das Gruppenantigen D. Sherman teilte 1937 anhand von 10 Merkmalen, von denen eines die Anwesenheit des Lancefield-Gruppenantigens war, die Streptokokken in vier Untergruppen ein: Pyogene Streptokokken („Pyogenic“), vergrünende Streptokokken („Viridans“), Milchstreptokokken („Lactic“) und Enterokokken („Enterococcus“). Letztere beinhaltete die Arten *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus bovis* und *Streptococcus equinus*.

Kalina schlug 1970 den Transfer von *S. faecalis*, *S. faecalis* ssp. *liquefaciens*, *S. faecalis* ssp. *zymogenes* und *S. faecium* in die neue (bzw. wiederbelebte) Gattung *Enterococcus* vor. Zusätzlich benannte er *S. durans* in *E. faecium* ssp. *durans* um. Diese Vorschläge wurden aber nie offiziell anerkannt. In den folgenden Jahren wurde die Einteilung der Streptokokken immer wieder verändert (Jones, 1978; Bridge and Sneath, 1983; Hardie, 1986).

Schleifer und Kilpper-Bälz (1984) teilten aufgrund von Ergebnissen aus DNS-DNS- und DNS-rRNS-Hybridisierungen die Gattung *Streptococcus sensu lato* in die drei Gattungen *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus* und *Enterococcus*. Die bis dahin zu den Streptokokken zählenden Arten *faecalis* und *faecium* wurden der wiederbelebten Gattung *Enterococcus* zugeordnet. Durch 16S-rRNS-Sequenzanalysen wurde diese Unterteilung bestätigt (Ludwig *et al.*, 1985; Collins *et al.*, 1989a). In vielen Bereichen

hält sich aber hartnäckig die Verwendung des alten, taxonomisch nicht genau abgegrenzten Begriffes Fäkalstreptokokken. So wurde z.B. erst bei der letzten Überarbeitung der Trinkwasserverordnung (Anonym, 2001) der Begriff Fäkalstreptokokken durch Enterokokken ersetzt.

In den folgenden Jahren wurden weitere Streptokokken in die Gattung *Enterococcus* übertragen und auch neue Arten beschrieben. Diese sind zusammen mit den vorherrschenden Habitaten und der Bedeutung für die hygienische Wasseruntersuchung in Tab. A1, geordnet nach dem Zeitpunkt der Eingruppierung in die Gattung *Enterococcus*, angegeben. Darüber hinaus sind die Gattungen *Melissococcus* und *Tetragenococcus* in dieser Tabelle aufgelistet. Nicht aufgeführt ist dagegen *E. seriolicida*, da aufgrund hoher DNS-DNS-Ähnlichkeiten gezeigt werden konnte, dass *E. seriolicida* und *Lactococcus garviae* (= *Lactococcus garvieae*) zu einer Art gehören. *E. seriolicida* wurde daher als *L. garviae* reklassifiziert (Eldar *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1996).

Tabelle A1: Vorkommen und hygienische Relevanz der einzelnen Arten der Gattungen *Enterococcus*, *Melissococcus* und *Tetragenococcus*

Art	Vorkommen ¹	Hygienische Relevanz ¹	Referenz
<i>E. faecalis</i>	Mensch (Fäzes; dominierende Art in GB, USA); Rind (v.a. Jungtiere), Schwein, Schaf, Ziege, Geflügel (v.a. Jungtiere), Pferd, Hund, Katze, Insekten, Pflanzen; Milch, Milchprodukte	Indikator v.a. für menschliche Fäkalien	Schleifer und Kilpper-Bälz, 1984 ²
<i>E. faecium</i>	Mensch (Fäzes; dominierende Art in IND, J, EAU); Rind (v.a. Jungtiere), Schwein, Schaf, Geflügel (v.a. Jungtiere), Pferd, Hund, Katze; Milch, Milchprodukte	Indikator v.a. für menschliche Fäkalien	Schleifer und Kilpper-Bälz, 1984 ²
<i>E. avium</i>	Mensch (Fäzes; v.a. Kinder); Rind (v.a. Jungtiere), Schwein, Hund, Katze	Indikator für menschliche und tierische Fäkalien	Collins <i>et al.</i> , 1984 ²
<i>E. casseliflavus</i>	Pflanzen	=	Collins <i>et al.</i> , 1984 ²
<i>E. durans</i>	Mensch (Fäzes); Rind (v.a. Jungtiere), Geflügel (v.a. Jungtiere); Milch, Milchprodukte	Indikator für menschliche und tierische Fäkalien	Collins <i>et al.</i> , 1984 ²

¹ Devriese *et al.*, 1987; Devriese und Pot, 1995; Meier, 1997

² Transfer von der Gattung *Streptococcus* in die Gattung *Enterococcus*

Art	Vorkommen ¹	Hygienische Relevanz	Referenz
<i>E. gallinarum</i>	Geflügel (selten)	Indikator für tierische Fäkalien	Collins <i>et al.</i> , 1984 ²
<i>E. malodoratus</i>	Katze (Mandeln); Gouda (selten)	=	Collins <i>et al.</i> , 1984 ²
<i>E. hirae</i>	Mensch (Fäzes; selten); Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Geflügel, Pferd, Hund	Indikator für menschliche und tierische Fäkalien	Farrow und Collins, 1985
<i>E. mundtii</i>	Pflanzen	=	Collins <i>et al.</i> , 1986
<i>E. cecorum</i>	Rind (v.a. Jungtiere), Schwein, Geflügel (v.a. alte Tiere), Pferd, Hund, Katze	Indikator für tierische Fäkalien	Williams <i>et al.</i> , 1989 ²
<i>E. pseudoavium</i>	Rind (Mastitis; selten)	=	Collins <i>et al.</i> , 1989b
<i>E. raffinosus</i>	klinisches Isolat	=	Collins <i>et al.</i> , 1989b
<i>E. solitarius</i>	klinisches Isolat	=	Collins <i>et al.</i> , 1989b
<i>E. columbae</i>	Taube (Fäzes)	Indikator für tierische Fäkalien	Devriese <i>et al.</i> , 1990
<i>E. saccharolyticus</i>	Rind (Haut); Rinderstreu	=	Rodrigues und Collins, 1990 ²
<i>E. dispar</i>	klinisches Isolat (selten)	=	Collins <i>et al.</i> , 1991
<i>E. sulfureus</i>	Pflanzen	=	Martinez-Murcia und Collins, 1991
<i>E. flavescens</i>	klinisches Isolat (selten)	=	Pompei <i>et al.</i> , 1992
<i>E. asini</i>	Esel (Blinddarm)	#	de Vaux <i>et al.</i> , 1998
<i>E. villorum</i>	Schwein	#	Vancanneyt <i>et al.</i> , 2001
<i>E. haemoperoxidus</i>	Oberflächenwasser	#	Švec <i>et al.</i> , 2001
<i>E. moraviensis</i>	Oberflächenwasser	#	Švec <i>et al.</i> , 2001
<i>E. porcinus</i>	Schwein	#	Teixeira <i>et al.</i> , 2001
<i>E. ratti</i>	Ratte	#	Teixeira <i>et al.</i> , 2001
„ <i>E. azikeevi</i> “	-	#	Gilvanova, pers. Mitteilung
„ <i>E. phoeniculicola</i> “	Rotschnabel-Baumhopf (<i>Phoeniculus purpureus</i>)	#	Law-Brown, pers. Mitteilung
„ <i>E. rottae</i> “	Wasser	#	Weiss, pers. Mitteilung
<i>M. pluton</i>	Bienenlarve	=	Bailey und Collins, 1982
<i>T. halophilus</i>	Shottsuru (fermentierte Fischsoße)	=	Collins <i>et al.</i> , 1990
<i>T. muriaticus</i>	Fermentierte Tintenfischlebersoße	=	Satomi <i>et al.</i> , 1997

-: Keine Daten erhältlich

=: Keine Bedeutung als Fäkalindikator

#: Bedeutung als Fäkalindikator unklar, da zu diesen neuen Arten kaum Daten vorliegen

Die Gattung *Enterococcus* gehört mit den Gattungen *Atopobacter*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* und *Vagococcus* zur Familie der *Enterococcaceae* (Domäne: *Bacteria*; Phylum: *Firmicutes*; Klasse: *Bacilli*; Ordnung: *Lactobacillales*) (Garrity *et al.*, 2001). Der Stammbaum in Abb. A1 gibt einen Überblick über die nächstverwandten Gattungen.

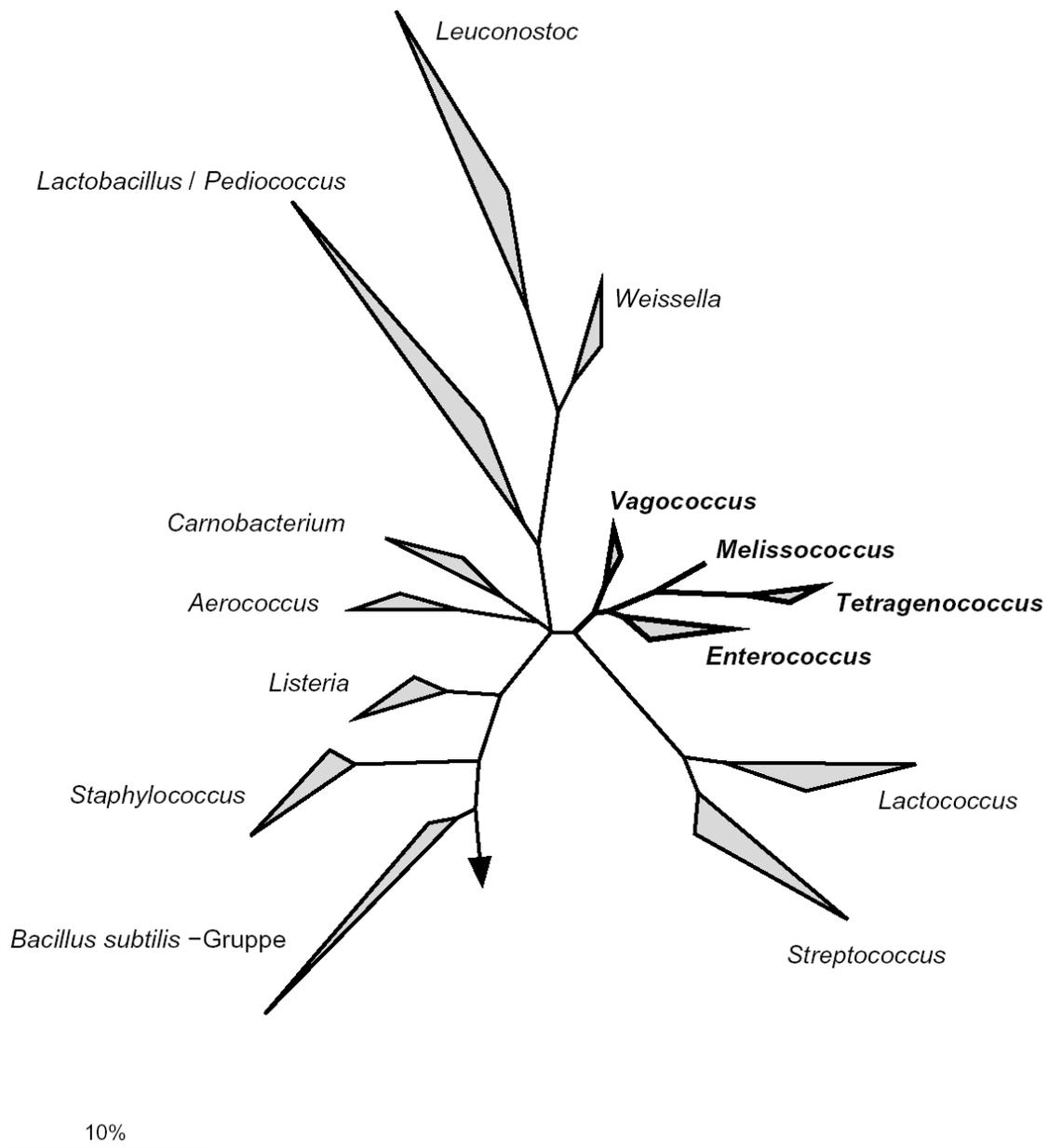


Abbildung A1: 16S-rRNS-Stammbaum ausgewählter Gattungen des Phylums *Firmicutes*, Familie der *Enterococcaceae* im Fettdruck; der Pfeil kennzeichnet die Wurzel des gezeigten Teilbaumes, die durch Präferenzsequenzen des Gesamtdatensatzes positioniert wurde; der Balken gibt einen Sequenzunterschied von 10% an

2 Physiologische Charakteristika der Enterokokken

Enterokokken sind grampositive kugel- bis eiförmige, einzeln, in Paaren oder in kurzen Ketten angeordnete Kokken mit niedrigem GC-Gehalt; manche sind beweglich (z.B. *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*) und / oder pigmentiert (z.B. *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. mundtii*, *E. sulfureus*). Sie sind fakultativ anaerob, Katalase-negativ, nicht sporenbildend und homofermentativ mit komplexen Nährstoffansprüchen (Devriese und Pot, 1995).

In folgender Tabelle sind physiologische Charakteristika aufgeführt, die zur Identifizierung von Enterokokken auf Gattungsebene vorgeschlagen wurden. Es gibt allerdings keine phänotypischen Merkmale, die die Gattung *Enterococcus* eindeutig von anderen grampositiven, Katalase-negativen Kokken unterscheidet (Devriese *et al.*, 1993). Neben allen gültig beschriebenen Enterokokken wurden auch die Gattungen *Tetragenococcus* und *Melissococcus* in Tab. A2 aufgenommen.

Tabelle A2: Physiologische Charakteristika der gültig beschriebenen Arten der Gattungen *Enterococcus*, *Melissococcus* und *Tetragenococcus* (Devriese *et al.*, 1991; Devriese *et al.*, 1993; Devriese und Pot, 1995; Hardie und Whiley, 1997; Morrison *et al.*, 1997; Literatur aus Tab. A1)

Art	Wachstum bei			Wachstum bei Zusatz von			Äskulin-hydrolyse	Lancefield-Gruppe D
	10 °C	45 °C	pH 9,6	6,5% NaCl	40% Galle	0,04% Natriumazid		
<i>E. asini</i>	o	o	k	-	+	k	+	+
<i>E. avium</i>	±	+	+	±	±/+	k	+	±
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	±/+	+	+	+	+
<i>E. cecorum</i>	-	+	o	-	o	-	+	-
<i>E. columbae</i>	-	k	k	-	o	-	+	-
<i>E. dispar</i>	+	-	k	+/-	+	-	+	-
<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. flavescens</i>	±/-	±/+	k	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	-	k	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. malodoratus</i>	+	-	+	+	+	k	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+	-	k	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. porcinus</i>	+	+	k	+	k	k	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	+/-	±/+	k	+	-
<i>E. raffinosus</i>	o	+	+	+	±/+	k	+	+
<i>E. ratti</i>	+	+	k	+	k	k	+	o
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	k	o	+	k	+	-
<i>E. solitarius</i>	+	+	k	+	+	k	+	+
<i>E. sulfureus</i>	+	-	k	+	+	k	+	-
<i>E. villorum</i>	k	k	k	+	+	+	+	k
<i>M. pluton</i> ³	-	+	k	k	k	k	k	+
<i>T. halophilus</i>	-	-	k	+	k	k	k	k
<i>T. muriaticus</i>	-	-	+	+	k	k	k	k

o: Schwach positiv

±/+: Variabel, meist positiv

+/-: Unterschiedliche Angaben in der Literatur

±: Variabel

±/-: Variabel, meist negativ

k: Keine Angabe

³ Anaerob bis mikroaerophil

Da einerseits bei manchen Enterokokken einige dieser Eigenschaften nicht vorhanden sind und andererseits einige dieser Eigenschaften auch in anderen Gattungen vorkommen, ist die eindeutige Zuordnung schwierig. Einige Selektivmedien, die zwar nicht alle Enterokokken und zusätzlich einige Streptokokken erfassen, haben sich aber in der Praxis bewährt. Hierzu zählen z.B. Slanetz-Bartley-Agar (Slanetz und Bartley, 1957), Kanamycin-Äskulin-Azid-Agar (Mossel *et al.*, 1978) oder Oxolinsäure-Äskulin-Azid-Agar (Audicana *et al.*, 1995). Vorgeschädigte Zellen werden jedoch durch Selektivmedien oft nicht erfasst, da sie empfindlicher gegenüber selektiven Kultivierungsbedingungen sind (Niemi und Ahtiainen, 1995).

Neben Problemen bei der selektiven Anreicherung von Enterokokken ist auch die Differenzierung bis auf die Artebene nicht einfach. Hier kann die Anwendung von molekularbiologischen Methoden Abhilfe schaffen (vgl. A.5).

3 Vorkommen der Enterokokken

Enterokokken sind typischerweise im Darm und in Fäzes von Mensch und Tier zu finden (Devriese und Pot, 1995). Einige Arten wurden aber auch aus Boden, Nahrungsmitteln und Wasser isoliert. Die am häufigsten aus menschlichen Fäzes isolierten Enterokokken sind *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. durans*. Bei Tieren wie Schweinen, Rindern, Schafen und Pferden wurden diese Arten in der Regel in weitaus geringerer Zahl gefunden (Meier, 1997). In Tab. A1 sind die wichtigsten Habitate der einzelnen Arten zusammengestellt.

4 Bedeutung der Enterokokken

4.1 Bedeutung als Probiotikum

Neben bestimmten Stämmen der Gattungen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* u.a. werden Stämme von *E. faecalis* und *E. faecium* als Probiotika in Milchprodukten, Säuglingsnahrung und Arzneimitteln verwendet. Dabei soll die Einnahme von Probiotika die normale Darmflora erhalten oder wiederherstellen und so beispielsweise Lactoseunverträglichkeit lindern, den Serumcholesterinspiegel senken und sogar antikarzinogen wirken. Auch die erfolgreiche Behandlung von Enteritis wurde beschrieben. Als Futterzusatz sollen Probiotika das Wachstum beschleunigen und als Vorbeugung oder Behandlung von Enteritis eingesetzt werden können. (Franz *et al.*, 1999)

Darüber hinaus können Enterokokken durch Produktion einer Reihe von Bakteriozinen (Enterozine) Lebensmittel vor dem Befall mit Listerien (Giraffa, 1995) oder Clostridien (Franz *et al.*, 1996, 1999) schützen.

4.2 Bedeutung als Lebensmittelverderber

Aufgrund der Anwesenheit von Enterokokken im Intestinaltrakt von Tieren besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Kontamination von Fleisch und Fleischprodukten bereits bei der Schlachtung. Wegen ihrer relativ hohen Thermotoleranz sind sie aber auch bei gekochtem Fleisch oder pasteurisiertem Dosenfleisch als Verunreinigungen anzutreffen (Franz *et al.*, 1999).

Nach Kielwein (1978, 1994) dominieren in Milchprodukten *E. durans* und *E. faecium*, deren Vorkommen auf eine unhygienische Produktionsweise zurückzuführen ist. In diesen Fällen können Enterokokken als Indikatoren für nicht ausreichende Hygiene bei der Produktion herangezogen werden. Sie werden aber auch selbst mit Lebensmittelvergiftungen in Verbindung gebracht, da sie an der Bildung von biogenen Aminen beteiligt sind (Satyendra und Mital, 1991; Kielwein, 1994).

4.3 Bedeutung als Pathogene

Als Pathogene sind Enterokokken an Harnwegsinfektionen, Bakteriämie, Endokarditis und Wundinfektionen beteiligt (Murray *et al.*, 1998). Bei Harnwegsinfektionen und bakterieller Endokarditis sind sie oft die einzigen Verursacher der Infektion. In anderen Fällen treten sie in Verbindung mit weiteren Bakterien auf. Die weitaus größte Rolle spielt *E. faecalis* gefolgt von *E. faecium* (Devriese *et al.*, 1991). Infektionen mit *E. faecium* nehmen jedoch prozentual immer mehr zu; während früher ca. 10% aller durch Enterokokken verursachten Infektionen auf *E. faecium* zurückzuführen waren, sind es heute bereits ca. 30% (Edwards, 2000). Andere Enterokokken, z.B. *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* und *E. raffinosus*, spielen dagegen nur eine untergeordnete Rolle.

Für diese Erkrankungen ist kein einzelnes Toxin oder hydrolytisches Enzym verantwortlich, sondern eine Kombination mehrerer Pathogenitätsfaktoren ermöglicht den Enterokokken die Verursachung schwerer Krankheiten (Infektionen). Beispiele möglicher Pathogenitätsfaktoren sind Cytolysin, Adhäsine, Hämolysin, Produktion von extrazellulärem Hydroperoxid („Superoxid“) oder Gelatinasen (Murray *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 1999; Edwards, 2000). Ca. 10% aller nosokomialen Infekte gehen auf Enterokokken zurück (Murray *et al.*, 1998).

Zusätzlich weisen Enterokokken oft eine Reihe von Antibiotikaresistenzen auf, die eine Behandlung erschweren. So existieren bereits Enterokokken, die gegen alle gängigen Antibiotika resistent sind und daher ein ernstzunehmendes Risiko darstellen (Franz *et al.*, 1999). In den letzten Jahren stiegen die Fälle nosokomialer Infekte durch multiresistente Enterokokken immer weiter an (Morrison *et al.*, 1997; Edwards, 2000).

Neben intrinsischen Antibiotikaresistenzen, z.B. gegen Penicillin, die bei unterschiedlichen Arten verschieden stark ausgeprägt sind, haben Enterokokken auch

erworbene Resistenzen z.B. gegen Erythromycin, Tetracyclin oder Vancomycin. Momentan sind mehr als die Hälfte aller klinischen Isolate von *E. faecium* nicht mit Vancomycin behandelbar (Edwards, 2000).

Die Antibiotikaresistenzgene werden durch konjugative und nicht konjugative Plasmide und konjugative Transposons ausgetauscht. Hinzu kommt, dass *E. faecalis* innerhalb seiner Art Antibiotikaresistenzen sehr effektiv mit Hilfe von Sexpheromonplasmiden austauschen kann (Devriese *et al.*, 1991; Franz *et al.*, 1999). Ein weiteres Risiko stellt die Möglichkeit der Übertragung von Resistenzgenen auf andere, virulentere Pathogene dar (Morrison *et al.*, 1997).

Als mögliche Ursache für das Auftreten von vancomycinresistenten Enterokokken steht die Verwendung von Avoparcin, einem Glykopeptidantibiotikum, in der Landwirtschaft in Verdacht; die Verwendung wurde daher EU-weit verboten. Dieser Zusammenhang ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt (Klein *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 1999). Wie sich herausstellte, sind solcherart gefährliche Enterokokken in den meisten Fällen nicht identisch mit den zur normalen Darmflora gehörenden Enterokokken. Vielmehr gibt es fundamentale Unterschiede zwischen Infektionsstämmen und kommensalen Stämmen (Edwards, 2000).

Mit steigender Bedeutung von Enterokokken als opportunistische Humanpathogene wird eine effektive Kontrolle von Lebensmitteln auf Verunreinigungen mit Enterokokken in Zukunft immer wichtiger werden. Bei gezielter Verwendung von Enterokokken als Probiotika sollte besondere Sorgfalt auf die Auswahl von nicht resistenten Stämmen oder von Stämmen ohne mögliche Pathogenitätsfaktoren angewendet werden. Aber auch der Einsatz von nicht resistenten oder nicht hämolysinproduzierenden Enterokokken in Nahrungsmitteln ist zu überdenken, da sie in der Lage sind, durch horizontalen Gentransfer schnell Resistenzen und mögliche Pathogenitätsfaktoren aufzunehmen (Franz *et al.*, 1999).

4.4 Bedeutung in der hygienischen Trinkwasser- und Lebensmittelkontrolle

Bei der Trinkwasseruntersuchung, aber auch bei der Überprüfung von anderen Lebensmitteln oder Badegewässern, werden sogenannte Indikatororganismen herangezogen, um die hygienische Qualität zu prüfen. Ein idealer Indikatororganismus sollte folgende Eigenschaften haben (Godfree *et al.*, 1997; Meier, 1997):

- Dauerhaftes und ausschließliches Auftreten in menschlichen und tierischen Fäzes
- Vorkommen in mindestens gleicher Anzahl wie mögliche Pathogene
- Ähnliches Verhalten in der Umwelt wie mögliche Pathogene

- Keine Vermehrungsfähigkeit in der Umwelt
- Mindestens so hohe Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln wie mögliche Pathogene
- Leichte Detektierbarkeit
- Hinweise auf Kontaminationsquelle ableitbar

Folgende Enterokokken erfüllen die meisten der o.g. Kriterien und sind gleichzeitig die wichtigsten Fäkalindikatoren dieser Gattung: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* und *E. hirae*. Sie sind fast ausschließlich intestinaler Herkunft, vermehren sich nicht in der Umwelt, wie dies z.B. von *E. coli* berichtet wurde und sind in ausreichender Menge, wenn auch in deutlich geringerer Zahl als *E. coli*, im Abwasser vorhanden (Godfree *et al.*, 1997). Sie sterben langsamer als *E. coli* oder andere *Enterobacteriaceae* und auch die Resistenz gegenüber Desinfektion ist ca. doppelt so hoch wie die von *E. coli*. Allerdings sind manche Viren und Protozoen (*Cryptosporidium*, *Giardia*) widerstandsfähiger gegenüber chemischer und UV-Desinfektion. Die Anwendung nur dieser Fäkalindikatoren ist also für die hygienische Trinkwasseranalyse nicht ausreichend (Sinton *et al.*, 1993; Godfree *et al.*, 1997).

In anderen Nahrungsmitteln eignen sich Enterokokken aufgrund ihrer hohen Thermotoleranz und Widerstandsfähigkeit gegen ungünstige Bedingungen auch als Indikatororganismen zur Überprüfung einer ausreichenden Behandlung (z.B. Erhitzung) während der Produktion (Devriese *et al.*, 1991).

Neben den vier o.g. Enterokokkenarten sind auch andere Enterokokken als Indikatoren für menschliche bzw. tierische Fäkalien zu verwenden. In Tab. A1 ist die hygienische Relevanz der einzelnen Arten zusammengestellt. Eine genauere Analyse des Ursprungs der Verunreinigung durch Auswertung des Artenspektrums in der Probe ist umstritten (Sinton *et al.*, 1993). Enterokokken kommen zwar in verschiedenen Habitaten unterschiedlich häufig vor (vgl. Tab. A1), einzelne Habitate können den einzelnen Arten aber nur schwer zugeordnet werden. *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* wurden beispielsweise auch aus Insekten und Fischen isoliert, in deren Darm sie sich vermehren und so ins Wasser gelangen können (Kanoë und Abe, 1988). Allerdings wird davon ausgegangen, dass sie ursprünglich von Fäzes warmblütiger Tiere stammen. Auch die Vermehrung von Enterokokken auf Pflanzen bis hin zu epiphytischen Beziehungen wie beispielsweise bei *E. faecalis* ssp. *liquefaciens*, ist beschrieben (Sinton *et al.*, 1993). Aus diesen Gründen sollte auch die Anwesenheit von *E. coli* und coliformen Bakterien untersucht werden (Godfree *et al.*, 1997).

Ein anderer Ansatz, um Rückschlüsse auf den Ursprung der Verunreinigung ziehen zu können, ist die Bestimmung des zahlenmäßigen Verhältnisses einzelner Arten oder Gruppen zueinander. Geldreich und Kenner (1969) benutzten beispielsweise das Verhältnis ‚Fäkalcoliforme‘ / ‚Fäkalstreptokokken‘ zur Unterscheidung menschlicher und

tierischer Verunreinigungen. Aufgrund unterschiedlicher Absterberaten verändert sich jedoch dieses Verhältnis im Lauf der Zeit und ist daher in der Praxis weniger geeignet (Sinton *et al.*, 1993; Godfree *et al.*, 1997).

Um die Bedeutung der Enterokokken als Fäkalindikatoren besser einschätzen zu können, bedarf es einer genaueren Untersuchung ihres natürlichen Vorkommens. Dies ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Selektivität der eingesetzten Selektivmedien und der unsicheren physiologischen Differenzierung, wie sie in den meisten bisherigen Studien verwendet wurde, nicht vollständig geklärt (Niemi *et al.*, 1993; Leclerc *et al.*, 1996).

Nach der Trinkwasserverordnung (Anonym, 2001) dürfen in 100 ml Wasser weder *E. coli* noch Enterokokken noch coliforme Bakterien nachweisbar sein. Eine weitergehende Differenzierung ist nicht vorgeschrieben.

5 Detektion der Enterokokken

Klassische Methoden zur Detektion von Enterokokken basieren auf physiologischen Charakteristika (vgl. A.2). Die Analyse der Proben wird entweder in Flüssigkulturen mit Hilfe der Stichzahl oder auf Festmedien mit Hilfe der Membranfiltrationsmethode nach Slanetz und Bartley (1957) durchgeführt. Verwendung finden hierbei diverse Selektivmedien (vgl. A.2). Nicht alle mit diesen Selektivmedien erfassten Bakterien sind als Fäkalindikatoren relevant (vgl. Tab. A1). Daher ist bei einem positiven Befund eine genauere Untersuchung der enthaltenen Art erforderlich.

Für die artspezifische Detektion sind eine Reihe von Identifizierungssystemen entwickelt worden, die auf der kombinierten Untersuchung physiologischer Merkmale beruhen. Hierzu zählen z.B. der Identifizierungsschlüssel von Manero und Blanch (1999) oder kommerzielle Testsysteme wie z.B. API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, F) und MicroScan (Dade International, MicroScan Int., West Sacramento, CA, USA). Allen diesen Systemen geht allerdings eine zeit- und arbeitsaufwendige Isolierung als Reinkulturen voraus. Daher ist ein Ergebnis erst nach einigen Tagen zu erhalten. Bei API- und MicroScan-Systemen wurde außerdem über Schwierigkeiten bei der genauen Identifizierung berichtet. So ist z.B. die Unterscheidung zwischen *E. durans* und *E. hirae* nicht sicher möglich (Devriese *et al.*, 1995; Kirschner *et al.*, 2001).

Daneben werden auch eine Reihe anderer Methoden zur Identifizierung eingesetzt. Folgende Methoden erlauben eine Differenzierung einzelner Arten:

- SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) der Gesamtzellproteine (Niemi *et al.*, 1993; Devriese *et al.*, 1995)
- DNS-DNS-Hybridisierung (Devriese *et al.*, 1987)
- Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden (Betzl *et al.*, 1990)
- Ribotypisierung (Hall *et al.*, 1992)
- PCR (Saiki *et al.*, 1988) mit spezifischen Oligonukleotidprimern ggf. in Verbindung mit Hybridisierungsmethoden (Bej *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1996)

Folgende Methoden erlauben eine Differenzierung einzelner Stämme:

- Chromosomale RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) (Murray *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1992)
- RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Cocconcelli *et al.*, 1995)
- IR- und Ramanspektroskopie ganzer Zellen (Kirschner *et al.*, 2001)

DNS-DNS-Hybridisierungen eignen sich, neben Sequenzanalysen konservierter Gene, wie z.B. ribosomale RNS, Elongationsfaktor TU oder β -Untereinheit der ATPase (Ludwig, 1991), v.a. für phylogenetische und taxonomische Studien. Die Verwendung von rRNS- bzw. rDNS-spezifischen Sonden und rDNS-Sequenzanalysen gehören zu den Standardtechniken für die Detektion und Identifikation von Mikroorganismen (Amann und Ludwig, 1994; Amann *et al.*, 1995). Da die rRNS in Abhängigkeit von der funktionellen Bedeutung sowohl konservierte als auch hochvariable Regionen besitzt, können Sonden unterschiedlicher Spezifität konstruiert werden (Amann und Ludwig, 1994; Amann *et al.*, 1995). Dadurch ist eine Differenzierung zum Teil bis auf die Artebene möglich. Als Sondenzielregionen können neben der rRNS bzw. rDNS auch andere, für bestimmte Arten spezifische Gene verwendet werden. Ein großer Vorteil von Hybridisierungen mit Oligonukleotidsonden ist die direkte Untersuchung von Proben ohne vorhergehende Isolierung der Mikroorganismen als Reinkulturen.

Zu den bewährten Hybridisierungstechniken zählt die **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung** (FISH). Sie ermöglicht die Detektion nicht kultivierbarer Bakterien direkt in der Probe (Amann und Ludwig, 1994; Amann *et al.*, 1995). Außerdem können die Sonden signale mehrerer Sonden (bei Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe) direkt einzelnen Zellen zugeordnet werden. Auch ist mit dieser Methode eine Quantifizierung der mit einer Sonde detektierten Bakterien möglich (Bouchez, *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2000; Daims *et al.*, xxxxb). Bei einer größeren Anzahl von Sonden ist dieses Verfahren jedoch sehr zeitaufwendig.

Ebenfalls zu nennen ist die **(Mikro-)Koloniehybridisierung**, die quantitative Aussagen ermöglicht und sich daher bei der Analyse von klinischen, Wasser-, Lebensmittel- und

Umweltproben bewährt hat (Datta *et al.*, 1987; Amy und Hiatt, 1989; Ludwig *et al.*, 1995; Koob, 1997; Meier, 1997). Im Gegensatz zur Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ist diese Methode nur mit kultivierbaren Bakterien durchführbar. Bei einer größeren Anzahl von Sonden ist aber auch dieses Verfahren sehr zeitaufwendig.

Fehler bei der Identifikation von Mikroorganismen können in der Anwesenheit identischer Zielsequenzen in phylogenetisch entfernten Organismen begründet sein. Besonders bei artspezifischen Sonden, die zwangsläufig in sehr variablen Regionen liegen, sind solche Probleme möglich, da durch Mehrfachmutationen im Lauf der Evolution auch in entfernten Organismen dieselbe Zielsequenz vorhanden sein kann. Wenn die Sequenz dieses Organismus noch nicht in der Datenbank enthalten ist, kann dies nicht erkannt und folglich bei der Sondenkonstruktion auch nicht berücksichtigt werden. Es ist dagegen sehr unwahrscheinlich, dass in unabhängig evolvierenden Genregionen des gleichen Gens oder verschiedener Gene solche sekundären Identitäten auftreten. Daher kann durch den Einsatz mehrerer gegen unterschiedliche Bereiche der rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden (Mehrfachsondenkonzept) die Zuverlässigkeit der Hybridisierungsergebnisse erheblich gesteigert werden (Ludwig *et al.*, 1998).

Um die größere Anzahl von Sonden, die durch Einsatz dieses Mehrfachsondenkonzeptes benötigt wird, auch in der Praxis mit einem vertretbaren Zeit- und Arbeitsaufwand anwenden zu können, bietet sich die **reverse Hybridisierung** (Saiki *et al.*, 1989) an. Das Prinzip der reversen Hybridisierung beruht auf der Immobilisierung kurzer Oligonukleotide (hier 18 Nukleotide) auf einem Trägermaterial und anschließender Hybridisierung mit amplifizierter und markierter rDNS aus der zu untersuchenden Probe. DNS-Stränge, die eine zur Sonde komplementäre Sequenz enthalten, hybridisieren mit der immobilisierten Sonde, Hybride mit Fehlpaarungen werden beim folgenden stringenten Waschschrift entfernt. Durch die Markierung können die Sonden erkannt werden, deren komplementäre Sequenz in der Probe enthalten war, was wiederum Rückschlüsse auf die in der Probe enthaltenen Organismen zulässt. Als Markierung dienen Fluoreszenzfarbstoffe, Haptene (und anschließende Detektion mit antikörpergebundenen Enzymen in Verbindung mit einem chromogenen oder luminogenen Substrat) oder radioaktiv markierte Nukleotide.

Diese Hybridisierungsmethode hat gegenüber den o.g. den entscheidenden Vorteil, dass eine Probe bei einer Hybridisierung gleichzeitig mit einer Vielzahl von Sonden untersucht werden kann. Als Trägermaterialien werden Membranen, Mikrotiterplatten oder Objektträger (DNS-Chips) eingesetzt (Saiki *et al.*, 1989; Koob, 1997; Meier, 1997; Lemieux *et al.*, 1998). Mikrotiterplatten bieten gegenüber den anderen beiden Trägern den Vorteil, dass das Verfahren einfach automatisierbar ist und in benachbarten Kavitäten unterschiedlich stringente Pufferlösungen verwendet werden können. Für Routinelabors sind die entscheidenden Vorteile, dass durch die einfache

Automatisierbarkeit ein hoher Probendurchsatz möglich wird und keine großen Investitionen notwendig sind, wie dies z.B. bei Einsatz der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der Fall wäre. Der klare Vorteil von DNS-Chips ist die erhebliche Steigerung der Belegungsdichte [mehrere 10.000 Sonden pro DNS-Chip; bei direkter Oligosynthese auf dem Objektträger bis zu 250.000 Sonden pro cm² (Lemieux *et al.*, 1998)] und die damit verbundene Minimierung des Verbrauchs an eingesetzten Lösungen. Dieser Vorteil kommt aber erst ab einer größeren Zahl von Sonden zum Tragen. Da die Anzahl der Sonden weiter steigt, wird auch die Bedeutung der Hybridisierung auf DNS-Chips immer mehr zunehmen. Die Miniaturisierung und die gleichzeitige Verwendung einer großen Anzahl von Sonden birgt aber auch die Gefahr von Verwechslungen sowohl bei der Belegung der DNS-Chips als auch bei der Auswertung. Hier kann durch Einsatz von Pipettierrobotern und entsprechender Auswertungssoftware die Gefahr so gering wie möglich gehalten werden. Trotzdem ist zu bedenken, dass auch ein kleiner Fehler, z.B. eine falsch eingesetzte Mikrotiterplatte, eine große Zahl falscher Ergebnisse produziert (Knight, 2001).

6 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Sondensatzes nach den Prinzipien des Mehrfachsondenkonzeptes für die Gattung *Enterococcus*, aufbauend auf bereits vorhandenen (Betzl *et al.*, 1990; Koob, 1997; Meier, 1997; Mehlen, 1999) und neu konstruierten Sonden. Darüber hinaus sollen Hybridisierungsverfahren weiterentwickelt und an die Erfordernisse dieses Sondensatzes angepasst werden. Da in dieser Arbeit die Automatisierbarkeit und die Miniaturisierung der Hybridisierung im Vordergrund steht, wird speziell auf reverse Mikrohybridisierungsverfahren in Mikrotiterplatten und auf DNS-Chips eingegangen.

B MATERIAL UND METHODEN

1 Mikroorganismen

Tabelle B1: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Stammnummer	Medium	T [°C]	Anzucht
<i>Enterococcus asini</i>	DSM 11492 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus avium</i>	DSM 20679 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSM 20680 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus cecorum</i>	DSM 20682 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus columbae</i>	DSM 7374 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus dispar</i>	DSM 6630 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus durans</i>	DSM 20633 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus faecalis</i>	LMG 7937 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>liquefaciens</i>	DSM 20380	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus faecalis</i> ssp. <i>zymogenes</i>	DSM 20371	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus flavescens</i>	DSM 7370 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus gallinarum</i>	DSM 20628 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus hirae</i>	DSM 20160 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus malodoratus</i>	DSM 20681 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus mundtii</i>	DSM 4838 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	DSM 5632 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus raffinosus</i>	DSM 5633 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	DSM 20726 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus solitarius</i>	DSM 5634 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Enterococcus sulfureus</i>	DSM 6905 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	M1	37	aerob
<i>Escherichia coli</i>	DSM 498	M1	37	aerob
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079 ^T	MRS	37	anaerob
<i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	BMF 11Lb1	MRS	37	anaerob
<i>Lactococcus garviae</i>	DSM 6783	BHI	37	anaerob
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	DSM 20481 ^T	M53	30	anaerob
<i>Melissococcus pluton</i>	LTH 3442	MFM	30	anaerob
<i>Pediococcus acidilactici</i>	LMG 11384 ^T	MRS	37	anaerob
<i>Pediococcus inopinatus</i>	LMG 11409 ^T	MRS	30	anaerob
<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i>	DSM 20232	M1	37	aerob
<i>Streptococcus bovis</i>	DSM 20480 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i>	DSM 20560 ^T	M92	37	aerob
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	DSM 20339 ^T	BHI	37	anaerob
<i>Vagococcus fluvialis</i>	DSM 5731 ^T	M92	30	anaerob
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	LMG 1199 ^T	-	-	-
<i>Nitrobacter</i> sp.	Isolat (K 3.4) ^a	-	-	-
<i>Nitrobacter</i> sp.	Isolat (215) ^a	-	-	-
<i>Nitrobacter</i> sp.	Isolat (Nb 4) ^b	-	-	-
<i>Nitrosomonas europaea</i>	ATCC 25978 ^a	-	-	-
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Isolat (1) ^c	-	-	-

<i>Nitrococcus</i> sp.	Isolat (24) ^a	-	-	-
<i>Nitrococcus mobilis</i>	Isolat (NC 2) ^a	-	-	-
<i>Nitrosococcus mobilis</i>	Isolat (Nm 93) ^c	-	-	-
<i>Nitrospira</i> sp.	Isolat (295) ^a	-	-	-
<i>Nitrospina</i> sp.	Isolat (Nb 3) ^a	-	-	-
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	ATCC 25196 ^a	-	-	-
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Isolat (165) ^a	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolat (176) ^a	-	-	-
<i>Zoogloea ramigera</i>	ATCC 25935 ^a	-	-	-

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

BMF: Bundesanstalt für Ernährung, Karlsruhe, D

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D

LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent, B

LTH: Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart, D

a: DNS zur Verfügung gestellt von E. Waltenberger (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München, Freising, D)

b: DNS zur Verfügung gestellt von S. Juretschko (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München, Freising, D)

c: DNS zur Verfügung gestellt von U. Purkhold (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München, Freising, D)

T: Typstamm

2 Nährmedien

M1, pH 7,0 (Medium 1; lt. DSMZ-Katalog)

Pepton	5 g	
Fleischextrakt	3 g	
Agar	12 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

M53, pH 7,2-7,4 (Medium 53; lt. DSMZ-Katalog)

Trypton (Casein)	10 g	
Glucose	5 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	5 g	
Agar	12 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

M92, pH 7,0-7,2 (Medium 92; lt. DSMZ-Katalog)

Trypticase Soy Broth	30 g	
Hefeextrakt	3 g	
Agar	12 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

BHI (Brain-Heart-Infusion; Oxoid, Wesel, D)

BHI, getrocknet	37 g	
Agar	12 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

MFM (Medium für *Melissococcus*)

BHI, getrocknet	37 g	
Fructose	5 g	
Hefeextrakt	2,5 g	
Agar	12 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	
Cystein	2,59 g	kurz vor dem Animpfen zugeben

MRS, pH 6,2-6,5 (MRS-Medium)

Trypton (Casein)	10,00 g	
Fleischextrakt	10,00 g	
Hefeextrakt	5,00 g	
Glucose	20,00 g	
Tween 80	1,00 g	
K ₂ HPO ₄	2,00 g	
Natriumacetat	5,00 g	
(NH ₄) ₂ -citrat	2,00 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,20 g	
MnSO ₄ · H ₂ O	0,05 g	
Agar	12,00 g	nur für Festmedien
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml	

KAA-Agar (Kanamycin-Äskulin-Azid-Agar; Merck, Darmstadt, D)

KAA, getrocknet	47,50 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

OAA-Agar, pH 7,0 (Oxolinsäure-Äskulin-Azid-Agar; Audicana *et al.*, 1995)

KAA, getrocknet	47,50 g
Natriumazid	0,25 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Oxolinsäurelösung	0,50 ml	(1% (w / v) Oxolinsäure in 0,05 N Natronlauge) sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern, nach dem Autoklavieren zugeben
-------------------	---------	--

Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3 Zellanzucht und Stammhaltung

Die Stämme wurden unter den in Tab. B1 aufgeführten Bedingungen angezogen. Aerobe Anzucht erfolgte unter Schütteln in Erlenmeyerkolben bzw. auf Festmedien, anaerobe Anzucht in Flüssigmedien ohne Belüftung, bzw. auf Festmedien im Anaerobtopf unter Verwendung von AnaeroGen™ (Oxoid, Basingstoke, GB).

Die Stämme wurden wenige Wochen auf Festmedium bei 4 °C aufbewahrt. Zur Kontrolle auf Reinheit wurden Verdünnungsausstriche durchgeführt und ggf. die 16S-rDNS ansequenziert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen hergestellt und bei –80 °C gelagert.

4 DNS-Isolierung

Als Lösungsmittel diente im Folgenden, soweit nicht anders vermerkt, H₂O_{reinst} (MilliQ, Millipore, Eschborn, D). Alle Lösungen, die mit * gekennzeichnet sind, wurden autoklaviert.

4.1 DNS-Isolierung nach Marmur (1961, mod.)

Lösungen

Penicillin G:	(Sigma, Deisenhofen, D)
Saline-EDTA-Lösung*:	0,15 M Natriumchlorid 0,01 M EDTA; pH 8,0
LysozymbLösung:	10 mg / ml Lysozym (Merck, Darmstadt, D) in 50 mM Tris / HCl; pH 8,0
SDS-Lösung:	25% (w / v) Natriumdodecylsulfat
NaCl-Lösung*:	5 M Natriumchlorid
Chloroform	
Isopropanol	
Ethanol	
1xSSC (Standard-Saline-Citrat)*:	0,150 M Natriumchlorid 0,015 M tri-Natriumcitrat; pH 7,0
Natriumacetatlösung*:	3 M Natriumacetat; pH 7,0
RNase A-Lösung:	1 mg / ml Rnase A (Merck, Darmstadt, D) in 2xSSC, 10 min auf 100 °C erhitzt (zur Inaktivierung von DNasen)
Proteinase K-Lösung:	10 mg / ml Proteinase K (Roche, Mannheim, D)

Zellernte

- Zellernte aus Flüssigkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} = 0,4-1,0), bei grampositiven Bakterien eine Stunde vor der Ernte Zugabe von Penicillin G zur Destabilisierung der Zellwand

- Zentrifugation für 20 min mit 8000 x g bei 4 °C
- Aufnahme der geernteten Zellen in Saline-EDTA-Lösung
- Zentrifugation für 20 min mit 8000 x g bei 4 °C

Zellyse

- Resuspendieren der Zellen in 10 ml Saline-EDTA-Lösung pro Gramm Nassgewicht
- Zugabe von Lysozymlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mg / ml
- Inkubation für 30-120 min bei 37 °C
- Zugabe von SDS-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 2%
- Inkubation für 10 min bei 65 °C (Inaktivierung von DNasen)
- Zugabe von NaCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 M

Chloroformextraktion

- Zugabe von 1 Vol Chloroform und Inkubation für 20 min bei RT unter Schütteln
- Zentrifugation für 20 min mit 8000 x g bei RT
- Abheben der oberen, wässrigen Phase
- Wiederholen der Chloroformextraktion, bis keine Interphase mehr sichtbar ist

Isopropanolfällung

- Zugabe von 1 / 9 Vol Natriumacetatlösung und 0,6 Vol Isopropanol
- Wickeln der ausgefällten DNS auf einen sterilen Glasstab

RNasebehandlung

- Lösen der DNS in 20 ml 0,1xSSC ÜN bei 4 °C (Zusatz von 50 µl Chloroform verhindert das Wachstum von Mikroorganismen)
- Zugabe von 10xSSC bis zu einer Endkonzentration von 1xSSC
- Zugabe von RNase A-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 50 µg / ml
- Inkubation für 30 min bei 37 °C

Proteinasebehandlung

- Zugabe von Proteinase K-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 50 µg / ml
- Inkubation für 60 min bei 37 °C

Fällung, Waschen und Lagerung der DNS

- Chloroformextraktion (s.o.)
- Isopropanolfällung (s.o.)
- Waschen der DNS mit 70%igem Ethanol
- Lösen der DNS in H₂O_{reinst} und Lagerung bei -20 °C

4.2 DNS-Isolierung nach Wisotzkey *et al.* (1990, mod.)

Lösungen

Saline-EDTA-Lösung*:	0,15 M Natriumchlorid 0,01 M EDTA; pH 8,0
1xSSC*:	0,150 M Natriumchlorid 0,015 M tri-Natriumcitrat; pH 7,0
Lysozymlösung:	10 mg / ml Lysozym (Merck, Darmstadt, D) in 1xSSC
RNase A-Lösung:	10 mg / ml RNase A (Merck, Darmstadt, D) in 2xSSC; 10 min auf 100 °C erhitzt (zur Inaktivierung von DNasen)
Proteinase K-Lösung:	10 mg / ml Proteinase K (Roche, Mannheim, D)
SDS-Lösung:	25% (w / v) Natriumdodecylsulfat
Natriumacetatlösung*:	5 M Natriumacetat; pH 5,5
Chisom: Ethanol	Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1)

Zellernte und -lyse

- Zentrifugation von 2 ml ÜN-Kultur für 5 min mit 14000 x g bei 4 °C
- Aufnahme des Niederschlags in 1 ml Saline-EDTA-Lösung, erneut abzentrifugieren
- Resuspendieren der Zellen in 500 µl Saline-EDTA-Lösung
- Zugabe von 20 µl Lysozymlösung und Inkubation für 30 min bei 37 °C
- Zugabe von 5 µl RNase A-Lösung und Inkubation für 30 min bei 37 °C
- Zugabe von 5 µl Proteinase K-Lösung und Inkubation für 60 min bei 37 °C
- Zugabe von 40 µl SDS-Lösung und Inkubation für 10 min bei 65 °C (Inaktivierung von DNasen)

Reinigung der DNS

- Zugabe von 180 µl Natriumacetatlösung und 745 µl Chisom, schütteln
- Zentrifugation für 5 min mit 14000 x g bei RT
- Abheben der oberen, wässrigen Phase

- Zugabe von 2 Vol Ethanol und Fällen der DNS für 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zentrifugation für 2 min mit $14000 \times g$ bei RT
- Verwerfen des Überstandes
- Waschen der DNS mit 70%igem Ethanol
- Zentrifugation für 1 min mit $14000 \times g$ bei RT
- Verwerfen des Überstandes
- Trocknen der DNS für 10 min in der Vakuumzentrifuge
- Aufnehmen der DNS in $100\ \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.3 DNS-Isolierung nach Stahl und Flesher (1987, mod.)

Lösungen und Verbrauchsmaterial

Tris-EDTA-Puffer (TE)*:	10 mM Tris / HCl; pH 8,0 1 mM EDTA
SDS-Lösung:	25% (w / v) Natriumdodecylsulfat
Glasperlen:	170-180 μm (Braun, Melsungen, D)
Natriumacetatlösung*:	3 M Natriumacetat; pH 7,0
Chisom:	Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1)
Phenol / Chloroform:	Roti [®] -Phenol / Chloroform (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D)
Ethanol	

Zellaufschluss und Reinigung der DNS

- Zentrifugation von 2 ml Probe für 5 min mit $14000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Niederschlag in $400\ \mu\text{l TE}$ suspendieren
- Zugabe von $50\ \mu\text{l SDS-Lösung}$, $400\ \mu\text{l Glasperlen}$ und $400\ \mu\text{l Phenol / Chloroform}$
- Inkubation für 4 min im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex super RK103, Bandelin electronic, Berlin, D)
- Inkubation für 10 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zentrifugation für 15 min mit $14000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Abheben der oberen, wässrigen Phase
- Zugabe von 1 Vol Chisom, schütteln
- Zentrifugation für 10 min mit $14000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Abheben der oberen, wässrigen Phase
- Zugabe von 1 / 9 Vol Natriumacetatlösung und 2,5 Vol Ethanol
- Fällen der DNS für 60 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zentrifugation für 10 min mit $14000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Verwerfen des Überstandes

- Waschen der DNS mit 70%igem Ethanol
- Zentrifugation für 1 min mit 14000 x g bei RT
- Verwerfen des Überstandes
- Trocknen der DNS für 10 min in der Vakuumzentrifuge
- Aufnehmen der DNS in 100 µl H₂O_{reinst} und Lagerung bei -20 °C

4.4 DNS-Isolierung nach Zhou *et al.* (1996, mod.)

Lösungen und Verbrauchsmaterial

Extraktionspuffer:	100 mM Tris / HCl; pH 8,0 100 mM EDTA 100 mM Na ₃ PO ₄ 1,5 M NaCl 1% Cetyltrimethylammoniumbromid
Glasperlen:	170-180 µm (Braun, Melsungen, D)
Enzymmix 1:	10 mg / ml Lysozym 10 mg / ml Lipase Typ 7 10 mg / ml Pektinase 10 mg / ml β-Glucuronidase
Enzymmix 2:	10 mg / ml Proteinase K 10 mg / ml Protease Typ 9 10 mg / ml Pronase P
SDS-Lösung:	20% (w / v) Natriumdodecylsulfat
Phenol / Chloroform:	Roti [®] -Phenol / Chloroform (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D)
Isopropanol	
Ethanol	

Zellaufschluss und Reinigung der DNS

- Zentrifugation von 2 ml Probe für 5 min mit 14000 x g bei 4 °C
- Niederschlag in 675 µl Extraktionspuffer suspendieren
- [Optional: Zugabe von 700 µl Glasperlen und Inkubation für 5 min im Ultraschallbad]
- Zugabe von 50 µl Enzymmix 1 und Inkubation für 30 min bei 37 °C
- Zugabe von 50 µl Enzymmix 2 und Inkubation für 30 min bei 37 °C
- Zugabe von 75 µl SDS-Lösung und Inkubation für 120 min bei 65 °C
- Zugabe von 600 µl Phenol / Chloroform, schütteln
- Inkubation für 20 min bei 65 °C
- Zentrifugation für 10 min mit 14000 x g bei RT
- Abheben der oberen, wässrigen Phase
- Zugabe von 1 Vol Phenol / Chloroform, schütteln

- Zentrifugation für 10 min mit 14000 x g bei RT
- Abheben der oberen, wässrigen Phase
- Zugabe 0,6 Vol Isopropanol und Fällen der DNS für 60 min bei RT
- Zentrifugation für 20 min mit 14000 x g bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes
- Waschen der DNS mit eiskaltem 70%igem Ethanol
- Zentrifugation für 1 min mit 14000 x g bei RT
- Verwerfen des Überstandes
- Trocknen der DNS für 10 min in der Vakuumzentrifuge
- Aufnehmen der DNS in 100 µl H₂O_{reinst} und Lagerung bei –20 °C

4.5 DNS-Isolierung mit FastDNA™Kit MH / Beadbeating

Die DNS wurde nach Anleitung des Herstellers (Qbiogene, Heidelberg, D) aus den Proben isoliert.

5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die einzelnen Nukleotide der DNS haben ihre Absorptionsmaxima zwischen 253 nm und 271 nm (pH 7,0). Zur Konzentrationsbestimmung nach Clark und Switzer (1977) wurde ein Aliquot der DNS-Lösung in eine Quarzküvette überführt und in einem Spektralphotometer (Pharmacia, Freiburg, D) bei 260 nm vermessen.

Folgende Näherungswerte⁴ lagen der Konzentrationsbestimmung zugrunde:

Doppelsträngige (ds) DNS:	1 OD _{260nm} entspricht 50 µg / ml
Einzelsträngige (ss) DNS:	1 OD _{260nm} entspricht 33 µg / ml
Einzelsträngige (ss) RNS:	1 OD _{260nm} entspricht 40 µg / ml

Verunreinigungen können durch die Bestimmung der Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm und Bildung der Quotienten E_{260nm} / E_{230nm} und E_{260nm} / E_{280nm} festgestellt werden. Dabei gelten folgende Richtwerte (Marmur, 1961):

$$\boxed{\frac{E_{260nm}}{E_{230nm}} > 2,2} \text{ und } \boxed{\frac{E_{260nm}}{E_{280nm}} > 1,9}$$

⁴ <http://www.Eppendorf.com/katalog/katalog2000/german/deutschkap12.pdf>

Zur Berechnung der Konzentration von einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden die Werte aus Tab. B2 in Verbindung mit folgender Formel verwendet:

$$c = \frac{V_{\text{Mess}} \cdot \text{OD}_{260\text{nm}}}{V_{\text{Probe}} \cdot \epsilon \cdot d}$$

- c: Konzentration des Oligonukleotids [mM]
 V_{Mess} : Messvolumen [ml]
 V_{Probe} : Probenvolumen [ml]
d: Schichtdicke [cm]
 ϵ : Oligonukleotidspezifischer Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$];
berechnet aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Nukleotide (vgl. Tab. B2) des Oligonukleotids

Tabelle B2: Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der Desoxynukleotide⁵

Nukleotid	Extinktionskoeffizient bei 260 nm [$\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$]	Molekulargewicht [g / mol]
dAMP	15,20	312,2
dCMP	7,05	288,2
dGMP	12,01	328,2
dTMP	8,40	303,2

6 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld im Agarosegel nach Masse und Konformation (linear, offen zirkulär bzw. superhelikal) aufgetrennt. Durch Interkalation von Ethidiumbromid oder Anlagerung von SYBRGreen™ kann die DNS unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe, Reinheit oder Konzentration von Nukleinsäuren (chromosomale DNS, DNS-Amplifikate) verwendet. Zur Bestimmung der Größe und Menge der aufgetragenen DNS erfolgte ein visueller Vergleich der Banden mit einem mitgeführten Längenstandard bekannter Menge. Zu beachten ist dabei, dass das Mengenverhältnis von SYBRGreen™ zu DNS das Laufverhalten beeinflussen kann. Im Zweifelsfall wurde daher zur Abschätzung der Größe von Nukleinsäuren das Gel erst nach der Elektrophorese gefärbt.

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

100xTAE:	4,0 M Tris 2,0 M Eisessig 0,2 M EDTA; pH 8,0
Agarosegel:	1-2% Agarose (Gibco / BRL, Eggenstein, D) in 1xTAE aufschmelzen

⁵ <http://www.Eppendorf.com/katalog/katalog2000/german/deutschkap12.pdf>

Probenpuffer 1:	10 mM EDTA 5% (w / v) Ficoll (Sigma, Deisenhofen, D) 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 0,10% SYBRGreen™ (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA)
Probenpuffer 2:	10 mM EDTA 5% (w / v) Ficoll (Sigma, Deisenhofen, D) 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung:	1 µg / ml Ethidiumbromid
Standard:	1 µg 1-kb-Standard (Gibco / BRL, Eggenstein, D)
Apparatur:	Horizontalgelelektrophoreseapparatur Typ H3: 11 x 14 cm, 100 ml Gelvolumen (Gibco / BRL, Eggenstein, D)
Geldokumentation:	UV-Transilluminator, Wellenlänge: 302 nm (Bachofer, Reutlingen, D) Cybertech CS1 Image Dokumentation System (Cybertech, Berlin, D)

Elektrophorese mit SYBRGreen™ im Probenpuffer

- Probe bzw. Standard mit 1 Vol Probenpuffer 1 mischen, auf Agarosegel auftragen
- Elektrophorese in 1xTBE bei 90-120 mA (konstante Stromstärke)
- Dokumentation auf dem Transilluminator

Elektrophorese ohne SYBRGreen™ im Probenpuffer

- Probe bzw. Standard mit 1 Vol Probenpuffer 2 mischen, auf Agarosegel auftragen
- Elektrophorese in 1xTBE bei 90-120 mA (konstante Stromstärke)
- Gel 20 min in Ethidiumbromidlösung färben, anschließend mit Wasser spülen
- Dokumentation auf dem Transilluminator

7 Oligonukleotide für PCR- und Sequenziertechniken

In den folgenden Tabellen sind allgemeine PCR- und Sequenzierprimer aufgelistet, die nicht im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Fa. MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) synthetisiert und aufgereinigt.

Folgende Basensymbole wurden verwendet (IUB, Nomenclature Committee, 1985)

M = A oder C; **S** = C oder G; **V** = A oder C oder G; **B** = C oder G oder T;
R = A oder G; **Y** = C oder T; **H** = A oder C oder T; **N** = A oder C oder G oder T;
W = A oder T; **K** = G oder T; **D** = A oder G oder T;

Die Dissoziationstemperatur T_D wurde nach folgender Formel (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

$$T_D [^\circ\text{C}] = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (C + G)$$

A, C, G, T: Anzahl der entsprechenden Nukleotide

7.1 PCR-Primer

Tabelle B3: 16S-rRNS-spezifische Primer

Name	Position ⁶	Sequenz [5' → 3']	T_D [°C]	GC [%]
616V	8	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	58	45
630R	1529	CAK AAA GGA GGT GAT CC	50	47

V: Vorwärtsprimer (bindet an + bzw. kodierenden Strang)
R: Rückwärtsprimer (bindet an - bzw. nicht kodierenden Strang)

Tabelle B4: 23S-rRNS-spezifische Primer

Name	Position ⁶	Sequenz [5' → 3']	T_D [°C]	GC [%]
118V	115	CCG AAT GGG GRA ACC C	53	66
985R	2654	CCG GTC CTC TCG TAC T	52	63

V: Vorwärtsprimer (bindet an + bzw. kodierenden Strang)
R: Rückwärtsprimer (bindet an - bzw. nicht kodierenden Strang)

Tabelle B5: 5S-rRNS-spezifische Primer

Name	Position ⁶	Sequenz [5' → 3']	T_D [°C]	GC [%]
554LGCR	42	AGC TTA ACT KYG GTG TTC GG	56	40

R: Rückwärtsprimer (bindet an - bzw. nicht kodierenden Strang)

⁶ *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

7.2 Sequenzierprimer

Tabelle B6: 16S-rRNS-spezifische Primer, markiert mit IRDye™800 (vgl. B.9)

Name	Position ⁶	Sequenz [5' → 3']	T _D [°C]	GC [%]
97K	343	CTG CTG CCT CCC GTA	53	67
630R	1525	AAG GAG GTG ATC CAR CC	54	56

R: Rückwärtsprimer (bindet an - bzw. nicht kodierenden Strang)

Tabelle B7: 23S-rRNS-spezifische Primer, markiert mit IRDye™800 (vgl. B.9)

Name	Position ⁶	Sequenz [5' → 3']	T _D [°C]	GC [%]
328V	1923	TCC TAA GGT AGC GAA ATT CCT TC	59	43
335V	23	GGT GGA TGC CYW GGC	55	70
992R	457	TTC CCT CAC RGT ACT	46	50
992V	457	AGT ACC GTG AGG RAA	46	50
1019R	803	TTC GRR GAG AAC CAG CTA	54	50
1019V	803	TAG CTG GTT CTY YCC GAA	54	50
1027V	1608	AAA CCG ACA CAG GTR G	50	53
1036V	2492	TTG RYM CYT CGA TGT CG	52	53
1037R	1934	CTT ACC CGA CAA GGA ATT TCG	58	48

V: Vorwärtsprimer (bindet an + bzw. kodierenden Strang)

R: Rückwärtsprimer (bindet an - bzw. nicht kodierenden Strang)

8 *In vitro* Amplifikation und Markierung von DNS mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988)

8.1 Allgemeines

Die PCR ist ein enzymatisches Verfahren zur spezifischen Amplifikation definierter DNS-Abschnitte durch zyklische Wiederholung folgender Reaktionsschritte:

Denaturierung: Thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNS

Annealing: Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Zielsequenzen

Elongation: Verlängerung der Primer durch thermostabile Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) in 5'-3'-Richtung

Da die in einem Zyklus synthetisierten DNS-Stücke im nächsten Amplifikationszyklus wieder als Matrizen dienen, wird eine exponentielle Vervielfältigung ermöglicht. Nach 25 bis 35 Zyklen kann unter optimalen Bedingungen eine 10⁶-fache Amplifikation der von den Primern flankierten DNS-Region erreicht werden. Eine weitere Amplifikation ist auch durch Erhöhung der Zyklenzahl nicht möglich, da ab einer gewissen Konzentration an amplifizierter DNS das Amplifikationsplateau erreicht wird (Saiki *et al.*, 1988).

Die Annealingtemperatur richtet sich nach den verwendeten Primern. Als Anhaltspunkt dient die Dissoziationstemperatur (vgl. B.7), in der Praxis muss jedoch für jedes Primerpaar die optimale Annealingtemperatur empirisch gefunden werden (vgl. Tab. B8). Die Dauer der Elongationsphase richtet sich nach der Länge des Amplifikates und der verwendeten Polymerase (vgl. B.8.2).

Tabelle B8: Annealingtemperaturen ausgewählter Primerpaare

Primer 1	Primer 2	Annealingtemperatur [°C]
616V	554LGCR	56
616V	985R	52
616V	630R	50
118V	985R	52

8.2 PCR-Systeme

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Primus 96 Thermocycler (MWG-Biotech AG, Ebersberg, D) durchgeführt. Es wurden neben dem Enzym auch die Pufferlösung und die Nukleotidmische der jeweiligen Hersteller verwendet.

8.2.1 TaqPCR Core Kit™ (Qiagen, Hilden, D)

Reaktionsansatz

Reaktionspuffer (10x)	10 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 µl
Primer 1 (50 µM)	0,4 µl
Primer 2 (50 µM)	0,4 µl
DNS	1-100 ng
Taq	0,4 µl
H ₂ O _{reinst}	ad 100 µl

Temperaturprofil

Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	30
Annealing	x °C	1 min	
Elongation	72 °C	y min; Inkrement 5s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

x: vgl. z.B. Tab. B8

y: ca. 1 min pro 1,5 kb

8.2.2 Expand High Fidelity™ (Roche, Mannheim, D)

Dieses System eignet sich wegen vorhandener Korrekturlesefunktion gut für lange PCR-Fragmente.

Reaktionsansatz

Reaktionspuffer (10x)	10 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 µl
Primer 1 (50 µM)	0,4 µl
Primer 2 (50 µM)	0,4 µl
DNS	1-100 ng
Expand™	0,4 µl
H ₂ O _{reinst}	ad 100 µl

Temperaturprofil

Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	30
Annealing	x °C	1 min	
Elongation	68 °C	y min; Inkrement 5s	
Finale Elongation	68 °C	10 min	1

x: vgl. z.B. Tabelle B8
y: ca. 1 min pro 1,5 kb

8.2.3 Ex Taq™ (TaKaRa Shuzo Co., Otsu, J)

Dieses System eignet sich ebenfalls gut für lange PCR-Fragmente (>4 kb). Außerdem ist dieses System weniger anfällig gegenüber Hemmstoffen und eignet sich deshalb besonders gut für aus Umweltproben isolierte DNS.

Reaktionsansatz

Reaktionspuffer (10x)	10 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	8 µl
Primer 1 (50 µM)	0,4 µl
Primer 2 (50 µM)	0,4 µl
DNS	1-100 ng
Ex Taq™	0,4 µl
H ₂ O _{reinst}	ad 100 µl

Temperaturprofil (vgl. B.8.2.1)

8.3 Markierung der DNS während der PCR

Um markierte PCR-Amplifikate zu erhalten, wurden Nukleotidmische mit markierten Nukleotiden in der PCR eingesetzt. Die übrigen Bedingungen wurden nicht verändert.

8.3.1 Markierung mit Digoxigenin (DIG)

Zur Markierung mit Digoxigenin wurde DIG-11-dUTP (Roche, Mannheim, D) mit unmarkiertem dTTP im Verhältnis 1:19 in der PCR eingesetzt. Damit ergeben sich für die einzelnen Nukleotide im fertigen PCR-Ansatz folgende Konzentrationen:

200 µM dATP
200 µM dCTP
200 µM dGTP
190 µM dTTP
10 µM DIG-11-dUTP

8.3.2 Markierung mit Fluorescein (FLUOS)

Zur Markierung mit Fluorescein (Absorptionsmaximum: 494 nm; Emissionsmaximum: 520 nm) wurde FLUOS-12-dUTP (Roche, Mannheim, D) mit unmarkiertem dTTP im Verhältnis 3:7 in der PCR eingesetzt. Damit ergeben sich für die einzelnen Nukleotide im fertigen PCR-Ansatz folgende Konzentrationen:

50 µM dATP
50 µM dCTP
50 µM dGTP
35 µM dTTP
15 µM FLUOS-12-dUTP

8.3.3 Markierung mit Cy3 bzw. Cy5

Zur Markierung mit Cy3 (5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarboxyanin; Absorptionsmaximum: 550 nm; Emissionsmaximum: 570 nm) bzw. Cy5 (Cy3-Derivat; Absorptionsmaximum: 649 nm; Emissionsmaximum: 670 nm) wurde Cy-dUTP (Amersham, Little Chalfont, GB) mit unmarkiertem dTTP in verschiedenen Verhältnissen in der PCR eingesetzt. Dabei hat sich das Verhältnis 1:1 am besten bewährt (vgl. C.4.3.1) Damit ergeben sich für die einzelnen Nukleotide im fertigen PCR-Ansatz folgende Konzentrationen:

50 µM dATP
50 µM dCTP
50 µM dGTP
25 µM dTTP
25 µM Cy-dUTP

8.3.4 Markierung mit Biotin

Zur Markierung mit Biotin wurde Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim, D) mit unmarkiertem dTTP im Verhältnis 7:13 in der PCR eingesetzt. Damit ergeben sich für die einzelnen Nukleotide im fertigen PCR-Ansatz folgende Konzentrationen:

50,0 µM dATP
 50,0 µM dCTP
 50,0 µM dGTP
 32,5 µM dTTP
 17,5 µM Biotin-16-dUTP

8.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach der PCR wurden die Amplifikate mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

9 Sequenzanalyse von DNS

Die DNS-Sequenzanalyse erfolgte mittels linearer Amplifikationssequenzierung („Cycle-Sequencing“) (Murray, 1989). Dabei handelt es sich um eine Kombination der enzymatischen Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und einer PCR-Amplifizierung (Saiki *et al.*, 1988) unter Verwendung von IR-markierten Primern. Didesoxynukleotide (ddNTPs) sorgen für die notwendigen Kettenabbrüche bei der Sequenzierreaktion. Als Enzym für die Amplifikation wurde die ThermoSequenase™ (Amersham, Little Chalfont, GB) eingesetzt. Dieses Enzym diskriminiert kaum zwischen dNTPs und ddNTPs (Tabor und Richardson, 1995) und baut ddNTPs ca. 1000 mal besser ein als z.B. die *Taq*-Polymerase (Reeve und Fuller, 1995). Als Farbstoff diente IRDye™800 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D) mit einem Absorptionsmaximum bei 787 nm und einem Emissionsmaximum bei 812 nm.

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion wurden die Fragmente im Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Laser online detektiert.

9.1 Sequenzierreaktion

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Sequenzierkit:	ThermoSequenase™ fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham, Little Chalfont, GB)
Primer:	5 µM IR-markiert (vgl. B.7.2)

Stopppuffer:	95% Formamid 20 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau
Mikrotiterplatte:	Polycarbonat, V-Boden (Biozym, Hess. Oldendorf, D)
Klebefolie:	Microseal™ ,A'-Film (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)
Thermocycler:	Typ PTC-100™ (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)

Durchführung

- 800 ng DNS mit 5 pmol Primer versetzen und auf 24 µl mit H₂O_{reinst} auffüllen
- Ansatz auf vier Kavitäten einer Mikrotiterplatte verteilen
- Zugabe von 2 µl A- bzw. C- bzw. G- bzw. T-Reagenz (enthält Puffer, Enzym, dNTPs und das entsprechende ddNTP)
- Verschließen der Mikrotiterplatte mit Klebefolie
- Durchführung der Reaktion im Thermocycler nach folgendem Programm:

Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	25
Annealing / Elongation	45 °C	30 s	
Finale Elongation	45 °C	10 min	1
Kühlung	4 °C	2 min	1

- Anschließend Zugabe von 4 µl Stopppuffer
- Kurz vor dem Auftragen 5 min bei 94 °C denaturieren

9.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (1xTBE):	134 mM Tris 44,5 mM Borsäure 2,5 mM EDTA; pH 8,0
Harnstoff	
Sequagel XR:	(National Diagnostics, Hull, GB)
Sequagel Complete:	(National Diagnostics, Hull, GB)
APS-Lösung:	10% (w / w) Ammoniumpersulfat (Aliquots bei -20 °C lagern)
TEMED:	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
Glasplatten:	66 cm (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Spacer:	0,2 mm (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Kamm:	0,2 mm (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)

Sequenzierapparatur:	LI-COR dna sequencer model 4000L (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Software:	LI-COR Base ImagIR™, Image Analysis 4.0h (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)

Durchführung

- 6 g Harnstoff in 1,5 ml 10xTBE und 11,3 ml H₂O_{reinst} lösen
- Zugabe von 24 ml Sequagel XR, 6 ml Sequagel Complete, 300 µl APS-Lösung und 15 µl TEMED
- Lösung sterilfiltrieren und Gel nach Herstellerangaben gießen
- 1,5 h polymerisieren lassen
- Gel in Sequenzierapparatur einhängen, Pufferbecken mit 1xTBE füllen und Vorlauf starten (2000 V, 25 mA, 45 W, 45 °C)
- Probenauftrag nach Erreichen einer Geltemperatur von 45 °C
- Elektrophorese (2000 V, 25 mA, 45 W, 45 °C)
- Ende des Gellaufs nach ca. 10 h
- Auswertung der Sequenziergele mit o.g. Software

10 Auswertung der Sequenzdaten und Sondenkonstruktion

10.1 Alignmenterstellung

Die Ermittlung phylogenetischer Verhältnisse erfordert das Einordnen der Sequenzen in ein Alignment. Das heißt die Sequenzen werden so angeordnet, dass sich homologe Positionen an denselben Stellen des Alignments befinden. In variablen Sequenzbereichen des Alignments dienen Sekundärstrukturanalysen oder kleine Gruppen konservativer Basenfolgen als Orientierung bei der Bestimmung homologer Positionen. Das Einordnen der Sequenzen in das bestehende Alignment erfolgte mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes (Ludwig und Strunk, 1996).

10.2 Stammbaumrekonstruktion

Die Darstellung von phylogenetischen Verwandtschaften erfolgt meist in Form von Stammbäumen. Mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes lassen sich durch Erstellen und Anwenden von Filtern die zur Stammbaumrekonstruktion benötigten Alignmentpositionen auswählen und Stammbäume nach der Maximum-Parsimony-Methode rekonstruieren. Die Topologie der Bäume wurde durch die Maximum-Likelihood-Methode und die Neighbor-Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) überprüft und ggf. korrigiert. Die Matrix der paarweisen Distanzwerte, die als Grundlage der Stammbaumrekonstruktion nach der Neighbor-Joining-Methode dient, wurde ebenfalls

mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes unter Berücksichtigung des Verfahrens nach Jukes und Cantor (1969) erstellt. Referenzsequenzen wurden den aktuellen ARB-Sequenzdatenbanken⁷ und anderen Datenbanken (Maidak *et al.*, 1999; De Rijk *et al.*, 2000) entnommen.

Teilsequenzen wurden in das Alignment der vollständigen Sequenzen an den entsprechenden Positionen eingefügt. Das ARB-Softwarepaket erlaubt das Verrechnen dieser Teilsequenzen mit dem gesamten Datensatz nach der Parsimony-Methode. Dabei werden sie an den Stellen des bestehenden Baumes integriert, an denen ihre nächstverwandten Sequenzen zu finden sind. Der Baum selbst wird nicht neu aufgebaut.

10.3 Sondenkonstruktion

Die Sonden wurden ebenfalls mit Hilfe des ARB-Softwarepaketes und der jeweils aktuellen ARB-Sequenzdatenbanken⁷ konstruiert. Die momentan zur Verfügung stehenden Datensätze umfassen ca. 30.000 Sequenzen im 16S- und ca. 5.000 Sequenzen im 23S-rRNS-Datensatz. Aus den konstruierten Sonden erfolgte eine Auswahl nach den Kriterien GC-Gehalt und Lage innerhalb des rDNS-Operons. Außerdem wurde jedes Oligonukleotid mit DNS geeigneter Referenzorganismen auf seine Tauglichkeit in der Praxis überprüft.

⁷ <http://www.arb-home.de>

11 Reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte

Bei der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte wird die Sonde in der Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend mit der markierten Proben-DNS hybridisiert. Das Prinzip ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

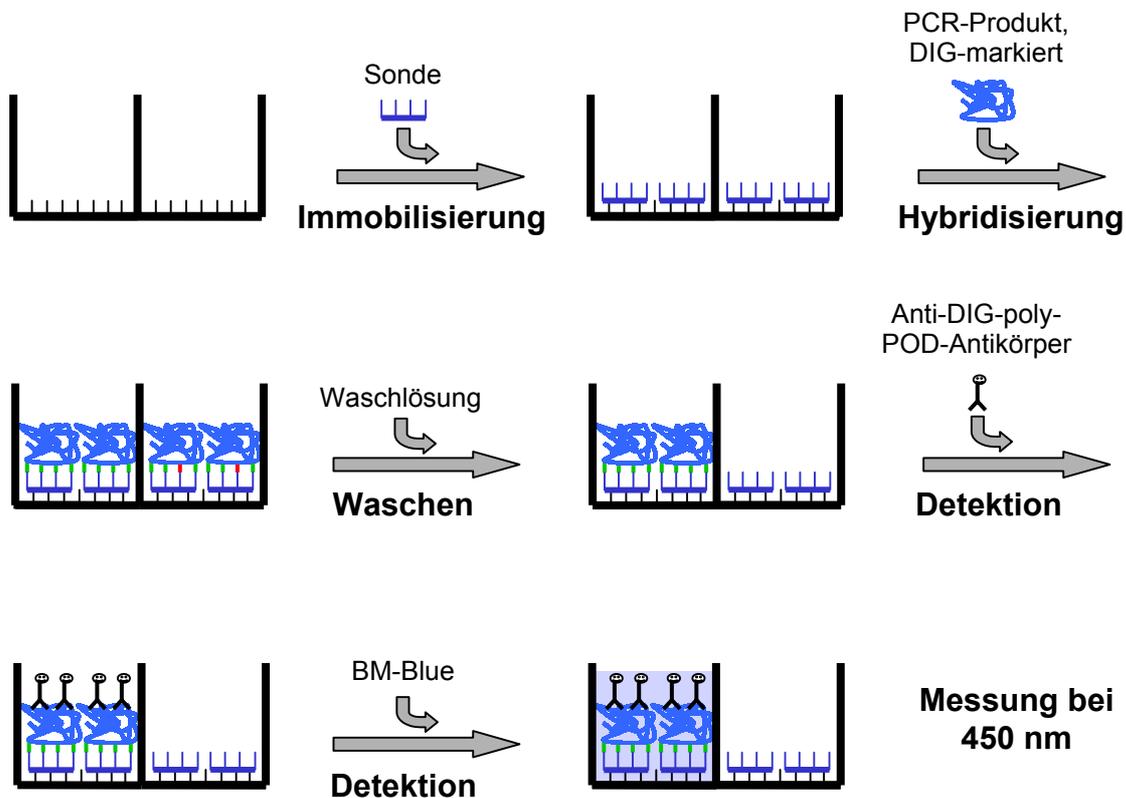


Abbildung B1: Schema der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte unter Verwendung DIG-markierter PCR-Produkte (grüne Striche: AT-, bzw. GC-Paarung; rote Striche: Fehlpaarung zwischen Sonde und PCR-Produkt)

11.1 System 1a: Reverse Hybridisierung ohne Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) (Koob, 1997, mod.)

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Mikrotiterplatte:	MaxiSorp™ (NUNC, Roskilde, DK)
Sondenlösung:	10 µM Sonde
PCR-Produkt:	DIG-markiert
EDC-Lösung:	10 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Lösung frisch herstellen!
Tris-Waschlösung:	10 mM Tris / HCl; pH 7,5 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
Blockingstammlösung:	10% Blockingreagenz (Roche, Mannheim, D) (Herstellung nach Firmenangaben)

Hybridisierungslösung:	5x SSC (vgl. B.4.1) 1% Blockingreagenz (= 10% Blockingstammlösung) 0,1% N-Laurylsarkosin 0,02% SDS 0-30% Formamid (je nach erforderlicher Stringenz)
Waschlösung:	2x SSC (vgl. B.4.1) 0,1% SDS 0-30% Formamid (je nach erforderlicher Stringenz)
PBS:	130 mM NaCl 10 mM $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ (0,2 M Na_2HPO_4 mit 0,2 M NaH_2PO_4 auf pH 7,2 eingestellt)
Blocking-PBS:	1% Blockingreagenz in PBS (Blockingstammlösung mit PBS 1:10 verdünnen)
Anti-DIG-poly-POD-Lösung:	Anti-DIG-poly-POD-Konjugat 1:1000 mit Blocking-PBS verdünnen
BM-Blue:	(Roche, Mannheim, D)
Stopplösung:	1 M Schwefelsäure
Thermomix:	iEMS Incubator / Shaker HT (Labsystems, Helsinki, SF)
Mikrotiterplatten-Washer:	Wellwash Ascent (Labsystems, Helsinki, SF)
Photometer:	Emax™ precision microplate reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA)

Immobilisierung (Nikiforov und Rogers, 1995)

- 100 µl EDC-Lösung mit 1-2 µl Sondenlösung mischen und in Kavität pipettieren
- Inkubation ÜN bei 37 °C im Thermomix
- 3x Waschen mit je 200 µl Tris-Waschlösung bei RT im Mikrotiterplatten-Washer [Beim Waschen von Hand und Ausklopfen der Mikrotiterplatte sind 100 µl ausreichend]

Prähybridisierung

- Inkubation mit 50 µl Hybridisierungslösung für 30-60 min bei 37 °C im Thermomix

Hybridisierung

- Denaturierung des PCR-Produktes (vgl. B.11.4)
- Inkubation für 120 min bei 37 °C im Thermomix

Waschen

- 3x Waschen mit je 100 µl Waschlösung für 10 min bei 37 °C im Thermomix

Detektion

- Waschen mit 200 µl PBS bei RT im Mikrotiterplatten-Washer [Beim Waschen von Hand und Ausklopfen der Mikrotiterplatte sind 100 µl ausreichend]
- Inkubation mit 100 µl Blocking-PBS für 15 min bei RT
- Inkubation mit 100 µl Anti-DIG-poly-POD-Lösung für 30 min bei RT
- 2x Waschen mit je 200 µl PBS bei RT im Mikrotiterplatten-Washer [Beim Waschen von Hand und Ausklopfen der Mikrotiterplatte sind 100 µl ausreichend]
- Inkubation mit 100 µl BM-Blue für 30 min bei RT
- Zugabe von 100 µl Stopplösung (Abstoppen der Reaktion)
- Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm)

11.2 System 2: Reverse Hybridisierung mit TMACI in der Waschlösung (Koob, 1997, mod.)

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Mikrotiterplatte:	vgl. B.11.1
Sondenlösung:	vgl. B.11.1
PCR-Produkt:	vgl. B.11.1
EDC-Lösung:	vgl. B.11.1
Tris-Waschlösung:	vgl. B.11.1
Blockingstammlösung:	vgl. B.11.1
Hybridisierungslösung:	vgl. B.11.1
TMACI-Waschlösung:	50 mM Tris / HCl; pH 7,5 2 mM EDTA 0,1% SDS 3 M Tetramethylammoniumchlorid (TMACI) 0-30% Formamid (je nach erforderlicher Stringenz)
PBS:	vgl. B.11.1
Blocking-PBS:	vgl. B.11.1
Anti-DIG-poly-POD-Lösung:	vgl. B.11.1
BM-Blue:	vgl. B.11.1
Stopplösung:	vgl. B.11.1
Thermomix:	vgl. B.11.1
Mikrotiterplatten-Washer:	vgl. B.11.1
Photometer:	vgl. B.11.1

Immobilisierung (vgl. B.11.1)

Prähybridisierung (vgl. B.11.1)

Hybridisierung (vgl. B.11.1)

Waschen

- 3x Waschen mit je 100 µl TMACI-Waschlösung für 10 min bei 37 °C im Thermomix

Detektion (vgl. B.11.1)

11.3 System 3: Reverse Hybridisierung mit TMACI in Hybridisierungs- und Waschlösung (Graf, 1998, mod.)

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Mikrotiterplatte:	vgl. B.11.1
Sondenlösung:	vgl. B.11.1
PCR-Produkt:	vgl. B.11.1
EDC-Lösung:	vgl. B.11.1
Tris-Waschlösung:	vgl. B.11.1
Blockingstammlösung:	vgl. B.11.1
TMACI-Hybridisierungslösung:	50 mM Tris / HCl; pH 7,5 2 mM EDTA 0,1% SDS 3 M Tetramethylammoniumchlorid (TMACI) 0-30% Formamid (je nach erforderlicher Stringenz) 1% Blockingreagenz (Roche, Mannheim, D)
TMACI-Waschlösung:	vgl. B.11.2
PBS:	vgl. B.11.1
Blocking-PBS:	vgl. B.11.1
Anti-DIG-poly-POD-Lösung:	vgl. B.11.1
BM-Blue:	vgl. B.11.1
Stopplösung:	vgl. B.11.1
Thermomix:	vgl. B.11.1
Mikrotiterplatten-Washer:	vgl. B.11.1
Photometer:	vgl. B.11.1

Immobilisierung (vgl. B.11.1)

Prähybridisierung

- Inkubation mit 50 µl TMACI-Hybridisierungslösung für 30-60 min bei 37 °C im Thermomix

Hybridisierung

- Denaturierung des PCR-Produktes (vgl. B.11.4)
- Inkubation für 120 min bei 37 °C im Thermomix

Waschen (vgl. B.11.2)

Detektion (vgl. B.11.1)

11.4 Denaturierung der Amplifikate

11.4.1 Thermische Denaturierung

- PCR-Produkt für 10 min bei 98 °C im Wasserbad denaturieren
- 1-3 µl PCR-Produkt (ca. 200 ng) mit 50 µl eiskalter (0 °C) Hybridisierungslösung mischen
- In die Kavität füllen

11.4.2 Alkalische Denaturierung

- PCR-Produkt mit 1 Vol Natronlauge (200 mM) mischen
- Inkubation für 5 min bei RT
- 1-3 µl PCR-Produkt (ca. 200 ng) mit 50 µl Hybridisierungslösung mischen
- In die Kavität füllen

11.4.3 Thermische Denaturierung in der Mikrotiterplatte

- 1-3 µl PCR-Produkt (ca. 200 ng) mit 50 µl Hybridisierungslösung mischen
- In die Kavität füllen
- Inkubation für 10-60 min bei 100 °C im Hybridisierungssofen

12 Reverse Hybridisierung auf DNS-Chips

Bei der reversen Hybridisierung auf DNS-Chips wird die Sonde analog der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte auf der Oberfläche des Objektträgers immobilisiert und anschließend mit der markierten Proben-DNS hybridisiert. Das Prinzip ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

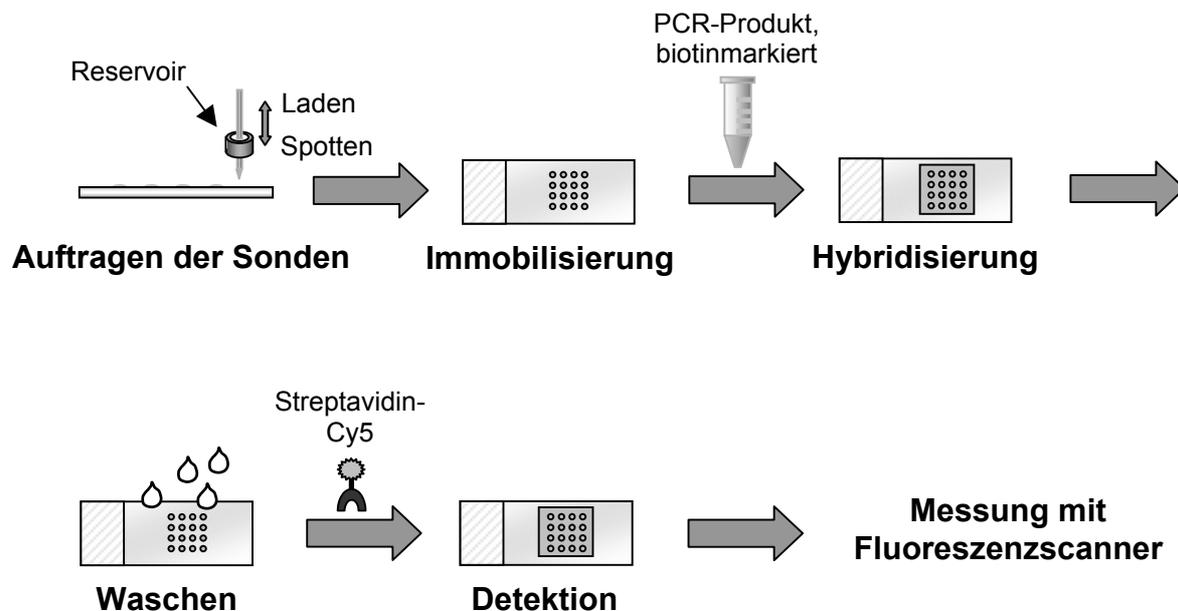


Abbildung B2: Schema der reversen Hybridisierung auf DNS-Chips unter Verwendung biotinmarkierter PCR-Produkte

12.1 System 1b: Reverse Hybridisierung ohne TMACl (Anonym, 2000, mod.)

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Objektträger (OT):	ArrayIt™ SuperAldehyde (TeleChem International Inc., Sunnyvale, CA, USA) oder CSS Silylated Slides (Aldehyde) (CEL Associates Inc., Pearland, TX, USA)
Deckglas:	20 x 20 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen, D)
Sondenlösung:	50 µM Sonde, 0-36 T am 5'-Ende, 5'-Aminomod. 50% Dimethylsulfoxid (DMSO)
SDS-Lösung:	0,2% Natriumdodecylsulfat
Natriumborhydridlösung:	65,6 mM NaBH ₄ 75% (v:v) PBS (vgl. B.11.1) 25% (v:v) Ethanol Lösung frisch herstellen!
PCR-Produkt:	cy- oder biotinmarkiert
Blockingstammlösung:	vgl. B.11.1

Denhardtlösung (50x):	1% (w / v) Ficoll 400 (Serva, Heidelberg, D) 1% (w / v) Polyvinylpyrrolidon (Merck, Darmstadt, D) 1% (w / v) Rinderserumalbumin (Sigma, Deisenhofen, D) Lagerung in Aliquots bei -20 °C
Hybridisierungslösung:	6x SSC (vgl. B.4.1) 5x Denhardtlösung 50 mM Natriumphosphat; pH 8,0 0,5% SDS 0-30% Formamid (je nach erforderlicher Stringenz)
Waschlösung 1:	2x SSC (vgl. B.4.1) 0,1% SDS
Waschlösung 2:	1x SSC (vgl. B.4.1)
Waschlösung 3:	0,5x SSC (vgl. B.4.1)
PBS:	vgl. B.11.1
Blocking-PBS:	vgl. B.11.1
Streptavidin-Cy5-Lösung:	Streptavidin-Cy5 1:1000 mit Blocking-PBS verdünnen
Hybridisierungskammer:	(MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Thermocycler:	Primus 96 (MWG-Biotech AG, Ebersberg, D)
Arrayer:	GMS 417 Arrayer (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Scanner:	GMS 418 Array Scanner (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, D)
Software:	ImaGene™ v4.0 (BioDiscovery Inc., Marina del Rey, CA, USA)

Spotten der Oligonukleotide

- Je 30-50 µl Sondenlösung in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettieren (Vorratsbehälter für die zu spottenden Sonden)
- Spotten der Sonden auf die Objektträger, 3-5 „Hits per dot“
- Inkubation ÜN bei RT

Reduktion der Aldehydgruppen auf dem Objektträger

- Inkubation der OT in SDS-Lösung für 2 min bei RT unter Schütteln
- 2x Waschen mit H₂O_{reinst} für je 1 min bei RT unter Schütteln
- Inkubation in Natriumborhydridlösung für 5 min bei RT
- Waschen mit eiskaltem H₂O_{reinst} für 1 min
- Inkubation in SDS-Lösung für 1 min bei RT
- 2x Waschen mit H₂O_{reinst} für je 1 min bei RT
- Trocknen lassen

Hybridisierung

- PCR-Produkt (ca. 2 µg) bis zur Trockene einrotieren
- Rückstand in 15 µl Hybridisierungslösung aufnehmen, 10 min lösen
- Denaturierung für 10 min bei 98 °C im Thermocycler
- Auf Objektträger pipettieren und Deckglas auflegen
- 100 µl H₂O_{reinst} in die Hybridisierungskammer pipettieren und verschließen
- Inkubation im Wasserbad ÜN bei 37 °C

Waschen

- Waschen mit Waschlösung 1 für 5 min bei RT, OT dabei mehrmals schwenken
- Waschen mit Waschlösung 2 für 5 min bei RT, OT dabei mehrmals schwenken
- Waschen mit Waschlösung 3 für 5 min bei RT, OT dabei mehrmals schwenken
- Abzentrifugieren des Objektträgers im 50 ml Probengefäß (Greiner, Solingen, D) mit 200 x g für 2 min bei RT

Detektion bei Verwendung Cy-markierter PCR-Produkte

- Messung im Scanner mit grünem Laser (532 nm) bei Cy3-Markierung
- Messung im Scanner mit rotem Laser (635 nm) bei Cy5-Markierung
- Auswertung mittels ImaGene™-Software

Detektion bei Verwendung biotinmarkierter PCR-Produkte

- 15 µl Streptavidin-Cy5-Lösung auf den OT pipettieren und Deckglas auflegen
- Hybridisierungskammer verschließen
- Inkubation für 30 min bei RT
- 2x Waschen mit PBS bei RT
- Abzentrifugieren des Objektträgers im 50 ml Probengefäß (Greiner, Solingen, D) mit 200 x g für 2 min bei RT
- Messung im Scanner mit rotem Laser (635 nm)
- Auswertung mittels ImaGene™-Software

12.2 System 2: Reverse Hybridisierung mit TMACI in der Waschlösung

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Objektträger (OT):	vgl. B.12.1
Deckglas:	vgl. B.12.1
Sondenlösung:	vgl. B.12.1
SDS-Lösung:	vgl. B.12.1
Natriumborhydridlösung:	vgl. B.12.1
PCR-Produkt:	vgl. B.12.1
Blockingstammlösung:	vgl. B.11.1
Hybridisierungslösung:	vgl. B.11.1
TMACI-Waschlösung:	vgl. B.11.2
PBS:	vgl. B.11.1
Blocking-PBS:	vgl. B.11.1
Streptavidin-Cy5-Lösung:	vgl. B.12.1
Hybridisierungskammer:	vgl. B.12.1
Thermocycler:	vgl. B.12.1
Arrayer:	vgl. B.12.1
Scanner:	vgl. B.12.1
Software:	vgl. B.12.1

Spotten der Oligonukleotide (vgl. B.12.1)

Reduktion der Aldehydgruppen auf dem Objektträger (vgl. B.12.1)

Hybridisierung

- PCR-Produkt (ca. 2 µg) bis zur Trockene einrotieren
- Rückstand in 15 µl Hybridisierungslösung aufnehmen, 10 min lösen
- Denaturierung für 10 min bei 98 °C im Thermocycler
- Auf Objektträger pipettieren und Deckglas auflegen
- 100 µl H₂O_{reinst} in die Hybridisierungskammer pipettieren und verschließen
- Inkubation im Wasserbad ÜN bei 37 °C

Waschen

- Waschen mit TMACI-Waschlösung für 10 min bei 45-60 °C (vgl. C.4.2)
- Während dieser Zeit OT mehrmals schwenken
- 2x Waschen mit PBS bei RT
- Abzentrifugieren des Objektträgers im 50 ml Probengefäß (Greiner, Solingen, D) mit 200 x g für 2 min bei RT

Detektion (vgl. B.12.1)

12.3 System 3: Reverse Hybridisierung mit TMAcI in Hybridisierungs- und Waschlösung

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

Objektträger (OT):	vgl. B.12.1
Deckglas:	vgl. B.12.1
Sondenlösung:	vgl. B.12.1
SDS-Lösung:	vgl. B.12.1
Natriumborhydridlösung:	vgl. B.12.1
PCR-Produkt:	vgl. B.12.1
Blockingstammlösung:	vgl. B.11.1
TMAcI-Hybridisierungslösung:	vgl. B.11.3
TMAcI-Waschlösung:	vgl. B.11.2
PBS:	vgl. B.11.1
Blocking-PBS:	vgl. B.11.1
Streptavidin-Cy5-Lösung:	vgl. B.12.1
Hybridisierungskammer:	vgl. B.12.1
Thermocycler:	vgl. B.12.1
Arrayer:	vgl. B.12.1
Scanner:	vgl. B.12.1
Software:	vgl. B.12.1

Spotten der Oligonukleotide (vgl. B.12.1)

Reduzieren der Oberfläche der Objektträger (vgl. B.12.1)

Hybridisierung

- PCR-Produkt (ca. 2 µg) bis zur Trockene einrotieren
- Rückstand in 15 µl TMAcI-Hybridisierungslösung aufnehmen, 10 min lösen
- Denaturierung für 10 min bei 98 °C im Thermocycler
- Auf Objektträger pipettieren und Deckglas auflegen
- 100 µl H₂O_{reinst} in die Hybridisierungskammer pipettieren und verschließen
- Inkubation im Wasserbad ÜN bei 37 °C

Waschen (vgl. B.12.2)

Detektion (vgl. B.12.1)

13 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) (Manz *et al.*, 1992, mod.)

Lösungen, Verbrauchsmaterial und Geräte

PFA-Lösung:	4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (PFA in H ₂ O _{reinst} durch Erhitzen und Zugabe von NaOH lösen, mit 3xPBS bis zu einer Endkonzentration von 1xPBS versetzen, pH auf 7,2 einstellen und sterilfiltrieren)
Objektträger (OT):	10 Aussparungen (Nr.: 12164201) (Marienfeld, Lauda-Königshofen, D)
Deckglas:	(Marienfeld, Lauda-Königshofen, D)
Sondenlösung:	5 µM Sonde, am 5'-Ende Cy3-markiert
Ethanol	
Hybridisierungspuffer:	20 mM Tris / HCl; pH 8,0 0,01% SDS 900 mM NaCl x% Formamid ⁸ (je nach erforderlicher Stringenz)
Waschpuffer:	20 mM Tris / HCl; pH 8,0 0,01% SDS y mM NaCl ⁸ z mM EDTA ⁸
PBS:	vgl. B.11.1
Citifluor AF1	(Citifluor Ltd., London, GB)
Mikroskop:	Axioplan Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, D)
Objektive:	Plan-Neofluar-Objektive (Zeiss, Oberkochen, D)
Filter:	Anregungsfilter: HQ 545 / 30 Strahlenteiler: Q 565 LP Sperrfilter: HQ 610 / 75 (AHF analysentechnik AG, Tübingen, D)
Automatische Kamera:	MC 100 (Zeiss, Oberkochen, D)
Film:	Ektachrome P1600x (Kodak, Stuttgart, D)

⁸ vgl. Tab. B9

Tabelle B9: Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer und zugehörige Salz- und EDTA-Konzentrationen im Waschpuffer bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Hybridisierungspuffer	Waschpuffer	
	x% Formamid	y mM NaCl
0	900	0
5	636	0
10	450	0
15	318	0
20	225	5
25	159	5
30	112	5
35	80	5
40	56	5
45	40	5
50	28	5
55	20	5
60	14	5
65	10	5

Zellfixierung

- Zellsuspension mit 3 Vol PFA-Lösung mischen
- Inkubation für 0,5-16 h bei 4 °C
- Zentrifugation mit 14000 x g für 5 min bei RT
- Niederschlag mit PBS waschen, erneut abzentrifugieren
- In PBS resuspendieren und mit 1 Vol Ethanol mischen
- Bei -20 °C lagern

Hybridisierung

- Fixierte Zellen auf die Felder des Objektträgers pipettieren und bei 46 °C trocknen
- Objektträger zur Dehydratisierung und Nachfixierung der Zellen je 3 min in 50%igen, 80%igen und 96%igen Ethanol tauchen (aufsteigende Ethanolreihe)
- Nach Trocknung des Objektträgers auf jedes Feld 8 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl Sondenlösung pipettieren und vermischen
- Zellstoff mit Hybridisierungspuffer befeuchten und mit dem Objektträger in ein 50 ml Probengefäß (Greiner, Solingen, D) legen
- Gefäß verschließen und für 120 min bei 46 °C inkubieren
- Objektträger mit Waschpuffer (48 °C) abspülen und in 50 ml Waschpuffer für 15 min bei 48 °C inkubieren
- Mit H₂O_{dest.} spülen, abschütteln und lufttrocknen

Detektion

- Proben in Citifluor einbetten und Deckglas auflegen
- Dokumentation mittels Fluoreszenzmikroskopie und automatischer Kamera

14 Analyse von Speiseeisproben

Lösungen und Verbrauchsmaterial

BHI:	vgl. B.2
Puffer 1:	100 mM Na ₂ HPO ₄ 150 mM NaCl 10 mM EDTA 40 mM NaOH
PBS:	vgl. B.11.1
OAA-Agar:	vgl. B.2

Durchführung

- 25 ml Speiseeis mit 25 ml BHI versetzen
- Inkubation ohne Schütteln für 16 h bei 37 °C
- Zugabe von 1 Vol Puffer 1 und Inkubation für 10 min bei RT
- Zentrifugation für 8 min mit 8000 x g bei RT
- Überständiges Fett steril abnehmen (Wattestäbchen)
- Niederschlag in 25 ml Puffer 1 aufnehmen, erneut abzentrifugieren
- Diesen Vorgang 3x wiederholen
- Niederschlag in 200 µl PBS suspendieren
- 100 µl der Suspension auf OAA-Agar ausstreichen
- Aus den restlichen 100 µl der Suspension DNS isolieren (vgl. B.4.2) und PCR (vgl. B.8) und Hybridisierung (vgl. B.11 oder B.12) durchführen

C ERGEBNISSE

1 Sequenzanalyse ribosomaler DNS

Die für die phylogenetischen Untersuchungen und zur Konstruktion von Sonden notwendigen Daten wurden durch Sequenzanalyse ermittelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Vervollständigung der Datenbank die 23S-rRNS Gene von *Enterococcus asini* DSM 11492^T, *Enterococcus pseudoavium* DSM 5632^T, *Enterococcus durans* DSM 20633^T und *Enterococcus hirae* DSM 20160^T sequenziert.

Dazu wurde die DNS isoliert (vgl. B.4.2), die 23S-rDNS inklusive der benachbarten Regionen mit den Primern 616V und 554LGC amplifiziert (vgl. B.8) und sequenziert (vgl. B.9). Die erhaltenen Sequenzen wurden, nach Einfügen in das Alignment (vgl. B.10.1), zusammen mit den bereits in der Datenbank vorhandenen Sequenzen, insbesondere der Sequenzen der übrigen Enterokokken, für phylogenetische Analysen (vgl. B.10.2) und zur Konstruktion von Sonden (vgl. B.10.3) verwendet. Die Sequenzen sind im Anhang wiedergegeben.

Aus den phylogenetischen Untersuchungen ergab sich für die 16S- und 23S-rRNS eine Ähnlichkeitsmatrix (vgl. Tab. C1) mit Sequenzähnlichkeiten zwischen 89,9% (*E. columbae* – *E. solitarius*) und 99,5% (*E. casseliflavus* – *E. gallinarum*) bei der 16S-rRNS und zwischen 88,9% (*T. halophilus* - *M. pluton*) und 99,9% (*E. casseliflavus* – *E. flavescens*) bei der 23S-rRNS. Die rekonstruierten Stammbäume (vgl. Abb. D1) werden in D.1 gegenübergestellt und diskutiert.

Tabelle C1: rRNS-Sequenzähnlichkeiten von Arten der Gattungen *Enterococcus*, *Tetragenococcus* und *Melissococcus*; Ähnlichkeitswerte der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Typstämme im Fettdruck

	16S-rRNS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	<i>E. asini</i>	100	97,0	96,6	95,4	94,4	96,9	96,9	95,0	96,2	96,2	96,8	96,5	96,2	96,4	97,0	96,7	95,6	90,6	94,9	93,2	91,6	1
2	<i>E. avium</i>	94,9	100	98,3	97,0	95,1	97,0	98,4	95,7	97,5	98,0	98,4	98,2	98,5	97,9	99,1	99,1	96,6	91,3	96,5	94,2	92,3	2
3	<i>E. casseliflavus</i>	97,0	95,9	100	96,9	95,2	97,2	97,5	95,9	96,8	99,2	99,5	97,2	97,8	97,0	98,2	98,0	97,2	91,9	96,5	94,7	93,1	3
4	<i>E. cecorum</i>	94,7	94,3	95,1	100	96,3	96,1	95,8	94,4	94,9	96,7	97,1	95,8	96,1	95,7	96,6	96,7	96,0	90,8	95,9	92,9	91,6	4
5	<i>E. columbae</i>	95,1	94,6	95,4	97,8	100	94,7	94,2	92,9	93,7	94,8	95,4	93,9	94,4	93,9	94,5	94,7	94,5	89,9	93,7	92,4	91,0	5
6	<i>E. dispar</i>	96,6	95,7	96,9	95,2	95,7	100	97,1	95,0	96,3	97,1	97,4	96,8	96,5	96,7	97,0	96,7	96,3	91,1	95,5	93,8	91,9	6
7	<i>E. durans</i>	95,8	95,9	97,0	95,1	95,2	96,9	100	96,1	98,3	97,2	97,8	99,3	97,7	98,8	98,6	98,2	96,2	91,2	95,7	94,4	91,9	7
8	<i>E. faecalis</i>	93,4	94,8	94,5	93,6	93,9	94,5	95,6	100	95,1	95,5	96,0	95,9	95,1	95,6	95,6	95,3	95,2	91,5	94,8	94,2	92,5	8
9	<i>E. faecium</i>	95,6	95,7	96,6	95,1	95,1	96,8	98,4	95,6	100	96,4	96,9	98,0	96,9	97,6	97,5	97,1	95,1	90,6	95,0	93,1	91,3	9
10	<i>E. flavescens</i>	97,0	95,8	99,9	95,1	95,4	97,0	97,0	94,5	96,6	100	99,2	97,0	97,6	96,7	97,9	97,9	97,2	91,5	96,5	94,4	92,7	10
11	<i>E. gallinarum</i>	96,1	95,5	98,6	94,6	94,9	96,5	96,3	94,1	96,2	98,7	100	97,4	97,9	97,3	98,5	98,1	97,4	91,6	96,7	94,8	92,9	11
12	<i>E. hirae</i>	95,7	96,0	97,0	95,4	95,4	97,0	99,3	95,5	98,8	97,0	96,3	100	97,6	98,4	98,2	98,0	96,1	91,1	95,8	94,3	92,0	12
13	<i>E. malodoratus</i>	95,0	99,2	95,9	94,8	95,0	95,9	96,1	94,7	96,0	95,8	95,5	96,3	100	97,5	98,4	98,8	95,9	90,7	95,7	93,5	91,8	13
14	<i>E. mundtii</i>	95,7	96,0	96,6	95,5	95,6	97,1	98,8	95,4	98,5	96,7	96,2	99,1	96,4	100	97,9	97,8	95,8	90,7	95,6	94,2	91,9	14
15	<i>E. pseudoavium</i>	94,9	99,1	95,9	94,5	94,7	95,8	95,9	94,3	95,7	95,9	95,5	96,1	99,1	96,0	100	98,8	96,3	91,0	96,2	94,0	92,0	15
16	<i>E. raffinosus</i>	95,0	99,6	96,1	94,8	95,0	96,0	96,0	94,7	95,9	96,1	95,8	96,3	99,2	96,3	99,3	100	96,2	91,1	96,0	93,8	92,1	16
17	<i>E. saccharolyticus</i>	95,9	95,9	96,5	94,9	95,5	96,6	96,4	94,9	96,5	96,4	96,3	96,4	96,5	96,5	96,0	96,1	100	92,2	96,8	94,0	93,4	17
18	<i>E. solitarius</i>	90,5	90,4	90,7	89,7	89,8	90,7	90,5	89,6	90,7	90,6	90,5	90,4	90,4	90,4	90,0	90,3	91,2	100	91,6	91,6	96,3	18
19	<i>E. sulfureus</i>	95,6	95,8	96,6	95,5	95,5	96,5	97,0	94,9	97,0	96,6	96,4	97,2	96,3	97,0	96,1	96,2	97,2	90,7	100	93,7	92,9	19
20	<i>M. pluton</i>	92,6	93,0	93,0	92,5	92,5	93,2	93,8	94,2	93,5	93,0	92,9	93,6	93,2	93,6	92,8	93,1	92,6	89,2	92,9	100	92,8	20
21	<i>T. halophilus</i>	89,6	90,3	90,3	89,4	89,4	90,5	90,3	89,5	90,4	90,3	90,4	90,3	90,3	90,2	90,0	90,3	90,8	95,5	90,5	88,9	100	21
	23S-rRNS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	

2 Entwicklung eines rRNS-gerichteten Sondensatzes für Enterokokken

Aus neuen und bereits vorhandenen Sequenzdaten wurde ein hierarchischer Sondensatz entwickelt, der es ermöglicht, Enterokokken, Tetragerokokken und *Melissococcus pluton* zu identifizieren und zu unterscheiden. Hierarchisch bedeutet in diesem Fall, dass ein Teil der Sonden einzelne Arten (artspezifische Sonden), andere kleine Gruppen von zwei bis fünf Enterokokkenarten (teilgruppenspezifische Sonden) und wieder andere die Angehörigen der Gattung (gattungsspezifische Sonden) erfassen. Um diese Sonden unterschiedlicher Spezifitätentiefe zu konstruieren, wurden unterschiedlich konservierte Bereiche innerhalb der 23S-rRNS herangezogen. So sind die meisten artspezifischen Sonden gegen die Helices 9 und 58 gerichtet (vgl. Abb. D2). Diese Helices gehören zu den variabelsten Regionen der 23S-rRNS (Höpfl *et al.*, 1989; Roller *et al.*, 1992). Die Zielsequenz der ‚gattungsspezifischen‘ Sonde Enc38 liegt dagegen in der Helix 38 der 23S-rRNS, einer weniger variablen Region.

Die Sonden wurden wie unter B.10.3 beschrieben konstruiert. Die Benennung der 23S-rRNS-spezifischen Sonden erfolgte nach folgendem System: Der Großbuchstabe steht für die Gattung, die folgenden Kleinbuchstaben für die detektierten Arten, gefolgt von der Helixnummer der Bindungsposition. Die Sonden haben eine Länge von 18 Nukleotiden und sind in der Regel gegen den der rRNS entsprechenden Strang (nicht kodierender Strang oder Minusstrang) der rDNS gerichtet. Sie könnten somit prinzipiell auch für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung verwendet werden. Bei einigen Sonden zeigte aber die revers komplementäre Sequenz hinsichtlich Sensitivität oder Spezifität ein besseres Ergebnis. Handelt es sich bei einer Sonde um ein solches Komplement, ist sie mit einem „i“ nach der Helixnummer gekennzeichnet. Bei den 16S-rRNS-gerichteten Sonden wurde die Benennung aus früheren Arbeiten übernommen.

In Tab. C2 und C3 sind alle verwendeten Enterokokkensonden mit Name, Sequenz und Bindungsposition aufgeführt. Die Sonden wurden mit rDNS-Fragmenten der Arten für die sie spezifisch sind auf ihre Tauglichkeit für die reverse Hybridisierung überprüft. Als Negativkontrollen dienten Hybridisierungen mit rDNS von nächstverwandten Arten und von Arten deren rDNS lt. Datensatz nur eine Fehlpaarung zur entsprechenden Sondensequenz aufweist. Daneben wurden ausgewählte Sonden, darunter auch die ‚Gattungssonde‘ Enc38i, mit Vertretern nah verwandter Gattungen (lt. 16S-rRNS-Datensatz), z.B. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Staphylococcus* und *Streptococcus*, getestet. Dabei wurden gezielt Arten ausgewählt, die bei konventioneller Wasseruntersuchung als falsch positiv aufgefallen waren, wie

z.B. *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Staphylococcus aureus* oder als Fäkalstreptokokken eine Rolle spielen, wie z.B. *Streptococcus bovis* (Koob, 1997).

Tabelle C2: Gegen die 23S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden zur Detektion von Enterokokken

Name	Pos. ⁹	Reg. ¹⁰	GC [%]	Sequenz (5' → 3')	Spezifität ¹¹	Herkunft
Artspezifische Sonden						
Eas09	136	b	38,9	CGT AAC ATC CTA TCA AAG	<i>E. asini</i>	Diese Arbeit
Eav58	1494	h	27,8	TTA GAG ATG TAA GCA TTT	<i>E. avium</i>	Diese Arbeit
Eav58i	1494	h	27,8	AAA TGC TTA CAT CTC TAA	<i>E. avium</i>	Diese Arbeit
Era58	1499	h	38,9	TGT CCT TAA AGA CGT AAG	<i>E. raffinosus</i>	Diese Arbeit
Ema58i	1497	h	44,4	TGC TTG CAT CTC TAA GGA	<i>E. malodoratus</i>	Diese Arbeit
Edr58	1500	h	44,4	CTT ATC CGT GTA GAC AGA	<i>E. durans</i>	Diese Arbeit
Edr58i	1500	h	44,4	TCT GTC TAC ACG GAT AAG	<i>E. durans</i>	Diese Arbeit
Ehr58	1500	h	50,0	CTT GTC CGT ACA GAC AGA	<i>E. hirae</i>	Diese Arbeit
Eps58	1497	h	38,9	TCC TTA TAG ACG TAA GCA	<i>E. pseudoavium</i>	Diese Arbeit
Efm09	142	b	44,4	CAC ACA ATC GTA ACA TCC	<i>E. faecium</i>	Betzl <i>et al.</i> , 1990, mod.
Efm09i	142	b	44,4	GGA TGT TAC GAT TGT GTG	<i>E. faecium</i>	Betzl <i>et al.</i> , 1990, mod.
Efi58	1476	h	44,4	TGA CTC CTC TTC AGA CTT	<i>E. faecium</i>	Diese Arbeit
Emu58	1498	h	38,9	GTC CTT AAA GTT AGA AGC	<i>E. mundtii</i>	Diese Arbeit
Eca58	1502	h	50,0	AGC TTG TCC GTA CAG GTA	<i>E. casseliflavus</i>	Diese Arbeit
Efl58i	1500	h	38,9	TTC TAC CTA TAC GGA CAA	<i>E. flavescens</i>	Diese Arbeit
Ega09	142	b	44,4	CAC AAC TGT GTA ACA TCC	<i>E. gallinarum</i>	Koob, 1997
Edi38	835	f	44,4	ATT CTT CAC TTC GAC GCT	<i>E. dispar</i>	Diese Arbeit
Esu18	346	e	38,9	CTA GGT GCA TAC CAA ATT	<i>E. sulfureus</i>	Diese Arbeit
Esa09	142	b	33,3	CAC TAA TAA GTA ACA TCC	<i>E. saccharolyticus</i>	Diese Arbeit
Tha09	126	b	38,9	GAT GAA AAA TGC GAG GTT	<i>T. halophilus</i>	Diese Arbeit
Eso18i	276	d	38,9	ACA CGA TCT TTT AGA CGA	<i>E. solitarius</i>	Diese Arbeit
Eso58	1496	h	38,9	GTG AAC AAG AAA AAG CCT	<i>E. solitarius</i>	Diese Arbeit
Eso58i	1496	h	38,9	AGG CTT TTT CTT GTT CAC	<i>E. solitarius</i>	Diese Arbeit
Efs18i	343	e	44,4	CGA AAT GCT AAC AAC ACC	<i>E. faecalis</i>	Betzl <i>et al.</i> , 1990, mod.
Efa54	1399	g	38,9	CAA AAA CAA CTG GTA CAG	<i>E. faecalis</i>	Diese Arbeit
Eco09i	142	b	33,3	GGA TAT TAC CTT TAA GTG	<i>E. columbae</i>	Koob, 1997
Ece09	142	b	38,9	CAC TTA AAG GTA ACA TCC	<i>E. cecorum</i>	Koob, 1997
Mpl15i	268	c	44,4	AAA CCA ACG AGC ATG CTT	<i>M. pluton</i>	Diese Arbeit
Mpl58i	1502	h	38,9	ACT CTG TAA GGA TGA GTT	<i>M. pluton</i>	Diese Arbeit

⁹ *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

¹⁰ Sondenzielregionen aus Abb. D2

¹¹ bezogen auf die in Tab. B1 genannten Stämme

Name	Pos.	Reg.	GC [%]	Sequenz (5' → 3')	Spezifität	Herkunft
Teilgruppenspezifische Sonden						
Eassa38	835	f	44,4	ATT CTC AAC TTC GAC GCT	<i>E. asini</i> <i>E. saccharolyticus</i>	Diese Arbeit
Eampr18	343	e	44,4	GGT GCC AGT CAA ATT TTG	<i>E. avium</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. raffinosus</i>	Koob, 1997
Eduhi09	142	b	50,0	CAC GCA AAC GTA ACA TCC	<i>E. durans</i> <i>E. hirae</i>	Koob, 1997
Edfm57	1456	h	44,4	CTG CTT GGA CAG ACA TTT	<i>E. durans</i> <i>E. faecium</i> <i>E. mundtii</i>	Diese Arbeit
Ecafl09i	142	b	55,6	GGA TGT TAC GTC TGC GTG	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	Koob, 1997
Eacdfg57	1447	h	38,9	AGA CAT ATC CAT CAG TCT	<i>E. asini</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. dispar</i> <i>E. flavescens</i> <i>E. gallinarum</i>	Diese Arbeit
Eamprs09	142	b	38,9	CAC TGA AAA GTA ACA TCC	<i>E. avium</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. sulfureus</i>	Koob, 1997
Esasu58	1487	h	38,9	TGA AAG CAT TTG ACT CTC	<i>E. saccharolyticus</i> <i>E. sulfureus</i>	Diese Arbeit
Esasu58i	1487	h	38,9	GAG AGT CAA ATG CTT TCA	<i>E. saccharolyticus</i> <i>E. sulfureus</i>	Diese Arbeit
Esoha57	1452	h	44,4	TGG ACA GAC CTT TCC ATT	<i>E. solitarius</i> <i>T. halophilus</i>	Diese Arbeit
Ecoce58	1490	h	38,9	AGT GAC AAG CAT TTG ACT	<i>E. cecorum</i> <i>E. columbae</i>	Diese Arbeit
',Gattungsspezifische' Sonde						
Enc38i	847	f	44,4	AGA ATG ATG GAG GTA GAG	Enterokokken <i>E. solitarius</i> ¹² <i>T. halophilus</i> ¹² <i>V. fluvialis</i>	Koob, 1997

¹² trotz Fehlpaarung (vgl. D.2.3.3)

Tabelle C3: Gegen die 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden zur Detektion von Enterokokken

Name	Position ¹³	GC [%]	Sequenz (5' → 3')	Spezifität ¹⁴	Herkunft
Artspezifische Sonden					
Edi131	131	77,8	CCC CCG CTT GAG GGC AGG	<i>E. asini</i>	Meier, 1997
Edi137	138	50,0	ATG TTA TCC CCC GCT TGA	<i>E. dispar</i>	Mehlen, 1999
Esu90	90	50,0	CAC TCC TCT TAC TTG GTG	<i>E. sulfureus</i>	Meier, 1997
Esa452	453	38,9	CAT TCT CTT CTC ATC CTT	<i>E. saccharolyticus</i>	Mehlen, 1999
Eso193	194	55,6	ACG CAC AAA GCG CCT TTC	<i>E. solitarius</i>	Mehlen, 1999
Efs129 ¹⁵	129	55,6	CCC TCT GAT GGG TAG GTT	<i>E. faecalis</i>	Meier, 1997
Ece92	92	50,0	CCA CTC ATT TTC TTC CGG	<i>E. cecorum</i>	Meier, 1997
Mplu464	465	44,4	GTC ACG AGG AAA ACA GTT	<i>M. pluton</i>	Mehlen, 1999
Teilgruppenspezifische Sonden					
Enc93 ¹⁵	93	55,6	GCC ACT CCT CTT TTT CCG	<i>E. hirae</i> <i>E. faecium</i>	Meier, 1997
Ecg191	193	44,4	GCG CCT TTC AAC TTT CTT	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	Meier, 1997
Ecf459	461	38,9	GGG ATG AAC ATT TTA CTC	<i>E. pseudoavium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i> <i>E. dispar</i>	Meier, 1997
Ecc461	462	44,4	AGG GAT GAA CTT TCC ACT	<i>E. cecorum</i> <i>E. columbae</i>	Meier, 1997
Enc131 ¹⁵	131	66,7	CCC CTT CTG ATG GGC AGG	<i>E. spp.</i>	Meier, 1997

Folgendes Schema (Tab. C4) fasst die Spezifitäten der gegen die 16S- und 23S-rRNS gerichteten Sonden zusammen.

¹³ *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

¹⁴ bezogen auf die in Tab. B1 genannten Stämme

¹⁵ vgl. D.2.3.3

Zur Markierung und Amplifikation der DNS aus Probenmaterial wird vor der reversen Hybridisierung eine PCR durchgeführt. Durch Verwendung spezifischer Primer lässt sich die Empfindlichkeit des Nachweises von Enterokokken mittels reverser Hybridisierung deutlich erhöhen (Koob, 1997). Mit der ‚gattungsspezifischen‘ Sonde Enc38 kann in Kombination mit geeigneten Universalprimern eine spezifische Amplifikation durchgeführt werden. Wie aus Abb. D2 deutlich wird, sind die Bindungsstellen der Enterokokkensonden aber auf mehrere Regionen der rRNS verteilt. Daher müssen bei Verwendung dieser Sonde als spezifischer Primer mindestens 2 PCR-Ansätze durchgeführt werden, um alle Bindungspositionen auf der 23S-rDNS erfassen zu können, z.B. 118V-Enc38 und Enc38i-985R. Außerdem steht dann die ‚Gattungssonde‘ Enc38i nicht mehr als zusätzliche Absicherung bei der Hybridisierung zur Verfügung.

Es wurde daher der in Tab. C5 angegebene Primer Enc01V (Mischung aus drei Primern, die im Verhältnis 1:1:1 zur PCR eingesetzt werden) konstruiert. Die Zielsequenz dieser Primer liegt im 5'-terminalen Bereich der 23S-rRNS und ermöglicht, z.B. mit dem Rückwärtsprimer 985R, die spezifische Amplifikation aller 23S-rDNS Sondenbindungspositionen. Durch eine anschließende Hybridisierung mit den gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonden kann bereits eine Identifizierung der Enterokokken bis auf die Artebene durchgeführt werden. Zusätzlich erlaubt die Verwendung von Enc01R mit z.B. 616V auch die spezifische Amplifikation der 16S-rDNS. Die Kombination dieser beiden Amplifikationen ermöglicht die Anwendung des vollständigen Sondenatzes.

Tabelle C5: Gegen die 23S-rDNS gerichtete Primer zur spezifischen Amplifikation der rDNS von *Enterococcus* spp., *Tetragenococcus halophilus*, *Melissococcus pluton* und *Vagococcus fluvialis* (die einzelnen Primervarianten haben lt. Datensatz folgende Spezifitäten: 1. Variante: *Enterococcus* spp., nicht *E. solitarius*; 2. Variante: *E. solitarius*, *T. halophilus*; 3. Variante: *M. pluton*)

Name	Position ¹⁸	Region ¹⁹	GC [%]	Sequenz (5' → 3')	Spezifität ²⁰	Herkunft
Enc01V	0	a	38,9	AGG TTA AGT GAA TAA GGG	Enterokokken <i>T. halophilus</i> <i>M. pluton</i> <i>V. fluvialis</i>	Diese Arbeit
			38,9	AGG TTA AGT AAG AAA GGG		
			44,4	AGG TTA AGT GAA CAA GGG		
Enc01R	0	a	38,9	CCC TTA TTC ACT TAA CCT	Enterokokken <i>T. halophilus</i> <i>M. pluton</i> <i>V. fluvialis</i>	Diese Arbeit
			38,9	CCC TTT CTT ACT TAA CCT		
			44,4	CCC TTG TTC ACT TAA CCT		

V: Vorwärtsprimer (bindet an + bzw. kodierenden Strang)

R: Rückwärtsprimer (bindet an - bzw. nicht kodierenden Strang)

¹⁸ *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

¹⁹ Sondenzielregionen aus Abb. D2

²⁰ bezogen auf die in Tab. B1 genannten Stämme

Tabelle C6: Primerpaare und deren optimale Annealingtemperaturen zur spezifischen Amplifikation der 16S- bzw. 23S-rDNS von *Enterococcus* spp., *Tetragenococcus halophilus*, *Melissococcus pluton* und *Vagococcus fluvialis*

Amplifizierte rDNS	Primer 1	Primer 2	Annealingtemperatur [°C]
16S	616V	Enc01R	57
23S	Enc01V	985R	59

Unter den in Tab. C6 angegebenen Bedingungen wurden die besten Amplifikationsergebnisse erzielt. Dabei konnte von **allen** in Tab. B1 aufgeführten Enterokokken und von *T. halophilus*, *M. pluton* und *V. fluvialis* DNS amplifiziert werden. Von den verwendeten Nichtzielorganismen wurde nur von DNS aus *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* ein PCR-Produkt erhalten. Die entsprechende Bande ist jedoch deutlich schwächer als die der Amplikate der Zielorganismen (s.u.). In Abb. C1 und C2 ist die spezifische Amplifikation der 16S- und 23S-rDNS einiger beispielhaft ausgewählter Enterokokken und einiger Nichtzielorganismen gezeigt.

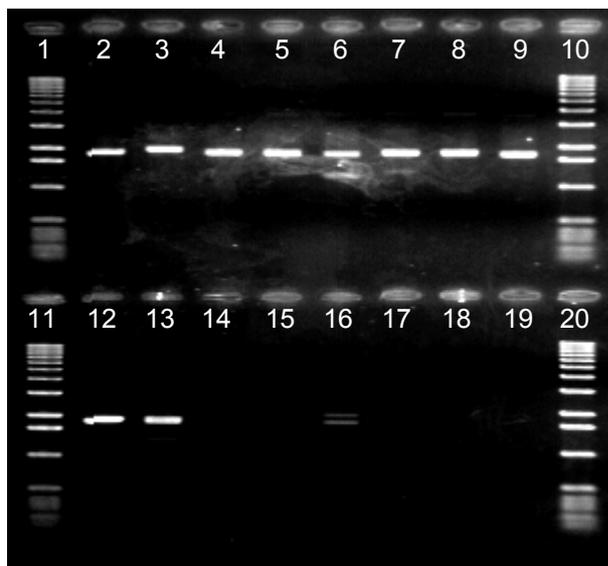


Abbildung C1: Spezifische Amplifikation der 16S-rDNS mit den Primern 616V-Enc01R unter den in B.8.2.3 und Tab. C6 genannten Bedingungen;

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1: 1 kb-Standard | 8: <i>E. faecalis</i> |
| 2: <i>E. durans</i> | 9: <i>E. cecorum</i> |
| 3: <i>E. faecium</i> | 10: 1 kb-Standard |
| 4: <i>E. casseliflavus</i> | 11: 1 kb-Standard |
| 5: <i>E. avium</i> | 12: <i>M. pluton</i> |
| 6: <i>T. halophilus</i> | 13: <i>V. fluvialis</i> |
| 7: <i>E. sulfureus</i> | 14: <i>S. salivarius</i> |

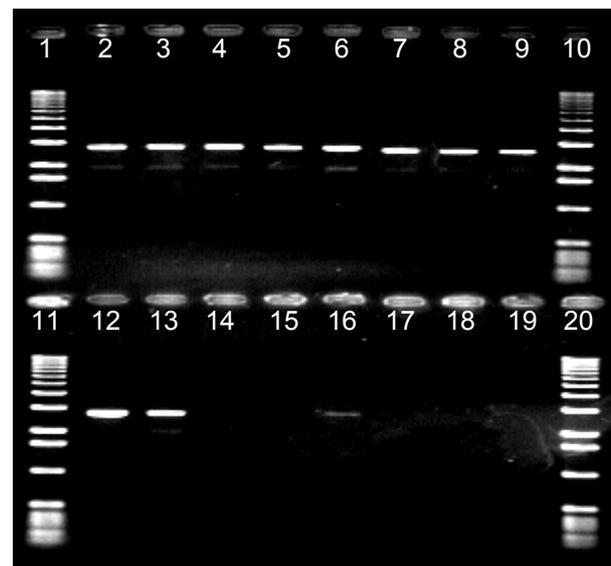


Abbildung C2: Spezifische Amplifikation der 23S-rDNS mit den Primern Enc01V-985R unter den in B.8.2.3 und Tab. C6 genannten Bedingungen;

- | |
|--|
| 15: <i>S. bovis</i> |
| 16: <i>Lb. delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> |
| 17: <i>Lb. acidophilus</i> |
| 18: <i>S. aureus</i> |
| 19: <i>L. lactis</i> |
| 20: 1 kb-Standard |

Die Spezifität lässt sich durch Erhöhung der Annealingtemperatur noch verbessern. So ist bei einer Verwendung des Primerpaares Enc01V-985R und einer Annealingtemperatur von 60 °C kein unspezifisches PCR-Produkt bei *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* mehr sichtbar (bei 59 °C ist noch eine schwache Bande erkennbar; vgl. Abb. C2), doch wird auch die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt

deutlich geringer (Daten nicht gezeigt). Da das PCR-Produkt anschließend für eine Hybridisierung verwendet wird, die für den Einsatz von universell amplifizierter DNS entwickelt wurde, ist eine geringfügige Amplifikation von DNS von Nichtzielorganismen kein Problem. Die spezifische PCR soll hier nur die Sensitivität erhöhen. Die nötige Spezifität ist durch den hierarchischen Sondensatz gewährleistet.

Wenn die spezifische PCR als diagnostische PCR eingesetzt wird, ist die Verwendung von Enc01V und 985R bei einer Annealingtemperatur von 60 °C zu empfehlen, da hier mit keinem der in Tab. B1 aufgeführten Nichtzielorganismen ein PCR-Produkt erhalten wurde (Daten nicht gezeigt).

3 Reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte

Für die Hybridisierungen wurde die 16S- und 23S-rDNS mit dem Primerpaar 616V-985R amplifiziert (vgl. B.7.1 und B.8.2) und im Verlauf der PCR markiert (vgl. B.8.3). Dieses ca. 4,5 kb lange Amplifikat enthält alle Bindungsstellen der hier vorgestellten Enterokokkensonen. Das PCR-Produkt wurde vor der Hybridisierung durch Agarosegelelektrophorese (vgl. B.6) untersucht. Eine Reinigung des PCR-Produktes ist nicht unbedingt erforderlich.

3.1 Immobilisierung

3.1.1 Trägermaterial

Als Trägermaterial wurden MaxiSorp™-Mikrotiterplatten (NUNC, Roskilde, DK) in Verbindung mit dem EDC-Kopplungsverfahren verwendet. Dies hat sich schon bei verschiedenen Arbeiten (Nikiforov und Rogers, 1995; Graf, 1998) als besser erwiesen als z.B. CovaLink™ Mikrotiterplatten, die, mit einem Aminolinker versehen, eigentlich für die Immobilisierung von z.B. phosphorylierten Oligonukleotiden besonders geeignet sein sollten. Da eine zusätzliche Verwendung von 1-Methylimidazol bei der Immobilisierungsreaktion (Rasmussen, 1990) keine Verbesserung mit sich brachte, wurde darauf verzichtet.

3.1.2 Modifikation der Oligonukleotide

Folgende Modifikationen am 5'-Ende der Oligonukleotide wurden mit unmodifizierten Oligonukleotiden im Hinblick auf die Immobilisierungseffizienz verglichen:

- Phosphorylierung (5'-POH-Sequenz)
- Verlängerung um 6 Nukleotide (5'-AAAAAA-Sequenz)
- Verlängerung um 12 Nukleotide (5'-AAAAAAAAAAAA-Sequenz)

Bei Verwendung der unterschiedlichen Modifikationen waren einige grundlegende Tendenzen feststellbar. Die schlechtesten Ergebnisse wurden mit den Sonden Ega09 und Ece09 ohne Modifikation erzielt. Die Sonden Eduhi09 und Enc38i zeigten dagegen auch ohne Modifikation gleich gute Werte wie phosphorylierte oder verlängerte Sonden (vgl. Abb. C3).

Bei der Sonde Ece09 war im Gegensatz zu den übrigen Sonden eine signifikante Signalsteigerung durch die Verlängerung um 6 Nukleotide gegenüber der Phosphorylierung feststellbar. Aber auch in diesem Fall wurde mit der phosphorylierten Sonde noch ein deutliches Signal erzielt.

Weder durch zusätzliche Phosphorylierung der verlängerten Sonden, noch mit einer weiteren Verlängerung konnte eine Verbesserung erreicht werden (vgl. auch Schedl *et al.*, 2000).

Bei schrittweiser Erhöhung des Formamidgehaltes in der Waschlösung wurden die Hybride mit den nicht modifizierten Oligonukleotiden zuerst ausgewaschen. Danach folgten die Hybride mit den phosphorylierten Oligonukleotiden. Am stabilsten waren Hybride mit verlängerten Oligonukleotiden (vgl. Abb. C3).

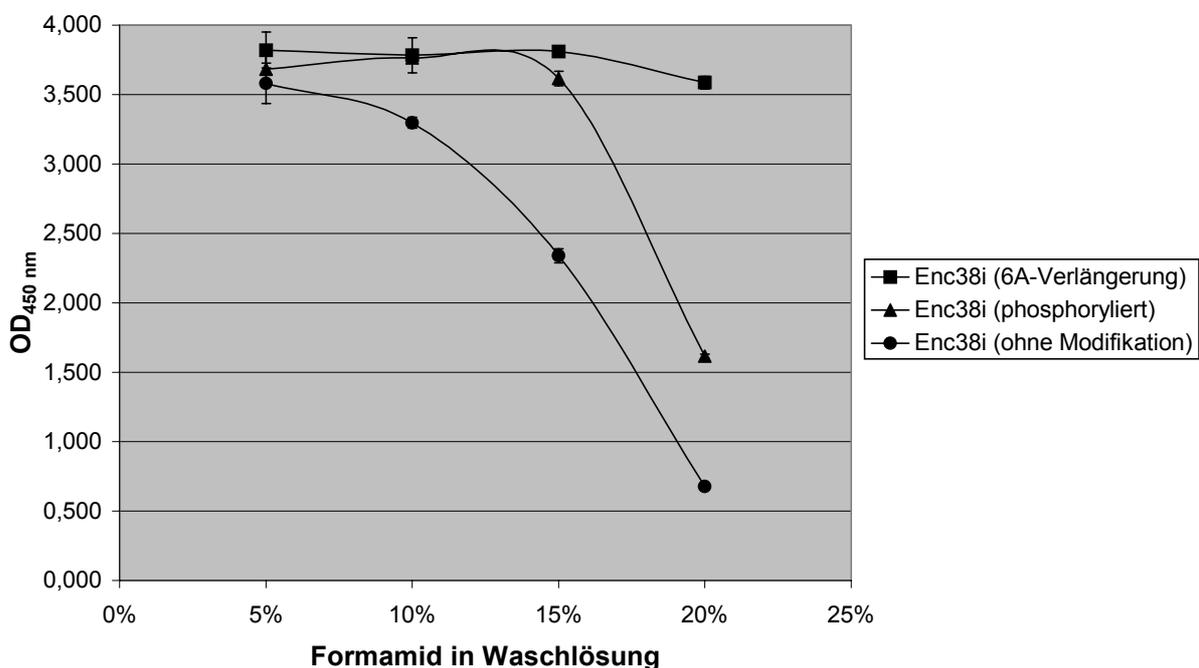


Abbildung C3: Hybridisierung (vgl. B.11.2, 5% FA in Hybridisierungslösung) von Sonde Enc38i (ohne Modifikation, 5'-phosphoryliert, 6 A-Verlängerung am 5'-Ende), Spezifität: vgl. Tab. C4, mit amplifizierter und DIG-markierter DNS von *E. durans*

Insgesamt lässt sich feststellen, dass um 6 Nukleotide verlängerte Sonden und phosphorylierte Sonden gut für die Immobilisierung geeignet sind.

3.1.3 Immobilisierungsbedingungen

Die Versuche ergaben, dass eine Sondenmenge von 10-20 pmol / Kavität ausreicht, um ein maximales Hybridisierungssignal zu erhalten. Eine Steigerung darüber hinaus ist nicht mehr sinnvoll, da eher eine Signalreduktion zu beobachten war. Nach Southern *et al.* (1999) ist dies wahrscheinlich auf eine zu dichte Belegung der Oberfläche zurückzuführen, was zu sterischen Behinderungen bei der Hybridisierung führt.

3.2 Denaturierungsbedingungen

Zur Vereinfachung der Methode wurde die thermische Denaturierung des markierten PCR-Produktes vor der Hybridisierung direkt in der Kavität getestet. Hierfür wurde die Sonde Eduhi09 (spezifisch für *E. durans* und *E. hirae*), wie unter B.11.2 beschrieben, immobilisiert. Die Denaturierung der PCR-Produkte (hier *E. durans*) und die Hybridisierung wurden nach B.11.4.3 bzw. B.11.2 durchgeführt. Als Referenz erfolgte eine Denaturierung im Wasserbad (vgl. B.11.4.1).

In Abb. C4 sind die Auswirkungen unterschiedlich langer Denaturierungszeiten auf die Signalintensität dargestellt. Hier zeigt sich sehr deutlich, dass die Denaturierung in der Mikrotiterplatte bei langen PCR-Produkten (ca. 4,5 kb) keine Alternative zur Denaturierung im Wasserbad darstellt. So ist das Signal auch nach 1 h Denaturierung immer noch deutlich geringer als bei der Denaturierung im Wasserbad.

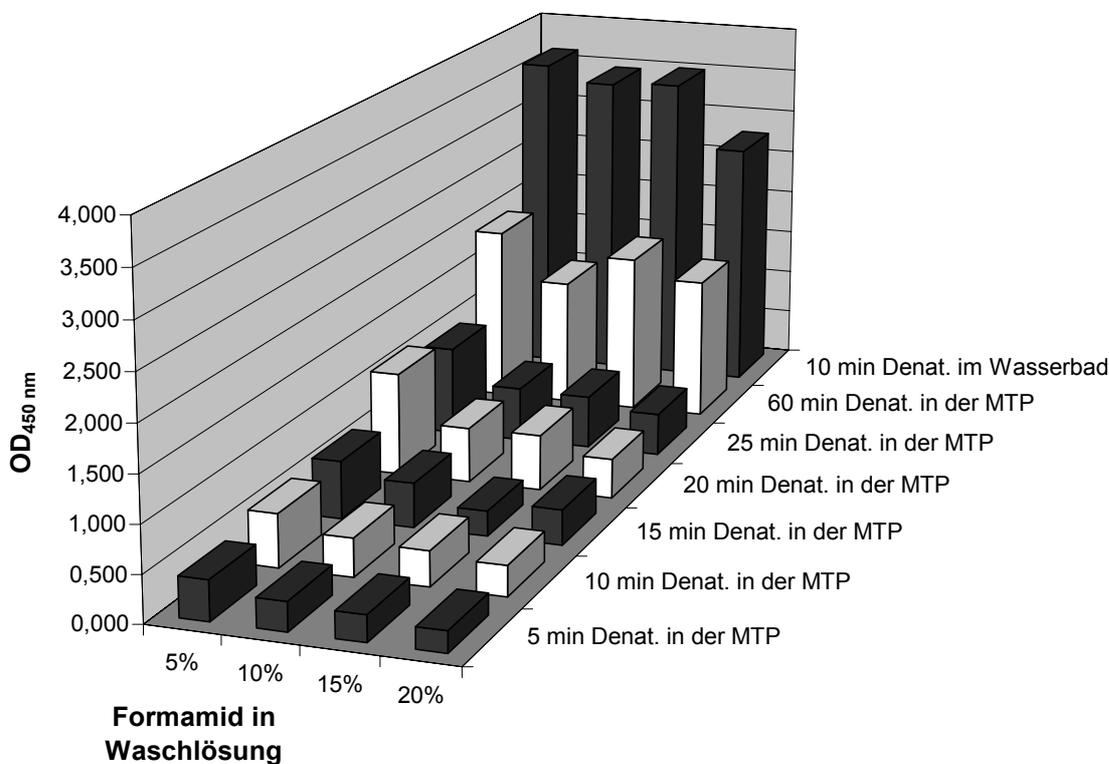


Abbildung C4: Hybridisierung (vgl. B.11.2, 5% FA in Hybridisierungslösung) von Sonde Eduhi09 (5'-phosphoryliert), spezifisch für *E. durans* und *E. hirae*, mit amplifizierter und DIG-markierter DNS von *E. durans*; die Denaturierung erfolgte in der Mikrotiterplatte (MTP) für 5-60 min bei 100 °C (vgl. B.11.4.3) bzw. im Wasserbad für 10 min bei 98 °C (vgl. B.11.4.1)

3.3 Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Es wurden 3 verschiedene Systeme zur Hybridisierung verwendet. Diese waren:

- System 1a (vgl. B.11.1) ohne TMACI
- System 2 (vgl. B.11.2) mit TMACI in der Waschlösung
- System 3 (vgl. B.11.3) mit TMACI in Hybridisierungs- und Waschlösung

Zur Evaluierung dieser Systeme wurde die Sonde mit dem niedrigsten GC-Gehalt (Eav58i, 27,8% GC, 5'-phosphoryliert), die Sonde mit dem höchsten GC-Gehalt der gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonden (Ecaf109i, 55,6% GC, 5'-phosphoryliert) und eine Sonde mit mittlerem GC-Gehalt (Eco09i, 33,3% GC, 5'-phosphoryliert) ausgewählt. Die Hybridisierungen wurden mit 5% Formamid (FA) in der Hybridisierungslösung bei 37 °C für 2 h durchgeführt.

Das Waschen erfolgte 3x10 min bei 37 °C. Dabei wurde ein FA-Gradient von 0-30% FA zur Ermittlung der optimalen Bedingungen gewählt.

Hybridisierungen mit **System 1a** zeigten gute Hybridisierungssignale; allerdings ist hier das zentrale Problem der reversen Hybridisierung, nämlich die gleichzeitige Hybridisierung von Sonden unterschiedlicher GC-Gehalte unter den gleichen Bedingungen gegeben. Dies kann zwar in der Mikrotiterplatte durch Verwendung eines FA-Gradienten beim Waschen (parallele Verwendung verschiedener Waschlösungen in benachbarten Kavitäten) besser ausgeglichen werden als auf Membranen oder DNA-Chips (vgl. C.4.2), aber auch in der Mikrotiterplatte sollte das Verfahren durch Verwendung vieler unterschiedlicher Waschpuffer nicht zu umständlich in der Handhabung werden.

Um hier Abhilfe zu schaffen, wurde die Verwendung von TMACI getestet. TMACI lagert sich spezifisch an die AT-Bindung und erhöht deren Dissoziationstemperatur (T_D). Mit steigender TMACI-Konzentration erhöht sich auch die T_D , bis sie bei einer Konzentration von 3 M den Wert der GC-Bindung erreicht hat (DiLella und Woo, 1987).

System 2 (Verwendung von TMACI in der Waschlösung) hat sich sehr gut bewährt. (vgl. auch C.4.2). Ein völliger Ausgleich der unterschiedlichen T_D konnte aber nicht erreicht werden.

Daher wurde **System 3** geprüft (TMACI in Hybridisierungs- und Waschlösung). Dieses System eignet sich ebenfalls gut für die Hybridisierung. Eine Verbesserung durch die zusätzliche Verwendung von TMACI in der Hybridisierungslösung wurde aber nicht erreicht. Auch in diesem Fall war die ‚Schmelzkurve‘ der Sonde Ecaf109i gegenüber der Kurve von Eav58i nach rechts (zu höheren FA-Gehalten) verschoben. Ein Vorteil dieses Systems liegt in der einfachen Herstellung der Lösungen, da sich die Hybridisierungs-

und die Waschlösung nur durch den Zusatz von Blockingreagenz bzw. Denhardtlösung unterscheiden. Ein wesentlicher Nachteil ist aber die Verwendung von giftigem TMACI in einem zusätzlichen Schritt.

Alle folgenden Hybridisierungen wurden daher mit System 2 durchgeführt.

Um für die Sonden die optimalen Bedingungen zu ermitteln, wurde sowohl bei der Hybridisierung als auch beim Waschen ein FA-Gradient gefahren. Zur Hybridisierung wurden wieder die am 5'-Ende phosphorylierten Sonden Eav58i, Ecafl09i und Eco09i verwendet. Sie zeigten folgendes Verhalten:

Eav58i lieferte das stärkste Signal bei 0% FA in der Hybridisierungslösung. Bei 10% FA in der Hybridisierungslösung war das Signal nur noch sehr schwach. Als Negativkontrolle wurde DNS von *E. malodoratus* mit einer Fehlpaarung zu dieser Sonde verwendet (vgl. Abb. C5).

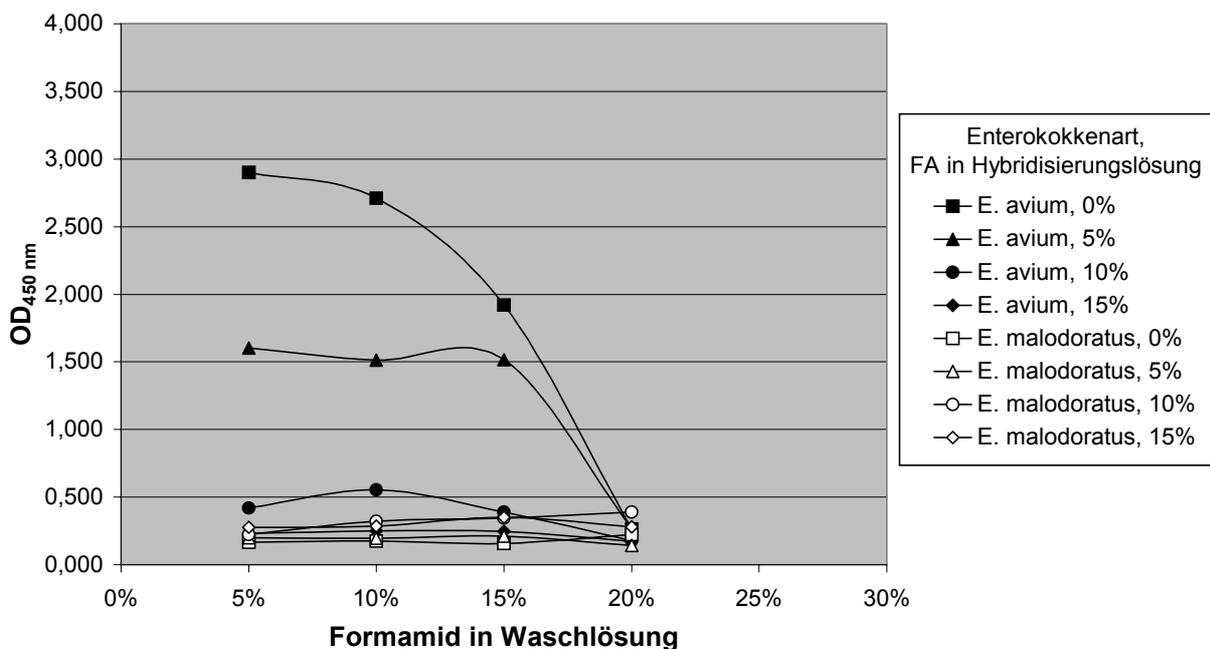


Abbildung C5: Hybridisierung (vgl. B.11.2) von Sonde Eav58i (5'-phosphoryliert), spezifisch für *E. avium*, mit amplifizierter und DIG-markierter DNS von *E. avium* und *E. malodoratus* bei verschiedenen FA-Gehalten in Hybridisierungs- und Waschlösung

Bei Eco09i war kein signifikanter Unterschied zwischen 0% und 5%FA in der Hybridisierungslösung festzustellen (vgl. Abb. C6). Ab 10% FA in der Hybridisierungslösung fiel das Signal ab. Als Negativkontrolle wurde DNS von *E. cecorum* mit nur einer Fehlpaarung zu dieser Sonde verwendet.

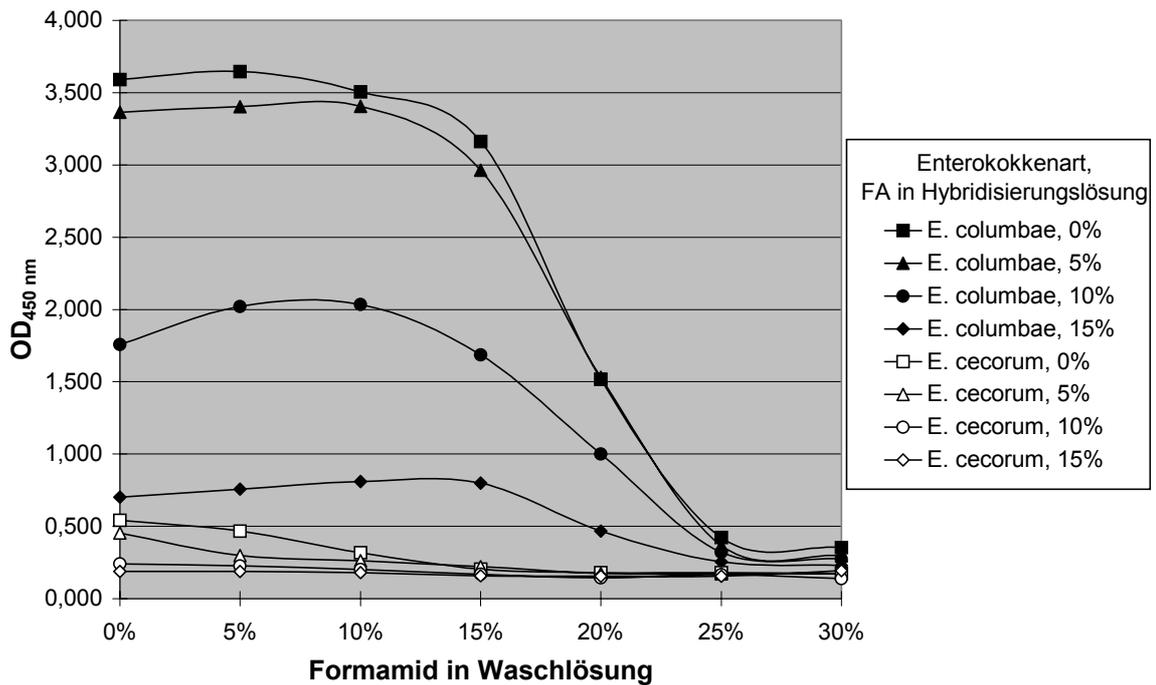


Abbildung C6: Hybridisierung (vgl. B.11.2) von Sonde Eco09i (5'-phosphoryliert), spezifisch für *E. columbae*, mit amplifizierter und DIG-markierter DNS von *E. columbae* und *E. cecorum* bei verschiedenen FA-Gehalten in Hybridisierungs- und Waschlösung

Die erste Hybridisierung von Sonde Eav58i mit DNS von *E. avium* zeigte bereits deutlich, dass FA-Gehalte von 10% oder mehr in der Hybridisierungslösung schon zu hoch liegen. Daher ist hier nur das Ergebnis der Hybridisierung von Ecafl09i mit 0% und 5% FA dargestellt (vgl. Abb. C7). Diese Sonde zeigt bei 5% FA in der Hybridisierungslösung ein stärkeres Signal als bei 0% FA. Als Negativkontrolle wurde DNS von *E. durans* mit nur einer Fehlpaarung zu dieser Sonde verwendet.

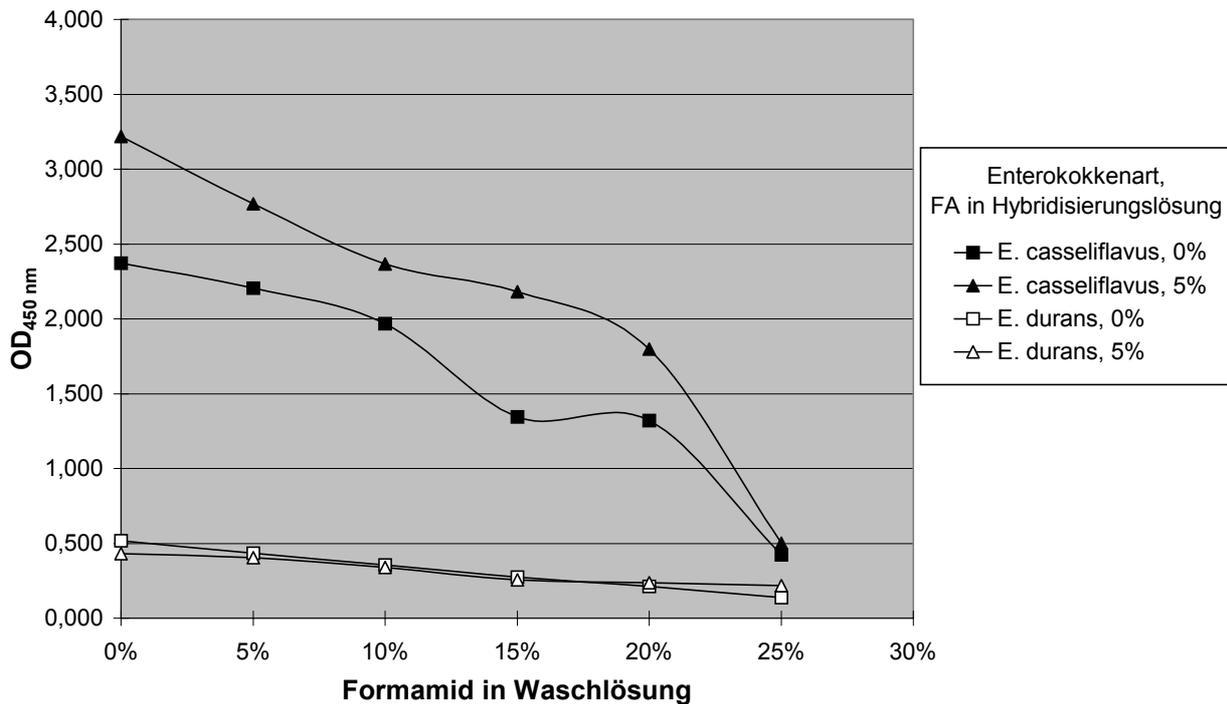


Abbildung C7: Hybridisierung (vgl. B.11.2) von Sonde Ecaf109i (5'-phosphoryliert), spezifisch für *E. casseliflavus* und *E. flavescens*, mit amplifizierter und DIG-markierter DNS von *E. casseliflavus* und *E. durans* bei verschiedenen FA-Gehalten in Hybridisierungs- und Waschlösung

Diese Ergebnisse verdeutlichen bereits die Schwierigkeiten, Hybridisierungsbedingungen zu finden, die für alle verwendeten Sonden hinsichtlich Spezifität und Sensitivität optimal sind.

Für die folgenden Hybridisierungen wurde ein relativ unstringenter Puffer gewählt (5% FA), der zum einen bei Ecaf109i das stärkste Signal erzielte, zum anderen aber auch bei den Sonden mit niedrigeren GC-Gehalten gute Werte lieferte. Bei höheren FA-Werten nahm die Signalintensität bei allen drei Sonden deutlich ab. Bei niedrigerem FA-Gehalt zeigte zwar die Sonde Eav58i höhere Werte, dafür ließ das Signal bei Ecaf109i wieder nach. Außerdem wird bei zu unstringenten Hybridisierungsbedingungen die Bildung von Sekundärstrukturen u.ä. begünstigt. Dies behindert wiederum die Hybridisierung.

Die eigentliche Diskriminierung zwischen passenden Sonden und Sonden mit Fehlpaarungen zur verwendeten DNS erfolgt erst beim Waschen.

Insgesamt erwies sich System 2 (TMACI in der Waschlösung) mit unstringenten Hybridisierungsbedingungen (5% FA, 37 °C) und stringentem Waschschriff (37 °C) mit FA-Gradient als am besten geeignet, um für alle Sonden die optimalen Bedingungen zu gewährleisten. Durch Reduktion von 100 µl auf 50 µl Hybridisierungslösung konnte die Empfindlichkeit der Methode noch gesteigert werden. So kann mit Halbierung der

Hybridisierungslösung auch der Einsatz an PCR-Produkt halbiert werden, ohne dass das Signal abnimmt (Daten nicht gezeigt).

3.4 Automatisches Waschen

Für einige Schritte wurde ein Mikrotiterplattenwasher (Wellwash Ascent, LabSystems, Helsinki, SF) eingesetzt. Dies gilt für das Waschen mit Tris-Waschlösung und das Waschen mit PBS, jeweils 200 µl Lösung pro Kavität. Zum Absaugen der Flüssigkeit lassen sich verschiedene Modi einstellen. Diese sind:

- **Sweep:** Die Spitze fährt mehrfach (seitlich und mittig) auf den Boden der Kavität und saugt dabei die Lösung ab
- **Normal:** Die Spitze fährt einmal in die Kavität (Abstand zum Boden einstellbar) und saugt dabei die Lösung ab

Im Sweep-Modus bleibt fast keine Restflüssigkeit in der Kavität. Durch diesen sehr gründlichen Absaugvorgang wird aber auch ein Teil der Hybride entfernt. Das heißt, es ist ein deutlich reduziertes Signal im Vergleich zum manuellen Ausklopfen der Lösung festzustellen.

Im Normal-Modus ist diese Signalreduktion nicht mehr so stark ausgeprägt und lässt sich durch Vergrößerung des Abstandes zwischen dem Boden der Kavität und der Absaugspitze weiter verringern. Hier hat sich ein Abstand von 1,5 mm bewährt. Bei dieser Einstellung wird einerseits das Signal nur unwesentlich gegenüber der Entfernung der Flüssigkeit durch Ausklopfen vermindert, andererseits bleibt aber auch nicht zu viel Restflüssigkeit in der Kavität zurück.

4 Reverse Hybridisierung auf DNS-Chips

Durch Automatisierung ist in der Mikrotiterplatte schon ein hoher Probendurchsatz erreichbar; durch Miniaturisierung von Hybridisierungstechniken ist aber noch eine wesentliche Steigerung der Anzahl der verwendeten Sonden während eines Experimentes möglich. Auch verringert sich die Menge an benötigtem PCR-Produkt erheblich.

Für die reverse Hybridisierung auf DNS-Chips wurden Aldehydchips in Verbindung mit Sonden mit Aminolinker am 5'-Ende benutzt (zur Kopplung der Oligonukleotide auf die Chipoberfläche vgl. D.5.2). Bei diesem System wurden einige Modifikationen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden.

4.1 Sondenverlängerung am 5'-Ende

Aufgrund der Erfahrungen zum Einfluss unterschiedlicher Verlängerungen der Sonden bei der reversen Hybridisierung auf Membranen (Saiki *et al.*, 1989) und in der Mikrotiterplatte (Schedl *et al.*, 2000; diese Arbeit) wurden vier Sonden ausgewählt und mit einer unterschiedlichen Anzahl von Nukleotiden am 5'-Ende verlängert. Die Sonden Eav58i (niedrigster GC-Gehalt), Ecaf109i (höchster GC-Gehalt der gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonden), Ece09 und Enc38i (mittlerer GC-Gehalt) wurden jeweils ohne Verlängerung, mit 6 T, 9 T, 15 T, 18 T, 24 T, 30 T und 36 T am 5'-Ende zur Hybridisierung eingesetzt. Mit Hilfe der ImaGene™ Software wurde bei der Auswertung der Hybridisierung für jeden Spot die mittlere Signalstärke und das mittlere Hintergrundsignal ermittelt. Jede Sonde war achtmal aufgetragen, daher wurde für jede Sonde der Mittelwert und die Standardabweichung dieser acht Signale und der Mittelwert der acht Hintergrundsignale errechnet. In das Diagramm wurde die Differenz dieser Mittelwerte und die Standardabweichung eingezeichnet.

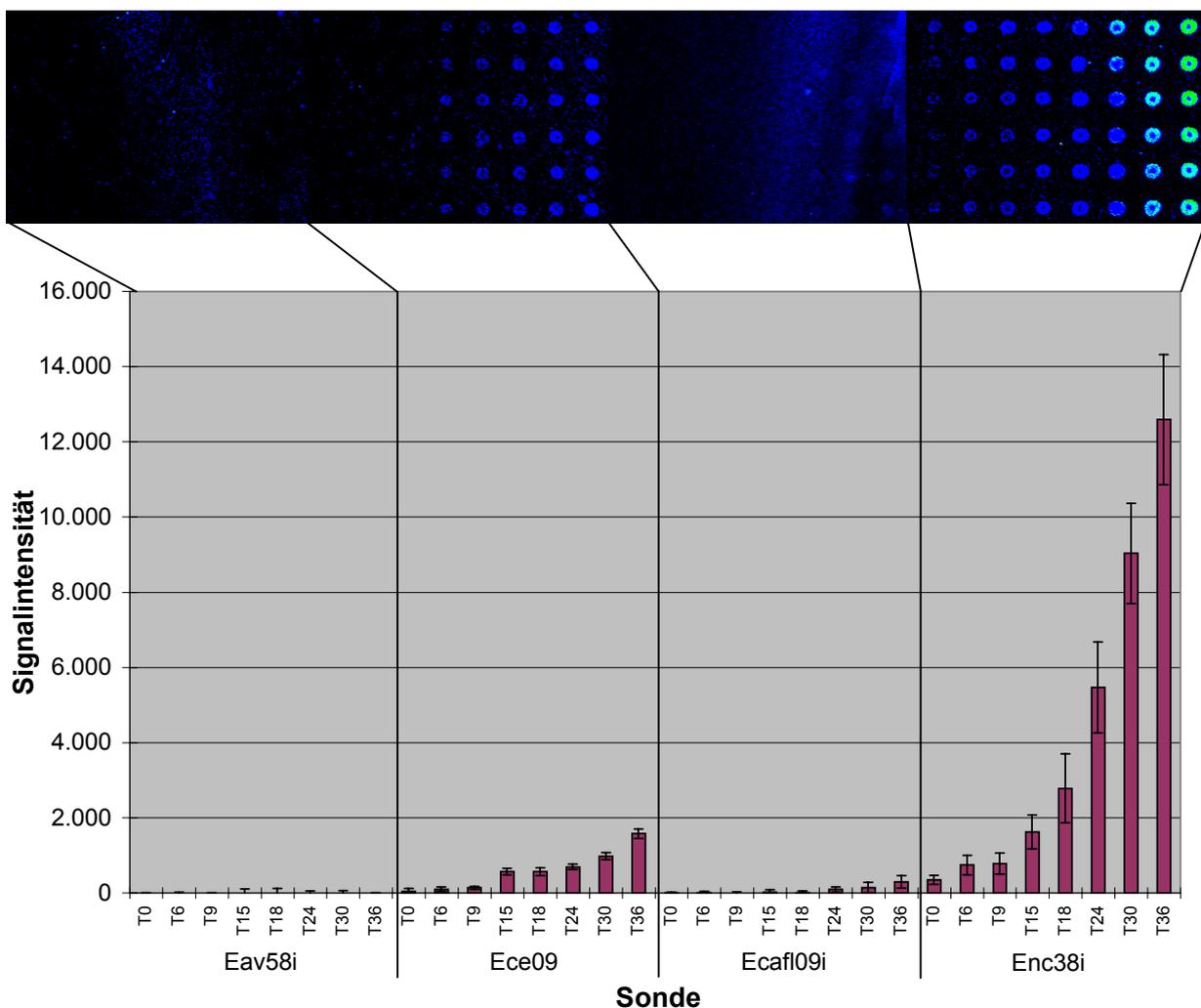


Abbildung C8: Hybridisierung (vgl. B.12.2; Hybridisierung: 5% FA; Waschen: 0% FA, 50 °C) von 5'-aminomodifizierten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4, mit amplifizierter und biotinmarkierter DNS von *E. cecorum*; T0: ohne Verlängerung; T6: Verlängerung um 6 T am 5'-Ende der Sonde; T9: Verlängerung um 9 T am 5'-Ende der Sonde; etc.

Beispielhaft ist in Abb. C8 die Hybridisierung der 32 o.g. Sonden mit DNS von *E. cecorum* gezeigt. Deutlich zu sehen sind die erheblichen Signalunterschiede zwischen unterschiedlich verlängerten Sonden, aber auch zwischen unterschiedlichen Sonden mit gleicher Verlängerung (z.B. Sonde Ece09 und Enc38i). Die Konzentrationen der auf den Chip aufgetragenen Sondenlösungen lagen alle im gleichen Bereich. Es kann also davon ausgegangen werden, dass diese Signalunterschiede nicht durch Aufbringen unterschiedlicher Sondenmengen ausgelöst wurden.

In jedem Fall war mit zunehmender Anzahl an Ts, d.h. mit zunehmender Länge des T-Schwanzes, eine deutliche Signalsteigerung zu erkennen. Dies wurde in mehreren Versuchen mit PCR-Produkten verschiedener Arten bestätigt. In dem Bereich von 0-36 T konnte noch keine Sättigung erreicht werden. In Anbetracht der großen Zahl an Sonden, die auf dem Chip eingesetzt werden sollen, muss aber eine Grenze gezogen werden, bei der der zusätzliche Aufwand für die Verlängerung der Sonden den Nutzen nicht übersteigt. Für die weiteren Versuche wurde deshalb eine Verlängerung von 15 T verwendet, die schon eine deutliche Signalsteigerung gegenüber den nicht verlängerten Sonden zeigt, den zusätzlichen Aufwand aber in Grenzen hält.

4.2 Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Für die ersten Versuche wurde das für Chips empfohlene **System 1b** (vgl. B.12.1) verwendet. Hier wird die Stringenz bei der Hybridisierung eingestellt, der Waschschrift ist relativ unstringent.

Als Beispiel wurde ein Chip mit allen Enterokokkensonden aus Tab. C4 belegt und mit einer Mischung aus PCR-Produkten von *E. avium* und *E. durans* hybridisiert. Diese Mischung wurde gewählt, da zum einen DNS von *E. durans* bei zu geringer Stringenz mit Ecafl09i (Sonde mit höchstem GC-Gehalt aller gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonden) hybridisiert und zum anderen DNS von *E. avium* bei zu hoher Stringenz mit Eav58i (Sonde mit niedrigstem GC-Gehalt) nicht mehr hybridisiert. Zur Bestimmung der optimalen Stringenz wurde die Hybridisierung parallel bei 5%, 10%, 15% und 20% FA durchgeführt.

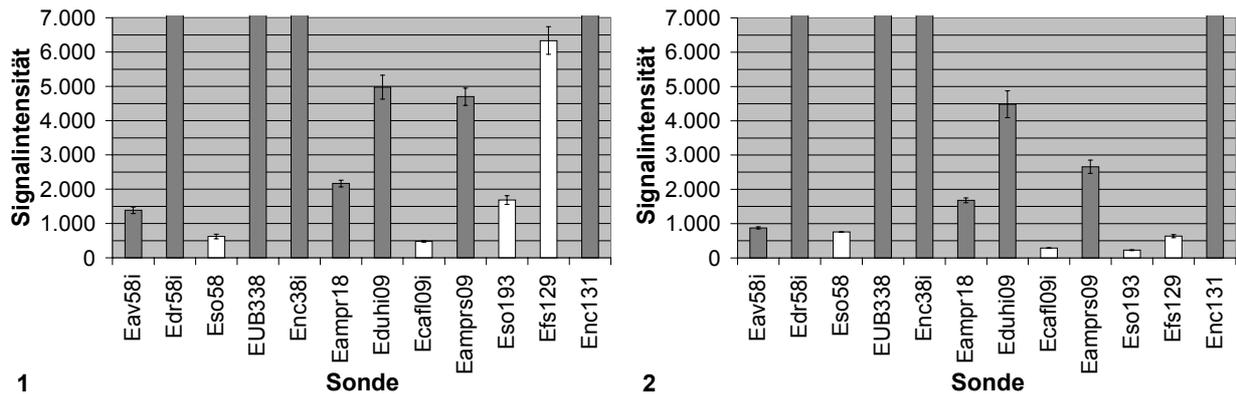
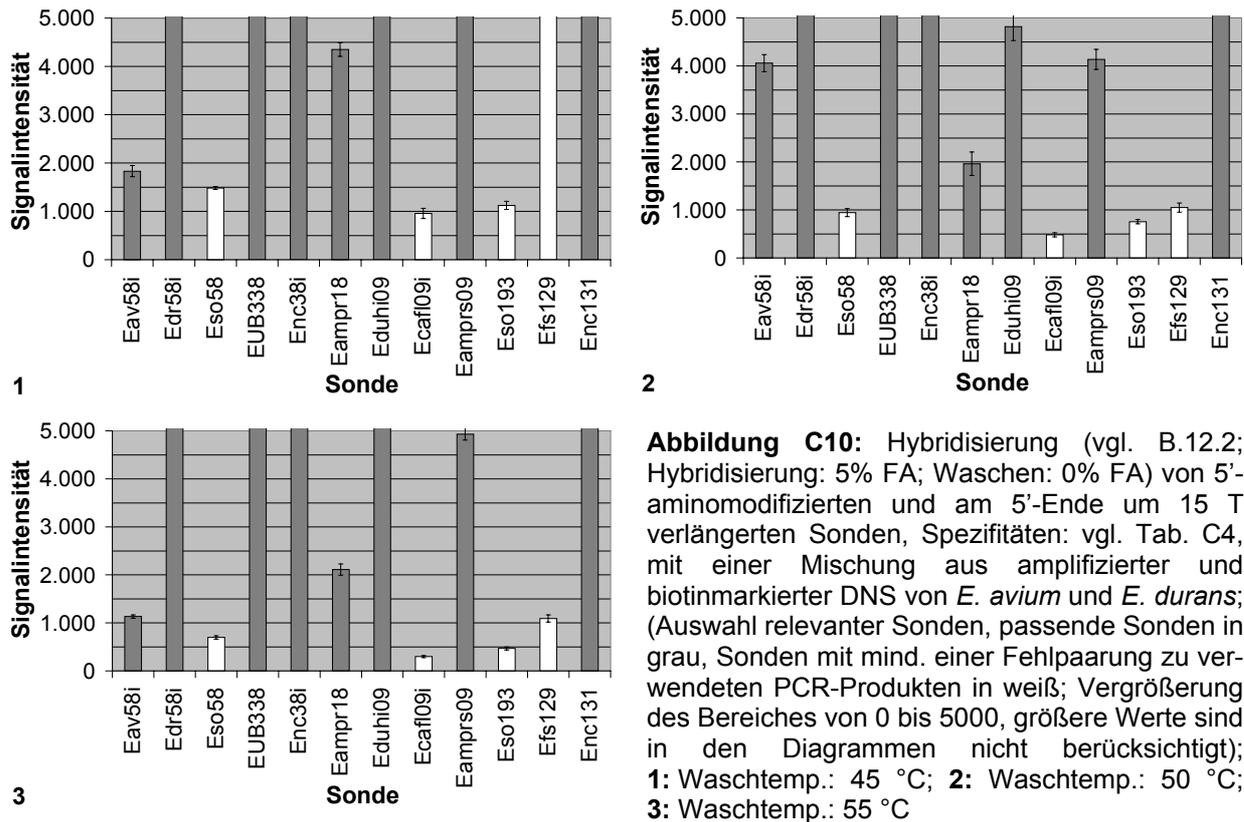


Abbildung C9: Hybridisierung (vgl. B.12.1) von 5'-aminomodifizierten und am 5'-Ende um 15 T verlängerten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4, mit einer Mischung aus amplifizierter und biotinmarkierter DNS von *E. avium* und *E. durans*; (Auswahl relevanter Sonden, passende Sonden in grau, Sonden mit mind. einer Fehlpaarung zu verwendeten PCR-Produkten in weiß; Vergrößerung des Bereiches von 0 bis 7000, größere Werte sind in den Diagrammen nicht berücksichtigt) **1:** 5% FA in der Hybridisierungslösung; **2:** 20% FA in der Hybridisierungslösung

Wie bei 5% FA (vgl. Abb. C9 / 1) zeigte auch die Hybridisierung mit 10% und 15% FA für die Sonde Efs129 ein deutlich stärkeres Signal als für die Sonde Eav58i. Erst bei 20% FA (vgl. Abb. C9 / 2) konnte das Signal von Efs129 auf einen akzeptablen Wert gesenkt werden. Im Gegenzug war aber nun das erwünschte Signal für Eav58i kaum noch wahrnehmbar. Ähnliches gilt für die Sonde Eso193. Diese Sonde ist zwar bei 15% FA bereits einsetzbar, aber auch diese Hybridisierungsbedingungen sind für Eav58i schon zu stringent. Eine Verwendung von TMACl in der Hybridisierungslösung brachte keine Verbesserung, der Hintergrund wurde sogar deutlich schlechter. Eine Verwendung der Hybridisierungslösung von System 1a (vgl. B.11.1) und Beibehaltung der übrigen Bedingungen von System 1b (vgl. B.12.1) zeigte keine signifikanten Unterschiede zur alleinigen Verwendung von System 1b (vgl. B.12.1).

Aufgrund dieser unbefriedigenden Ergebnisse wurde das in der Mikrotiterplatte bewährte **System 2** (Einstellen der Stringenz beim Waschen, Verwendung von TMACl in der Waschlösung) angewendet. Zur Einstellung der optimalen Stringenz wurde die Hybridisierung mit 5% FA bei 37 °C ÜN mit den o.g. Sonden durchgeführt. Das anschließende Waschen erfolgte parallel mit TMACl-Waschlösung mit 0% FA bei 45,0 °C; 47,5 °C; 50,0 °C; 52,5 °C; 55,0 °C und 57,5 °C. In Abb. C10 sind als Beispiele die Ergebnisse bei 45 °C, 50 °C und 55 °C dargestellt.



Bei Verwendung der relativ unstringenten Waschtemperatur von 45 °C war das Signal von Efs129 deutlich höher als das Signal von Eav58i (vgl. Abb. C10 / 1). Unter diesen Bedingungen ist das Ergebnis mit System 1b vergleichbar. Bei Verwendung höherer Temperaturen konnte jedoch das Signal der falsch positiven Signale erniedrigt werden, wohingegen das Signal z.B. von Eav58i noch deutlich positiv war (vgl. Abb. C10 / 2). Bei weiterer Erhöhung der Temperatur ging auch das Signal von Eav58i zurück (vgl. Abb. C10 / 3), bis es schließlich bei 57,5 °C (Daten nicht gezeigt) unter die Ausschlussgrenze (vgl. C.5) sank.

Auch hier konnte durch zusätzliche Verwendung von TMACI in der Hybridisierungslösung (System 3) keine Verbesserung, sondern lediglich eine Erhöhung des Hintergrundsignals erreicht werden.

Insgesamt erbrachte die Verwendung von System 2 (Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, 50 °C) die besten Ergebnisse. Daher wurden die Spezifitäten der Sonden unter diesen Bedingungen ermittelt (vgl. C.5).

4.3 Detektion

Zur Detektion wurden zwei Methoden verwendet, bei der die Markierung der Probe während der PCR durchgeführt wird. Dies hat den Vorteil gegenüber z.B. der „Random-Priming-Methode“, dass zur Hybridisierung ein PCR-Produkt definierter Länge zur Verfügung steht, die durch die Wahl der Primer bestimmt werden kann.

Bei der Wahl des Farbstoffs hat sich Cy5 am besten bewährt, da bei der Detektion bei 635 nm deutlich weniger Hintergrundfluoreszenz auftritt als bei der Detektion mit der für Cy3 oder Fluorescein notwendigen Wellenlänge von 532 nm.

4.3.1 Cy-markiertes dUTP

Da in der Regel eine Amplifikation der DNS notwendig ist, um die nötige Sensitivität zu erreichen, ist die Verwendung Cy-markierter Nukleotide bei der PCR am wenigsten zeit- und arbeitsaufwendig. Nach dem Aufreinigen kann das PCR-Produkt sofort zur Hybridisierung eingesetzt werden. Die Detektion erfolgt direkt nach dem Waschen im Fluoreszenzscanner.

Leider wird Cy-dUTP relativ schlecht durch die Polymerase eingebaut, d.h. die Einbaurrate des markierten dUTP ist deutlich geringer als die des unmarkierten. Dies hat zur Folge, dass bei einem geringen Zusatz von Cy-dUTP die Markierungsdichte des Amplifikates sehr niedrig ist. Bei einer Erhöhung des Anteils an Cy-dUTP bei der PCR geht die Ausbeute deutlich zurück. Die Verwendung von 35 μ M Cy-dUTP zeigte die höchste Markierungsdichte, die Ausbeute an PCR-Produkt geht aber auf 8% zurück²¹. Eigene Untersuchungen bestätigten den rapiden Rückgang an PCR-Produkt mit steigendem Anteil an Cy3-dUTP (vgl. Abb. C11).

²¹ <http://www.mdyn.com/app%5Fnotes/appnotes/an62/an62.html>

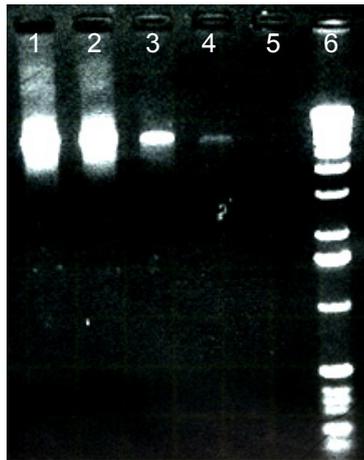


Abbildung C11: PCR-Produkte von DNS aus *E. durans* nach Auftrennung im Agarosegel, PCR unter Verwendung des Primerpaares 616V-985R und Cy3-markiertem dUTP in verschiedenen Konzentrationen (vgl. B.8.2.1, B.8.3.3 und Tab. B8); **1:** 10 μM Cy3-dUTP, 40 μM dTTP; **2:** 15 μM Cy3-dUTP, 35 μM dTTP; **3:** 20 μM Cy3-dUTP, 30 μM dTTP; **4:** 25 μM Cy3-dUTP, 25 μM dTTP; **5:** 30 μM Cy3-dUTP, 20 μM dTTP; **6:** 1 kB-Standard

Bei aus Reinkulturen isolierter DNS konnte bei der PCR mit Cy-dUTP und dTTP im Verhältnis 1:1 ein relativ brauchbarer Kompromiss zwischen Ausbeute und Markierung erzielt werden. Allerdings ist die Ausbeute, verglichen mit einer PCR unter Verwendung unmarkierter Nukleotide, relativ niedrig und bei DNS aus Umweltproben noch einmal reduziert. Ein weiterer Grund, der gegen diese Markierung spricht, ist der hohe Preis von Cy5-dUTP.

4.3.2 Biotinmarkiertes dUTP

Bei der Verwendung von 35% Biotin-dUTP (Roche, Mannheim, D) und 65% dTTP (nach Angaben des Herstellers) konnte eine ausreichende Markierungsdichte des Amplifikates erreicht werden. Eine Verringerung der Ausbeute wurde nicht festgestellt. Diese Markierung ist daher besser geeignet als die Verwendung von Cy-markierten Nukleotiden. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass nach der Hybridisierung ein zusätzlicher Detektionsschritt, nämlich die Inkubation der Hybride mit Cy3- bzw. Cy5-Streptavidin (vgl. B.12.1), durchgeführt werden muss.

5 Evaluierung der Enterokokkensonoden in der Mikrotiterplatte und auf DNS-Chips

Der unter C.2 (Tab. C2 und C3) aufgelistete Enterokokkensonodensatz wurde unter den o.g. optimierten Bedingungen in der **Mikrotiterplatte** (vgl. B.11.2; 5% FA in Hybridisierungslösung, 37 °C; 5%-20% FA in Waschlösung, 37 °C) und auf **DNS-Chips** (vgl. B.12.2; 5% FA in Hybridisierungslösung, 37 °C; 0% FA in Waschlösung, 50 °C) evaluiert. In Tab. C7 und C8 sind alle Enterokokkensonoden aufgelistet, die sich in der Praxis bewährt haben. Daneben finden sich jeweils die optimalen Stringenzen und die damit erreichten Signalintensitäten bei der Hybridisierung in der Mikrotiterplatte und auf dem Chip. Zu beachten ist dabei, dass in der Mikrotiterplatte die erforderliche Stringenz durch Erhöhung des FA-Gehaltes in der Waschlösung erreicht wurde, wohingegen auf dem Chip die Stringenz durch Erhöhung der Waschtemperatur eingestellt wurde. Da es hier, im Gegensatz zur Mikrotiterplatte, nicht möglich ist, verschiedene Waschlösungen parallel auf demselben Chip anzuwenden, wurde auf dem Chip zunächst die optimale Stringenz für einige ausgesuchte Sonden ermittelt (vgl. C.4.2). Anschließend wurden alle Sonden auf ihre Tauglichkeit unter diesen Bedingungen getestet. Dabei zeigte sich, dass nicht für alle Sonden die hinsichtlich Spezifität optimalen Bedingungen erreicht werden konnten. So ergaben einige gegen die 16S-rRNS gerichtete Sonden unter diesen optimierten Bedingungen falsch positive Signale (vgl. Tab. C8). Diese Sonden können aber z.B. auf einem zweiten Chip parallel hybridisiert und bei höherer Temperatur gewaschen werden.

Im Folgenden werden drei Beispiele für die Hybridisierung unter den optimierten Bedingungen gezeigt; zwei Hybridisierungen in der Mikrotiterplatte und eine Hybridisierung auf dem Chip.

Abb. C12 / 1 zeigt die Hybridisierung der Sonde Eav58i mit DNS von *E. avium* und, als Negativkontrollen, mit DNS von *E. malodoratus* und *E. raffinosus*. Sie sind die nächst verwandten Arten zu *E. avium* und gehören zur gleichen Untergruppe. Ihre rDNS weist zur Sonde Eav58i eine bzw. zwei Fehlpaarungen auf. Wie aus der Abbildung hervorgeht, lassen sie sich sehr gut von *E. avium* unterscheiden. Auch bei niedrigem FA-Gehalt ist kein falsch positives Signal bei Anwesenheit dieser beiden Arten zu erwarten.

Als zweites Beispiel für eine Hybridisierung in der Mikrotiterplatte ist die Hybridisierung von Tha09 gegen *T. halophilus* und, als Negativkontrolle, *E. hirae* (vgl. Abb. C12 / 2) dargestellt. Bei niedriger Stringenz ist hier ein falsch positives Signal von *E. hirae* zu erkennen, das aber bei Erhöhung des FA-Gehaltes verschwindet. Die besten Waschbedingungen für diese Sonde sind bei 10% und 15% FA gegeben.

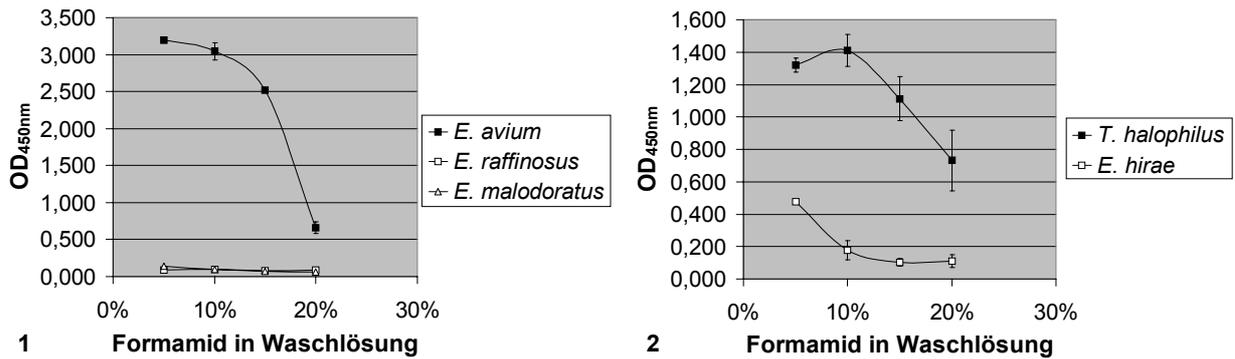


Abbildung C12: Hybridisierung (vgl. B.11.2, 5% FA in Hybridisierungslösung); **1:** Hybridisierung von Sonde Eav58i (5'-phosphoryliert), spezifisch für *E. avium*, mit amplifizierter und DIG-markierter DNS von *E. avium*, *E. raffinosus* und *E. malodoratus*; **2:** Hybridisierung von Sonde Tha09 (5'-phosphoryliert), spezifisch für *T. halophilus*, mit amplifizierter und DIG-markierter DNS von *T. halophilus* und *E. hirae*

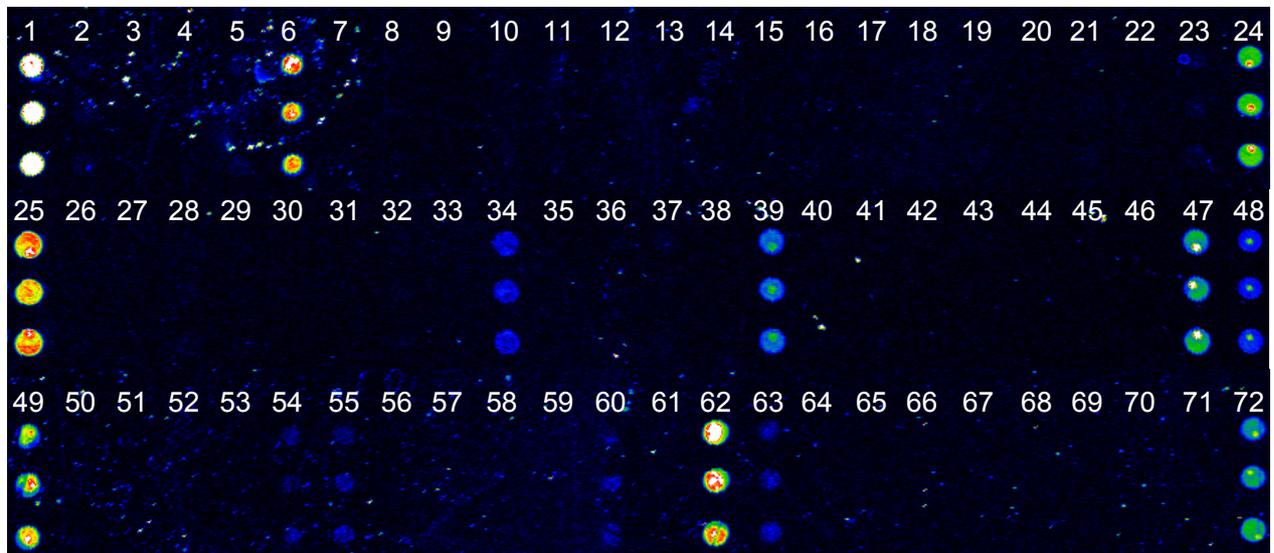


Abbildung C13: Hybridisierung (vgl. B.12.2; Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, 50 °C) von 5'-aminomodifizierten und am 5'-Ende um 15 T verlängerten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4, mit amplifizierter und biotinmarkierter DNS von *E. malodoratus*; die Sonden wurden im Triplikate aufgetragen:

1: Enc38i	13: Efi58	25: Enc38i	37: Ecafl09i	49: Enc38i	61: Ecc461
2: Eas09	14: Emu58	26: Eso58i	38: Eacdfg57	50: Edi131	62: Enc131
3: Eav58	15: Eca58	27: Efs18i	39: Eamprs09	51: Edi137	63: Ex ²²
4: Eav58i	16: Efl58i	28: Efa54	40: Esasu58	52: Esu90	64: -
5: Era58	17: Ega09	29: Eco09i	41: Esasu58i	53: Esa452	65: -
6: Ema58i	18: Edi38	30: Ece09	42: Esoha57	54: Eso193	66: -
7: Edr58	19: Esu18	31: Mpl15i	43: Ecoce58	55: Efs129	67: -
8: Edr58i	20: Esa09	32: Mpl58i	44: -	56: Ece92	68: -
9: Ehr58	21: Tha09	33: Eassa38	45: -	57: Mplu464	69: -
10: Eps58	22: Eso18i	34: Eampr18	46: -	58: Enc93	70: -
11: Efm09	23: Eso58	35: Eduhi09	47: Enc38ai ²³	59: Ecg191	71: -
12: Efm09i	24: EUB338	36: Edfm57	48: EUB338	60: Ecf459	72: EUB338

²² Sonde, die sich in der Praxis als weniger brauchbar erwies und deshalb nicht in den SONDENSATZ aufgenommen wurde.

²³ Variante der Sonde Enc38i; da sie sich in der Praxis nicht bewährte, wurde sie nicht in die Tabellen aufgenommen (vgl. D.2.3.3).

Abb. C13 zeigt die Hybridisierung eines Chips, belegt mit allen Sonden aus Tab. C2 und C3, mit DNS von *E. malodoratus*. Deutliche Signale lieferten die Sonden Ema58i, Eampr18, Eamprs09, Enc131, Enc38i und EUB338 (Spezifitäten sind in Tab. C4 zu finden). Die Signale an Pos. 54, 55 und 60, die nur bei genauer Betrachtung erkennbar sind, liegen unterhalb der Ausschlussgrenze (s.u.). Nicht berücksichtigt wurden die Sonden an Position 47 und 63, da diese sich nicht bei den Hybridisierungsversuchen bewährten und deshalb nicht in den SONDENSATZ aufgenommen wurden. Ein Vergleich mit den Tab. C2, C3 und C4 ergibt, dass alle für *E. malodoratus* spezifischen Sonden ein Signal ergeben und keine der dort aufgeführten Sonden ein falsch positives Signal liefert.

Berechnung der Ausschlussgrenze:

Zur Evaluierung der Sonden und zur Berechnung der Ausschlussgrenzen (Signalstärke, unterhalb der ein Signal nicht mehr als positiv zu werten ist) wurden Hybridisierungen mit PCR-Produkten mit mind. einer Fehlpaarung zu den verwendeten Sonden durchgeführt (= Negativkontrolle). Aus diesen Signalen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt und die Ausschlussgrenze nach folgender Formel berechnet (Graf, 1998):

$$AG = MW + 3 \cdot Stabw$$

AG: Ausschlussgrenze

MW: Mittelwert der Hybridisierungssignale der Sonden mit mind. einer Fehlpaarung zum PCR-Produkt

Stabw: Standardabweichung der Hybridisierungssignale der Sonden mit mind. einer Fehlpaarung zum PCR-Produkt

Da diese Werte von Mikrotiterplatte zu Mikrotiterplatte und von Chip zu Chip abweichen, sollte dieser Wert für jeden Versuch neu berechnet werden. Bei genauer Einhaltung der Bedingungen ist es aber möglich, Näherungswerte für die Ausschlussgrenze anzugeben, die auch für folgende Tabellen zugrunde gelegt wurden:

In der Mikrotiterplatte:	OD _{450nm} = 0,200
Auf dem Chip:	Signalintensität = 500

Tabelle C7: Optimale Hybridisierungsbedingungen und zugehörige Signalintensitäten der 23S-rRNS-gerichteten Enterokokkensonden; Hybridisierung in der **Mikrotiterplatte** (vgl. B.11.2; Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: x% FA, 37 °C) und auf **DNS-Chips** (vgl. B.12.2; Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, y °C)

Name	Spezifität ²⁴	Hybr. in der Mikrotiterplatte		Hybr. auf dem DNS-Chip	
		Stringenz x% FA	Signal	Stringenz y °C	Signal
Artspezifische Sonden					
Eas09	<i>E. asini</i>	5-10	+	50	+
Eav58	<i>E. avium</i>	5-10	+	50	-
Eav58i	<i>E. avium</i>	5-15	++	50	+
Era58	<i>E. raffinosus</i>	5-10	+	50	-
Ema58i	<i>E. malodoratus</i>	15	++	50	++
Edr58	<i>E. durans</i>	5-10	++	50	=
Edr58i	<i>E. durans</i>	5-10	++	50	++
Ehr58	<i>E. hirae</i>	5-10	+	50	-
Eps58	<i>E. pseudoavium</i>	5-10	+	50	-
Efm09	<i>E. faecium</i>	5-20	++	50	++
Efm09i	<i>E. faecium</i>	15-20	++	50	+
Efi58	<i>E. faecium</i>	5-10	+	50	-
Emu58	<i>E. mundtii</i>	5-10	++	50	+
Eca58	<i>E. casseliflavus</i>	10	++	50	-
Efl58i ²⁵	<i>E. flavescens</i>	15	+*	50	#
Ega09	<i>E. gallinarum</i>	5-10	+	50	+
Edi38	<i>E. dispar</i>	10-15	++	50	+
Esu18	<i>E. sulfureus</i>	5-10	+	50	+
Esa09	<i>E. saccharolyticus</i>	5-10	o	50	+
Tha09	<i>T. halophilus</i>	10-15	+	50	+
Eso18i	<i>E. solitarius</i>	5-15	++	50	+
Eso58	<i>E. solitarius</i>	5-15	+	50	-
Eso58i	<i>E. solitarius</i>	10-20	++	50	++
Efs18i	<i>E. faecalis</i>	5-15	+	50	++
Efa54	<i>E. faecalis</i>	5-10	o	50	+
Eco09i	<i>E. columbae</i>	5-10	+	50	+
Ece09	<i>E. cecorum</i>	5-15	+	50	+
Mpl15i	<i>M. pluton</i>	5-10	+	50	-
Mpl58i	<i>M. pluton</i>	5-10	+	50	+
Teilgruppenspezifische Sonden					
Eassa38	<i>E. asini</i> <i>E. saccharolyticus</i>	5-15	+	50	+
Eampr18	<i>E. avium</i>	5-15	+	50	+++
	<i>E. malodoratus</i>		+		+++
	<i>E. pseudoavium</i>		++		+++
	<i>E. raffinosus</i>		++		+++

²⁴ bezogen auf die in Tab. B1 genannten Stämme

²⁵ vgl. D.2.3.3

Name	Spezifität ²⁴	Hybr. in der Mikrotiterplatte		Hybr. auf dem DNS-Chip	
		Stringenz x% FA	Signal	Stringenz y °C	Signal
Eduhi09	<i>E. durans</i> <i>E. hirae</i>	5-15	++ ++	50	+** +**
Edfm57	<i>E. durans</i> <i>E. faecium</i> <i>E. mundtii</i>	10	++ ++ ++	50	- - o
Ecafl09i	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	15	++ ++	50	+** +**
Eacdfg57	<i>E. asini</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. dispar</i> <i>E. flavescens</i> <i>E. gallinarum</i>	5-10	o ++ o ++ +	50	- o - - -
Eamprs09	<i>E. avium</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. sulfureus</i>	5-15	++ ++ ++ ++ +	50	+ + ++ ++ +
Esasu58	<i>E. saccharolyticus</i> <i>E. sulfureus</i>	5-10	+ +	50	- -
Esasu58i	<i>E. saccharolyticus</i> <i>E. sulfureus</i>	15	+ ++	50	++ +
Esoha57	<i>E. solitarius</i> <i>T. halophilus</i>	5-15	+ +	50	- o
Ecoce58	<i>E. cecorum</i> <i>E. columbae</i>	5-15	+ ++	50	o o
',Gattungsspezifische' Sonde					
Enc38i ²⁵	Enterokokken <i>E. solitarius</i> ²⁶ <i>T. halophilus</i> ²⁶ <i>V. fluvialis</i>	15	++ + + +	50	++ ++ ++ ++

*: Näherungswert für Ausschlussgrenze: OD_{450nm} = 0,600 (vgl. D.2.3.1)

** : Näherungswert für Ausschlussgrenze: Signalintensität = 1000 (vgl. D.2.3.2)

-: Kein Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

o: Schwaches Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

+: Starkes Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

++: Sehr starkes Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

=: Mind. eine Art, für die die Sonde spezifisch ist, ergibt kein Signal, außerdem falsch positive Signale

#: Neben der angegebenen Spezifität falsch positive Signale

²⁶ trotz Fehlpaarung (vgl. D.2.3.3)

Tabelle C8: Optimale Hybridisierungsbedingungen und zugehörige Signalintensitäten der 16S-rRNS-gerichteten Enterokokkensonden; Hybridisierung in der **Mikrotiterplatte** (vgl. B.11.2; Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: x% FA, 37 °C) und auf **DNS-Chips** (vgl. B.12.2; Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, y °C)

Name	Spezifität ²⁷	Hybr. in der Mikrotiterplatte		Hybr. auf dem DNS-Chip	
		Stringenz x% FA	Signal	Stringenz y °C	Signal
Artspezifische Sonden					
Edi131	<i>E. asini</i>	20	++	50	#
Edi137	<i>E. dispar</i>	20	++	50	#
Esu90	<i>E. sulfureus</i>	20	+	50	+
Esa452	<i>E. saccharolyticus</i>	20	++	50	+
Eso193	<i>E. solitarius</i>	20	++	50	#
Efs129 ²⁸	<i>E. faecalis</i>	20	++*	50	#
Ece92	<i>E. cecorum</i>	20	+	50	+**
Mplu464	<i>M. pluton</i>	20	++	50	++**
Teilgruppenspezifische Sonden					
Enc93 ²⁸	<i>E. hirae</i>	20	+	50	#
	<i>E. faecium</i>		+		
Ec9191	<i>E. gallinarum</i>	20	++	50	#
	<i>E. casseliflavus</i>		++		
	<i>E. flavescens</i>		++		
Ecf459	<i>E. pseudoavium</i>	20	+	50	#
	<i>E. casseliflavus</i>		+		
	<i>E. flavescens</i>		+		
	<i>E. dispar</i>		++		
Ecc461	<i>E. cecorum</i>	20	++	50	++
	<i>E. columbae</i>		++		++
Enc131 ²⁸	<i>E. spp.</i>	20	+ / ++*	50	#

*: Näherungswert für Ausschlussgrenze: OD_{450nm} = 0,600 (vgl. D.2.3.1)

** : Näherungswert für Ausschlussgrenze: Signalintensität = 1000 (vgl. D.2.3.2)

-: Kein Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

o: Schwaches Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

+: Starkes Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

++: Sehr starkes Hybridisierungssignal, keine falsch positiven Signale

=: Mind. eine Art, für die die Sonde spezifisch ist, ergibt kein Signal, außerdem falsch positive Signale

#: Neben der angegebenen Spezifität falsch positive Signale

²⁷ bezogen auf die in Tab. B1 genannten Stämme

²⁸ vgl. D.2.3.3

6 Evaluierung von Sonden für in Kläranlagen relevante Bakterien

Im Rahmen eines Sonderforschungsbereiches zu den Grundlagen der aeroben biologischen Abwasserreinigung wurden bereits bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bewährte Sonden auf ihre Tauglichkeit für die reverse Hybridisierung in Mikrotiterplatten überprüft. Dies erfolgte unter den in vorliegender Arbeit optimierten Hybridisierungs- und Waschbedingungen. Ziel war es, eine Hybridisierungsmethode bereitzustellen, mit der auch in Routinelabors eine schnelle Überwachung der Population einer Kläranlage ermöglicht wird. In folgender Tabelle (Tab. C9) sind die Sonden zusammengestellt, die zur Evaluierung in der Mikrotiterplatte ausgesucht wurden.

Tabelle C9: Gegen die 16S-rRNS gerichtete Sonden für relevante Bakterien in Kläranlagen; die aufgeführten 16S-rDNS-Klone A, H und S beziehen sich auf die Genbank von Juretschko (2000)

Name	Pos. ²⁹	Sequenz (5' → 3')	Spezifität ³⁰	Herkunft
EUB338	338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Bakterien	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-II	338	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Ergänzung zu EUB338 (vgl. Lit.)	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-III	338	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Ergänzung zu EUB338 (vgl. Lit.)	Daims <i>et al.</i> , 1999
<i>α-Proteobacteria</i>				
ALF1b	19	CGT TCG YTC TGA GCC AG	α-Proteobakterien	Manz <i>et al.</i> , 1992
ALF968	968	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	α-Proteobakterien	Neef, 1997
S*-Alph-1026-a-A-18	1026	TGT CCG CGT CCA TTG CTG	H4, H6, H29, S7	Juretschko, 2000
S*-Alph-1349-a-A-18	1349	AGC CTG CTG TTC TGC GAT	H4, H6, H29, S7	Juretschko, 2000
S*-Alph2-65-a-A-20	65	ACT CCC TAT TGC TAG GGC GT	H46, S43	Juretschko, 2000
Hvu1034	1034	GCA CCT GTC CCA CTG CCT	<i>Hyphomicrobium vulgare</i>	Neef, 1997
S*-Hyvu-128-a-A-20	128	TCC GTA CCG ATA GGA AGA TT	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> , A7b, A39	Juretschko, 2000
NIT3	1035	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	<i>Nitrobacter</i> spp.	Wagner <i>et al.</i> , 1996
Par651	651	ACC TCT CTC GAA CTC CAG	<i>Paracoccus</i> spp. ohne <i>P. alcaliphilus</i>	Neef, 1997
S*-RhBla-1110-a-A-19	1110	GGC AAC TGA AAG TGT GGG T	A10, A15b, A26	Juretschko, 2000
<i>β-Proteobacteria</i>				
S*-A21b-213-a-A-18	213	CGC TCC CAT AGC GCG AGG	A21b	Juretschko, 2000
S*-Azo-131-a-A-18	131	CCC CCA CAA CAT GGG TAC	A33, H25, H30, H35, S3, S10, S23	Juretschko, 2000
S*-Azo-466-a-A-20	466	ACC GTC ATT AGG ATC CTA TG	A33, H25, H30, H35, S3, S10, S23	Juretschko, 2000
S*-Bmde-177-a-A-18	177	TCA ACC TCA GTT CTC ATG	<i>Brachymonas denitrificans</i> , A6b	Juretschko, 2000
BONE23a	663	GAA TTC CAT CCC CCT CT	β1-Proteobakterien	Wagner, 1995

²⁹ *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

³⁰ Nähere Erläuterungen sind in den unter Herkunft genannten Arbeiten zu finden.

Name	Pos. ²⁹	Sequenz (5' → 3')	Spezifität ³⁰	Herkunft
S [*] -Chol-1425-a-A-18 ³¹	1425	ACT ACC TAC TTC TGG TGG	A13, H12, H20, H23, S28, S40	Juretschko, 2000
S [*] -Chol-444-a-A-20	444	TTA GGG GCC ACC GTT TCG TT	A13, H12, H20, H23, S28, S40	Juretschko, 2000
S [*] -Chol-645-a-A-18	645	TGC CAC ACT CGA GTT ATG	A13, H12, H20, H23, S28, S40	Juretschko, 2000
S [*] -H21-444-a-A-18	444	AGA AGG GCT TTT CGT TCC	H21	Juretschko, 2000
S [*] -H7-1013-a-A-18	1013	TCG GGC ACC CCT CAA TCT	H7	Juretschko, 2000
S [*] -ldde-644-a-A-18	644	GCC GCA CTC CAG CCG TGC	<i>Alcaligenes latus</i> , A2, A15, A26b	Juretschko, 2000
LDI23a	649	CTC TGC CGC ACT CCA GCT	<i>Leptothrix discophora</i>	Wagner, 1995
NEU	653	CCC CTC TGC TGC ACT CTA	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus mobilis</i>	Wagner <i>et al.</i> , 1995
NmIV	1004	TCT CAC CTC TCA GCG AGC T	<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> Linie	Pommerening-Röser <i>et al.</i> , 1996
NmV	174	TCC TCA GAG ACT ACG CGG	<i>Nitrosococcus mobilis</i> Linie	Pommerening-Röser <i>et al.</i> , 1996
Noli1434	1434	CCT TAC GGT TAG ACT ACC TGC	<i>Nitrosomonas</i> sp.	Juretschko, unveröffentlicht
S [*] -Nscmo-1468-a-A-18	1468	CAG TCA TGA CTC TCA CCG	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	Juretschko, 2000
S [*] -Nse-1472-a-A-18	1472	ACC CCA GTC ATG ACC CCC	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Nitrosomonas eutropha</i> , <i>Nitrosomonas halophila</i>	Juretschko <i>et al.</i> , 1998
Nsm1026	1028	CTG TGT CTT GGC TCC CTT TC	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Nitrosomonas eutropha</i> , <i>Nitrosomonas halophila</i>	Juretschko, unveröffentlicht
Nsm1026b	1028	CTG TGT CTT GGT TCC CTT TC	<i>Nitrosococcus</i> sp.	Juretschko, unveröffentlicht
Nsm156	156	TAT TAG CAC ATC TTT CGA T	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus mobilis</i>	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
Nso1225	1225	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	β-Ammoniumox.	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
Nso148	148	CAT CTT TCG ATG CGT TAT	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus</i> spp., <i>Nitrospira</i> spp.	Juretschko, unveröffentlicht
Nso148b	148	CAC CTT TCG GTG CGT TAT	<i>Nitrospira</i> spp., <i>Nitrosovibrio</i> spp., <i>Nitrosolobus multiformis</i>	Juretschko, unveröffentlicht

³¹ Erfasst auch einige Vertreter der γ-Proteobakterien

Name	Pos. ²⁹	Sequenz (5' → 3')	Spezifität ³⁰	Herkunft
Nso190	190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	β-Ammoniumox.	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
Nsv443	444	CCG TGA CCG TTT CGT TCC G	<i>Nitrosospira briensis</i> , <i>Nitrosolobulus multiformis</i> , <i>Nitrosovibrio tenuis</i>	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
SNA23a	656	CAT CCC CCT CTA CCG TAC	<i>Sphaerotilus natans</i>	Wagner, 1995
S*-Zora-1414-a-A-20	1414	TTC TGG TAA ACC CCA CTC CC	<i>Zoogloea ramigera</i> ATCC19544 ^T , <i>Thiobacillus cuprinus</i> , A16, H7, H10, H11, H13, H22, H27, H40, S21	Juretschko, 2000
ZRA	647	CTG CCG TAC TCT AGT TAT	<i>Zoogloea ramigera</i> ATCC19544 ^T	Rosselló-Mora <i>et al.</i> , 1995
<i>γ-Proteobacteria</i>				
S*-Nscoc-1248-a-A-18	1248	TGC TTG GCC ACC CTC TGT	<i>Nitrosococcus oceani</i> , <i>Nitrosococcus halophilus</i>	Juretschko, 2000
S*-Nscoc-128-a-A-18	128	CCC CTC TAG AGG CCA GAT	<i>Nitrosococcus oceani</i> , <i>Nitrosococcus halophilus</i>	Juretschko, 2000
S*-Nscoc-65-a-A-18	65	CTT AAG CGC TGC TGC CGT	<i>Nitrosococcus oceani</i> , <i>Nitrosococcus halophilus</i>	Juretschko, 2000
S*-Ntcoc-206-a-A-18	206	CGG TGC GAG CTT GCA AGC	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Juretschko, 2000
S*-Ntcoc-84-a-A-18	84	TCG CCA GCC ACC TTT CCG	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Juretschko, 2000
<i>δ-Proteobacteria</i>				
S*-Ntspn-693-a-A-20	693	TTC CCA ATA TCA ACG CAT TT	<i>Nitrospina gracilis</i>	Juretschko, 2000
S*-Ntspn-994-a-A-18	994	CAA GGC GGT CCC AAG CAA	<i>Nitrospina gracilis</i>	Juretschko, 2000
„Grüne, nicht schwefelhaltige Bakterien“				
S*-GNS-1404-a-A-18	1404	CCA GCT CCC ATG ACG TGA	A4b, A11b, A30, H1, H5, H8, H19, H39, S9, S14, S16, S38, S41	Juretschko, 2000
S*-GNS1-207-a-A-18	207	CTC AAG GCG AAT CCT TTC	A31, S47	Juretschko, 2000
S*-GNS1-629-a-A-18	629	GTT AGT CTC CAA TGA CCT	A31, S47	Juretschko, 2000
S*-GNS2-1003-a-A-18	1003	CAC CTT TCG GAT CCC TAC	A11b, A30, H1, H19, S16	Juretschko, 2000
S*-GNS2-649-a-A-20	649	TTC CTC TTC TAC TCT CAA GT	A11b, A30, H1, H19, S16	Juretschko, 2000
S*-GNS3d-655-a-A-21	655	TTC TAC ACG CCT CTA CCA TAC	H8, S9, S14	Juretschko, 2000
S*-GNS4-1345-a-A-18	1345	AGC TGT CCT GCG GTT ACT	H39, S41	Juretschko, 2000
<i>Acidobacteria</i>				
S*-H/A-1400-a-A-18	1400	CTT TCG TGA TGT GAC GGG	A22, A34, H3, H44, S6	Juretschko, 2000
S*-H/A/A-359-a-A-18	360	CCA TTG CGA ACA ATT CCC	A22, A34, H3	Juretschko, 2000
S*-H/A/C-719-a-A-20	719	CAA CCC GTC TTC ACC TCA GG	H44, S6	Juretschko, 2000

Name	Pos. ²⁹	Sequenz (5' → 3')	Spezifität ³⁰	Herkunft
<i>Nitrospira</i>				
S*-A4/11-211-a-A-18	211	ATC AAA GAG CGC CGC ACT	A4, A11	Juretschko, 2000
S*-Ntspa-1026-a-A-18	1026	AGC ACG CTG GTA TTG CTA	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , A4, A11	Juretschko, 2000
S-G-Ntspa-0662-a-A-18	662	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	<i>Nitrospira</i> spp. Gattung	Daims <i>et al.</i> , xxxxa
S*-Ntspa-0712-a-A-21	712	CGC CTT CGC CAC CGG CCT TCC	<i>Nitrospira</i> spp. Phylum mit Ausnahmen	Daims <i>et al.</i> , xxxxa
<i>Planctomycetes / Chlamydiae</i>				
Pla46	46	GAC TTG CAT GCC TAA TCC	<i>Planctomyces</i> spp., <i>Chlamydia</i> spp.	Neef, 1997
Pla886	886	GCC TTG CGA CCA TAC TCC C	<i>Planctomyces</i> spp.	Neef, 1997

Schwierig ist eine Evaluierung der Sonden in der Mikrotiterplatte, wenn keine Reinkulturen zur Verfügung stehen, wie dies in einigen Fällen, z.B. bei der Gattung *Nitrospira*, der Fall ist. In diesen Fällen wurden, soweit möglich, Klone aus diversen Genbanken (Juretschko, 2000; Daims, 2001) zur Hybridisierung verwendet. In folgender Tabelle (Tab. C10) sind die optimalen Bedingungen für jede Sonde und die sich ergebenden Signalstärken angegeben.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der überwiegende Teil der bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bewährten Sonden auch sehr gut für die reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte geeignet ist.

Tabelle C10: Optimale Hybridisierungsbedingungen und zugehörige Signalintensitäten der Sonden aus Tab. C9; Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (vgl. B.11.2; Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: x% FA, 37 °C); die aufgeführten 16S-rDNS-Klone A, H und S beziehen sich auf die Genbank von Juretschko (2000), die übrigen Arten auf die in Tab. B1 genannten Stämme

Name	Spez. lt. Datensatz	Kein Signal mit	Signal mit	x% FA	Signal
EUB338	Bakterien	<i>Nitrosococcus mobilis</i> , A1-19	<i>E. coli</i> (DSM 498), <i>Nitrobacter</i> sp. (215), <i>Nitrosococcus mobilis</i> (NC 2), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>), A2-22	10-15	+ + ++ + ++
EUB338-II	Ergänzung zu EUB338 (Daims <i>et al.</i> , 1999)	<i>E. coli</i> (DSM 498), <i>Nitrobacter</i> sp. (215), <i>Nitrosococcus mobilis</i> (NC 2), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>), A2-22	A1-19	10-15	+
EUB338-III	Ergänzung zu EUB338 (Daims <i>et al.</i> , 1999)	<i>E. coli</i> (DSM 498), <i>Nitrobacter</i> sp. (215), <i>Nitrosococcus mobilis</i> (NC 2), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>), A1-19, A2-22	-	15	-

Name	Spez. lt. Datensatz	Kein Signal mit	Signal mit	x% FA	Signal
<i>α-Proteobacteria</i>					
ALF1b	α-Proteobakterien	<i>N. europaea</i> (1), A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	A1-3, H4, H34, S2	> 20	++
ALF968	α-Proteobakterien	<i>N. europaea</i> (1), A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	A1-3, H4, H34, S2	5-10	+ ++
S*-Alph-1026-a-A-18	H4, H6, H29, S7	A1-7, H9	H4, H6, H29, S7	5-20	++
S*-Alph-1349-a-A-18	H4, H6, H29, S7	A1-7, H9	H4, H6, H29, S7	5-20	++
S*-Alph2-65-a-A-20	H46, S43	A1-3, H34	H46, S43	5-20	++
Hvu1034	<i>Hyphomicrobium vulgare</i>	A1-3, A2-7, A2-39	A2-27	5-20	++
S*-Hyvu-128-a-A-20	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> , A7b, A39	A1-3, A2-27, H7, H10, H11, H13	A2-7, A2-39	5-20	++
NIT3	<i>Nitrobacter</i> spp.	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>Nitrobacter</i> sp. (215)	5-15	++
Par651	<i>Paracoccus</i> spp. ohne <i>P. alcaliphilus</i>	H42	<i>P. denitrificans</i> , S2	5-20	++
S*-RhBla-1110-a-A-19	A10, A15b, A26	H42, S2	A1-10, A1-26, A2-15	15-20	++
<i>β-Proteobacteria</i>					
S*-A21b-213-a-A-18	A21b	A1-13, H7	A2-21	5-15	+
S*-Azo-131-a-A-18	A33, H25, H30, H35, S3, S10, S23	<i>N. europaea</i> (1), H7	A33, H25, H30, H35, S3, S10, S23	5-15	++
S*-Azo-466-a-A-20	A33, H25, H30, H35, S3, S10, S23	<i>N. europaea</i> (1), H7	A33, H25, H30, H35, S3, S10	5-15	++
S*-Bmde-177-a-A-18	<i>Brachymonas denitrificans</i> , A6b	A1-15, H7, H10, H11, H13, H21	A1-6	5-20	++
BONE23a	β1-Proteobakterien	A2-26	A1-6, A1-15, H21	5-10	+ o
S*-Chol-1425-a-A-18 ³²	A13, H12, H20, H23, S28, S40	H12, S3, S10	A13, H20, H23, S28, S40	15	++
S*-Chol-444-a-A-20	A13, H12, H20, H23, S28, S40	H12, S3, S10	A13, H20, H23, S28, S40	5-20	++
S*-Chol-645-a-A-18	A13, H12, H20, H23, S28, S40	A13, H12, S3, S10, S28	H20, H23, S40	5-15	+ o
S*-H21-444-a-A-18	H21	A1-6, A1-15	H21	10-15	++
S*-H7-1013-a-A-18	H7	<i>Z. ramigera</i> , H10	H7	5-10	o
S*-Idde-644-a-A-18	<i>Alcaligenes latus</i> , A2, A15, A26b	<i>A. eutrophus</i> , A1-15, H7, H10, H11, H13, H21	A1-2, A2-6, A2-26	> 20	++
LDI23a	<i>Leptothrix discophora</i>	A1-15	A1-2, A2-6, A2-26	20	+
NEU	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus mobilis</i>	<i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i>	5-10	++ +
NmIV	<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> Linie	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrobacter</i> sp. (215), A1-11 (<i>Nitrospira</i>), H21	-	15-20	-

³² Erfasst auch einige Vertreter der γ-Proteobakterien

Name	Spez. lt. Datensatz	Kein Signal mit	Signal mit	x% FA	Signal
NmV	<i>Nitrosococcus mobilis</i> Linie	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	> 20	++
Noli1434	<i>Nitrosomonas</i> sp.	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrobacter</i> sp. (215), A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	-	5-20	-
S-*-Nscmo-1468-a-A-18	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , H7, H10, H11, H13	-	10-20	-
S-*-Nse-1472-a-A-18	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Nitrosomonas eutropha</i> , <i>Nitrosomonas halophila</i>	<i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>N. europaea</i> (1)	5-15	o
Nsm1026	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Nitrosomonas eutropha</i> , <i>Nitrosomonas halophila</i>	<i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrobacter</i> sp. (215), A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>N. europaea</i> (1)	15	++
Nsm1026b	<i>Nitrosococcus</i> sp.	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrobacter</i> sp. (215), A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	15	++
Nsm156	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus mobilis</i>	<i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i>	5-15	+ ++
Nso1225	β -Ammoniumox.	<i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i>	15	++ o
Nso148	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus</i> spp., <i>Nitrospira</i> spp.	<i>Nitrobacter</i> sp. (215), A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i>	5-15	+ ++
Nso148b	<i>Nitrospira</i> spp., <i>Nitrosovibrio</i> spp., <i>Nitrosolobus multiformis</i>	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrobacter</i> sp. (215), A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	-	5-20	-
Nso190	β -Ammoniumox.	<i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i>	5-15	++ +
Nsv443	<i>Nitrospira briensis</i> , <i>Nitrosolobulus multiformis</i> , <i>Nitrosovibrio tenuis</i>	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4), <i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	-	5-20	-
SNA23a	<i>Sphaerotilus natans</i>	A1-2, A1-15, A2-6, A2-26	-	5-20	-

Name	Spez. lt. Datensatz	Kein Signal mit	Signal mit	x% FA	Signal
S*-Zora-1414-a-A-20	<i>Zoogloea ramigera</i> ATCC19544 ^T , <i>Thiobacillus cuprinus</i> , A16, H7, H10, H11, H13, H22, H27, H40, S21	A1-13, A2-21	<i>Z. ramigera</i> , A1-16, H7, H10, H11, H13, H22, H27, H40, S21	15-20	0 ++ ++ ++
ZRA	<i>Zoogloea ramigera</i> ATCC19544 ^T	<i>Z. ramigera</i> , A1-13, A2-21	A1-16, H7, H10, H11, H13, H22, H27, H40, S21	5-15	+
<i>γ-Proteobacteria</i>					
S*-Nscoc-1248-a-A-18	<i>Nitrosococcus oceani</i> , <i>Nitrosococcus halophilus</i>	-	-	-	-
S*-Nscoc-128-a-A-18	<i>Nitrosococcus oceani</i> , <i>Nitrosococcus halophilus</i>	-	-	-	-
S*-Nscoc-65-a-A-18	<i>Nitrosococcus oceani</i> , <i>Nitrosococcus halophilus</i>	H7, H10, H11, H13	-	5-20	-
S*-Ntcoc-206-a-A-18	<i>Nitrococcus mobilis</i>	<i>E. coli</i> , <i>Nitrococcus mobilis</i> (NC 2), <i>P. aeruginosa</i> , H7, H10, H11, H13	-	20	-
S*-Ntcoc-84-a-A-18	<i>Nitrococcus mobilis</i>	<i>E. coli</i> , <i>Nitrococcus mobilis</i> (NC 2), <i>P. aeruginosa</i> , H7, H10, H11, H13	-	20	-
<i>δ-Proteobacteria</i>					
S*-Ntspn-693-a-A-20	<i>Nitrospina gracilis</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , H7, H10, H11, H13	<i>Nitrospina</i> sp.	5-20	++
S*-Ntspn-994-a-A-18	<i>Nitrospina gracilis</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>Nitrospina</i> sp.	5-15	++
„Grüne, nicht schwefelhaltige Bakterien“					
S*-GNS-1404-a-A-18	A4b, A11b, A30, H1, H5, H8, H19, H39, S9, S14, S16, S38, S41	A2-31	A2-4, S9, A2-11, A2-30, H5, H8, H19, H39, S14, S16	15	+ ++ ++
S*-GNS1-207-a-A-18	A31, S47	H5, H39	A2-31	5-20	++
S*-GNS1-629-a-A-18	A31, S47	H5, H39	A2-31	5-20	++
S*-GNS2-1003-a-A-18	A11b, A30, H1, H19, S16	H5, H39	A2-11, A2-30, H19, S16	5	0
S*-GNS2-649-a-A-20	A11b, A30, H1, H19, S16	H5, H39	A2-11, A2-30, H19, S16	5-10	++ 0
S*-GNS3d-655-a-A-21	H8, S9, S14	A2-11, H6, H39, S14	S9	5-20	++
S*-GNS4-1345-a-A-18	H39, S41	A2-31, H5	H39	5-15	++
<i>Acidobacteria</i>					
S*-H/A-1400-a-A-18	A22, A34, H3, H44, S6	A1-3	A2-22, H3, H44, S6	5-15	++
S*-H/A/A-359-a-A-18	A22, A34, H3	H44, S6	A2-22, H3	5-15	++
S*-H/A/C-719-a-A-20	H44, S6	A2-22, H3	H44, S6	5-20	++

Name	Spez. lt. Datensatz	Kein Signal mit	Signal mit	x% FA	Signal
<i>Nitrospira</i>					
S*-A4/11-211-a-A-18	A4, A11	<i>Nitrospina</i> sp., A1-4	A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	5-15	+
S*-Ntspa-1026-a-A-18	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , A4, A11	<i>Nitrospina</i> sp., A1-4, H7, H10, H11, H13	A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	5-15	++
S-G-Ntspa-0662-a-A-18	<i>Nitrospira</i> spp. Gattung	<i>N. europaea</i> (1), <i>Nitrosococcus mobilis</i> , <i>Nitrobacter</i> sp. (K 3.4) / (215) / (Nb 4)	<i>Nitrospira</i> sp., A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	5-20	++
S*-Ntspa-0712-a-A-21	<i>Nitrospira</i> spp. Phylum mit Ausnahmen	<i>Nitrospina</i> sp., A1-4	A1-11 (<i>Nitrospira</i>)	15-20	++
<i>Planctomycetes / Chlamydiae</i>					
Pla46	<i>Planctomyces</i> spp., <i>Chlamydia</i> spp.	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	A1-8, A1-12, A1-19, A2-1, A2-24	5-20	++
Pla886	<i>Planctomyces</i> spp.	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	A1-8, A1-12, A1-19, A2-1, A2-24	5-20	++

- o: Schwaches Hybridisierungssignal
 +: Starkes Hybridisierungssignal
 ++: Sehr starkes Hybridisierungssignal

Für die Gattung *Nitrospira*, die für die Nitritoxidation, z.B. in Kläranlagen, große Bedeutung hat (Daims, 2001), wurden spezifische Primer konstruiert. In Tab. C11 sind die Sequenzen der beiden Primer aufgeführt, die in Kombination eine spezifische Amplifikation von rDNS der im Sequenzdatensatz genannten Nitrospiren ermöglichen. In Tab. C12 sind die optimalen Annealingtemperaturen für den Einsatz der vorgeschlagenen Primerpaare bei der PCR zusammengestellt.

Tabelle C11: Gegen die 16S-rDNS gerichtete Primer zur spezifischen Amplifikation der rDNS von *Nitrospira* spp.

Name	Pos. ³³	GC [%]	Sequenz (5' → 3')	Spezifität	Herkunft
Nsp961R	961	50,0	GTT TTT CGC GTT GCA TGC	<i>Nitrospira briensis</i>	Diese Arbeit
Nsp1213R	1213	69,4	CGT GTG TRG CCC CAG GCA	<i>Nitrospira marina</i> <i>Nitrospira moscoviensis</i>	Diese Arbeit

R: Rückwärtsprimer (bindet an - bzw. nicht kodierenden Strang)

Tabelle C12: Primerpaare und deren Annealingtemperaturen zur Amplifikation der 16S-rDNS von *Nitrospira* spp.

Amplifizierte rDNS	Primer 1	Primer 2	Annealingtemperatur [°C]
16S	616V	Nsp961R	56
16S	616V	Nsp1213R	56

³³ *E. coli* (Brosius et al., 1981)

Durch Verwendung dieser spezifischen Amplifikate zur Hybridisierung konnte die Empfindlichkeit der reversen Hybridisierung in Bezug auf den Nachweis von Nitrospiren in Klärschlammproben deutlich gesteigert werden (vgl. C.7.1.2).

7 Untersuchung von Realproben

Um die Praxistauglichkeit der entwickelten Sonden und der optimierten Bedingungen für die Hybridisierung zu demonstrieren, wurden Proben aus den verschiedensten Bereichen verwendet und auf die Anwesenheit von Enterokokken bzw. Ammonium- und Nitritoxidierer untersucht.

7.1 Untersuchung von Klärschlammproben

7.1.1 Untersuchung auf Enterokokken

Für die Untersuchung einer Probe aus der Kläranlage Ingolstadt (BF1) wurde eine Auswahl der Enterokokkensonden verwendet, die einen Großteil der Enterokokken erfassen. Da eine Amplifikation mit Universalprimern kein aussagekräftiges Ergebnis lieferte, wurde mit diesem Amplifikat eine zweite, spezifische PCR („Nested PCR“) mit den Primerpaaren 118V-Enc38 und Enc38i-985R durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt zeigt bereits die Anwesenheit von Enterokokken an. Bei der Hybridisierung ergaben sich folgende Ergebnisse:

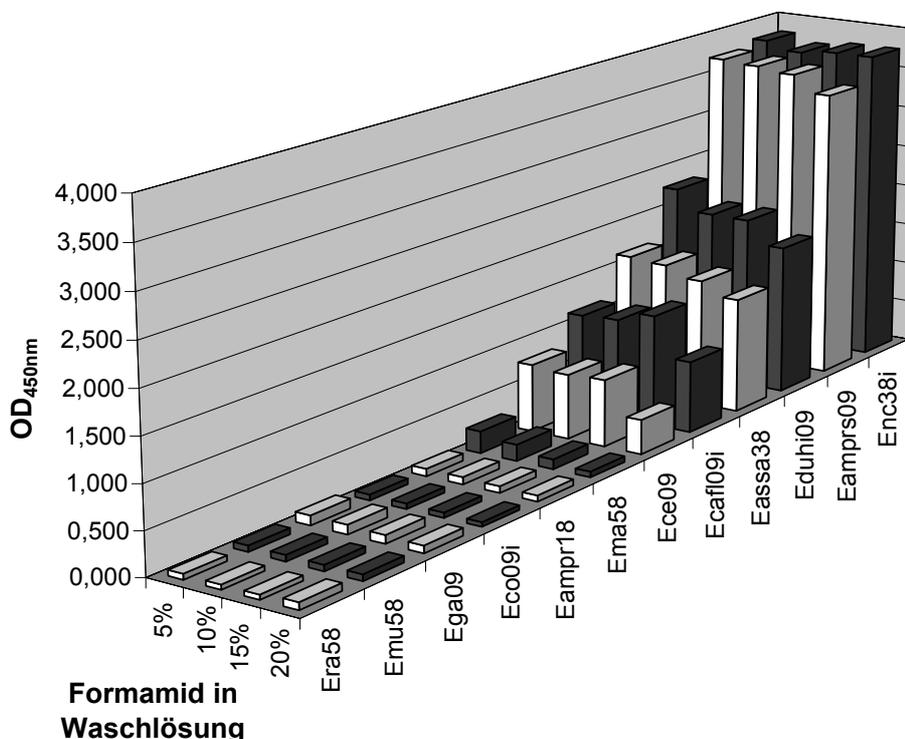


Abbildung C14: Ingolstadt (BF1); Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (vgl. B.11.2, 5% FA in Hybridisierungslösung) mit 5'-phosphorylierten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4

Deutlich erkennbar ist in Abb. C14 das Signal der ‚Enterokokkengattungssonde‘ Enc38i. Da diese Sonde als Primer verwendet wurde, dient sie in diesem Fall als Positivkontrolle der Hybridisierung. Durch die Teilgruppensonden lässt sich das Spektrum der enthaltenen Enterokokken einschränken. So ergab die Hybridisierung mit der Sonde Eamprs09 (spezifisch für *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. sulfureus*) ein deutlich positives Signal, die Hybridisierung mit Eampr18 (spezifisch für *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*) dagegen nicht. Dies spricht für die Anwesenheit von *E. sulfureus*. Ferner ist *E. durans* oder *E. hirae* enthalten, da mit der Sonde Eduhi09 ein starkes Signal erhalten wurde. Eassa38 zeigt die Anwesenheit von *E. asini* oder *E. saccharolyticus* an, Ecaf109i die Anwesenheit von *E. casseliflavus* oder *E. flavescens*. Schließlich wird durch die Sonde Ece09 die Anwesenheit von *E. cecorum* angezeigt.

Mit der Sonde Emu58 wurde bei 5% und 10% FA ein leicht positives Ergebnis erhalten. Diese Sonde ist aber erst ab einem FA-Gehalt von 15% auswertbar, da bei niedrigeren FA-Gehalten falsch positive Signale möglich sind (vgl. Tab. C7). Bei 15% FA liegt der Wert der OD aber bei ca. 0,1 und ist damit nicht mehr als positives Signal zu werten (vgl. C.5).

Keine Signale wurden mit den Sonden Era58, Emu58, Ega09, Eco09i und Eampr18 erhalten (Spezifitäten sind in Tab. C4 angegeben).

Zusammenfassend ließen sich in der Klärschlammprobe Ingolstadt (BF1) folgende Enterokokken nachweisen:

- *E. cecorum*
- *E. sulfureus*
- *E. durans* und / oder *E. hirae*
- *E. casseliflavus* und / oder *E. flavescens*
- *E. asini* und / oder *E. saccharolyticus*

Falls für die Untersuchung eine genauere Identifizierung benötigt wird, z.B. ob *E. durans* oder *E. hirae* oder beide in der Probe enthalten sind, kann dies durch die Anwendung des vollständigen SONDENSATZES erreicht werden. Auch kann dann die Anwesenheit der o.g. Enterokokken weiter abgesichert und die An- oder Abwesenheit von Enterokokken, die mit diesem eingeschränkten SONDENSATZ nicht detektiert werden können, wie z.B. *E. faecalis* und *E. faecium*, geklärt werden.

7.1.2 Untersuchung auf Ammonium- und Nitritoxidierer

Im Falle der ammonium- und nitritoxidierenden Bakterien konnten direkte Vergleiche mit Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen getroffen werden. Dazu wurde eine Probe aus der Kläranlage Ingolstadt (SBBR1) mit Sonden, mit denen bereits eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung dieser Probe durchgeführt wurde (Daims *et al.*, 2001), untersucht. Dabei handelte es sich um die Sonden S-G-Ntspa-0662-a-A-18 (kurz: Ntspa662), NEU, Nso1225, Nso190, NmV und NIT3 (Spezifitäten sind in Tab. C13 angegeben). Zusätzlich wurden die Sonden Nsm1026, Noli1434, Nso148, Nsm156 und Nsm1026b (Spezifitäten sind in Tab. C13 angegeben) für die Untersuchung verwendet.

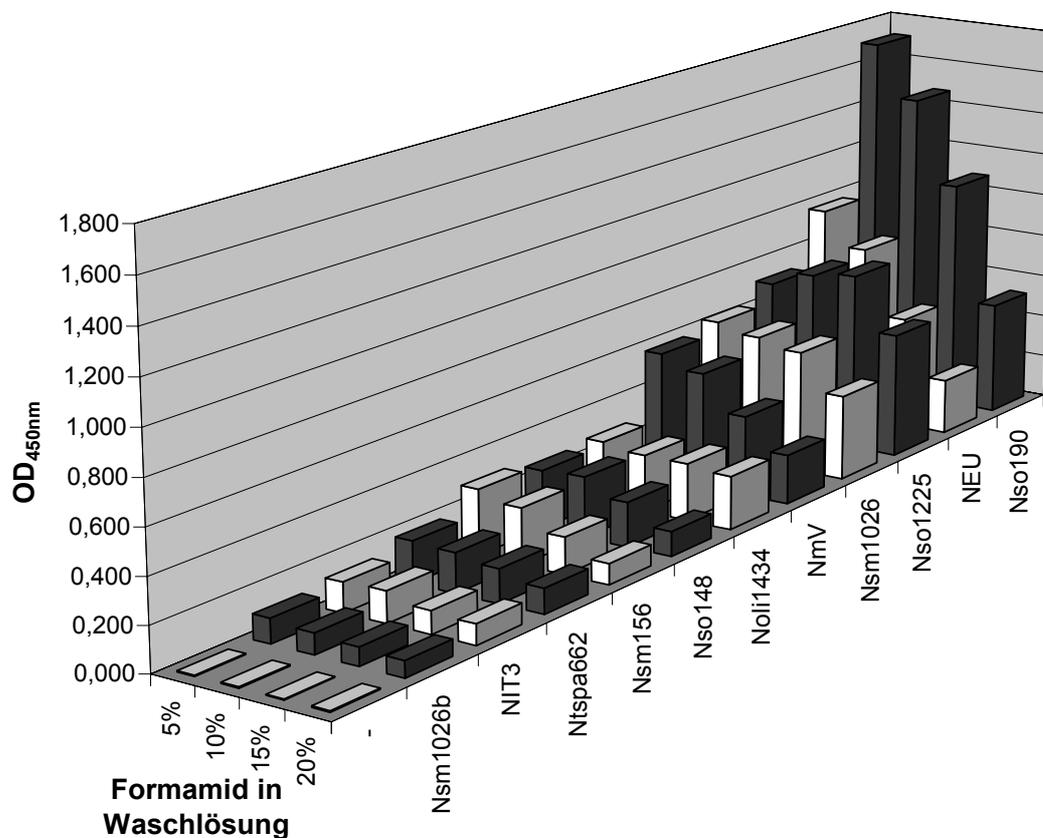


Abbildung C15: Ingolstadt (SBBR1); Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (vgl. B.11.2, 5% FA in Hybridisierungslösung) mit 5'-phosphorylierten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C13

Deutlich positive Signale lieferte die Hybridisierung mit den Sonden Nso190, NEU, Nso1225 und Nsm1026. Schwache Signale wurden auch mit den Sonden Noli1434, Nso148 und Nsm156 erhalten. Keine Signale ergab dagegen die Hybridisierung mit den Sonden Nsm1026b, NIT3 und Ntspa662.

Die Sonde NmV ist erst bei FA-Gehalten über 20% spezifisch, da bei niedrigerer Stringenz auch *N. europaea* mit dieser Sonde ein Signal liefert. Da aber der Wert bei 20% FA nur noch knapp über der Ausschlussgrenze von 0,2 (Mittelwert der Negativkontrollen + 3 x Standardabweichung der Negativkontrollen) liegt und bei einer

Erhöhung der FA-Konzentration kein deutliches Signal mehr zu erwarten ist, wurde auf die Verwendung stringenterer Waschbedingungen verzichtet. Außerdem sollte bei Anwesenheit von *Nitrosococcus mobilis* auch die Sonde Nsm1026b ansprechen, was aber hier nicht der Fall war. In Tab. C13 sind die Spezifitäten der Sonden und die Ergebnisse der reversen Hybridisierung zusammengestellt.

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung lieferte hier folgende Ergebnisse (Daims *et al.*, 2001): Mit den Sonden NEU, Nso190, Nso1225, NmV, NIT3, S-G-Ntspa-0662-a-A-18 und S*-Ntspa-0712-a-A-21 konnten Zellen detektiert werden. (Spezifitäten: vgl. Tab. C13). Die Sonden für Ammoniumoxidierer zeigten ein interessantes Hybridisierungsmuster. So waren Zellen erkennbar, die durch die Sonden NEU bzw. NEU und NmV aber nicht durch Nso1259 gefärbt waren. Dies deutet auf die Anwesenheit von mindestens zwei neuen Ammoniumoxidierern (neue Art oder neuer Stamm von *Nitrosomonas* bzw. *Nitrosococcus*) hin, da die Sonde Nso1259 alle bekannten Zielorganismen der Sonden NEU und NmV detektiert (Daims *et al.*, 2001).

Solche Unterscheidungen sind bei der reversen Hybridisierung nicht durchführbar, da keine Zuordnung der Hybridisierungssignale zu einzelnen Zellen möglich ist. Die Sonde NmV ergab sowohl bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung als auch bei niedrigeren Stringenzen in der Mikrotiterplatte ein Signal. Die Sonde Nsm1026b, spezifisch für *Nitrosococcus* sp., ergab in der Mikrotiterplatte kein Signal. Für diese Sonde liegen keine Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung vor.

In der von dieser Probe angelegten 16S-rDNS Genbank konnte kein *Nitrosococcus* gefunden werden (Daims *et al.*, 2001). Dies würde dem Ergebnis in der Mikrotiterplatte eher entsprechen. Für eine zuverlässige Aussage sind aber die Probleme der DNS-Isolierung und der PCR zu berücksichtigen, wie dies am Beispiel *Nitrospira* gezeigt wurde (s.u.).

Für die übrigen Ammoniumoxidierer ist eine gute Übereinstimmung feststellbar. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung kann durch Messung der Flächen der nach der Hybridisierung gefärbten Zellen erfolgen (Bouchez *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2000; Daims *et al.*, xxxb). In diesem Fall ergab die quantitative Auswertung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen einen Flächenanteil von ca. 55% für die mit den Sonden Nso1225, NEU und NmV markierten Zellen (Daims *et al.*, 2001). Bei der Hybridisierung in der Mikrotiterplatte erreichten diese Sonden, besonders Nso1225 und NEU, ebenfalls recht hohe Werte.

Daneben zeigten auch die zusätzlich in der Mikrotiterplatte verwendeten Sonden Nso190 und Nsm1026 relativ starke Signale. Dies ist ebenfalls mit den Ergebnissen der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung in Einklang zu bringen. Nso190 zeigt wie Nso1225 die Anwesenheit von Ammoniumoxidierern der β -Proteobakterien an. Die Sonde

Nsm1026 deutet auf die Anwesenheit von *Nitrosomonas* spp. hin. Diese wiederum hybridisieren mit den Sonden NEU, Nso190 und Nso1225. In der Probe sind also Vertreter der Gattung *Nitrosomonas* vorhanden.

Schwächere, aber doch positive Signale wurden auch mit den Sonden Noli1434, Nso148 und Nsm156 erhalten. Dies ergibt aber keine zusätzliche Information, da diese Sonden bei Anwesenheit von *Nitrosomonas* spp. sowieso ein Signal ergeben.

In folgender Tabelle (Tab. C13) sind die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung den Ergebnissen der reversen Hybridisierung gegenübergestellt.

Tabelle C13: Vergleich der Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Daims *et al.*, 2001) mit den Ergebnissen der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte

Sonde	Signal		Spezifität
	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte	
NEU	+	+	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus mobilis</i>
Nso190	+	+	β -Ammoniumox.
Nso1225	+	+	β -Ammoniumox.
NmV	+	+ ³⁴	<i>Nitrosococcus mobilis</i> Linie
NIT3	+	-	<i>Nitrobacter</i> spp.
S-G-Ntspa-0662-a-A-18	+	+ ³⁵	<i>Nitrospira</i> spp. Gattung
S*-Ntspa-0712-a-A-21	+	n.u.	<i>Nitrospira</i> spp. Phylum mit Ausnahmen
Noli1434	n.u.	o	<i>Nitrosomonas</i> sp.
Nsm1026	n.u.	+	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Nitrosomonas eutropha</i> , <i>Nitrosomonas halophila</i>
Nsm1026b	n.u.	-	<i>Nitrosococcus</i> sp.
Nsm156	n.u.	o	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus mobilis</i>
Nso148	n.u.	o	<i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrosococcus</i> spp., <i>Nitrospira</i> spp.

- : Kein Hybridisierungssignal
- o: Schwaches Hybridisierungssignal
- +: Starkes Hybridisierungssignal
- ++: Sehr starkes Hybridisierungssignal
- n.u.: Nicht untersucht

³⁴ Zeigt bei der reversen Hybridisierung bei 5-20% FA positives Signal; in diesem Stringenzbereich wurde in Vorversuchen auch ein Signal mit *N. europaea* erhalten

³⁵ Bei Verwendung der DNS-Isolierung mit der „Bead-Beating-Methode“ bzw. bei Verwendung spezifischer Primer

Beim Vergleich der beiden Hybridisierungsvarianten bei den nitritoxidierenden Bakterien werden die Probleme der reversen Hybridisierung deutlich. Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung konnte zwar ein geringer Anteil an *Nitrobacter*-Zellen in der Probe nachgewiesen werden (Sonde NIT3), aber weder in der Genbank, noch bei der reversen Hybridisierung konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Noch deutlicher zeigte sich ein Unterschied bei der Gattung *Nitrospira*. Hier wurde *in situ* eine relativ hohe Abundanz festgestellt, und auch in der Genbank waren noch 5 Nitrospiraklone (von >100 Klonen) enthalten. Bei der reversen Hybridisierung wurde dagegen zunächst kein Signal detektiert.

Dies kann zum einen an der DNS-Isolierung und zum anderen an sequenzspezifischen PCR-Unzulänglichkeiten (Knopp *et al.*, 2000) liegen. Im vorliegenden Fall konnten durch Anwendung verschiedener DNS-Isolierungsmethoden Nitrospiren nachgewiesen werden. Durch Verwendung eines spezifischen Primers konnte die Empfindlichkeit noch erheblich gesteigert werden, sodass auch in der ursprünglich isolierten DNS Nitrospiren detektiert werden konnten.

In den folgenden Versuchen wurde aus derselben Probe (Kläranlage Ingolstadt, SBBR1) DNS mit der Methode nach Zhou *et al.* (1996, mod.) (vgl. B.4.4) und mit der „Bead-Beating-Methode“ (vgl. B.4.5) isoliert und jeweils eine PCR mit Universalprimern (616V-630R) und mit nitrospiraspezifischen Primern in Verbindung mit einem Universalprimer (616V-Nsp961R / Nsp1213R) durchgeführt (vgl. B.8 und Tab. C12). Aus der PCR mit den Universalprimern wurde ein ‚universelles‘ PCR-Produkt, aus der PCR mit den nitrospiraspezifischen Primern ein ‚nitrospiraspezifisches‘ PCR-Produkt erhalten. Die Hybridisierung erfolgte mit den Sonden Nso190 (spezifisch für β -Ammoniumoxidierer) und Ntspa662 (spezifisch für die Gattung *Nitrospira*). Vorausgehende Untersuchungen zeigten die Anwesenheit von zu den β -Ammoniumoxidierern zählenden *Nitrosomonas* spp. Die Hybridisierung des ‚universellen‘ PCR-Produktes mit der Sonde Nso190 diente daher bei den folgenden Versuchen als Positivkontrolle, die Hybridisierung des ‚nitrospiraspezifischen‘ PCR-Produktes mit der Sonde Nso190 als Negativkontrolle.

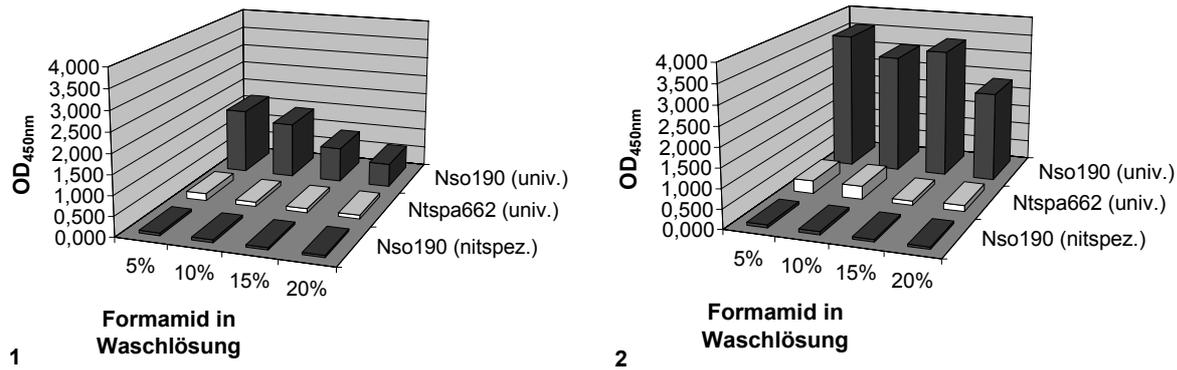


Abbildung C16: Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (vgl. B.11.2, 5% FA in Hybridisierungslösung) mit den 5'-phosphorylierten Sonden Nso190 (spezifisch für β -Ammoniumoxidierer) und Ntspa662 (spezifisch für die Gattung *Nitrospira*); Abkürzungen: univ.: Amplifikation mit Universalprimern (616V-630R); nitspez.: Amplifikation mit nitrospiraspezifischen Primern (616V-Nsp961R / Nsp1213R); **1:** Probe Ingolstadt (SBBR1), DNS-Isolierung nach Zhou *et al.* (1996, mod.); **2:** Probe Ingolstadt (SBBR1), DNS-Isolierung mit „Bead-Beating-Methode“

In Abb. C16 ist der Einfluss der verwendeten DNS-Isolierung gezeigt. Für beide Hybridisierungen wurde die gleiche Menge PCR-Produkt verwendet und unter den gleichen Bedingungen in derselben Mikrotiterplatte hybridisiert. Bei beiden Sonden konnte ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Die Sonde Nso190 zeigte nach Hybridisierung mit amplifizierter, mit der „Bead-Beating-Methode“ isolierter DNS ein mehr als doppelt so starkes Signal. Das Signal von Ntspa662 lag nach Hybridisierung mit amplifizierter, mit der Methode nach Zhou *et al.* (1996, mod.) isolierter DNS mit einem Wert von 0,180 unter der Ausschlussgrenze; nach Hybridisierung mit amplifizierter, mit der „Bead-Beating-Methode“ isolierter DNS dagegen lag der Wert des Signals ($OD_{450\text{ nm}} = 0,334$) deutlich über der Ausschlussgrenze.

Durch Verwendung nitrospiraspezifischer Primer konnte die Empfindlichkeit soweit gesteigert werden, dass auch mit der nach Zhou *et al.* (1996, mod.) isolierten DNS ein Signal mit Ntspa662 erreicht werden konnte (vgl. Abb. C17).

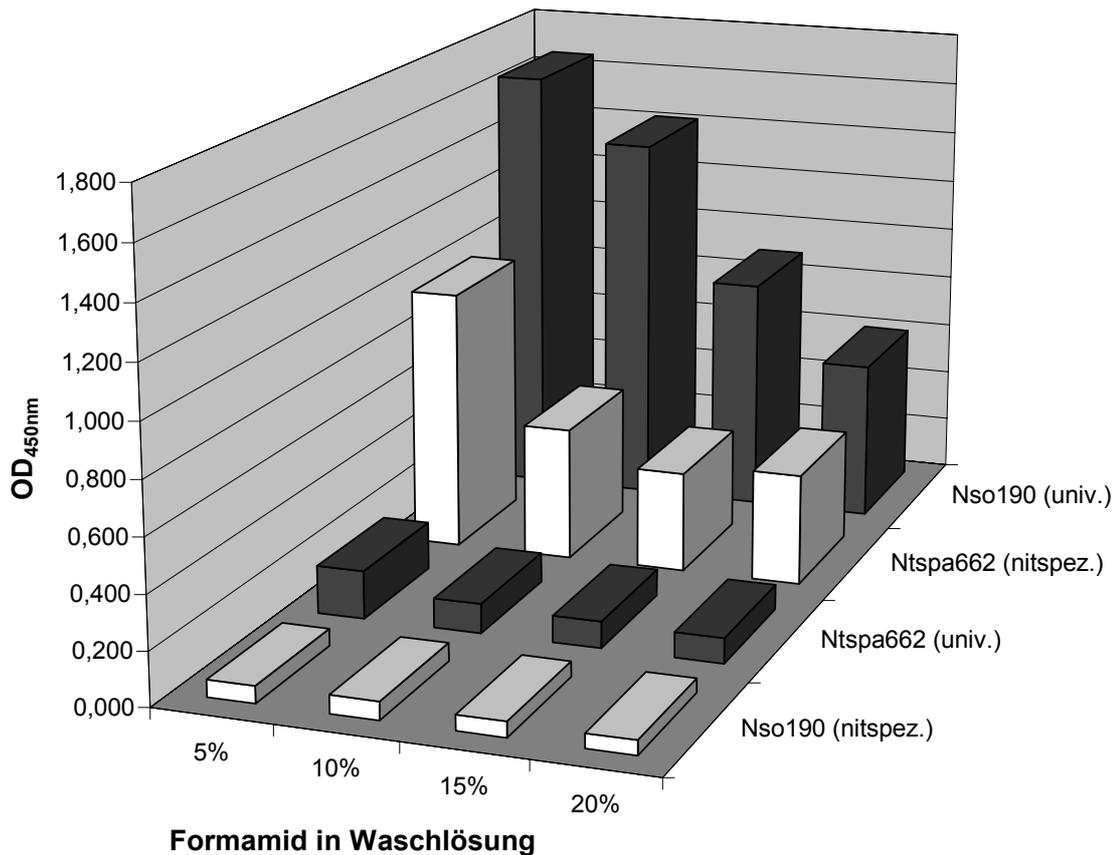


Abbildung C17: Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (vgl. B.11.2, 5% FA in Hybridisierungslösung) mit den 5'-phosphorylierten Sonden Nso190 (spezifisch für β -Ammoniumoxidierer) und Ntspa662 (spezifisch für die Gattung *Nitrospira*); Abkürzungen: univ.: Amplifikation mit Universalprimern (616V-630R); nitspez.: Amplifikation mit nitrospiraspezifischen Primern (616V-Nsp961R / Nsp1213R); Probe Ingolstadt (SBBR1), DNS-Isolierung nach Zhou *et al.* (1996, mod.)

Dieses Beispiel zeigt die große Bedeutung der richtigen Wahl der DNS-Isolierungsmethode für die jeweiligen zu detektierenden Organismen bzw. der Verwendung von spezifischen Primern. Dadurch ließen sich u.U. auch Unterschiede zwischen der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte bzw. der Genbank auflösen.

7.2 Untersuchung von Quellwasser

Durch Tracerversuche konnte nachgewiesen werden, dass Abwasser aus der Kläranlage Haunstetten (Karstgebiet der südlichen Frankenalb), das in eine Doline eingeleitet wurde, 24 h später zur Quelle in Badanhausen (ebenfalls im Karstgebiet der südlichen Frankenalb) gelangt (Engel, Institut für Bodenökologie, GSF, München, D; persönliche Mitteilung). Anfang 2000 wurde die Kläranlage stillgelegt, Anfang Juli 2000 wurde Klärschlamm der Anlage in der Umgebung von Haunstetten ausgebracht.

Aus der Quelle wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und auf Fäkalverunreinigungen untersucht. Dazu wurde ein Aliquot der Proben vom 19.10.99 und vom 24.07.00 filtriert und DNS aus dem Rückstand isoliert. Die DNS wurde mit den

Primerpaaren 616V-985R und anschließend mit Enc01V-985R amplifiziert und dabei mit Biotin markiert. Die so vorbereiteten Proben wurden von Frau Dr. Engel (Institut für Bodenökologie, GSF, München, D) zur Verfügung gestellt. Die Hybridisierung auf dem Chip wurde nach B.12.2 durchgeführt.

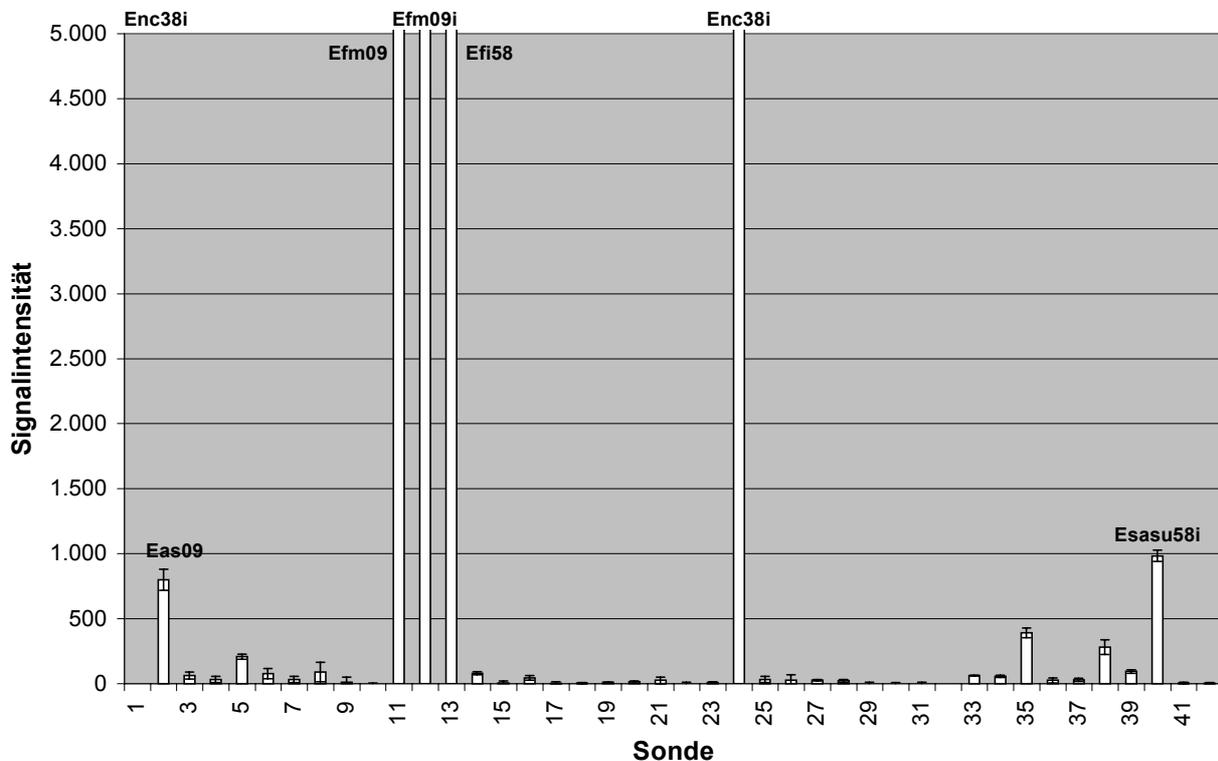


Abbildung C18: Quelle Badanhausen, Probenahme: 19.10.99; Hybridisierung auf dem DNS-Chip (vgl. B.12.2, Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, 50 °C) mit 5'-aminomodifizierten und um 15 T verlängerten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4; (Vergrößerung des Bereiches von 0 bis 5000, größere Werte sind im Diagramm nicht berücksichtigt);

1:Enc38i	8:Edr58i	15:Eca58	22:Eso18i	29:Ece09	36:Ecafl09i
2:Eas09	9:Ehr58	16:Efi58i	23:Eso58	30:Mpl15i	37:Eacd57
3:Eav58	10:Eps58	17:Ega09	24:Enc38i	31:Mpl58i	38:Eamprs09
4:Eav58i	11:Efm09	18:Edi38	25:Eso58i	32:Eassa38	39:Esasu58
5:Era58	12:Efm09i	19:Esu18	26:Efs18i	33:Eampr18	40:Esasu58i
6:Ema58i	13:Efi58	20:Esa09	27:Efa54	34:Eduhi09	41:Esoha57
7:Edr58	14:Emu58	21:Tha09	28:Eco09i	35:Edfm57	42:Ecoce58

Bei der Probenahme am 19.10.99 gaben neben der ‚Enterokokkengattungssonde‘ Enc38i die Sonden Efm09, Efm09i und Efi58 ein sehr starkes Signal. Schwache Signale zeigten auch die Sonden Eas09 und Esasu58i (vgl. Abb. C18). Da eine enterokokkenspezifische Amplifikation der 23S-rDNS durchgeführt wurde, sind hier nur die 23S-rRNS-spezifischen Sonden aufgeführt.

E. faecium wird durch zwei unabhängige Sonden detektiert (Efm09 und Efi58). Die Sonde Edfm57, die sich in der Mikrotiterplatte gut für die Detektion von *E. durans*, *E. faecium* und *E. mundtii* eignete, konnte sich bei der Hybridisierung auf dem Chip

nicht bewähren. Da dort auch mit Reinkulturen kein Hybridisierungssignal erhalten werden konnte (vgl. Tab. C7), wird diese Sonde nicht bei der Auswertung von Hybridisierungen auf DNS-Chips berücksichtigt.

Eas09 deutet auf die Anwesenheit von *E. asini* hin, allerdings ist die Sonde Eassa38, die die Anwesenheit von *E. asini* bestätigen würde, negativ. Da die Sonde Eas09 nur ein schwaches Signal zeigt, ist es wahrscheinlich, dass das Signal der Teilgruppensonde Eassa38, die bei Hybridisierung mit Reinkulturen ein schwächeres Signal lieferte als Eas09, hier schon im Hintergrundrauschen verschwindet.

Die Sonde Esasu58i deutet auf die Anwesenheit von *E. saccharolyticus* oder *E. sulfureus* hin. Da bei Anwesenheit von *E. sulfureus* auch die Sonde Eamprs09 ein Signal geben müsste, ist eher *E. saccharolyticus* in der Probe anzunehmen. Für die Sonden Esa09 und Eassa38, die dies bestätigen könnten, gilt das o.g. Deren Signale sind wahrscheinlich nicht mehr detektierbar.

Die Hybridisierung ergab somit, dass in der Probe folgende Enterokokken enthalten sind:

- *E. faecium*
- (*E. asini*)
- (*E. saccharolyticus*)

Eindeutig ist der Nachweis von *E. faecium*. Die Hybridisierungssignale von Efm09 oder Efi58 liegen um mehr als das zehnfache über den Werten von Eas09 oder Esasu58i. Die eingeklammerten Arten wurden nicht durch mehrere Sonden bestätigt. Durch Einsatz einer größeren Menge an PCR-Produkt könnte die Empfindlichkeit gesteigert werden und es könnte Klarheit geschaffen werden, ob die Hybridisierungssignale der Sonden Eas09 und Esasu58i durch die weniger empfindlichen Sonden Esa09 und Eassa38 bestätigt werden. Durch den eindeutigen Nachweis der Anwesenheit von *E. faecium*, einem der wichtigsten Fäkalindikatoren v.a. für menschliche Fäzes, kann von einer Fäkalverunreinigung der Quelle ausgegangen werden. Auf eine weitere Bestätigung der Anwesenheit von den als Fäkalindikatoren unbedeutenden Arten *E. asini* und *E. saccharolyticus* wurde daher verzichtet.

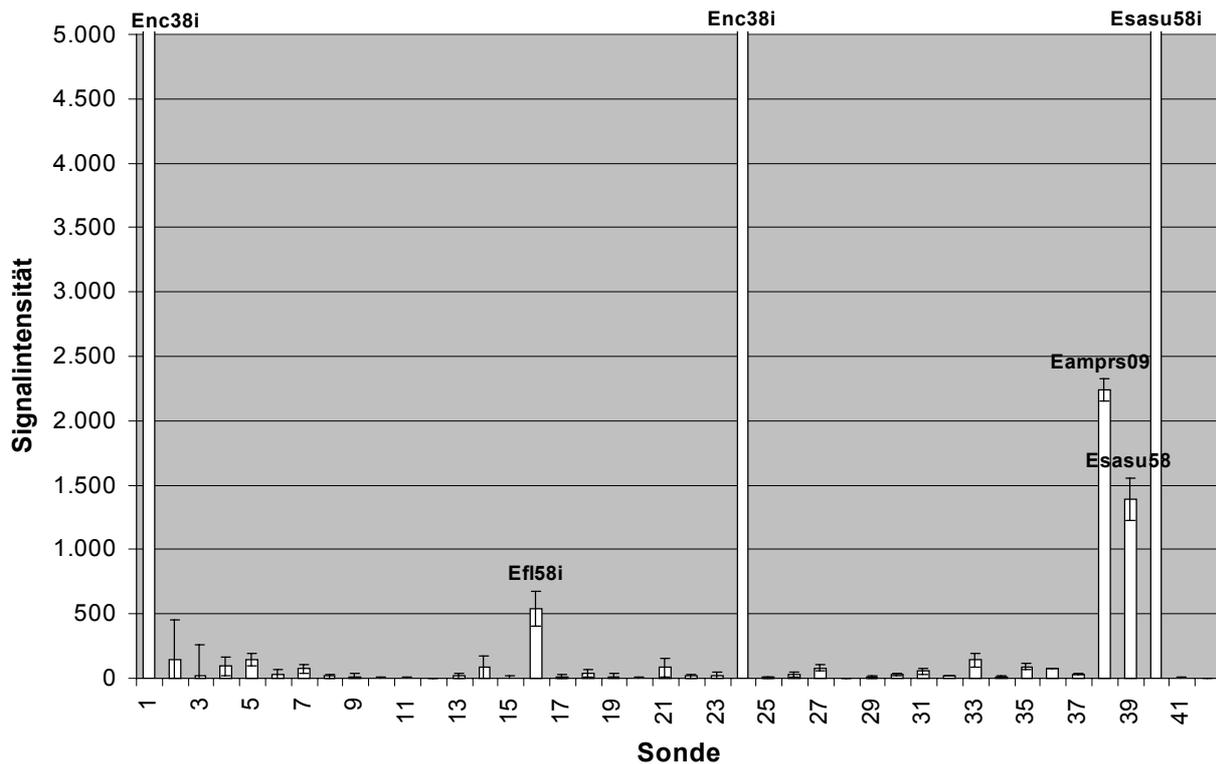


Abbildung C19: Quelle Badanhausen, Probenahme: 24.07.00; Hybridisierung auf dem DNS-Chip (vgl. B.12.2, Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, 50 °C) mit 5'-aminomodifizierten und um 15 T verlängerten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4; (Vergrößerung des relevanten Bereiches von 0 bis 5000, größere Werte sind im Diagramm nicht berücksichtigt); Belegung des Chips wie in Abb. C18

Bei der zweiten Probenahme am 24. 7. 00 zeigte Eamprs09, Esasu58, Esasu58i und Enc38i ein deutliches Signal (vgl. Abb. C19). Das Signal der Sonde Efl58i liegt so knapp an der Ausschlussgrenze (Signalintensität = 500; vgl. C.5), dass es nicht berücksichtigt wurde.

Die Hybridisierung mit der Sonde Eamprs09 (spezifisch für *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. sulfureus*) ergab ein deutlich positives Signal, die Hybridisierung mit Eampr18 (spezifisch für *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*) dagegen nicht. Dies spricht für die Anwesenheit von *E. sulfureus*. Dies wird durch die Sonde Esasu58 und Esasu58i (beide spezifisch für *E. saccharolyticus* und *E. sulfureus*) bestätigt. Die artspezifische Sonde für *E. sulfureus*, Esu18, zeigte kein Signal. Allerdings konnte auch bei Hybridisierungen mit Reinkulturen festgestellt werden, dass diese Sonde gegenüber den Sonden Eamprs09 und Esasu58i deutlich geringere Signale liefert. Auf diese Problematik wird in der Diskussion unter D.6 weiter eingegangen.

Da *E. sulfureus* durch zwei unabhängige, gegen unterschiedliche Bereiche der 23S-rRNS gerichtete teilgruppenspezifische Sonden detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass *E. sulfureus* in der Probe vorhanden ist.

Abschließend ist zu bemerken, dass die Hybridisierungsmuster der beiden Proben vollkommen unterschiedlich ausfallen. So ist *E. faecium* als Fäkalindikator ein Hinweis auf den Eintrag von Fäkalien, wohingegen *E. sulfureus* hauptsächlich bei Pflanzen auftritt und als Fäkalindikator keine Rolle spielt.

Die Einstellung der Abwassereinleitung Anfang 2000 hat sich also deutlich auf die anwesenden Enterokokken ausgewirkt. In der zweiten Probe sind keine als Fäkalindikatoren dienende Enterokokken mehr nachweisbar.

7.3 Untersuchung von Speiseeis

Bei dem in dieser Studie in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Lehner (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München, Freising, D) untersuchten Speiseeis handelte es sich um Proben aus offenem Verkauf (Eisdielen) sowie Softeisproben aus Automaten.

Die Eisproben wurden wie unter B.14 beschrieben bearbeitet und die isolierte DNS zur PCR mit dem Primerpaar 616V-985R (vgl. B.8.2.3 und B.8.3.4) eingesetzt. Zur Überprüfung, ob es sich bei der isolierten DNS um amplifizierungsfähiges Material handelte, wurde jeweils ein zweiter PCR-Ansatz mit 1 ng Enterokokken-DNS versetzt und ebenfalls amplifiziert. Die Hybridisierung erfolgte nach B.12.2 mit biotinmarkierten PCR-Produkten. Zusätzlich wurden Ausstriche auf OAA-Agar (vgl. B.2) durchgeführt.

In Abb. C20 und C21 sind zwei Beispiele (Speiseeis D und Softeis C) dieser Hybridisierungen gezeigt.

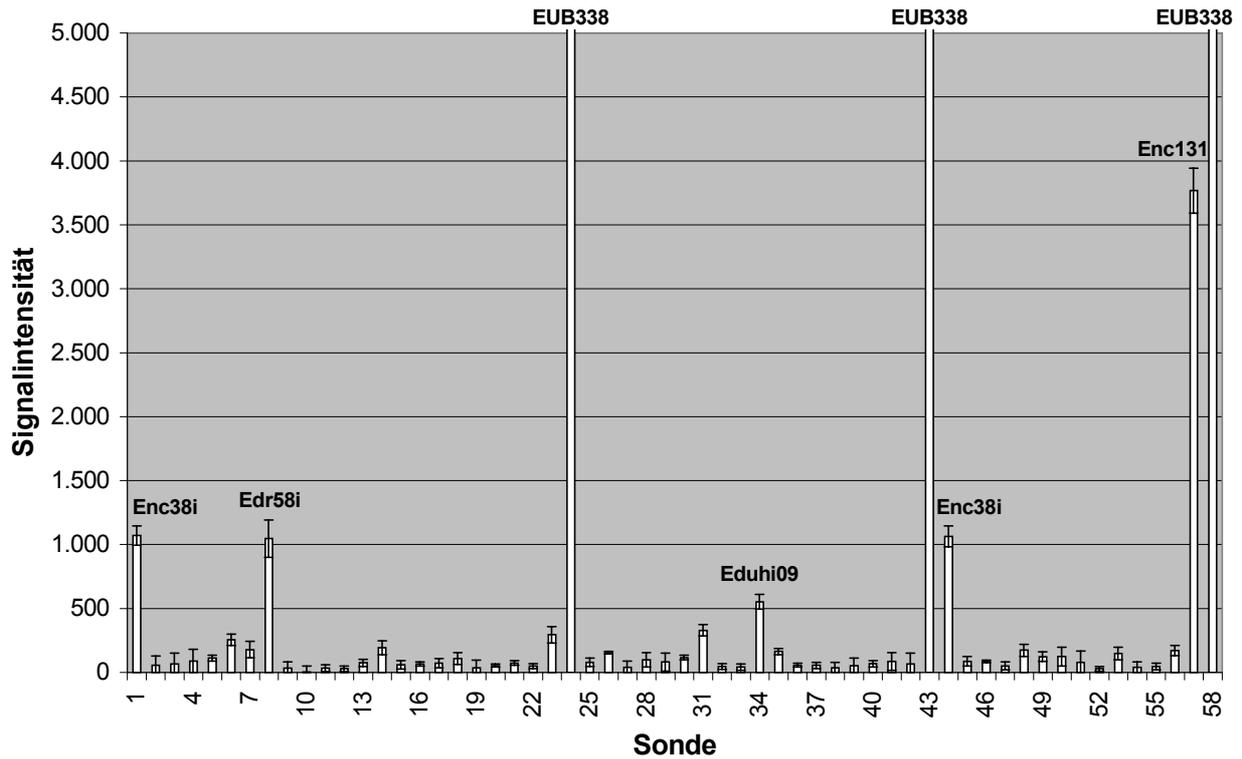


Abbildung C20: Speiseeis D; Hybridisierung auf dem DNS-Chip (vgl. B.12.2, Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, 55 °C) mit 5'-aminomodifizierten und um 15 T verlängerten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4; (Vergrößerung des relevanten Bereiches von 0 bis 5000, größere Werte sind im Diagramm nicht berücksichtigt);

1:Enc38i	11:Efm09	21:Tha09	31:Mpl58i	41:Esoha57	51:Ece92
2:Eas09	12:Efm09i	22:Eso18i	32:Eassa38	42:Ecoce58	52:Mplu464
3:Eav58	13:Efi58	23:Eso58	33:Eampr18	43:EUB338	53:Enc93
4:Eav58i	14:Emu58	24:EUB338	34:Eduhi09	44:Enc38i	54:Ecg191
5:Era58	15:Eca58	25:Eso58i	35:Edfm57	45:Edi131	55:Ecf459
6:Ema58i	16:Efl58i	26:Efs18i	36:Ecafl09i	46:Edi137	56:Ecc461
7:Edr58	17:Ega09	27:Efa54	37:Eacdfg57	47:Esu90	57:Enc131
8:Edr58i	18:Edi38	28:Eco09i	38:Eamprs09	48:Esa452	58:EUB338
9:Ehr58	19:Esu18	29:Ece09	39:Esasu58	49:Eso193	
10:Eps58	20:Esa09	30:Mpl15i	40:Esasu58i	50:Efs129	

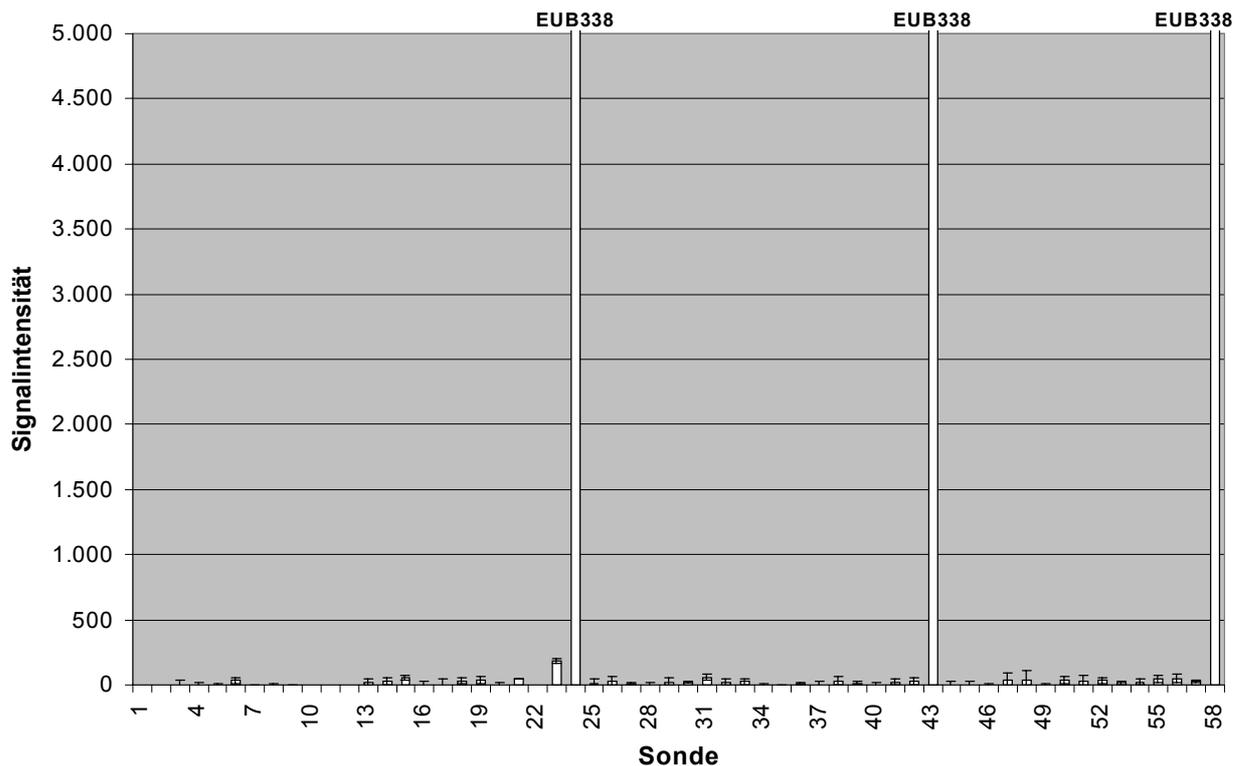


Abbildung C21: Softeis C; Hybridisierung auf dem DNS-Chip (vgl. B.12.2, Hybridisierung: 5% FA, 37 °C; Waschen: 0% FA, 55 °C) mit 5'-aminomodifizierten und um 15 T verlängerten Sonden, Spezifitäten: vgl. Tab. C4; (Vergrößerung des relevanten Bereiches von 0 bis 5000, größere Werte sind im Diagramm nicht berücksichtigt); Belegung des Chips wie in Abb. C20

Speiseeis D (vgl. Abb. C20) zeigt deutlich positive Signale mit Edr09i, Enc38i und Enc131. Ein schwaches Signal zeigt auch Eduhi09. Diese Konstellation weist eindeutig auf eine Kontamination mit *E. durans* hin. Das Ergebnis der artspezifischen Sonde Edr58i wird durch die teilgruppenspezifischen Sonden Eduhi09 (diese Sonde zeigt nur ein sehr schwaches Signal, das alleine nicht zur Identifizierung ausreichen würde) und Enc131 und schließlich der ‚Gattungssonde‘ Enc38i bestätigt.

Auf dem Selektivagar waren nach Inkubation bei 37 °C schwarz gefärbte Kolonien erkennbar. Dies bestätigt die Anwesenheit von Enterokokken.

Softeis C (vgl. Abb. C21) zeigt keine Signale mit den Enterokokkensonden, auch nicht mit der ‚Gattungssonde‘ Enc38i. Daher ist davon auszugehen, dass diese Probe keine Enterokokken enthält. Auf dem Selektivagar waren keine Kolonien gewachsen. Dies stützt das Ergebnis der Hybridisierung.

In folgender Tabelle (Tab. C14) ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Speiseeisproben durch Hybridisierung und mittels Selektivagar gegeben.

Tabelle C14: Gegenüberstellung der Hybridisierungsergebnisse und der Ergebnisse auf dem Selektivagar

Speiseeisprobe	Selektivagar (OAA-Agar)	Hybridisierungsergebnis
Speiseeis A	+	<i>E. casseliflavus</i> oder <i>E. flavescens</i>
Speiseeis B	+	-
Speiseeis C	+	<i>E. casseliflavus</i> oder <i>E. flavescens</i>
Speiseeis D	+	<i>E. durans</i>
Softeis A	-	-
Softeis B	-	-
Softeis C	-	-
Softeis D	+	<i>E. faecium</i> und <i>E. faecalis</i>

Außer bei Speiseeis B wurde das Ergebnis der Hybridisierung von den Ergebnissen auf dem Selektivagar bestätigt. Im Fall des Speiseeis' B konnte kein Hybridisierungssignal erhalten werden, obwohl der Selektivagar eine positive Reaktion zeigte.

Zur Absicherung wurde eine PCR mit enterokokkenspezifischen Primern (vgl. B.8.2.3 und Tab. C5 und C6) mit DNS aus dieser Probe durchgeführt. Hierbei konnte kein PCR-Produkt erhalten werden; dieses Ergebnis stützt also das Ergebnis der Hybridisierung. Aufgrund der erfolgreichen Amplifikation dieser DNS mit Universalprimern kann außerdem die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren in dieser Probe ausgeschlossen werden. Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen.

Zum einen könnte die positive Reaktion auf dem Selektivagar auf Mikroorganismen zurückzuführen sein, die ebenfalls auf diesem Agar ein positives Resultat hervorrufen, wie dies z.B. von *Streptococcus bovis* bekannt ist.

Zum anderen kann dieses Ergebnis aber auch in PCR-Unzulänglichkeiten (Knopp *et al.*, 2000) begründet sein. Da es sich bei der isolierten DNS um eine Mischung von DNS unterschiedlicher Organismen handelte, ist es beispielsweise denkbar, dass die Enterokokken-DNS in so geringer Menge vorlag, bzw. die übrige DNS in so großem Überschuss vorhanden war, dass die Enterokokken-DNS nicht in ausreichender Menge amplifiziert werden konnte.

D DISKUSSION

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Entwicklung eines hierarchischen Sondensatzes für die Gattung *Enterococcus* und die nah verwandten Arten *Tetragenococcus halophilus* und *Melissococcus pluton*. Dazu wurden neu konstruierte und bereits vorhandene Sonden (Koob, 1997; Meier, 1997; Mehlen, 1999) zu einem umfassenden Sondensatz zusammengestellt, der den Prinzipien des Mehrfachsondenkonzeptes (Ludwig *et al.*, 1998) entspricht. Mit den für die Sondenkonstruktion notwendigen Sequenzdaten der 16S- und 23S-rRNS wurden ferner phylogenetische Untersuchungen durchgeführt. Die schnelle, zuverlässige und gleichzeitige Anwendung aller Sonden konnte durch Optimierung der reversen Hybridisierung in Mikrotiterplatten sichergestellt werden. Darüber hinaus wurden verschiedene Protokolle für die Hybridisierung auf DNS-Chips untersucht und die Bedingungen an die Anforderungen dieses Sondensatzes angepasst. Das hier optimierte Hybridisierungsverfahren mit der Anwendung eines Formamidgradienten während des Waschschriffs ist universal anwendbar, eine spezielle Anpassung an einzelne Sonden ist nicht erforderlich. Dies wurde an Sonden gezeigt, die ursprünglich für die Verwendung bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Detektion von ammonium- und nitritoxidierenden Bakterien konstruiert worden waren.

Die Praxistauglichkeit der Sonden und Hybridisierungsprotokolle konnte anhand von Untersuchungen diverser Realproben dargestellt werden.

1 Sequenzanalyse

Als Grundlage phylogenetischer Untersuchungen werden phylogenetische Markermoleküle verwendet, von denen angenommen wird, dass sie sich aus einem ursprünglichen Molekül im Verlauf der Evolution durch Mutationen entwickelt haben. Die rRNS bietet sich aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung und funktionellen Konstanz als geeignetes Markermolekül an (Olsen *et al.*, 1986). Zur phylogenetischen Analyse werden die rRNS-Sequenzen anhand konservierter Regionen in ein Alignment eingefügt, sodass ein Vergleich der Sequenzen möglich wird. Die Ähnlichkeit von rRNS-Sequenzen spiegelt die evolutionäre Verwandtschaft der Organismen wider. Daher können die rRNS-Sequenzen zur Rekonstruktion von Stammbäumen verwendet werden. Artefakte durch lateralen Gentransfer gelten als unwahrscheinlich (Schleifer und Ludwig, 1989), wie sich durch Vergleich der Analyse phylogenetischer Marker unterschiedlicher Funktionalität zeigte (Ludwig und Schleifer, 1994).

Aus den Sequenzdaten der 16S- und 23S-rRNS wurden für die Gattung *Enterococcus* folgende Stammbäume rekonstruiert. Für die nach Abschluss der praktischen Arbeiten

beschriebenen Enterokokken *E. villorum* (Vancanneyt *et al.*, 2001), *E. haemoperoxidus* und *E. moraviensis* (Švec *et al.*, 2001), *E. porcinus* und *E. rattii* (Teixeira *et al.*, 2001), „*E. azikeevi*“ (Gilvanova, persönliche Mitteilung), „*E. phoeniculicola*“ (Law-Brown, persönliche Mitteilung) und „*E. rottae*“ (Weiss, persönliche Mitteilung) wurden Sequenzanalysen der zugänglichen 16S-rRNS-Sequenzen durchgeführt.

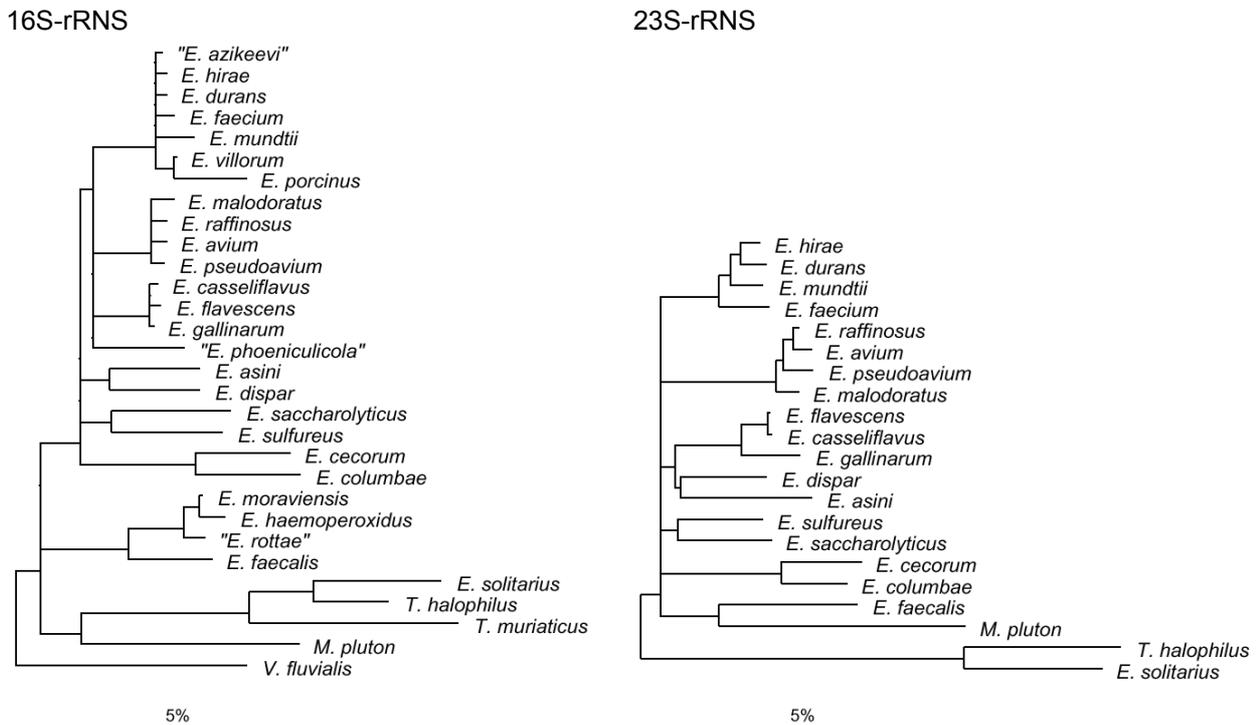


Abbildung D1: 16S- und 23S-rRNS Stammbäume, konstruiert aus allen erhältlichen Sequenzdaten der Typstämme aus den Gattungen *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Melissococcus* und *Vagococcus*; die Baumrekonstruktion erfolgte nach B.10, bei Mehrfachverzweigungen konnte das Verwandtschaftsverhältnis nicht genauer aufgelöst bzw. nicht durch verschiedene Rekonstruktionsverfahren bestätigt werden; der Balken gibt einen Sequenzunterschied von 5% an; Arten in Anführungszeichen sind noch nicht gültig beschrieben

Aus Abb. D1 ergeben sich folgende Untergruppen:

- „*E. azikeevi*“, *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. porcinus*, *E. villorum*
- *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosis*
- *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*
- *E. asini*, *E. dispar*
- *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*
- *E. cecorum*, *E. columbae*
- *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, „*E. rottae*“
- *E. solitarius*, *T. halophilus*, *T. muriaticus*
- „*E. phoeniculicola*“
- *M. pluton*

Mehrfachverzweigungen, wie sie im 16S-rRNS Stammbaum innerhalb mancher Untergruppen (*E. faecium*-Untergruppe, *E. avium*-Untergruppe, *E. gallinarum*-Untergruppe) in Abb. D1 zu sehen sind, zeigen an, dass durch verschiedene Rekonstruktionsverfahren unterschiedliche Verzweigungen erhalten wurden. Bei Verwendung der 23S-rRNS, deren Informationsgehalt sich vom Informationsgehalt der 16S-rRNS unterscheidet, konnten dagegen einige dieser Stellen aufgelöst werden. Die Einteilung der Untergruppen anhand des 16S-rRNS Stammbaumes konnte durch Analyse der 23S-rRNS bestätigt werden.

In jedem Fall ergab sich eine monophyletische Gruppe für die Gattungen *Enterococcus*, *Melissococcus* und *Tetragenococcus* mit *Vagococcus* als Schwestergruppe.

Die phylogenetischen Untergruppen stimmen nicht in allen Fällen mit den Spezifitätsgruppen der Sonden überein. Eampr18 z.B. ist spezifisch für *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium* und *E. raffinosus*. Dies entspricht genau einer Untergruppe (vgl. Abb. D1). Eamprs09 dagegen ist zusätzlich auch für *E. sulfureus* spezifisch. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch Mehrfachmutationen bei weniger verwandten Organismen zufällig identische Nukleotide entstehen können (Koob, 1997). Gerade dieser Sachverhalt deutet aber auf die Gefahr hin, dass durch Zufall in sehr weit entfernten Arten identische Sondenzielregionen vorhanden sein können. Diese Möglichkeit der fehlerhaften Identifizierung kann effektiv durch Anwendung des Mehrfachsondenkonzeptes vermieden werden (vgl. auch D.2).

2 Hierarchischer Sondensatz für Enterokokken

2.1 Allgemeines

Bei der Entwicklung des Sondensatzes wurde Wert darauf gelegt, nicht nur Reinkulturen bzw. Isolate identifizieren zu können, sondern auch die Detektion und Identifikation von Enterokokken aus komplexen Proben zu ermöglichen.

Ersteres lässt sich beispielsweise mit einem Sondensatz aus teilgruppenspezifischen Sonden überlappender Spezifität realisieren, aus dem sich für jede Enterokokkenart ein spezifisches Hybridisierungsmuster ergibt. Diese Vorgehensweise stößt bei Gemischen schnell an ihre Grenzen, da nicht unterschieden werden kann, von wie vielen Arten das Muster verursacht wird. So kann z.B. bei Signalen der Sonden Eduhi09 und Edfm57 nicht unterschieden werden, ob nur *E. durans* enthalten ist oder *E. hirae* und *E. faecium* bzw. alle drei Arten.

Klarheit könnte durch Verwendung einer entsprechenden Anzahl von Sonden überlappender Spezifität geschaffen werden. Die Konstruktion derartiger Sonden kann

allerdings sehr schwierig bis unmöglich sein. Außerdem ist die Auswertung solcher Ergebnisse umständlich.

Daher wurde in vorliegender Arbeit ein Sondensatz, aufbauend auf bereits vorhandenen gegen die 16S- und 23S-rRNS gerichteten Sonden (Betzl *et al.*, 1990; Koob, 1997; Meier, 1997; Mehlen, 1999), entwickelt, der für jede Enterokokkenart aus Tab. B1 mindestens eine artspezifische Sonde enthält. Da somit das Hybridisierungssignal einer Sonde direkt auf eine Art hinweist und keine Hybridisierungsmuster verglichen werden müssen, ist die Auswertung wesentlich vereinfacht. Darüber hinaus wurden einige teilgruppenspezifische Sonden entwickelt, die die Hybridisierungen der artspezifischen Sonden stützen. Schließlich ist noch die ‚gattungsspezifische‘ Sonde zu erwähnen, mit der Angehörige der Gattung *Enterococcus* und zusätzlich *Tetragenococcus halophilus* und *Vagococcus fluvialis* detektiert werden können. Diese Sonde kann somit ersten Aufschluss geben, ob Enterokokken in einer Probe vorhanden sind. Wenn eine weitere Differenzierung für die jeweilige Fragestellung notwendig ist, kann dann mit der Anwendung des Sondensatzes eine Identifizierung bis auf die Artebene erfolgen. Dadurch ist es möglich, die benötigte Auflösung individuell zu bestimmen.

Da man bei der Konstruktion artspezifischer Sonden relativ schnell an die Grenzen der 16S-rRNS stößt, wurde die 23S-rRNS miteinbezogen und ein die Möglichkeiten der rRNS-Gensequenzen ausschöpfender Sondensatz entwickelt.

Bei Verwendung aller in Tab. C2 und C3 aufgeführten Sonden steht ein hierarchischer Sondensatz zur Verfügung, der den Kriterien des Mehrfachsondenkonzeptes (Ludwig *et al.*, 1998) entspricht. Das heißt, ein Hybridisierungsergebnis basiert auf Hybridisierung mehrerer, gegen unterschiedliche Bereiche der rRNS gerichtete Sonden. Dabei wurden Sonden paralleler (gleiche Spezifität, aber gegen unterschiedliche Bereiche der rRNS gerichtet) und hierarchischer Spezifität entwickelt. So sprechen bei Anwesenheit einer Enterokokkenart, neben mind. einer artspezifischen Sonde, auch eine oder mehrere teilgruppenspezifische Sonden und natürlich die ‚Gattungssonde‘ an. Dies erhöht die Sicherheit der Ergebnisse erheblich, denn es ist möglich, dass ein nicht im Sequenzdatensatz vorhandener Organismus zufällig die gleiche Sondenzielsequenz enthält. Es ist hingegen unwahrscheinlich, dass ein fremder Organismus an mehreren der im Sondensatz genutzten Sondenzielregionen an verschiedenen Stellen der rRNS die gleiche Sequenz aufweist wie der entsprechende Zielorganismus.

In Reinkulturen ist bereits das Signal der entsprechenden Teilgruppensonde eine Bestätigung des Hybridisierungssignals der artspezifischen Sonde, z.B. Ema58i und Eamprs09. In komplexen Proben ist dieser Nachweis nicht mehr so leicht zu führen, da bei Anwesenheit von *E. avium* die Sonde Eamprs09 in jedem Fall ein Signal ergeben würde. Diese Sonde könnte also im o.g. Beispiel nicht mehr als Bestätigung von Ema58i herangezogen werden. In solchen Fällen schafft die Verwendung von mehreren

Sonden paralleler Spezifität Abhilfe, wie dies z.B. bei den Sonden Efm09i und Efi58, Efs18i und Efa54 usw. der Fall ist.

Trotzdem können Teilgruppensonden interessante Hinweise geben. So deutet die Hybridisierung einer Teilgruppensonde, wenn gleichzeitig keine der artspezifischen Sonden anspricht, auf die Anwesenheit einer unbekanntem Art innerhalb dieser Teilgruppe hin. Andererseits könnte die Hybridisierung einer artspezifischen Sonde ohne die Hybridisierung der zugehörigen Teilgruppensonde auf die Anwesenheit eines unbekanntem Nichtzielorganismus hindeuten (vgl. auch D.6).

Durch Anwendung des Sondensatzes ist es auch möglich, Fragestellungen zu klären, die durch konventionelle, auf physiologischen Unterschieden aufbauende Testsysteme nicht bzw. nur schwer zu lösen sind. Ein Beispiel ist die Unterscheidung von *E. durans* und *E. hirae*, die mit Hilfe des Sondensatzes problemlos durchgeführt werden kann, bei physiologischen Tests aber oft Schwierigkeiten bereitet (Devriese *et al.*, 1995; Kirschner *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel ist die Untersuchung von Mischkontaminationen. Diese sind mit Hilfe konventioneller Methoden erst nach sehr zeit- und arbeitsaufwendigen Isolierungsschritten zu Reinkulturen identifizierbar.

2.2 Sondenkonstruktion und -evaluierung

Alle Sondenkonstruktionen erfolgten unter Anwendung des ARB-Softwarepaketes und der ARB-Sequenzdatenbank (vgl. B.10.3).

Generell ist der Bereich am 5'-Ende der 23S-rRNS variabler als der Bereich am 3'-Ende (Höpfl *et al.*, 1989). Besonders die Domänen I und III (vgl. Abb. D2) zeichnen sich durch hohe Sequenzvariabilität aus. So ist es nicht verwunderlich, dass fast alle in dieser Arbeit entwickelten Sonden gegen eine dieser beiden Domänen gerichtet sind.

Besonders die Helices 9 und 58 (vgl. Abb. D2) eignen sich für die Konstruktion artspezifischer Sonden, da sie zu den variabelsten Regionen der 23S-rRNS zählen (Höpfl *et al.*, 1989; Roller *et al.*, 1992). Zusätzlich wurden Sonden gegen Bereiche der Helices 15, 18, 38 und 54 konstruiert (vgl. Abb. D2).

Der ‚gattungsspezifische‘ Primer Enc01 wurde gegen den 5'-terminalen Bereich der 23S-rRNS gerichtet (Helix 1), um in Verbindung mit einem Universalprimer am 3'-terminalen Bereich der 23S-rRNS alle 23S-rRNS Sondenzielregionen in einer PCR amplifizieren zu können (vgl. Abb. D2). Der Primer Enc01 stellt ein Gemisch aus drei unterschiedlichen Primern dar (vgl. Tab. C5), die im Verhältnis 1:1:1 zur PCR eingesetzt werden.

In folgender Abbildung sind die Bindungsstellen aller gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonden des Enterokokkensondensatzes in die Sekundärstruktur der 23S-rRNS von *E. faecalis* eingezeichnet.

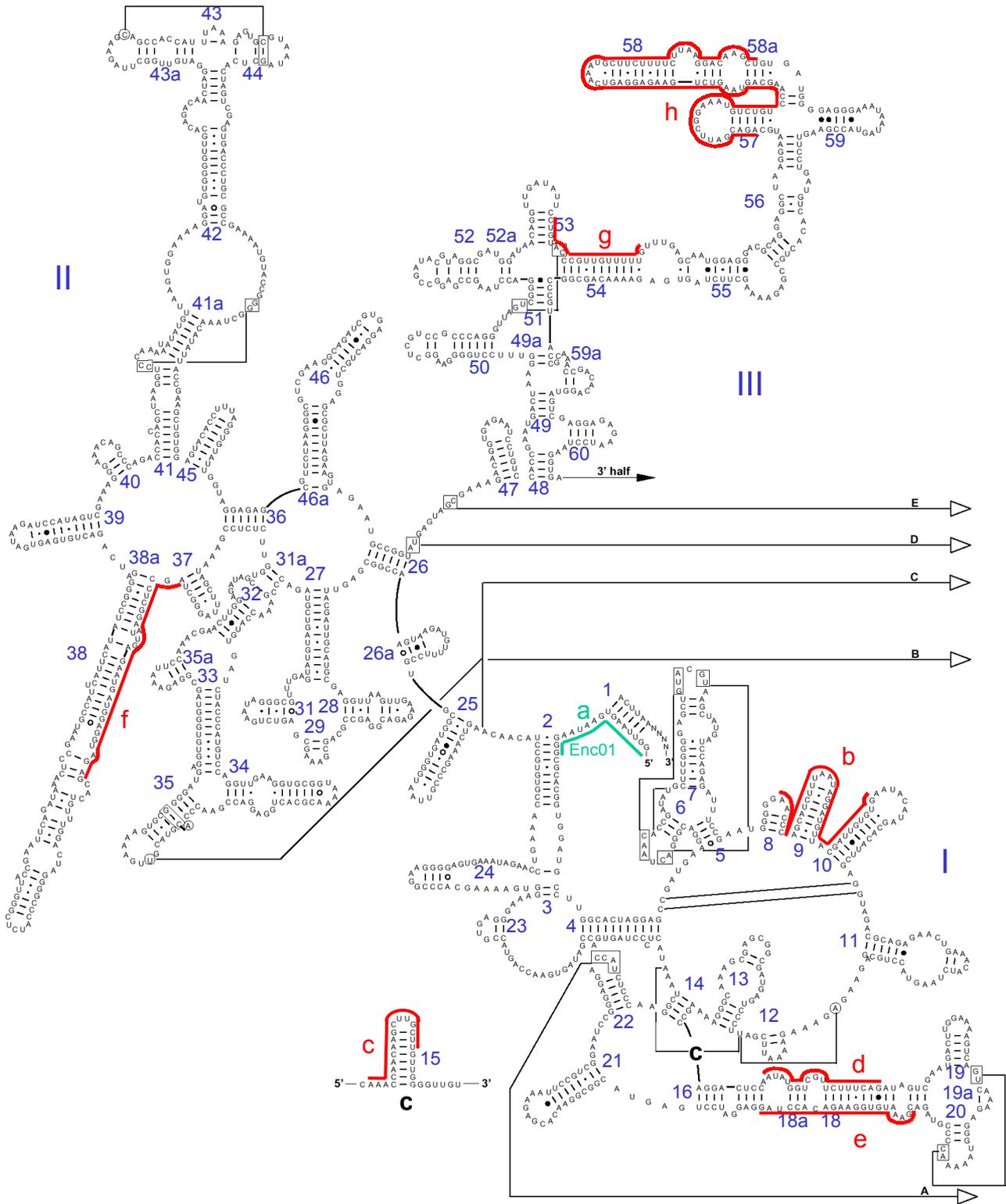


Abbildung D2: Sekundärstruktur der 23S-rRNS von *Enterococcus faecalis* (Gutell *et al.*, 1993; Cannone *et al.*, 2001, mod.) mit eingezeichneten Bindungsstellen a-i der gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonden und Primer; 5'-Hälfte, Domänen I, II und III, Helices 1-60

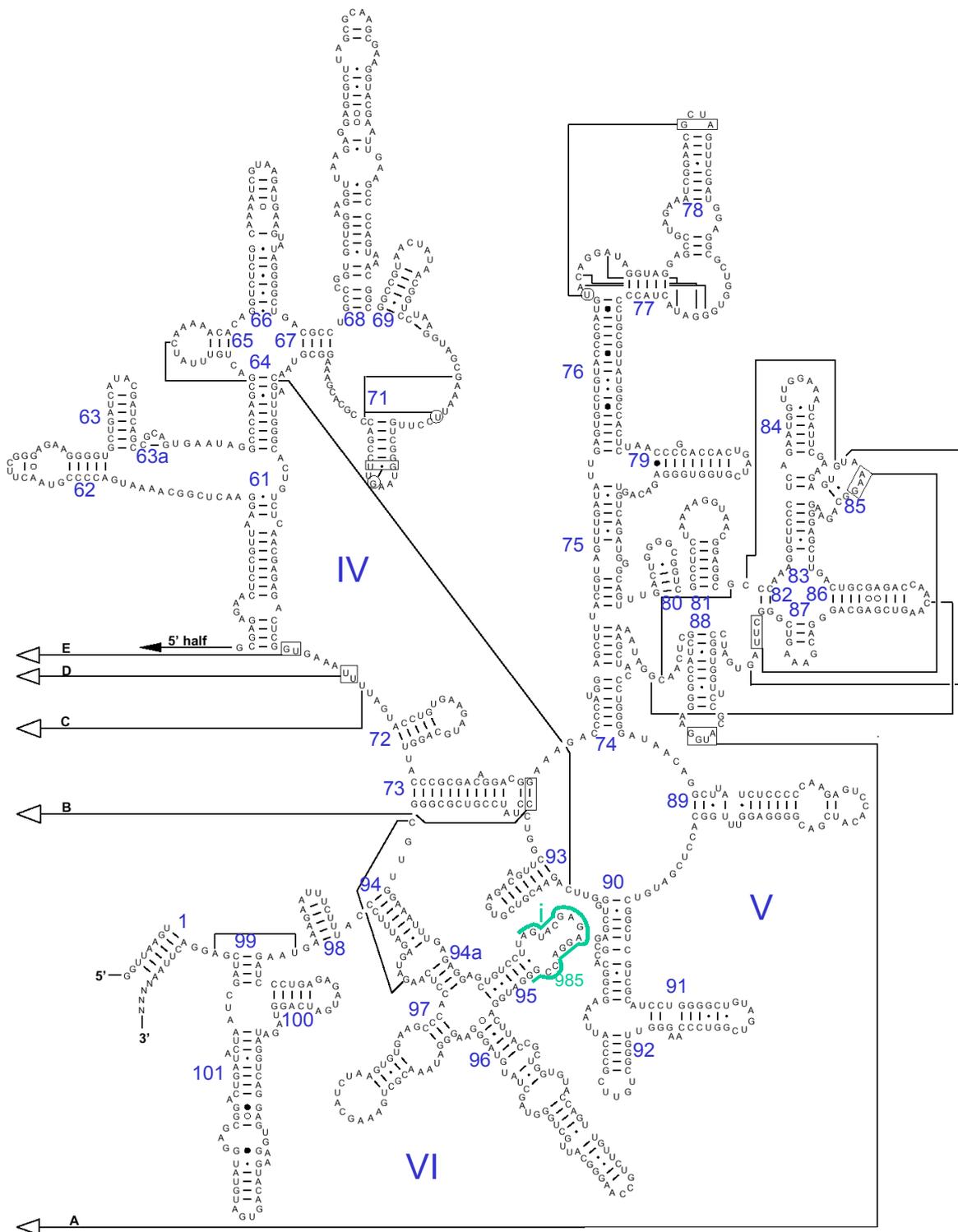


Abbildung D3: Sekundärstruktur der 23S-rRNS von *Enterococcus faecalis* (Gutell *et al.*, 1993; Cannone *et al.*, 2001, mod.) mit eingezeichneten Bindungsstellen a-i der gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonden und Primer; 3'-Hälfte, Domänen IV, V und VI, Helices 61-101

Bei der Konstruktion der Sonden wurde neben dem GC-Gehalt auch die Stellung und Art der Fehlpaarungen berücksichtigt, da dies entscheidenden Einfluss auf die Tauglichkeit der Sonde hat. So wurde darauf geachtet, diskriminierende Positionen in die Mitte der Sonde zu legen, da sich endständige Fehlpaarungen wesentlich schlechter diskriminieren lassen. Auch die Art der Fehlpaarung spielt eine nicht zu unterschätzende Rolle. So sind z.B. A-A, A-C, C-C, C-T und T-T stärkere Fehlpaarungen als A-G, G-G und G-T (Ludwig *et al.*, 1998).

Da bei der reversen Hybridisierung gegen DNS oder PCR-Amplifikate beide Stränge als Zielstrukturen zur Verfügung stehen, konnte die Spezifität einiger Sonden erheblich verbessert werden, wenn die revers komplementäre Sequenz als Sonde verwendet wurde. Ein Beispiel ist die Sonde Ecafl09. Diese Sonde gibt neben den Signalen für *E. casseliflavus* und *E. flavescens* bei der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte auch Signale mit *E. durans* und *E. hirae* (Koob, 1997). Ein Blick auf die Sequenzen zeigt, dass die rDNS von *E. durans* und *E. hirae* nur eine Fehlpaarung zu dieser Sonde aufweist, nämlich eine G-T Fehlpaarung an Position³⁶ 153. Bei Verwendung der revers komplementären Sonde Ecafl09i ergibt sich die Fehlpaarung A-C, die besser zu diskriminieren ist (s.o.). Tatsächlich sind bei Verwendung der Sonde Ecafl09i keine falsch positiven Signale durch *E. durans* oder *E. hirae* zu beobachten. Entsprechendes gilt z.B. auch für die Sonden Eco09 und Eco09i. Ob die Originalsonde oder das Komplement im jeweiligen Fall die bessere Wahl ist, muss jedoch immer ausgetestet werden. Im Fall von Ema58i ist das Komplement die bessere Wahl, es unterscheidet sich aber zur nächstverwandten Art (*E. avium*) durch eine G-T Paarung. Die Originalsonde mit einer A-C Fehlpaarung ist für eine Diskriminierung zwischen *E. malodoratus* und *E. avium* weniger geeignet.

Ein weiterer Punkt, der bei Verwendung revers komplementärer Sonden beobachtet werden konnte, ist die oft erhebliche Steigerung der Signalintensität gegenüber der Originalsonde. Dies ist z.B. bei den Sonden Eso18i, Mpl15i, Mpl58i und Enc38i der Fall. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die die Zugänglichkeit des einen Stranges mehr behindern als die des anderen.

Eine weitere Erklärung könnte das „Volumen“ der Überhänge des PCR-Produktes sein. So zeigten Sonden unterschiedliche Signalintensitäten, je nachdem ob sie am 5'-Ende oder am 3'-Ende immobilisiert wurden (Peplies *et al.*, 2001). Dies könnte auf unterschiedlich voluminöse Überhänge des PCR-Produktes am 3'- bzw. 5'-Ende hindeuten, die zu einer sterischen Behinderung der Hybridisierung führen. Entsprechendes könnte auch für die revers komplementären Sonden gelten, wobei die Länge allein nicht der entscheidende Faktor sein kann, da z.B. die Zielsequenz der Sonde Mpl15i näher an einem Ende des PCR-Produktes, die Zielsequenz der Sonde

³⁶ *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

Enc38i relativ genau in der Mitte und die Zielsequenz der Sonde Mpl58i näher am anderen Ende des ca. 4,5 kb langen PCR-Produktes liegt. In allen drei Fällen lieferte aber die revers komplementäre Sonde das bessere Hybridisierungsergebnis.

Jede Sonde wurde im Experiment unter Verwendung amplifizierter rDNS der jeweiligen Ziel- und Referenzorganismen auf ihre Praxistauglichkeit untersucht. Gleichzeitig erfolgte die Ermittlung der für die jeweilige Spezifität erforderlichen, optimalen Stringenz. Einige Sonden, die theoretisch gut geeignet sein sollten, konnten in der Praxis nicht überzeugen und wurden daher nicht in den Sondensatz aufgenommen. Aber auch die in den Sondensatz aufgenommenen Sonden zeigen unterschiedlich effizientes Bindungsvermögen und damit unterschiedliche Signalstärken nach der Hybridisierung mit vergleichbaren Mengen der entsprechenden PCR-Produkte (vgl. Tab. C7 und C8).

2.3 Besonderheiten

2.3.1 Besonderheiten einiger Sonden in der Mikrotiterplatte

Bei manchen Sonden wurde ein leicht erhöhtes Hintergrundsignal bei Hybridisierungen mit Nichtzielorganismen festgestellt; bei Erhöhung der Stringenz wurde das Signal der Zielorganismen aber zu stark abgeschwächt. Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung kann durch Zusatz einer entsprechend konstruierten, unmarkierten Kompetitorsonde die Hybridisierung der eigentlichen Sonde mit diesen Nichtzielorganismen mit ähnlicher Sondenzielsequenz unterdrückt werden (Manz *et al.*, 1992). Der Einsatz einer solchen Kompetitorsonde kann bei der reversen Hybridisierung in der Regel nicht angewendet werden, da hier das Mol-Verhältnis zwischen Kompetitorsonde und konkurrierendem PCR-Produkt berücksichtigt werden muss. Die Menge an PCR-Produkt ist bei der Anwendung in der Praxis jedoch nicht bekannt, da das PCR-Produkt aus Realproben ein Gemisch von DNS unterschiedlicher Arten darstellt.

Falls die Hybridisierungssignale sowohl für die Ziel- als auch für die Nichtzielorganismen reproduzierbar waren, wurden die Sonden trotz der etwas erhöhten Hintergrundsignale in den Sondensatz aufgenommen und der FA-Gehalt angegeben, der die beste Unterscheidung zwischen Ziel- und Nichtzielorganismen ermöglicht. Um die Anwendung dieser Sonden (Efl58i [vgl. D.2.3.3], Efs129, Enc131) im Rahmen des gesamten Sondensatzes, also unter den für den gesamten Sondensatz optimalen Bedingungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität, zu ermöglichen, wurden für diese Sonden in Tab. C7 und C8 erhöhte Ausschlussgrenzen (vgl. C.5) angegeben. Diese erhöhten Ausschlussgrenzen ergaben sich für die Sonden Efl58i, Efs129 bzw. Enc131 bei Hybridisierungen gegen *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* bzw. *E. cecorum* als Negativkontrollen. Alle angegebenen Näherungswerte für die Ausschlussgrenzen sind

nur bei genauer Einhaltung aller Bedingungen, insbesondere der Inkubationszeit des chromogenen Substrates, gültig. Auch dann handelt es sich aber lediglich um Näherungswerte. Es sollte daher immer mindestens eine Negativkontrolle (Hybridisierung mit DNA eines Nichtzielorganismus) mitgeführt werden, aus der sich die Ausschlussgrenze für den jeweiligen Versuch errechnen lässt (vgl. C.5) und somit eine zuverlässige Auswertung des Versuches sichergestellt wird. Für die Sonden Efs129 und Enc131, die durch eine etwas erhöhte Ausschlussgrenze auffielen, stehen auch andere Sonden mit gleichen bzw. tiefergehenden Spezifitäten zur Verfügung, die ein Signal dieser beiden Sonden evaluieren können.

2.3.2 Besonderheiten einiger Sonden auf DNS-Chips

Bei der Hybridisierung auf dem Chip konnte im Gegensatz zur Mikrotiterplatte kein Formamidgradient während des Waschschrilles gefahren werden. Es wurden daher Hybridisierungs- und Waschbedingungen gewählt, die für möglichst viele Sonden des Enterokokkensonensatzes die optimalen Bedingungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität darstellen. Einige Sonden zeigten unter diesen Bedingungen falsch positive Signale (vgl. Tab. C7 und C8). Diese Sonden müssen auf jeden Fall unter stringenteren Bedingungen verwendet werden, wie dies z.B. durch parallele Hybridisierung auf mehreren Chips und anschließendes Waschen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden könnte. Andere Sonden ergaben nach Hybridisierung mit DNS von Nichtzielorganismen nur leicht erhöhte Signale (vgl. Tab. C7 und C8). Diese Sonden sollten ebenfalls unter stringenteren Bedingungen gewaschen werden. Sie können aber auch unter diesen, für sie nicht ganz optimalen Bedingungen, unter Berücksichtigung einer erhöhten Ausschlussgrenze (vgl. C.5), wertvolle Hinweise geben. Im Hinblick auf die zukünftige Verwendung von DNA-Chips wäre aber die Anwendung unterschiedlicher Stringenzen auf einem Chip und somit die Bereitstellung der optimalen Bedingungen für alle auf dem Chip immobilisierten Sonden wünschenswert (vgl. auch D.5.4).

2.3.3 Besonderheiten einiger Sonden

Efl58i

Die Sonde Efl58i, spezifisch für *E. flavescens*, zeigt einen erhöhten Hintergrund bei der Hybridisierung mit DNS von *E. casseliflavus* (Ähnlichkeitswert der 23S-rRNS 99,9%), wie dies unter D.2.3.1 beschrieben wurde. Trotz intensiver Suche konnte keine Alternative für diese Sonde gefunden werden. Alle weiteren mit dem Programmpaket ARB gegen unterschiedliche Bereiche der 23S-rRNS konstruierten Sonden erwiesen sich in der Praxis als nicht brauchbar, da sie entweder kein Signal oder ein Signal auch mit *E. casseliflavus* lieferten. Die Sonde Efl58i ergab bei weitem den besten

Signalunterschied zwischen *E. casseliflavus* und *E. flavescens*. Trotzdem war es nicht möglich, das Signal von *E. casseliflavus* weiter zu erniedrigen, ohne dass auch das Signal für *E. flavescens* zu stark sank. Es wurde daher der FA-Gehalt angegeben, der die beste Unterscheidung zwischen diesen beiden Arten ermöglicht. Für die Ausschlussgrenze gelten die Angaben von D.2.3.1.

Der umgekehrte Fall, also die Konstruktion einer Sonde für *E. casseliflavus*, stellte dagegen kein Problem dar.

Enc38i

Die ‚gattungsspezifische‘ Sonde Enc38i (spezifisch für *Enterococcus* spp., *T. halophilus* und *V. fluvialis*) weist an der ersten Stelle (Position³⁷ 847) bzw. an der ersten und zweiten Stelle (Position³⁷ 847 und 848) mit rDNS von *E. solitarius* bzw. *T. halophilus* eine bzw. zwei Fehlpaarungen auf. Da zwei der drei Fehlpaarungen nur sehr schwach sind (A-G statt A-T bzw. A-C G-G statt A-T G-C) und außerdem direkt am Rand der Sonde liegen, ist eine Diskriminierung nicht möglich. Hybridisierungen mit DNS von *E. solitarius* und *T. halophilus* lieferten sogar gleich starke Signale wie Hybridisierungen gegen die eigentlichen Zielorganismen. Deswegen wird diese Sonde für o.g. Arten verwendet. Der naheliegende Versuch, die Sonde um eben diese zwei Basen zu verschieben, brachte keinen Erfolg. Die Sonde weist zwar dann nach Datensatz genau die erwünschte Spezifität auf, doch in der Praxis war die Diskriminierung falsch positiver Signale z.B. von *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* u.a. nicht mehr möglich.

Als Negativkontrollen wurden nah verwandte Arten und Arten, die bei konventioneller Wasseruntersuchung als falsch positiv auftraten, wie *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis* u.a., verwendet. Keine dieser Negativkontrollen ergab ein Signal mit Enc38i. Die in Tab. C2 genannte Spezifität hat sich also in der Praxis bestätigt.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass Enc38i sowohl laut Datensatz als auch in der Praxis mit DNS von *V. fluvialis* hybridisiert, obwohl dieser Organismus nicht in die Gattung *Enterococcus* fällt, sondern zur Schwestergattung *Vagococcus* zählt.

Efs129, Enc93 und Enc131

Am Beispiel dieser drei Sonden wird die Notwendigkeit des Mehrfachsondenkonzeptes besonders deutlich. Die bis vor kurzer Zeit gültigen Spezifitäten (Meier, 1997; Mehlen, 1999) müssen um neu entdeckte Enterokokkenarten erweitert werden. So ist nach dem

³⁷ *E. coli* (Brosius et al., 1981)

neuesten Datensatz (Okt. 2001) die Sonde Efs129 zusätzlich für *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis* und „*E. rottae*“ spezifisch. Enc93 ist zusätzlich für „*E. azikeevi*“ und *E. villorum* spezifisch und die Spezifität von Enc131 erweitert sich um die Arten „*E. azikeevi*“, *E. villorum* und „*E. phoeniculicola*“. Da diese erweiterten Spezifitäten nur auf theoretischer Evaluation der Sonden mittels Computer beruhen, sind sie nicht in Tab. C3 und C4 aufgeführt.

3 Sonden für in Kläranlagen relevante Bakterien

Die biologische Abwasserbehandlung ist von großer Bedeutung bei der Klärung von Abwässern. Der Abbau oder die Bindung von Substanzen hängt dabei von der Zusammensetzung der Population und diese wiederum von chemischen und physikalischen Parametern der Anlage ab. Durch Untersuchung der Populationsstruktur und deren Veränderungen können Rückschlüsse auf den Zustand der Anlage gezogen werden (Knopp *et al.*, 2000).

Zur Überwachung einer Anlage ist eine schnelle Methode notwendig, mit der eine Vielzahl von Proben mit einer großen Anzahl von Sonden untersucht werden kann. Dafür bietet sich die reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte an, da zum einen diese Methode mit der in Routinelabors vorhandenen Ausstattung durchgeführt werden kann und zum anderen ein hoher Probendurchsatz durch Automatisierung der Methode möglich ist.

Daher wurde eine Reihe von Sonden zur Detektion von in Kläranlagen relevanten Bakterien mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung aus verschiedenen Arbeiten ausgewählt und auf ihre Tauglichkeit zur Anwendung bei der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte, insbesondere unter den in dieser Arbeit optimierten Bedingungen, untersucht. In der Praxis wird durch Anwendung dieser Methode ein Hybridisierungsmuster erhalten, das die qualitative Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der Probe innerhalb der Grenzen des Spezifitätsprofils der verwendeten Sonden und der Nachweisgrenze der Methode wiedergibt. Durch das schnelle Erkennen einer Änderung der Populationsstruktur können gezielt Maßnahmen ergriffen werden, um die Reinigungsleistung der Kläranlage durch Änderung der Prozessführung zu erhalten oder zu erhöhen.

In Tab. C9 sind alle ausgewählten Sonden mit Position, Sequenz, Spezifität und Herkunft beschrieben. In Tab. C10 sind die Ergebnisse der Evaluierung in der Mikrotiterplatte zusammengefasst. Dabei zeigte sich, dass, sofern Referenzorganismen in Reinkultur oder zumindest klonierte 16S-rDNS zur Verfügung standen, nahezu alle Sonden, die sich bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bewährten, auch in der Mikrotiterplatte angewendet werden können. Bei Anwendung eines Waschgradienten

von 5% - 30% FA werden für diese Sonden die hinsichtlich Sensitivität und Spezifität optimalen Bedingungen durchlaufen.

Ein Problem stellen die Sonden dar, die nur mit unmarkierter Kompetitorsonde (Manz *et al.*, 1992) die nötige Spezifität erreichen, da die Verwendung von solchen Kompetitorsonden bei der reversen Hybridisierung nicht möglich ist. Weitere Erläuterungen zum Einsatz von Kompetitorsonden sind unter D.2.3.1 zu finden.

Aus Tab. C10 ist ersichtlich, dass nicht alle aufgeführten Sonden getestet werden konnten, da keine Referenzorganismen in Reinkultur bzw. als Klone zur Verfügung standen. Diese sehr zeitaufwendigen Spezifitätsuntersuchungen mit Reinkulturen von Referenzorganismen (sofern diese überhaupt vorhanden sind) werden aber bei der großen Zahl an Sonden, die in Zukunft für die reverse Hybridisierung auf DNS-Chips Verwendung finden sollen, kaum mehr möglich sein. Hier scheint es eher angebracht, aus den bei der Hybridisierung erhaltenen Denaturierungskurven Rückschlüsse zu ziehen. So lässt sich aus dem Kurvenverlauf u.U. ableiten, ob es sich um eine Hybridisierung mit Fehlpaarung handelt, die bei höherer Stringenz ausgewaschen wird (z.B. Kurve *E. hirae* in Abb. C12 / 2) oder ob die Sonde mit passender DNS hybridisiert hat (z.B. Kurve *T. halophilus* in Abb. C12 / 2). Mit weiter steigender Stringenz wird auch die passende DNS ausgewaschen, die Denaturierungskurve passender Hybride ist jedoch gegenüber Denaturierungskurven von Hybriden mit Fehlpaarungen zu höheren Stringenzen hin verschoben und zeigt in der Regel einen steileren Kurvenverlauf.

4 Reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte

4.1 Immobilisierung

4.1.1 Trägermaterial

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dem Trägermaterial entscheidende Bedeutung zukommt (Graf, 1998; Schedl *et al.*, 2000). Bei Untersuchungen von drei kommerziell erhältlichen Mikrotiterplattentypen (CovaLink™ [NUNC, Roskilde, DK]; NucleoLink™ [NUNC, Roskilde, DK]; MaxiSorp™ [NUNC, Roskilde, DK]) wurden deutliche Unterschiede in der Immobilisierungseffizienz der eingesetzten Oligonukleotide festgestellt.

Für die Immobilisierung wurde das EDC-Kopplungsverfahren verwendet. Diese Methode hat sich in früheren Arbeiten gegenüber anderen Verfahren, wie der Immobilisierung mittels NaCl, SSC oder UV-Crosslinking, als besonders effizient erwiesen (Graf, 1998). Dabei reagiert das wasserlösliche EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) mit einer Carboxyl- oder Phosphatgruppe zu einem aktivierten Komplex, der mit primären oder sekundären Aminen eine Bindung eingeht

und dabei 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)harnstoff freisetzt (Rasmussen *et al.*, 1991; Vollhardt, 1990).

CovaLink™-Mikrotiterplatten – als reaktive Gruppe dient eine sekundäre Aminogruppe, die über einen Spacer mit der Polystyroloberfläche verbunden ist – wurden insbesondere für die kovalente Kopplung von Biomolekülen mit freier Carboxylgruppe entwickelt und für reverse Hybridisierungen verwendet. Die Kopplung der Oligonukleotide beruht wahrscheinlich auf der Ausbildung einer Phosphoramidatbindung zwischen einem Aminolinker der Platte und dem phosphorylierten Ende des Nukleotids (Rasmussen *et al.*, 1991; Chevrier *et al.*, 1993) mit Hilfe von EDC. Bei weiteren Untersuchungen konnte aber nur eine mäßige Bindungsfähigkeit beobachtet werden. Daraus resultierte zwangsläufig ein sehr schwaches Hybridisierungssignal. Lediglich durch übermäßig starke Erhöhung der Oligonukleotidkonzentration konnte eine Signalverstärkung erzielt werden (Schedl *et al.*, 2000). Im Verlauf dieser Arbeit wurde deshalb auf den Einsatz von CovaLink™-Mikrotiterplatten verzichtet.

Die bereits in früheren Arbeiten (Koob, 1997; Graf, 1998) verwendeten **MaxiSorp™-Mikrotiterplatten** – mit γ -Strahlung (^{60}Co) behandelte Polystyroloberfläche – zeigten eine hohe Kopplungseffizienz. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden von Nikiforov und Rogers (1995), die unter Verwendung von EDC und ELISA-Mikrotiterplatten (Immulon 4; Dynatech, Chantilly, VA, USA) ebenfalls eine sehr gute Immobilisierungseffizienz festgestellt hatten. Die eingesetzte Oligonukleotidmenge führte bei 10 - 20 pmol / Kavität zu sehr guten Ergebnissen und war damit deutlich niedriger als die von Chevrier *et al.* (1993) für CovaLink™-Mikrotiterplatten verwendete Menge von ca. 75 pmol / Kavität. Eine Verwendung von mehr als 20 pmol Sonde / Kavität ist bei Verwendung der MaxiSorp™-Mikrotiterplatten nicht mehr sinnvoll, da dann in manchen Fällen eher eine Signalreduktion zu beobachten ist. Dies lässt sich z.B. mit dem sog. „Crowding-Effekt“ erklären, d.h. eine zu dichte Belegung der Oberfläche kann zu sterischer Behinderung bei der Hybridisierung führen (Schedl *et al.*, 2000).

Der Kopplungsmechanismus ist nicht vollständig geklärt. Für eine kovalente Bindung spricht die sehr hohe Stabilität, da auch nach einem Waschschrift mit 0,4 N Natronlauge die Sonden gebunden bleiben. Der starke Bindungscharakter verhindert somit eine Ablösung der Sonden während der Hybridisierung oder der stringenten Waschschriffe. Nikiforov und Rogers (1995) sind allerdings der Meinung, dass keine kovalente Anbindung der Oligonukleotide auf der Mikrotiterplatte, sondern eine Immobilisierung durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt, wobei EDC als kationisches Detergens die Hydrophobizität der Oligonukleotide herabsetzen soll.

In jedem Fall war eine Immobilisierung nur möglich, wenn dem Ansatz EDC zugegeben wurde, wohingegen der Zusatz von 1-Methylimidazol keine Veränderung ergab. Die Phosphorylierung der Sonden erwies sich als nicht unbedingt erforderlich. Welche Bindungsmechanismen zutreffend sind und inwieweit Bindungen zwischen Carboxylgruppen der Mikrotiterplattenoberfläche und exocyclischen Aminogruppen der Nukleotide an der Immobilisierung beteiligt sind, kann gegenwärtig noch nicht abschließend beurteilt werden.

NucleoLink™-Mikrotiterplatten erwiesen sich als sehr gut geeignet für die Immobilisierung der Sonden. Nach anschließender Hybridisierung wurden sogar höhere Signale erreicht als mit MaxiSorp™-Mikrotiterplatten (Schedl *et al.*, 2000). Genauere Angaben über die Art der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche wurden bislang vom Produzenten (Nunc, Roskilde, DK) nicht gemacht. Gegenüber der Verwendung von MaxiSorp™-Mikrotiterplatten ergibt sich jedoch kein entscheidender Vorteil, der den erheblich höheren finanziellen Aufwand für die NucleoLink™-Mikrotiterplatte für Routineuntersuchungen rechtfertigen würde. Als nachteilig erwies sich bei der kolorimetrischen Detektion (Absorptionsmessung bei 450 nm) die leichte Gelbfärbung des Materials, die für eine Erhöhung des Hintergrundsignals (um den Faktor 2-3) verantwortlich ist (Schedl *et al.*, 2000).

In vorliegender Arbeit wurden daher MaxiSorp™-Mikrotiterplatten für die reverse Hybridisierung verwendet.

4.1.2 Modifikation der Oligonukleotide

Zunächst wurden 5'-phosphorylierte Oligonukleotide (5'-POH-Sequenz) verwendet, da sie sich in früheren Arbeiten (Graf, 1998) als besonders geeignet für eine Hybridisierung nach Immobilisierung in MaxiSorp™-Mikrotiterplatten mittels EDC erwiesen. Wurde die Phosphatgruppe am 5'-Terminus durch einen Spacer aus 6 Nukleotiden (5'-AAAAAA-Sequenz) ersetzt, konnten jedoch meist gleich gute, zum Teil sogar bessere Ergebnisse erzielt werden. Eine zusätzliche Phosphorylierung (5'-POH-AAAAAA-Sequenz) erbrachte keine Verbesserung, eine Verlängerung auf 12 Nukleotide (5'-AAAAAAAAAAAA-Sequenz) erbrachte sogar eine Verschlechterung der Hybridisierungsergebnisse gegenüber der 6 A-Verlängerung (Schedl *et al.*, 2000). Nicht modifizierte Sonden (5'-Sequenz) führten in manchen Fällen zu guten Hybridisierungsergebnissen (z.B. Sonde Eduhi09), in anderen Fällen konnten jedoch nur sehr schwache bis keine Hybridisierungssignale erhalten werden (z.B. Sonde Ece09). Gerade diese beiden nicht modifizierten Sonden (Eduhi09 und Ece09), die durch erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer Hybridisierungseffizienz auffielen, sind gegen den gleichen Bereich der 23S-rRNS gerichtet (Helix 9, *E. coli*-Position 142).

Diese Unterschiede im Hybridisierungsverhalten können also nicht durch unterschiedliche Zielbereiche der Sonden innerhalb des rRNS-Operons erklärt werden.

Durch die Aufnahme von Schmelzkurven konnte gezeigt werden, dass 6 A-Sondenhybride immer geringfügig erhöhte Schmelztemperaturen gegenüber phosphorylierten und diese wiederum geringfügig erhöhte Schmelztemperaturen gegenüber nicht modifizierten Sondenhybriden aufweisen (vgl. Abb. C3). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass bei den phosphorylierten und erst recht bei den nicht modifizierten Oligonukleotiden nicht die gesamte Länge der Sonde zur Hybridisierung bereit steht, da sich die ersten Nukleotide zu nah an der Oberfläche der Mikrotiterplatte befinden. Bei den um 6 Nukleotide verlängerten Sonden steht dagegen die ganze Sequenz für die Hybridisierung zur Verfügung, was zur Ausbildung stabilerer Hybride führt (vgl. auch Schedl *et al.*, 2000). Daher muss bei Verwendung von verlängerten Sonden auch mit etwas abweichenden (erhöhten) optimalen FA-Werten gerechnet werden.

Durch diesen Spacereffekt könnte auch die bei einigen Sonden festgestellte gesteigerte Hybridisierungseffizienz der verlängerten Sonden erklärt werden. Die 6 Nukleotide dienen als Abstandshalter zwischen der Plattenoberfläche und der eigentlichen diagnostischen Sequenz und verbessern die Zugänglichkeit der Basen der Sonde gegenüber der Ziel-DNS. Allerdings wurden bei Verwendung nicht modifizierter Sonden teilweise auch gute Hybridisierungsergebnisse erhalten. Da, wie bereits oben erwähnt, der Immobilisierungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, sind weiterführende Aussagen bezüglich der Ursachen dieser unterschiedlichen Verhaltensweisen verschiedener Sonden nicht möglich. Insbesondere die Frage, ob sich eine kovalente Bindung zwischen Mikrotiterplatte und 5'-Ende oder zwischen Mikrotiterplatte und exocyclischen Aminogruppen bildet oder ob doch hydrophobe Wechselwirkungen für die Immobilisierung verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt.

Fest steht allerdings, dass eine Phosphorylierung der Sonden nicht unbedingt erforderlich ist, wohingegen ohne EDC weder auf der NucleoLink™- noch auf der MaxiSorp™-Oberfläche Oligonukleotide immobilisiert werden konnten (Schedl *et al.*, 2000). Insgesamt eignen sich besonders die um 6 Nukleotide verlängerten Sonden (5'-AAAAAA-Sequenz) für die Hybridisierung in Mikrotiterplatten. Aber auch phosphorylierte Sonden (5'-POH-Sequenz) sind gut geeignet. Sonden ohne Modifikation (5'-Sequenz) können dagegen wegen teilweise schlechter Hybridisierungsergebnisse nicht zur Verwendung bei der reversen Hybridisierung empfohlen werden.

4.2 Denaturierungsbedingungen

Die notwendige Denaturierung der PCR-Produkte erfolgte thermisch. Dies wurde zum einen durch Erhitzung des PCR-Produktes im Wasserbad (98 °C) und anschließende Verdünnung mit eiskalter (0 °C) Hybridisierungslösung durchgeführt. Zum anderen wurde das PCR-Produkt direkt in der Kavität denaturiert, wie dies bei der Immobilisierung kurzer PCR-Produkte bereits erfolgreich angewendet wurde (Wassill, 1999). Bei den hier verwendeten PCR-Produkten (ca. 4,5 kb) erfolgte die Denaturierung in der Mikrotiterplatte allerdings zu langsam. Erst nach 60 min Denaturierungszeit und anschließender Hybridisierung konnten brauchbare Signale erreicht werden (vgl. Abb. C4). Für PCR-Produkte dieser Länge ist die Wärmeübertragung im Hybridisierungssofen, obwohl die Mikrotiterplatte direkt auf einen 100 °C heißen Einschubboden gestellt wurde (direkter Kontakt der U-Böden der Kavitäten mit der Platte), nicht effektiv genug. Nach zehnmütiger Denaturierung im Wasserbad und anschließender Hybridisierung waren die Werte der Hybridisierungssignale ca. doppelt so hoch wie die Signale nach 60-minütiger Denaturierung in der Mikrotiterplatte.

In Zukunft könnte die Automatisierung der Methode im Vordergrund stehen. Hier stellen NucleoLink™-Mikrotiterplatten eine Alternative dar. Sie sind, wie MaxiSorp™-Mikrotiterplatten, sehr gut für die reverse Hybridisierung geeignet (vgl. D.4.1.1), durch ihre spezielle Form können sie aber in einem Thermocycler verwendet werden. Hier ist gegenüber dem o.g. Verfahren eine bessere Wärmeübertragung zu erwarten. So ist es denkbar, die beschichtete Platte mit Hybridisierungslösung inklusive des PCR-Produktes zu befüllen, und die Denaturierung mit direkt anschließender Hybridisierung in einem Thermocycler mit entsprechend programmierter Temperaturführung durchzuführen. Dadurch entfällt ein zusätzlicher Pipettierschritt, da weder das PCR-Produkt extra denaturiert werden muss, noch eine Zugabe von Natronlauge als denaturierendes Agens und deren anschließende Neutralisierung erforderlich ist. Ein weiterer Vorteil ist der gleichzeitige Beginn der Hybridisierung in jeder Kavität, wohingegen bei der thermischen Denaturierung im Wasserbad eine gewisse Zeit zwischen dem Befüllen der ersten und der letzten Kavität vergeht. In Verbindung mit einem Pipettierroboter könnte so die Methode vollständig automatisiert werden.

4.3 Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Der entscheidende Vorteil reverser Hybridisierungsverfahren gegenüber anderen Hybridisierungstechniken liegt darin, dass im selben Experiment eine Vielzahl von Sonden unterschiedlicher Spezifität verwendet und damit eine entsprechende Datenfülle erhoben werden kann. Ein zentrales Problem dieser Methode ist es aber, allen Sonden im selben Experiment die für die jeweilige Spezifität erforderlichen Bedingungen zu bieten. Während der Konstruktion der Sonden bereits auf gleiche

experimentelle Erfordernisse zu achten, ist nur in begrenztem Umfang, abhängig von den Sequenzdaten, möglich.

So wurde versucht, eine andere Möglichkeit zu finden, die Unterschiede der hinsichtlich Sensitivität und Spezifität optimalen Hybridisierungsbedingungen für die einzelnen Sonden auszugleichen. In der Literatur sind eine Reihe Substanzen beschrieben, die zur Nivellierung dieser Unterschiede verwendet werden können. Die Auswirkungen von Alkylammoniumchloriden auf die Stabilität von Basenpaarungen und DNA-Doppelsträngen sind schon seit Jahren bekannt (Shapiro *et al.*, 1969; Melchior und von Hippel, 1973; Orosz und Wetmur, 1977). Der Einfluss von Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) auf die Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden ist ebenfalls beschrieben (Wood *et al.*, 1985; DiLella und Woo, 1987).

TMACl lagert sich spezifisch an die A-T Paare an und erhöht deren Dissoziationstemperatur mit steigender TMACl-Konzentration. Bei 3 M ist der Wert erreicht, bei dem die Dissoziationstemperatur der A-T Paarung gleich der der G-C Paarung ist (DiLella und Woo, 1987). Eine weitere Erhöhung der TMACl-Konzentration führt zu einer weiteren Steigerung der Dissoziationstemperatur über den Wert der G-C Paarung hinaus. Bei Anwendung einer 3 M TMACl-Lösung ist die Dissoziationstemperatur nur noch von der Länge der Sonde, aber nicht mehr vom GC-Gehalt abhängig.

In der Praxis wurde TMACl in der Waschlösung oder sowohl in der Hybridisierungs- als auch in der Waschlösung verwendet (Koob, 1997; Graf, 1998).

In vorliegender Arbeit zeigte sich jedoch, dass die unterschiedlichen Anforderungen der Sonden hinsichtlich Stringenz durch Verwendung von TMACl nicht vollständig ausgeglichen werden konnten, auch nicht bei Verwendung von TMACl sowohl in der Hybridisierungs- als auch in der Waschlösung (vgl. C.3.3).

Dieses Problem konnte schließlich dadurch gelöst werden, dass nach der Hybridisierung mehrere isotherme Waschschriffe mit unterschiedlichen Puffern erfolgten. Damit wird eine kontrollierte Denaturierung der Hybride durchgeführt, d.h. für jedes Sonden-Zielsequenz-Hybrid werden die für die jeweilige Spezifität optimalen Bedingungen durchlaufen. Dabei haben sich vier Waschpuffer (5%, 10%, 15% und 20% FA) für alle Sonden des Enterokokkensondensatzes als ausreichend erwiesen (vgl. Tab. C7 und C8).

In der Praxis könnte z.B. das Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen für die Sonden mit den extremsten Anforderungen an die Stringenz (z.B. eine Sonde mit dem höchsten und eine mit dem niedrigsten GC-Gehalt) sicherstellen, dass für alle Sonden die optimalen Bedingungen durchlaufen wurden, also die Temperaturen, FA- und TMACl-Konzentrationen exakt eingehalten wurden.

4.4 Hybridisierungsdauer

Bei der Hybridisierung mit einem 4,5 kb langen PCR-Produkt erfolgte in den ersten 2 h die stärkste Steigerung der Signalintensität. Danach stieg das Signal nur noch langsam, bis nach 3-4 h ein Signalmaximum erreicht wurde (Schedl *et al.*, 2000). Eine weitere Verlängerung der Hybridisierungszeit brachte keine Signalsteigerung mehr. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde eine Hybridisierungszeit von 2 h gewählt, da eine Verlängerung auf 4 h nur noch eine vernachlässigbare Signalsteigerung zur Folge hatte.

4.5 Detektion

Bei allen Hybridisierungen in der Mikrotiterplatte wurden DIG-markierte Amplifikate eingesetzt, mit Antikörpern (gekoppelt mit Meerrettichperoxidase) versetzt und mit dem chromogenen Substrat Tetramethylbenzidin kolorimetrisch detektiert. Dabei ist die Empfindlichkeit direkt von der Menge des im PCR-Produkt enthaltenen Digoxigenins abhängig. Durch Verwendung markierter Primer enthält jeder Einzelstrang des PCR-Produktes genau ein Digoxigeninmolekül. Die Markierungsdichte ist somit genau definiert, allerdings auch sehr niedrig. Durch Verwendung von markierten Nukleotiden (DIG-dUTP) während der PCR kann die Markierungsdichte erheblich gesteigert werden. Sie ist abhängig vom GC-Gehalt des Amplifikats und vom Verhältnis von markiertem dUTP zu unmarkiertem dTTP. Ein Verhältnis von 1:19 (DIG-dUTP : dTTP) erwies sich als ausreichend; wenn eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, kann diese aber durch Verwendung eines höheren DIG-dUTP-Anteils während der PCR gesteigert werden. Je länger das PCR-Produkt ist, desto mehr Digoxigenin ist außerdem pro Molekül amplifizierter DNS enthalten. Genauere Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Markierungsdichten sind bei Graf (1998) zu finden.

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Ziel-DNS für die Hybridisierung in der Mikrotiterplatte scheint derzeit wenig sinnvoll, da die Sensitivität um einige Größenordnungen unter der des kolorimetrischen Systems DIG / POD liegt (Schedl *et al.*, 2000). Eine Alternative wäre aber das luminometrische Detektionssystem DIG / AP, das sogar noch um den Faktor 2-3 empfindlicher ist (Schedl *et al.*, 2000).

4.6 Lagerfähigkeit und Rehybridisierung

Um den Zeitbedarf der reversen Hybridisierung in Mikrotiterplatten zu verringern, können die Mikrotiterplatten im Voraus beschichtet und bei 4 °C gelagert werden. Die beschichteten Mikrotiterplatten sind mind. 8 Wochen lagerfähig, ohne dass es zu Beeinträchtigungen der Hybridisierungsergebnisse kommt (Schedl *et al.*, 2000). Auch ist es möglich, die Mikrotiterplatten mehrmals zu verwenden. Nach dem Entfernen der

Ziel-DNS mit Denaturierungslösung (0,2 N Natronlauge, 0,1% Tween 20) ist die Platte wieder für eine neue Hybridisierung einsetzbar (2x Waschen mit Denaturierungslösung, 2x Waschen mit TRIS-Waschlösung). Dabei war auch nach 4 Rehybridisierungen keine Verschlechterung der Signale feststellbar (Schedl *et al.*, 2000).

Durch Mehrfachbenutzung und Lagerung der beschichteten Mikrotiterplatten können sowohl der Zeitaufwand als auch die Kosten des Verfahrens deutlich gesenkt werden.

5 Reverse Hybridisierung auf DNS-Chips

5.1 Arrayer

Zum Auftragen der Sonden auf die Objektträger wurde der „GMS 417 Arrayer“ von Affymetrix verwendet. Dieses Modell arbeitet mit dem „Pin-and-Ring-System“. Dabei taucht ein Ring in die aufzutragende Flüssigkeit ein. Beim Herausziehen bleibt ein Flüssigkeitsfilm, ähnlich einer Seifenblase, im Ring hängen. Zum „Spotten“ sticht eine Nadel durch den Flüssigkeitsfilm und tippt auf den Objektträger auf. Für jedes Auftreffen der Nadel auf den Objektträger sticht die Nadel durch diesen Flüssigkeitsfilm und bringt so immer die gleiche Menge Sondenlösung auf. Beim Wechsel der Sondenlösung werden Nadel und Ring mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

Dieses System zeichnet sich durch eine hohe Spotuniformität aus. Der Spot-Durchmesser ist mit ca. 150 μm gering und erlaubt eine hohe Belegungsdichte (ca. 700 Spots / cm^2). Ein wesentlicher Nachteil ist allerdings die relativ niedrige Spotgeschwindigkeit. So benötigt ein 4-Nadel-Spotter für eine Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) und 20 Objektträger ca. 2 h (jede Sonde 3 x gespottet; 5 x pro Spot aufgetüpfelt). Dies ist für die hier verwendete Anzahl von Sonden ausreichend, für eine Verwendung von mehreren Tausend Sonden, wie dies längerfristig geplant ist, allerdings zu langsam.

5.2 Immobilisierung

Zur Immobilisierung wurden verschiedene Aldehyd-Objektträger verwendet, zum einen ArrayIt™ SuperAldehyde und zum anderen CSS Silylated Slides (Aldehyde). Erstere zeichnen sich durch eine sehr niedrige Hintergrundfluoreszenz aus, letztere fielen durch oft ungleichmäßige Hintergrundfluoreszenz auf. Da sich in der Praxis diese Unterschiede nach erfolgter Hybridisierung nicht stark bemerkbar machten und der Preis für CSS-Objektträger nur ca. 1 / 10 des Preises für ArrayIt™ Objektträger beträgt, wurden CSS Silylated Slides (Aldehyde) für die meisten Hybridisierungen verwendet.

Die zugehörigen Oligonukleotide sind am 5'-Ende aminiert. Zur Immobilisierung wird die Sonde, zur Vermeidung einer zu schnellen Verdunstung, in 50%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und auf den Chip aufgetragen. Während der anschließenden

Ruhephase ÜN bei RT werden die Sonden auf den Objektträger gebunden. Vor Gebrauch müssen übrige Aldehydgruppen reduziert werden. Auf dem Objektträger laufen dabei folgende Reaktionen ab:

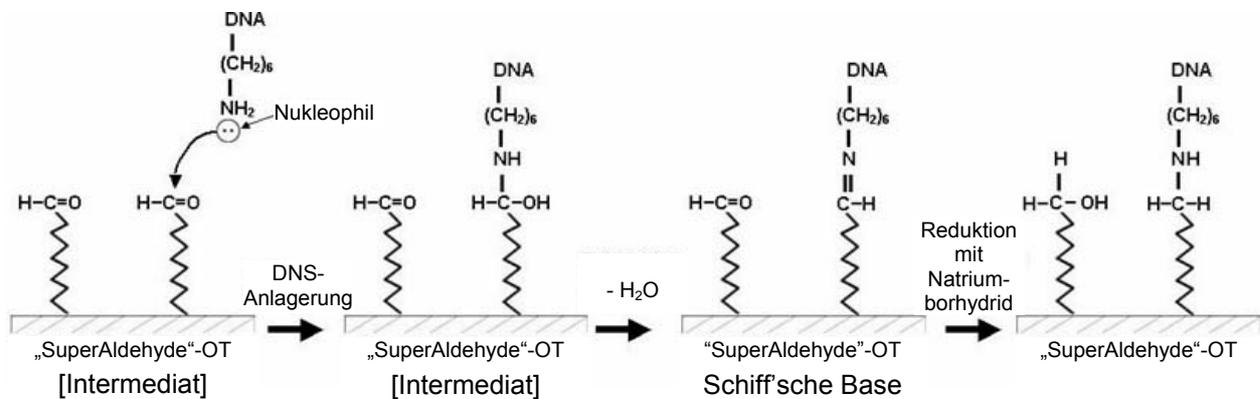


Abbildung D4: Immobilisierung von 5'-aminomodifizierten Oligonukleotidsonden auf Objektträgern mit Aldehydbeschichtung

Dieses System hat gegenüber anderen Systemen (aminierte Objektträger und phosphorylierte Oligonukleotide oder Polystyrolobjektträger und phosphorylierte Oligonukleotide), die auch erfolgreich angewandt wurden (Schedl, 2002), den Vorteil, dass die gelösten Sonden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und bei Bedarf zum Belegen neuer Chips verwendet werden können. Bei Verwendung phosphorylierter Oligonukleotide muss die Sonde in 10 mM EDC-Lösung gelöst werden. Da EDC relativ schnell zerfällt, sind diese Sondenlösungen nur einmal zu gebrauchen. Dadurch wird der Verbrauch an Oligonukleotiden insgesamt extrem erhöht, obwohl für diese Verfahren geringere Sondenkonzentrationen ausreichen.

5.3 Sondenverlängerung am 5'-Ende

Während in der Mikrotiterplatte eine Verlängerung der Sonden um mehr als 6 Nukleotide keine Steigerung der Hybridisierungssignale mehr zur Folge hatte (vgl. C.3.1.2), konnte auf DNS-Chips durch weitere T-Verlängerung der Sonden am 5'-Ende die Hybridisierungseffizienz noch erheblich gesteigert werden (vgl. C.4.1).

Nach Firmenangaben (MWG-Biotech AG, Ebersberg, D; persönliche Mitteilung) wurde mit einer Verlängerung von 15 T bereits eine maximale Signalsteigerung erzielt. Dies konnte bei der hier durchgeführten Versuchsreihe mit cy- und biotinmarkierten PCR-Produkten nicht bestätigt werden. In dem in vorliegender Arbeit verwendeten Bereich (0-36 T) wurde keine Sättigung erreicht (vgl. Abb. C8). Ein Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Länge des verwendeten PCR-Produktes sein. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden PCR-Produkte von 4,5 kb Länge zur Hybridisierung eingesetzt, wohingegen nach Firmenangaben die Markierung mittels

„Random-Priming-Methode“ durchgeführt (MWG-Biotech AG, Ebersberg, D; persönliche Mitteilung) und daher kürzere PCR-Produkte unterschiedlicher Länge zur Hybridisierung benutzt wurden.

Ein Grund für die stärkeren Hybridisierungssignale bei verlängerten Sonden ist die bessere Erreichbarkeit der Zielsequenz innerhalb des PCR-Produktes. Die Sonden sind am 5'-Ende mit der Oberfläche des Objektträgers verbunden (vgl. Abb. D4). Je länger nun die T-Verlängerung („Spacer“) ist, desto größer ist der Abstand zwischen der Oberfläche des Objektträgers und der eigentlichen SONDENSEQUENZ. Dadurch können sterische Behinderungen zwischen überhängendem PCR-Produkt und Objektträgeroberfläche bei der Hybridisierung vermindert und die Hybridisierungseffizienz gesteigert werden. Soweit erforderlich, könnte durch eine weitere Verlängerung der Sonden die Empfindlichkeit der Hybridisierung noch erhöht werden (vgl. Abb. C8).

5.4 Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Im Gegensatz zur Hybridisierung in der Mikrotiterplatte (vgl. C.3.3) konnte bei der Hybridisierung auf DNS-Chips kein Gradient gefahren werden, um für alle Sonden die optimalen Bedingungen zu erreichen. Hier ist die Verwendung von temperatenausgleichenden Zusätzen noch wichtiger. System 2 (vgl. B.12.2) mit 50 °C Waschttemperatur ist geeignet, um für die meisten Sonden die notwendige Stringenz bereitzustellen. Allerdings gilt dies nicht für alle. So ergeben einige Sonden unter diesen Bedingungen falsch positive Signale und müssen daher unter stringenteren Bedingungen verwendet werden. In der Praxis lässt sich dies z.B. dadurch erreichen, dass mehrere Chips parallel hybridisiert und bei verschiedenen Waschttemperaturen gewaschen werden. Ein stufenweises Waschen, bei dem der Chip nach dem ersten Waschen gescannt und dann bei höherer Stringenz gewaschen und wiederum gescannt wird, ist weniger empfehlenswert, da hierbei der Chip für jeden Scanvorgang getrocknet wird. Nach mehrmaligem Eintrocknen der Hybride ist die so erhaltene Schmelzkurve aber nicht mehr mit der Kurve aus Parallelansätzen zu vergleichen (Loy, Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München, Freising, D; persönliche Mitteilung).

Bei Verwendung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte wäre auch eine Onlinedetektion in einer Flusskammer denkbar. Durch diese Kammer könnte die Waschlösung gepumpt und dabei langsam die Stringenz durch Temperaturerhöhung oder kontinuierliche Steigerung des FA-Gehaltes erhöht werden. Dadurch könnte der Objektträger mit steigender Stringenz gewaschen und gleichzeitig die Hybride detektiert werden. So wäre sichergestellt, dass für jede Sonde die optimalen Bedingungen durchlaufen werden. Solche Geräte sind allerdings momentan noch nicht erhältlich.

Eine Alternative könnte das NanoChip™-System (Nanogen Inc., San Diego, CA, USA) darstellen. Bei diesem System erfolgt die Immobilisierung der Sonden und die Hybridisierung auf speziellen Chips. Diese ermöglichen durch Anlegen individueller Spannungen die separate Einstellung der optimalen Stringenz für jede einzelne Sonde. Momentan sind diese Chips für ca. 100 Sonden ausgelegt, in Zukunft werden aber auch Chips mit höherer Kapazität erhältlich sein. Ein Nachteil dieses Systems ist allerdings der hohe Preis für die erforderlichen Geräte und v.a. für die Chips.

5.5 Detektion

Die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Markierungsmethoden sind in C.4.3 dargestellt. Für die in vorliegender Arbeit durchgeführten Hybridisierungen hat sich die Verwendung von biotinmarkierten PCR-Produkten und anschließende Detektion mit Cy5-Streptavidin sehr gut bewährt.

Für die unter D.5.4 beschriebene Onlinedetektion, die in Zukunft eine einfachere Einstellung der optimalen Stringenzen ermöglichen könnte, müssen aber bereits fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte zur Hybridisierung eingesetzt werden. Da ein direkter Einbau von Cy-markierten Nukleotiden sehr ineffektiv ist, könnte hier die Verwendung von fluoresceinmarkierten Nukleotiden eine bessere Alternative darstellen. Diese Nukleotide werden besser von der Polymerase eingebaut als Cy-Nukleotide³⁸. Weitere Alternativen sind die „Nick-Translation“ oder die „Random-Priming-Methode“ unter Verwendung Cy-markierter Nukleotide (Yu *et al.*, 1994) und die chemische Markierung der fertigen PCR-Produkte mit Cy-Farbstoffen z.B. mit Hilfe des „Label IT[®] Labeling Kit“ (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, D).

6 Untersuchung von Realproben

Die Untersuchung von Wasser und Lebensmittel auf Anwesenheit von Enterokokken beruht meist auf der Verwendung verschiedener Selektivmedien. Ein Problem dieser klassischen Analysenmethoden, wie sie auch in der Trinkwasserverordnung (Anonym, 2001) vorgeschrieben werden, ist der, von der Wahl des Selektivmediums abhängige, hohe Prozentsatz falsch positiver bzw. falsch negativer Ergebnisse (Koob, 1997). Eine weitere Differenzierung auf Artebene ist in der Trinkwasserverordnung nicht vorgesehen, obwohl dies notwendig erscheint, da nicht alle Enterokokken Fäkalindikatoren darstellen. Auch könnten aus dem Artenspektrum Hinweise auf die Quelle der Verunreinigungen erhalten werden.

Klassische Identifizierungsmethoden, basierend auf physiologischen Merkmalen, können nur mit Reinkulturen durchgeführt werden und benötigen daher zuerst eine zeit-

³⁸ <http://www.mdyn.com/app%5Fnotes/appnotes/an62/an62.html>

und arbeitsaufwendige Isolierung der fraglichen Mikroorganismen aus der Probe. Ein Ergebnis ist erst nach mehreren Tagen erhältlich. Abgesehen davon ist die Identifizierung bis zur Artebene mit Hilfe klassischer, physiologischer Verfahren oft mit Unsicherheiten behaftet, wie dies z.B. bei der Unterscheidung von *E. durans* und *E. hirae* der Fall ist (Devriese *et al.*, 1995; Kirschner *et al.*, 2001).

Die Identifizierung mit DNS-Sonden ist dagegen ein zuverlässiges Verfahren, mit dem auch Mischkontaminationen bis auf die Artebene entschlüsselt werden können. Außerdem liegen die Ergebnisse bereits am Tag nach der Probenahme vor. Somit steht ein Verfahren zur hygienischen Lebensmittelanalytik zur Verfügung, das eine schnellere und sicherere Identifizierung von Enterokokken, deren Bedeutung für die Wasser- und Lebensmitteluntersuchung in der Einleitung beschrieben ist, ermöglicht, als dies physiologische Testsysteme erlauben.

Um die Anwendbarkeit der Sondensätze in der Praxis zu zeigen, wurden verschiedene Proben untersucht. Bei Klärschlamm-, Quellwasser- und Speiseeisproben erfolgte eine Untersuchung auf Enterokokken. Im Fall der Speiseeisproben wurde zusätzlich durch Verwendung eines Selektivagars die An- oder Abwesenheit von Enterokokken mit einer klassischen Methode überprüft. Die Ergebnisse sind in C.7 dargestellt.

Außerdem wurden Klärschlammproben auf Ammonium- und Nitritoxidierer untersucht und die Ergebnisse mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung verglichen. Auch diese Ergebnisse sind ausführlich in C.7 beschrieben.

Bei der hier verwendeten reversen Hybridisierung in Mikrotiterplatten oder auf DNS-Chips handelt es sich um eine qualitative Methode zur Detektion und Identifizierung. Die Empfindlichkeit der Methode ist dabei in erster Linie von der DNS-Isolierung und DNS-Amplifikation abhängig. Die Effizienz der Amplifikation kann auch bei perfekter Paarung von Primer und Zielregion von benachbarten Sequenzabschnitten beeinflusst werden (Knopp *et al.*, 2000).

Die Nachweisgrenze des hier durchgeführten Verfahrens liegt bei 0,1 fmol PCR-Produkt (ca. 4,5 kb) (Schedl *et al.*, 2000). Bei der Untersuchung von Lebensmitteln ist zur Erlangung der notwendigen Sensitivität und zum Nachweis, dass es sich um lebende, vermehrungsfähige Organismen handelt, ein Anreicherungsschritt erforderlich (Frahm *et al.*, 1998). Die Anreicherung kann durch Inkubation der mit Nährmedium versetzten Probe bei 37 °C oder durch Filtration der Probe erfolgen. Die Vorkultivierung erfolgt in Brain-Heart-Infusion (BHI), da die Verwendung von Selektivmedien entscheidende Nachteile hat. Zwar könnte dies ein übermäßiges Wachstum der Hintergrundflora verhindern, Enterokokken, die auf dem Selektivmedium nicht wachsen, würden bei der Untersuchung aber übersehen. Außerdem werden vorgeschädigte Zellen (z.B. durch Auszehrung in nährstoffarmem Wasser, UV-Strahlung, Desinfektionsmittel, usw.) nicht

erfasst, da sie oft auf Selektivagar nicht mehr zu kultivieren sind (Byrd *et al.*, 1991). Bei Verwendung der Anreicherung durch Vorkultivierung der Probe kann die Nachweisgrenze auf 1-10 KBE / ml gesenkt werden (Frahm *et al.*, 1998).

Anschließend erfolgt eine DNS-Isolierung und eine PCR zur Amplifikation und Markierung der rDNS. Bei der Untersuchung von Lebensmitteln mit komplexen Matrices ist die Verwendung einer Positivkontrolle bei der PCR (Reaktionskomponenten sowie zu amplifizierendes Probenisolat und amplifizierfähige DNS) unumgänglich, da nur so die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren erkannt werden kann, die zu falsch negativen Ergebnissen führen würden (Rossen *et al.*, 1992; Gasch *et al.*, 1997).

Bei der Untersuchung von Realproben kann der Fall eintreten, dass zwar teilgruppenspezifische Sonden hybridisieren, aber keine der zugehörigen artspezifischen Sonden ansprechen, oder, im umgekehrten Fall, dass artspezifische Sonden ansprechen, aber keine der übergeordneten teilgruppenspezifischen Sonden (vgl. auch C.7.2). Wie die Hybridisierung mit DNS von Reinkulturen zeigte, sind die Sonden unterschiedlich empfindlich. Bei geringen DNS-Konzentrationen kann es vorkommen, dass eine empfindlichere Sonde noch ein Signal liefert, während das Signal einer unempfindlicheren Sonde, die nach dem Mehrfachsondenkonzept die Hybridisierung bestätigen würde, bereits im Hintergrundsignal untergeht. Dies kann durch Verwendung einer größeren Menge an PCR-Produkt bei der Hybridisierung erkannt werden. Hier ist es außerdem wichtig, das Verhalten der einzelnen Sonden bei der Hybridisierung mit DNS von Reinkulturen zu kennen, da so besser eingeschätzt werden kann, ob bei einer Hybridisierung dieser Sachverhalt zugrunde liegt. Wenn diese Möglichkeit ausgeschlossen werden kann, gibt ein derartiges Hybridisierungsergebnis Hinweise auf die mögliche Anwesenheit unbekannter Organismen. So deutet die Hybridisierung einer Teilgruppensonde, wenn gleichzeitig keine der artspezifischen Sonden anspricht, auf die Anwesenheit einer unbekannt Art innerhalb dieser Teilgruppe hin. Andererseits könnte die Hybridisierung einer artspezifischen Sonde ohne die Hybridisierung der zugehörigen Teilgruppensonde auf die Anwesenheit eines unbekannt Nichtzielorganismus hindeuten.

Eine Quantifizierung ist mit kompetitiven Hybridisierungsassays möglich (Chevrier *et al.*, 1993). Gutiérrez *et al.* (1998) haben außerdem eine gute Korrelation zwischen dem Hybridisierungssignal und der Anzahl an Mikroorganismen in der ursprünglichen Probe festgestellt, wobei sie DNS aus der Probe isolierten und eine PCR mit anschließender Hybridisierung durchführten.

Die Anreicherung durch Kultivierung und darauffolgende PCR machen aber eine Quantifizierung der Mikroorganismen in der ursprünglichen Probe unmöglich. Da dies für die Untersuchung von Trinkwasser auch nicht notwendig ist, weil nur die An- oder Abwesenheit von Enterokokken interessiert, wurde in dieser Arbeit auf die Quantifizierung nicht weiter eingegangen.

7 Ausblick

Die hier vorgestellte Methode der reversen Hybridisierung in der Mikrotiterplatte oder auf DNS-Chips stellt in Verbindung mit Sondensätzen, die dem Mehrfachsondenkonzept entsprechen, eine schnelle und zuverlässige Methode zum Nachweis und zur Identifizierung von Mischkontaminationen dar. Die im Rahmen dieser Arbeit optimierte reverse Hybridisierung in Mikrotiterplatten ist für die Routineüberwachung interessant, da dieses Verfahren durch Verwendung von Mikrotiterplatten-Washern teilweise, durch Verwendung von Pipettierrobotern sogar vollständig, automatisierbar ist. Außerdem ist sie mit der Routineausstattung vieler Labors leicht durchführbar.

Durch die Anwendung des Mehrfachsondenkonzeptes, das zur zuverlässigen Identifizierung jeder Art mehrere Sonden fordert, werden die Sondensätze immer umfangreicher. Dies erfordert miniaturisierte Verfahren, wie beispielsweise die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Hybridisierung auf DNS-Chips in Verbindung mit entsprechender Auswertungssoftware. Hier kann aufgrund der hohen Belegungsdichte die Hybridisierung einer Probe gleichzeitig mit einer Vielzahl von Sonden spezifisch für die verschiedensten Gattungen und Arten durchgeführt werden. Ziel dieser Entwicklung könnte der ‚Universalchip‘ sein, der es ermöglicht, Proben aus den unterschiedlichsten Bereichen der Mikrobiologie und der Medizin mit dem gleichen Chip zu untersuchen. Bei sehr komplexen Proben ist allerdings die Gefahr der Fehlinterpretation des Hybridisierungsmusters nicht zu unterschätzen. So kann das gleichzeitige Signal entsprechender Sonden die sichere Identifizierung einer Art nach dem Mehrfachsondenkonzept vortäuschen, obwohl diese Signale von mehreren Nichtzielorganismen hervorgerufen wurden, deren Sequenzen bisher nicht bekannt sind. Ausgehend von Sonden, die im jeweiligen Experiment kein Hybridisierungssignal zeigten, kann aber in jedem Fall die Anwesenheit der entsprechenden Arten unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze ausgeschlossen werden.

Bei der Verwendung solcher ‚Universalchips‘ ist die Verwendung eines FA- oder Temperaturgradienten in Verbindung mit gleichzeitiger Detektion der Hybride wünschenswert, da so für jede Sonde auf dem Chip die optimalen Bedingungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität im selben Experiment durchlaufen werden. So kann auch vermieden werden, dass die Hybridisierung auf DNS-Chips durch umständliche Waschprozeduren mit unterschiedlichen Lösungen oder bei unterschiedlichen Temperaturen mit mehreren Objektträgern an Potential verliert.

E ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 23S-rRNS-Gene von vier Enterokokkenarten sequenziert. Unter Einbeziehung der in der Datenbank vorhandenen Sequenzen wurden phylogenetische Untersuchungen aller bisher bekannten Enterokokkenarten durchgeführt. Aus diesen Sequenzdaten wurden ferner gegen die rRNS gerichtete art- und teilgruppenspezifische Sonden für die Gattung *Enterococcus* und für *Melissococcus pluton* und *Tetragenococcus halophilus* konstruiert und mit bereits vorhandenen Sonden zu einem hierarchischen Sondensatz zusammengestellt, der eine zuverlässige Detektion von Enterokokken bis auf die Artebene ermöglicht. Dabei wurde nach den Prinzipien des Mehrfachsondenkonzeptes vorgegangen, um die Sicherheit der richtigen Identifizierung zu gewährleisten. Auch ist es mit diesem Sondensatz möglich, Enterokokkenarten aus Gemischen zu identifizieren. Darüber hinaus wurden zur Steigerung der Empfindlichkeit der Methode ‚gattungsspezifische‘ Primer konstruiert und erfolgreich zur PCR eingesetzt.

Um die gleichzeitige Anwendung aller Sonden dieses Sondensatzes zu gewährleisten, wurden Verfahren zur reversen Hybridisierung sowohl in der Mikrotiterplatte als auch auf DNS-Chips entwickelt.

Die reverse Hybridisierung in der Mikrotiterplatte bietet die Vorteile der leichten Automatisierbarkeit und der Anwendbarkeit mit der in Routinelabors zur Verfügung stehenden Ausstattung. Hier wurden die Hybridisierungs- und Waschbedingungen optimiert. Außerdem wurde die Verwendung unterschiedlicher Sondenmodifikationen bei der Immobilisierung und der Zusatz temperatúrausgleichender Substanzen bei der Hybridisierung bzw. beim Waschen getestet. Zur Bereitstellung der hinsichtlich Sensitivität und Spezifität optimalen Bedingungen wurde die Verwendung eines Formamidgradienten während des Waschschrilles eingeführt.

Der Vorteil der reversen Hybridisierung auf DNS-Chips liegt v.a. in der Miniaturisierung und der damit verbundenen wesentlichen Einsparung an Zeit und Material. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen wurden optimiert und an die Anforderungen des entwickelten Sondensatzes angepasst. Hier wurden ebenfalls unterschiedliche Sondenmodifikationen und der Zusatz temperatúrausgleichender Substanzen getestet. Darüber hinaus wurden verschiedene Markierungsmethoden evaluiert.

Damit steht ein leistungsfähiges und zuverlässiges Verfahren zur Untersuchung einer großen Anzahl von Proben zur Verfügung. Die Praxistauglichkeit konnte an diversen Realproben (Quellwasser, Speiseeis, Klärschlamm) demonstriert werden.

F LITERATUR

- Amann, R., and W. Ludwig (1994)** Typing *In Situ* with Probes. In F.G. Priest, A. Ramos-Cormenzana, and B.J. Tindall (eds.): *Bacterial Diversity and Systematics* 115-135. Plenum Press, New York
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chrisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl (1990)** Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919-1925
- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer (1995)** Phylogenetic Identification and *In Situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169
- Amy, P.S., and H.D. Hiatt (1989)** Survival and Detection of Bacteria in an Aquatic Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:788-793
- Andrewes, F.W., and T.J. Horder (1906)** A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* **2**:708-713
- Anonym (2000)** Working Instructions. MWG Microarray Workshop on September, 13-14
- Anonym (2001)** Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001). Bundesgesetzblatt 2001, Teil I, Nr. 24, ausgegeben zu Bonn am 28. Mai 2001
- Audicana, A., I. Perales, and J.J. Borrego (1995)** Modification of Kanamycin-Esculin-Azide Agar To Improve Selectivity in the Enumeration of Fecal Streptococci from Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4178-4183
- Bailey, L., and M.D. Collins (1982)** Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *J. Appl. Bacteriol.* **53**:215-217
- Bej, A.K., M.H. Mahbubani, and R.M. Atlas (1991)** Detection of Viable *Legionella pneumophila* in Water by Polymerase Chain Reaction and Gene Probe Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:597-600
- Betzl, D., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer (1990)** Identification of Lactococci and Enterococci by Colony Hybridization with 23S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2927-2929

- Bouchez, T., D. Patureau, P. Dabert, S. Juretschko, J. Doré, P. Delgenès, R. Moletta, and M. Wagner (2000)** Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* **2**:179-190
- Bridge, P.G., and P.H.A. Sneath (1983)** Numerical taxonomy of *Streptococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **129**:565-597
- Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter, and H.F. Noller (1981)** Gene Organization and Primary Structure of a Ribosomal RNA Operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**:107-127
- Byrd, J.J., H.-S. Xu, and R.R. Colwell (1991)** Viable but Nonculturable Bacteria in Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:875-878
- Cannone et al. (2001)** The Comparative RNA Web (CRW) Site: An Online Database of Comparative Sequence and Structure Information for Ribosomal, Intron, and other RNAs. <http://www.rna.icmb.utexas.edu>
- Chevrier, D., S.R. Rasmussen, and J.-L. Guesdon (1993)** PCR product quantification by non-radioactive hybridization procedures using an oligonucleotide covalently bound to microwells. *Mol. Cell. Probes* **7**:187-197
- Clark, J.M., and R.L. Switzer (1977)** *Experimental Biochemistry*. 2nd ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco
- Cocconcelli, P.S., D. Porro, S. Galandini, and L. Senini (1995)** Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**:376-379
- Collins, M.D., A.M. Williams, and S. Wallbanks (1990)** The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:255-262
- Collins, M.D., C. Ash, J.A.E. Farrow, S. Wallbanks, and A.M. Williams (1989a)** 16S Ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.* **67**:453-460
- Collins, M.D., D. Jones, J.A.E. Farrow, R. Kilpper-Bälz, and K.-H. Schleifer (1984)** *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:220-223
- Collins, M.D., J.A.E. Farrow, and D. Jones (1986)** *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:8-12
- Collins, M.D., R.R. Facklam, J.A.E. Farrow, and R. Williamson (1989b)** *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov., and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**:283-288

- Collins, M.D., U.M. Rodrigues, N.E. Pigott, and R.R. Facklam (1991)** *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. Lett. Appl. Microbiol. **12**:95-98
- Daims, H. (2001)** Population Structure and Functional Analyses, by *In Situ* Techniques, of Nitrifying Bacteria in Wastewater Treatment Plants. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer, and M. Wagner (1999)** The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all *Bacteria*: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. System. Appl. Microbiol. **22**:434-444
- Daims, H., J.L. Nielsen, P.H. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner (xxxxa)** *In situ* Characterization of *Nitrospira*-like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. Appl. Environ. Microbiol. Eingereicht
- Daims, H., N.B. Ramsing, K.-H. Schleifer, and M. Wagner (xxxxb)** Cultivation-independent, Semiautomatic Determination of Absolute Bacterial Cell Numbers in Environmental Samples by Fluorescence *In Situ* Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. Eingereicht
- Daims, H., U. Purkhold, L. Bjerrum, E. Arnold, P.A. Wilderer, and M. Wagner (2001)** Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches. Wat. Sci. Tech. **43**:9-18
- Datta, A.R., B.A. Wentz, and W.E. Hill (1987)** Detection of Hemolytic *Listeria monocytogenes* by Using DNA Colony Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **53**:2256-2259
- De Rijk, P., J. Wuyts, Y. Van de Peer, T. Winkelmans, and R. De Wachter (2000)** The European Large Subunit Ribosomal RNA database. Nucleic Acids Res. **28**:177-178
- de Vaux, A., G. Laguerre, C. Diviès, and H. Prévost (1998)** *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the ceacum of donkeys (*Equus asinus*). Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:383-387
- Devriese, L.A., A. Van de Kerckhove, R. Kilpper-Bälz, and K.-H. Schleifer (1987)** Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. Int. J. Syst. Bacteriol. **37**:257-259
- Devriese, L.A., and B. Pot (1995)** The genus *Enterococcus*. In B.J.B. Wood, and W.H. Holzapfel (eds.): *The Genera of Lactic Acid Bacteria* 327-367. 1st ed. Blackie Academic & Professional, London

- Devriese, L.A., B. Pot, and M.D. Collins (1993)** Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:399-408
- Devriese, L.A., B. Pot, L. Van Damme, K. Kersters, and F. Haesebrouck (1995)** Identification of *Enterococcus* species Isolated from Foods of Animal Origin. *Int. J. Food Microbiol.* **26**:187-197
- Devriese, L.A., K. Ceysens, U.M. Rodrigues, and M.D. Collins (1990)** *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:247-252
- Devriese, L.A., M.D. Collins, and R. Wirth (1991)** The Genus *Enterococcus*. In *A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds.): The Prokaryotes* 1465-1481. 2nd ed. Springer-Verlag, New York
- DiLella, A.G., and S.L.C. Woo (1987)** Hybridization of Genomic DNA to Oligonucleotide Probes in the Presence of Tetramethylammonium Chloride. *Methods in Enzymology* **152**:447-451
- Edwards, D.D. (2000)** Enterococci Attract Attention of Concerned Microbiologists. *ASM News* **66**:9
- Eldar, A., C. Ghittino, L. Asanta, E. Bozzetta, M. Gorla, M. Prearo, and H. Bercovier (1996)** *Enterococcus seriolicida* Is a Junior Synonym of *Lactococcus garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish. *Curr. Microbiol.* **32**:85-88
- Farrow, J.A.E., and M.D. Collins (1985)** *Enterococcus hirae*, a New Species That Includes Amino Acid Assay Strain NCDO 1258 and Strains Causing Growth Depression in Young Chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**:73-75
- Frahm, E., I. Heiber, S. Hoffmann, C. Koob, H. Meier, W. Ludwig, R. Amann, K.-H. Schleifer, and U. Obst (1998)** Application of 23S rDNA-targeted Oligonucleotide Probes Specific for Enterococci to Water Hygiene Control. *System. Appl. Microbiol.* **21**:450-453
- Franz, C.M.A.P., U. Schillinger, and W.H. Holzapfel (1996)** Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* **29**:255-270
- Franz, C.M.A.P., W.H. Holzapfel, M.E. Stiles (1999)** Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**:1-24
- Garrity, G.M., M. Winters, and D.B. Searles (2001)** Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Release 1.0, April 2001. Springer-Verlag, New York

- Gasch, A., F. Wilborn, P. Scheu, and K. Berghof (1997)** Detection of genetically modified organisms with the polymerase chain reaction: potential problems with the food matrix. In G. Schreiber, and K.W. Bögl: *Foods produced by means of genetic engineering* 90-99. 2nd status report, BgVV-Hefte 01 / 1997
- Geldreich, E.E., and B.A. Kenner (1969)** Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Poll. Control Fed.* **41**:R336-R352
- Giraffa, G. (1995)** Enterococcal bacteriocins: Their potential as anti-Listeria factors in dairy technology. *Food Microbiol.* **12**:291-299
- Godfree, A.F., D. Kay, and M.D. Wyer (1997)** Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* **83**:110S-119S
- Graf, E. (1998)** Untersuchung molkereispezifischer Mikroorganismen mit molekularbiologischen Methoden. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Gutell R.R., M.W. Gray, and M.N. Schnare (1993)** A compilation of large subunit (23S- and 23S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic Acids Res.* **21**:3055-3074
- Gutiérrez, R., T. García, I. González, B. Sanz, P.E. Hernández, and R. Martín (1998)** Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Let. Appl. Microbiol.* **26**:372-376
- Hall, L.M., B. Duke, M. Guiney, and R. Williams (1992)** Typing of *Enterococcus* Species by DNA Restriction Fragment Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **30**:915-919
- Hardie, J.M. (1986)** Genus *Streptococcus*. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **2**:1043-1071. Williams and Wilkins, Baltimore
- Hardie, J.M., and R.A. Whiley (1997)** Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* **83**:1S-11S
- Höpfl, P., W. Ludwig, K.-H. Schleifer, and N. Larsen (1989)** The 23S ribosomal RNA higher-order structure of *Pseudomonas cepacia* and other prokaryotes. *Eur. J. Biochem.* **185**:355-364
- Jones, D. (1978)** Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. In F.A. Skinner, and L.B. Quesnel (eds.): *Streptococci*. Society for Applied Bacteriology Symposium Series **7**:1-49. Academic Press, London
- Jukes, T.H., and C.R. Cantor (1969)** Evolution of protein molecules. In H.N. Munro (ed.): *Mammalian protein metabolism III*:21-132. Academic Press, New York

- Juretschko, S. (2000)** Mikrobielle Populationsstruktur und –dynamik in einer nitrifizierenden / denitrifizierenden Belebtschlammanlage. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops, and M. Wagner (1998)** Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-Like Bacteria as Dominant Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3042-3051
- Kalina, A.P. (1970)** The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**:185-189
- Kanoe, M., and T. Abe (1988)** Enterococcal Isolates from Environmental Sources. *Microbios Letters* **38**:15-20
- Kielwein, G. (1978)** Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken in Milch und Milchprodukten. *Arch. Lebensmittelhyg.* **29**:127-128
- Kielwein, G. (1994)** Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene. 3., neubearbeitete Auflage. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- Kirschner, C., K. Maquelin, P. Pina, N.A. Ngo Thi, L.-P. Choo-Smith, G.D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S.M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G.J. Puppels, and D. Naumann (2001)** Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1763-1770
- Klein, G., A. Pack, and G. Reuter (1998)** Antibiotic Resistance Patterns of Enterococci and Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Raw Minced Beef and Pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1825-1830
- Knight, J. (2001)** When the chips are down. *Nature* **410**:860-861
- Knopp, D., R. Nießner, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer (2000)** Entwicklung und Anwendung von Mikrohybridisierungsverfahren für Untersuchungen zu Vorkommen und Aktivität von Mikroorganismen bei der biologischen Abwasserbehandlung. *In: Sonderforschungsbereich 411, Grundlagen der aeroben biologischen Abwasserreinigung. Arbeits- und Ergebnisbericht 1998-1999-2000.* TU München
- Koob, C. (1997)** Nachweis und Identifizierung von hygienisch relevanten Enterokokken durch Hybridisierung mit 23S-rDNS-gerichteten Oligonukleotidsonden in der Wasser- und Lebensmittelanalytik. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Lancefield, R.C. (1933)** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**:571-595

- Leclerc, H., L.A. Devriese, and D.A.A. Mossel (1996)** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* **81**:459-466
- Lemieux, B., A. Aharoni, and M. Schena (1998)** Overview of DNA chip technology. *Molecular Breeding* **4**:277-289
- Ludwig, W. (1991)** DNA Sequencing in Bacterial Systematics. In *E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (eds.): Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* 69-94. John Wiley & Sons, Chichester
- Ludwig, W., and K.-H. Schleifer (1994)** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:155-173
- Ludwig, W., and O. Strunk (1996)** ARB: a software environment for sequence data. <http://www.arb-home.de>
- Ludwig, W., E. Brockmann, C. Beimfohr, C. Hertel, B. Jacobsen, and K.-H. Schleifer (1995)** Nucleic Acid Based Detection Systems for Genetically Modified Bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **18**:477-485
- Ludwig, W., E. Seewaldt, R. Kilpper-Bälz, K.-H. Schleifer, L. Magrum, C.R. Woese, G.E. Fox, and E. Stackebrandt (1985)** The Phylogenetic Position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:543-551
- Ludwig, W., R. Amann, E. Martinez-Romero, W. Schönhuber, S. Bauer, A. Neef, and K.-H. Schleifer (1998)** rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. *Plant and Soil* **204**:1-19
- Maidak, B.L., J.R. Cole, C.T. Parker, G.M. Garrity, N. Larsen, B. Li, T.G. Lilburn, M.J. McCaughey, G.J. Olsen, R. Overbeek, S. Pramanik, T.M. Schmidt, J.M. Tiedje, and C.R. Woese (1999)** A new version of the RDP (Ribosomal Database Projekt). *Nucleic Acids Res.* **27**:171-173
- Manero, A., and A.R. Blanch (1999)** Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4425-4430
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer (1992)** Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**:593-600
- Marmur, J. (1961)** A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208-218
- Martinez-Murcia, A.J., and M.D. Collins (1991)** *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**:69-74

- Mehlen, A. (1999)** Identifizierung und Differenzierung von Enterokokken und Pediokokken durch reverse Hybridisierung in Mikrotiterplatten. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Meier, H. (1997)** Nachweis von Fäkalstreptokokken mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden zur Anwendung in der hygienischen Trinkwasserkontrolle. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Melchior, W.B., and P.H. von Hippel (1973)** Alteration of the Relative Stability of dA • dT and dG • dC Base Pairs in DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**:298-302
- Mobarry, B.K., M. Wagner, V. Urbain, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl (1996)** Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **62**:2156-2162
- Morrison, D., N. Woodford, and B. Cookson (1997)** Enterococci as emerging pathogens of humans. J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement **83**:89S-99S
- Mossel, D.A.A., P.G.H. Bijker und I. Eelderink (1978)** Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmitteln und Trinkwasser – Ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung. Arch. Lebensmittelhyg. **29**:121-127
- Murray, B.E., K.V. Singh, J.D. Heath, B.R. Sharma, and G.M. Weinstock (1990)** Comparison of Genomic DNAs of Different Enterococcal Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Sites. J. Clin. Microbiol. **28**:2059-2063
- Murray, P.R., K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi, and M.A. Pfaller (1998)** Medical Microbiology 206-208. 3rd ed. Mosby, St. Louis
- Murray, V. (1989)** Improved double-stranded DNA-sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. **17**:8889
- Neef, A. (1997)** Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Niemi, R.M., and J. Ahtiainen (1995)** Enumeration of intestinal enterococci and interfering organisms with Slanetz-Bartley agar, KF streptococcus agar and the MUST method. Lett. Appl. Microbiol. **20**:92-97
- Niemi, R.M., S.I. Niemelä, D.H. Bamford, J. Hantula, T. Hyvärinen, T. Forsten, and A. Raateland (1993)** Presumptive Fecal Streptococci in Environmental Samples Characterized by One-Dimensional Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. **59**:2190-2196
- Nikiforov, T.T., and Y.-H. Rogers (1995)** The Use of 96-Well Polystyrene Plates for DNA Hybridization-Based Assays: An Evaluation of Different Approaches to Oligonucleotide Immobilization. Anal. Biochem. **227**:201-209

- Olsen, G.J., D.J. Lane, S.J. Giovannoni, and N.R. Pace (1986)** Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**:337-365
- Orosz, J.M., and J.G. Wetmur (1977)** DNA Melting Temperatures and Renaturation Rates in Concentrated Alkylammonium Salt Solutions. *Biopolymers* **16**:1183-1199
- Peplies, J., F.O. Glöckner, D. Blohm, and R. Amann (2001)** DNA-Microarrays for the detection of 16S rDNA targets: Evaluation of hybridization parameters. VAAM Jahrestagung, Oldenburg, Poster PFÖ27
- Pommerening-Röser, A., G. Rath, and H.-P. Koops (1996)** Phylogenetic Diversity within the Genus *Nitrosomonas*. *System. Appl. Microbiol.* **19**:344-351
- Pompei, R., F. Berlutti, M.C. Thaller, A. Ingianni, G. Cortis, and B. Dainelli (1992)** *Enterococcus flavescens* sp. nov., a New Species of Enterococci of Clinical Origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:365-369
- Rasmussen, S.E. (1990)** Covalent immobilization of biomolecules onto polystyrene MicroWells for use in biospecific assays. *Ann. Biol. clin.* **48**:647-650
- Rasmussen, S.R., M.R. Larsen, and S.E. Rasmussen (1991)** Covalent Immobilization of DNA onto Polystyrene Microwells: The Molecules Are Only Bound at the 5' End. *Anal. Biochem.* **198**:138-142
- Reeve, M.A., and C.W. Fuller (1995)** A novel thermostable polymerase for DNA sequencing. *Nature* **376**:796-797
- Rodrigues, U., and M.D. Collins (1990)** Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:231-234
- Roller, C., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer (1992)** Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1167-1175
- Rosselló-Mora, R.A., M. Wagner, R. Amann, and K.-H. Schleifer (1995)** The Abundance of *Zoogloea ramigera* in Sewage Treatment Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:702-707
- Rossen, L., P. Nørskov, K. Holmstrøm, and O.F. Rasmussen (1992)** Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* **17**:37-45
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich (1988)** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**:487-491

- Saiki, R.K., P.S. Walsh, C.H. Levenson, and H.A. Erlich (1989)** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6230-6234
- Saitou, N., and M. Nei (1987)** The Neighbor-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467
- Satomi, M., B. Kimura, M. Mizoi, T. Sato, and T. Fujii (1997)** *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a New Moderately Halophilic Lactic Acid Bacterium Isolated from Fermented Squid Liver Sauce. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:832-836
- Satyendra, K.G., and B.K. Mital (1991)** Enterococci in Milk and Milk Products. *Critical Reviews in Microbiology* **18**:15-45
- Schedl, M. (2002)** Entwicklung und Anwendung von Mikrohybridisierungsverfahren zur Analyse von mikrobiellen Populationen. Dissertation am Lehrstuhl für Wasserchemie und chemische Balneologie der TU München
- Schedl, M., T. Behr, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, R. Nießner, and D. Knopp (2000)** Optimization of Reverse Hybridization in Microplates Coated with rRNA Targeted Oligonucleotide Probes. *System. Appl. Microbiol.* **23**:573-581
- Schleifer, K.-H., and R. Kilpper-Bälz (1984)** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:31-34
- Schleifer, K.-H., and W. Ludwig (1989)** Phylogenetic relationship among bacteria. In *B. Fernholm, K. Bremer, and H. Jörnvall (eds.): The Hierarchy of Life* 103-117. Excerpta Medica, Amsterdam
- Schmid, M., U. Twachtmann, M. Klein, M. Strous, S. Juretschko, M. Jetten, J.W. Metzger, K.-H. Schleifer, and M. Wagner (2000)** Molecular Evidence for Genus-Level Diversity of Bacteria Capable of Catalyzing Anaerobic Ammonium Oxidation. *System. Appl. Microbiol.* **23**:93-106
- Shapiro, J.T., B.S. Stannard, and G. Felsenfeld (1969)** The Binding of Small Cations to Deoxyribonucleic Acid. *Nucleotide Specificity. Biochemistry* **8**:3233-3241
- Sherman, J.M. (1937)** The streptococci. *Bacteriol. Rev.* **1**:3-97
- Sinton, L.W., A.M. Donnison, and C.M. Hastie (1993)** Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **27**:101-137

- Slanetz, L.W., and C.H. Bartley (1957)** Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bact.* **74**:591-595
- Southern, E., K. Mir, and M. Shchepinov (1999)** Molecular interactions on microarrays. *Nature Genet.* **21**:5-9
- Stahl, D.A., and B. Flesher (1987)** Application of Ribosomal RNA Sequencing to Studies of Microbial Ecology. Gray Freshwater Biological Institute, Summer Course July, 6-10
- Stahl, D.A., and R. Amann (1991)** Development and Application of Nucleic Acid Probes. In *E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (eds.): Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* 205-248. John Wiley & Sons, Chichester
- Suggs, S.V., T. Hirose, T. Miyake, E.H. Kawashima, M.J. Johnson, K. Itakura, and R.B. Wallace (1981)** Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In *D.D. Brown, and C.F. Fox (eds.): Developmental biology using purified genes* 683-693. Academic Press, New York
- Švec, P., L.A. Devriese, I. Sedláček, M. Baele, M. Vancanneyt, F. Haesebrouck, J. Swings, and J. Doškař (2001)** *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1567-1574
- Tabor, S., and C.C. Richardson (1995)** A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:6339-6343
- Teixeira, L.M., M.G.S. Carvalho, M.M.B. Espinola, A.G. Steigerwalt, M.P. Douglas, D.J. Brenner, and R.R. Facklam (2001)** *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1737-1743
- Teixeira, L.M., V.L.C. Merquior, M.C.E. Vianni, M.G.S. Carvalho, S.E.L. Fracalanza, A.G. Steigerwalt, D.J. Brenner, and R.R. Facklam (1996)** Phenotypic and Genotypic Characterization of Atypical *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Water Buffalos with Subclinical Mastitis and Confirmation of *L. garvieae* as a Senior Subjective Synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:664-668
- Thiercelin, E. (1899)** Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C. R. Séances Société Biologie* **51**:269-271
- Thiercelin, E., and L. Jouhaud (1903)** Reproduction de l'entérocoque: taches centrales; granulations périphériques et microblastes. *C. R. Séances Société Biologie* **55**:686-688

- Vancanneyt, M., C. Snauwaert, I. Cleenwerck, M. Baele, P. Descheemaeker, H. Goossens, B. Pot, P. Vandamme, J. Swings, F. Haesebrouck, and L.A. Devriese (2001)** *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:393-400
- Vollhardt, K.P.C. (1990)** Organische Chemie 1286-1288. 1. korr. Nachdruck der 1. Auflage. VCH, Weinheim
- Wagner, M. (1995)** Die Anwendung von *in situ* Hybridisierungssonden zur Aufklärung mikrobieller Populationsstrukturen in der Abwasserreinigung. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Wagner, M., G. Rath, H.-P. Koops, J. Flood, and R. Amann (1996)** *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* **34**:237-244
- Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H.-P. Koops, and K.-H. Schleifer (1995)** *In Situ* Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **18**:251-264
- Wang, R.-F., W.-W. Cao, and C.E. Cerniglia (1996)** PCR Detection and Quantitation of Predominant Anaerobic Bacteria in Human and Animal Fecal Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1242-1247
- Wassill, L.C. (1999)** Entwicklung verbesserter Ausschlußhybridisierungstechniken und deren Anwendung zur Konstruktion stammspezifischer PCR-Systeme für lebensmittelrelevante und pathogene Mikroorganismen. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München
- Williams, A.M., J.A.E. Farrow, and M.D. Collins (1989)** Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Sreptococcus cecorum*. *Let. Appl. Microbiol.* **8**:185-189
- Wisotzkey, J.D., P. Jurtshuk, and G.E. Fox (1990)** PCR Amplification of 16S rDNA from Lyophilized Cell Cultures Facilitates Studies in Molecular Systematics. *Curr. Microbiol.* **21**:325-327
- Wood, W.I., J. Gitschier, L.A. Lasky, and R.M. Lawn (1985)** Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: A method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1585-1588
- Yu, H., J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, S. Mujumdar, and A.S. Waggoner (1994)** Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. *Nucleic Acids Res.* **22**:3226-3232
- Zhou, J., M.A. Bruns, and J.M. Tiedje (1996)** DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:316-322

G ANHANG

Auf den folgenden Seiten sind die Alignments der in vorliegender Arbeit ermittelten 23S-rRNS-Sequenzen von E. asini (DSM 11492T), E. durans (DSM 20633T), E. hirae (DSM 20160T) und E. pseudoavium (DSM 5632T) abgedruckt.

Table with columns for organism (ECOLI, HELIX_NR, HELIX, E.asini, E.durans, E.hirae, E.pseudoav), sequence alignment characters, and position numbers (0-816).

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer im Zeitraum von März 1998 bis Dezember 2001 angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit die Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können und das Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Wolfgang Ludwig für die auch bei knapper Zeit gute Betreuung und fachliche Unterstützung.

Priv.-Doz. Dr. Dietmar Knopp und Matthias Schedl für die gute und konstruktive Zusammenarbeit während des SFB-Projektes.

André Mehlen für die große Hilfsbereitschaft und sehr angenehme Zusammenarbeit.

Johannes Zimmermann für viele interessante fachliche und nicht fachliche Diskussionen und das freundschaftliche Verhältnis auch außerhalb des Labors.

Eva Waltenberger und Barbara Wunner-Füßl für die Erledigung einiger zusätzlicher Arbeiten.

Dr. Angelika Lehner für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Chipprojektes.

Dr. Stefan Juretschko, Ulrike Purkhold und Dr. Holger Daims für die Unterstützung in Form von DNS diverser Isolate und Klone und in Form von Informationen zu den Sonden für die ammonium- und nitritoxidierenden Bakterien.

Dr. Otto Geisenberger, Dr. Aldo Ammendola und Dr. Astrid Gotschlich für die Hilfsbereitschaft und die wertvollen („brauchbaren“) Ratschläge.

allen Angehörigen des  **iso** -Labors für die schöne Zeit am Lehrstuhl und die zahlreichen Unternehmungen.

meinen Eltern und bei Kerstin Eberhardt, Kenan Hakverdi und Marcel Schütte.