

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

Entwicklung und Anwendung eines 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Differenzierung von Acidobakterien im Habitat Boden

Manuela Hartmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Höll
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer, i.R.
2. Univ.-Prof. Dr. R.F. Vogel

Die Dissertation wurde am 03.09.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt am 02.10.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungen	12
1 Einleitung	15
1.1 Die Bedeutung von Mikroarrays	15
1.2 Mikrobielle Biodiversität in Böden	18
1.3 Das Phylum <i>Acidobacteria</i>	21
1.4 Ziele der Arbeit	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Verwendete Mikroorganismen	25
2.1.1 Reinkulturen	25
2.1.2 16S-rDNS Referenzklone	25
2.2 Probennahme	26
2.2.1 Lysimeter Bodenproben	26
2.2.2 Grünschwaige Bodenproben	26
2.2.3 2,4,6-Trinitrotoluen-kontaminierte Böden	29
2.3 Bodencharakteristika der Grünschwaige Proben	29
2.3.1 pH-Wert	29
2.3.2 Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt	30
2.4 Isolierung von DNS aus Bodenproben	30
2.4.1 Isolierung von DNS aus Bodenproben mit dem Ultra Clean™ Mega Soil DNA Kit	30
2.4.2 Isolierung von DNS aus Bodenproben nach Zhou <i>et al.</i> [190]	31
2.4.3 Isolierung von DNS aus Bodenproben nach Dong <i>et al.</i> [41]	32
2.5 PCR - Polymerasekettenreaktion [147]	33
2.5.1 PCR-Reaktionen und -Programme	33

2.5.2	Primer	35
2.5.3	Agarosegelelektrophorese und PCR-Aufreinigung	35
2.6	Klonierung von PCR-Fragmenten	37
2.7	Anzucht von Organismen	37
2.8	Stammhaltung	37
2.9	Plasmid-DNS Aufreinigung	38
2.10	Klonscreening	38
2.11	Mikroarray-Realzeithybridisierungen mit einem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp	39
2.11.1	Sondenkonstruktion	39
2.11.2	Probenvorbereitung für Hybridisierungen mit dem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp	39
2.11.3	Sondenimmobilisierung auf den Sensorchip	40
2.11.4	Aufbau des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyps	41
2.11.5	Aufbau des Sensorchips	42
2.11.6	Durchführung von Hybridisierungen mit dem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp	43
2.11.7	Auswertung der Messungen	46
2.11.8	Spotinterne Korrektur des Ausleuchtungsprofils	46
2.11.9	Normalisierung der Werte	49
2.12	Sequenzierung	49
2.13	Phylogenetische Analysen	49
2.14	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	49
2.15	Fixierung von Bodenproben für FISH	50
2.15.1	Fixierung von Bodenproben nach McDonald <i>et al.</i> [118]	50
2.15.2	Fixierung von Bodenproben nach Lunau <i>et al.</i> [111]	51
2.15.3	Fixierung von Bodenproben mit Nycodenz [®]	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Bodencharakteristika	53
3.2	Vergleich der DNS-Extraktionsmethoden	53

3.3	Konstruktion einer 16S- und 23S-rDNS Klondatenbank	54
3.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierungen (FISH)	60
3.4.1	Konstruktion von 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden	61
3.4.2	Evaluierung der 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden	62
3.4.3	Aufbereitung von Bodenproben	64
3.4.4	FISH mit Zellen der Umweltprobe Grünschwaipe K8-1	67
3.5	Konstruktion und Anwendung eines 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Differenzierung von Vertretern des Phylums <i>Acidobacteria</i>	73
3.5.1	Konstruktion von <i>Acidobacteria</i> -spezifischen 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden	73
3.5.2	Evaluierung von <i>Acidobacteria</i> -spezifischen 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden	74
3.5.3	Spezifität und Sensitivität des Mikroarrays	84
3.5.4	Evaluierung des <i>Acidobacteria</i> 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays für Bodenproben	88
3.5.5	Anwendung des <i>Acidobacteria</i> 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays für die Untersuchung Bodenproben	103
3.5.6	Erweiterung des neu-entwickelten 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays	108
4	Diskussion	111
4.1	Vergleich der DNS-Extraktionsmethoden	111
4.2	Konstruktion einer 16S- und 23S-rDNS Klondatenbank	112
4.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung - Evaluierung neuer Oligonukleotidsonden für das Phylum <i>Acidobacteria</i> und deren Anwendung auf Bodenproben	114
4.4	Konstruktion und Anwendung eines 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Differenzierung von Vertretern des Phylums <i>Acidobacteria</i>	116
4.4.1	Spezifität und Sensitivität des Arrays	119
4.4.2	Evaluierung des <i>Acidobacteria</i> 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Untersuchung von Bodenproben	123
4.4.3	Anwendung des <i>Acidobacteria</i> 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Untersuchung von Bodenproben	126
4.5	Fazit	132
4.6	Perspektiven	134

5 Zusammenfassung	137
6 Anhang	139
6.1 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden zur Identifizierung von Bakterien mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	139
6.2 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden zur Identifizierung von Vertretern des Phylums <i>Acidobacteria</i> mittels Mikroarrayhybridisierungen und deren Anordnung auf dem DNS-Chip	143
Literaturverzeichnis	149

Abbildungsverzeichnis

1	Entstehung eines evaneszenten Feldes	17
2	Darstellung eines Bodenaggregats	19
3	Darstellung eines „full-cycle rRNA approaches“	24
4	Parzelleneinteilung der Versuchsstation Grünschwaige (Freising, D)	27
5	Aufbau des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyps	42
6	Aufbau der Einzelkomponenten des Sensorchips	43
7	Nutzbare Fläche des Mikroarray-Chips	43
8	Screenshot der Benutzeroberfläche der Software <i>dna-mwg</i>	45
9	Ablauf einer Hybridisierung am Beispiel der Positivkontrolle	47
10	Screenshot der Benutzeroberfläche der <i>dnachip</i> -Software (ICB, Münster, D)	48
11	Einsatz der Primerkombination 31F_mod und 100K zur Amplifikation der Plasmid-DNS von 16S-rDNS Referenzklonen der <i>Acidobacteria</i> „subdivisions“ 2 und 10	57
12	PCR-Enhancer-abhängige Amplifikation von DNS der Grünschwaige Bodenprobe K8-2 mit dem Primerpaar 31F_mod und 985R	60
13	Schätzfunktionen zur Bestimmung der Artenvielfalt für die Klondatenbank K8-1	61
14	Vergleich der Hybridisierungseffizienz nach Vorbereitung der Zellen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen	63
15	Mikroskopische Aufnahmen zum Vergleich verschiedener Bodenaufbereitungsprotokolle	67
16	<i>In situ</i> Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Sonde Acido1_112 („subdivision“ 1)	69
17	<i>In situ</i> Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Sonde IRog1 („subdivision“ 6)	70
18	<i>In situ</i> Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Sonde Alf1b (<i>Alphaproteobacteria</i>)	71
19	<i>In situ</i> Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Sonde HGC69a (<i>Actinobacteria</i>)	72
20	Maximum Likelihood Baum der „subdivision“ 4 mit zugehöriger Sondenabdeckung	75

21	Vergleich von Hybridisierungen mit modifizierten Oligonukleotidsonden und unmodifizierten Oligonukleotidsonden	77
22	Darstellung der Signalabschwächung über $n = 20$ Hybridisierungen auf dem selben DNS-Chip	78
23	Darstellung der Signalintensität einzelner Sondenspots im evaneszenten Feld	78
24	Kurvendarstellung negativer und positiver Hybridisierungsergebnisse	80
25	Formamidreihe mit dem 16S-rDNS Referenzklon EB1134 („subdivision“ 1)	82
26	Hybridisierung von 23S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden mit der DNS spezifischer Referenzklone.	83
27	Hybridisierungen nach unterschiedlicher Vorbereitung der Proben-DNS	85
28	Hybridisierungen von <i>Acidobacterium capsulatum</i> 16S-rDNS PCR-Produkten nach Anwendung verschiedener Modifikationen des Deca-Priming Protokolls	86
29	Validierung der Interphylumspezifität	87
30	Vergleich von Hybridisierungen mit 16S-rDNS PCR-Produkten von <i>Acidobacterium capsulatum</i> und <i>Holophaga foetida</i> Zellen	87
31	Bestimmung der Detektionsgrenze des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays	89
32	Bindungspositionen der PCR-Primer, die für die Vorbereitung der Bodenproben-DNS für Mikroarrayhybridisierungen eingesetzt wurden	91
33	Hybridisierungen der Umweltprobe BI nach Amplifikation der DNS mit verschiedenen PCR-Methoden und Primern	93
34	Hybridisierungen der Umweltprobe K6-1 nach Amplifikation der DNS mit verschiedenen PCR-Methoden und Primern	94
35	Hybridisierungsbild der DNS der Umweltprobe K6-1 nach Amplifikation mit dem Primer 31F_mod	95
36	Hybridisierungsdiagramm der Umweltprobe K6-1 mit und ohne kommerziellen PCR-Enhancer	96
37	Hybridisierungsbild der Umweltprobe K6-1 mit kommerziellen PCR-Enhancer im Vergleich zu einer Hybridisierung ohne PCR-Enhancer	97
38	Steigerung des Probenvolumens für Hybridisierungen der Cy5-markierten DNS der Umweltprobe BI	99

39	Hybridisierungen der Umweltprobe K6-1 nach der Anwendung unterschiedlicher DNS-Extraktionsmethoden	100
40	Reproduzierbarkeit von Hybridisierungsergebnissen	102
41	Vergleich der acidobakteriellen Diversität der Bodenproben BI-BIV	104
42	Vergleich der acidobakteriellen Diversität der Bodenproben K6, K8 und K15 . . .	107
43	Vergleich der acidobakteriellen Diversität TNT-kontaminierter Bodenproben . . .	109
44	Hybridisierungsbild der Umweltprobe K6-1 mit dem weiter-entwickelten Spezies-spezifischen Chip	110
45	Darstellung der Signalverläufe für Assoziation und Dissoziation einer spezifischen und einer unspezifischen Hybridisierung	118

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Reinkulturen	25
2	Zur Verfügung gestellte 16S-rDNS Klone (Dr. Sait)	26
3	Zur Verfügung gestellte 16S-rDNS Klone (Dr. Schmid)	26
4	Lysimeterproben Bayreuth und Bewuchskombinationen	27
5	Beschreibung der Bodenproben der Grünschwaige Versuchsstation (Freising, D)	28
6	Standard-Reaktionsansatz für PCR (pro 50 μ l)	34
7	Modifizierter PCR-Reaktionsansatz für Bodenproben (pro 50 μ l)	34
8	Modifizierter PCR-Reaktionsansatz für asymmetrische PCR (pro 50 μ l)	34
9	Standard-PCR-Programm	34
10	16S-rRNS spezifische Primer	35
11	23S-rRNS spezifische Primer	36
12	Vektor-spezifische Primer	36
13	Standardhybridisierungsschema für die Sondenevaluierung	44
14	Standardhybridisierungsschema für Bodenproben	45
15	Bodencharakteristika der Grünschwaige Proben	53
16	Vergleich verschiedener DNS-Extraktionsmethoden	55
17	Sequenzunterschiede der „subdivisions“ 2 und 10 zum 31F_mod Primer	56
18	Verdünnungsfaktor der Ausgangs-DNS von Bodenproben für die Amplifikation in Abhängigkeit der angewendeten DNS-Extraktionsmethoden	58
19	Prozentuale <i>Acidobacteria</i> „subdivision“ Zugehörigkeit analysierter 16S- und 23S-rDNS Klone	59
20	Bodenprobenaufbereitung für FISH	66
21	<i>Acidobacteria</i> -spezifische 23S-rRNS Oligonukleotidsonden	83
22	Kombination verschiedener PCR-Methoden und Primer als Vorbereitung für Mikroarrayhybridisierungen	91

23	TNT-Kontamination verschiedener Böden aus Frankreich und Spanien	106
24	Vergleich der acidobakteriellen Diversität im Zusammenhang mit der Pflanzendiversität.	127
25	Vergleich der acidobakteriellen Diversität im Zusammenhang mit dem Bodentyp.	130
26	Vergleich verschiedener Techniken zur Untersuchung der Biodiversität von Acidobakterien	134
27	16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden für verschiedene bakterielle Phyla . .	141
28	16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden spezifisch für Vertreter des Phylums <i>Acidobacteria</i>	142
30	Verwendete 16S-rDNS Mikroarrayoligonukleotidsonden	146
31	Sondenanzordnung für den Gruppen-spezifischen 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray	147
32	Sondenanzordnung für den Klon-spezifischen 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray	148

Abkürzungen

A	Adenine
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AMP	Ampicillin
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
Cy	Cyanin-Farbstoff
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAPI	4', 6'-Diamino-2-Phenylindol-dihydrochlorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteri
etc.	et cetera
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH _{abs}	100% Ethanol
evtl.	eventuell
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
Fluos	5,(6)-carboxyfluoreszein-N-hydroxysuccinimidester
g	Gramm/Fallbeschleunigung
G	Guanin, Guanosin

GC	Mol % Guanin + Cytosin
h	Stunde(n)
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser (MilliQ, Millipore, Eschborn, D)
ITS	Internal transcribed spacer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
M	molar (mol/l)
m	Meter; milli(10^{-3})
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNS	messenger RNS
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	nano (10^{-9})
ng	Nanogramm
NaAc	Natriumacetat
Nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
OTU	operational taxonomic unit
p	pico (10^{-12})
PBS	Phosphat gepufferte Salinelösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	picomol

RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
rRNS	ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
SSC	Standardsalinecitrat
sp.	Spezies
spp.	alle, bzw. mehrere Spezies einer Gattung
ss	einzelsträngig
T	Thymin, Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T _D	Dissoziationstemperatur von Nukleinsäuren
T _m	Schmelztemperatur von Nukleinsäuren
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Enzymeinheit oder Uracil
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- β -D-Galactosid

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Mikroarrays

Molekularbiologische Anwendungen zur Beschreibung der bakteriellen Biodiversität sind oftmals von der Klassifizierung heterogener, mit PCR amplifizierter Nukleinsäuren abhängig. Diese können relativ schnell, wenn auch nicht sehr exakt mittels Temperatur- oder denaturierender Gradientengelelektrophorese (T/DGGE), terminalem Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (t-RFLP) oder auch Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP) kategorisiert werden [99]. Im Anschluss kann durch Sequenzierung noch eine Zuordnung zu taxonomischen Gruppen erfolgen. Dies erfordert allerdings zusätzlichen Zeitaufwand, da die einzelnen Markergene zuerst isoliert und kloniert und für vergleichende Studien eine große Anzahl Sequenzen bestimmt werden müssen. Im Gegensatz zur Speziesvielfalt für deren Bestimmung einige hundert Sequenzen ausreichend sind, geht man davon aus, dass für reproduzierbare Identifizierung der Spezieszusammensetzung mehr als 10^4 Sequenzierungen pro Probe notwendig sind [42].

Im Vergleich dazu beschleunigt die DNS-Chip-Technologie, die v.a. durch Arbeiten der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) in den 90er Jahren eine rasante Entwicklung erfuhr, die Identifizierung von Mikroorganismen innerhalb komplexer Proben und erlaubt daneben die parallele Detektion verschiedener Organismen in einer Probe. Diese Methode wurde erfolgreich auf unterschiedliche bakterielle Gruppen angewandt. Wenige bis einige hundert 16S-rRNS gerichtete Sonden erlauben die Detektion von *Enterococcus* [93], Fischpathogenen [180], Cyanobakterien [28], Nitrifizierern [79], Rhodocyclales [106] und weiteren Gruppen. Zusätzlich können auch proteinkodierende Gene zur Konstruktion von Mikroarrays und Untersuchung von Umweltproben verwendet werden [185, 189]. In letzter Zeit wurden auch „high-density“ 16S-rRNS Mikroarrays entwickelt, deren Vorteil v.a. in der großen Abdeckung aller bakterieller Gruppen liegt [39, 40, 184]. Sie sind jedoch im Moment noch eher kritisch zu betrachten, da vor allem die Sondenevaluierung bei solch hohen Zahlen (60 000 bis über 200 000 Sonden) auf einem DNS-Chip nur in einem sehr begrenzten Rahmen durchgeführt werden kann.

Die Zuverlässigkeit von Mikroarrays wird durch die Anwendung des Mehrfachsondenkonzeptes [15] stark erhöht. Dabei müssen entweder nach einem hierarchischen oder parallelen Prinzip immer mehrere Sonden positive Signale zeigen, um einen Organismus eindeutig zu identifizieren. So können pathogene, umweltbelastende aber auch nutzbringende Bakterien in sehr kurzer Zeit nachgewiesen werden. Dies erleichtert z.B. die Kontrolle der Wasserqualität aber auch die medizinisch relevante Differenzierung phylogenetisch verwandter Mikroorganismen und vermeidet ineffektive Therapieansätze durch gehäufte Antibiotika-Resistenzen. Zusätzlich zum 16S-rRNS Gen bietet sich auch noch das 23S-rRNS Gen zur Detektion verschiedener Bakterien an, v.a. klinisch relevanter, da deren 16S-rRNS oftmals zu ähnlich ist, um eine eindeutige Unterscheidung zu erlauben, während 23S-rRNS eine größere interspezifische Sequenzvariabilität aufweist [8]. Auch andere funktionelle Gene wie das Gen der partikulären Methan-Monooxygenase (pMMO)

können zur Analyse von Bakterien, in diesem Falle methanotropher, hinzugezogen werden [19]. Neben der Anwendung zur Identifizierung einzelner Mikroorganismen spielen DNS-Chips in den unterschiedlichsten Aufgabenbereichen, wie der Genexpressionsanalyse und dem Nachweis von Punktmutationen (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms), eine Rolle. Mittels Genexpressionsanalyse scheint eine quantitative Aussage über das Expressionsniveau der Gene eines gesamten Genoms möglich zu sein [154]. Die Detektion von Punktmutation ist durch die hohe Spezifität der Hybridisierung mit kurzen Oligonukleotidsonden [63] möglich.

Im Vergleich mit konventionellen Chiphybridisierungen beruhen Biosensoren auf der direkten räumlichen Kopplung einer selektiven biologischen Komponente und eines physikalischen Signalumwandlers [153]. Chemische oder physikalische Veränderungen, die bei der Hybridisierung entstehen, werden dabei in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dies bestimmt maßgeblich die Sensitivität des Biosensors. Für die biologische Komponente kommen Nukleinsäuren, Antikörper und Enzyme aber auch Mikroorganismen oder ganze Zellen in Frage. Der Signalumwandler ist meist ein optisches oder elektrochemisches System (wie z.B. potentiometrisch [179] oder amperometrisch [27]), zusätzlich stehen noch piezoelektrische und akustische Erfassungssysteme zur Verfügung. Der entscheidende Vorteil von Biosensoren ist die reversible Wechselwirkung des Analyten. Dadurch wird der Sensor regeneriert und wiederverwendbar. Im Gegensatz zu klassischen Hybridisierungsmethoden zeichnen sich Biosensoren oftmals durch deutlich kürzere Messzeiten, geringere Anschaffungs- und Betriebskosten sowie einfache Handhabung aus.

DNS-Biosensoren bieten die Möglichkeit der spezifischen Hybridisierung von komplementären DNS-Einzelsträngen. Meist werden einzelsträngige Oligonukleotidsonden auf einer Trägeroberfläche immobilisiert und anschließend mit komplementären, markierten Zielsequenzen in der Probenlösung hybridisiert. Bevorzugt werden optische Signalumwandler, die auf Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) oder dem evaneszenten Feld beruhen, verwendet. Evaneszente Felder entstehen bei totalen internen Lichtreflexionen an Grenzflächen von Medien, die unterschiedliche Brechungsindizes aufweisen (siehe auch Kapitel 2.11 und Abbildung 1). Die Wechselwirkung zwischen Analyt und Rezeptor kann somit bei gleichzeitigem Einsatz einer CCD-Kamera in Realzeit studiert werden. Der entscheidende Vorteil des evaneszenten Feldes ist, dass exponentiell zur zunehmenden Entfernung von der Chipoberfläche die Intensität des evaneszenten Feldes abnimmt. Dadurch werden nur Fluorophore in nächster Nähe zum DNS-Chip angeregt. Es wird hier noch unterschieden zwischen direkt-optischen Systemen, d.h. die Wechselwirkung wird detektiert ohne vorherige Einführung einer Markierung, bzw. Systemen, bei denen die Anregung fluoreszenz-markierter Liganden im evaneszenten Feld genutzt wird. Die Detektion bei direkt-optischen Systemen beruht dabei auf kleinsten Änderungen des Brechungsindex auf der Trägeroberfläche durch die Anbindung des Analyten an die immobilisierten Zielmoleküle. Diese Methode konnte bereits erfolgreich zur Detektion von HIV-1 Genomsequenzen [17] angewendet werden.

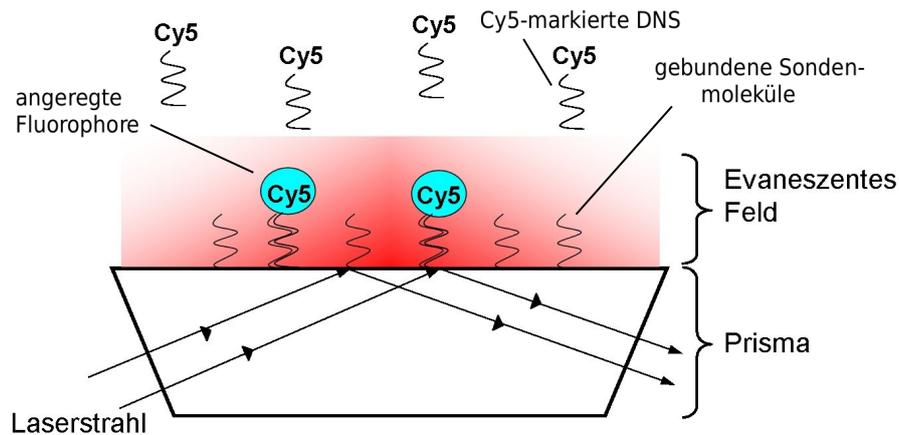


Abbildung 1: Entstehung eines evaneszenten Feldes durch Totalreflexion eines Laserstrahles an der Grenzfläche zwischen Glas und Probenlösung.

Grundsätzlich erlaubt die Anregung fluoreszenz-markierter Moleküle jedoch eine höhere Sensitivität im Vergleich zu direkt-optischen Systemen. Meist wird hier die Ziel-DNS fluoreszenzmarkiert und anschließend die Anregung während der Hybridisierung an die immobilisierten, komplementären Sondensequenzen im evaneszenten Feld gemessen. Andere Methoden, wie die Interkalation von Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Ethidiumbromid [83]) oder der Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden („Molecular Beacons“), welche aufgrund inhibierender Sekundärstrukturen erst nach erfolgter Hybridisierung detektierbare Signale erzeugen [94], stehen auch zur Verfügung. Bei allen hier beschriebenen Verfahren wird meist Glas als Trägeroberfläche für die immobilisierten Fangmoleküle gewählt, da dieses kostengünstig und den Probenlösungen gegenüber chemisch inert ist. Zudem zeigt es nur eine geringe Autofluoreszenz in den üblicherweise verwendeten Laserwellenlängen. Eine Alternative dazu bietet die sogenannte BeadArray[®] Technologie. Hierbei wird durch die Anordnung von mit Oligonukleotidsonden beschichteten Silikakügelchen in geätzten Mikrokavitäten auf der sensitiven Endfläche eines faser-optischen Lichtleiterbündels ein „high-density“-Mikroarray hergestellt [45].

Von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Durchführung eines Hybridisierungsexperiments ist zudem die Anwesenheit einer ausreichenden und stabilen Menge an Fangsonden auf der Trägeroberfläche. Die Fangsonden dürfen dabei nicht durch Waschschriffe oder rigorose Reaktionsbedingungen von der sensitiven Oberfläche gelöst werden und müssen möglichst zugänglich sein. Dies wird meist durch am 5'-Ende amino-modifizierte Oligonukleotide gewährleistet, die mit Aldehyd-beschichteten Glasobjektträgern eine kovalente Bindung eingehen können [186].

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor, entwickelt vom Institut für Chemo- und Biosensorik (ICB, Münster, D), erfolgt die Fluoreszenzdetektion über die Trägeroberfläche und ein Prisma in Kombination mit einer CCD-Kamera (*Charge Coupled Device*), so dass dabei simultan verschiedene Zielsequenzen nachgewiesen werden. Da die Analyse

der Hybridisierung in Realzeit erfolgt, kann die Reaktionskinetik der Bindung (Assoziationsphase, Gleichgewicht und Dissoziationsphase) charakterisiert werden. Anhand solcher DNS-Biosensoren konnte ein umfassendes, theoretisches Modell dynamischer Oligonukleotidhybridisierungskinetiken für Festphasenmikroarrays, z.B. mit Glas als Trägermaterial, bestätigt werden [43]. Mit Hilfe so entstandener Hybridisierungskurven kann, zumindest in einfachen Probenmischungen, auch eindeutig zwischen perfekt-paarenden und fehl-paarenden Oligonukleotidsonden unterschieden werden (siehe Abbildung 45 sowie [136]).

1.2 Mikrobielle Biodiversität in Böden

Neben Luft und Wasser ist der Boden einer der wichtigsten Lebensräume und Nahrungsgrundlage für Mensch, Tier und Pflanze. Böden stellen ein großes Reservoir industriell und medizinisch nutzbarer Stoffe (z.B. Enzyme und Antibiotika) dar, da sie durch eine enorme mikrobielle Diversität gekennzeichnet sind. Auf Grund ihrer Entstehung kann man Böden grob in zwei verschiedene Typen, mineralische und organische Böden, unterteilen. Mineralische Böden entstehen durch die Verwitterung von Felsen und anderem anorganischen Material, während organische Böden sich durch Sedimentationsprozesse, z.B. von totem Pflanzenmaterial, in Mooren oder Marschen entwickeln. Böden zeigen extreme Gefälle physikochemischer Parameter, z.B. sind bereits in einem Bodenpartikel von nur 3 mm Durchmesser stark unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen nachweisbar, so dass sich abhängig von Zeit und Respirationsrate im Inneren meist anaerobe Bakterien und weiter außen aerobe Bakterien befinden [112]. Durch solche Phänomene und auch die Bildung von Aggregaten aus Bodenpartikeln entsteht in Böden eine riesige Anzahl sogenannter Mikrohabitate in denen die unterschiedlichsten Mikroorganismen optimale Lebensbedingungen vorfinden (siehe Abbildung 2).

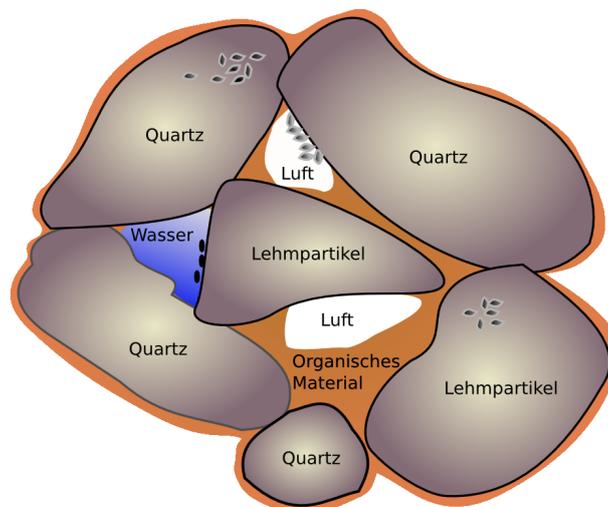


Abbildung 2: Darstellung eines Bodenaggregats, zusammengesetzt aus organischen und anorganischen Komponenten. Gezeigt sind auch mögliche Positionen von Bodenbakterien. Durch Bodenaggregate entstehen verschiedenste Mikrohabitats innerhalb und um solche Bodenaggregate und dem zu Folge Nischen für z.B. aerobe wie anaerobe Bakterien. Zusätzlich ermöglichen Gefälle von Nährstoffen und anderer physikochemischer Parameter die Existenz einer enormen Vielfalt an Bakterien nebeneinander.

Schätzungen gehen von Tausenden [42, 172] bis Millionen einzigartiger bakterieller Genome pro Gramm Boden aus. Gemeinschaften von Bodenmikroorganismen zählen also zu den komplexesten und wichtigsten Ansammlungen von Organismen in der Biosphäre [90]. Sie spielen eine wichtige Rolle in allen großen Stoffkreisläufen, beim Abbau von organischem Material, der Kohlenstoffspeicherung und wirken auch auf die Struktur und das Wasserrückhaltevermögen des Bodens mit ein. Man findet Bodenbakterien vor allem an Bodenpartikel oder Wurzeloberflächen angeheftet und eher selten in der sogenannte Bodenlösung, einem Film bestehend aus Wasser und gelösten anorganischen Ionen, der die Bodenteilchen umgibt. Die Verfügbarkeit von Wasser beeinflusst die mikrobielle Aktivität stark, da es eine hochvariable Komponente abhängig von der Bodenzusammensetzung, Niederschlagshäufigkeit, der Drainage sowie des Pflanzenbewuchs ist. Zudem ist die Nährstoffverfügbarkeit in Böden sehr unterschiedlich. In mineralischen Böden ist oftmals Kohlenstoff der limitierende Faktor, während in landwirtschaftlich-genutzten Böden eher Mineralstoffe wie Phosphor, Stickstoff oder Kalium limitierend auf die Fauna und Flora wirken.

Ubiquitär in fast allen Bodentypen kommen vier phylogenetische Hauptgruppen, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, sowie *Alphaproteobacteria*, vor, wie vergleichende phylogenetische Untersuchungen von 16S-rDNS Sequenzen zeigten [71]. Zusätzlich können noch *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, andere Klassen des Phylums *Proteobacteria*, sowie *Archaea* in 25-75% aller Studien detektiert werden [71].

Trotz der Entwicklungen und Verbesserungen im Bereich der mikrobiellen Methoden konnten die meisten Bodenmikroorganismen bisher nicht kultiviert werden. Unter der Annahme, dass mehr als 99% aller natürlich auftretenden Mikroorganismen nicht mit Standardtechniken kultiviert werden können [50, 167], gewinnt der Einsatz molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung der Zusammensetzung und Funktion mikrobieller Gemeinschaften zunehmend an Bedeutung. Die Untersuchung der Bodenmikroben wendet sich immer mehr von der biochemischen und mikrobiologischen Bestimmung von z.B. Enzymaktivitäten oder Atmungskoeffizienten, der Bestimmung ihrer Diversität und der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft zu [34]. Angewandt werden v.a. t-RFLP, PFLA, DGGE oder ARDRA [47, 161, 163, 183]. Zur Bestimmung der Quantität einzelner Bakteriengruppen kommt hauptsächlich die sogenannte RT-PCR zum Einsatz [44], aber auch FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, z.B. [65, 131]) und in zunehmenden Mass zur Funktionsbestimmung der Organismen das SIP („Stable Isotope Probing“, [139]). Die letzteren Methoden erlauben die Unterscheidung von aktiven und inaktiven Population auf Basis der Menge an vorhandenen Ribosomen bzw. des Einbaus stabiler Isotope in die DNS. Dies ist von Vorteil, da in Böden Zellen oftmals in einer Art ruhendem Zustand vorliegen in dem sie metabolisch inaktiv sind. Da die Zellen jedoch intakt sind werden sie in einer DNS-Extraktion mitlysiert und ihre DNS entsprechend amplifiziert, so dass die Ergebnisse PCR-basierender Methoden zwar auf Anwesenheit jedoch nicht auf Aktivität schliessen lassen.

In den letzten Jahren rückte die Frage, ob und wie anthropogene Aktivitäten die Biodiversität von Mikroorganismen in Böden beeinflussen können, immer mehr in den Vordergrund. Es konnte gezeigt werden das mikrobielle Umsetzungen in Böden wesentlich das Wachstum und die Gesundheit von Pflanzen beeinflussen und zudem die Konzentration klimarelevanter Gase in der Atmosphäre entscheidend mitbestimmen. Mit großer Wahrscheinlichkeit beeinflusst die Diversität an Bodenmikroorganismen die Funktion des Ökosystems Boden sowie dessen Fähigkeit auf Stress zu reagieren. Umgekehrt kann auch die Zugabe verschiedener Düngemittel und Pestizide oder Schädlingsbefall die mikrobielle Gemeinschaft beeinflussen [69, 160]. Für Monokulturen und landwirtschaftlich genutzte Böden konnten bereits verschiedene Faktoren bestimmt werden, die Einfluss auf die bakterielle Gemeinschaft haben, darunter Pflanzenspezies [113, 121, 164, 182], und Bodencharakteristika [25, 57, 74]. Andere Studien wiederum nehmen an, dass die Wichtigkeit des Einflusses der Pflanzengemeinschaft abhängig vom jeweiligen Bodentyp ist [5, 117]. Die Mehrheit der Studien für nicht-landwirtschaftlich genutzte Böden sind auf Rhizosphärengemeinschaften (z.B. [23, 24] oder [86]) oder Rhizoplanengemeinschaften (z.B. [116]) fokussiert, so dass der Einfluss der Pflanzen vermutlich den Wurzelexudaten zuzuschreiben ist. Bodenmanagementmodelle könnten also einen starken Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft ausüben, jedoch ist der Effekt der Vegetation bei Betrachtung verschiedener Studien nicht eindeutig nachweisbar. Beispielsweise wurde in Studien von Kuske *et al.* [91], Smalla *et al.* [164] und Grayston *et al.* [61] ein starker Einfluss der Pflanzen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft beobachtet, während Gastine *et al.* [54] und Hedlund *et al.* [66] eher inkonsistente Einflussnahme von sowohl Bodencharakteristika als auch Pflanzenspezies zeigten. Auch Nunan *et al.* [125] konnten

zeigen, dass nicht die einzelne Pflanzenspezies, sondern vielmehr die Zusammensetzung der pflanzlichen Gemeinschaft in Kombination mit anderen Faktoren, wie pH-Wert, Auswirkungen auf die Komplexität der bakteriellen Gemeinschaft haben. Zusätzlich konnten auch jahreszeitlich bedingte Änderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft beobachtet werden [25, 62, 98]. Dessen ungeachtet ist das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren mit der Diversität und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften in Böden noch kaum verstanden, da z.B. die genetischen Unterschiede von Gemeinschaften der selben Probennahmestelle oftmals ebenso groß sind wie im Vergleich mit einer Probennahmestelle die mehrere hundert Kilometer entfernt liegt [32]. Dies könnte zwar durch zusätzliche lokale Einträge oder Umverteilung von Nährstoffen, wie z.B. Schafurin, zu Stande kommen [143], Nunan *et al.* [126] konnten jedoch zeigen, dass der Effekt von Schafurin auf die Diversität nicht sehr groß ist, sondern eher eine quantitative Umverteilung bereits vorhandener Bakterien bewirkt. Die Komplexität des Habitats Boden bietet somit Raum für viele weitere Forschungsarbeiten, deren Beiträge zu einem besseren Verständnis der Fragestellung, welche Faktoren in welchem Ausmaß die mikrobielle Biodiversität in Böden beeinflussen, führen werden.

1.3 Das Phylum *Acidobacteria*

Obwohl das Phylum *Acidobacteria* nun bereits seit einem Jahrzehnt erforscht wird, sind die verfügbaren Informationen eher gering. Die phylogenetische „Breite“ und „Tiefe“ dieses Phylums entsprechen in etwa der der Proteobakterien [71], so dass von einer ausreichenden Untersuchung im Hinblick auf die Gesamtheit der Acidobakterien kaum die Rede sein kann. Aufgrund ihres weit verbreiteten Vorkommens und hohen Anzahl von Sequenzen in entsprechenden Klondatenbanken (zwischen 10 und 50%), v.a. in Böden, geht man jedoch davon aus, dass sie von großer ökologischer Bedeutung sind [70, 90, 107].

Beschrieben wurden sie erstmals von Ludwig *et al.* [107], da durch die Anwendung des „rRNA-full-cycle-approaches“ zur Untersuchung von Boden- und Rhizosphärenproben im Rahmen eines Freisetzungsversuches gentechnisch veränderter Pflanzen [13] der hohe Anteil damals unbekannter 16S-rRNS-Sequenzen auffiel. Die Präsenz der entsprechenden Organismen konnte anschließend durch *in situ* Zellhybridisierungen verifiziert werden [13, 107]. Weitere eingehende phylogenetische Analysen der damals aktuellsten 16S-rRNS ARB-Datenbanken wiesen auf ein völlig neues Phylum hin, dem auch drei bereits bekannte kultivierbare Organismen (*A. capsulatum*, *G. fermentans*, *H. foetida*) angehörten [107]. Ursprünglich wurde das Phylum als *Holophaga/Acidobacterium*-Phylum bezeichnet, später jedoch in das Phylum *Acidobacteria* umbenannt [53]. Die Acidobakterien werden nach Hugenholz *et al.* [71], Zimmermann *et al.* [193] und Barns *et al.* [11] in verschiedene „subdivisions“ untergliedert. Dabei entspricht eine „subdivision“ einer Abstammungslinie die mindestens zwei 16S-rRNS Sequenzen enthält und sowohl reproduzierbar monophyletisch als auch unabhängig von anderen Repräsentanten dieses Phylums ist [71].

Vertreter des Phylums *Acidobacteria* sind weit verbreitet. Entsprechende Sequenzen konnten in vielen auf PCR-basierenden Untersuchungen identifiziert werden. Man findet sie in Böden (landwirtschaftliche genutzten bis hin zu Wüstenböden), Sedimenten, Belebtschlamm, Torfmooren, aber auch in Höhlensystemen, Thermalquellen, antarktischem Seeis, marinen Schwämmen, Tiefseesediment, vulkanischen Ascheablagerungen, in der Luft sowie in Biotopen mit erhöhter radioaktiver oder UV-Strahlung [1, 12, 22, 44, 58, 60, 67, 71, 77, 102, 146, 151, 152, 166, 178, 192]. Mittlerweile sind über 3200 16S-rRNS-Voll- und Partialsequenzen sowie 100 23S-rRNS-Voll- und Partialsequenzen von Vertretern dieses Phylums verfügbar. Allein die Präsenz solcher Sequenzen lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die wirkliche Häufigkeit oder gar Bedeutung dieser Organismen in ihrem jeweiligen Habitat zu. Beispielsweise kann die DNS frei vorliegen, die Zellen könnten in DNS-Extraktionsverfahren leichter lysieren oder eine besonders hohe Anzahl an *rrn*-Operons pro Genom enthalten. Für ein Grasland der Landwirtschaftlichen Forschungsstation Drense A in den Niederlanden konnte jedoch mittels RT-PCR eine große Anzahl und hohe metabolische Aktivität von Acidobakterien belegt werden [44].

Inzwischen sind auch mehrere Kultivierungsmethoden für dieses Phylum beschrieben [37, 73, 75]. Trotzdem gelang die Kultivierung von Vertretern dieser weit verbreiteten Gruppe bisher nur selten. Vor allem durch Modifizieren der Anzuchtbedingungen, wie Anpassen des pH-Wertes an die entsprechende Probe, Cokultivierung mit z.B. *Alphaproteobacteria* [166], Verdünnung der Menge an Inoculum und komplexere Nährmedien, welche die Umweltbedingungen imitieren, gelang die Isolation von Acidobakterien der „subdivisions“ 1, 2, 3, und 4 [71, 73, 148, 169]. Die bisher beschriebenen, kultivierbaren Vertreter *Acidobacterium capsulatum* [68, 82], *Geothrix fermentans* [33, 101] und *Holophaga foetida* [10, 95] lassen die hohe morphologische, physiologische und metabolische Vielfalt der Acidobakterien bereits erkennen. Während *A. capsulatum* und „*Candidatus* Edaphobacter modestus“ beispielsweise aerobe Bakterien sind, leben die beiden anderen Vertreter *G. fermentans* und *H. foetida* strikt anaerob. Zudem verfügen die beiden letztgenannten über spezielle metabolische Eigenschaften: *H. foetida* kann den Phloroglucinol-Abbaupfad zur Demethylierung aromatischer Verbindungen verwenden [88] und *G. fermentans* kommt eine bedeutende Rolle in der anaeroben Oxidation von organischen Stoffen zu CO₂ zu, da er die Fähigkeit zur dissimilatorischen Reduktion von Eisen(III) besitzt. Anscheinend können einige Acidobakterien auch Methanol als Kohlenstoffquelle verwerten, wie Radajewski *et al.* [139] in einem SIP-Experiment („Stable Isotope Probing“) mit ¹³C-markiertem Methanol nachweisen konnten. Um zusätzliche Informationen über die potentiellen Stoffwechselwege und Physiologie dieser Bakteriengruppe zu erhalten, laufen verschiedene Genomsequenzierungen (<http://www.genomesonline.org> und <http://genome.jgi-psf.org>) der drei ersten, kultivierten Isolate (*A. capsulatum*, *G. fermentans* und *H. foetida*) sowie von fünf Umweltisolaten, darunter *Solibacter usitatus* Ellin6076 („subdivision“ 3) und *Acidobacterium* sp. Ellin 345 („subdivision“ 1, [148]).

1.4 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte ein 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray zur Identifizierung von Vertretern des Phylum *Acidobacteria* konstruiert und evaluiert werden. Gleichzeitig wurde ein neuartiger Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp, mit dem Realzeitverfolgung von Hybridisierungsereignissen möglich ist, auf seine Anwendbarkeit für umfangreichere Mikroarrays getestet. Dies war von entscheidender Bedeutung, da das evaneszente Feld (siehe Kapitel 2.11) nur einen kleinen Teilbereich (10x10 mm) auf einem DNS-Chip homogen ausleuchten kann und somit nur eine begrenzte Anzahl von Sonden auf dem DNS-Chip erlaubt. Da das Phylum *Acidobacteria* zudem nur wenige kultivierbare Vertreter bereit hält, mussten zuerst Klondatenbanken erstellt werden, um die Funktionalität und Spezifität der neu entwickelten Sonden zu überprüfen.

Im Anschluss daran wurde der *Acidobacteria*-Oligonukleotidmikroarray auf unterschiedliche Bodenproben angewendet. Hierfür wurde eine neuerliche Evaluierung der vorangehenden PCR-Methoden notwendig, da mit den üblicherweise verwendeten keine Signale detektiert werden konnten. Ein Vergleich der Mikroarrayhybridisierungen mit Klondatenbanken und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen sollte die Ergebnisse verifizieren (siehe auch Abbildung 3). Für die Visualisierung der Acidobakterien mittels FISH war die Konstruktion und Evaluierung neuer Oligonukleotidsonden nötig. Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt [123].

Der Einsatz dieser modernsten Techniken sollte dazu beitragen zu verstehen, wie die Gemeinschaft der Acidobakterien in Böden organisiert ist und ob eine Abhängigkeit von Faktoren, wie Pflanzendiversität, Bodentyp oder der Kontamination mit Fremdstoffen besteht.

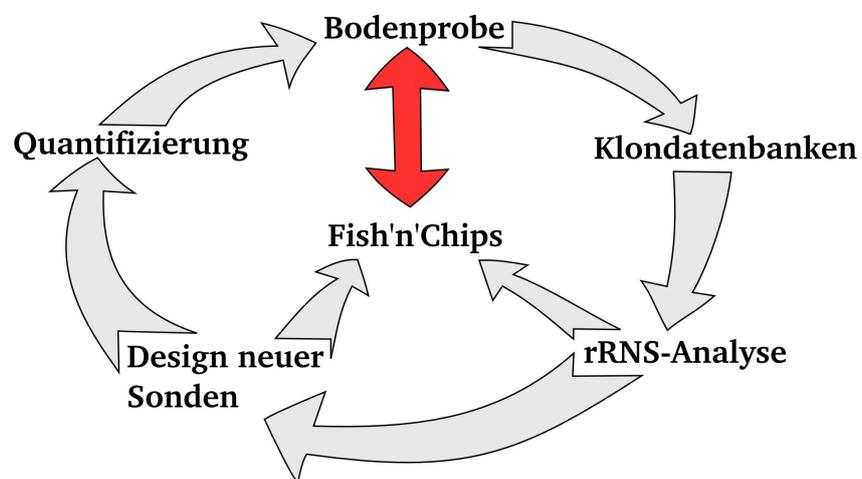


Abbildung 3: Darstellung eines „full-cycle rRNA approaches“ wie er in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat. Mikroarrayexperimente in Kombination mit FISH und der Erstellung von Klondatenbanken soll die Authentizität der Ergebnisse gewährleisten. Die Quantifizierung der Acidobakterien wurde von der Arbeitsgruppe Overmann (Teilprojekt BIOLOG, LMU München, D) durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mikroorganismen

2.1.1 Reinkulturen

Im Laufe dieser Arbeit wurden folgende Reinkulturen, aufgelistet in Tabelle 1, verwendet.

Bakterienspezies	Stammnummer
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	DSM 11244 ^T
„ <i>Candidatus</i> Edaphobacter modestus“ ¹	DSM 18101 ^T
<i>Holophaga foetida</i>	DSM 6591 ^T
<i>Geothrix fermentans</i>	DSM 14018 ^T
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	DSM 6445
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	B-10 ²
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DSM 36
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030 ^T
<i>Arthrobacter citreus</i>	DSM 20133
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AF 438775 ³
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5157

^T Typstamm; DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D)

¹ zur Verfügung gestellt von Isabella Koch, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München (München, D)

² Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie der TU München (Freising, D)

³ Robert-Bosch-Krankenhaus (Stuttgart, D)

Tabelle 1: Bakterienspezies mit der Stammnummer des jeweiligen Organismus, sowie der Herkunft der Kulturen

2.1.2 16S-rDNS Referenzklone

Zusätzlich zu eigenen 16S- und 23S-rDNS Klonen wurden freundlicherweise noch weitere 16S-rDNS Klone zur Sondenevaluierung von Dr. Michelle Sait (University of Melbourne, Melbourne, AU) und Dr. Michael Schmidt (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung Neuherberg (GSF), München, D) zur Verfügung gestellt. Die Klone sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt. Die EB-Klone von Dr. Sait wurden mit dem *Bacteria*-spezifischen Primerpaar 27f und 1492r generiert, die EC-Klone mit den Primern 31f [12] und 1492r. Alle Fragmente wurden mittels des pGEM[®]-T Easy Vector Systems kloniert und in *E. coli* JM109 transformiert. Die Ls-Klone und Xc-Klone von Dr. Schmidt wurden mit den *Bacteria*-spezifischen Primern 616V und 630R

Klonname	<i>Acidobacteria</i> „subdivision“	Accessionnummer
EB1134	1	AY395453
EB1129	3	AY395448
EB1023	4	AY325342
EB1069	4	AY395389
EC1058	5	DQ083276
EB1055	6	AY395374
EB1093	7	AY395412
EB1009	7	AY395328
EC1113	n.d.	DQ083303

Tabelle 2: 16S-rDNS Klone zur Verfügung gestellt von Dr. Sait (University of Melbourne, Melbourne, AU) mit der zugehörigen „subdivision“ und Accessionnummer.

Klonname	<i>Acidobacteria</i> „subdivision“	Ectomycorrhiza
Ls_31_18	2	<i>Lactarius subdulcis</i>
Ls_2_6	„12“	<i>Lactarius subdulcis</i>
Xc_43_10	2	<i>Xerocomus chrysenteron</i>
Xc_5.1_24	„12“	<i>Xerocomus chrysenteron</i>

Tabelle 3: 16S-rDNS Klone zur Verfügung gestellt von Dr. Schmidt (GSF, München, D) mit der zugehörigen „subdivision“ und Ectomycorrhizaprobe.

generiert und anschließend in das pCR[®]2.1-TOPO Plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) kloniert und in TOP0 *E. coli* Zellen transformiert.

2.2 Probennahme

2.2.1 Lysimeter Bodenproben

Bodenproben wurden aus vier Lysimetern (BIOLOG Projekt des BMBF, Universität Bayreuth, Bayreuth, D), die seit vier Jahren betrieben werden, am 9. Juni 2004 entnommen. Die Lysimeter unterschieden sich ausschließlich in Bezug auf den Pflanzenbewuchs: BI enthielt Boden ohne Bewuchs (nur Moose entwickelten sich), BII, BIII und BIV hingegen waren mit 2, 4 bzw. 8 verschiedenen Pflanzenspezies bewachsen. Eine genauere Auflistung der einzelnen Pflanzenspezies kann Tabelle 4 entnommen werden.

2.2.2 Grünschwaige Bodenproben

Die Versuchsstation Grünschwaige (Freising, D) ist in mehrere Weidezonen (siehe Abbildung 4) unterteilt. Diese unterschieden sich in der Häufigkeit der Beweidung (konstant, teilweise oder

Probename	Pflanzenspezies
BI	unbepflanzt, nur Moose entwickelten sich
BII	<i>Holcus lanatus</i> und <i>Arrhenatherum elatius</i>
BIII	<i>Geranium pratense</i> , <i>Plantago lanceolata</i> , <i>Holcus lanatus</i> und <i>Arrhenatherum elatius</i>
BIV	<i>Anthoxanthum orodatum</i> , <i>Alopecurus pratensis</i> , <i>Ranunculus acris</i> , <i>Geranium pratense</i> , <i>Plantago lanceolata</i> , <i>Taraxacum officinale</i> , <i>Holcus lanatus</i> und <i>Arrhenatherum elatius</i>

Tabelle 4: Lysimeterproben Bayreuth und Bewuchskombinationen

selten beweidet) sowie im Bodentyp. Die konstant beweideten Parzellen sind wiederum durch einen mobilen Zaun in eine Kern- und eine Pufferzone unterteilt. Falls Futtermangel auftreten sollte, kann dieser Zaun in die Pufferzone verschoben werden, so dass mehr Weidefläche zur Verfügung steht. Zum Zeitpunkt der Probennahme (08.06.2005, 9.30-10.30 Uhr) war das Wetter sonnig und es herrschte eine Temperatur von ca. 16°C. Die letzten zwei Tage zuvor hatte es geregnet, so dass keine austrocknungsbedingte Stressreaktionen der bakteriellen Gemeinschaft vorliegen sollten. Die einzelnen Bodenproben und ihre Charakteristika können der Tabelle 5 entnommen werden.

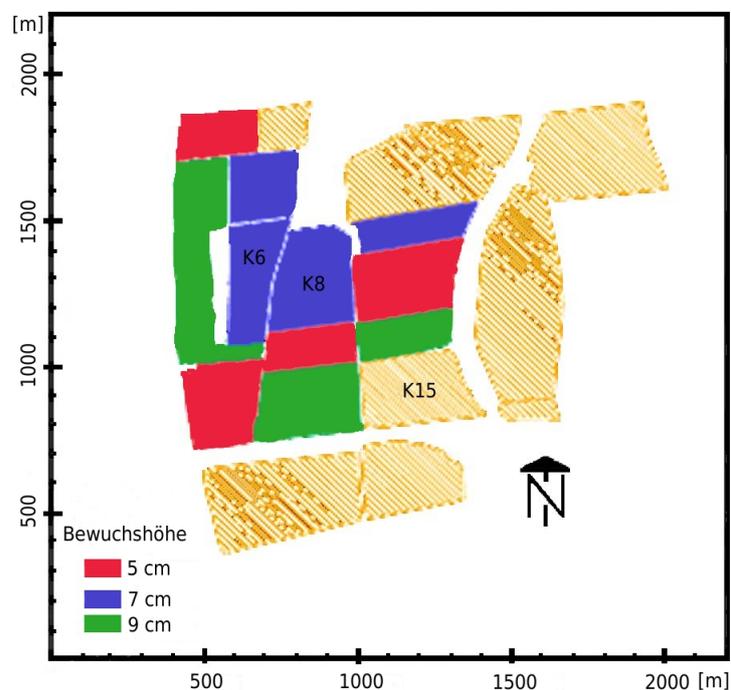


Abbildung 4: Parzelleneinteilung der Versuchsstation Grünschwaipe (Freising, D). Bodenproben wurden den Parzellen K6, K8 und K15 entnommen.

Probenname	Parzelle	Zone	Bodentyp	Einsatz	Beweidung	Flora	Klima
K6-1	K6	Kernzone	Niedermoor	vor 1999	konstant	v. a. verschiedene Gräser und <i>Taraxacum officinale</i>	ständig Sonne
K6-2	K6	Kernzone nahe Tränke	Niedermoor	vor 1999	konstant	spärlicher Bewuchs, v. a. verschiedene Gräser	ständig Sonne
K6-3	K6	Pufferzone	Niedermoor	vor 1999	teilweise	v. a. verschiedene Gräser und <i>Taraxacum officinale</i>	ständig Sonne
K8-1	K8	Kernzone nahe Tränke	Mineralboden	1999	konstant	spärlicher Bewuchs, v. a. verschiedene Gräser und <i>Taraxacum officinale</i>	ständig Sonne
K8-2	K8	Kernzone	Mineralboden	1999	konstant	v. a. verschiedene Gräser, niedriger Farne und <i>Taraxacum officinale</i>	ständig Sonne
K8-3	K8	Pufferzone	Mineralboden	1999	teilweise	v. a. verschiedene Gräser	ständig Sonne
K15	K15	-	Mineralboden	n. b.	selten	v. a. <i>Tripleurospermum perforatum</i> , <i>Capsella bursa-pastoris</i> und <i>Plantago major</i> , wenig Gräser	morgens Sonne, ab Nachmittag Schatten

n. b. = nicht bekannt

Tabelle 5: Grünschwaige-Bodenproben: Ort der Probenahme, Bodentyp, Graseinsatz, Beweidungshäufigkeit, Bewuchs sowie die klimatischen Bedingungen am Standort

2.2.3 2,4,6-Trinitrotoluen-kontaminierte Böden

Die in diesem Kapitel beschriebenen Bodenproben sowie die dazugehörige Charakterisierung dieser Bodenproben wurden von Dr. Isabelle George (Katholische Universität von Louvain, Louvain-la-Neuve, BE) durchgeführt und anschließend freundlicherweise der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

Zwei Reihen Bodenproben wurden untersucht. Die erste (REF, KX1, KL2, und KF4) wurde einem Areal in Bourges (Frankreich) entnommen, das die letzten 20 Jahre dem Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluen diente. Die Proben wurden an unterschiedlichen Standorten dieses Areals entnommen mit einem Abstand von ca. 10 m zwischen den einzelnen Bodenproben. Nicht-kontaminierte Bodenproben wurden einer Fläche entnommen, die durch eine schützende Wand vor TNT-Kontamination gesichert ist. Nicht-kontaminiert bedeutet hier, dass kein TNT mit HPLC detektiert werden konnte. HPLC hat ein Detektionslimit von 1 mg TNT pro kg Boden. Die zweite Bodenprobenreihe wurde von der Fabricaciones Extremeñas S.L. einem Subunternehmen der Union Española de Explosivos (Madrid) zur Verfügung gestellt. Sie stammen von einem künstlich mit TNT kontaminiertem Areal in El Gordo (Cáceres, ES). Die Kontamination erfolgte über einen Zeitraum von sieben Monaten. Das Areal wurde dabei in verschiedene Plots eingeteilt. Eine Bodenprobe wurde einem kontaminierten Plot entnommen (IN). Ein weiterer TNT-kontaminierter Plot wurde mit Maissamen bepflanzt, die mit *Pseudomonas putida* sp. JLR11 beimpft waren. Dieser Stamm kann TNT als Stickstoffquelle und terminalen Elektronenakzeptor verwenden. Eine Probe wurde nach 15 Tagen (J15) und eine weitere nach 29 Tagen (J29) entnommen. Eine nicht-kontaminierte Bodenprobe (OUT) wurde von demselben Areal entnommen. Alle Proben wurden den oberen 10 cm Boden entnommen. Anschließend wurden sie homogenisiert und gesiebt (Sieb mit 2 mm Porendurchmesser), um Pflanzenwurzeln und Steine zu entfernen und bei 4°C gelagert.

2.3 Bodencharakteristika der Grünschwaige Proben

Vor der Bestimmung der Bodencharakteristika wurden alle Bodenproben bei 105°C getrocknet bis keine Feuchtigkeit mehr vorhanden war. Dies wurde durch wiederholtes Wiegen der Probe gemessen.

2.3.1 pH-Wert

Für die Bestimmung des pH-Werte kann auch mit kleineren bzw. größeren Mengen Boden als hier verwendet wurde gearbeitet werden, aber das Verhältnis Boden zu Lösung muss immer bei 1 zu 2,5 liegen.

- 3 g luftgetrockneten Boden (Partikeldurchmesser < 2mm) in ein 50 ml Greiner-Röhrchen einwiegen, pro Probe 2 Ansätze (Parallelversuch)
- Zugabe von 7,5 ml 0,01 M CaCl₂
- Röhrchen fest verschließen und gut mischen
- für 1 h bei Raumtemperatur sedimentieren lassen
- Wiederholung der letzten beiden Schritte
- pH-Wert (pH-Meter Spekol 1300, Analytik Jena, D) im klaren Überstand messen

2.3.2 Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt

- 3 g luftgetrockneten Boden (Partikeldurchmesser < 2mm) in einem Mörser verreiben bis die Probe homogen ist
- 5-15 mg Bodenprobe (abhängig von Bodentyp, Niedermoorboden 5-10 mg, Mineralboden 15 mg) in Zinnschiffchen (6x6x12 mm, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, D) einwiegen, pro Probe 2 Ansätze (Parallelversuch)
- 5 mg Acetanilid (Merck KGaA, Darmstadt, D) in Zinnschiffchen als Standard einwiegen, 1 Ansatz Standard pro 2 Proben
- Zinnschiffchen mit einer Pinzette falten (Vorsicht: die Päckchen müssen absolut dicht sein)
- Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt mit dem varioEL CN-Analyser (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, D) messen

2.4 Isolierung von DNS aus Bodenproben

2.4.1 Isolierung von DNS aus Bodenproben mit dem Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit

Aus den Lysimeterbodenproben (siehe Kapitel 2.2.1) wurde die DNS an der Ludwigs-Maximilians-Universität (Overmann Teilprojekt, BIOLOG, München, D) mittels des Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA USA) isoliert. Um den Ertrag an DNS zu steigern, wurde das Protokoll des Herstellers leicht modifiziert: nach Schritt 8 des Protokolls wurde ein zusätzlicher Sonifizierschritt eingeführt (3 min bei einer Amplitude von 60%, pulse on 5 s, pulse off 10 s). Für nachfolgende PCR-Reaktionen musste die DNS weiteraufgereinigt und konzentriert werden mit Hilfe der Centricon[®] Centrifugal Filter Unit mit Ultracel YM-50 membrane (Millipore, Billerica, MA USA) und dem QIAGEN Genomic-tip 20/G (QIAGEN GmbH, Hilden, D).

2.4.2 Isolierung von DNS aus Bodenproben nach Zhou *et al.* [190]

Gebrauchsmaterialien:

Extraktionspuffer	100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100 mM	NaEDTA (pH 8,0)
	100 mM	Na ₃ PO ₄ (pH 8,0)
	1,5 M	NaCl
	1%	CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)
Proteinase K	10 mg/ml	
SDS	20%	
Glasperlen	3 mm	Durchmesser
Chisom	24:1 (v/v)	Chloroform:Isoamylalkohol
EtOH	70%	
EtOH _{abs}		
Isopropanol		

- Zugabe von 13,5 ml Extraktionspuffer und 100 μ l Proteinase K zu 5 g Bodenprobe
- in einem Greiner-Röhrchen (50 ml) für 30 min bei 37°C horizontal schütteln
- Zugabe von 750 μ l 20% SDS
- Inkubation in einem Wasserbad bei 65°C für 2 h, zum Lösen der sedimentierten Bodenpartikel alle 15-20 min gut durchschütteln (nicht mit Vortex-Apperatur)
- Bei 6000xg für 10 min zentrifugieren
- Überstand in frisches Röhrchen überführen
- Pellet weitere 2 Mal extrahieren: jeweils Zugabe von 5 ml Extraktionspuffer und 500 μ l 20% SDS, 10 s gut mischen und für 10 min bei 65°C inkubieren, bei 6000xg für 10 min zentrifugieren
- Überstände der 3 Zyklen poolen und dasselbe Volumen an Chisom zugeben
- Bei 6000xg und 4°C für 10 min zentrifugieren
- Abnehmen der oberen Phase und Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol, DNS-Fällung für 1 h bei RT
- Bei 16000xg und 4°C für 20 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 70%igem eiskaltem EtOH waschen und in einem angemessenen Volumen in H₂O_{reinst} aufnehmen

2.4.3 Isolierung von DNS aus Bodenproben nach Dong *et al.* [41]

Der Vorteil der Extraktionsmethode nach nach Dong *et al.* [41] ist, dass Huminstoffe, die folgende Anwendungen, wie PCR, inhibieren können, vor der Lyse der Zellen mit Hilfe von Aluminiumsulfat ausgefällt werden. Zudem ist das Protokoll wesentlich weniger zeitaufwendig als die Isolierungsmethode nach Zhou *et al.* [190]. Allerdings isolierten Dong *et al.* [41] nur aus 0,3 g Bodenprobe DNS. Da aber empfohlen wird [140, 150] aus mindestens 1 g Bodenprobe DNS zu isolieren, damit in weiteren Versuchen die Charakterisierung der gesamten Biodiversität erfolgen kann, wurden hier immer 4 Ansätze à 0,3 g parallel durchgeführt und anschließend gepoolt.

Gebrauchsmaterialien:

Aluminiumsulfat	100 mM	Aluminiumsulfat
Phosphatpuffer	100 mM	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 6,6
Natriumhydroxid	1 M	NaOH
Glasperlen	3 mm	Durchmesser
SDS-Lysepuffer	100 mM	NaCl
	500 mM	Tris (pH 8,0)
	10% (w/v)	SDS
Chisom	24:1 (v/v)	Chloroform:Isoamylalkohol
RNase A	10 mg/ml	in 2xSSC
20xSSC	3 M	NaCL
(Standard-Saline-Citrat)	0,3 M	Trinatriumcitrat
	pH 7,0	
Natriumacetat	3 M	
Ammoniumacetat	7,5 M	
EtOH	70%	
EtOH _{abs}		
Isopropanol		

- Entfernen von Huminstoffen durch Zugabe von 200 μ l Aluminiumsulfat und 300 μ l Phosphatpuffer zu 0,3 g Bodenprobe, für 2 min sehr gut mischen
- Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 durch Zugabe von 150 μ l NaOH
- Zugabe von 0,35 g sterilen Glasperlen und 250 μ l SDS-Lysepuffer, dann für 10 min mit Hilfe der Vortex-Apperatur sehr gut mischen
- Bei 10000xg für 30 s zentrifugieren
- Überstand in ein frisches Cap überführen und 250 μ l Chisom zugeben, 5 s vortexen, 5 min bei 4°C inkubieren
- Bei 10000xg für 1 min zentrifugieren

- Obere Phase abnehmen und in ein frisches Cap überführen, Zugabe von 0,5 Volumen Ammoniumacetat und 1 Volumen Isopropanol, DNS-Fällung für 15 min bei -20°C
- Bei 12000xg für 10 min zentrifugieren
- 3 Mal mit 70% EtOH waschen, lufttrocknen lassen und anschließend in $100\ \mu\text{l}\ \text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendieren
- RNase A-Verdau: Poolen der Parallelansätze und ggf. auf ein Volumen von $500\ \mu\text{l}$ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ auffüllen, Zugabe von $10\ \mu\text{l}$ RNase A, für 1 h bei 55°C inkubieren. Anschließend Zugabe von $55,5\ \mu\text{l}$ Natriumacetat und $735\ \mu\text{l}$ Chisom, vorsichtig mischen. Für 10 min bei 12000xg zentrifugieren, obere Phase in ein frisches Cap überführen und Zugabe von 2 Volumen EtOH_{abs} Inkubation auf Eis für 10 min, dann 10 min bei 12000xg und 4°C zentrifugieren. Pellet mit 70% EtOH waschen, 2 min bei 4°C und 12000xg zentrifugieren, lufttrocknen und in $50\ \mu\text{l}\ \text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendieren

2.5 PCR - Polymerasekettenreaktion [147]

2.5.1 PCR-Reaktionen und -Programme

PCR wurde standardmäßig zur enzymatischen, spezifischen Vervielfältigung von bakterieller DNS verwendet. Die Annealingtemperatur T_D der Primer wurde mit Hilfe der „2+4 rule“ [170] bestimmt. Die Elongationszeit ist dabei abhängig von der Länge des zu amplifizierenden PCR-Fragments, da Standardpolymerasen zwischen 1 und 1,5 kb pro Minute synthetisieren können, kann die Elongationszeit für eine bestimmte Fragmentlänge abgeschätzt werden. Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem TaKaRa *ExTaq*TM System (TaKaRa Shuzo Co., Otsu, J) in einem Primus 96plus Thermal Cycler (MWG, Ebersberg, D) durchgeführt. Für die Bodenproben war die Zugabe von BSA (Bovines Serumalbumin 20mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D; [87]) und TMAcI (Tetramethylammoniumchlorid, 190mM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D; [85]) und ein „Hot-Start“ (Zugabe der Polymerase nach einer 10 minütigen Inkubation bei 94°C ; [31]) nötig, da die PCR sonst durch Bodenbestandteile inhibiert wurde. Zusätzlich zu BSA und TMAcI wurde im späteren Verlauf der Arbeit noch PrimerNavigator DNA Amplification Enhancer (biohelix, Beverly, MA, USA) als weiterer PCR-Enhancer eingesetzt. Das PrimerNavigator-Set besteht aus thermostabilem RecA und thermostabilem SSB Protein (Einzelstrangbindeprotein), die gewährleisten sollen, dass der Primer ausschließlich spezifisch bindet. Laut Hersteller destabilisiert dabei das SSB Protein DNS-Sekundärstrukturen und steigert die Prozessivität von DNS-Polymerasen, während RecA an einzelsträngige DNS bindet und nach sequenzidentischen Stellen (zum Primer) in doppelsträngiger DNS sucht. Die Standard-PCR-Reaktion sowie die modifizierte Version und das zugehörige PCR-Programm sind in den Tabellen 6 bis 9 aufgeführt.

<i>ExTaq</i> TM Puffer (10x)	5 μ l
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	5 μ l
Primer 1 (50 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Primer 2 (50 pmol/ μ l)	0,5 μ l
<i>ExTaq</i> TM DNS-Polymerase	0,25 μ l
DNS	ca. 50 ng
H ₂ O _{reinst}	ad 50 μ l

Tabelle 6: Standard-Reaktionsansatz für PCR (pro 50 μ l)

<i>ExTaq</i> TM Puffer (10x)	5 μ l
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	5 μ l
Primer 1 (50 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 2 (50 pmol/ μ l)	1 μ l
BSA (20 mg/ml)	3 μ l
TMACl (190 mM)	0,5 μ l
<i>ExTaq</i> TM DNS-Polymerase	0,5 μ l
DNS	ca. 100-200 ng
H ₂ O _{reinst}	ad 50 μ l

Tabelle 7: Modifizierter PCR-Reaktionsansatz für Bodenproben (pro 50 μ l)

<i>ExTaq</i> TM Puffer (10x)	5 μ l
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	5 μ l
Primer 1 (50 pmol/ μ l)	4 μ l
<i>ExTaq</i> TM DNS-Polymerase	0,25 μ l
DNS	ca. 200-400 ng
H ₂ O _{reinst}	ad 50 μ l

Tabelle 8: Modifizierter PCR-Reaktionsansatz für asymmetrische PCR (pro 50 μ l)

Reaktion	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	5-10 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	30
Annealing	x ¹ °C	30 s	
Elongation	72°C	y ² min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1

¹ x: T_D des Primers² y: ca. 1 min pro kb Fragmentlänge

Tabelle 9: Standard-PCR-Programm

2.5.2 Primer

Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, D) bezogen. Die verwendeten 16S-rRNS- und 23S-rRNS-spezifischen Primer, sowie Vektor-spezifische Primer sind in den Tabellen 10 bis 12 zu finden.

Primer	Spezifität	<i>E. coli</i> Position	Annealingtemp. [°C]	GC-Gehalt [%]	Sequenz 5'→3'
616V ¹	<i>Bacteria</i>	8	55,3	45,0	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG
100K	<i>Bacteria</i>	1510	52,4	42,1	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
611V_Ac	<i>Bacteria</i> (modifiziert um alle <i>Acidobacteria</i> einzuschließen)	54	49,2	56,7	CAT GCA AGT CGR RYG
630R	<i>Bacteria</i>	1541	51,0	47,0	CAK AAA GGA GGT GAT CC
Hol_1400V	<i>Acidobacteria</i>	1417	55,2	58,8	GCC CGT CAC ATC ACG AA
Hol_1400 ²	<i>Acidobacteria</i>	1417	55,2	58,8	TTC GTG ATG TGA CGG GC
31f ³	<i>Acidobacteria</i>	15	52,0	52,9	GAT CCT GGC TCA GAA TC
31F_mod	<i>Acidobacteria</i>	15	49,2	44,1	GAT WMT GGC TCA GAA TC
27f ⁴	<i>Bacteria</i>	8	60,0	50,0	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
1492r ⁴	<i>Bacteria</i>	1492	66,0	50,0	TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T
Acido2_52	„subdivision“ 2	52	56,0	55,6	CAC ATG CAA GTC GAG TGC
Acido6_52	„subdivision“ 6	52	64,0	60,0	CAC ATG CAA GTC GAA CGC GR

¹ [78]

² [192]

³ [12]

⁴ [92]

Tabelle 10: 16S-rRNS spezifische Primer mit zugehöriger Spezifität, Annealingtemperaturen, GC-Gehalt und Primersequenz.

2.5.3 Agarosegelelektrophorese und PCR-Aufreinigung

Zur Bestimmung der Größe, Reinheit und Konzentration der PCR-Fragmente wurde standardmäßig die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Nukleinsäuren werden aufgrund ihrer Masse und Konformation (zirkulär, linear, supercoiled) in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend mittels DNS interkalierenden Substanzen wie Ethidiumbromid oder SYBR-GreenTM sichtbar gemacht. Um die Größe des PCR-Fragments zu bestimmen, wurde ein Größenstandard (1kb-DNA-

Primer	Spezifität	<i>E. coli</i> Position	Annealingtemp. [°C]	GC-Gehalt [%]	Sequenz 5'→3'
985R	<i>Bacteria</i>	2669	54,3	62,5	CCG GTC CTC TCG TAC T
Hol_189R ¹	<i>Acidobacteria</i>	205	53,7	50,0	CTG AGA TGG TTC ACT TCC
Hol_189R_Ac	<i>Acidobacteria</i>	205	50,3	41,7	CTR ARA TGK YTC AMT TSC
Acido_2285R	<i>Acidobacteria</i> „subdivision“ 4	2302	58,2	61,1	AGC CTG AGS GAA CCT TCG

¹ [192]

Tabelle 11: 23S-rRNS spezifische Primer mit zugehöriger Spezifität, Annealingtemperaturen, GC-Gehalt und Primersequenz.

Primer	Annealingtemp. [°C]	GC-Gehalt [%]	Sequenz 5'→3'
M13 uni (-21)	53,7	50,0	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 rev (-29)	53,7	50,0	CAG GAA ACA GCT ATG AC
T7	53,2	40,0	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6	53,2	40,0	CGA TTT AGG TGA CAC TAT AG

Tabelle 12: Vektor-spezifische Primer mit zugehöriger Annealingtemperatur, GC-Gehalt und Primersequenzen.

Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA USA) mit aufgetragen. Da Ethidiumbromid auch Huminstoffe anfärbt, wurde stattdessen für die Analyse von DNS aus Bodenproben SYBR-GreenTM verwendet. Die Extraktion von PCR-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, D) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten (Entfernen nicht genutzter Nukleotide, Polymerase, Primer etc.) wurde das QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Drei verschiedene Vektorsysteme wurden zur Klonierung von PCR-Fragmenten eingesetzt. Für kurze Fragmente bis 3 kb wurde das pCR[®]2.1-TOPO Plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA USA), für Fragmente länger als 3 kb das pCR[®] XL-TOPO[®] System (Invitrogen, Carlsbad, CA USA). Für zur Clone-FISH-bestimmte Fragmente wurde der pGEM[®]-TEasy Vektor (Promega Corp., Madison, WI USA) verwendet, da er eine durch IPTG induzierbare T7-Polymerase trägt [156]. Letzteres Vektorsystem wurde in Kombination mit NovaBlue[®](DE3) kompetenten Zellen (Novagen, EMD Biosciences, Darmstadt, D) verwendet. Alle Klonierungen wurden nach den Protokollen der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

2.7 Anzucht von Organismen

Nährmedien wurden mit H₂O hergestellt und in einem Autoklaven für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Festen Nährmedien wurde 15 g/l Agar (Difco Bacto Agar, Gibco BRL, Eggenstein, D) zugefügt.

LB - (Luria-Bertani)-Medium:

Trypton (tryptisch verdautes Caseinpepton)	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml pH 7,0-7,2

2.8 Stammhaltung

Zur Stammhaltung von Reinkulturen und Klonen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 800 μ l filtersterilisiertes Glycerin (50%) zu 800 μ l ÜN-Kultur gegeben und bei -20°C oder -80°C gelagert.

2.9 Plasmid-DNS Aufreinigung

Die Isolierung von Plasmid-DNS wurde mit Hilfe des Qiagen Spin Plasmid Isolation Kit (Qiagen, Hilden, D) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.10 Klonscreening

Das Vorhandensein des gewünschten Inserts wurde durch DNS-spezifisches Fischen [119], Koloniehybridisierung [89] oder Ganz-Zell-PCR mit spezifischen Sonden bzw. Primern bestimmt. Für die Koloniehybridisierung und das DNS-spezifische Fischen wurde der Primer Hol_1400 (siehe Tabelle 10) am 5'-Ende DIG-markiert bzw. phosphoryliert. Im Falle der Klone, die das komplette 16S- bis 23S-rDNS Operon trugen, kamen die spezifischen Primer Hol_1400V (16S-rDNS, siehe Tabelle 10) und Hol_189R bzw. Hol_189R_Ac (23S-rDNS, siehe Tabelle 11) in einer Ganz-Zell-PCR zum Einsatz, um das Vorhandensein eines acidobakteriellen Inserts zu verifizieren. Für die Ganz-Zell-PCR wurden die ÜN-Klone zuerst in eine Mikrotiterplatte mit 100 μ l LB-Medium, das 50 μ g/ml Ampicillin enthielt, vereinzelt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l der Flüssigkultur direkt für die entsprechende PCR (siehe Tabellen 6 und 9) eingesetzt.

2.11 Mikroarray-Realzeithybridisierungen mit einem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp

Der hier verwendete Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp wurde am Institut für Chemo- und Biosensorik (ICB, Münster, D) hergestellt. Das Gerät wurde als Durchflusssystem bestehend aus einem Sensorchip und einer optischen Ausleseeinheit konzipiert und ermöglicht die simultane Detektion multipler Hybridisierungsereignisse in Realzeit. Zunächst werden spezifische Oligonukleotidsonden auf einem mit Aldehydgruppen beschichteten Glasobjektträger immobilisiert (siehe Kapitel 2.11.3). Anschließend wird die Anbindung von Cy5-markierten Zielmolekülen aus der Probenlösung an diese Sonden während der Anregung in einem evaneszenten Feld gemessen. Das evaneszente Feld wird durch die Totalreflexion eines Laserstrahles an der Grenzfläche zwischen Glas und Probenlösung im Fließraum erzeugt (siehe Abbildung 1). Nur wenn der Sinus des Einfallswinkels α größer ist als der Quotient aus Brechungsindex n_1 der Probenlösung (optisch dünneres Medium) und Brechungsindex n_2 des Glasmaterials des Sensorchip (optisch dichteres Medium), kommt es zu einer Totalreflexion. Exponentiell zur zunehmenden Entfernung von der Chipoberfläche nimmt die Intensität des evaneszenten Feldes ab, d.h. nur Fluorophore, die sich innerhalb der charakteristischen Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befinden, werden angeregt. Ausgehend von der Reflexionsebene erreicht das evaneszente Feld eine Eindringtiefe im optisch dünneren Medium, die in etwa der Größe der Wellenlänge der eingestrahlten Lichtquelle entspricht. Unter den vorliegenden Bedingungen sind das ca. 200 nm (persönliche Mitteilung, ICB). Damit kann der übliche Waschschrift zur Entfernung der ungebunden Zielmoleküle deutlich zeit- und volumenreduziert werden.

2.11.1 Sondenkonstruktion

Auf Basis von 1600 acidobakteriellen 16S-rDNS Voll- und Partialsequenzen wurden Oligonukleotidsonden für die einzelnen „subdivisions“ mit dem Probe-Design-Modul des ARB Software Pakets ([109], <http://www.arb-home.de>) konstruiert. Anschließend wurden die so berechneten Oligonukleotidsequenzen gegen alle bislang in der ARB-Datenbank (ca. 60 000) erfassten 16S-rDNS Sequenzen mittels des Probe-Match-Tools abgeglichen und auf ihre Spezifität geprüft. Alle Oligonukleotidsonden wurden von MWG Biotech (Ebersberg, D) bezogen.

2.11.2 Probenvorbereitung für Hybridisierungen mit dem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp

Ein Problem bei jeder Hybridisierung ist die Zugänglichkeit der Sonden-Zielregion auf einem großen PCR-Fragment. Durch die Tatsache, dass die DNS Sekundärstrukturen bildet kann es vorkommen, dass eine Hybridisierung der Sonde mit der Zielregion nicht oder nur teilweise

zustande kommt. Durch das Einsetzen des DecaLabel[®]DNA Labeling Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) werden nach folgendem Protokoll (im folgenden Deca-Priming-Reaktion genannt) vom ursprünglichen PCR-Produkt kleinere DNS-Fragmente (zwischen 200-800 Basen) generiert. Anschließend wurden diese mit dem ULYSIS[®] Alexa Fluor[®] 647 Nucleic Acid Labeling Kit markiert.

- Zugabe von 10 μl Dekanukleotiden in 5xReaktionspuffer zu 2 μg aufgereinigtem PCR-Produkt, ad 45 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$
- Inkubation bei 95°C für 10 min, sofort auf Eis kühlen
- Zugabe von 6,25 μl dNTP (je 0,25 mM) und 1 μl Klenow Fragment exo^- (5 U/ μl)
- Inkubation bei 37°C für 4 h im Wasserbad
- Aufreinigung mit dem QIAquick[™] Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden, D), dabei 2 Mal mit je 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ eluieren
- Eluat in einer Vakuumzentrifuge (Bachofer, Reutlingen D) komplett einrotieren
- Resuspendieren in 20 μl ULYSIS[®] Labeling-Puffer und 30 min auf Eis inkubieren
- Inkubation bei 95°C für 10 min
- Zugabe von 5 μl ULYSIS[®] Alexa Fluor[®] 647 Labeling-Lösung und 20 min bei 80°C inkubieren
- Zugabe von 3 μl 3 M Natriumacetat und 60 μl EtOH_{abs} , über Nacht bei -80°C fällen
- 15 min bei 14000xg zentrifugieren, waschen mit 70% EtOH , weitere 5 min bei 14000xg zentrifugieren, lufttrocknen und in einem angemessenen Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendieren (10-20 μl)

2.11.3 Sondenimmobilisierung auf den Sensorchip

Alle Oligonukleotidsonden wurden von MWG Biotech (Ebersberg, D) bezogen (siehe Tabelle 30 im Anhang). An das 5'-Ende der Oligonukleotidsonden wurde ein 24mer Thymidin-Spacer (polyT-Spacer) synthetisiert, um die Zugänglichkeit der immobilisierten Sonde zur Ziel-DNS zu erhöhen [158, 165]. Zusätzlich wurde das 5'-terminale Nukleotid amino-modifiziert, um eine kovalente Bindung der Oligonukleotidsonden an die mit Aldehydgruppen beschichteten GAPS II Coated Glasobjektträger (Corning[®] Incorporated, NY USA) zu gewährleisten. Die Sonden wurden in einer Konzentration von 50 μM eingesetzt und in 50% DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, um ein Verdampfen der Sondenlösung während des Spotvorganges zu vermeiden und

die Bildung von Sekundärstrukturen zu inhibieren. Die Sonden wurden mit Hilfe des GMS 417 contact arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA USA) auf den DNS-Chips plaziert. Im Anschluss wurden die Chips einige Sekunden mit H_2O bedampft, getrocknet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die fertigen Chips können im Dunkeln bei RT gelagert werden. Vor der Hybridisierung wurden die Chips in H_2O_{reinst} und Isopropanol gewaschen.

2.11.4 Aufbau des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyps

Die einzelnen Komponenten des Gerätes lassen sich einteilen in:

- zentrales Glasprisma (mittels einer Mechanik kann der Sensorchip darauf herabgelassen werden)
- Anregungsoptik mit dem Lasermodul
- Detektionsoptik mit der CCD-Kamera
- Magazin (kann mit bis zu 8 unterschiedlichen Flüssigkeiten beladen werden)
- Fluidiksystem mit Pumpe und Ventil
- Thermostat
- elektronische Steuereinheit

Während der Messung ist das Glasprisma mit dem Sensorchip über ein Silikonöl kontaktiert. Sowohl das Glasprisma als auch das Silikonöl müssen denselben Brechungsindex wie der Sensorchip besitzen, damit die Totalreflexion tatsächlich erst an der Glasoberfläche des Sensorchips statt findet. Für die Fluoreszenzanregung wurde eine Laserdiode der Wellenlänge 635 nm (Singlemode-Laserdiode 35 mW, Schäfter und Kirchhoff GmbH, Hamburg, D) gewählt. Die verwendete Laserdiode weist ein typische Strahlprofil von ca. 7,3x1,6 mm auf, wobei an den Rändern dieses Feldes die Laserleistung auf ca. 50% der Maximalleistung abfällt. Dies resultiert in einer nicht absolut homogenen Intensitätsverteilung des evaneszenten Feldes auf der ca. 10x10 mm großen, sensitiven Fläche des Sensorchips. Durch ein System aus Spiegeln, optischen Linsen und einem Filter zur Unterdrückung von Laserstreulicht wird das emittierte Fluoreszenzlicht auf die lichtempfindliche Fläche der CCD-Kamera (Serie 300, Photometrics[®], Ottobrunn, D) abgebildet. Mit Hilfe eines in der Ausleseinheit integrierten Thermostaten ist ein indirektes Aufheizen des Sensorchips möglich. Es können verschiedene, konstante Temperaturen im Bereich von etwa 20-50°C eingestellt werden. Die Ausleseinheit wird über eine eigens entwickelte Software namens *dna-mwg* angesteuert (siehe auch Abbildung 8). Diese ermöglicht die Steuerung der mechanischen Sensorchipalterung, des Magazins für den Lösungszufluss sowie des Fluidiksystems (Einstellen

Durchflussvolumen und -geschwindigkeit) und der Aufnahme rate (Bilder pro Sekunde) der CCD-Kamera. Die Abbildung 5 zeigt den Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp, sowie die Mechanik zum Einlegen der Fluidikkammer.

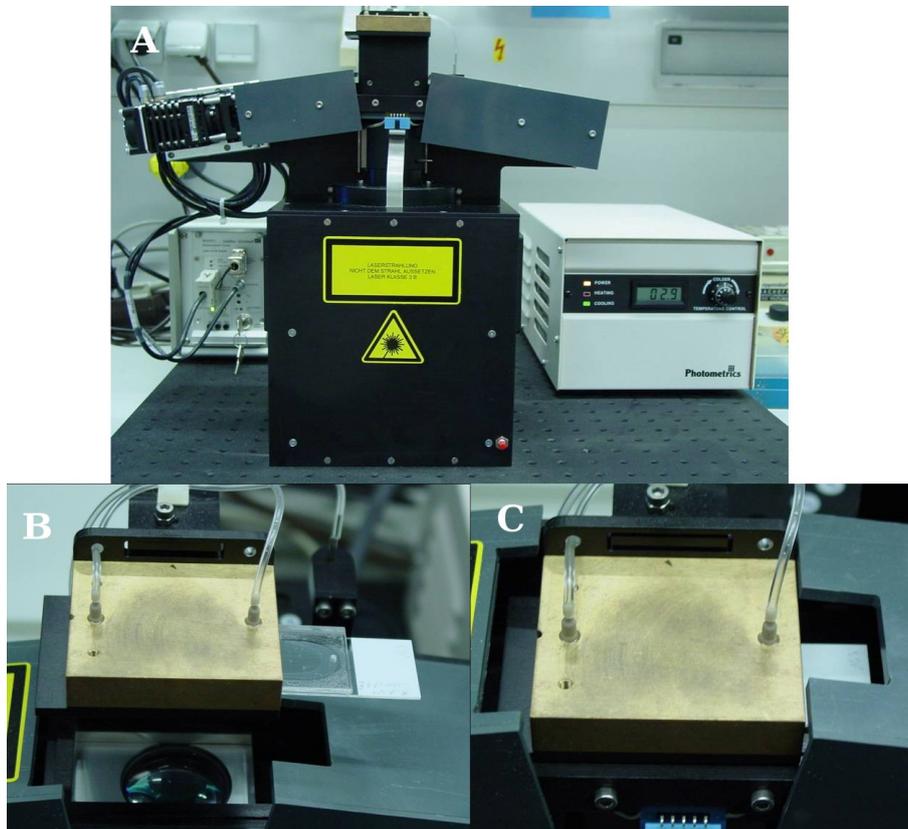


Abbildung 5: Abbildungen der Frontansicht des hier verwendeten Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyps, der vom ICB (Münster, D) entwickelt wurde (A), der geöffneten Mechanik zum Einlegen der DNS-Chips (B), und der geschlossenen Mechanik (C), der Kontakt zwischen Sensorchip und Glasprisma findet über Silikonöl statt.

2.11.5 Aufbau des Sensorchips

Der DNS-Sensorchip ist aus drei Komponenten aufgebaut, die in Abbildung 6 dargestellt sind. Die Basis des Sensorchips bildet ein GAPS II Coated Glasobjektträger (Corning[®] Incorporated, NY USA) an den Oligonukleotidsonden immobilisiert sind (siehe Kapitel 2.11.3). Zur Ausbildung des Fließkanals wurde der Glasobjektträger über einen zugeschnittenen Klebefilm (50 μm dick) mit einer mittigen Öffnung (Größe ca. 49x16 mm) mit einem Chipoberteil (aus Polymethacrylsäuremethylester, PMMA) verbunden. In diesem Chipoberteil sind Zu- und Abfluss zum Fließkanal integriert. Da die sensitive Fläche nur einen kleinen Teil des Chips ausmacht, müssen

die Sonden präzise auf dem DNS-Chip platziert werden. Die Lage des Arrays auf dem Sensorchip und die zugehörigen Koordinaten sind in Abbildung 7 dargestellt.

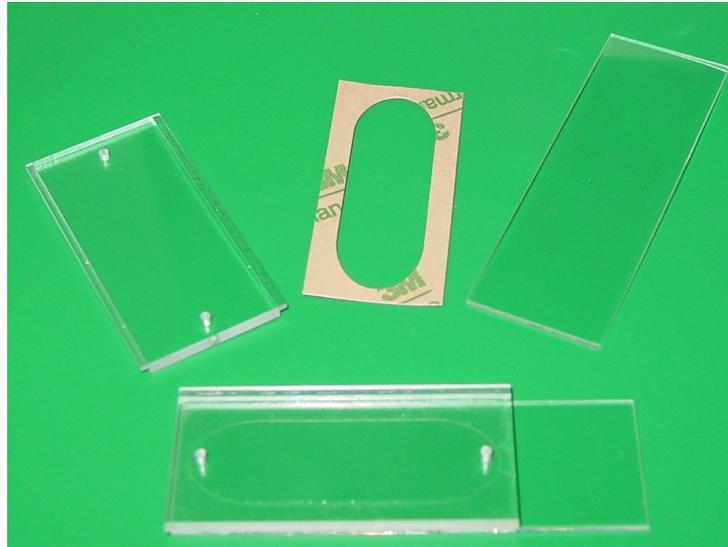


Abbildung 6: Abbildungen der Einzelkomponenten des Sensorchips (A) und des zusammengesetzten Sensorchips (B)

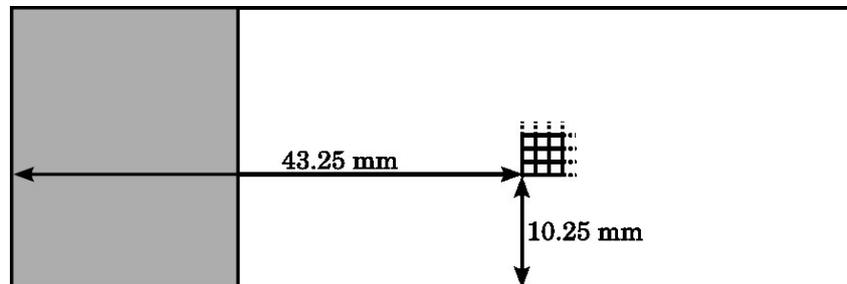


Abbildung 7: Koordinatenangabe des Startpunktes der nutzbaren Fläche von 10x10 mm eines Mikroarray-Chips für den Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp.

2.11.6 Durchführung von Hybridisierungen mit dem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp

Zunächst wurde der Sensorchip aus den Einzelkomponenten mit Hilfe einer Montagevorrichtung zusammengebaut und in die mechanische Sensorchiphalterung eingelegt. Anschließend wurden 1-2 Tropfen Immersionsöl (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, D) auf das Prisma aufgebracht und die Sensorchiphalterung auf das Prisma abgesenkt. Nach ca. 5 min hatte sich ein gleichmäßiger Ölfilm zwischen Sensorchip und Prisma ausgebildet. Zur Kontrolle der Spothomogenität wurde vor jeder Probenhybridisierung zuerst eine Positivkontrolle, in diesem

Fall eine Cy5-markierte Sonde ausschließlich aus Adeninen bestehend und damit komplementär zum polyT-Spacer jeder Sonde, hybridisiert. Probenvolumen und Durchflussgeschwindigkeit für Kontrolle bzw. Reinkulturen/Klone können Tabelle 13 entnommen werden und für Umweltproben Tabelle 14. Die Aufnahmezeit betrug immer ein Bild alle 7 s mit einer Belichtungszeit von 5 s. Die Aufnahmen wurden dabei im Modus des 2x2 Binnings gespeichert, d.h. jeweils 2x2 der insgesamt 1024x1024 Pixel wurden zu einem Wert zusammengefasst, damit der Speicherplatzbedarf der Messdaten verringert wurde bei noch ausreichender Auflösung der Bildinformation. Die Einstellungen für Temperatur, Durchflussgeschwindigkeit und -volumen, und Aufnahmezeit konnten mit der eigens implementierten Software *dna-mwg* vorgenommen werden (siehe Abbildung 8). Mit einem Sensorchip können mehrere Messungen durchgeführt werden, weshalb der Sensorchip nach erfolgter Hybridisierung durch Spülen mit einer Denaturierungslösung und anschließend mit einer Waschlösung regeneriert wurde (Zusammensetzung siehe unten, Durchflussgeschwindigkeit- und volumen siehe Tabellen 13 und 14). Die Kunststoffkomponenten können nach einer Reinigung mit EtOH_{abs} wiederverwendet werden. Für alle Hybridisierungen wurde der ULTRAhybTM Hybridisierungspuffer (Ambion, Austin, TX USA) verwendet. Standardmäßig wurden pro Hybridisierung 200 ng markiertes PCR-Produkt von Reinkulturen bzw. Klonen und 2 µg von Umweltproben eingesetzt (siehe Kapitel 2.11.2).

Denaturierungslösung:

Tween 20 0,05%
 NaOH 0,125 N
 pH 7,5
 (1:1 Verhältnis von 0,1% Tween20 : 0,25 N NaOH)

Waschlösung:

SSC 0,5x
 SDS 0,1%
 pH 7,5

Revolver- Position	Inhalt	Volumen [µl]	Durchflussrate [µl/s]
Nummer 1	Kontrolle oder Probe	120	1
Nummer 2	Hybridisierungspuffer	200	1
Nummer 7	Denaturierungslösung	200	10
Nummer 8	Waschlösung	400	25

Tabelle 13: Standardhybridisierungsschema für die Sondenevaluierung

Revolver-Position	Inhalt	Volumen [μl]	Durchflussrate [$\mu\text{l/s}$]
Nummer 1	Probe	120	1
Nummer 2	Probe	120	1
Nummer 3	Probe	120	1
Nummer 4	Probe	120	1
Nummer 5	Hybridisierungspuffer	200	1
Nummer 7	Denaturierungslösung	200	10
Nummer 8	Waschlösung	400	25

Tabelle 14: Standardhybridisierungsschema für Bodenproben

The screenshot shows a software window titled 'Form1' with a blue title bar. The interface is divided into several sections:

- Buttons:** 'Einstellungen laden', 'Einstellungen speichern', 'KommentarEdit', 'Übernehmen', 'Start', 'Stop', 'Sensor ankoppeln', 'Sensor herausnehmen', 'Temperatur setzen', 'Temperatur Lesen'.
- Messung (Measurement):**
 - Buttons: 'Einstellungen laden', 'Einstellungen speichern'
 - Text input: 'KommentarEdit'
 - Section: **Messung**
 - Labels: 'Vol [ul]', 'Fluss [ul/s]'
 - Table:

	Vol [ul]	Fluss [ul/s]	
Totvolumen	90		
<input checked="" type="checkbox"/> Probe1	120	1	<input type="checkbox"/> Pumpe leeren
<input checked="" type="checkbox"/> Probe2	200	1	<input type="checkbox"/> Pumpe leeren
<input type="checkbox"/> Probe3	0	0	<input type="checkbox"/> Pumpe leeren
<input type="checkbox"/> Probe4	0	0	<input type="checkbox"/> Pumpe leeren
<input type="checkbox"/> Probe5	0	0	<input type="checkbox"/> Pumpe leeren
<input type="checkbox"/> Probe6	0	0	<input type="checkbox"/> Pumpe leeren
<input checked="" type="checkbox"/> Probe7	200	10	<input type="checkbox"/> Pumpe leeren
 - Buttons: 'Spülen (Probe8)', 'Temperatur setzen', 'Temperatur Lesen'
 - Text inputs: '40 °C', 'T °C'
 - Buttons: 'Sensor ankoppeln', 'Sensor herausnehmen'
 - Text inputs: 'Messintervall min 1125ms', '5000 ms'
 - Buttons: 'Start', 'Stop'
 - Text input: 'filename'
- Kamera (Camera):**
 - Section: **Kamera**
 - Text input: 'Belichtungszeit 4000 [ms]'
 - Text input: 'OnChipGain 1'
 - Section: **Bildbereich** (alle Angaben in physikalischen Pixeln)
 - Table:

	Offset	Size	Binning
X	0	512	2
Y	0	512	2
 - Button: 'Übernehmen'

Abbildung 8: Screenshot der Benutzeroberfläche der Software *dna-mwg*. Hier können die Temperatur, das Durchflussvolumen und die -geschwindigkeit, sowie die Bildaufnahme rate für jede Hybridisierung festgelegt werden.

2.11.7 Auswertung der Messungen

Die gesamte Auswertung der aufgenommenen CCD-Bilder ist möglich mit Hilfe einer in Matlab[®] (The MathWorks, MA USA) implementierten Software namens *dnachip* (ICB, Münster, D). Die Verarbeitung erfolgt dabei schrittweise durch eine einfach zu handhabende Benutzeroberfläche, z.B. zum Festlegen des Datenordners, Einlesen der darin gespeicherten Bilddaten, Kontrolle des Signalverlaufs einzelner Spots, Festlegen einer Zeitachse für die betrachtete Messung, Generieren eines Steigungsbildes der Spotintensität über die Zeit sowie zur Quantifizierung der dabei erhaltenen Werte (siehe Abbildung 10). Abbildung 9 zeigt exemplarisch eine Hybridisierung. Damit das eigentlich in Graustufen aufgenommene Bild der CCD-Kamera besser interpretierbar für das Auge wird, sind alle Signalintensitäten in Falschfarbenskalierung dargestellt. Abbildung 9 A zeigt die Chipoberfläche am Beginn der Messung, hier hat noch keine Hybridisierung statt gefunden. In Abbildung 9 B ist nun die eigentlich Hybridisierung nach 120 s zu erkennen. Da hier die Positivkontrolle gezeigt ist, können alle Spots auf dem Sensorchip detektiert werden. Erkennbar ist auch die Inhomogenität des Ausleuchtungsprofils, die sich durch das Intensitätsprofil der Laserdiode ergibt (siehe auch Kapitel 2.11.4). Anschließend wurden die Sonden-DNS-Hybride denaturiert und der Chip regeneriert (siehe Abbildung 9 C). Im Anschluss können folgende Quantifizierungswerte von der *dnachip*-Software ausgegeben werden: maximale Signalintensität mit Hintergrund, gemittelte Signalintensität mit Hintergrund, integrierte Signalintensität mit Hintergrund, sowie die korrigierten (d.h. nach Abzug des Hintergrundes von den Sondenspots) Signalintensitäten dieser drei Berechnungsarten. Für die Berechnung der maximalen Signalintensität wurde immer der Mittelwert der obersten vier Pixel verwendet, um Ausreißer zu vermeiden. Bei der Auswertung der CCD-Bilder wurden nun aufgrund der linearen Bindungskinetiken nicht die absoluten Fluoreszenzsignale am Ende der Messung betrachtet, sondern ausschließlich die Steigungswerte der maximalen Signalintensität ohne Hintergrund in einem bestimmten Zeitraum. Abbildung 9 D zeigt eine entsprechende Realzeithybridisierungskurve (dargestellt ist die Signalintensität auf dem DNS-Chip abhängig von der Zeit) für den Zeitraum von 100 s bis 300 s an einem bestimmten Punkt aus deren Steigung diese Werte berechnet werden können.

2.11.8 Spotinterne Korrektur des Ausleuchtungsprofils

Zum Ausgleich der inhomogenen Ausleuchtung des sensitiven Feldes wurden Korrekturfaktoren für jeden einzelnen Spot generiert. Da die Kontrolle der Spothomogenität (siehe Kapitel 2.11.6) jeden einzelnen Spot betrifft, konnten aus (von diesen Messungen erhaltenen) Steigungswerten, Korrekturfaktoren für die einzelnen Spotpositionen bestimmt werden. Nach dieser Charakterisierung wurden die Korrekturfaktoren auf die Hybridisierungsmessungen der eigentlichen Zielsequenzen angewendet.

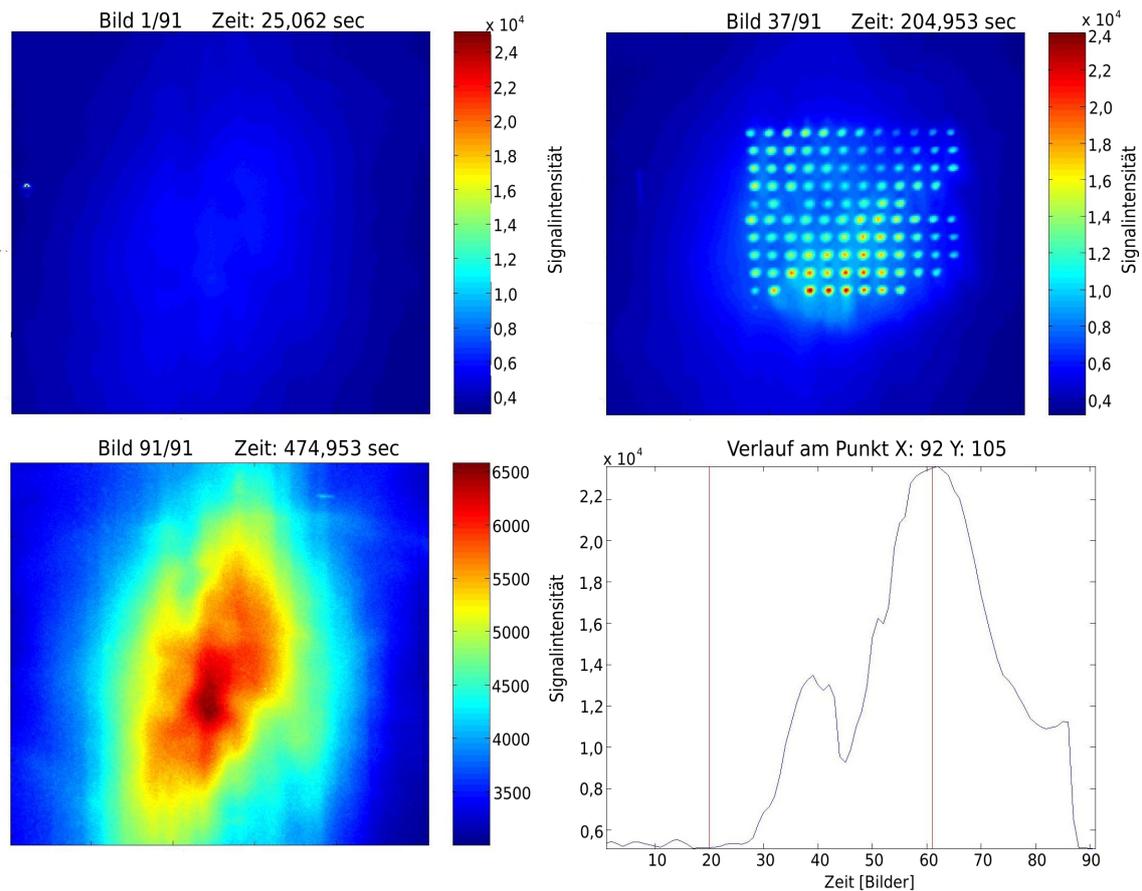


Abbildung 9: Ablauf einer Hybridisierung am Beispiel der Positivkontrolle (Komplementärsonde zum polyT-Spacer): Chipoberfläche am Beginn der Hybridisierung (A), die eigentliche Hybridisierung (B), Chipoberfläche nach der Denaturierung (C) sowie die entsprechende Realzeithybridisierungskurve der Hybridisierung für den Zeitraum von 100 s bis 300 s (D).

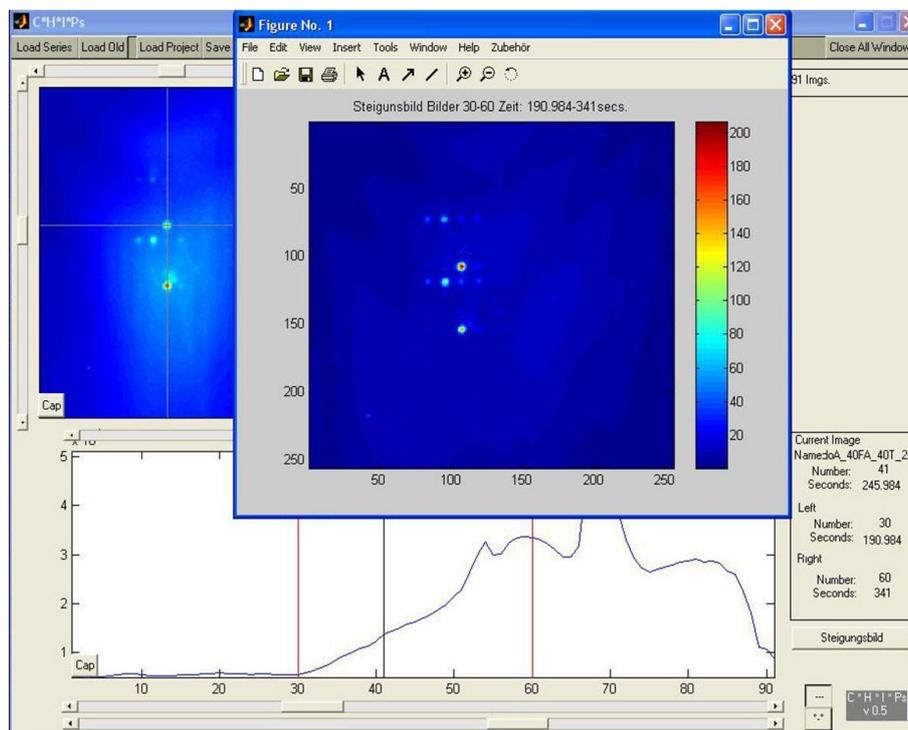


Abbildung 10: Screenshot der Benutzeroberfläche der *dnachip*-Software (ICB, Münster, D) zur Auswertung der Hybridisierungen mit dem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp.

2.11.9 Normalisierung der Werte

Um eine Vergleichbarkeit verschiedener Hybridisierungen zu ermöglichen wurden die Steigungswerte nach der Korrektur nach Gleichung 1 normalisiert. Dabei ist R die normalisierte Signalintensität, I_P die Signalintensität der einzelnen Sonden, I_N die Signalintensität der Nonsense-Sonde und I_U die Signalintensität der universellen Sonde UNIV_1390 bzw. 616V. Als Bezugssonde wurde zuerst die 616V-Sonde (siehe Tabelle 30 im Anhang) gewählt, im Verlauf der Arbeit wurde sie allerdings durch die UNIV_1380 (siehe Tabelle 30 im Anhang) ersetzt, da in den vorhergehenden PCR-Reaktionen zur Probenvorbereitung der Primer 616V (siehe Tabelle 10), der sequenzidentisch mit der 616V-Oligonukleotidsonde ist, verwendet wurde. So konnte eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund Primerfehlpaarung verhindert werden.

$$R = \frac{I_P - I_N}{I_U - I_N} \quad (1)$$

2.12 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden mit dem SequiTherm EXCEL[®]II DNA Sequencing Kit-LC (66cm, Epicentre, Madison, WI, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Trennung der entstehenden Fragmente erfolgte in einem LI-COR Global IR² DNS Sequenzierer (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D). Die Sequenzen wurden anschließend mit der *e*-Seq DNS Sequenzier- und Analyse-Software (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D) ausgewertet.

2.13 Phylogenetische Analysen

Alle phylogenetischen Analysen wurden mit den Alignment- und Baumberechnungsmethoden des ARB Software Paketes durchgeführt ([109], <http://www.arb-home.de>). Neue Sequenzen wurden dem existierenden ARB-Alignment mit Hilfe von ARB.EDIT hinzugefügt und anschließend manuell angepasst. Für phylogenetische Analysen wurden Distanzmatrix-, Maximum-Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methoden angewandt. Alle phylogenetischen Konsensusbäume wurden nach den Empfehlungen von Ludwig *et al.* [108] gezeichnet.

2.14 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Auf Basis von 1600 acidobakteriellen 16S-rDNS Voll- und Partialsequenzen wurden Oligonukleotidsonden für die einzelnen „subdivisions“ mit dem Probe-Design-Modul des ARB Software Pakets ([109], <http://www.arb-home.de>) konstruiert. Anschließend wurden die so identifizierten Oligonukleotidsequenzen gegen alle bislang in der ARB-Datenbank (ca. 60 000) erfassten 16S-

rDNS Sequenzen mittels des Probe-Match-Tools abglichen und auf ihre Spezifität geprüft. Alle Oligonukleotidsonden wurden von MWG Biotech (Ebersberg, D) bezogen. Die Funktionalität und Spezifität dieser Sonden wurde anschließend noch durch Hybridisierungsreihen mit unterschiedlichen Formamidkonzentrationen, sowie FISH mit kultivierten Referenzen (Interphylum, Tabelle 1) und *Acidobacteria* Reinkulturen bzw. Klonen (Intraphylum, siehe Tabellen 1) *in vitro* evaluiert [123]. Die Tabellen 27 (Phylum-spezifische Sonden) und 28 (*Acidobacteria*-spezifische Sonden) im Anhang führen die verwendeten Sonden, ihre Spezifität, Sequenz, Annealingtemperatur, sowie den optimalen bzw. verwendeten Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer auf. Alle FISH-Experimente wurden mit den von Dr. Johannes Fried entwickelten Hybridisierungskammern nach bestehenden Protokollen [48, 123, 181] durchgeführt. Aufgrund der schwierigen Detektionsverhältnisse in Bodenproben wurden für diese Hybridisierungen immer eine spezifische Sonde, eine allgemeine Bakteriensonde (EUB-Mix, siehe Tabelle 27) und DAPI-Färbung zum Nachweis von DNS im Allgemeinen (4', 6'-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D) kombiniert. Nach der Hybridisierung wurden die Proben mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM, Zeiss LSM 510 Ver. 2.01 SP2, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, D) ausgewertet.

2.15 Fixierung von Bodenproben für FISH

2.15.1 Fixierung von Bodenproben nach McDonald *et al.* [118]

Lösungen:

Iminodiacetat-Lösung	1 g	Natriumiminodiacetat
	20 ml	Natriumdesoxycholatlösung 0,2% (w/v)
Dextran-Lösung	20% (w/v)	Dextran
Polyethylenglycol	40% (w/w)	Polyethylenglycol

- Zugabe von 20 ml Iminodiacetat-Lösung zu 10 g Bodenprobe (Partikeldurchmesser <2mm)
- alle nachfolgenden Schritte müssen bei 4°C durchgeführt werden
- Inkubation 2 h bei 4°C unter Rühren
- Zugabe von 10 ml Dextran-Lösung, 15 ml Polyethylenglycol und 69 ml H₂O_{reinst}
- Abwarten bis sich alle Partikel absetzen und sich 2 flüssige Phasen bilden
- Überführen der unteren Phase in 2 ml Caps
- Zentrifugieren bei 14000xg für 2 min und Überstand abnehmen
- Fixierung des Pellets in 4% PFA : 1xPBS im Verhältnis 3:1 und bei 4°C über Nacht inkubieren oder in EtOH_{abs} : 1xPBS im Verhältnis 1:1

2.15.2 Fixierung von Bodenproben nach Lunau *et al.* [111]

Lunau *et al.* [111] entwickelten eine neue Methode, um Bakterien aus Sedimenten oder anderen Habitaten mit hoher Partikelzahl zu zählen. Sie postulierten, dass eine Behandlung der Probe mit einer Kombination aus 10% (v/v) Methanol und Sonifizierung ein Ablösen der partikel-assoziierten Bakterien möglich machen würde.

- Zugabe von 1300 μl 1xPBS zu 0,3 g Boden (letztendliches Volumen sollte ca. 1350 μl sein)
- Zugabe von 150 μl 10% (v/v) sterilfiltriertem Methanol
- Inkubation bei 37°C 15 min im Ultraschallbad
- Bei 2000xg für 1 min zentrifugieren
- Zugabe von 3 Volumen PFA zu 1 Volumen Überstand
- Fixierung für 2,5 h bei 4°C
- Bei 10000xg für 5 min zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet in 300 μl 1xPBS und 300 μl EtOH_{abs} resuspendieren

2.15.3 Fixierung von Bodenproben mit Nycodenz[®]

Die Verwendung von Nycodenz[®] (Gentaur, Brüssel, B) zur Isolierung von Bakterien aus Bodenproben wurde erstmals 1995 von Lindahl und Bakken [96] erprobt. Dabei sollten zwei Bedingungen erfüllt werden: (1) Bakterien sollten effektiv von Bodenpartikeln gelöst werden und (2) dichtere Bodenpartikel sollten von den Bakterien getrennt werden. Dabei sollte jedoch die funktionelle Integrität der Bakterien nicht beeinflusst werden.

Lösungen:

Extraktionslösung	0,1 g	NaCl
	0,02 g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	0,2 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	5 ml	Tween80
	ad 1000 ml	H ₂ O
	autoklavieren	
Nycodenz [®]	13,1 g/10 ml	Nycodenz [®] / H ₂ O
PFA	4%	
Polyvinylpyrrolidon	20%	
EtOH _{abs}		
EtOH	80%	
EtOH	50%	

- 1 g Boden in Einsätze für Schwing Mühle Modell MM2 (Retsch GmbH, Haan, D) einwiegen
- Zugabe von 9 ml Extraktionslösung
- 7 min bei 80% Leistung in der Schwing Mühle Modell MM2 (Retsch GmbH, Haan, D) schütteln
- Suspension in 15 ml Greiner-Röhrchen pipettieren
- 15 min sedimentieren lassen
- 1 ml vom Überstand abnehmen und in ein frisches Cap überführen
- Zugabe von 3 Volumen 4% PFA, 20 min bis über Nacht bei RT inkubieren
- 4 Mal 1 min Ultraschallbehandlung mit jeweils 30 s Pause dazwischen
- 1 ml Nycodenz[®] in 2 ml Caps pipettieren
- Überstand sehr vorsichtig auf die Nycodenz[®]Lösung pipettieren
- Bei 14000xg und 4°C 45-50 min in der Gradientenzentrifuge abzentrifugieren
- Obere Phase verwerfen, Zwischenphase abnehmen
- Zur Zwischenphase 1 ml 1xPBS geben und auf Filter (Porenweite 37 μm) mit Hilfe einer Vakuumpumpe aufbringen
- mit 4 ml 1xPBS waschen
- aufsteigende EtOH-Reihe: 1 ml 50% EtOH, 1 ml 80% EtOH, 1 ml 96% EtOH, Filter trocknen
- kann staubgeschützt über Monate aufbewahrt werden

3 Ergebnisse

3.1 Bodencharakteristika

Da Boden als Habitat hoch komplex ist, wurden einige Faktoren, wie pH-Wert und Stickstoff- bzw. Kohlenstoffgehalt der Grünschwaige-Bodenproben bestimmt (siehe Kapitel 2.3). Diese Werte spielen auch im Zusammenhang mit Wachstum und Nährstoffverfügbarkeit für Bodenbakterien eine relevante Rolle. Stickstoff ist ein stark begrenzter Faktor in Böden (99% des Gesamtstickstoffes befinden sich in der Erdatmosphäre). Da auch Pflanzen für optimales Wachstum einen höheren Stickstoffgehalt benötigen wird meist, mit z.B. tierischer Gülle, gedüngt. Alle Bodenproben zeigen ähnliche pH-Werte im neutralen bis leicht sauren Bereich zwischen 6,6 und 7,1 (siehe Tabelle 15). Im Gegensatz dazu sind sowohl Kohlenstoff- als auch Stickstoffgehalt der einzelnen Bodenproben sehr unterschiedlich. Der Gesamtkohlenstoff schwankt zwischen 70,12 und 134,2 g/kg Boden, der Gesamtstickstoff zwischen 4,61 und 9,82 g/kg Boden (siehe Tabelle 15). Das Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis, das u.a. die Humusqualität beschreibt, liegt zwischen 12,1:1 und 19,1:1 (siehe Tabelle 15).

Bodenprobe	pH-Wert	Gesamtkohlenstoff [g/kg Boden]	Gesamtstickstoff [g/kg Boden]	C/N-Verhältnis
K6-1	6,8	88,07	4,61	19,1:1
K6-2	7,1	92,75	5,99	15,5:1
K6-3	6,8	134,2	9,27	14,5:1
K8-1	6,9	102,65	5,69	18,0:1
K8-2	6,7	103,4	7,77	13,3:1
K8-3	6,6	70,12	5,78	12,1:1
K15	6,8	129,85	9,82	13,2:1

Tabelle 15: pH-Werte, Stickstoff- und Kohlenstoffgehalt sowie das Verhältnis von Stickstoff- zu Kohlenstoffgehalt (C/N-Verhältnis) der Grünschwaige-Bodenproben

3.2 Vergleich der DNS-Extraktionsmethoden

Drei verschiedene DNS-Extraktions-Methoden (siehe Kapitel 2.4) wurden im Laufe der Arbeit angewendet und hinsichtlich des zeitlichen Aufwands (für die Extraktion) und resultierenden Reinheit, Qualität und Menge der DNS verglichen (siehe Tabelle 16). Die Methode nach Zhou *et al.* [190] schnitt sowohl in Bezug auf Dauer der DNS-Extraktion (ca. 6 h) als auch der Menge der erhaltenen DNS (weniger als 1 μg pro 5 g Boden) im Vergleich mit den anderen Methoden schlechter ab. Zudem war die DNS stark abgebaut. Die Methode nach Dong *et al.* [41] und das Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit entsprechen sich in etwa in der Effektivität, in Hinblick auf die Reinheit der DNS und den zeitlichen Aufwand. Dies liegt vermutlich auch an der Ähnlichkeit

der Protokolle: bei beiden werden zuerst Inhibitorstoffe entfernt (Aluminiumsulfat [41] bzw. „Inhibitor Removal Solution“ (Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit)) und erst im Anschluss die Zellen mit Hilfe von Glasperlen lysiert. Mit Hilfe der Methode nach Dong *et al.* [41] kann jedoch deutlich mehr DNS aus dem entsprechenden Probenvolumen extrahiert werden (siehe Tabelle 16). Zusätzlich ist im Vergleich zu dem Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit die Methode nach Dong *et al.* [41] deutlich kostengünstiger, so dass sie weiterverwendet wurde.

3.3 Konstruktion einer 16S- und 23S-rDNS Klondatenbank

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf 16S-23S-rDNS-Genbanken aus ebenso vielen unterschiedlichen Böden erstellt (siehe Kapitel 2.2). Die Klondatenbanken wurden nach der jeweiligen Bodenprobe benannt aus der die Sequenzen gewonnen wurden (BI, BII, BIII, BIV, K6-1, K6-2, K6-3, K8-1, K8-2, K8-3 und K15).

Die in Bodenproben enthaltenen Huminsäuren, polymere anionische Verbindungen, hemmen die DNS-Polymerase bereits in kleinsten Konzentrationen. Die chemischen Eigenschaften von Huminsäuren ähneln denen von DNS sehr stark, so dass diese im Allgemeinen bei einer DNS-Isolierung zusammen mit der DNS extrahiert werden [41]. Erst nach entsprechender Verdünnung der hemmenden Substanz kann somit eine *in vitro*-Amplifikation erfolgen [13]. Da Verdünnungen der DNS-Präparation auch seltener auftretende Nukleinsäuren in dem Gemisch minimieren, ist deren Amplifikation evtl. zu stark vermindert, um anschließend in einer Klondatenbank oder mit einem Mikroarray nachgewiesen zu werden. Deshalb wurden verschiedene DNS-Extraktions-Methoden (siehe Kapitel 3.2 und Tabelle 16) verglichen sowie PCR-Enhancer (BSA und TMAcI, siehe Kapitel 2.5) eingesetzt, um die Inhibierung durch Huminstoffe zu reduzieren. Zusätzlich musste ein initialer Denaturierungsschritt eingeführt werden (sog. „Hot-Start“-PCR, [31]) durch die thermisch instabile Inhibitoren im Vorfeld eliminiert wurden. Die Zugabe der DNS-Polymerase erfolgte erst im Anschluss an diese Denaturierung. Ohne diesen Schritt wurden auch bei Zugabe der PCR-Enhancer keine Amplifikate erzielt. Die „Hot-Start“-PCR verhindert zudem das sogenannte „pre-PCR-mispriming“ sowie die Bildung von Primerkonkatemeren [84]. Auf Grund dieser Optimierungsschritte konnte die Amplifikation der DNS zum Großteil mit unverdünnter Boden-DNS durchgeführt werden. Für einige Bodenproben wurde jedoch ohne Verdünnung der Boden-DNS kein Amplifikat erhalten, so dass im weiteren Verlauf mit der niedrigsten Verdünnung bei der noch ein Amplifikat sichtbar war gearbeitet wurde. Die genaue Verdünnung der einzelnen Bodenproben kann Tabelle 18 entnommen werden. Um die Amplifikation von geringer vertretenen DNS-Sequenzen trotzdem zu gewährleisten, wurden mehrere DNS-Extraktionen vereinigt [2].

Zur Amplifikation wurde zuerst die Primerkombination 616V und 100K (Bindepositionen am 5'- bzw. 3'-Ende der 16S-rDNS) eingesetzt und im späteren Verlauf der Arbeit 31f bzw. 31F_mod und 985R (Bindepositionen am 5'-Ende der 16S-rDNS bzw. 3'-Ende der 23S-rDNS, siehe Kapitel 2.5.2), um zusätzlich auch die ITS-Region sowie die 23S-rRNS von Acidobakterien untersuchen

	Zhou <i>et al.</i> ¹	Dong <i>et al.</i> ²	Ultra Clean™ Mega Soil DNA Kit
Vorbehandlung der Probe Methode der Zellyse Zeitaufwand DNS-Ausbeute DNS-Qualität	– SDS, Inkubation bei 65°C, Chisom ca. 6 h <1 µg aus 5 g Boden stark abgebaut	Aluminiumsulfat SDS und Glasperlen, Chisom 2,5 h 1 µg aus 0,3 g Boden leicht abgebaut	„Inhibitor Removal Solution“ ⁴ Glasperlen, Säulenaufreinigung ³ 2 h 4-5 µg aus 5 g Boden leicht abgebaut

¹ DNS-Extraktion nach Zhou *et al.* [190] (siehe Kapitel 2.4.2)

² DNS-Extraktion nach Dong *et al.* [41] (siehe Kapitel 2.4.3)

³ Näheres konnte dem Protokoll des Herstellers nicht entnommen werden

Tabelle 16: Vergleich verschiedener DNS-Extraktionsmethoden

zu können. Da die Anzahl der in Datenbanken zu Verfügung stehenden 16S-rDNS-Klonsequenzen im Laufe der letzten Jahre drastisch zunahm, war es nötig, bereits publizierte Primer (31f [12] und Hol_189R [192]) zu modifizieren, so dass neu hinzugekommene Sequenzen ebenfalls erfasst wurden. Bei der Modifikation des 31f Primers konnten nicht alle Variationen berücksichtigt werden, da eine zu hohe Anzahl degenerierter Positionen des Primers nicht wünschenswert wäre. Die 16S-rDNS Sequenzen von Vertretern der „subdivisions“ 2 und 10 haben am 3'-Ende der Primerbindungsposition zwei potentiell problematische Fehlpaarungen zum modifizierten 31f Primer (31F_mod, siehe Tabelle 17). Um zu zeigen, dass trotz dieser Fehlpaarungen eine Amplifikation der entsprechenden Sequenzen problemlos möglich war, wurde eine PCR mit dem 31F_mod Primer auf 16S-rDNS Referenzklone dieser „subdivisions“ bei derselben Annealing-Temperatur (49°C), die auch für Bodenproben eingesetzt wurde, durchgeführt (siehe Abbildung 11). Damit kann eine mangelhafte Amplifikation der DNS dieser „subdivisions“ aus Bodenproben ausgeschlossen werden. Deutlich sichtbar in Abbildung 11 ist das gewünschte PCR-Fragment in der Größe von 1600 b. Die zusätzlichen Banden stellen in diesem Fall Plasmid-DNS dar, die aufgrund zu hoher Initialkonzentration der DNS in der PCR im Gelbild noch sichtbar sind. Trotz Optimierungsversuchen (Steigerung der Annealing-Temperatur, Variation der Primer- und BSA-Konzentrationen) traten jedoch für Bodenproben z.T. zusätzliche unspezifische Amplifikate mit der Primerkombination 31F_mod und 985R auf. Neben dem gewünschten PCR-Fragment in der Größe von ca. 4500-5000 b wurden auch noch kleinere Amplifikate (ca. 2000 b) bzw. leichte Schmierbildung beobachtet. Die Größenvariation des gewünschten PCR-Fragments hat ihre Ursache in der unterschiedlichen Länge der ITS-Region. Diese variierte bei den gefundenen *Acidobacteria*-Klonen zwischen 350 b und 1250 b. Die Kloniereffizienz, d.h. die Anzahl analysierter Klone im Verhältnis zu spezifischen Klonen, war dessen ungeachtet ausreichend, sie lag abhängig von der Bodenprobe zwischen 27,92% und 45,26%, so dass auf weitere Optimierungsversuche verzichtet werden konnte. Mit Hilfe des PCR-Enhancers PrimerNavigator DNA Amplification Enhancer (biohelix, Beverly, MA, USA, siehe Kapitel 2.5) konnten im späteren Verlauf zwar die unspezifischen Amplifikate eliminiert werden (siehe Abbildung 12), jedoch verringerte sich auch die Menge an spezifischem Amplifikat deutlich, so dass eine Selektion auf bestimmte acidobakteriellen rDNS Sequenzen nicht ausgeschlossen werden konnte.

Spezifität	Sequenz 5'→3'
31F_mod	GAT WMT GGC TCA GAA TC
„subdivision“ 2	GAT CCT GGC TCA GAG CG
„subdivision“ 10	GAT CNT GGC TCA GAA CG

Tabelle 17: Sequenzunterschiede der „subdivisions“ 2 und 10 im Vergleich zum modifizierten 31F_mod Primer

Die Charakterisierung des Vektorinserts erfolgte mittels Koloniehybridisierung [89] mit der DIG-markierten Sonde Hol_1400, DNS-spezifischem Fischen [119] mit der Sonde Hol_1400 sowie

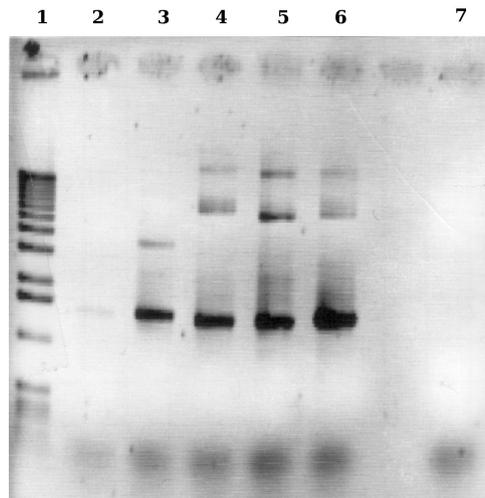


Abbildung 11: Einsatz der Primerkombination 31F_mod und 100K zur Amplifikation der Plasmid-DNS von 16S-rDNS Referenzklonen der *Acidobacteria* „subdivisions“ 2 und 10 (nach Agarosegelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel). 1:Längenstandard, 2:Ls_31_18 („subdivision“ 2), 3:Xc_43_10 („subdivision“ 2), 4: MP9_120505 („subdivision“ 10), 5:MP3_070605 („subdivision“ 10), 6:MP43_210706 („subdivision“ 4, Positivkontrolle), 7:Negativkontrolle

Ganz-Zell-PCR (siehe Kapitel 2.10). Wobei die Ganz-Zell-PCR unter Zuhilfenahme des spezifischen Primerpaars Hol_1400V (Bindepotion am 3'-Ende der 16S-rDNS) und Hol_189R bzw. Hol_189R_Ac (Bindepotion am 5'-Ende der 23S-rDNS) ausschließlich für die Identifizierung der 16S- bis 23S-rDNS Fragmente angewendet wurde. Die Sequenzen des Großteils der Klone, bei denen Amplifikat mit diesem Primerpaar entstand, konnten dem Phylum *Acidobacteria* zugeordnet werden. Einige wenige waren Chimären, andere konnten weder mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) noch mit ARB-Werkzeugen bekannten 16S- bzw. 23S-rRNS Sequenzen zugeordnet werden. Letztere entsprechen vermutlich unspezifischen PCR-Artefakten, da sie auch auf Proteinebene keinerlei signifikante Ähnlichkeiten zu anderen, bekannten oder hypothetischen Proteinen aufwiesen.

Beim Vergleich der verschiedenen Klondatenbanken (siehe Tabelle 19) konnte eine unterschiedliche Verteilung der acidobakteriellen „subdivisions“ festgestellt werden. Während in den Lysimeterbodenproben (BI-BIV) Vertreter der „subdivisions“ 1 und 3 in großer Anzahl gefunden wurden (siehe Tabelle 19), waren keine „subdivision“ 1 16S-rDNS Klone in den Grünschwaiqe Klondatenbanken zu finden und nur eine (im Vergleich) geringe Anzahl an „subdivision“ 3 16S-rDNS Klone (zwischen 15,9 und 18,9% der analysierten 16S-rDNS Klone in den Grünschwaiqe Klondatenbanken und zwischen 24,0 und 46,3% in den Bayreuthklondatenbanken, siehe Tabelle 19). Mehrere „subdivisions“ konnten nur vereinzelt in den Datenbanken nachgewiesen werden. Klondatenbanken können allerdings erst ab einer bestimmten Größe signifikante Aussagen über die tatsächliche

Bodenprobe	Zhou <i>et al.</i> ¹	Dong <i>et al.</i> ²	Ultra Clean™ Mega Soil DNA Kit ³
BI	n.b.	n.b.	1:10
BII	n.b.	n.b.	1:10
BIII	n.b.	n.b.	1:20
BIV	n.b.	n.b.	1:20
K6-1	1:10	unverdünnt	unverdünnt
K6-2	1:10	unverdünnt	n.b.
K6-3	1:10	unverdünnt	n.b.
K8-1	1:10	unverdünnt	n.b.
K8-2	1:10	unverdünnt	n.b.
K8-3	1:10	1:10	n.b.
K15	1:10	1:10	n.b.

¹ DNS-Extraktion nach Zhou *et al.* [190] (siehe Kapitel 2.4.2)

² DNS-Extraktion nach Dong *et al.* [41] (siehe Kapitel 2.4.3)

³ Bayreuth-Lysimeter-Bodenproben wurden von Mitarbeitern des Teilprojekts Overmann (LMU, München, BIOLOG-Projekt) isoliert (siehe Kapitel 2.4.1)

n.b. = nicht bestimmt, da die entsprechende DNS-Extraktion nicht durchgeführt wurde

Tabelle 18: Verdünnungsfaktor der Ausgangs-DNS von Bodenproben für die Amplifikation in Abhängigkeit der angewendeten DNS-Extraktionsmethoden. Unverdünnt:DNS konnte nach der DNS-Extraktion in der üblichen Menge (siehe Kapitel 2.5) eingesetzt werden, Verdünnung (1:10; 1:20): DNS musste nach der DNS-Extraktion im entsprechenden Verhältnis mit H_2O_{reinst} verdünnt werden, um eine erfolgreiche Amplifikation zu gewährleisten.

„subdivision“	BI	BII	BIII	BIV	K6-1	K6-2	K6-3	K8-1	K8-2	K8-3	K15
1	41,4	44,1	31,7	44,0	-	-	-	-	-	-	-
3	37,9	32,4	46,3	24,0	-	-	10,4	18,9	5,9	14,3	12,5
4	3,5	8,8	12,2	8,0	52,2	60,6	56,3	75,7	64,7	37,1	68,8
5	-	5,9	-	-	-	-	2,1	-	2,9	2,9	-
6	13,8	5,9	9,8	16,0	47,8	36,4	29,2	2,7	23,5	42,9	18,8
10	-	-	-	8,0	-	-	-	-	-	-	-
„13“	-	-	-	-	-	3,0	-	2,7	2,9	2,9	-
Chimären	3,5	2,9	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-

Tabelle 19: 16S- und 23S-rDNS Klone aus unterschiedlichen Böden und ihre Zugehörigkeit zu acidobakteriellen „subdivisions“ in Prozent analysierter Klone

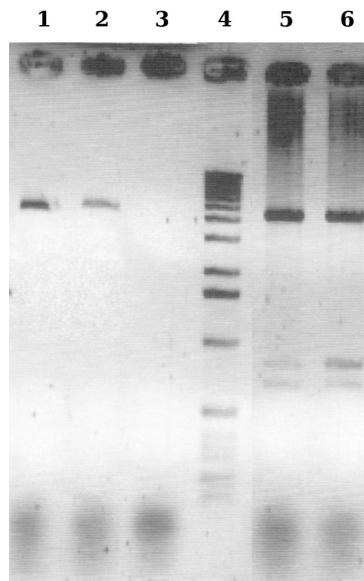


Abbildung 12: Einsatz der Primerkombination 31F_mod und 985R auf die Grünschwaiige Bodenprobe K8-2 (nach Agarosegelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel) mit bzw. ohne Zugabe des PrimerNavigator DNA Amplification Enhancers ((biohelix, Beverly, MA, USA). 1 und 2: mit PrimerNavigator DNA Amplification Enhancer, 3: Negativkontrolle, 4:Längenstandard, 5 und 6: ohne PCR-Enhancer.

Diversität in einer Probe ermöglichen. Deshalb werden oftmals Schätzfunktionen zur Bestimmung der absolute Anzahl an phylogenetischen Einheiten (also der Artenvielfalt) herangezogen, um zu überprüfen, ob eine Klondatenbank eine, für den jeweiligen Zweck, aussagekräftige Größe erreicht hat. Die Methode nach Kemp *et al.* [81] geht davon aus, dass solche Schätzfunktionen für kleine Klondatenbanken keine stabilen Resultate finden können (siehe auch [72]), deshalb werden die Klondatenbanken in Untergruppen unterteilt und die Artenvielfalt wird für jedes Set einzeln berechnet. Anschließend wird verglichen, ob die Schätzungen stabile Werte liefern [80]. Hauptsächlich werden hier die Schätzfunktionen S_{ACE} [30] und S_{CHAO1} [29] verwendet. Am Beispiel der Kurven S_{ACE} und S_{CHAO1} für die Klondatenbank K8-1 ist ersichtlich, dass die nötige Größe nicht erreicht wird. Eine optimale Abdeckung der Biodiversität wäre erreicht, wenn die Kurven sich einem Wert asymptotisch annähern. Abbildung 13 zeigt, dass dies hier nicht der Fall ist.

3.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH)

Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit fluoreszenz-markierten 16S-rRNS gerichteter Oligonukleotidsonden, sollten Vertreter des Phylums *Acidobacteria* im Boden auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Gerade Bodenproben erweisen sich hinsichtlich FISH-Anwendungen als

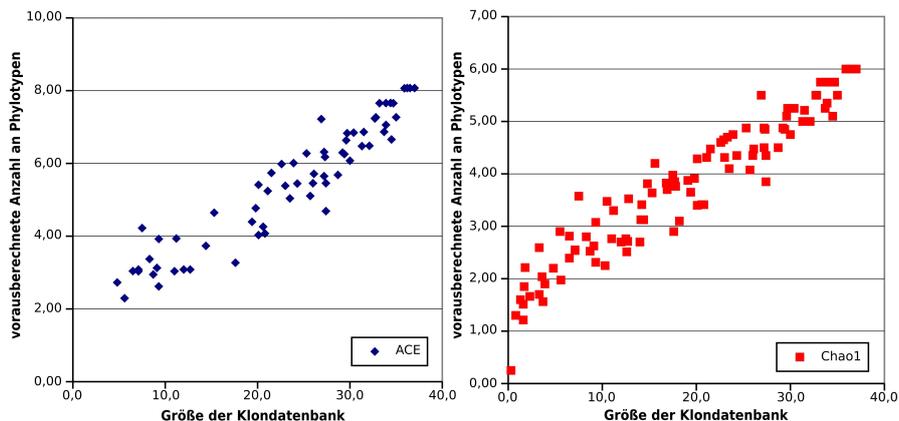


Abbildung 13: Darstellung Kurven der Schätzfunktionen S_{ACE} (in blau) und S_{CHAO1} (in rot) zur Bestimmung der Artenvielfalt für die Klondatenbank K8-1. Eine optimale Abdeckung der Biodiversität wäre erreicht, wenn die Kurven sich einem Wert asymptotisch annähern.

äußerst kompliziert, da die Bakterien oftmals mit autofluoreszierenden Partikeln assoziiert sind und zusätzlich anderes, ebenfalls autofluoreszierendes Störmaterial, wie kleinste Pflanzenreste, in der Probe präsent sind. Ein Entfernen der Partikel ohne Verluste an Bakterienzellen ist auf Grund der Assoziation nur schwer möglich. In den folgenden Kapiteln wird die Entwicklung *Acidobacteria*-spezifischer 16S-rRNS Oligonukleotidsonden, deren Evaluierung sowie die Evaluierung verschiedener Fixierungsmethoden für Böden und zuletzt die Anwendung entwickelter und bekannter Sonden auf die Bodenprobe K8-1 (Grünschwaige Versuchsstation, Freising, D, siehe auch Kapitel 2.2.2) genauer beschrieben. Die Evaluierung *Acidobacteria*-spezifischer 16S-rRNS Oligonukleotidsonden und erste Versuche zur Anwendungen auf die Bodenproben wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt [123].

3.4.1 Konstruktion von 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Da für die Gruppe der Acidobakterien nur wenige evaluierte 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden vorliegen (IRog1, IRog2, OTU43/44.O360 und Hol.1400, siehe Tabelle 28 im Anhang) und diese v.a. die „subdivision“ 6 der *Acidobacteria* (IRog1, IRog2, OTU43/44.O360) bzw. allgemein alle Acidobakterien (Hol.1400) erfassen, mussten zusätzliche Sonden für die einzelnen „subdivisions“ konstruiert und evaluiert werden. Hierzu wurde ein Teil der für den Mikroarray konstruierten Sonden übernommen und unter FISH-Bedingungen neu evaluiert (siehe Tabelle 28). Zusätzlich wurde noch die Zugänglichkeit der 16S-rRNS an der Sondenbindungsstelle, anhand der Zugänglichkeit des 16S-rRNS Gens von *E.coli* [16], die unter Vorbehalt auf die acidobakterielle 16S-rRNS übertragen wurde, überprüft. Sonden mit Zugänglichkeitsklassen niedriger als Klasse

IV wurden nicht verwendet. Es stellte sich heraus, dass einige Sonden, die positive Signale in Mikroarrayhybridisierungen zeigten, keine detektierbaren Signale unter FISH-Bedingungen ergaben (z.B. Acido3.307, [123]). In diesen Fällen wurden neue 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden auf Grundlage aktueller 16S-rDNS Datenbanken konstruiert [123]. Es war möglich, für die „subdivisions“ 1, 2, 3, 4, 6, und 8 des Phylums *Acidobacteria* Oligonukleotidsonden zu entwickeln. Die Sonden erfassen sowohl komplette „subdivisions“ als auch einzelne Untergruppen der verschiedenen acidobakteriellen „subdivisions“. Für die übrigen „subdivisions“ konnten keine Sonden evaluiert werden, da zu diesem Zeitpunkt entweder keine entsprechenden 16S-rDNS Klone zur Verfügung standen oder die entwickelten Sonden keine Signale mit den Zielklonen zeigten. Alle verwendeten Sonden mit der zugehörigen Spezifität sind im Anhang in den Tabellen 27 und 28 aufgeführt.

3.4.2 Evaluierung der 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Da fast alle konstruierten Sonden bisher unkultivierte Acidobakterien erfassten, wurde die Sondenevaluierung mittels Clone-FISH [123, 156] durchgeführt. Hierbei wird die 16S-rDNS-Sequenz, die komplementär zur entwickelten Oligonukleotidsonde ist in einen Vektor ligiert, der einen T7-RNS-Polymerase Promotor trägt. In diesem Fall der pGEM[®]-T Easy Vector. Anschließend wird der Vektor in Zellen transformiert, die eine induzierbare T7-RNS-Polymerase besitzen (hier *E. coli* NovaBlue[®](DE3)). Bei Zugabe von IPTG wird diese exprimiert und führt zur *in vivo* Transkription des Plasmidinserts. Wenn das Insert in der korrekten Leserichtung im Vektor vorliegt, werden somit einzelsträngige rRNS Kopien der zur Sonde komplementären 16S-rDNS Sequenz von der T7-RNS-Polymerase synthetisiert. Durch die Zugabe von Chloramphenikol, das den Abbau von RNS inhibiert [176] und zu einer Erhöhung der Anzahl von Plasmidkopien führt [149], kann die Zielsequenz noch weiter angereichert werden. Im Anschluss an diese Prozedur können die *E. coli* Zellen fixiert und für FISH verwendet werden (siehe Kapitel 2.14). Die hier verwendete Vektor-Zellen-Kombination führte bereits bei Schramm *et al.* [156] zu guten Hybridisierungssignalen mit einer relativen Signalintensität von 80%.

Eine im Rahmen dieses Projektes durchgeführte Diplomarbeit [123] hatte zudem die Aufgabe, diese Methode weiter zu optimieren, mit anderen Methoden zu vergleichen (z.B. mit catFISH, [129]) und anschließend die Sonden zu evaluieren. Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden zu ermitteln, wurde die Hybridisierungseffizienz, d.h. das Verhältnis von Zellen, die ein positives Signal zeigen, zu Zellen, die keine Signale zeigen, durch das manuelle Auszählen der *E. coli*-Zellen zweier Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen bestimmt [123]. Eine Auswertung der Hybridisierungseffizienz mittels semiautomatischer Quantifizierungssoftware, wie z.B. DAIME [36], war aufgrund der Konzentration der Signale an den Zellpolen nicht möglich.

Abbildung 14 zeigt die verschiedenen Protokolle und ihre Hybridisierungseffizienz am Beispiel von Zellen des Klons Xc.43_10 („subdivision“ 2), die mit der „subdivision“ 2-spezifischen Aci-

do2.404 Sonde hybridisiert wurden. Ersichtlich ist, dass mit dem catFISH-Protokoll, welches mit niedrigeren IPTG- und Chloramphenikolkonzentrationen und kürzeren Inkubationszeiten arbeitet [129], im Vergleich zu dem Standardprotokoll [156] nur sehr wenige Zellen ein positives Signal zeigen [123]. Eine Inkubation der Zellen mit Chloramphenikol über Nacht führte zwar zu einer homogeneren Verteilung des Signals innerhalb der Zellen (d.h. keine Konzentration des Signals an den Zellpolen), aber nur noch 12% der Zellen zeigten spezifische Fluoreszenz. Eine auf 3 h bzw. 5 h (im Gegensatz zu einer Stunde im Standardprotokoll) verlängerte Inkubation mit IPTG führte zu gleicher bzw. geringerer Hybridisierungseffizienz verglichen mit dem Standardprotokoll [123]. Zudem konzentrierten sich die Signale wesentlich stärker an den Zellpolen [123]. Durch die Erhöhung der IPTG-Konzentration bei gleichbleibender Inkubationszeit konnte jedoch ein positiver Effekt erzielt werden. Die Hybridisierungseffizienz stieg bei einer Konzentration zwischen 0,5 und 2 mM IPTG an, bis sie ab einer Konzentration von 3 mM IPTG wieder drastisch abnahm (auf unter 10% Hybridisierungseffizienz). Die Signalintensität veränderte sich dabei nicht.

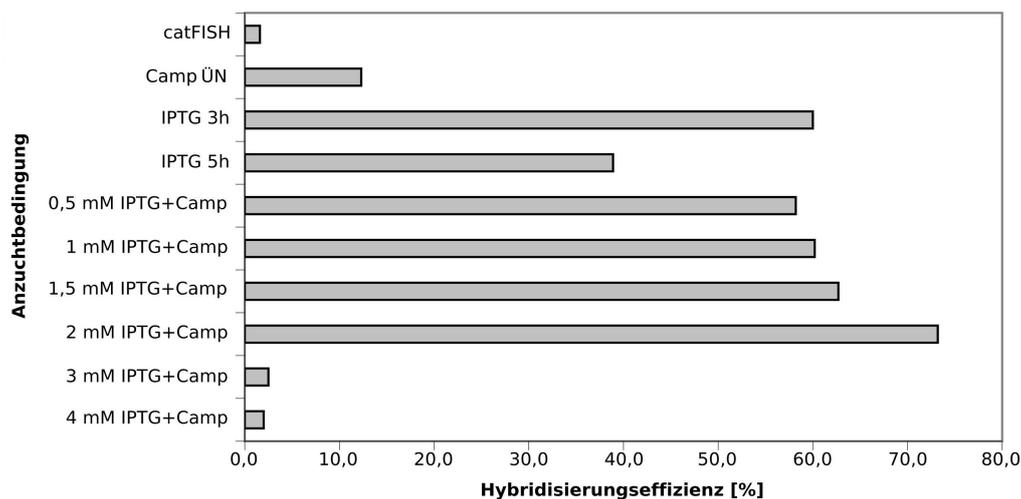


Abbildung 14: Vergleich der Hybridisierungseffizienz nach Vorbereitung der Zellen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen am Beispiel der Zellen des Klons Xc_43_10 („subdivision“ 2), die mit der „subdivision“ 2-spezifischen Acido2.404 Sonde hybridisiert wurden. Die Hybridisierungseffizienz wurde durch das manuelle Auszählen der *E.coli*-Zellen zweier Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen für jedes Anzuchtprotokoll bestimmt. Cat-FISH: catFISH Protokoll nach Ouverney *et al.* [129], Camp: Chloramphenikolbehandlung über Nacht, IPTG 3h: IPTG-Behandlung für 3 h, IPTG 5h: IPTG-Behandlung für 5 h, x mM IPTG + Camp: kombinierte Behandlung mit IPTG und Chloramphenikol, wobei IPTG in den Konzentrationen 0,5, 1, 1,5, 2, 3 und 4 mM zugegeben wurde.

Für andere Parameter wie Zelldichte (OD 0,1-0,4) oder Fixierungsmethode (4% PFA, 1,6% PFA und Ethanolfixierung) konnte kein Einfluss auf die Signalintensität bzw. Hybridisierungseffizienz

nachgewiesen werden [123].

Mittels Formamidreihen von 0-50% (siehe Kapitel 2.14) wurde nun die optimale Formamidkonzentration für die jeweilige Sonde bestimmt [123]. Um die Vergleichbarkeit der Signalintensitäten der einzelnen Formamidreihen zu gewährleisten, wurden die Bildeinstellungen am CLSM für jede Formamidreihe festgelegt und so weit wie möglich für die folgenden übernommen [123]. Fluoreszenzbilder und Durchlichtbilder dieser Hybridisierungen werden hier nicht im einzelnen gezeigt, sie können aber der Diplomarbeit von Nägele [123] entnommen werden.

Wie bereits erwähnt, konnte für die „subdivisions“ 1, 2, 3, 4, 6 und 8 der *Acidobacteria* jeweils mindestens eine Sonde entwickelt werden. Für die „subdivision“ 5 konnte keine Sonde erfolgreich evaluiert werden, da die *in silico* konstruierten Oligonukleotidsonden in *in situ* Hybridisierungen keine Signale mit dem entsprechenden Referenzklon (EC1058, „subdivision“ 5, siehe Tabelle 2) zeigten. Wenn Reinkulturen vorhanden waren, wurden diese ebenfalls mit in die Sondenevaluierung einbezogen. Hier konnte mit den entsprechenden Sonden die übliche Ganzzellfluoreszenz erzielt werden. Weder *Acidobacterium capsulatum* noch *Holophaga foetida* zeigten Autofluoreszenz. *Geothrix fermentans* („subdivision“ 8) zeigte hingegen eine ausgeprägte Autofluoreszenz im Bereich der Wellenlänge Cy3-Farbstoffes, so dass im weiteren Verlauf für die gesamte „subdivision“ 8 nur noch Fluos-markierte Sonden verwendet wurden [123].

Weiterhin wurde die Spezifität ausgewählter Oligonukleotidsonden durch Hybridisierung gegen kultivierte Nicht-*Acidobacteria* Referenzorganismen überprüft (siehe Tabelle 1). Es wurden v.a. Mikroorganismen ausgewählt, die im Boden zu finden sind, da die Sonden hauptsächlich auf Bodenproben angewendet werden sollten. Bei keinem Referenzorganismus konnten Signale mit den neu-entwickelten Oligonukleotiden Sonden detektiert werden [123]. Die Oligonukleotidsonden wurden aber nicht nur auf ihre Interphylumspezifität, sondern auch auf die Intrapylumspezifität getestet. Hierzu wurden die ausgewählten Sonden gegen Zellen aller verfügbaren 16S-rDNS Klone, sowie die drei verfügbaren Reinkulturen (*A. capsulatum*, *H. foetida*, *G. fermentans*) hybridisiert [123]. Es konnte gezeigt werden, dass die Sonden für ihre jeweiligen Ziel-Klone spezifisch sind und keine Signale mit Nicht-Ziel-Zellen auftraten. Der optimale Formamidgehalt für die jeweilige Sonde kann Tabelle 28 im Anhang entnommen werden.

3.4.3 Aufbereitung von Bodenproben

Die Aufbereitung von Bodenproben für FISH-Experimente ist aufgrund verschiedenster Faktoren sehr diffizil. Oft sind die Bakterienzellen stark mit Kleinstpartikeln assoziiert (z.B. mittels Exopolysacchariden), da diese sowohl einen gewissen Schutz vor Fressfeinden bieten und zudem Nahrung bereitstellen können [26]. Für eine Auftrennung der Bakterienzellen von den Partikeln muss also zuerst die Assoziation mit den Partikeln unterbrochen werden und anschließend eine Abtrennung der Partikel von den Zellen erfolgen, da sowohl diverse Partikel als auch kleine Pflanzenreste hohe Autofluoreszenzen zeigen, die eine Detektion spezifischer Signale in *in situ* Hybridisierungen

erschweren würden. Bereits im Laufe einer Diplomarbeit [123] wurden einige Protokolle zur Aufbereitung von Bodenproben getestet, u.a. Methoden nach McDonald *et al.* [118], Hahn *et al.* [65] sowie unterschiedliche mechanische Vorbehandlungen, wie Sieben, Mörsern und Ultraschall. Das Prinzip der Methode nach Hahn *et al.* [65] basiert auf dem Loslösen der Bakterienzellen von Bodenpartikeln durch die Behandlung der Probe mit Natriumpyrophosphat-Lösung, während bei McDonald *et al.* [118] Dextran, PEG, Natriumdesoxycholat und Natriumiminodiacetat zum Einsatz kommen (siehe Kapitel 2.15.1). Im Anschluss wurden noch die Anwendbarkeit von zwei weiteren Protokolle überprüft. Die Methode von Lunau *et al.* [111] wurde für das Auszählen von Bakterienzellen aus Bodenproben nach einer SybrGreenI-Färbung entwickelt, aber bisher, soweit bekannt, noch nicht als Grundlage für spezifische FISH-Experimente (siehe Kapitel 2.15.2). Das Loslösen der Zellen von Bodenpartikeln soll hier durch eine Behandlung mit Methanol in Kombination mit Ultraschall gewährleistet werden. Auch bei der letzten Methode kommt im Vorfeld ein Puffer zum Einsatz, der die Assoziation der Bakterienzellen mit den Bodenpartikeln zerstört. Anschließend wird die entstehende Suspension noch durch Dichtegradientenzentrifugation mit Nycodenz[®] von Bodenpartikeln befreit (siehe Kapitel 2.15.3). Die Zellen können danach entweder direkt auf den Objektträger oder auf einen Filter aufgebracht und danach mit den entsprechenden Sonden hybridisiert werden.

Tabelle 20 zeigt die Effizienz der jeweiligen Methode, d.h. das Loslösen der Bakterienzellen von den Bodenpartikeln, die Menge an Detritus, die noch in der Probe verbleibt sowie die Signalintensität nach einer FISH mit dem Oligonukleotidsondenmix EUB338-Mix (erfasst alle bekannten *Bacteria*, siehe auch Tabelle 27 im Anhang). Alle Methoden wurden auf die Grünschwaige-Probe K8-1 (siehe Kapitel 2.2.2) angewandt. Es konnte festgestellt werden, dass die Methoden nach McDonald *et al.* [118] bzw. nach Lunau *et al.* [111] die besten Resultate lieferten. Bei Anwendung dieser beiden Protokolle waren viele Zellen von den Bodenpartikeln abgetrennt und im Vergleich mit den anderen Methoden die Bodenpartikel weniger verklumpt und geringer in der Anzahl. Die Signalintensität mit der *Bacteria*-Sonde war in beiden Fällen sehr gut. Die Methanolmethode [111] hat gegenüber der Methode nach McDonald *et al.* [118] den entscheidenden Vorteil, zeitlich wesentlich weniger aufwendig zu sein (siehe auch Tabelle 20).

Am schlechtesten schnitt die mechanische Vorbehandlung ab. Hier war es kaum möglich, freie Zellen zu detektieren. Eine längere Ultraschallbehandlung [123] hatte zur Folge, dass nur noch Zellfragmente detektiert werden konnten. Die Partikelanzahl war ebenfalls sehr hoch und machte eine Unterscheidung zwischen bakterieller Zelle und Bodenpartikel so gut wie unmöglich. Auch die Methode nach Hahn *et al.* [65] resultierte in zu wenigen freien Zellen. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Bodenprobe mit Nycodenz[®] (siehe Kapitel 2.15.3) und anschließendem Aufbringen der Zellsuspension auf einen Filter zu einer relativ hohen Anzahl freier Zellen und wenigen Partikeln. Allerdings erschwert der Filter aufgrund seiner Struktur die Detektion und v.a. die Bildaufnahme. Zudem ist eine Auswertung der DAPI-Färbung wegen der Autofluoreszenz des Filters in genau diesem Wellenlängenbereich nicht möglich (siehe Abbildung 15). Wenn die Probe nach der Behandlung mit Nycodenz[®] in Lösung verblieb und nicht auf einen Filter appliziert

Method	freie Zellzahl	Partikelanzahl	Signalintensität
McDonald <i>et al.</i> ¹	++	+/-	+++
Hahn <i>et al.</i> ²	-	++	n.d.
Mechanisch (Sieben, Mörsern, Ultraschall) ³	--	++	n.d.
Lunau <i>et al.</i> ⁴	++	-	+++
Nycodenz [®] auf Filter ⁵	++	+/-	++
Nycodenz [®] in Lösung ⁵	+	+/-	++

¹ Bodenaufbereitung nach McDonald *et al.* ([118] siehe Kapitel 2.15.1)

² Bodenaufbereitung nach Hahn *et al.* ([65] näheres siehe auch [123])

³ mechanische Bodenaufbereitung nach Nägele [123]

⁴ Bodenaufbereitung nach Lunau *et al.* ([111] siehe Kapitel 2.15.2)

⁵ Bodenaufbereitung mit Nycodenz[®] (siehe Kapitel 2.15.3)

Tabelle 20: Bodenprobenaufbereitung für FISH. Verschiedene Protokolle wurden angewandt und hier eingeteilt nach der Effizienz mit der Zellen von Bodenpartikeln gelöst wurden (=freie Zellzahl), der Menge an Detritus, die nach der Behandlung noch vorhanden ist (= Partikelanzahl) sowie der Signalintensität nach einer Hybridisierung mit dem 16S-rRNS Oligonukleotidsondenmix EUB338-Mix zur Detektion von *Bacteria* (=Signalintensität). +++ = hohe Anzahl freier Zellen oder hohe Anzahl von Partikeln oder sehr gute Signalintensität, ++ = relativ viele freie Zellen oder relativ hohe Anzahl von Partikeln oder gute Signalintensität, + = niedrige Anzahl von Zellen oder niedrige Anzahl von Partikeln oder schwache Signalintensität, - = kaum freie Zellen oder kaum Partikel detektierbar oder kaum Signal detektierbar, -- = keine freien Zellen vorhanden oder keine Partikel sichtbar oder kein Signal detektierbar, n.d. = nicht definiert.

wurde, konnten insgesamt nur wenige freie Zellen detektiert werden. Auch durch eine Verdopplung des Auftragsvolumens der Zellsuspension auf den Objektträger konnte keine Verbesserung erzielt werden.

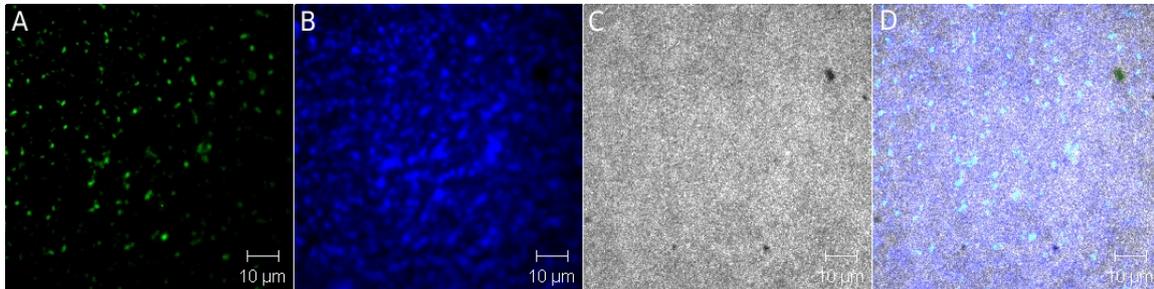


Abbildung 15: Hybridisierung der Bodenprobe Grünschaige K8-1 nach Vorbereitung mit dem Nycodenz[®] Protokoll mit dem EUB338-Sondenmix. Die Signale einzelner Zellen sind zu erkennen. Eine Verifizierung der Signale mittels DAPI oder Durchlichtaufnahme ist auf Grund der Filterstruktur jedoch nicht möglich. (A) Fluoreszenzaufnahme Fluos, (B) Fluoreszenzaufnahme DAPI, (C) Durchlichtaufnahme, (D) Übereinanderlagerung der Abbildungen A, B und C

3.4.4 FISH mit Zellen der Umweltprobe Grünschaige K8-1

3.4.4.1 FISH mit *Acidobacteria*-spezifischen 16S-rRNS Oligonukleotidsonden

Um die Authentizität der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde bei jeder Hybridisierung stets eine *Acidobacteria*-spezifische 16S-rRNS Oligonukleotidsonde gemeinsam mit dem EUB338-Sondenmix (siehe Tabellen 27 und 28 im Anhang) eingesetzt. Nur Signale einer *Acidobacteria*-Sonde, die gleichzeitig mit der *Bacteria*-Sonde auftraten, wurden als spezifisch bewertet. Eine zusätzliche DAPI-Färbung (4',6'-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid) diente als weitere Kontrolle, um hybridisierte Zellen als solche zu identifizieren (siehe Kapitel 2.14). Als Negativkontrolle wurde immer die Bodenprobe ohne fluoreszenz-markierte Sonden mitgeführt. Für die Hybridisierungen wurden die Sonden Acido1_112, Acido1_300A, Acido2_404, Acido3_297, Acido4_193, Acido4_329, IRog1, Gtx_1239 sowie die allgemeine *Acidobacteria*-Sonde Hol_1400 verwendet (eine Liste der Sonden ist in Tabelle 28 im Anhang zu finden). Wie schon im vorherigen Kapitel erwähnt ist die Detektion von Bakterienzellen im Boden wegen der hohen Partikelanzahl und Autofluoreszenz stark erschwert. Allgemein kann gesagt werden, dass in der Grünschaige Probe K8-1 nur sehr wenige Acidobakterienzellen nachgewiesen werden konnten. Auf Grund der geringen beobachteten Anzahl acidobakterieller Zellen in der Probe konnten oftmals Zielzellen, die bereits nachgewiesen wurden, in Parallelversuchen nicht wieder detektiert werden. Eine mangelhafte Detektion von Zellen durch z.B. ungenügende Durchlässigkeit der Zellen für fluoreszenz-markierte Sonden

kann ausgeschlossen werden, da das EUB338-Mix-Signal zum größten Teil sehr stark sichtbar war. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen positive Signale verschiedener *Acidobacteria*-Sonden im Grünschwaige-Boden K8-1. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Lysozym (10 mg/ml) erbrachte weder stärkere noch zahlreichere Signale von acidobakteriellen 16S-rRNS Oligonukleotidsonden. Die Morphologie der detektierten *Acidobacteria*-Zellen war verschiedenartig und reichte von einzelnen Kokken über Diplokokken und Kokken-Tetraden bis hin zu kurzen Stäbchen.

3.4.4.2 FISH mit Phylum-spezifischen 16S-rRNS Oligonukleotidsonden

Um Hinweise zu erhalten, ob die geringe Anzahl detektierter Acidobakterienzellen auf die verwendete Bodenaufbereitungsmethode zurückzuführen ist, wurden neben *Acidobacteria*-spezifischen Sonden weitere Phylum-spezifische Sonden eingesetzt (Sondenliste siehe Tabelle 27). Mit diesen Sonden sollten die am häufigsten im Boden vorkommenden *Archaea* und bakteriellen Phyla, u.a. *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Cytophaga*, *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- und *Delta*-), *Firmicutes* und *Actinobacteria* (siehe auch [131]) erfasst werden. Für diese Hybridisierungen wurde die nach Lunau *et al.* [111] vorbereitete K8-1 Bodenprobe kurz vor der eigentlichen Hybridisierung noch mit Lysozym (10 mg/ml) vorbehandelt und anschließend bei den entsprechenden Formamidkonzentration hybridisiert. Es wurde immer der EUB338-Mix (siehe Tabelle 27) und eine Negativkontrolle (ohne Sonden) mitgeführt. Zusätzlich wurde noch mit DAPI gefärbt, um eine einwandfreie Detektion zu gewährleisten (siehe Kapitel 2.14).

Von den untersuchten Gruppen konnten *Archaea*, *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, sowie *Firmicutes* und *Actinobacteria* nachgewiesen werden. Vor allem Alphaproteobakterien und Actinobakterien waren sehr stark in der Bodenprobe K8-1 vertreten (siehe auch Abbildungen 18 und 19). Es konnte somit gezeigt werden, dass verschiedene bakterielle Phyla, unabhängig von unterschiedlichen Zellwandmerkmalen (z.B. Gram-positiv, Gram-negativ), in großer Anzahl in der untersuchten Bodenprobe vorhanden waren. Die geringe Anzahl detektierbarer, acidobakterieller Zellen ist also vermutlich nicht auf die Fixierungsmethode zurückzuführen.

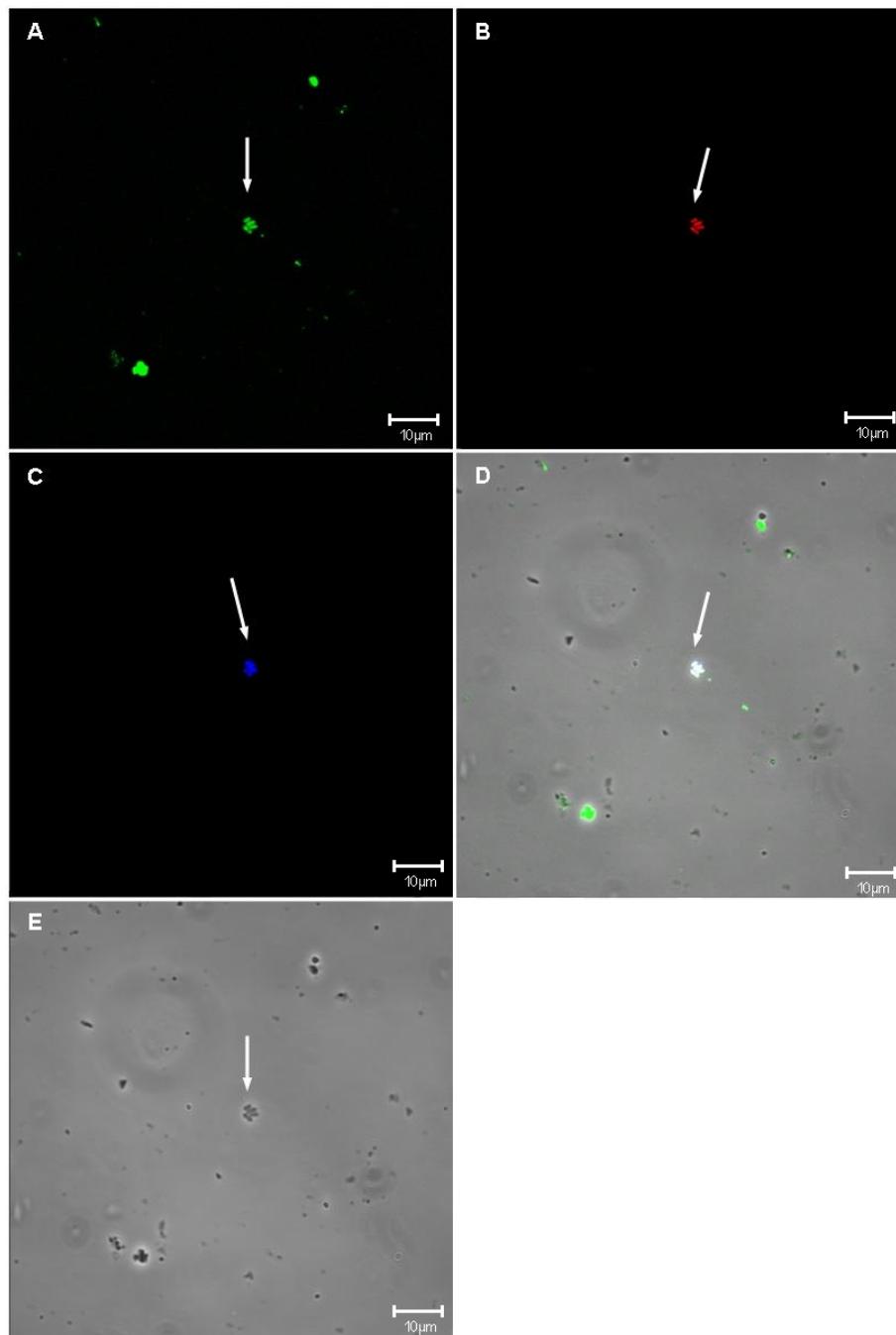


Abbildung 16: *In situ* Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Fluos-markierten Sonde Acido1_112 („subdivision“ 1) und dem Cy3-markierten EUB-Mix, sowie DAPI-Färbung bei einer FA-Konzentration von 10%. (A) Fluoreszenzaufnahme Fluos, (B) Fluoreszenzaufnahme Cy3, (C) Fluoreszenzaufnahme DAPI, (D) Übereinanderlagerung der Abbildungen A, B, C und E, (E) Durchlichtaufnahme

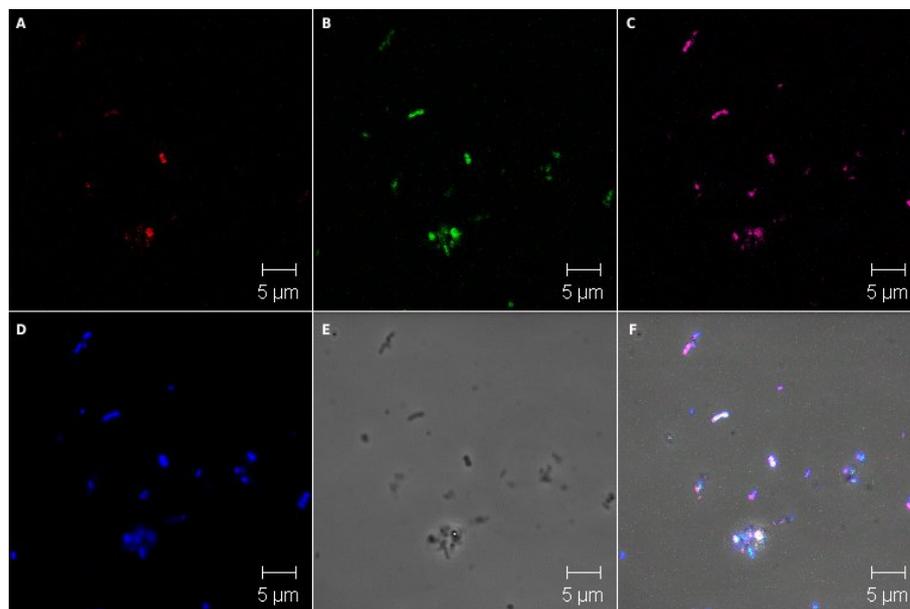


Abbildung 17: *In situ* Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Cy3-markierten Sonde IRog1 („subdivision“ 6), der Fluos-markierten Sonde Hol_1400 und dem Cy5-markierten EUB-Mix, sowie DAPI-Färbung bei einer FA-Konzentration von 20%. (A) Fluoreszenzaufnahme Cy3, (B) Fluoreszenzaufnahme Fluos, (C) Fluoreszenzaufnahme Cy5, (D) Fluoreszenzaufnahme DAPI, (E) Durchlichtaufnahme, (F) Übereinanderlagerung der Abbildungen A, B, C, D und E

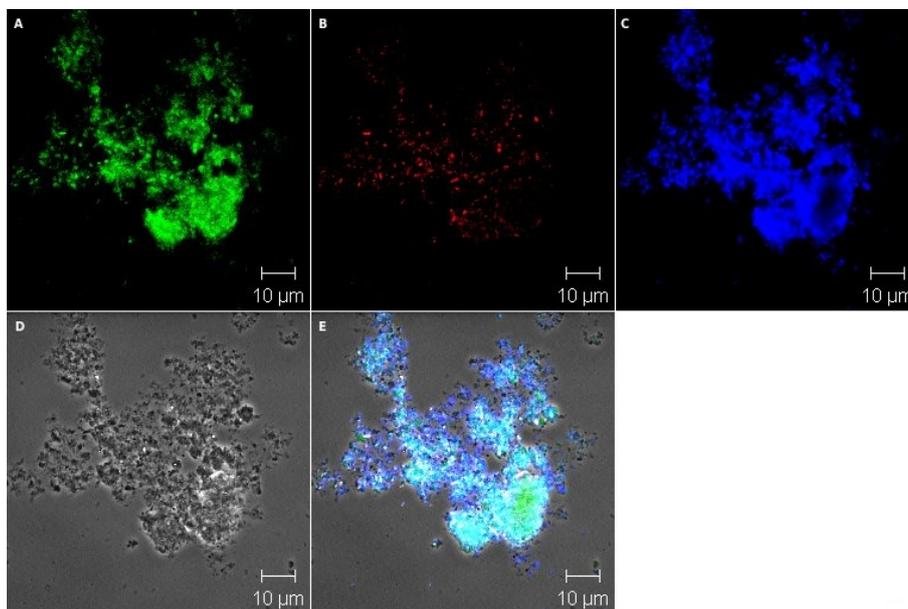


Abbildung 18: *In situ* Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Cy3-markierten Sonde Alf1b (*Alphaproteobacteria*, dem Fluos-markierten EUB-Mix, sowie DAPI-Färbung bei einer FA-Konzentration von 20%). (A) Fluoreszenzaufnahme Fluos, (B) Fluoreszenzaufnahme Cy3, (C) Fluoreszenzaufnahme DAPI, (D) Durchlichtaufnahme, (E) Übereinanderlagerung der Abbildungen A, B, C, und D

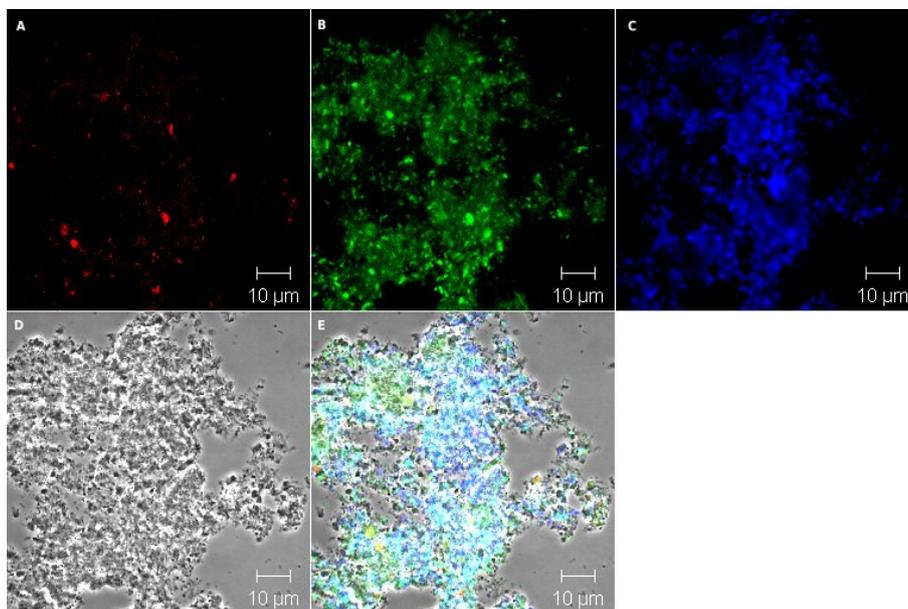


Abbildung 19: *In situ* Hybridisierung der Bodenprobe K8-1 mit der Cy3-markierten Sonde HGC69a (*Actinobacteria*), dem Fluos-markierten EUB-Mix, sowie DAPI-Färbung bei einer FA-Konzentration von 25%. (A) Fluoreszenzaufnahme Cy3, (B) Fluoreszenzaufnahme Fluos, (C) Fluoreszenzaufnahme DAPI, (D) Durchlichtaufnahme, (E) Übereinanderlagerung der Abbildungen A, B, C und D

3.5 Konstruktion und Anwendung eines 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Differenzierung von Vertretern des Phylums *Acidobacteria*

Mittels DNS-Mikroarrays können in einem einzigen Experiment viele verschiedene Mikroorganismen parallel nachgewiesen werden, unter der Voraussetzung, dass entsprechende Sequenzdaten zur Generierung spezifischer Sonden zur Verfügung stehen. Der Nachweis richtet sich dabei gezielt auf Abschnitte solcher Gene, welche die phylogenetische Identifizierung der verschiedenen Spezies möglich machen und entsprechend ihre Diversität besonders deutlich widerspiegeln. Das 16S-rRNS Gen ist das bislang am meisten untersuchte Gen für phylogenetische Analysen und zur Detektion von Bakterien. Es hat den Vorteil, dass es in allen lebenden Organismen vorkommt und sowohl relativ stark sequenzkonservierte Bereiche (Konstruktion Gruppen-spezifischer Sonden/Primer) zeigt als auch hochvariable (Konstruktion Gattung-spezifischer Sonden/Primer). Der Wissensstand im Hinblick auf rRNS-Sequenzen wird laufend erweitert, aber bis jetzt ist vermutlich nur ein Bruchteil der vorkommenden Sequenzen in den Datenbanken erfasst. Deshalb birgt die Konstruktion von nur einer Sonde pro Organismus/Gruppe ein nicht zu vernachlässigendes Risiko von Fehlidentifizierungen. Das Mehrfachsondenkonzept [15] findet darum häufig Anwendung bei der Differenzierung komplexer Bakterienpopulationen. Dabei erfolgt der zuverlässige Nachweis einer Spezies meist nach einem hierarchischen Prinzip über mehrere Sonden, die Spezies-, Gruppen- oder Gattung-spezifisch an verschiedenen Positionen des Zielgens lokalisiert sind. Ein Fehlidentifizierungsrisiko besteht bei der gleichzeitigen Einbeziehung mehrerer unabhängiger Zielstellen oder Moleküle kaum mehr.

Da die phylogenetische Diversität der *Acidobacteria* in etwa der der Proteobakterien entspricht [71], konzentrierte sich die Mikroarrayentwicklung vorerst auf die Identifizierung der einzelnen „subdivisions“ (1-11, [71, 193]) der Acidobakterien. Zusätzlich wurden noch zwei weitere „subdivisions“ „12“ und „13“ vorläufig festgelegt, die sich in 16S-rRNS Maximum Likelihood Bäumen deutlich von den anderen „subdivisions“ abgrenzen ließen. Später wurden noch zusätzliche Klon-spezifische 16S-rDNS-Sonden konstruiert und evaluiert.

Der „subdivision“-spezifische Oligonukleotidmikroarray umfasst momentan 53 SONDENSEQUENZEN, die unterschiedliche Bereiche des 16S-rRNS Gens erfassen und nach dem Mehrfachsondenkonzept entworfen wurden. Somit ist eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen „subdivisions“ durch charakteristische Hybridisierungsmuster für die mit semispezifischen Primern erhaltenen 16S-rDNS Genamplifikate möglich.

3.5.1 Konstruktion von *Acidobacteria*-spezifischen 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Auf Grundlage von bereits veröffentlichten 16S-rDNS-Klonsequenzen aus Genbanken wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit 137 16S-rDNS Oligonukleotidsonden konstruiert, die unterschiedliche „subdivisions“ der Acidobakterien erfassen sollten. Die *in silico* Konstruktion der

Sonden erfolgte wie unter Kapitel 2.13 beschrieben mittels des ARB-Software Paketes (ARB PROBE_DESIGN und ARB PROBE_MATCH). Zusätzlich wurden bereits publizierte *Acidobacteria*-spezifische Sonden [60, 77, 107, 192] mit dem aktuellen 16S-rRNS Datensatz verglichen, um ihre Spezifität zu überprüfen. Basierend auf dieser Analyse wurden die Sonden Hol_1400, IRog1, IRog2, Rog102, OTU43/44_O360 sowie 1078_3 in den Mikroarray aufgenommen und zusammen mit den neu-konstruierten Sonden evaluiert. Wie bereits erwähnt wurde das Mehrfachsondenkonzept nach Behr *et al.* [15] bei der Sondenentwicklung beachtet, so dass mehrere Sonden dieselbe „subdivision“ abdecken (siehe Abbildung 20). Zudem wurde darauf geachtet, dass die Sonden einen GC-Gehalt von mindestens 50%, eine Länge von 18-20 Nukleotiden (ohne den polyT-Spacer) und möglichst viele zentral-gelegene Basenfehlpaarungen zu Sequenzen von Nichtziel-Organismen aufwiesen. Der so entstandene SONDENSATZ deckt fast alle bisher bekannten Acidobakterien ab. In den Tabellen 30 bis 32 im Anhang ist eine Übersicht der entwickelten Sonden dargestellt, die SONDENNAMEN, Spezifität und Sequenz der Sonde sowie die Position auf dem Mikroarray enthalten.

3.5.2 Evaluierung von *Acidobacteria*-spezifischen 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Um die optimalen Hybridisierungsparameter für den Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp zu ermitteln, wurde der Großteil der Sonden hinsichtlich ihrer Signalintensität und Spezifität überprüft. In den nächsten Abschnitten wird diese SONDENEVALUIERUNG in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie Formamidgehalt, Länge der markierten PCR-Fragmente und Menge an markiertem PCR-Produkt, mit oder ohne unspezifische SONDENVERLÄNGERUNG (polyT-Spacer), verschiedenen Probenvorbereitungsmethoden und unterschiedlichen Hybridisierungspuffervolumina (Umweltproben) erläutert.

3.5.2.1 Unspezifische Verlängerung und Aminomodifikation der Oligonukleotidsonden

Bereits 2002 konnte von Behr [14] in Mikrotiterplatten nachgewiesen werden, dass die Verlängerung der Sonde einen Einfluss auf die Signalstärke haben kann: durch eine unspezifische Addition von Thyminen an die Sonde (polyT-Spacer) konnte ein stärkeres Signal derselben beobachtet werden. Man nimmt an, dass die Zugänglichkeit der verlängerten Sonde zu ihrer Zielregion im PCR-Produkt damit besser gewährleistet ist und deshalb höhere Signalintensitäten auftreten. Die Aminomodifikation am 5'-Ende der Sonde wiederum sorgt für eine kovalente Bindung der Sonde an den mit Aldehydgruppen beschichteten Glasobjektträger und verringert damit das Auswaschen der Sonde durch die verschiedenen Hybridisierungsschritte. Die hier verwendeten GAPS II Coated Glasobjektträger (Corning® Incorporated, NY USA) sind mit Gamma-Aminopropylsilan



Abbildung 20: Maximum Likelihood Baum der „subdivision“ 4. Die 16S-rDNS Oligonukleotidsonden und ihre Zielsequenzen sind farbig voneinander abgegrenzt. Die Sondensequenzen sind in der Tabelle 30 im Anhang aufgelistet. Die Skala entspricht 10% Nukleotiddifferenz, repräsentiert durch die Astlänge des Baumes.

beschichtet, so dass negativ-geladene Phosphatgruppen der DNS kovalent binden können. Es könnten also unmodifizierte Oligonukleotidsonden für den Mikroarray eingesetzt werden. Der Nachteil wäre eine verringerte Zugänglichkeit der Sonden (und damit vermutlich eine geringere Signalintensität) für die markierten DNS-Fragmente. Da die unmodifizierten Sonden jedoch deutlich günstiger zu beziehen sind (ca. 75% Kostenersparnis) sollte sie mit modifizierten Oligonukleotidsonden verglichen werden. Hierzu wurden drei verschiedene Sonden betrachtet: IRog1, Acido1.300A und Hol.1400 (siehe Tabelle 30 im Anhang). In der Abbildung 21 ist jeweils die Hybridisierung der modifizierten Sonde (polyT-Spacer, Aminomodifikation, $50\mu\text{M}$, gelöst in 50% DMSO), der unmodifizierten Sonde in Wasser gelöst ($50\mu\text{M}$) sowie der unmodifizierten Sonde in 50% DMSO gelöst ($50\mu\text{M}$) gegen ein komplementäres 16S-rDNS Referenz-PCR-Fragment dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass mit der modifizierten Sonde in jedem Fall die höchste Signalintensität erhalten wurde. Im Vergleich mit den unmodifizierten in Wasser gelösten Oligonukleotidsonden konnten leicht erhöhte Signalintensitäten für die in 50% DMSO gelöste, unmodifizierte Sonde festgestellt werden. Dies ist vermutlich auf die Inhibierung der Sekundärstrukturbildung durch das zugegebene DMSO zurückzuführen. Eine Verminderung der Signalintensität durch die fehlende Modifizierung könnte, bei gleichzeitiger Kostenreduzierung, eventuell in Kauf genommen werden, wenn die Signale noch Werte über dem Schwellenwert, ab dem das Signal einer Sonde als positiv bewertet wird (siehe Kapitel 3.5.2.4), zeigen würden. Im Fall der Sonde Hol.1400 ist dies jedoch nicht der Fall. Die Werte liegen deutlich unter dem Schwellenwert (siehe Kapitel 3.5.2.4) von 0,5 (siehe Abbildung 21). Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich modifizierte Oligonukleotidsonden verwendet. Die gewünschte höhere Sensibilität des Mikroarrays im Hinblick auf die Umweltproben spielte hier ebenfalls eine Rolle (siehe Kapitel 3.5.4).

3.5.2.2 Signalabschwächung

Neben der kurzen Hybridisierungsdauer von 7-15 min ist ein weiterer entscheidender Vorteil des hier verwendeten DNS-Biosensor-Prototypen die Wiederverwendbarkeit der Chips. Ein DNS-Chip kann unter den entsprechenden Bedingungen für mehrere aufeinanderfolgende, unterschiedliche Hybridisierungen genutzt werden. Durch alkalische Denaturierung können die markierten, gebundenen PCR-Fragmente wieder von den Sonden gelöst werden und der DNS-Chip mittels einer Waschlösung (SSC- und SDS-haltig) wieder regeneriert werden. Die silanbeschichtete Oberfläche des DNS-Chip wird jedoch abhängig von der Konzentration der Base in der Denaturierungslösung und der Anzahl an Denaturierungsschritten angegriffen. Damit werden, im Laufe mehrerer Hybridisierungen, immer mehr Sondenmoleküle abgewaschen, woraus eine Signalabschwächung resultiert. Es sollte nun festgestellt werden, wieviele Hybridisierungen aufeinanderfolgen können und noch eine ausreichende Signalintensität erreicht wird. Zu diesem Zweck wurde ein 12x8-Sondenarray auf einen DNS-Chip immobilisiert (siehe Kapitel 2.11.3) und mit der Positivkontrolle (komplementär zum polyT-Spacer) 20 Mal direkt hintereinander hybridisiert (siehe Kapitel 2.11.6). Zwischen

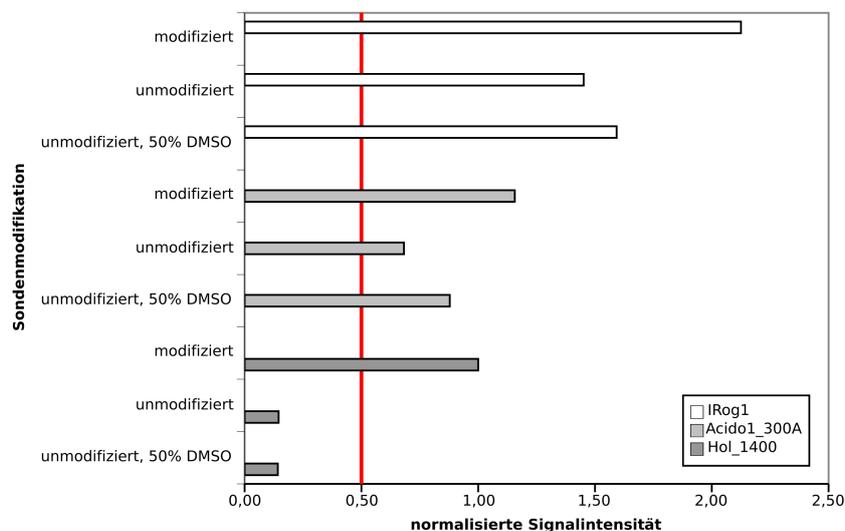


Abbildung 21: Vergleich von Hybridisierungen mit modifizierten Oligonukleotidsonden und unmodifizierten Oligonukleotidsonden. Drei Sonden wurden hinsichtlich ihrer Signalintensität verglichen, die mit Modifikationen (polyT-Spacer und Aminomodifikation am 5'-Ende der Sonde), ohne Modifikationen in Wasser gelöst sowie ohne Modifikation aber in 50% DMSO gelöst erzielt wurden. Die rote Linie markiert den Schwellenwert, ab dem eine Sonde positiv bewertet wurde.

den einzelnen Hybridisierungen wurde alkalisch denaturiert, so dass sich die Positivkontrolle von den Sonden löste, anschließend der Chip regeneriert und erneut mit der Positivkontrolle hybridisiert (siehe auch Kapitel 2.11.6). In Abbildung 22 ist exemplarisch der Mittelwert der Signalwerte von fünf zufällig ausgewählten Spots des Arrays für die jeweilige Hybridisierung aufgetragen. Zur Quantifizierung des Signalverlustes über $n = 20$ Messungen wurde durch diese Mittelwerte eine Trendlinie nach der Funktion $f(x) = a \cdot b^x$ gelegt. Die Trendlinie wurde mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate an die Messwerte angepasst, wobei sich ein Wert von 0,97 für b ergab. Pro Hybridisierung verliert man also ca. 3% Signalintensität, dies entspricht nach 20 Hybridisierungen noch etwa 60% der ursprünglichen Signalintensität.

3.5.2.3 Korrekturfaktor

Um die Inhomogenität des evaneszenten Feldes auszugleichen (siehe Abbildung 23), wurden für jede Hybridisierung spezifische Korrekturfaktoren berechnet. Dazu wurde vor der eigentlichen Hybridisierung, eine Hybridisierung mit einer Cy5-markierte Sonde durchgeführt, die komplementär zum polyT-Spacer ist, der am 5'-Ende jeder Sonde lokalisiert ist. Gleichzeitig dient diese Hybridisierung der Überprüfung der Spothomogenität und der korrekten Sondenimmobilisierung.

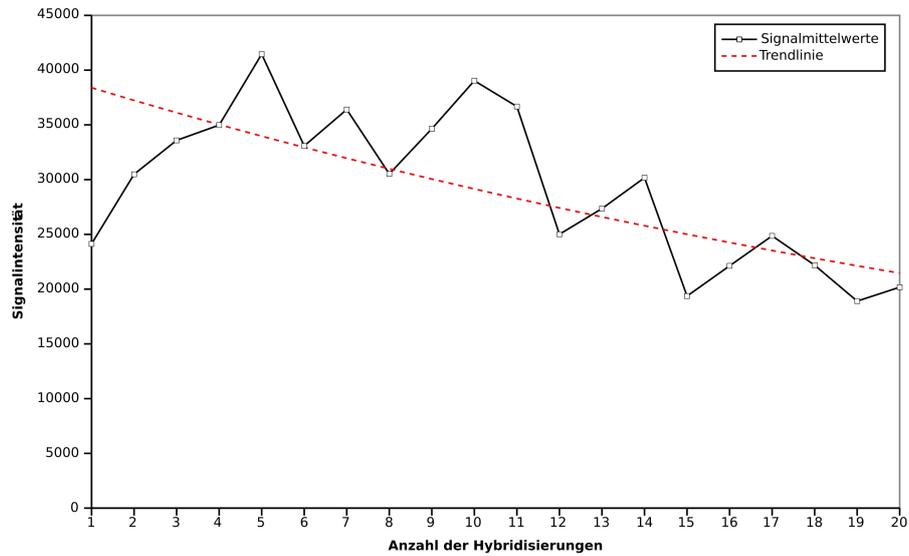


Abbildung 22: Darstellung der Signalabschwächung über $n = 20$ Hybridisierungen auf dem selben DNS-Chip. In schwarz ist der Mittelwert aus fünf, zufällig ausgewählten Sondenspots eines 12×8 Sondenarrays gezeigt. Die Trendlinie dieser Kurve ist rotgepunktet.

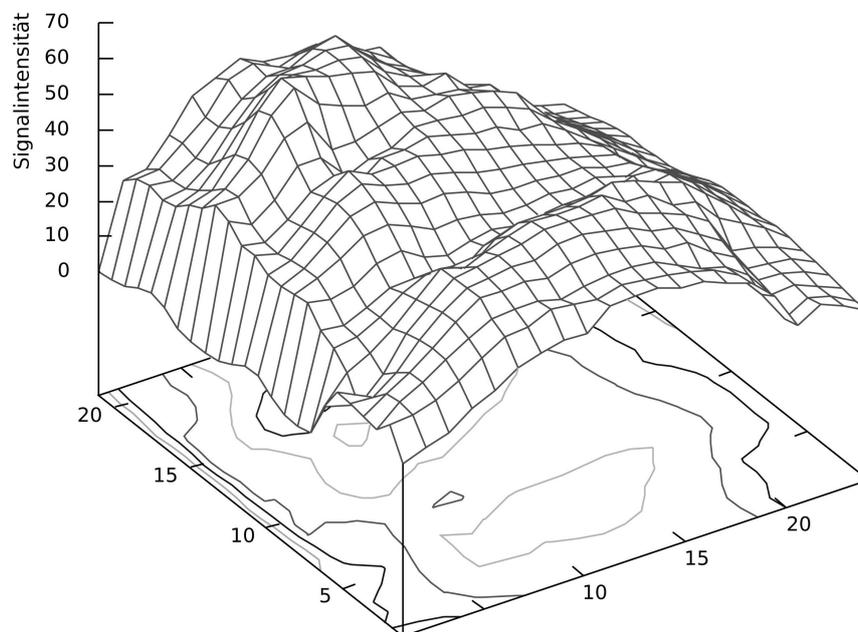


Abbildung 23: Darstellung der Signalintensität einzelner Sondenspots im evaneszenten Feld abhängig von der Position auf dem DNS-Chip.

Aus den bei dieser Hybridisierung erhaltenen Signalintensitäten (siehe auch Kapitel 2.11.7) wurden anschließend Korrekturfaktoren für die einzelnen Sondenspots bestimmt. Zur Berechnung des Korrekturfaktors wurde zuerst der Mittelwert der höchsten vier Signalintensitäten bestimmt und anschließend alle Signalintensitäten auf diesen Mittelwert normiert. Die hintergrundkorrigierten Signalintensitäten der spezifischen Hybridisierung mit markierten PCR-Fragmenten wurden dann mit den so ermittelten Korrekturfaktoren multipliziert und damit die Inhomogenität des evaneszenten Feldes rechnerisch ausgeglichen.

Um die Zuverlässigkeit der Korrekturfaktoren zu verifizieren, wurde ähnlich wie bei der Bestimmung der Signalabschwächung (siehe Kapitel 3.5.2.2), ein 12x4 Mikroarray mit der Positivkontrolle hybridisiert und die Standardabweichungen der korrigierten mit denen der unkorrigierten Werten verglichen. Da die Standardabweichung für die korrigierten Werte (0,13), d.h. die Variabilität zwischen den hohen und den niedrigen Signalintensitäten, deutlich geringer als für unkorrigierte Werte (0,23) ist, konnte gezeigt werden, dass die Einführung des Korrekturfaktors die Inhomogenität des evaneszenten Feldes zumindest teilweise ausgleichen kann.

3.5.2.4 Schwellenwert

Die Quantifizierung der einzelnen Signalspots anhand des Steigungsprofils der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programms *dnachip* (ICB, Münster, D). Es wurden immer die bereits hintergrundkorrigierten Werte der maximalen Intensität, d.h. pro Sondenspot der Mittelwert der vier Pixel mit der höchsten Signalintensität, verwendet. Der Mittelwert wurde gebildet, um keine Ausreißer in die Berechnungen mit einzubeziehen (ICB, persönliche Mitteilung). Um die Inhomogenität des evaneszenten Feldes aufgrund der optischen Anordnung zu kompensieren (siehe Abbildung 23), wurde wie in Kapitel 3.5.2.3 beschrieben ein Korrekturfaktor bestimmt und auf die Signalintensitäten der eigentlichen Hybridisierung angewendet. Anschließend wurden diese Werte mittels der NONSENSE-Sonde (Negativkontrolle, 0%) und der UNIV_1390-Sonde bzw. 616V (Positivkontrolle, 100%) normalisiert (siehe Kapitel 2.11.9), um die einzelnen Hybridisierungen vergleichen zu können. Der Schwellenwert ab dem ein SONDENSIGNAL als positiv eingestuft werden konnte, wurde durch einen Vergleich der Hybridisierungen, welche positive Signale zeigen sollten, mit Hybridisierungen, bei welchen keine Signale auftreten sollten, ermittelt (siehe Abbildung 24). Die Werte werden dabei als gegenläufige Kurven dargestellt. Im Schnittpunkt der beiden Kurven könnte der Schwellenwert festgesetzt werden. Um jedoch die Anzahl falsch positiver Signale zu minimieren, wurde der Schwellenwert nicht direkt auf den Schnittpunkt festgesetzt, sondern um 0,01 normalisierte Signalintensität in die positiven Werte verschoben.

Basierend auf ca. 2000 Hybridisierungsergebnissen wurde somit ein Schwellenwert von 0,12 festgesetzt für Hybridisierungen, die auf die Sonde UNIV_1390 normalisiert wurden, um zwischen positiven ($\geq 0,12$) und negativen ($< 0,12$) Signalen zu unterscheiden. Bei Verwendung dieses Schwellenwertes waren insgesamt nur 1,33% der Hybridisierungen falsch positiv und 7,27%

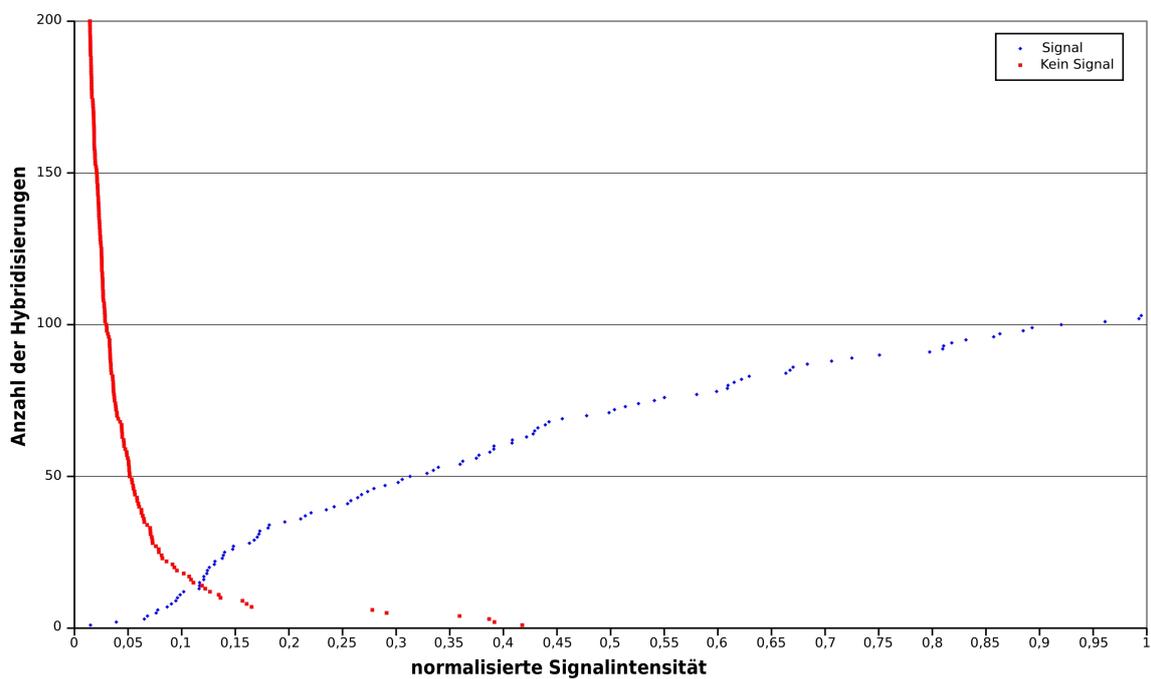


Abbildung 24: Negative und positive Hybridisierungsergebnisse, dargestellt als gegenläufige Kurven. Der Schwellenwert entspricht dem Wert, ab dem das Signal einer Sonde als positiv bewertet wurde. Für Hybridisierungen mit der Sonde UNIV_1390 wurde er auf 0,12 festgelegt.

falsch negativ zu bewerten. In früheren Versuchen wurde die Normierung auf Basis der 16S-rRNS gerichteten Bakteriensonde 616V durchgeführt. Hier wurde der Schwellenwert auf 0,5 festgesetzt um zwischen positiven ($\geq 0,5$) und negativen ($< 0,5$) Signalen zu unterscheiden. Die 616V wurde durch die UNIV_1390 Sonde ersetzt, da zur Vorbereitung der Bodenproben-DNS für die Hybridisierung in der PCR der Primer 31F_mod zum Einsatz, wodurch die Bindungsposition der 616V Sonde nicht mehr erfasst wird.

Der Schwellenwert ist bei jedem Diagramm als rote Linie mit angegeben um eine leichtere Zuordnung zu ermöglichen.

3.5.2.5 Formamidreihen

Um die Stringenz während der Hybridisierung zu optimieren, wurden Formamidreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Formamid im Hybridisierungspuffer (20%-40%) durchgeführt sowie die Temperatur während des Hybridisierungsvorgangs festgelegt. Die Regelung der Temperatur ist mit Hilfe eines in der Ausleseeinheit des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensors integrierten Thermostaten durch ein indirektes Aufheizen des Sensorchips möglich. Es können verschiedene, konstante Temperaturen im Bereich von etwa 20-50°C eingestellt werden. In früheren Versuchen (André Mehlen, persönliche Mitteilung) wurde eine optimale Temperatur von 40°C ermittelt, die auch im Verlauf dieser Arbeit weiterverwendet wurde. Zur weiteren Optimierung wurde der Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer zwischen 20% und 40% variiert. Auf Empfehlung des Instituts für Chemo- und Biosensorik GmbH (Münster, Deutschland) wurde für Hybridisierungen der kommerziell erhältliche Puffer ULTRAhyb™ (Ambion, Austin, TX USA) verwendet. Für jede Hybridisierung wurden ca. 200 ng des entsprechenden 16S-rDNS PCR-Produkts eingesetzt. Die Formamidreihen zeigten, dass die optimale Formamidkonzentration sondenabhängig zwischen 25% und 30% schwankt. Abbildung 25 zeigt exemplarisch eine der durchgeführten Formamidreihen am Beispiel des 16S-rDNS Referenzklons EB1134 („subdivision“ 1, siehe auch Kapitel 2.1.2). Sehr gut zu erkennen ist, dass die allgemeinen *Bacteria*-Sonden und die *Acidobacteria*-spezifischen Sonden bei jeder Formamidkonzentration positive Signale zeigen (616V, Hol_1400, Acido1_300A, Acido1_300C und Acido1_112). Zusätzlich kann jedoch beobachtet werden, dass bereits ab einer Formamidkonzentration von 30% unspezifische Signale von Nicht-Zielsonden, wie z.B. IRog1, mit dem 16S-rDNS Referenzklon auftreten. Somit konnte festgestellt werden, dass unter Bedingungen, die im Normalfall als stringenter zu betrachten wären, nicht nur, wie erwartet, die Signalstärke einiger Sonden wieder abnahm, sondern auch unspezifische Bindungen erfolgen konnten (siehe auch [136]). Ein extremes Beispiel für solche unspezifischen Bindungen wurde für die Sonde Acido5_1034 („subdivision“ 5-spezifisch) beobachtet. Sie zeigte ab 35% Formamid im Hybridisierungspuffer unspezifische Signale mit Acidobakterien der „subdivision“ 1 zu denen sie mindestens vier Fehlpaarungen aufwies (Daten nicht gezeigt). Da der Großteil der Sonden bei 25% optimale Hybridisierungsergebnisse zeigte und ab 30% z.T. bereits unspezifische

Signale beobachtet wurden (siehe Abbildung 25), wurde eine Konzentration von 25% Formamid im Hybridisierungspuffer für alle folgenden Hybridisierungen beibehalten. Alle weiterführenden DNS-Chip-Hybridisierungen wurden also bei 25% Formamid im Hybridisierungspuffer und einer Temperatur von 40°C durchgeführt.

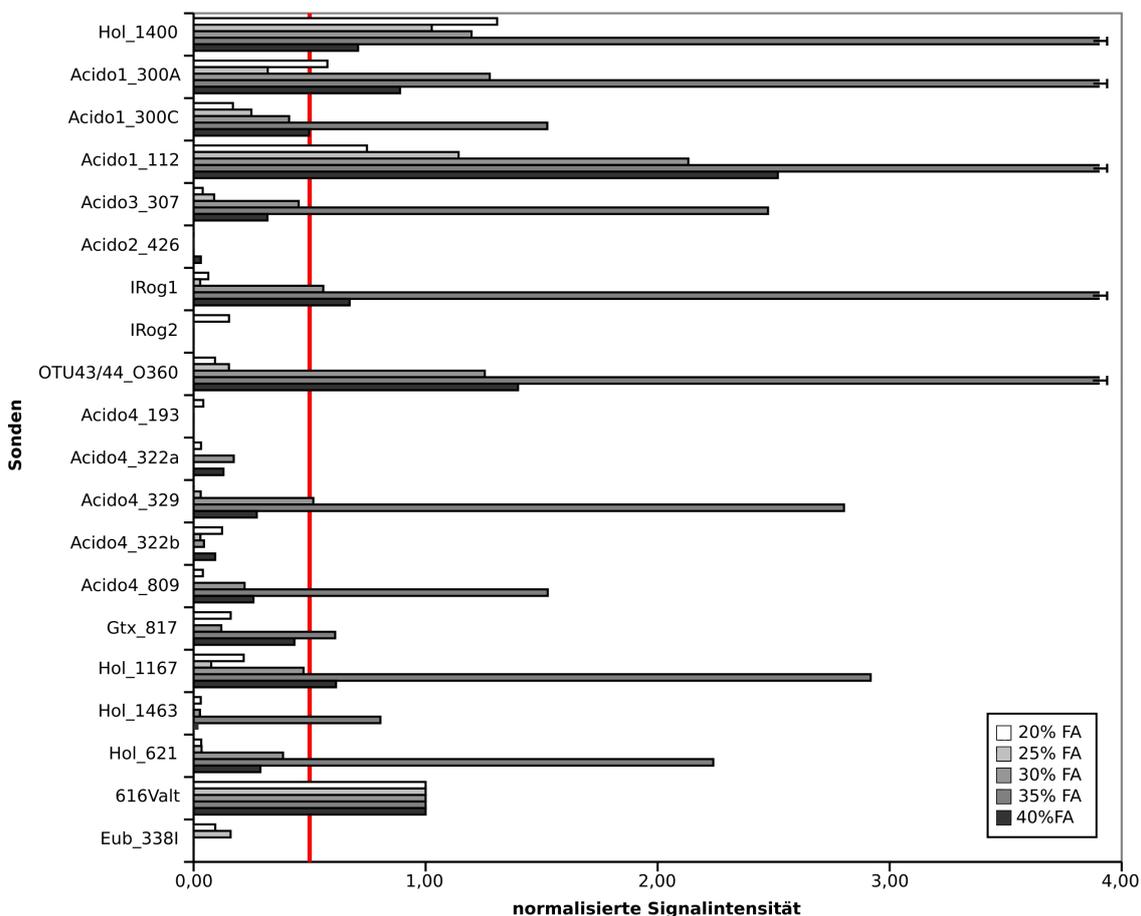


Abbildung 25: Formamidreihe mit dem 16S-rDNS Referenzklon EB1134 („subdivision“ 1) auf dem *Acidobacteria* 16S-rDNS Oligonukleotidmikroarray. Die rote Linie markiert den Schwellenwert, ab dem eine Sonde positiv bewertet wurde.

3.5.2.6 Konstruktion und Evaluierung von 23S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Da die 16S-rRNS nur eine begrenzte Auflösung der acidobakteriellen Gruppen bietet und somit eine zukünftige Erweiterung des *Acidobacteria*-spezifischen Mikroarrays sinnvoll erschien, wurden drei 23S-rRNS gerichtete Sonden konstruiert (siehe Tabelle 21). Ziel dieses Versuches war zu überprüfen, ob eine Übertragung des bisher evaluierten Ansatzes auf 23S-rRNS gerichtete Oligo-

nukleotidsonden ohne weitere Optimierungsmaßnahmen möglich war. Zu diesem Zweck wurde mit dem Primerpaar 616V und 985R sowohl die 16S- als auch die 23S-rDNS von Referenzklonen amplifiziert, mittels der Deca-Priming-Methode (siehe Kapitel 2.11.2) kürzere Fragmente (200-800 b) generiert, das Produkt anschließend Cy5-markiert (siehe Kapitel 2.11.2) und hybridisiert (siehe Kapitel 2.11.6). Es stellte sich heraus, dass trotz der z.T. mehr als dreifachen Länge des initialen Amplifikats (zwischen 4500 b bis 5000 b anstatt 1600 b), spezifische Signale mit allen konstruierten Sonden erzielt werden konnten (siehe Abbildung 26). Diese Methode kann also auf 23S-rRNS Sequenzen angewendet werden, so dass eine Erweiterung des Chips ohne Probleme möglich ist.

Sondenkurzname	Spezifität („subdivision“)	Sequenz 5'→3'	Annealingtemp. [°C]	GC-gehalt [%]
Acido1_2171	1	GAA CTC GCA GGG TGG TAT	56	55
Acido3_1468	3	CCA ACC TCG CTT CAC TCT	56	55
Acido4_2217	4	CTG ATA ATG TCC CTC TCC	54	50

Tabelle 21: *Acidobacteria*-spezifische 23S-rRNS Oligonukleotidsonden ihre Spezifität, Annealingtemperatur, Sequenz und GC-Gehalt

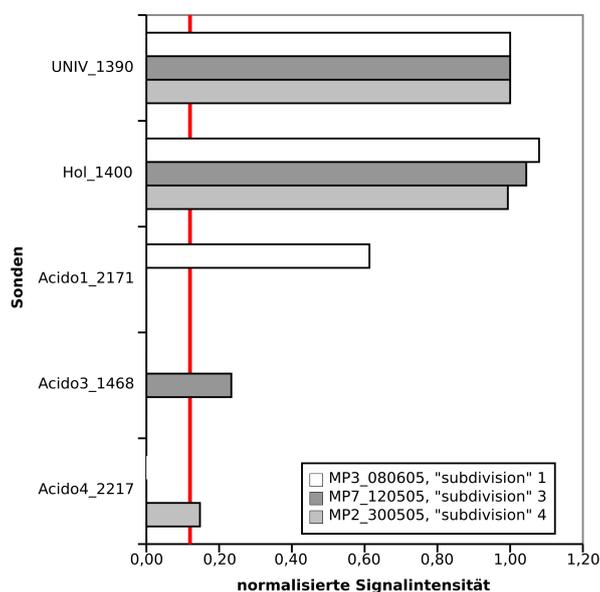


Abbildung 26: Hybridisierung von 23S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden mit der DNS spezifischer Referenzklone. Die rote Linie markiert den Schwellenwert, ab dem eine Sonde positiv bewertet wurde. Acido1_2171: „subdivision“ 1; Acido3_1468: „subdivision“ 3; Acido4_2217: „subdivision“ 4.

3.5.3 Spezifität und Sensitivität des Mikroarrays

Um den Nachweis der *Acidobacteria* auf dem 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray zu ermöglichen, musste die Spezifität jeder einzelnen Sonde und dadurch auch die Diskriminierung einzelner Basenfehlpaarungen gewährleistet sein. Im Gegensatz zu konventionellen Chiphybridisierungen kann mit dem Evaneszent-Feld-DNS Biosensor in viel kürzerer Zeit und mit geringerem Arbeitsaufwand eine wesentlich umfangreichere Datenmenge zur Bestimmung der optimalen Stringenzbedingungen der verschiedenen Sonden sowie der optimalen Probenvorbereitung erhalten werden. Da das System dynamisch ist, können einzelne Schritte verlängert oder verkürzt werden und so zu einer weiteren Optimierung der Signalintensitäten führen. Die Evaluierung der Spezifität des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays und der Probenvorbereitung wird in den folgenden Kapiteln näher ausgeführt.

3.5.3.1 Vorbereitung der Proben

Die Detektion gebildeter Hybride erfolgt über die Cy5-Markierung des PCR-Produkts, da dieses Fluorophor im Bereich der Wellenlänge des hier verwendeten Lasers angeregt wird. Um PCR-Produkte nun mit dem entsprechenden Fluorophor zu markieren, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, z.B. können bereits während der PCR Cy5-markierte dNTPs eingebaut werden oder man verwendet Cy5-markierte Primer. Zusätzlich gibt es verschiedene Kits mit denen ein PCR-Produkt nachträglich markiert werden kann. Da sich der Einsatz von markierten Primern eher für kurze Amplifikate eignet und der Einsatz von Cy5-markierten dCTPs während der PCR sich nachteilig auf den Ertrag von PCR-Produkten auswirkt, wurde in dieser Arbeit immer nachträglich, sprich nach der PCR, mit dem ULYSIS[®] Alexa Fluor[®] 647 Nucleic Acid Labeling Kit markiert (siehe Kapitel 2.11.2). Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Markierungseffizienz aus und erlaubt den Einsatz von geringeren Mengen des PCR-Produkts (Reinkultur/Klone 200 ng, Umwelt 2 µg). Ein Problem der reversen Hybridisierung muss allerdings bei der Probenvorbereitung stark berücksichtigt werden: die Zugänglichkeit der Sonden-Zielregion auf einem großen PCR-Produkt. Da die DNS Sekundärstrukturen ausbildet, kann es, besonders bei großen PCR-Fragmenten, vorkommen, dass eine Hybridisierung der Sonde mit der Zielregion nicht oder nur teilweise zustande kommt. Wenn nun kürzere PCR-Fragmente für die Hybridisierung eingesetzt würden, kann sich die Bindungskapazität verbessern. Die Generierung solcher kurzen Fragmente kann mittels eines DNase-Verdau oder dem DecaLabel[®] DNA Labeling Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) erreicht werden. Bei letzterem kommen zufällige 10 mer Primer zum Einsatz, die vom ursprünglichen PCR-Produkt kleinere Fragmente generieren (zwischen 200 und 800 Basen Länge, siehe Kapitel 2.11.2). Die Hybridisierungen, bei welchen diese kürzeren Fragmente eingesetzt wurden, wurden nun mit Hybridisierungen mit vollständigen 16S-rDNS PCR-Fragmenten verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Signalintensität bei Anwen-

dung der Deca-Priming-Methode (siehe Kapitel 2.11.2) und anschließender Cy5-Markierung am höchsten war (siehe Abbildung 27). Die Signalintensitäten von Hybridisierungen mit DNase-verdauten PCR-Fragmente sowie kompletter 16S-rDNS PCR-Fragmente lagen bei nur ca. 25% der Signalintensität, die bei Hybridisierungen mit Deca-Fragmenten erreicht wurden. Tendentiell neigten kürzere Fragmente zwar auch zu unspezifischen Reaktionen, Sonden, die mit Nichtzielorganismen kreuzreagierten, wurden jedoch nicht in den Mikroarray integriert (siehe Tabelle 30 im Anhang).

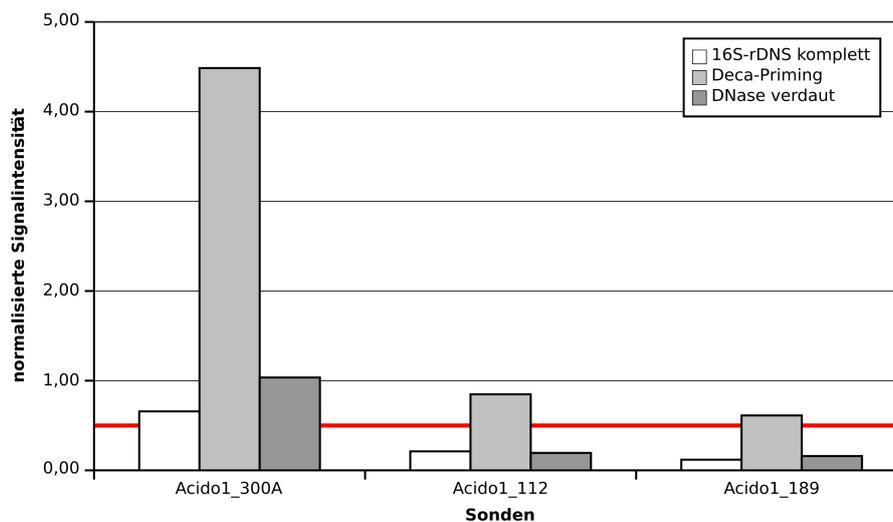


Abbildung 27: Hybridisierungen nach unterschiedlicher Vorbereitung der Proben-DNS. Es wurden komplette 16S-rDNS PCR-Produkte, sowie mittels DNase-Verdau oder Deca-Priming-Reaktion fragmentierte 16S-rDNS PCR-Produkte eines „subdivision 1“ Referenzklons BIL.3_301104 fluoreszenz-markiert. Die gezeigten Sonden sind absolut komplementär zu dieser 16S-rDNS. Die rote Linie markiert den Schwellenwert, ab dem eine Sonde positiv bewertet wurde.

3.5.3.2 Optimierung der Deca-Priming-Methode für den 16S-rRNS Oligonukleotid-mikroarray

Da die Methode des Deca-Primings weiterverwendet wurde, sollte noch überprüft werden, ob eine Variation des Protokolls zu besseren Ergebnissen führte. Dazu wurden drei Versionen geprüft: das Protokoll nach Loy *et al.* [106], das vom Hersteller empfohlene Protokoll (4 h Inkubationszeit bei 37°C), sowie eine modifizierte Version des Herstellerprotokolls (Inkubation über Nacht bei 37°C). In Abbildung 28 sind die Ergebnisse dargestellt. Evident ist, dass die Signalintensitäten zwischen den einzelnen Sonden stark variieren (vgl. z.B. Sonde Acido1_112 mit Acido1_300C). Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen nach der Anwendung der einzelnen Protokolle sind

kaum signifikant. Allenfalls lässt sich eine leichte Tendenz feststellen, dass das 4 h-Protokoll (siehe Kapitel 2.11.2) zu etwas besseren Signalintensitäten führt. Deshalb und wegen des kürzeren Zeitaufwands wurde dieses Protokoll im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet.

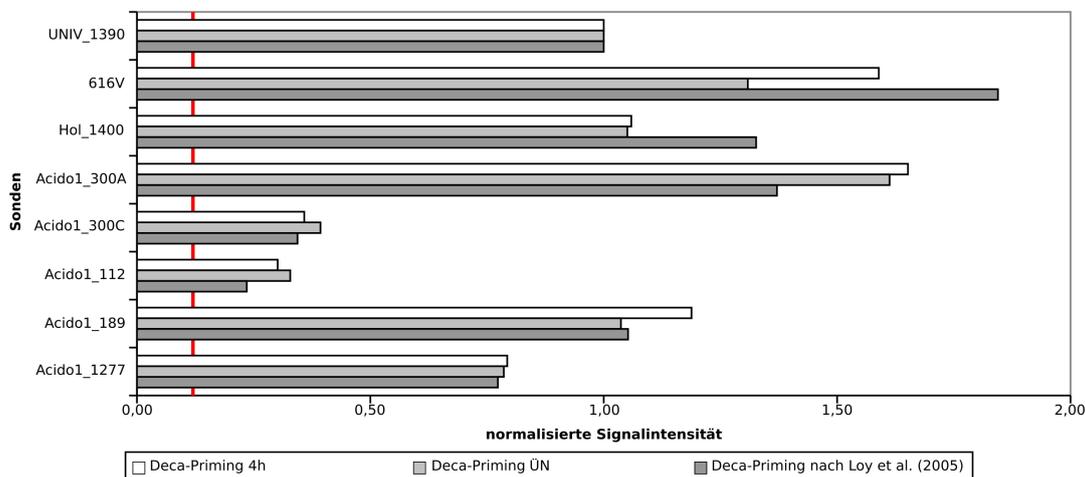


Abbildung 28: Hybridisierungen von *Acidobacterium capsulatum* 16S-rDNS. Das Protokoll des DecaLabel[®] DNA Labeling Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) wurde variiert. Die angewendeten Protokolle unterschieden sich in der Inkubationszeit (4 h, ÜN), sowie in der Menge eingesetzten Klenow Fragments exo^- (5 U nach dem Protokoll des Herstellers, 10 U nach Loy *et al.* [106]). Die rote Linie markiert den Schwellenwert, ab dem eine Sonde positiv bewertet wurde.

3.5.3.3 Inter- und Intrapylumspezifität des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays

Die Intrapylumspezifität des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays wurde parallel zu der Evaluierung der 16S-rDNS Oligonukleotidsonden mit acidobakteriellen 16S-rDNS Referenzklonen und Reinkulturen ermittelt (siehe z.B. Abbildung 30). Sonden, die trotz Fehlpaarungen unspezifische Signale mit Nicht-Zielsequenzen zeigten, wurden entweder komplett vom Mikroarray ausgeschlossen oder hierarchisch höher eingestuft. In Tabelle 30 im Anhang sind alle konstruierten Sonden und ihre Spezifität aufgelistet.

Die Interpylumspezifität der Sonden wurde durch Hybridisierungen mit der DNS kultivierter Referenzorganismen, die zum Großteil auch im Boden vorkommen, überprüft. Die entsprechenden Referenzorganismen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Bei keinem dieser Referenzorganismen konnten unspezifische Signale von Sonden des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays beobachtet werden. Die Abbildung 29 zeigt als Beispiel eine Hybridisierung (incl. Parallelansatz) mit Cy5-markierten

16S-rDNS PCR-Produkten von *Acinetobacter baumannii* Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass ausschließlich die universellen *Bacteria*-Sonden UNIV_1390 und 616V Signale zeigen.

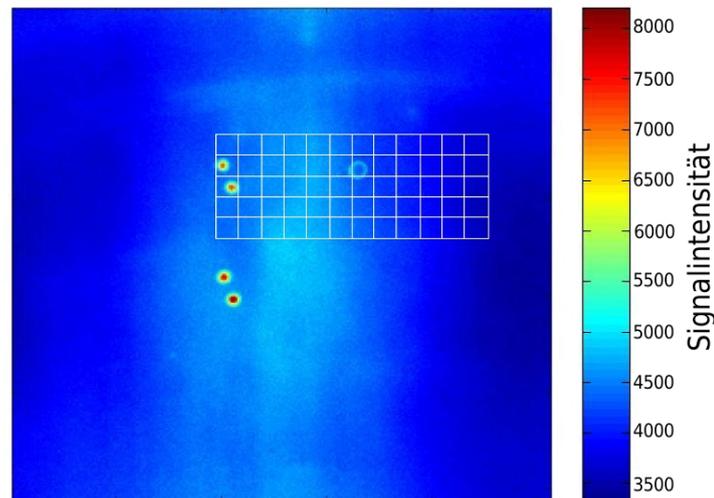


Abbildung 29: Hybridisierungsbild zur Validierung der Interphylumspezifität. Gezeigt ist die Hybridisierung (plus Parallelversuch) des *Acidobacteria*-Oligonukleotidmikroarrays mit Cy5-markierten 16S-rDNS PCR-Produkten von *Acinetobacter baumannii* Zellen. Ausschließlich die universellen *Bacteria*-Sonden UNIV_1390 und 616V zeigen ein Signal. Zum Vergleich kann ein acidobakterielles Signalmuster der Abbildung 30 entnommen werden.

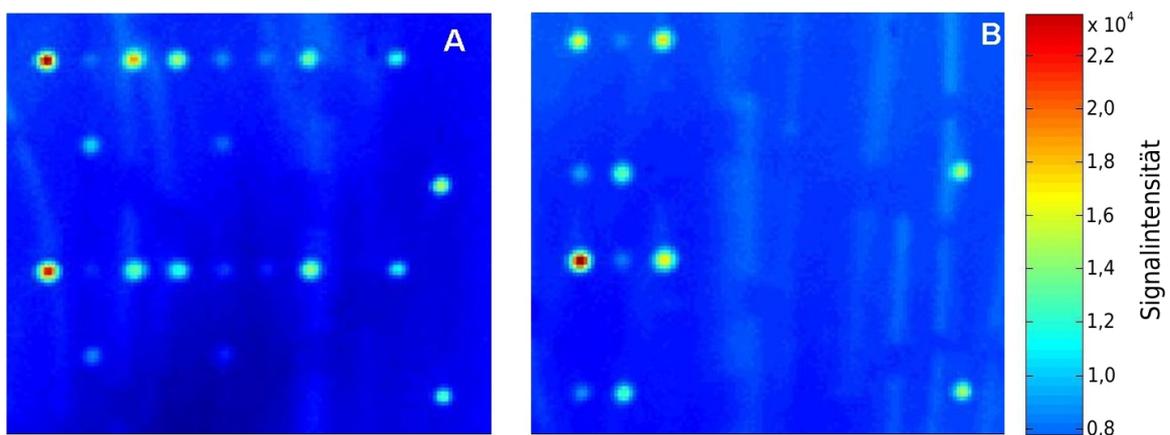


Abbildung 30: Hybridisierungen mit 16S-rDNS PCR-Produkten von *Acidobacterium capsulatum* Zellen (A) im Vergleich mit *Holophaga foetida* Zellen (B). Eine optimale Unterscheidung der beiden Spezies ist, wie deutlich an den unterschiedlichen Signalmustern zu erkennen, gewährleistet.

3.5.3.4 Detektionsgrenze

Um annähernd zu bestimmen, wieviel DNS eines Zielorganismus in der PCR vorliegen muss, um diesen in einer Mikroarrayhybridisierung zu detektieren und identifizieren, wurde die DNS von zwei 16S-rDNS Klonen (BIL_b_031104, „subdivision“ 1 und MP21_281204, „subdivision“ 6) in festgelegten Verhältnissen gemischt (1:1, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000), mittels PCR amplifiziert, markiert und anschließend hybridisiert. Die Ausgangskonzentration der DNS des Klons BIL_b_031104 betrug dabei konstant 100 ng, während die Konzentration der DNS des Klons MP21_281204 zwischen 0,01 und 100 ng variierte. Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, musste mindestens 1 ng DNS des gesuchten Organismus in der Initial-PCR vorliegen, um mit dem 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray nachgewiesen zu werden. Die Sonden Acido1_300A und Acido1_300C (beide spezifisch für „subdivision“ 1) zeigen konstant Signale, während die „subdivision“ 6-spezifischen Sonden IRog1, Rog102 und OTU43/44_O360 ab einer Konzentration von 0,1 ng des „subdivision“ 6 16S-rDNS Klons keine Signale mehr zeigten.

3.5.4 Evaluierung des *Acidobacteria* 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays für Bodenproben

Nach Abschluss der Sondenevaluierung, mussten nun die Versuchsbedingungen auf die wesentlich komplexeren Bodenproben übertragen werden. Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 3.3), war eine erfolgreiche PCR auf die aus Bodenproben isolierte pure DNS nur unter Zuhilfenahme verschiedener PCR-Enhancer möglich (siehe auch Kapitel 3.3), da Huminstoffe und andere Inhibitoren in den Bodenproben präsent sind, zudem musste eine Primerkombination ermittelt werden, bei der möglichst viele Signale mit dem 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray detektierbar waren. Weiterhin musste überprüft werden, ob die Menge an eingesetztem Cy5-markiertem PCR-Produkt und die Dauer der Hybridisierung ausreichten, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen. Die verschiedenen Modifikationen des Protokolls sowie die letztendlich optimierte Version sind in den folgenden Kapiteln erläutert.

3.5.4.1 Methodenvergleich

Es wurden bei allen hier vorgestellten PCR-Methoden sowie Primerkombinationen immer mehrere Reaktionsansätze parallel durchgeführt und anschließend vereinigt, um die Amplifikation von in der Probe geringer vertretener DNS-Sequenzen zu gewährleisten.

Für die ersten Hybridisierungsansätze mit der DNS von Bodenproben wurde eine PCR mit dem universellen Bakterienprimer 616V (16S-rDNS, [78]) und dem *Acidobacteria*-spezifischen Primer Hol_189R (23S-rDNS, [192]) durchgeführt und nach der Deca-Priming-Reaktion Cy5-markiert

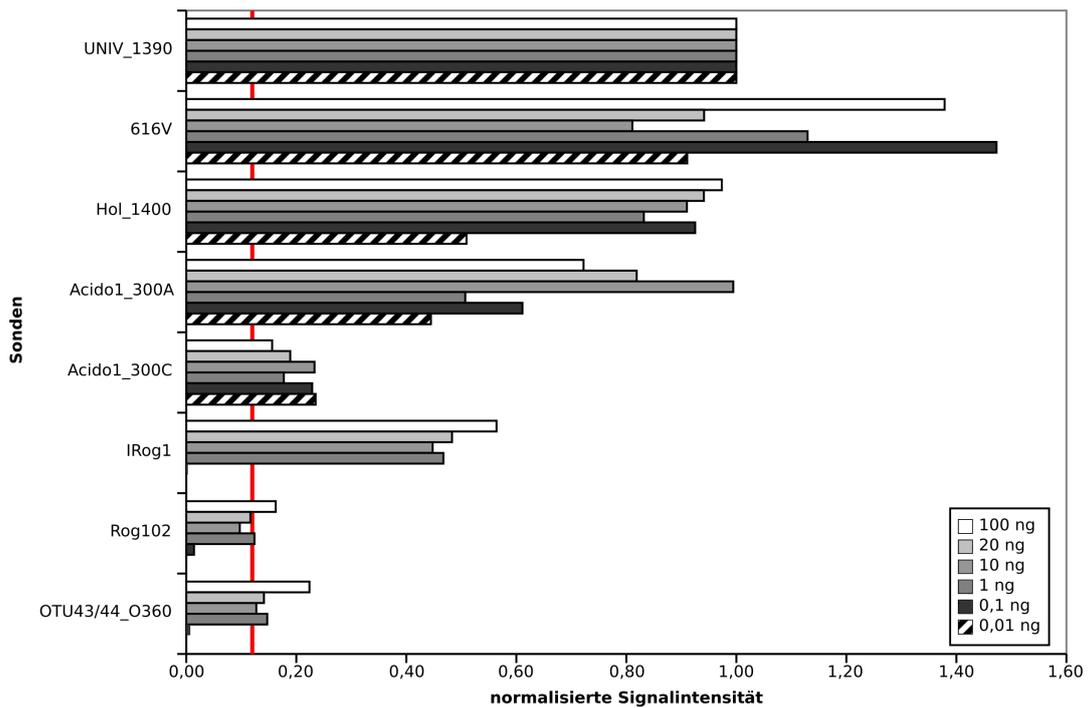


Abbildung 31: Bestimmung der Detektionsgrenze des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays durch Hybridisierungen einer Klonmischung. Die DNS zweier 16S-rDNS Klone (BII_b_031104, „subdivision“ 1 und MP21_281204, „subdivision“ 6) wurden in bestimmten Verhältnissen gemischt (1:1, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000), mittels PCR amplifiziert, markiert und anschließend hybridisiert. Die Ausgangskonzentration der DNS des Klons BII_b_031104 betrug konstant 100 ng, während die Konzentration der DNS des Klons MP21_281204 variierte (0,01 ng, 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 20 ng 100 ng). Die rote Linie markiert den Schwellenwert, ab dem eine Sonde positiv bewertet wurde.

(siehe Kapitel 2.11.2). Die anschließende Hybridisierung mit dem 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray führte zu äußerst wenigen Acidobakterien-spezifischen Signalen (siehe Abbildung 33). Die universellen *Bacteria* Sonden UNIV_1390 und 616V sowie die allgemeine *Acidobacteria*-Sonde Hol_1400 zeigten sehr starke Signale. Zusätzlich konnten noch schwächere Signale einiger „subdivision“ 1- und „subdivision“ 3-spezifischer Sonden beobachtet werden. Zur Optimierung des Signal und der Detektionssteigerung wurden deshalb verschiedene Primerkombinationen und PCR-Methoden getestet (siehe Tabelle 22 und Abbildung 32). Bei allen Ansätzen wurde die Bodenprobe BI (Bayreuth, Lysimeter, unbewachsen, siehe Kapitel 2.2.1) verwendet. Für die Hybridisierungen wurden jeweils 500 ng Cy5-markiertes PCR-Produkt eingesetzt (Probenvorbereitung siehe Kapitel 2.11.2). Alle hier erwähnten Hybridisierungen sind in Abbildung 33 dargestellt.

Im ersten Schritt wurde der Primer Hol_189R modifiziert, so dass auch neu erfasste, abweichende *Acidobacteria* 23S-rDNS Sequenzen amplifiziert wurden (Hol_189R_Ac, siehe Tabelle 11). Die Hybridisierung auf Basis des neuen Primers zeigte jedoch dasselbe Signalmuster wie die ursprüngliche Primerversion (siehe Abbildung 33). Daraufhin wurde der universelle *Bacteria*-Primer durch den *Acidobacteria*-spezifischen Primer 31F_mod (16S-rDNS) ersetzt und mit dem Primer Hol_189R_Ac kombiniert. Mit dieser Kombination konnten insgesamt zwar weniger positive Signale detektiert werden, aber es konnte auch eine Verschiebung des Signalmusters durch Signale der Sonden Acido1_996b und Acido5_530 beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob der Einsatz „subdivision“-spezifischer Primer zur Detektion der entsprechenden „subdivision“ mittels des Mikroarrays führen könnte, wurden zwei weitere Primer konstruiert: Acido2_52 („subdivision“ 2) und Acido6_52 („subdivision“ 6). Die Bindungsstelle dieser Primer liegt am 5'-Ende der 16S-rDNS (siehe Kapitel 2.5.2 und Abbildung 32). Beide Primer wurden jeweils mit dem *Acidobacteria*-spezifischen Primer Hol_189R_Ac kombiniert und das entstandene Cy5-markierte PCR-Produkt zur Hybridisierung eingesetzt. Bei der Hybridisierung mit dem Primer Acido2_52 konnten keine Acidobakterien detektiert werden. Nur die universelle Sonde UNIV_1390 zeigte ein deutliches Signal. Die Hybridisierung mit dem PCR-Produkt der Primerkombination Acido6_52 und Hol_189R_Ac führte zwar zu *Acidobacteria*-spezifischen Signalen (z.B. Hol_1400), jedoch nicht zu „subdivision“ 6-spezifischen, positiven SONDENSIGNALEN.

Die bei allen bisher beschriebenen Primerkombinationen eher geringe Anzahl positiver Signale ließ darauf schließen, dass die Menge acidobakterieller 16S-rDNS Sequenzen nach einer PCR noch nicht ausreichte, um eine Detektion mit dem Mikroarray zu gewährleisten. Also wurden nun zwei weitere Ansätze verfolgt. Im Anschluss an eine PCR mit den Primern 616V und Hol_189R_Ac wurde entweder eine „nested“ PCR mit den Primern 611V_Ac und 100K oder eine asymmetrische PCR mit den Primern 31F_mod bzw. Hol_189R_Ac durchgeführt (Protokolle siehe Kapitel 2.5). Die Hybridisierung der Cy5-markierten DNS nach einer PCR mit der ersten Kombination zeigte in etwa dasselbe Signalmuster, das auch bereits mit den ersten drei PCR-Methoden (616V + Hol_189R, 616V + Hol_189R_Ac, 31F_mod + Hol_189R_Ac) beobachtet wurde. Eine

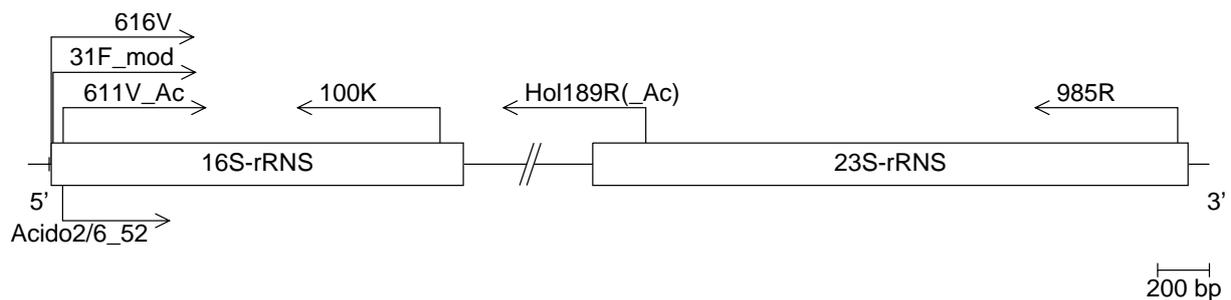


Abbildung 32: Bindungspositionen der PCR-Primer, die für die Vorbereitung der Bodenproben-DNS für Mikroarrayhybridisierungen eingesetzt wurden. Details der Primer können den Tabellen 10 und 11 entnommen werden.

Hybridisierung mit den markierten PCR-Produkten der asymmetrischen PCR mit dem Primer Hol.189R.Ac resultierte nur in zwei *Acidobacteria*-spezifische SONDENSIGNALEN (Hol.1400 und Acido3.983). Mit den markierten PCR-Produkten aus der asymmetrischen PCR mit dem 31F_mod Primer konnte jedoch, im Gegensatz zu allen vorherigen Ergebnissen, in der Hybridisierung erstmals eine höhere Anzahl von Signalen spezifischer Sonden detektiert werden, u.a. auch eine „subdivision“ 6-spezifische Sonde. Drastisch steigerte sich v.a. die Anzahl positiver Signale „subdivision“ 3-spezifischer Sonden (von 1-3 auf 5 positive SONDENSIGNALEN). Signale der Sonde 616V können nun z.T. allerdings nur schlecht detektiert werden, da die Bindungsstelle des Primers 31F_mod bei *E. coli*-Position 15 liegt während die Sondenbindungsstelle bei *E. coli*-Position 8 der 16S-rDNS positioniert ist.

Primer (1.PCR)	Primer (2. PCR)
616V + Hol189_R	–
616V + Hol189_R.Ac	–
31F_mod + Hol.189R.Ac	–
Acido2.52 + Hol.189R.Ac	–
Acido6.52 + Hol.189R.Ac	–
616V + Hol.189R.Ac	611.Ac + 100K
616V + Hol.189R.Ac	31F_mod
616V + Hol.189R.Ac	Hol.189R.Ac
31F_mod + 985R	–
616V + Hol.189R.Ac	31F_mod + 100K

Tabelle 22: Primerkombinationen und Anzahl an hintereinander geschalteten PCR-Reaktionen zur Optimierung des Mikroarray-Ansatzes für Bodenproben.

Weitere Kombinationen, die mit einer anderen Bodenprobe K6-1 (Grünschwaige, siehe Kapitel 2.2.2) evaluiert wurden, führten zu keiner weiteren, signifikanten Verbesserung. Nach einer direkten Anwendung der asymmetrischen PCR mit dem Primer 31F_mod auf diese Bodenprobe, die den zeitlichen Aufwand für die Probenvorbereitung deutlich reduzieren würde, resultierte ausschließlich in Hintergrundrauschen. Definierte Signal-Spots zeigten sich zu keinem Zeitpunkt der Hybridisierung (siehe Abbildung 35). Die beiden anderen Ansätze, eine Kombination des 31F_mod mit dem *Bacteria*-spezifischen 985R (23S-rDNS) sowie die Kombination 616V und Hol_189R_Ac mit anschließender „nested“ PCR mit den Primern 31F_mod und 100K, führten nur zu schwächeren bzw. gleichwertigen Hybridisierungsergebnissen im Vergleich zu der Primerkombination 616V und Hol_189R_Ac mit anschließender asymmetrischer PCR mit 31F_mod (siehe Abbildung 34), deshalb wurde diese in den folgenden Analysen der Bodenproben beibehalten. Allerdings konnten auch mit dieser Primerkombination nicht alle „subdivisions“ bei Mikroarrayhybridisierungen nachgewiesen werden, die mit Hilfe der Klondatenbanken gefunden wurden. Zum Beispiel konnten in der BI-Klondatenbank Vertreter der „subdivision“ 4 detektiert werden, aber nicht bei Hybridisierungen (siehe Abbildung 41). Aus diesem Grund wurden noch andere, PCR-unabhängige Optimierungen durchgeführt.

Erst am Ende dieser Arbeit wurde ein weiterer PCR-Enhancer (PrimerNavigator DNA Amplification Enhancer) von der Firma biohelix (Beverly, MA, USA) auf den Markt gebracht, so dass zwar noch Testreihen möglich waren, jedoch keine Übertragung mehr auf alle untersuchten Bodenproben erfolgen konnte. Dieser PCR-Enhancer ist ein Set bestehend aus thermostabilem RecA und thermostabilem SSB Protein (Einzelstrangbindeprotein). Diese sollen (laut Hersteller) gewährleisten, dass der Primer ausschließlich spezifisch bindet. Das SSB Protein destabilisiert dabei DNS-Sekundärstrukturen und steigert die Prozessivität von DNS-Polymerasen, während RecA an einzelsträngige DNS bindet und nach sequenzidentischen Stellen zum Primer in doppelsträngiger DNS sucht. Das oben beschriebene optimierte Amplifikationsprotokoll zur Probenvorbereitung für die Mikroarrayhybridisierung wurde nun durch Zugabe dieses PCR-Enhancers weiter modifiziert. Drei Ansätze wurden dabei überprüft: Zugabe des PCR-Enhancers zur initialen (616V + Hol_189R_Ac) und zur asymmetrischen PCR (31F_mod), Zugabe nur zur initialen oder nur zur asymmetrischen PCR. Bei allen Ansätzen wurde die Bodenprobe K6-1 (Grünschwaige, siehe Kapitel 2.2.2) verwendet. Pro Hybridisierung wurden 2 μ g Cy5-markiertes PCR-Produkt eingesetzt (Probenvorbereitung siehe Kapitel 2.11.2, Probenvolumen siehe Kapitel 3.5.4.2). Die höchste Anzahl positiver Signale wurde beobachtet, wenn der PCR-Enhancer in beiden PCR-Reaktionen eingesetzt wurde. Jedoch konnte im Vergleich mit der Hybridisierung ohne PCR-Enhancer keine signifikante Verbesserung der Detektion erzielt werden (siehe Abbildung 36). Allerdings ist der Hintergrund deutlich reduziert und die Signalintensität erhöht, wie Abbildung 37 zeigt.

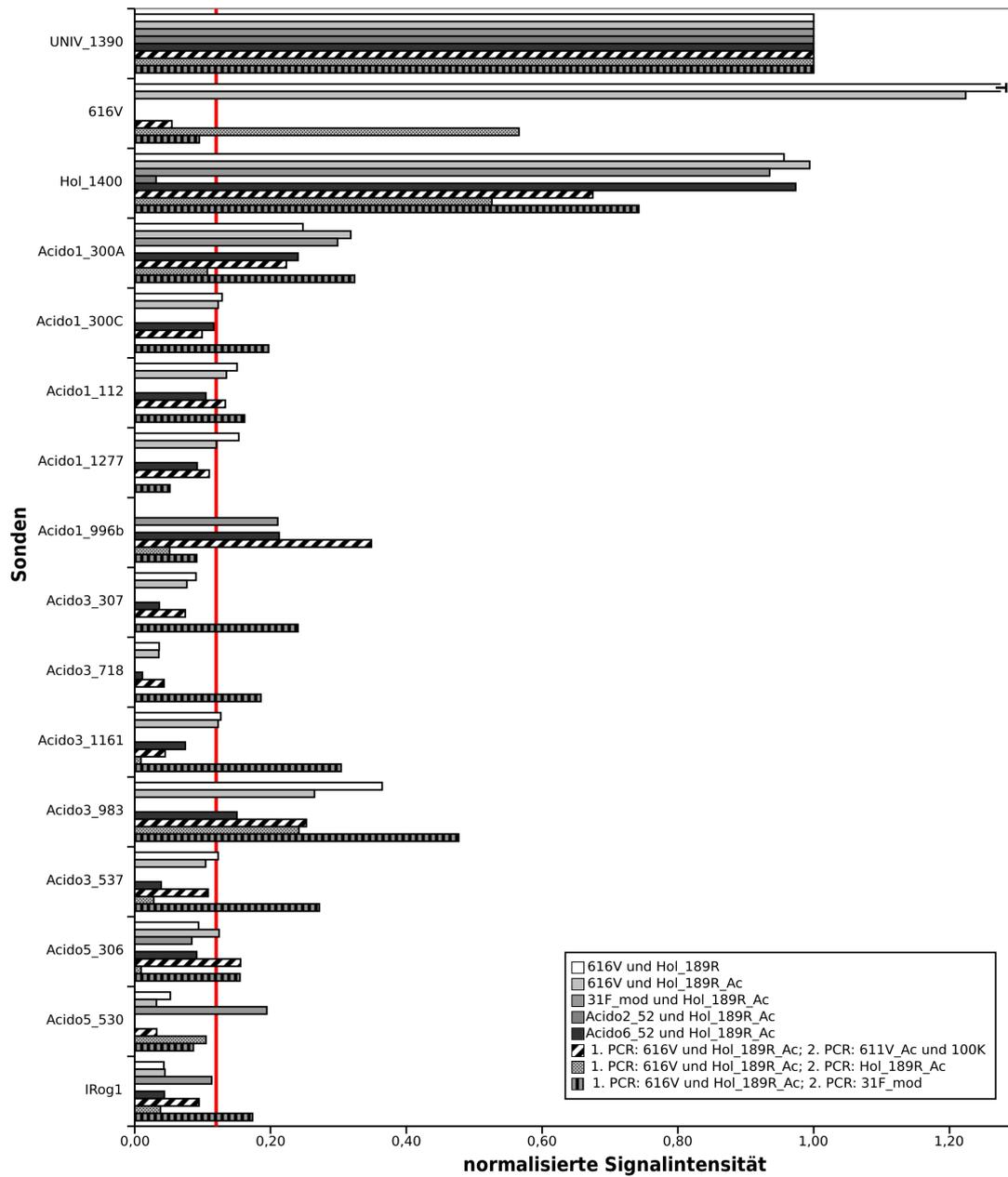


Abbildung 33: Hybridisierungen der Umweltprobe BI (Lysimeter, Bayreuth, D). Während der vorangehende(n) PCR-Reaktion(en) kam(en) verschiedene Primerkombinationen zum Einsatz, anschließend eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur Sonden dargestellt, die in mindestens einer der Hybridisierungen positiv waren. Die rote Linie markiert den Schwellenwert ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

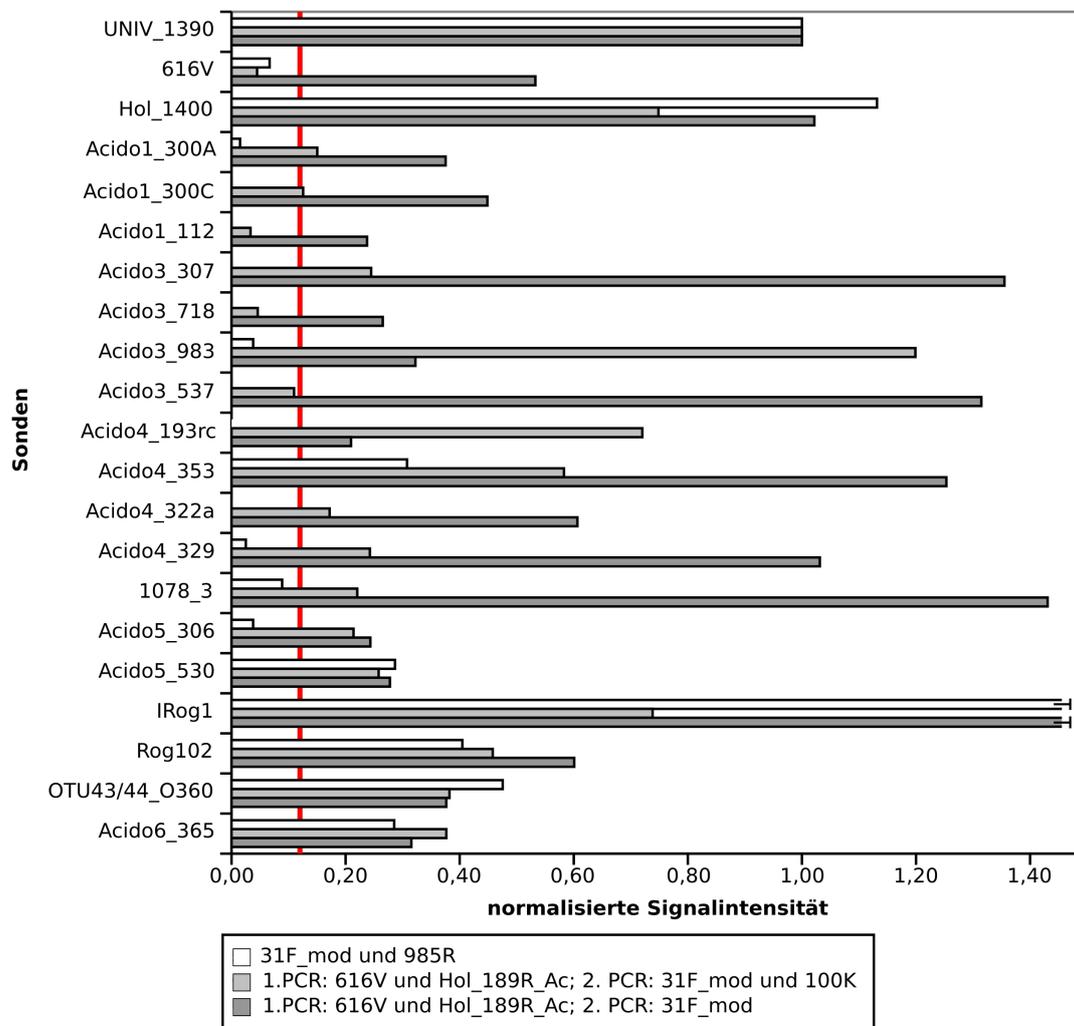


Abbildung 34: Hybridisierungen der Umweltprobe K6-1 (Grünschwaiqe Versuchsstation, D). Während der vorangehenden PCR-Reaktionen kamen verschiedene Primerkombinationen zum Einsatz, anschließend wurde eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur Sonden dargestellt, die in mindestens einer der Hybridisierungen positiv waren. Die rote Linie markiert den Schwellenwert ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

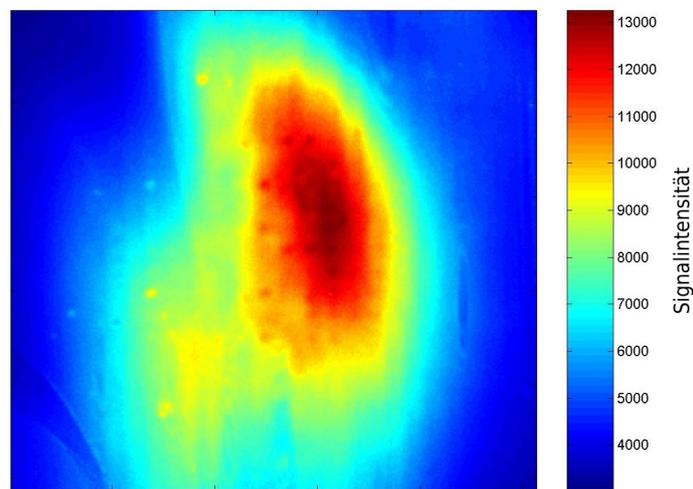


Abbildung 35: Hybridisierungsbild der Umweltprobe K6-1 (Grünschaige Versuchstation, D). Eine asymmetrische PCR mit dem Primer 31F_mod wurde direkt auf die Proben-DNS angewandt, anschließend eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Ausschließlich Hintergrundrauschen ist zu erkennen, definierte Sondenspots sind nicht zu beobachten.

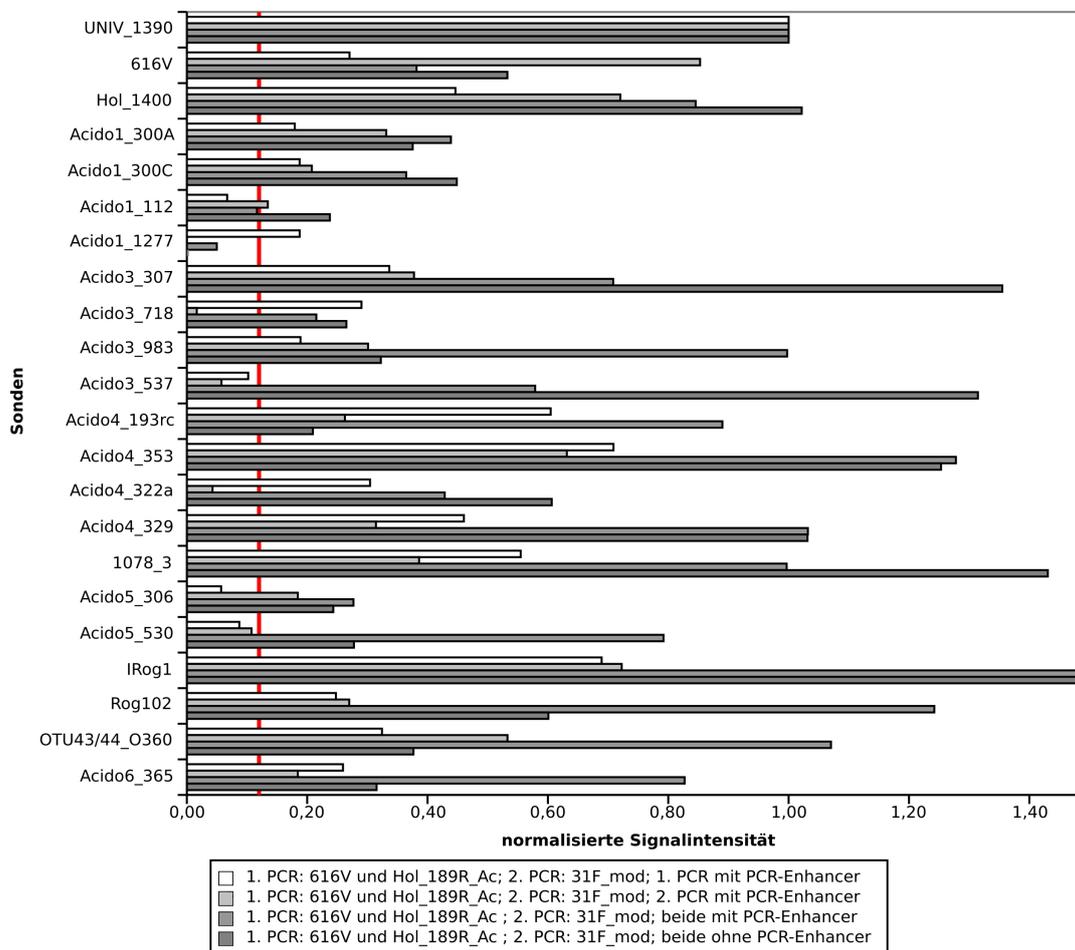


Abbildung 36: Hybridisierungen der Umweltprobe K6-1 (Grünschwäige Versuchsstation, D). Den PCR-Reaktionen wurde in unterschiedlichen Kombinationen der PCR-Enhancer PrimerNavigator DNA Amplification Enhancer (biohelix, Beverly, MA, USA) zugefügt, anschließend eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Im Vergleich wird eine Hybridisierung ohne eingesetzten PCR-Enhancer gezeigt. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur Sonden dargestellt, die in mindestens einer der Hybridisierungen positiv waren. Die rote Linie markiert den Schwellenwert ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

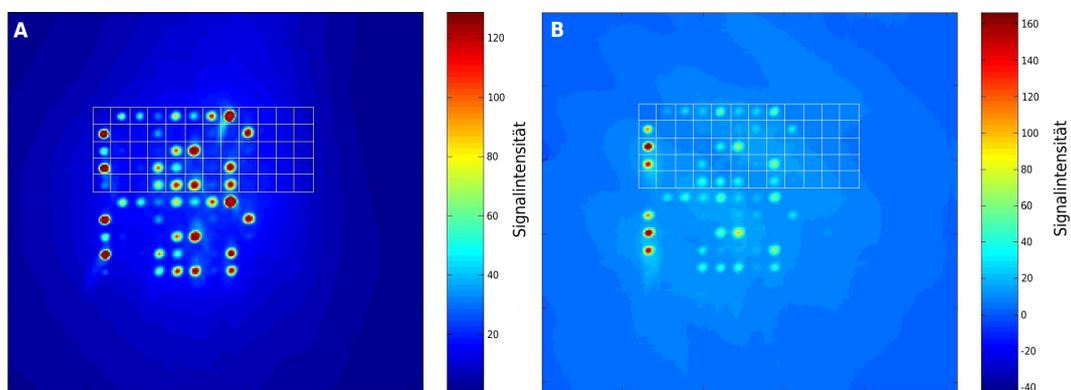


Abbildung 37: Hybridisierungsbild der Umweltprobe K6-1 (Grünschaige Versuchstation, D). Der PCR-Reaktion wurde der PCR-Enhancer PrimerNavigator DNA Amplification Enhancer (biohelix, Beverly, MA, USA) zugefügt, anschließend eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert (A). Zum Vergleich ist ein Hybridisierungsbild einer PCR-Reaktion ohne PCR-Enhancer-Zugabe gezeigt (B). Gut zu erkennen ist ein reduziertes Hintergrundrauschen, sowie die erhöhte Signalintensität bei Zugabe des PCR-Enhancers. Die Anordnung der Sonden auf dem Mikroarray kann Tabelle 31 im Anhang entnommen werden.

3.5.4.2 Steigerung des Hybridisierungsvolumens und der Probenmenge

Wie bereits erwähnt konnten auch mit dem optimierten PCR-Programm (616V und Hol_189R_Ac, 31F_mod asymmetrisch) nicht alle „subdivisions“ detektiert werden, von denen Sequenzen in den Klondatenbanken erfasst wurden. Vertreter der „subdivision“ 4 waren in sehr geringer Anzahl (3,45%) in der BI-Klondatenbank vertreten, konnten jedoch bei Mikroarrayhybridisierungen nicht nachgewiesen werden. Der Grund für die fehlenden Signale könnte in der geringen Präsenz dieser *Acidobacteria* in der Bodenprobe BI liegen, deshalb könnte eine erhöhte Menge an Proben-DNS für die Hybridisierung die Sensitivität des Mikroarrays steigern.

In dem Magazin des Evaneszent-Feld-Prototypen haben bis zu sieben Lösungen Platz. So konnte die Probenmenge einfach gesteigert werden indem jeweils 500 ng Probe in 115 μ l Hybridisierungspuffer gelöst und anschließend je nach geforderter Menge (500 ng, 1000 ng, 1500 ng, 2000 ng) bis zu vier Reaktionsgefäße in das Magazin geladen wurden. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse für die Bodenprobe BI (Lysimeter Bayreuth, unbewachsen, siehe Kapitel 2.2.1) dargestellt. Ersichtlich ist eine deutliche Signalsteigerung mit steigendem Probenvolumen. Eine zusätzliche Sonde (Acido1_996b) zeigt positive Signalwerte sobald die Probenmenge 1500 ng übersteigt, eine weitere (Rog102) ab 2000 ng Probenmenge (siehe Abbildung 38). Obwohl auch mit der hier maximal verwendeten Probenmenge keine Vertreter der „subdivision“ 4 detektiert werden konnten, zeigen die zusätzlichen Sondensignale, dass eine Steigerung der Sensitivität über eine Erhöhung der Probenmenge möglich ist.

3.5.4.3 Auswirkung der DNS-Extraktionsmethode auf Hybridisierungen mit dem 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays

Da die DNS-Extraktion der Bayreuth-Proben außer Haus (Teilprojekt Overmann des BIOLOG Projektes) mittels einer anderen Methode durchgeführt wurde, musste eine Auswirkung unterschiedlicher DNS-Extraktions-Protokolle auf die Hybridisierungen mit dem 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays untersucht werden. Es wurden die zwei Extraktionsmethoden miteinander verglichen, die für die Probenvorbereitung für Hybridisierungsexperimente angewendet wurden: die Methode nach Dong *et al.* [41] und der Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit. DNS wurde aus jeweils 5 g Bodenprobe K6-1 (Grünschaige, siehe Kapitel 2.2.2) isoliert. Im Anschluss an die DNS-Isolierung wurde eine PCR mit den Primern 616V und Hol_189R_Ac, gefolgt von einer asymmetrischen PCR mit dem Primer 31F_mod durchgeführt. Wie bereits beschrieben wurden auch hier jeweils vier PCR-Reaktionen pro Probe angesetzt und für die nachfolgenden Reaktionen vereinigt (siehe Kapitel 3.3). Für die Deca-Priming-Reaktion wurden je DNS-Extraktionsmethode 2 μ g PCR-Fragment eingesetzt, anschließend Cy5-markiert und hybridisiert. Es zeigte sich, dass sich die beiden DNS-Extraktionsmethoden, wenn jeweils aus 5 g Boden DNS isoliert wurde, nicht signifikant unterschieden (siehe Abbildung 39). Durch den Einsatz geringerer Mengen

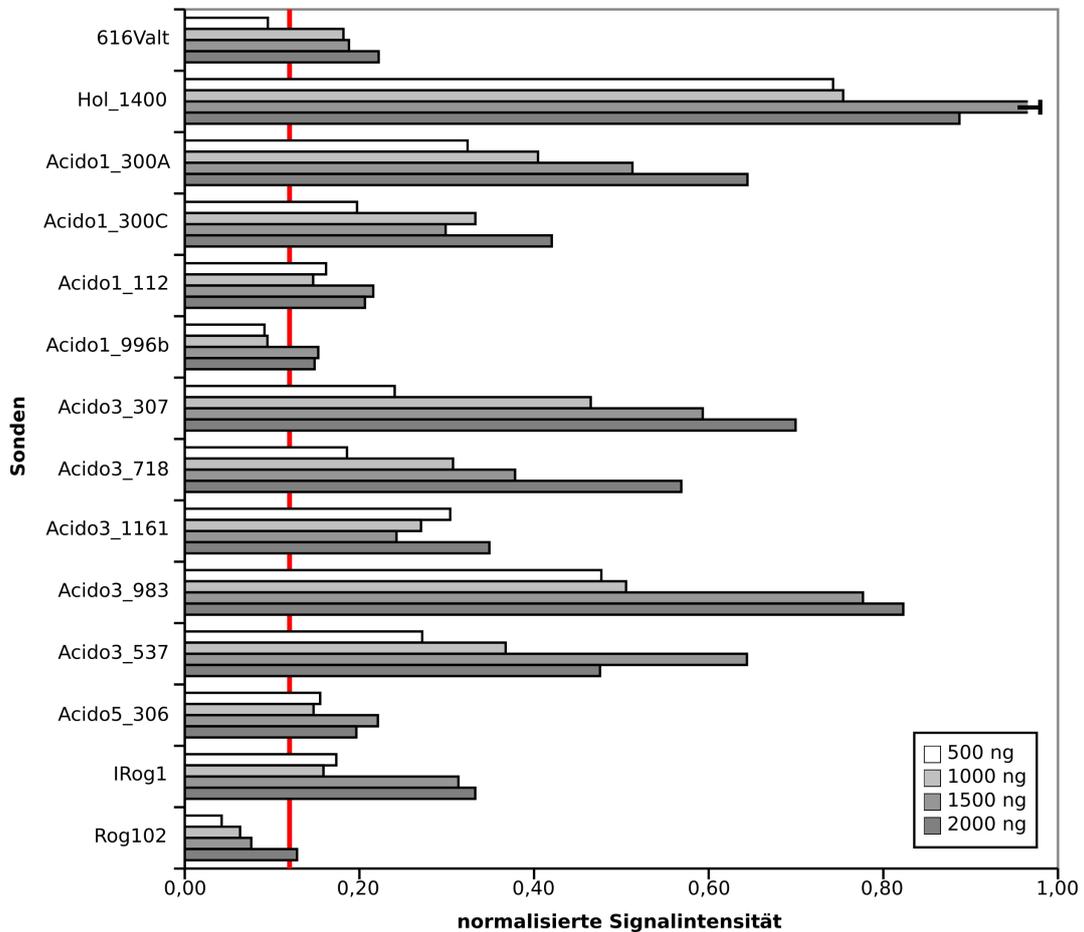


Abbildung 38: Hybridisierungen der Cy5-markierten DNS der Umweltprobe BI (Lysimeter, Bayreuth, D). Die PCR-Reaktionen erfolgten mit der Primerkombination 616V und Hol_189R_Ac und anschließender asymmetrischer PCR mit dem Primer 31F_mod, dann wurde eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Zwischen 500 ng und 2000 ng Probe wurden pro Hybridisierung eingesetzt. Jeweils 500 ng Probe wurden in 115 μ l Hybridisierungspuffer gelöst. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur Sonden dargestellt, die in mindestens einer der Hybridisierungen positiv waren. Die rote Linie markiert den Schwellenwert ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

Bodenprobe (1,2 g statt 5 g) konnten mit dem Protokoll nach Dong *et al.* [41] sogar noch bessere Ergebnisse erzielt werden, wie Abbildung 39 veranschaulicht, deshalb wurde es in dieser Form weiterverwendet.

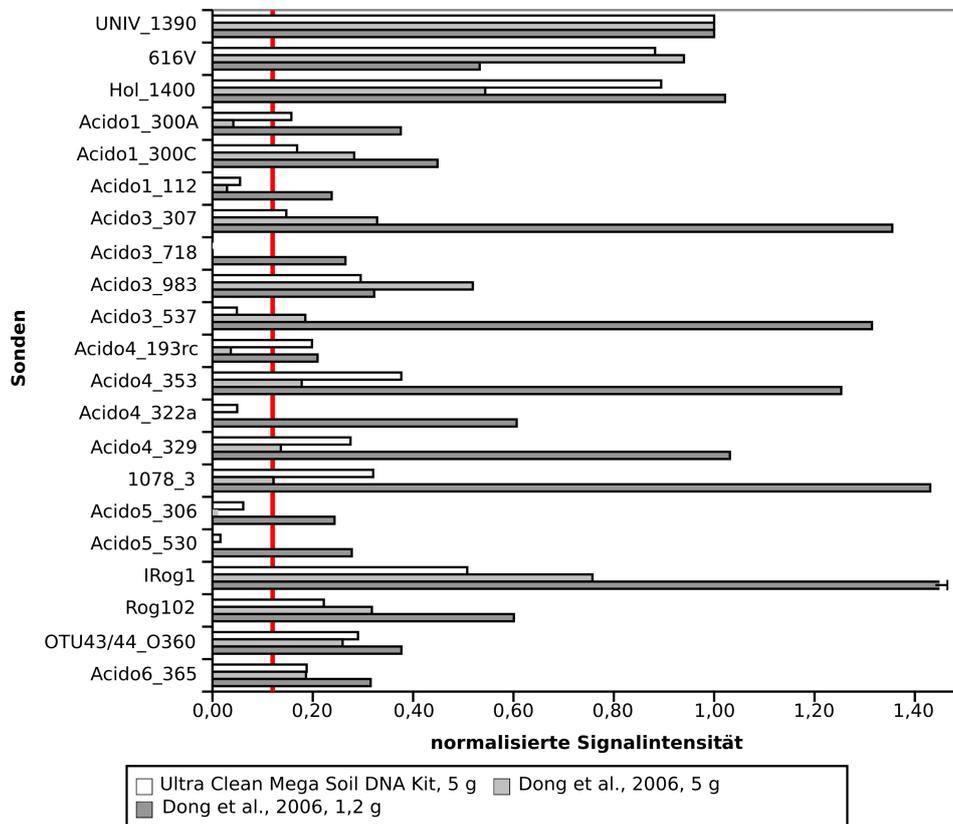


Abbildung 39: Hybridisierungen der Umweltprobe K6-1 (Grünschwaiqe Versuchsstation, Freising, D). Die PCR-Reaktion erfolgte mit der Primerkombination 616V und Hol.189R.Ac und darauf folgender asymmetrischer PCR mit dem Primer 31F_mod, anschließend wurde eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Im Vergleich sind die Hybridisierungsergebnisse nach Anwendung der DNS-Extraktionsmethode nach Dong *et al.* [41] bzw. mit dem Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit. Bei der ersten Methode wurde die DNS aus 1,2 g (hier angewendetes Standardprotokoll) sowie 5 g (Vergleichbarkeit zum Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit) Boden isoliert, mit dem Kit aus 5 g. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur Sonden dargestellt, die in mindestens einer der Hybridisierungen positiv waren. Die rote Linie markiert den Schwellenwert ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

3.5.4.4 Reproduzierbarkeit

Entscheidend für die Analyse komplexer Proben, wie z.B. Böden, sind reproduzierbare Ergebnisse bei Mehrfachhybridisierungen mit dem 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray. Hybridisierungen mit Cy5-markierter DNS einer einzelnen Referenz, wie sie für die Intraphylumspezifitätstests verwendet wurden, waren ausnahmslos zu 100% reproduzierbar, d.h. die Signalmuster stimmten absolut überein. Doch gerade komplexe Umweltproben könnten sich auf Grund unterschiedlicher Initialkonzentration einzelner 16S-rDNS Sequenzen in der PCR als Problem herausstellen. Dem sollte durch verschiedene Schritte entgegengewirkt werden. So wurde immer mehrfach parallel DNS aus den Bodenproben extrahiert und auch parallele PCR-Reaktionen durchgeführt. Diese wurden jeweils im Anschluss vereinigt, sehr gut gemischt und erst dann für folgende Reaktionen eingesetzt. Die Validierung der Reproduzierbarkeit erfolgte durch mehrere Mikroarray-Hybridisierungen einer Bodenprobe. Aus sechs Parallelansätzen wurde aus der Bodenprobe K6-1 (Grünschaige, siehe Kapitel 2.2.2) DNS isoliert nach Dong *et al.* ([41], siehe Kapitel 2.4). Danach wurde jeweils mit den einzelnen DNS-Proben zuerst eine PCR mit den Primern 616V und Hol_189R_Ac (vier Parallelansätze) und dann eine asymmetrische PCR mit dem Primer 31F_mod (ebenfalls vier Parallelansätze) durchgeführt. Die Mehrfachansätze wurden nach jeder Reaktion vereinigt und gut gemischt bevor sie für die nächste Anwendung zum Einsatz kamen. Das PCR-Produkt wurde wie bereits beschrieben markiert (siehe Kapitel 2.11.2) und für die Hybridisierung eingesetzt (siehe Kapitel 2.11.6).

In Abbildung 40 sind alle Sonden und die zugehörigen Signalintensitäten, die in mindestens einem der Parallelversuche ein positives Signal zeigten, aufgeführt. Der Übersichtlichkeit wegen wurden Sonden, die in allen Versuchen negativ waren in dieser Abbildung nicht gezeigt. Insgesamt kann festgestellt werden, dass 90,74% der Sonden reproduzierbare Ergebnisse liefern (positiv oder negativ). Einzelne Sonden zeigen widersprüchliche Ergebnisse, so sind die Sonden Acido1_112, Acido4_193rc, Acido5_306, Acido5_530, und Acido5_140 nur in 50%, 83%, 66%, 50% bzw. 16% der Hybridisierungen positiv (siehe auch Abbildung 40). Dies spricht für eine Anwesenheit der entsprechenden 16S-rDNS Sequenzen an der Grenze der Detektionsfähigkeit des hier verwendeten DNS-Biosensormodells (siehe auch Kapitel 3.5.3.4). Um nun solche Variabilitäten in den Hybridisierungen auszugleichen, wurde grundsätzlich für jede Bodenprobe der Mittelwert aus vier Parallelhybridisierungen gebildet und eine Sonde nur dann als positiv bewertet, wenn dieser Wert den Schwellenwert überschritt.

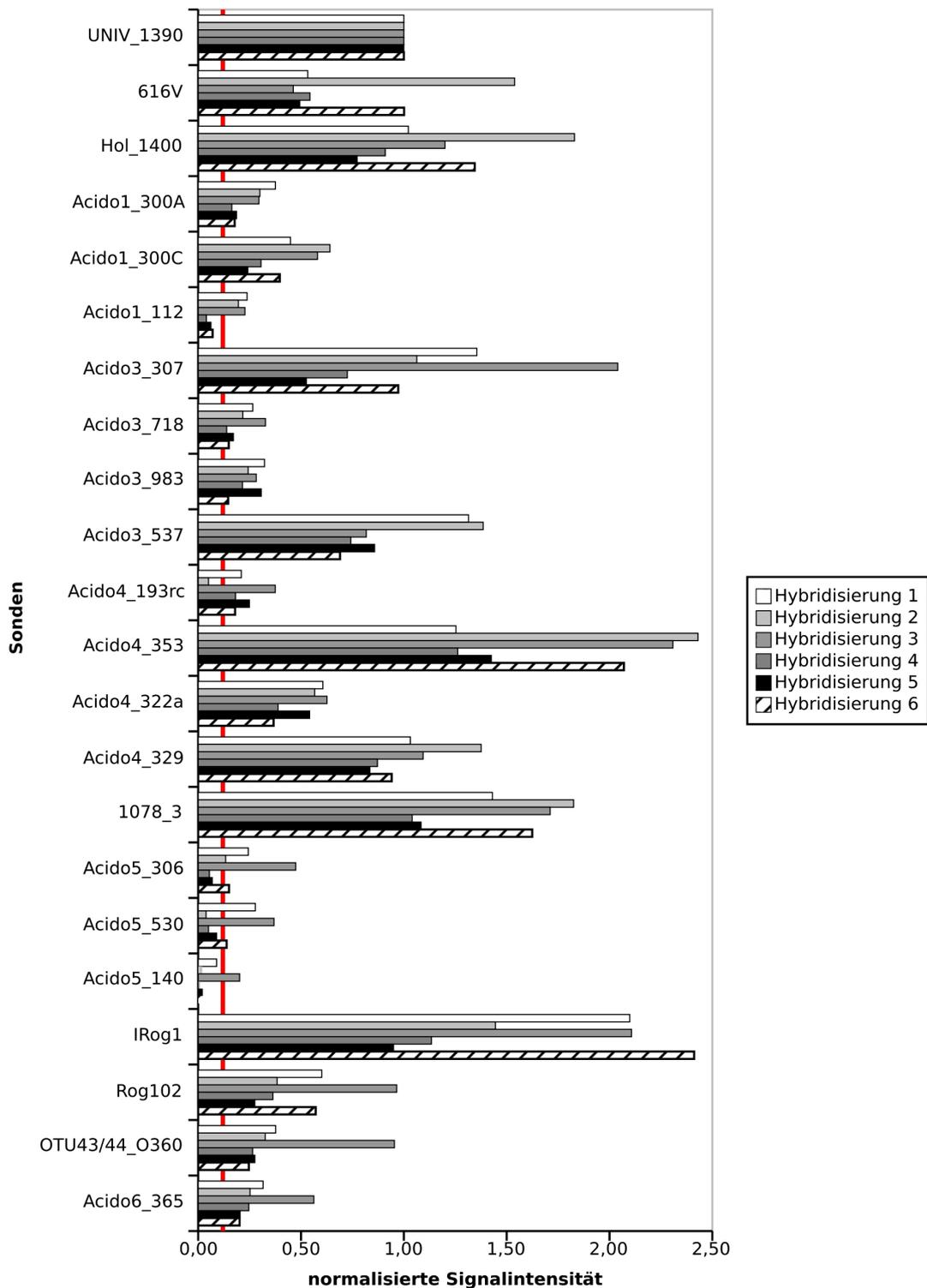


Abbildung 40: Reproduzierbarkeit von Hybridisierungsergebnissen mit der Grünschwaiige Bodenprobe K6-1. Zur Vereinfachung werden nur Sonden gezeigt, die in mindestens einer der sechs durchgeführten Parallelhybridisierungen ein positives Signal zeigten. Die rote Linie im Hintergrund stellt den Schwellenwert dar, ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

3.5.5 Anwendung des *Acidobacteria* 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays für die Untersuchung Bodenproben

Die in Kapitel 3.5.4 evaluierten Hybridisierungsbedingungen für Bodenproben (PCR mit der Primerkombination 616V und Hol_189R_Ac, gefolgt von einer asymmetrischen PCR mit dem Primer 31F_mod, Deca-Priming und Cy5-Markierung, Einsatz von 2 μg PCR-Produkt pro Hybridisierung) wurden nun für die Untersuchung aller zur Verfügung stehenden Proben angewandt. Für jede Probe wurden vier Hybridisierungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen und evtl. selten vorkommende Acidobakterien zu identifizieren. Die Spezifität der auf dem Mikroarray immobilisierten Sonden umfasst, wie bereits in Kapitel 3.5.1 erwähnt, hauptsächlich größere Untergruppen einer *Acidobacteria* „subdivision“. Da eine genauere Einteilung der Acidobakterien auf Grund ihrer großen phylogenetischen Diversität ohne das Vorhandensein kultivierbarer Referenzorganismen nicht sinnvoll erschien ist hier immer von „subdivision“-spezifischen Sonden die Rede, obwohl die Sonden z.T. spezifisch für eine Untergruppe der entsprechenden „subdivision“ sind.

Die Bodenproben BI-BIV stammen aus verschiedenen Lysimetern der Universität Bayreuth (Bayreuth, D, siehe auch Kapitel 2.2.1). Sie unterscheiden sich in der Anzahl der in dem Lysimeter wachsenden Pflanzenspezies von unbewachsen bis zu acht verschiedenen Spezies (siehe auch Tabelle 4). Des Weiteren wurden Proben der Grünschwaige Versuchsstation (Freising, D) untersucht. Diese unterscheiden sich v.a. im Bodentyp, aber auch in der Beweidungsart (ständig/selten, siehe auch Tabelle 5). Zuletzt wurden Proben TNT-kontaminierter Böden im Vergleich zu nicht-kontaminierten Böden untersucht (siehe Kapitel 2.2.3).

3.5.5.1 Hybridisierungen mit der DNS der Lysimeter Bodenproben (Bayreuth, D)

Wie bereits eingangs erwähnt, unterscheiden sich die Lysimeter Bodenproben aus Bayreuth (D) ausschließlich in ihrem Bewuchs. Lysimeter BI war unbewachsen, auf BII wuchsen zwei Pflanzenarten, auf BIII vier Pflanzenarten und auf BIV acht Pflanzenarten (siehe auch Kapitel 2.2.1). Unter Anwendung des neu entwickelten 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays (siehe Kapitel 2.11) sollte nun festgestellt werden, ob die Anzahl der Pflanzenarten oder eine bestimmte Pflanzenart Einfluss auf die Zusammensetzung der acidobakteriellen Gemeinschaft hat.

Wie Abbildung 41 zeigt, nimmt die Diversität der Acidobakterien Gemeinschaft tendenziell zu je mehr Pflanzenarten präsent waren. Fast ausnahmslos dieselben „subdivision“ 1 bzw. 3-spezifischen Sonden zeigen in den Hybridisierungen der DNS der vier Bodenproben positive Signale. Nur in der Lysimeterprobe BI (unbewachsen) kann ein zusätzliches Signal der „subdivision“ 1-spezifischen Sonde Acido1_996a detektiert werden. Dies weist auf eine leicht unterschiedliche Population der „subdivision“ 1 in dieser Bodenprobe im Vergleich zu den anderen drei Lysimeterproben

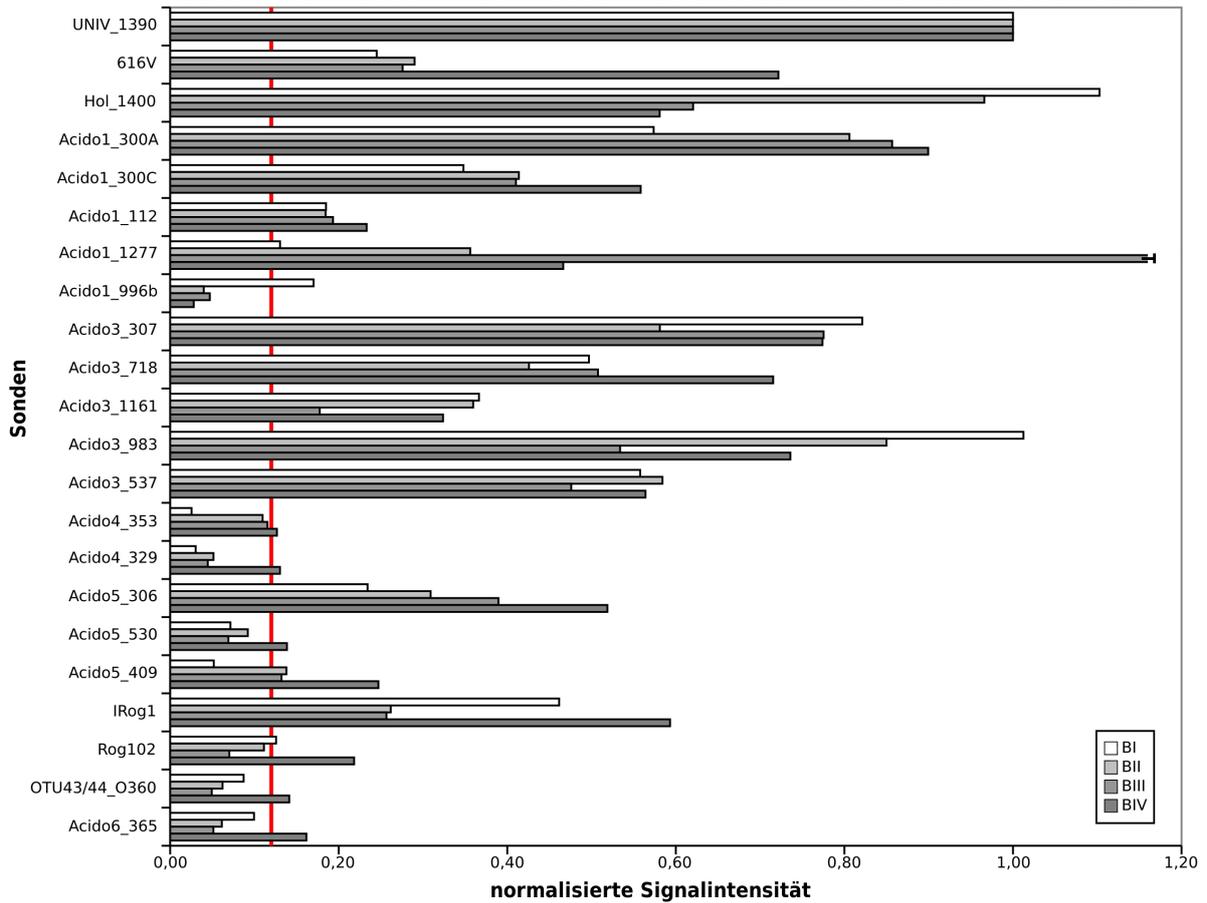


Abbildung 41: Vergleich der acidobakteriellen Diversität der Bodenproben BI-BIV (Lysimeter, Bayreuth, D). Die PCR erfolgte mit der Primerkombination 616V und Hol_189R_Ac und anschließender asymmetrischer PCR mit dem Primer 31F_mod, dann wurde eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Aus jeweils vier Parallelhybridisierungen wurde der Mittelwert der einzelnen Signalintensitäten pro Sondenspot gebildet und eine Sonde nur dann als positiv bewertet, wenn dieser Wert den Schwellenwert überschritt. Zur Vereinfachung werden nur Sonden gezeigt, die in mindestens einer der Hybridisierungen ein positives Signal zeigten. Die rote Linie stellt den Schwellenwert dar, ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

hin. Ebenfalls immer vorhanden sind Vertreter der „subdivision“ 5 (positives Signal der Sonde Acido5_306). Allerdings wird dieses Signal nur in den Proben BII, BIII und BIV durch weitere „subdivision“ 5-spezifische Sonden (Acido5_409, Acido5_530) verifiziert. Auch „subdivision“ 6 Vertreter können in jeder Probe beobachtet werden (IRog1, Rog102). Ebenfalls deutlich zu sehen in Abbildung 41 ist hier eine Zunahme der Diversität dieser „subdivision“ mit der Pflanzendiversität. Alle „subdivision“ 6-spezifischen Sonden auf dem Chip zeigen ein positives Signal in Hybridisierungen der Lysimeterprobe BIV. Acidobakterien der „subdivision“ 4 sind in den Proben BIII sowie BIV nachweisbar (Acido4_353). Auch hier zeigt die Probe BIV die höchste Diversität: zwei weitere „subdivision“ 4-spezifische Sonden zeigen positive Signale (Acido4_353 und Acido4_329).

3.5.5.2 Hybridisierungen der Bodenproben Grünschwaige Versuchstation (Freising, D)

Die Grünschwaige Bodenproben sollten vor allem der Feststellung dienen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Bodentyp (Niedermoor- bzw. Mineralboden) und der Zusammensetzung der acidobakteriellen Gemeinschaft besteht. In zweiter Linie wurde betrachtet, ob die Art der Beweidung (ständig bzw. selten) einen Einfluss auf die Diversität der Acidobakterien haben kann. Hierzu wurden insgesamt sieben Proben genommen (K6-1, K6-2, K6-3, K8-1, K8-2, K8-3 und K15, siehe auch Kapitel 2.2.2). Die Proben K6-1, K6-2 und K6-3 sind Niedermoorböden. Der Standort der Probennahme von K6-1 und K6-2 war ständig beweidet, während K6-3 in der Pufferzone lag und deshalb nur sehr selten beweidet war. Sowohl die K8 Proben, als auch K15 sind Mineralböden. K15 ist eine Weideparzelle, die zur absoluten Reserve zählt und deshalb nur äußerst selten beweidet wird. Genau wie bei den K6 Bodenproben, sind die Proben K8-1 und K8-2 aus ständig beweideten Parzellen entnommen worden, während die K8-3 Probe aus einem nicht-beweideten Bereich stammt.

Abbildung 42 zeigt die Hybridisierungsergebnisse für diese Bodenproben. Evident ist, dass in allen Bodenproben Acidobakterien der „subdivisions“ 3, 4 und 6, wenn auch unterschiedlicher Zusammensetzung vorhanden sind. Vertreter der „subdivision“ 1 können nur in den Bodenproben K6-3 und K8-3 anhand der Signalkombination von Acido1_300A, Acido1_300C, Acido1_112 und Acido1_1277 eindeutig nachgewiesen werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Signalmustern der untersuchten DNS der einzelnen Bodentypen Niedermoorboden und Mineralboden kann nicht festgestellt werden. Allenfalls ist eine leichte Tendenz höherer Diversität der Vertreter der „subdivision“ 6 in den Mineralböden zu erkennen. Aber auch die Probe K6-1 (Niedermoor) zeigt eine hohe „subdivision“ 6 Diversität, so dass die Ursache hier nicht einwandfrei in den unterschiedlichen Böden zu vermuten ist (siehe Abbildung 42). Auch die Art der Beweidung scheint keinen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria* Gemeinschaft zu besitzen. Die Probe K6-2 (ständig beweidet,

Probennahme direkt an der Tränke) zeigt zwar eine deutlich geringere Diversität als die beiden anderen K6-Proben (siehe Abbildung 42), doch kann dies nicht für die K8 Proben nachvollzogen werden. Hier ist die Diversität der beweideten und unbeweideten Flächen in etwa äquivalent. Für einen Einfluss der Beweidung spricht, dass in den selten beweideten Pufferzonen K6-3 und K8-3 eine zusätzliche „subdivision“ 1-spezifische Sonde ein Signal zeigt (Acido1_1277, siehe Abbildung 42), die bei keiner der anderen Grünschwaige Bodenproben beobachtet werden konnte. Die Beweidung könnte also eine Rolle spielen, aber es müssen zusätzlich noch weitere Faktoren, wie Pflanzenbewuchs in Betracht gezogen werden.

3.5.5.3 Hybridisierungen 2,4,6-Trinitrotoluen-kontaminierter Bodenproben

Für den Vergleich TNT-kontaminierter Böden mit nicht kontaminierten wurden freundlicherweise Bodenproben von Dr. Isabelle George (Katholische Universität von Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Proben stammen von kontaminierten bzw. nicht-kontaminierten Flächen in Frankreich bzw. Spanien (siehe auch Kapitel 2.2.3). In Tabelle 23 ist die jeweilige TNT-Konzentration der einzelnen Proben aufgelistet. Ein Vergleich dieser Proben sollte zeigen, wie sich die Diversität der Acidobakterien mit zunehmender TNT-Kontamination verändert und ob Gruppen bzw. einzelne Vertreter der *Acidobacteria* als potentielle Indikatorkeime für eine Kontamination mit TNT in Frage kommen.

Probenname	2,4,6-Trinitrotoluen (mg/kg Boden)
UCL	n.d.
REF	n.d.
KF4	2
KL2	23022
KX1	26561
OUT	n.d.
IN	1570
J29	125

n.d. = nicht detektiert

Tabelle 23: 2,4,6-Trinitrotoluen-Konzentration verschiedener Böden aus Frankreich (REF, KF4, KL2, KX1) bzw. Spanien (OUT, J29, IN) zur Verfügung gestellt von Dr. Isabelle George (Katholische Universität von Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgien)

Es konnte gezeigt werden, dass die Diversität der acidobakteriellen Gemeinschaft drastisch von der Kontamination mit TNT beeinflusst wird (siehe Abbildung 43). Die nicht kontaminierten Proben REF und OUT zeigen eine Verteilung der *Acidobacteria* ähnlich wie sie bereits in anderen Bodenproben beobachtet wurde (siehe Kapitel 3.5.5.1 und 3.5.5.2). Vertreter der „subdivisions“ 1, 3, 4, 5 und 6 konnten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 43). Eine Konzentration von 2 mg TNT

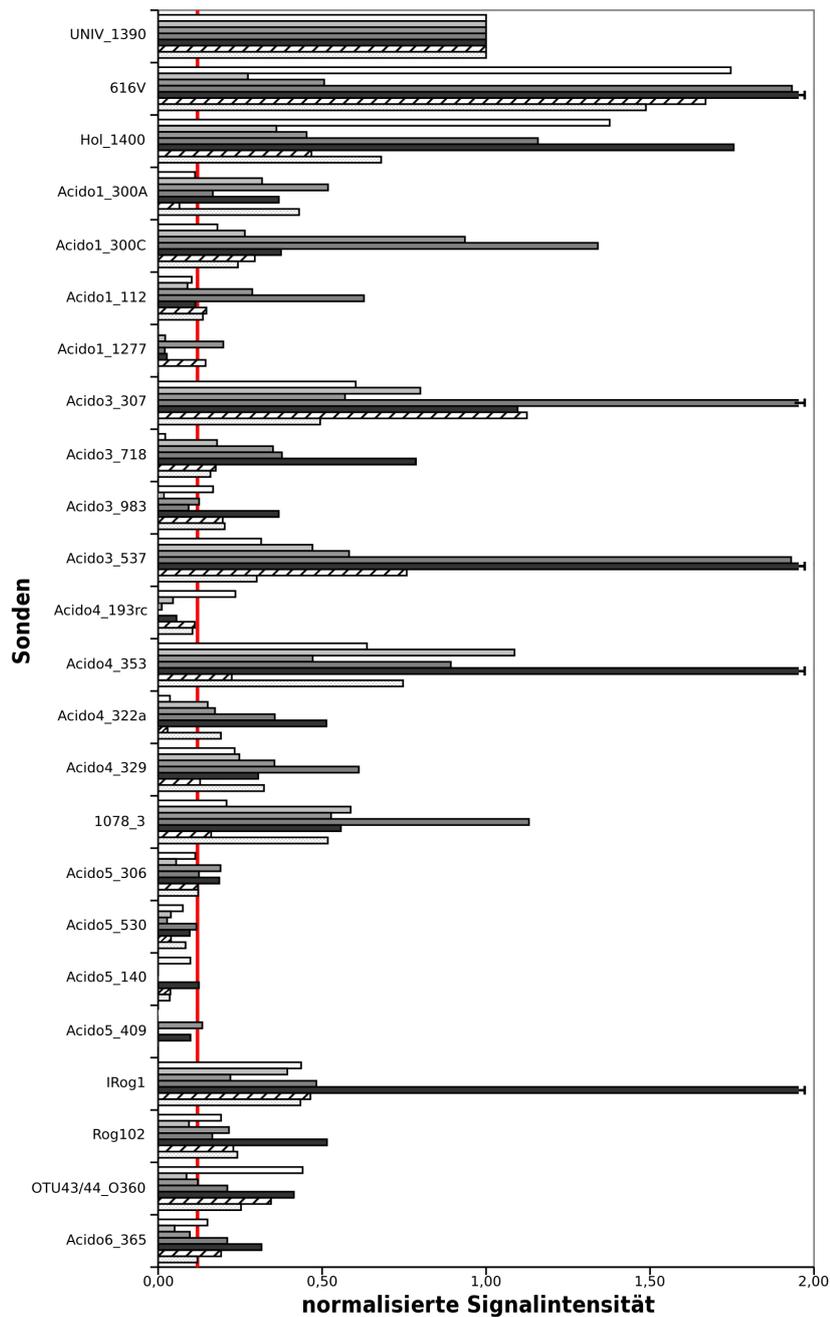


Abbildung 42: Vergleich der acidobakteriellen Diversität der Bodenproben K6, K8 und K15 (Grünswaige Versuchsstation, Freising, D). Die PCR erfolgte mit der Primerkombination 616V und Hol_189R_Ac und anschließender asymmetrischer PCR mit dem Primer 31F_mod, dann wurde eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Aus jeweils vier Parallelhybridisierungen wurde der Mittelwert der einzelnen Signalintensitäten pro Sondenspot gebildet und eine Sonde nur dann als positiv bewertet, wenn dieser Wert den Schwellenwert überschritt. Zur Vereinfachung werden nur Sonden gezeigt, die in mindestens einer der Hybridisierungen ein positives Signal zeigten. Die rote Linie im Hintergrund stellt den Schwellenwert dar, ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

pro kg Boden (Probe KF4) scheint bereits einen schwachen Einfluss auf diese Zusammensetzung zu haben. Die „subdivision“ 5-spezifischen Sonden Acido5_140 und Acido5_530, welche in den nicht kontaminierten Bodenproben noch positive Signale zeigten, können nicht mehr detektiert werden. Dafür kann ein Signal der Sonde Acido1_189 („subdivision“ 1) beobachtet werden. Diese Signalverlagerung könnte allerdings auch auf den anderen Probennahmeort zurückzuführen sein, da solche geringfügigen Unterschiede auch bei anderen Bodenproben beobachtet werden konnten (siehe Kapitel 3.5.5.1 und 3.5.5.2). Bemerkenswert ist jedoch, dass ab einer Konzentration von 125 mg TNT pro kg Boden (Probe J29) eine drastische Abnahme der acidobakteriellen Diversität stattfindet (siehe Abbildung 43). Im Boden J29 sind noch Signale der hierarchisch höheren Sonden Hol_1400, Acido1_300A, Acido1_300C und Acido5_306 zu beobachten, eine genaue Zuordnung zu *Acidobacteria* „subdivisions“ nach dem Mehrfachsondenkonzept ist jedoch nicht mehr möglich. Bei einer Konzentration von 1570 mg TNT pro kg Boden (Probe IN) kommt es zu einer Verschiebung des Signalmusters. Dieselben Sonden signale wie für die Probe J29 können auch jetzt wieder detektiert werden, aber zusätzlich zeigt die Sonde Hol_1463 („subdivision“ 10) ein positives Signal. In den beiden Proben (KL2 und KX1) mit der höchsten TNT-Konzentration können ebenfalls Signale dieser Sonde beobachtet werden, die anderen Sonden bis auf Hol_1400 (*Acidobacteria*-spezifisch) zeigen jedoch keine Signale mehr (siehe Abbildung 43). Die Sonde Hol_1463 konnte in keiner anderen untersuchten Umweltprobe nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von Acidobakterien wird durch das positive Signal der Sonde Hol_1400 bestätigt.

3.5.6 Erweiterung des neu-entwickelten 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays

Da die erstellten Klondatenbanken weitere Testkulturen für potentielle Sonden lieferten, konnte der ursprüngliche Mikroarray um weitere 45 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden erweitert werden. Diese Sonden sind von engerer Spezifität als die auf dem ursprünglichen Mikroarray und sollen daher eine gründlichere Identifizierung der einzelnen Acidobakterien ermöglichen. Die konstruierten Sonden wurden wie bereits in Kapitel 3.5.2 beschrieben mit dem ARB-Software Paket entwickelt und anschließend mit dem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor evaluiert. Sonden, die mit dem entsprechenden 16S-rDNS Referenzklon kein Signal zeigten, wurden ausgeschlossen (siehe auch Tabelle 30 im Anhang). Nur 11,1% der konstruierten Sonden erwiesen sich als zu schwach (d.h. die Signale lagen unter dem Schwellenwert) für weitere Hybridisierungen und wurden deshalb nicht weiterverwendet. Nach Abschluss der Sondenevaluierung sollte der erweiterte Mikroarray ebenfalls auf Umweltproben übertragen werden. Dazu wurde wie schon bei den ersten Bodenproben-Evaluierungen (siehe Kapitel 3.5.4), die Grünschwaiße Bodenprobe K6-1 verwendet. Die Bedingungen waren ebenfalls die selben: 25% Formamid im Hybridisierungspuffer, Hybridisierung bei 40°C, Einsatz von 2 mg Cy5-markiertem PCR-Produkt (siehe auch Kapitel 2.11). Aus Abbildung 44 ist ersichtlich, dass ausschließlich die Positivkontrollen (UNIV_1390, Hol_1400, Acido6_300G und Acido6_300T) Signale zeigen. Mindestens eine der neu konstruierten Sonden (Acido6_182) hätte positiv reagieren sollen, da in der K6-1 Klondatenbank

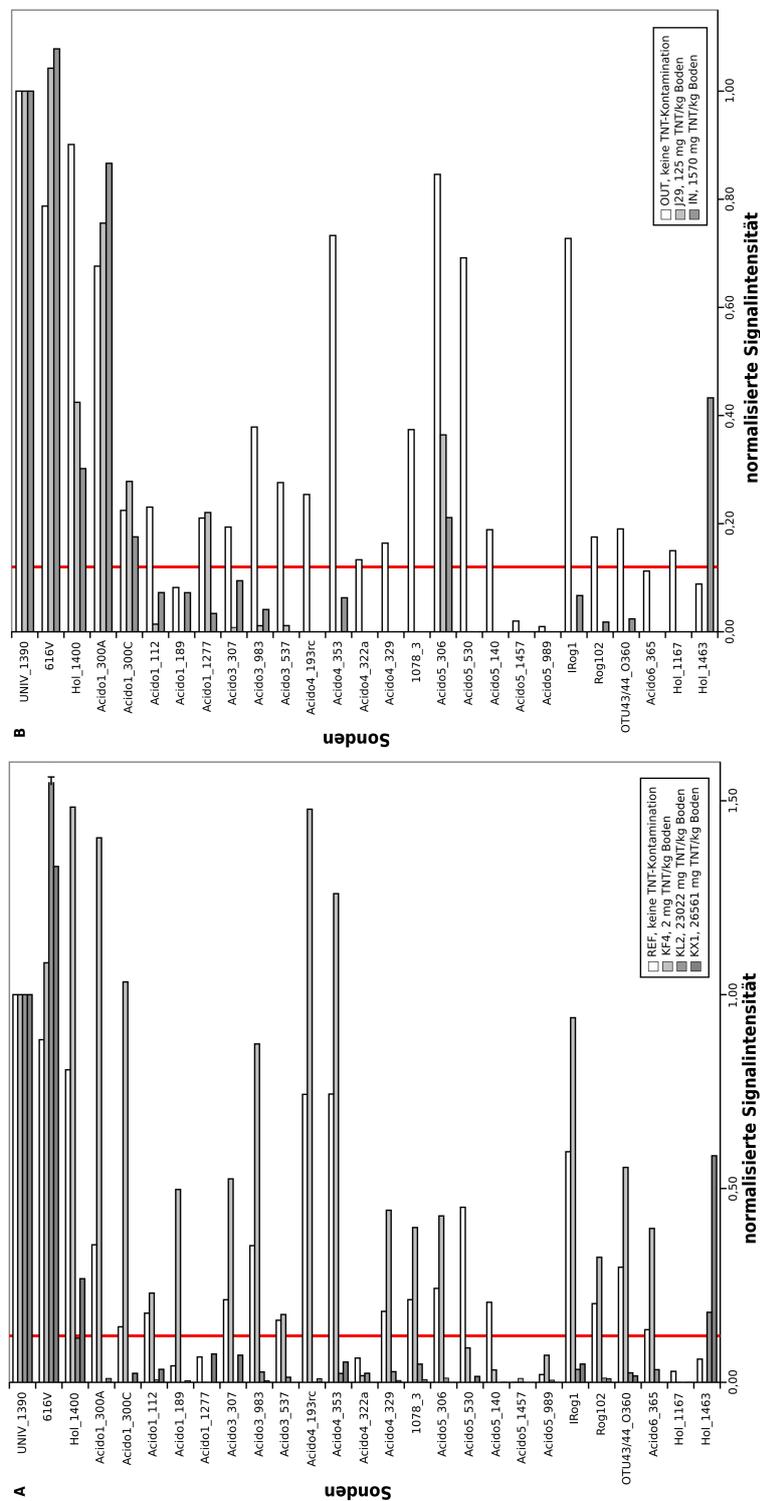


Abbildung 43: Vergleich der acidobakteriellen Diversität TNT-kontaminierter Bodenproben aus Frankreich (A) und Spanien (B) mit nicht-kontaminierten Proben (genauere Beschreibung der Proben siehe Kapitel 2.2.3). Die Proben wurden von Dr. Isabelle George (Katholische Universität von Louvain, Louvain-la-Neuve, BE) zur Verfügung gestellt. Die PCR erfolgte mit der Primerkombination 616V und Hol_189R_Ac und anschließender asymmetrischer PCR mit dem Primer 31F_mod, dann wurde eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Aus jeweils vier Parallelhybridisierungen wurde der Mittelwert der einzelnen Signalintensitäten pro Sondenspot gebildet und eine Sonde nur dann als positiv bewertet, wenn dieser Wert den Schwellenwert überschritt. Zur Vereinfachung werden nur Sonden gezeigt, die in mindestens einer der Hybridisierungen ein positives Signal zeigten. Die rote Linie im Hintergrund stellt den Schwellenwert dar, ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde.

entsprechende 16S-rDNS Klone gefunden wurden. Die Hybridisierung führte vermutlich zu keinen positiven Signalen, weil die Detektionsgrenze nicht überschritten wurde. Es sind also noch weitere Modifikationen der Methode nötig um eine Detektion einzelner Kleingruppen bzw. Spezies der *Acidobacteria* zu gewährleisten.

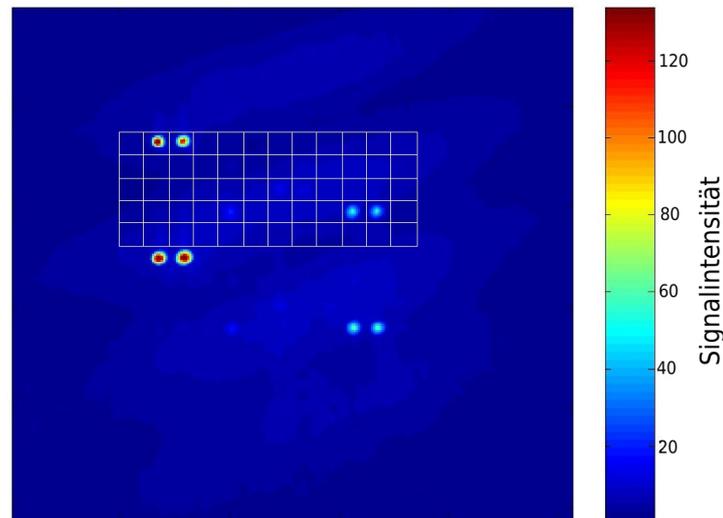


Abbildung 44: Hybridisierungsbild (plus Parallelversuch) der Umweltprobe K6-1 (Grünschaige Versuchsstation, D) mit dem weiter-entwickelten Spezies-spezifischen Chip. Die PCR-Reaktion erfolgte mit der Primerkombination 616V und Hol_189R_Ac und anschließender asymmetrischer PCR mit dem Primer 31F_mod, dann wurde eine Deca-Priming Reaktion durchgeführt und das Produkt Cy5-markiert. Ausschließlich die Positivkontrollen (UNIV_1390, Hol_1400, Acido6_300G und Acido6_300T) zeigen Signale. Die Anordnung der Sonden auf dem Mikroarray kann Tabelle 32 im Anhang entnommen werden..

4 Diskussion

4.1 Vergleich der DNS-Extraktionsmethoden

Die Qualität einer Bodenprobe ist abhängig von Veränderungen der Temperatur, Feuchte, Substratverfügbarkeit, Substrattransport usw., d.h. eine Änderung der konkreten Situation, wie z.B. die Probennahme und Trockenheit, führt zu einem Anstieg von Stress bei der Bakterienpopulation. Zudem überleben Bodenbakterien besser bei niedrigen Temperaturen [175]. Deshalb sollte die Probennahme am besten bei feuchter Witterung und kühlen Temperaturen, z.B. frühmorgens, durchgeführt werden, um eine Stressreaktion und damit Verfälschung der bakteriellen Gemeinschaft im Vorfeld einer DNS-Extraktion zu verhindern bzw. zu minimieren. Auch bei der Probenlagerung können sich Diversitätsverlagerungen manifestieren wie Rochelle *et al.* [144] zeigten. Die aerobe Lagerung für 24 h vor dem Einfrieren einer Probe aus Tiefseesediment führte zu einer deutlichen Veränderung des Diversitätsspektrums: v.a. Beta- und Gammaproteobakterien wurden detektiert, während die Lagerung bei 16°C in einer Anreicherung von Alphaproteobakterien resultierte. Deshalb wurden die Bodenproben sofort nach der Entnahme bei -20°C eingefroren, da diese Art der Probennahme und die anschließende Lagerung ein hohes Diversitätsspektrum erhält [144].

Doch auch die Methode der DNS-Extraktion kann weitere Fehler einführen. Verschiedentlich konnte gezeigt werden, dass durch ungenügende oder präferentielle Zellyse, fragmentierte DNA (durch z.B. zu rigorose Bedingungen, wie sie für Gram-positive Bakterien notwendig sind, kann die DNS Gram-negativer fragmentiert werden), sowie biotische und abiotische Bestandteile des Bodens (anorganische Partikel, Huminstoffe), die DNS-Extraktionsmethode einen signifikanten Einfluss auf die korrekte Reflexion der Artenvielfalt in einer Probe hat [49]. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit drei verschiedene DNS-Extraktionsmethoden (nach Zhou *et al.*, [190]; nach Dong *et al.* [41]; Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit) auf ihre Effizienz, v.a. Qualität und Menge der isolierten DNS, hin mittels Gelelektrophorese überprüft (siehe Kapitel 3.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Methode nach Zhou *et al.* [190] inadäquate Ergebnisse lieferte, vermutlich da z.B. kein Schritt, in dem die Huminstoffe entfernt wurden, erfolgte (siehe Tabelle 16), weshalb sie nicht weiterverwendet wurde. Die verbliebenen beiden Methoden entsprachen sich in der Effizienz in etwa. Dies liegt vermutlich an der Ähnlichkeit der Protokolle: zuerst werden Inhibitorstoffe entfernt und erst im Anschluss die Zellen mit Hilfe von Glasperlen lysiert (siehe Tabelle 16). Deshalb wurde als weiterer Vergleichsparameter die Hybridisierung mit dem neu-entwickelten Oligonukleotidmikroarray hinzugezogen. Dabei zeigte sich, dass nach der DNS-Isolierung mit der Methode nach Dong *et al.* [41] deutlich mehr Sondensignale sichtbar waren (siehe auch Kapitel 3.5.4.3), weshalb die so isolierte DNS auch zur Erstellung der Klondatenbanken verwendet wurde (siehe Kapitel 3.5.4.3).

4.2 Konstruktion einer 16S- und 23S-rDNS Klondatenbank

Mit der Konstruktion von 16S-rDNS bzw. 23S-rDNS Klondatenbanken wurden zwei Hauptziele verfolgt: zum einen die Verfügbarkeit von 16S-rDNS bzw. 23S-rDNS Klonen zur Evaluierung der Mikroarray- bzw. FISH-Oligonukleotidsonden zu erhöhen und zum anderen Informationen zum Plausibilitätsvergleich des neu-konstruierten Mikroarrays zu erhalten.

Neben der Probennahme und DNS-Extraktion (siehe Kapitel 4.1) hat vor allem die PCR-Technik einen Einfluss auf die Diversität von Sequenzen in der Klondatenbanken. Durch unterschiedliche Denaturierung verschiedener Sequenzen, aber auch unterschiedliches Annealing des Primers an die Zielsequenzen, bereits degradierte Ziel-DNS, in der Probe vorhandene Inhibitoren, wie Huminsäuren, oder die geringe Anzahl beprobter Genome kann es zu einer selektiven und/oder präferentiellen Amplifizierung von 16S-rDNS Sequenzen kommen [142]. Auch die Größe der Klondatenbank spielt eine entscheidende Rolle bei der Interpretation der Diversitätsverhältnisse. Verschiedene Strategien wurden verfolgt, um die Einflüsse solcher Fehlerquellen zu reduzieren. Um die Amplifikation geringer vorhandener 16S-rDNS Sequenzen in der Probe zu gewährleisten, wurde die Proben-DNS, wenn möglich, unverdünnt eingesetzt sowie immer mehrere Parallelansätze (sowohl bei der DNS-Extraktion als auch PCR, [2]) durchgeführt und vor einer weitergehenden Analyse vereinigt. Durch die Modifikation der Sequenzen bereits publizierter Primer (31f [12] und Hol.189R [193]) und das Herabsetzen der Annealingtemperatur auf 49°C während der PCR wurde sicher gestellt, dass auch 16S-rDNS Sequenzen mit Fehlpaarungen zur Primersequenz amplifiziert werden konnten (siehe Abbildung 11). Des Weiteren wurde den in Bodenproben enthaltenen Huminsäuren, die die DNS-Polymerase bereits in kleinsten Konzentrationen hemmen, durch die Anwendung eines neueren DNS-Extraktionsprotokolls [41], in welchem die Huminsäuren mittels Aluminiumsulfat bereits vor der Zellyse ausgefällt werden (siehe auch Kapitel 2.4.3), entgegengewirkt. Zusätzlich wurden PCR-Enhancer (wie BSA (Bovines Serum Albumin) und TMAcI (Tetramethylammoniumchlorid)) eingesetzt. Zur Detektion von Chimären wurden die Sequenzen in 300 b lange überlappende Abschnitte eingeteilt und auf deren Grundlage im Anschluss phylogenetische Bäume rekonstruiert. Zusammengehörige Sequenzen, die in unterschiedliche „subdivisions“ der *Acidobacteria* oder gar unterschiedliche Phyla gruppierten, wurden als Chimären identifiziert und von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Zwischen den Klondatenbanken der Lysimeterbodenproben BI, BII, BIII und BIV konnten nur sehr leichte Unterschiede beobachtet werden (siehe auch Kapitel 3.3). Sequenzen der „subdivisions“ 1, 3, 4 und 6 sind in ähnlichen Verhältnissen in allen vier Klondatenbanken vertreten, wobei die „subdivisions“ 1 und 3 dominierten. In der Klondatenbank BII konnten zusätzlich noch Vertreter der „subdivision“ 5 und in der Klondatenbank BIV Vertreter der „subdivision“ „13“ identifiziert werden. Im Gegensatz dazu sind die Klondatenbanken der Grünschwaige Bodenproben (K6-1, K6-2, K6-3, K8-1, K8-2, K8-3 und K15) durch eine Dominanz von „subdivision“ 4, „subdivision“ 6 und in geringerer Anzahl „subdivision“ 3 Klonen ausgezeichnet. Diese drei „subdi-

visions“ sind häufig am stärksten in Bodenproben vertreten [11]. Daneben treten noch vereinzelt „subdivision“ 5 und „subdivision“ „13“ Klone auf. Genau wie bei den Bayreuth Klondatenbanken kann zwischen den Grünschwaige Klondatenbanken kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei einem Vergleich der Bayreuth Bodenproben mit den Grünschwaige Bodenproben fällt jedoch auf, dass die dominanten Acidobakterien („subdivision“ 1) der Bayreuther Proben in den Grünschwaige Proben nicht nachgewiesen werden konnten. Mittels FISH konnten Vertreter dieser „subdivision“ jedoch auch in der Bodenprobe K8-1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16) und auch bei Mikroarrayhybridisierungen sind Signale „subdivision“ 1-spezifischer Sonden detektierbar. Die unterschiedlichen DNS-Extraktionsmethoden scheinen nicht für das Fehlen dieser Acidobakteriengruppe verantwortlich zu sein. Die DNS der Bayreuth Bodenproben wurde mit dem Ultra CleanTM Mega Soil DNA Kit extrahiert, während die DNS der Grünschwaige Bodenproben mit dem Protokoll nach Dong *et al.* [41] isoliert wurde. Mikroarrayhybridisierungen zeigten, dass nach einer Extraktion der DNS mit der Methode nach Dong *et al.* [41] mehr Signale auftraten als nach einer Extraktion mit dem Kit (siehe auch Kapitel 3.5.4.3). Dies widerspricht der Annahme, dass Vertreter der „subdivision“ 1 in den Grünschwaige Klondatenbanken aufgrund zu großer Rigorosität des DNS-Isolierungsprotokolls fehlten. Auch eine Abhängigkeit von jahreszeitlich bedingten Unterschieden, wie sie von Lipson *et al.* [98] für eine alpine Bodenprobe beschrieben wurde, kann ausgeschlossen werden, da die Proben jeweils im Juni genommen wurden. Die Ursache kann vielmehr in der Klondatenbankgröße vermutet werden. Da nur eine verhältnismäßig kleine Anzahl von Klonen analysiert werden konnte, kann die tatsächliche Biodiversität nicht komplett erfasst werden (siehe Kapitel 3.3). Der zu geringe Umfang der Klondatenbanken wird auch durch die Hybridisierungen auf dem Mikroarray bestätigt, die z.T. ein wesentlich größeres Spektrum an Acidobakterien als die Klondatenbanken zeigen, z.B. wurden in der Klondatenbank K6-1 ausschließlich Acidobakterien der „subdivisions“ 4 und 6 gefunden, während in den Hybridisierungen noch zusätzlich die „subdivisions“ 3 und 5 detektierbar waren (vergleiche Tabelle 19 und Abbildung 42). Dessen ungeachtet geben die Klondatenbanken einen wichtigen Überblick, um die Ergebnisse der Mikroarrayexperimente zu verifizieren.

4.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung - Evaluierung neuer Oligonukleotidsonden für das Phylum *Acidobacteria* und deren Anwendung auf Bodenproben

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit Oligonukleotidsonden wird häufig zur Untersuchung der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in verschiedenen Umweltsystemen verwendet. Durch solche Ganz-Zell-Hybridisierungen mit rRNS Oligonukleotidsonden ist es möglich, die Abundanz und Zellmorphologie verschiedener bakterieller Taxa mikroskopisch zu bestimmen [7].

Die Evaluierung neu-konstruierter 16S-rRNS gerichteter Oligonukleotidsonden für das Phylum *Acidobacteria* ist essentiell im Hinblick auf deren direkte Anwendung auf Umweltproben. Da auf Grund der schwierigen Kultivierbarkeit der Acidobakterien nur drei Reinkulturen (*A. capsulatum*, *G. fermentans* und *H. foetida*) für solche Tests zur Verfügung standen, wurden die Sonden mit Hilfe von Clone-FISH [156] evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration von IPTG (auf 2 mM) die Effizienz der Clone-FISH verbesserte: ca. 10% mehr Zellen zeigten nach der Hybridisierung positive Signale. Im Anschluss wurde der optimale Formamidgehalt der jeweiligen Sonde nach der Anzucht der Ziel-Zellen durch Formamidreihen bestimmt (siehe Kapitel 3.4.2 und Tabelle 28 im Anhang).

Die Spezifität der Sonden wurde zuerst *in silico* mit dem ARB-Modul „Probe Match“ ermittelt, gefolgt von *in situ* Hybridisierungen mit Nicht-Ziel-Zellen, d.h. Reinkulturen von Referenzorganismen (z.B. *Rhizobium leguminosarum* und *A. capsulatum*, siehe auch Tabelle 1) sowie entsprechenden acidobakteriellen 16S-rDNS Klonen. Die Hybridisierungen bestätigten sowohl die Intra- als auch die Interphylumspezifität der entwickelten *Acidobacteria* Oligonukleotidsonden unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen.

Der Anwendung der evaluierten Sonden für FISH auf Bodenproben stehen jedoch zahlreiche Probleme gegenüber, u.a. die Unterscheidung von Zielsignalen von unspezifischen Signalen wie Autofluoreszenz von Partikeln (z.B. [4]) sowie die Visualisierung und das Zählen der Zielzellen innerhalb dicker Bodenschichten und Zellaggregate, welche die Zellen verdecken [38]. Deshalb muss die Vorbereitung der Bodenprobe für *in situ* Hybridisierungen nicht nur wie üblich die Zellmorphologie konservieren und die Diffusion der Sonde durch die Zellhülle gewährleisten [38], sondern unbedingt auch eine ausreichende Trennung gewünschter Bakterienzellen von störenden Bodenpartikeln zur Folge haben. Der Nachteil aller beschriebenen Methoden ist, dass durch diese Trennung eine Beobachtung der Bakterien in ihrem ursprünglichen Habitat und ihrer ursprünglichen Zusammensetzung nicht mehr möglich ist. Abhängig von der Methode kann das Auflösen der Assoziation zwischen Partikel und Zelle durch mechanische Einwirkung (z.B. Mörsern), durch verschiedene Agenzien (z.B. Polyethylenglycol oder Methanol), aber auch durch Dichtegradientenzentrifugation geschehen. Es zeigte sich, dass v.a. agenzienbasierte Trennungsmethoden, wie die nach McDonald *et al.* [118] und Lunau *et al.* [111], die besten Resultate lieferten

(siehe auch Tabelle 20). Im Vergleich zu den anderen hier evaluierten Methoden konnten mehr intakte, frei vorliegende Zellen detektiert werden bei gleichzeitiger Verringerung der Anzahl an Bodenpartikeln. Zudem waren die Bodenpartikel nicht mehr so kompakt, sondern in ihrer Struktur eher aufgelöst. Die Auftrennung der Bakterienzellen und Partikel nach unterschiedlicher Dichte mit Hilfe von Nycodenz[®] (siehe Kapitel 2.15.3) entsprach der Effizienz dieser beiden Protokolle. Damit genug Zellen für die FISH vorhanden waren, musste die Probe jedoch auf einen Filter aufgebracht werden, der wiederum auf Grund seiner Struktur v.a. die Bildaufnahme erschwert. Zusätzlich können die Signale bakterieller Zielzellen nicht mit Hilfe der Durchlichtaufnahme bzw. DAPI-Färbung verifiziert werden, da die Autofluoreszenz des Filters dem Fluoreszenzsignal von DAPI entspricht (siehe Abbildung 15), so dass den agenzienbasierten Methoden der Vorzug gegeben wurde. Als weiterer Pluspunkt des Protokolls nach Lunau *et al.* [111] ist der wesentlich kürzere zeitliche Aufwand (v.a. im Vergleich zum Protokoll nach McDonald *et al.* [118]) zu vermerken. Sowohl die Methanolmethode [111] als auch die Methode nach McDonald *et al.* [118] wurden letztendlich für *in situ* Hybridisierungen mit *Acidobacteria*-spezifischen 16S-rRNS Oligonukleotidsonden auf die Umweltprobe Grünschwaige K8-1 (siehe Kapitel 3.4.4) angewandt.

In der Bodenprobe Grünschwaige K8-1 konnten Vertreter der „subdivisions“ 1, 3, 4, und 6 nachgewiesen werden. Die Signale wurden durch DAPI-Färbung und den Einsatz der EUB338-Mix Sondenkombination (siehe Tabelle 28 im Anhang) verifiziert. Die Anzahl acidobakterieller Zielzellen pro Hybridisierung war jedoch äußerst gering, meist wurden nur einzelne Zellen oder kleine Cluster von ca. 4-6 Zellen pro Gesichtsfeld detektiert. Hahn *et al.* [65] beschreiben, dass geringere Mengen organischen Materials (<8%) wie beispielsweise in sandhaltigen Lehmböden, die Identifizierung von Hybridisierungssignalen nicht signifikant beeinflussen. Da die K8-1 Bodenprobe ein Mineralboden mit einem eher geringen Anteil an organischem Material (starke Autofluoreszenz) ist, sollte die Zusammensetzung der Bodenpartikel nicht für die geringe Detektion Acidobakterien-spezifischer Signale verantwortlich sein. Diese Annahme wird zusätzlich durch die Hybridisierungen mit Sonden, die für andere im Boden vorkommende Phyla, wie z.B. *Firmicutes* spezifisch sind, bestätigt (siehe Kapitel 3.4.4.2). Sowohl *Alphaproteobacteria* als auch *Actinobacteria* (siehe Abbildungen 18 und 19) konnten in großer Anzahl in dieser Bodenproben nachgewiesen werden. Die vereinzelt acidobakteriellen Signale sprechen dafür, dass die Zellen durchlässig für die Oligonukleotidsonden sind und eine Hybridisierung möglich ist, ohne die Zellmorphologie zu zerstören.

Vermutlich ist die Anzahl der Acidobakterien-Zellen in dieser Probe sehr gering oder die Zellen enthalten eine zu geringe Anzahl an Ribosomen, um mit konventionellen Oligonukleotidsonden nachgewiesen zu werden. Gerade in Bodenproben, die eine äußerst hohe Anzahl an Zellen pro g (ca. 10^9) enthalten, ist auch die Detektion einzelner kleinerer phylogenetischer Gruppen oder gar Individuen, wie z.B. „subdivisions“ oder Spezies, im Vergleich zu der Masse an vorkommenden Bakterien erschwert [191]. Deshalb konnten evtl. in der Grünschwaige Bodenprobe nur einzelne wenige Signale detektiert werden. Für die zweite Möglichkeit, der geringen Anzahl an Ribosomen, spricht wiederum, dass auch mit der allgemeinen *Acidobacteria*-spezifischen Sonde (Hol_1400, siehe

Tabelle 28 im Anhang) nicht mehr Acidobakterien detektiert wurden. In oligotrophen Habitaten, wie manchen Böden, bleiben die Signale konventioneller Oligonukleotidsonden z.T. unterhalb der Nachweisgrenze, da oftmals nur geringe Anzahlen von Ribosomen pro Zelle vorhanden sind und nur ein Fluorophor pro Sonde mitgeführt wird [134]. Der geringe Ribosomengehalt spricht jedoch nicht gegen eine hohe Aktivität der jeweiligen Organismen. Pernthaler *et al.* [133] konnten z.B. für die SAR86 Abstammungslinie zeigen, dass die Zellen trotz geringer Anzahl an Ribosomen pro Zelle höchst aktiv sind. Indirekt spricht auch der gelungene Nachweis anderer bakterieller Phyla (siehe oben) für beide Annahmen. Dies und die gute Signalintensität, die mit der EUB-Mix Sonde erzielt wurde, weisen darauf hin, dass die Methode an sich adäquat ist und die *Acidobacteria* in dieser Bodenprobe nur in geringer Menge oder in einem Ruhezustand, der ungünstige Verhältnisse für FISH (z.B. geringe Ribosomenzahl) schafft, vorliegen. Der gelungene Nachweis der vier *Acidobacteria* „subdivisions“ zeigt genau wie die verfügbaren 16S- und 23S-rDNS Klondatenbanken wie weit verbreitet diese Gruppen v.a. im Boden sind. Auch Barns *et al.* [11] stellten fest, dass diese vier bisher am häufigsten in Untersuchungen von Bodenproben beobachtet wurden.

4.4 Konstruktion und Anwendung eines 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Differenzierung von Vertretern des Phylums *Acidobacteria*

Verschiedene „fingerprinting“ Methoden können heutzutage zur schnellen, reproduzierbaren Detektion der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in komplexen Habitaten verwendet werden. Diese Methoden basieren zumeist auf der Heterogenität von Restriktionsschnittstellen, der Länge von PCR-Fragmenten, Schmelzkurven oder der Sekundärstruktur von Einzelsträngen. Mit hohem Durchsatz können so die Artenvielfalt und -verteilung bestimmt werden [99]. Der Nachteil dieser Methoden ist, dass im Normalfall weniger als 100 spezifische Produkte (z.B. Gelbanden) klar unterschieden werden können.

Als häufigste Methode zur Identifizierung der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften werden nach wie vor PCR-Techniken mit darauf folgender Klonierung und Sequenzierung angewandt. Neben Amplifikationsfehlern während der PCR (Primerselektion, Zyklenzahl und Konzentration der Ausgangs-DNS) ist diese Methode v.a. durch die Anzahl der analysierten Klone limitiert. Dunbar *et al.* [42] zeigten, dass die Dokumentation von 50% der Artenvielfalt die Sequenzierung von mehr als 40 000 Klonen erfordern könnte. Dieser Ansatz ist somit arbeits-, zeit und kostenaufwendig. Allein die Analyse der Klondatenbanken dauert Wochen. Wenn nun auch noch Replikate überprüft werden sollen, wird die Arbeitsmenge schnell unüberschaubar. Mikroarraytechniken hingegen erlauben die gleichzeitige Identifizierung von multiplen phylogenetischen Gruppen unterschiedlicher hierarchischer Ebenen in komplexen Umweltproben in kürzerer Zeit, sind wesentlich günstiger und reproduzierbar. Somit kann eine stark parallele Detektion komplexer mikrobieller Gemeinschaften erfolgen.

Zudem hat in vielen Fällen der Einsatz von Biosensoren für Mikroarrays im Gegensatz zur

konventionellen Mikroarrayhybridisierung weitere Vorteile, wie die einfache Handhabung solcher Geräte, deutlich kürzere Messzeiten, geringere Anschaffungs- und Betriebskosten sowie minimalen Platzbedarf (siehe Abbildung 5). Des Weiteren liegt der besondere Vorteil des hier verwendeten Evaneszent-Feld-DNS-Biosensors darin, dass die Wechselwirkung mit dem Analyten reversibel ist und der DNS-Chip dadurch regenerierbar und mehrfach verwendbar ist. Während mit der konventionellen Methode jeder Array nur einmal hybridisiert werden sollte, kann hier jeder Sondenarray bis zu acht Mal regeneriert werden (siehe Kapitel 3.5.2.2). Auch eine Verfolgung der einzelnen Schritte (Hybridisierung, Denaturierung und Regeneration des DNS-Chips) ist mittels einer CCD-Kamera in Realzeit möglich (siehe Abbildung 9). Die Reversibilität der Wechselwirkung (Analyt-Sonde) ist vermutlich auf die wesentlich kürzeren Hybridisierungszeiten (7-15 min) im Vergleich zu konventionellen Mikroarraytechniken (ca. 12 h) zurückzuführen. Oftmals werden bei konventionellen Methoden die hybridisierten DNS-Chips noch bis zur eigentlichen Auswertung am Mikroarrayscanner in trockenem Zustand gelagert. So können sich irreversible Wechselwirkungen auf der Chipoberfläche ausbilden und eine vollständige Regenerierung des Arrays unmöglich machen. Ein ähnliches Phänomen konnte allerdings auch mit dem hier verwendeten Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor beobachtet werden, wenn größere Mengen an fluoreszenz-markiertem PCR-Produkt eingesetzt wurden (wie z.B. für Hybridisierungen von Bodenproben). Möglicherweise bilden sich hier auf Grund der Vielzahl an PCR-Produkten nicht nur Sonden-PCR-Produkt-Hybride aus, sondern es entstehen zusätzlich noch netzwerkartige Strukturen zwischen komplementären PCR-Produkten durch Renaturierungsprozesse, welche unter den vorliegenden, nur leicht alkalischen Bedingungen nicht wieder denaturiert werden können. Eine Erhöhung der Alkalikonzentration ist nicht möglich, da dies die beschichtete Oberfläche des DNS-Chips zu stark angreifen würde und dadurch die Sonden während des Regenerationsschritt vom Chip herunter gewaschen werden würden. Deshalb konnten auch mit dem hier verwendeten Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor DNS-Chips zur Untersuchung komplexer Umweltproben nur einmal verwendet werden. Trotzdem bietet der Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor die Möglichkeit eine Vielzahl an Sonden in sehr kurzer Zeit zu evaluieren, da bei diesen Hybridisierungen die Regeneration des Chips bis zu acht Mal ohne signifikanten Signalverlust gewährleistet ist. Ähnlich gute Regenerierbarkeiten wurden auch für andere DNS-Biosensoren beschrieben. Schuderer *et al.* [157] beobachteten z.B. nur einen geringfügigen Signalabfall in 10 Messzyklen bei Regenerierung mit 50 μM NaOH, während Feriotta *et al.* [46] mit derselben Konzentration sogar bis zu 70 Messungen durchführen konnten. Das Vorläufermodell des hier verwendeten Prototyps hatte eine etwas bessere Arbeitsstabilität: nach $n = 20$ Messungen betrug die Signalintensität immer noch 86% des ursprünglichen Wertes [136]. Dies muss jedoch nicht am Gerät an sich liegen, sondern könnte auch auf die unterschiedlichen DNS-Chips zurückzuführen sein. Peter [136] verwendete Glasobjektträger aus eigener Herstellung, während in dieser Arbeit GAPS II Coated Glasobjektträger (Corning[®] Incorporated, NY USA) verwendet wurden. Diese könnten anfälliger für eine längere Exposition der alkalischen Lösung im Fließkanal sein, so dass es evtl. zur Ablösung der 16S-rDNS Oligonukleotidsonden von der Oberfläche kommt. Ein weiterer Vorteil des Geräts

ist die Generierung von Schmelzkurven. Durch den Vergleich der Bindungskinetiken zweier unterschiedlicher Hybridisierungen konnte demonstriert werden, dass die Dissoziationsphase zur Differenzierung zwischen zwei unterschiedlichen Organismen genutzt werden kann [136]. Abbildung 45 zeigt dazu die Signalverläufe für Assoziation und Dissoziation einer spezifischen und einer unspezifischen Hybridisierung. Deutlich zu erkennen ist eine stärkere Tendenz zur Ablösung des unspezifischen bindenden Cy5-markierten PCR-Produkts. Zusätzlich zeichnet sich die spezifische Hybridisierung durch einen stärkeren Signalanstieg in der Assoziationsphase aus. Die Übertragung solcher Schmelzkurven auf komplexe Umweltproben dürfte sich jedoch sehr schwierig gestalten unter der Annahme, das sich jedes gemessene Signal sowohl aus spezifischen als auch unspezifischen Bindungen im dynamischen Hybridisierungsprozess zusammensetzt [137].

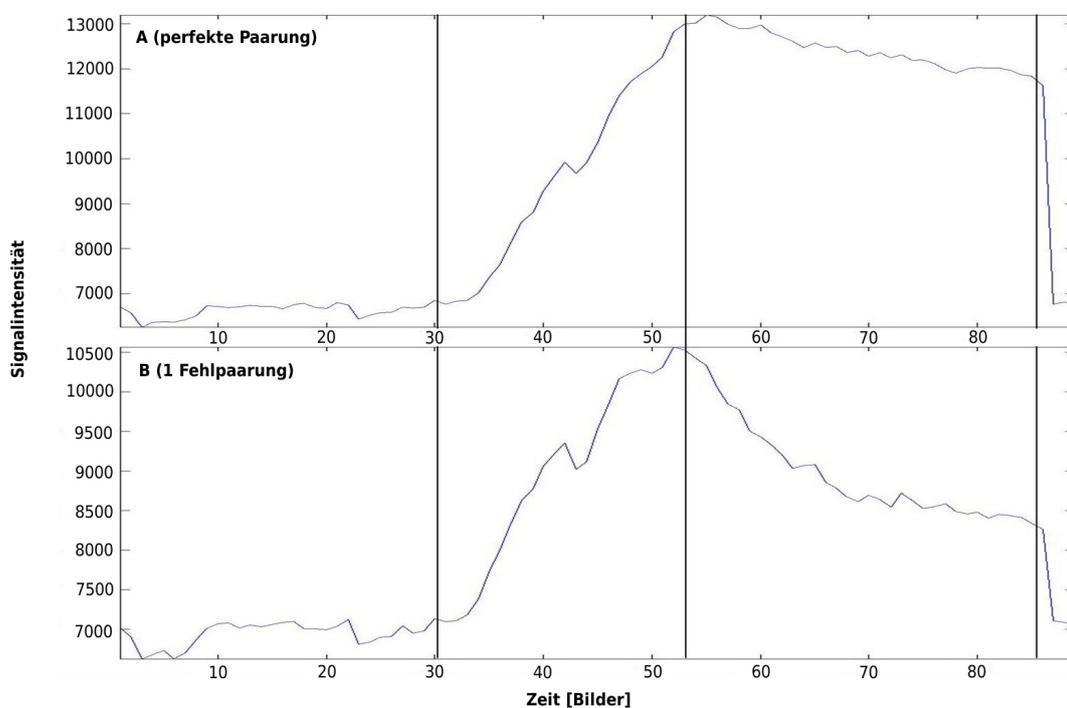


Abbildung 45: Darstellung der Signalverläufe für Assoziation und Dissoziation einer spezifischen (A) und einer unspezifischen Hybridisierung (B), die mit dem hier verwendeten Evaneszent-Feld-DNS-Prototypen durchgeführt wurden.

Der Nachteil des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensors ist das relativ kleine Sichtfeld von 10x10 mm, das nur z.T. mit Sonden belegt werden kann, da die Intensität des evaneszenten Feldes zu den Rändern hin stark abnimmt (siehe Kapitel 3.5.2.3). Bei einer Größe von 12x10 Sondenspots (entspricht dem hier entwickelten Mikroarray) ist das Maximum der Sondenbelegung erreicht. Da es ratsam ist Parallelansätze auf dem selben DNS-Chip mitzuführen, verringert sich die tatsächliche Anzahl an individuellen Sondenplätzen auf 12x5, d.h. maximal 60 Sonden können pro DNS-Chip hybridisiert werden. Dies ist im Vergleich zu anderen Ansätzen mit mehreren

hundert [106] bis einigen tausend [39] Sonden sehr wenig. In Zukunft könnte dieses Problem allerdings durch mobile Fluidikkammern oder Laserelemente („Abtasten“ des DNS-Chips) gelöst werden.

4.4.1 Spezifität und Sensitivität des Arrays

Ähnlich anderen Mikroarrayanwendungen zur Identifizierung bakterieller Gruppen wurde auch hier ein hierarchisch aufgebautes 16S-rDNS Oligonukleotidsondenset konstruiert [64, 100, 106]. Die 16S-rRNS eignet sich hierzu, da sie ubiquitär in allen Organismen vorkommt und sowohl variable wie auch konservative Bereiche enthält. Zudem ist, vermutlich auf Grund ihrer Funktion, die Sequenzvariabilität der 16S-rRNS beschränkter [155] als die mikrobieller Genome [52]. Die Wahrscheinlichkeit ist deshalb höher, dass bisher unbekannte Organismen bis zu einem gewissen Grad Ähnlichkeiten mit Sequenzen bekannter Zielorganismen besitzen und im Rahmen eines Mikroarrays entdeckt werden können.

Die einzelnen Sonden auf einem Mikroarray sollten möglichst dieselbe Länge und denselben GC-Gehalt aufweisen, um unterschiedliches Bindungsverhalten zu minimieren, da die Sensitivität eines Mikroarrays stark von den einzelnen Sonden abhängig ist. In einer Hybridisierungslösung, die Sonden und Ziel-DNS enthält können verschiedene Strukturformationen auftreten, u.a. Oligodimere, Oligohaarnadelstrukturen, Sekundärstrukturen der Ziel-DNS, Renaturierung kompletter Ziel-DNS-Moleküle sowie die eigentlichen Hybride aus Oligonukleotidsonde und Ziel-DNS. Um optimales Hybridisierungsverhalten zu gewährleisten, gilt es diese Formationen, bis auf die eigentlichen Hybride, zu vermeiden. Alle Sonden wurden deshalb mit GeneWalker (<http://www.cybergene.se/primerdesign/>) auf ihr Potential zur Sekundärstrukturformierung (ΔG) überprüft.

Jede 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonde wurde mit einem 24 Nukleotide langen Thymidin-Spacer (polyT-Spacer) und einer Aminomodifikation am 5'-Ende (zur kovalenten Bindung an die mit Aldehyd-Gruppen beschichteten Glasobjektträger) versehen. In Mikrotiterplatten konnte nachgewiesen werden, dass eine unspezifische Verlängerung der Sonde einen Einfluss auf die Signalstärke haben kann [14]. Es wird angenommen, dass sich dadurch die Zugänglichkeit der Sonde zu ihrer Zielregion im PCR-Produkt verbessert. Dies ist auch auf Mikroarrayhybridisierungen übertragbar, z.B. verwenden Loy *et al.* [105] einen aus 15 Thymidinen bestehenden Spacer am 5'-Ende jeder Sonde. Eine Verlängerung des polyT-Spacers auf 24 Nukleotide resultierte sogar in deutlich stärkeren SONDENSIGNALEN als die 15 Nukleotide Verlängerung (A. Mehlen, persönliche Mitteilung). Auch in dieser Arbeit konnte der positive Einfluss einer Sondenverlängerung und Aminomodifikation am 5'-Ende jeder Sonde auf die Signalintensitäten gegenüber unmodifizierten Oligonukleotidsonden beobachtet werden (siehe auch Kapitel 3.5.2.1). Da bis zu fünf Mal stärkere Signale mit den Modifikationen detektiert werden konnten, wurden ausschließlich modifizierte

Sonden für den 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray eingesetzt wurden.

Das sogenannte „sticky oligonucleotide“ Phänomen [103], das Fälle beschreibt in denen Oligonukleotidsonden trotz mehr als 6 Fehlpaarungen an Nichtziel-DNS binden, konnte für keine der neu-entwickelten Sonden beobachtet werden.

Um nun den Nachweis der *Acidobacteria* mit dem DNS-Mikrochip zu ermöglichen, musste zuerst die Spezifität jeder einzelnen Sonde durch die Diskriminierung einzelner Basenfehlpaarungen gewährleistet sein. Bei der Entwicklung der Sonden wurde das Mehrfachsondenkonzept [15] beachtet, so dass eine spezifische Zuordnung zu „subdivisions“ der Acidobakterien möglich ist. Die Evaluierung vieler Sonden in kürzester Zeit ist wie bereits erwähnt ein entscheidender Vorteil des Evaneszent-Feld-DNS Biosensor Prototyps. Mit geringerem Arbeitsaufwand kann eine, im Vergleich zu konventionellen Chiphybridisierungen, wesentlich umfangreichere Datenmenge zur Bestimmung der optimalen Stringenzbedingungen für einzelne Sonden erhalten werden. Da das komplette System dynamisch ist, können einzelne Schritte ohne Probleme verlängert oder verkürzt werden und so zu einer weiteren Optimierung der Signalintensitäten führen. Zusätzlich zu universellen *Bacteria*-Sonden wurde eine Nonsense-Sonde zur Kontrolle auf jeden Chip immobilisiert, die mindestens vier Fehlpaarungen zu jeder bekannten 16S-rRNS Sequenz besitzt (siehe Tabelle 30 im Anhang). Neben den *Bacteria*-Sonden diente als weitere Positivkontrolle für eine erfolgreiche Hybridisierung eine Cy5-markierte, zum polyT-Spacer komplementäre Sonde. Außerdem kann mit dieser Sonde gleichzeitig die Spothomogenität geprüft, die einzelnen Spotreihen detektiert und ein Korrekturfaktor zum Ausgleich des inhomogenen Ausleuchtungsprofils des evaneszenten Feldes berechnet werden. Basierend auf den Hybridisierungsergebnissen ausgewählter Sonden wurde eine Temperatur von 40°C und ein Formamidgehalt von 25% im Hybridisierungspuffer als Kompromiss zwischen Signalintensität und -spezifität der Oligonukleotidsonden festgelegt (siehe Kapitel 3.5.2.5). Eine weitere Steigerung der Stringenz reduzierte auf der einen Seite die Signalintensität einiger Sonden mit den perfekt komplementären Referenzorganismen und führte auf der anderen z.T. zu unspezifischen Signalen. Letzteres konnte bereits Peter [136] mit einem Vorläufermodell des hier verwendeten Evaneszent-Feld-DNS-Biosensors feststellen: zu niedrige und zu hohe FA-Konzentrationen wirkten anregend auf die Hybridisierung. Der in ihrer Arbeit bestimmte optimale Formamidgehalt lag ebenfalls zwischen 25% und 30%. Auch die Markierungsmethode wurde modifiziert um optimale Signalintensitäten zu erzeugen. Im Vergleich stellte sich heraus, dass Inkubationszeiten von 4 h während der Deca-Priming-Reaktion, die verhältnismäßig besten Signalintensitäten lieferten (siehe Kapitel 3.5.3.2). A. Mehlen (persönliche Mitteilung) stellte bereits fest, dass die Anwendung des Deca-Priming-Verfahrens in Kombination mit dem ULYSIS[®] Alexa Fluor[®] 647 Nucleic Acid Labeling Kit im Vergleich mit anderen Markierungsmethoden in sehr guten Signalen resultierte.

An den Rändern des Sichtfeldes des Biosensors fällt die Laserleistung auf ca. 50% der Maximalleistung ab, deshalb hat das evaneszente Feld keine vollkommen gleichmäßiges Ausleuchtungsprofil (siehe Abbildung 23). Zur Korrektur dieser Inhomogenität wurden ein Korrekturfaktor eingeführt

(siehe Kapitel 3.5.2.3). Ein Vergleich der korrigierten mit den unkorrigierten Werten zeigte, dass die Standardabweichung der Signalintensität von 0,23 (unkorrigiert) auf 0,13 (korrigiert) sank ohne einen zusätzlichen Fehler einzuführen (siehe Kapitel 3.5.2.3). Die Korrekturfaktoren konnten anschließend auf die eigentlichen Hybridisierungssignale angewendet werden. Eine Normalisierung dieser Werte gewährleistete die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Hybridisierungen (siehe Kapitel 2.11.9). Im Gegensatz zu Loy *et al.* [106] konnte zur Normalisierung der Signalintensitäten keine Verhältnisbildung erfolgen, da die *dnachip*-Software negative Werte zuließ. Diese lagen allerdings immer im nahen Bereich um Null, so dass es sich vermutlich um kleinste Schwankungen, die durch Kalkulationen der Software zu Stande kommen, handelt. Da die Berechnung der Normalisierung sehr zeitaufwendig und sich auf Grund der besonderen Vorteile des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensors (siehe oben) große Datenmengen in kurzer Zeit ansammeln, wurde dafür ein Perl-Programm entwickelt (<http://www.semistable.com/microarray.tar.gz>, R. Lemmen). Dieses Programm führt die Berechnungen durch und gibt im Anschluss die Daten der verschiedenen Zwischen- und Absolut-Werte in nach Sonden und Hybridisierung geordneter Reihenfolge als Textdatei wieder aus. Die Dateien können problemlos mit Tabellenkalkulationssoftware (MS Windows oder Linux-Applikationen) geöffnet und weiter bearbeitet werden. Um den Schwellenwert, ab dem eine Sonde als positiv bewertet wurde, festzulegen, wurde im nächsten Schritt ein *Acidobacteria*-DNS-Chip (mit allen Sonden in zweifacher Ausführung) mit 40 Referenzorganismen hybridisiert und anschließend ausgewertet. Zu diesem Zweck eignet sich der Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor wie bereits erwähnt hervorragend, da ein Chip bis zu acht Mal wiederverwendet werden kann (siehe Kapitel 3.5.2.2). Auf Basis der normalisierten Signalintensitäten wurde anschließend der Schwellenwert berechnet. Der Vorteil der hier angewendeten Art der Schwellenwertfestlegung (siehe Kapitel 3.5.2.4) ist, dass auch Sonden-Nichtzielorganismus-Duplicates mit einbezogen werden, die mehr als eine Fehlpaarung aufweisen. Damit ist diese Methode wesentlich präziser als die von DeSantis *et al.* [39] verwendete Methode, bei der die Signalintensität einer perfekt bindenden Sonde immer mit der einer entsprechenden Sonde, welche nur eine mittige Basenfehlpaarung aufwies, verglichen wurde. Die perfekt bindende Sonde wurde anschließend als positiv bewertet, wenn ihre Signalintensität mindestens 1,3 Mal höher als die der entsprechenden, fehlpaarenden Sonde war [39].

Die Evaluierung des Schwellenwerts zeigte, dass falsch-negative Signale (innerhalb der Detektionsgrenze der Methode) nur bei wenigen Sonden (7,27%) auftraten, welche sofort von folgenden Experimenten ausgeschlossen wurden. Während einige Sonden (1,33%) auch unter den optimierten Bedingungen falsch-positive Signale zeigten. Bei letzteren spielten wie erwartet v.a. die Nukleotidzusammensetzung der Fehlpaarung und die Position der Fehlpaarung [104, 168, 174] eine Rolle. Oftmals lagen die normalisierten Signalintensitäten der falsch-positiven Sonden für Nicht-Zielorganismen unter denen des entsprechenden Zielorganismus. Leider kann dieser Unterschied nicht für die Auswertung des Mikroarrays hinsichtlich Hybridisierungsergebnissen für Umweltproben verwendet werden, da niedrige Signalintensitäten auch für eine geringe Abundanz des Zielorganismus in der jeweiligen Probe sprechen können. Um Fehlinterpretationen bei der

Auswertung des Signalmusters von Mikroarrays durch unspezifische Bindungen trotzdem zu vermeiden, wurde das Mehrfachsondenkonzeptes [15] eingesetzt. Wenn also das Signalmuster der hierarchischen oder parallelen Spezifität der Sonden entspricht, zeigt das die Verlässlichkeit des Mikroarrays. Während eine Inkonsistenz im Signalmuster bei Hybridisierungen mit komplexen Umweltproben sowohl durch unspezifische Hybridisierungen aber auch durch vorher nicht bekannte Bakterien verursacht werden kann.

Im Gegensatz zu anderen Studien [103, 122] konnten keine große Unterschiede in den Signalintensitäten verschiedener Sonden beobachtet werden, jedoch zeigten dieselben Sonden unterschiedliche Signalintensitäten bei Hybridisierung mit verschiedenen perfekt-paarenden Referenzen. Eventuell ist dies auf die unterschiedlichen Sequenzen, welche die Sondenbindungsstelle umgeben, und damit auf die Bildung von Sekundärstrukturen oder andere sterischen Hindernissen der entstehenden Nukleinsäurehybride zurückzuführen.

Schließlich wurde noch die Sensitivität des Verfahrens mit Hilfe einer Mischung der DNS zweier 16S-rDNS Referenzklone überprüft, die in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt wurden, wobei die eingesetzte Menge der einen DNS immer stabil bei 100 ng gehalten wurde, während die andere zwischen 0,01 ng und 100 ng variierte (siehe Kapitel 3.5.3.4). Es zeigte sich, dass mindestens 1 ng DNS des gesuchten Organismus in der Initial-PCR vorliegen musste, um mittels des Chips nachgewiesen zu werden. Dieser Wert liegt deutlich unter dem von Loy [103] ermittelten Wert von 50 ng für einzelne Referenzorganismen, so dass angenommen werden kann, dass der Evaneszent-Feld-DNS-Biosensors im Vergleich mit konventionellen Hybridisierungen deutlich sensitiver ist. Mit dem Vorläufermodell konnten sogar noch niedrigere Konzentrationen von 0,1% Ziel-DNS in Mischungen nachgewiesen werden [136]. Dies kann vermutlich auch auf die geringere Anzahl an Sonden auf dem von Peter [136] evaluierten DNS-Chip zurückgeführt werden, da die Inhomogenität des evaneszenten Feldes dann keine Rolle spielt. Der hier erhaltene Wert von 1% bzw. 1 ng Ziel-DNS kann zwar als Richtwert für Umweltproben betrachtet werden, sollte jedoch noch in komplexeren Mischungen und mit Reinkulturen verifiziert werden.

Aufgrund der stetig steigenden Zahl an 16S-rRNS und 23S-rRNS Sequenzen in öffentlichen Datenbanken sollte eine diesbezügliche Erweiterungsmöglichkeit des Mikroarrays überprüft werden. Deshalb wurden 45 weitere 16S-rRNS Klon-spezifische Sonden getestet sowie eine Übertragbarkeit der evaluierten Methode auf 23S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden überprüft (siehe Kapitel 3.5.2.6 und 3.5.6). Da das Sichtfeld des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensors stark eingeschränkt ist (10x10 mm, siehe auch Kapitel 3.5.2.3) und an den Rändern das evaneszente Feld zu starken Schwankungen unterliegt, um reproduzierbare Signale zu erreichen, konnten diese Sonden nicht direkt auf den bereits evaluierten Mikroarray aufgetragen werden, da der 12x5 Sondenarray mit Parallelansatz die komplette Fläche belegt. Es wurde also ein weiterer Mikroarray entwickelt (siehe Tabellen 30 und 32).

Die Evaluierung von drei 23S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden (siehe Tabelle 21) unter den vorliegenden Bedingungen konnte mit positiven Hybridisierungsergebnissen abgeschlossen

werden. Alle drei Sonden zeigten Signale über dem bereits festgelegten Schwellenwert mit den jeweiligen Zielorganismen, während unspezifische Bindungen nicht beobachtet werden konnten (siehe Abbildung 26). Um dieses Konzept auf Bodenproben anzuwenden, müsste jedoch zuerst ein 23S-rDNS-*Acidobacteria*-spezifischer Primer konstruiert werden, dessen Bindungsstelle am 3'-Ende der 23S-rDNS positioniert wäre, da der momentan verwendete 23S-rDNS Primer nur die ersten 200 Basen der 23S-rDNS erfasst.

Von den 45 zusätzlich entwickelten 16S-rDNS gerichteten Oligonukleotidsonden reagierten 88,9% wie erwartet, entweder durch detektierbare Signale mit dem entsprechenden Zielorganismus oder fehlende Signale mit Nichtzielorganismen. Die Spezifität dieser Oligonukleotidsonden umfasst kleinere Untergruppen bzw. einzelne 16S-rDNS Referenzklone des Phylums *Acidobacteria*. Es stellte sich heraus, dass eine direkte Übertragung des Protokolls für Bodenproben nicht möglich war. Die Hybridisierung der Umweltprobe Grünschwaige K6-1 auf diesen DNS-Chip resultierte ausschließlich in positiven Signalen der universellen Sonden (616V, UNIV_1390, Hol_1400, Acido6_300G und Acido6_300T, siehe Kapitel 3.5.6). Jedoch hätte mindestens eine der neu konstruierten Sonden (Acido6_182) positiv reagieren müssen, da in der K6-1 Klondatenbank entsprechende 16S-rDNS Klone gefunden wurden. Vermutlich ist diese Sequenz in zu geringen Mengen in der initialen PCR vertreten, so dass das Detektionslimit des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays von 1% nicht überschritten wird. Es sind also noch weitere Modifikationen der Methode nötig, um eine Detektion einzelner Kleingruppen bzw. Spezies der *Acidobacteria* zu gewährleisten.

Von den 137 evaluierten Sonden zeigten somit 25 (siehe Tabelle 30 im Anhang) kein positives Signal mit der DNS des entsprechenden Referenzorganismus, einschließlich der zur Sonde perfekt komplementären Ziel-DNS, oder unspezifische Bindung zur DNS von Nichtzielorganismen (innerhalb des Phylums *Acidobacteria*) und wurden deshalb von dem Mikroarray ausgeschlossen. Unter den hier verwendeten Bedingungen waren 104 Sonden absolut spezifisch für die jeweiligen acidobakteriellen Gruppen. Die anderen Sonden hybridisierten auch mit Zielsequenzen, die zwischen ein und drei Basenfehlpaarungen aufwiesen. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass von den ca. 2000 durchgeführten Sondenhybridisierungen 92,4% die erwarteten Signale zeigten. Zudem konnte keinerlei positive Sonden signale mit Nichtzielorganismen anderer Phyla beobachtet werden (siehe Kapitel 3.5.3.3).

4.4.2 Evaluierung des *Acidobacteria* 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Untersuchung von Bodenproben

Nach der Evaluierung der Spezifität der einzelnen Sonden sollte der neu-entwickelte 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray zur Identifizierung der acidobakteriellen Gemeinschaft auf komplexe Umweltproben angewandt werden. Bei der Untersuchung von Bodenproben ist zu beachten, dass Huminstoffe einen Einfluss auf Qualität und Quantität von DNS-Extraktionen [171] und

dadurch auch einen Einfluss auf PCR durch z.B. Komplexbildung von Mg^{2+} -Ionen [173] oder Inhibierung der DNS-Polymerase, haben. Da allen Hybridisierungsexperimenten mindestens eine PCR-Reaktion voranging, mussten störende Einflüsse weitestgehend minimiert werden, um eine Verzerrung der Biodiversität zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde wenn möglich die Ausgangs-DNS nie verdünnt (siehe Kapitel 3.3), PCR-Enhancer eingesetzt (BSA und TMAcI, siehe Kapitel 2.5), und eine „Hot Start“-PCR durchgeführt. Letzteres verhindert unspezifische Primerbindungen [31]. Grundsätzlich wurde auch mit geringeren Annealingtemperaturen gearbeitet, da die Bindungsstelle des 31F_mod Primers zwei Fehlpaarungen mit der 16S-rDNS Sequenz von Vertretern der „subdivisions“ 2 und 10 aufweist. Bei der verwendeten Annealingtemperatur (49°C) ist eine Amplifikation dieser Sequenzen jedoch gewährleistet (siehe Abbildung 11). Die Durchführung und Vereinigung mehrerer PCR-Ansätze pro Probe sollte zusätzlich die Benachteiligung gering vorhandener Vertreter der *Acidobacteria* vermeiden. Auch wurden die Primersequenzen angepasst, um neu hinzugekommene acidobakterielle Sequenzen mit zu erfassen. Dies ist v.a. im Hinblick auf die bereits erwähnte präferentielle Amplifikation nötig. Sipos *et al.* [162] konnten zeigen, dass durch zwei Fehlpaarungen am 5'-Ende des Primers eine signifikante präferentielle Amplifikation der perfekt paarenden Sequenz auftritt. Ab einer Verdünnung von 1:10 (fehl-paarender DNS zu perfekt-paarender DNS) konnte das fehlpaarende Amplifikat nicht mehr detektiert werden.

Da die für die Evaluierung der Sonden eingesetzte Primerkombination (616V und 100K) zu keinerlei spezifischen Signalen auf dem Mikroarray führte (Daten nicht gezeigt), wurden verschiedene Primer sowie verschiedene PCR-Methoden („nested“ PCR, asymmetrische PCR) kombiniert, um bessere Ergebnisse zu erzielen (siehe Kapitel 3.5.4.1). Es stellt sich heraus, dass die Kombination aus einer semispezifischen PCR mit den Primern 616V und Hol.189R.Ac und einer darauf folgenden asymmetrischen PCR mit dem Primer 31F_mod in der anschließenden Hybridisierung zur höchsten Signalintensität und -diversität führte. Wenn vor der Hybridisierung nur eine PCR durchgeführt wurde, resultierte dies unabhängig von der gewählten Primerkombination immer in geringeren Signaldiversitäten. Zudem zeigte sich, dass der Einsatz universeller Primerkombinationen (wie z.B. 616V und 985R) entweder ausschließlich zu Hintergrundrauschen oder in kaum detektierbaren Signalen resultierte (siehe Kapitel 3.5.4.1). Möglicherweise finden durch die große Menge ähnlicher DNS-Sequenzen häufiger Renaturierungsprozesse statt, wodurch die tatsächliche Anzahl potentieller Ziel-DNS-Moleküle sinkt und eine korrekte Hybridisierung erschwert wird. Bei der Durchführung der asymmetrischen PCR mit spezifischen Primern entstehen mehr Ziel-DNS-Moleküle und könnten so diesen Effekt kompensieren. Um in Zukunft die Renaturierungsproblematik zwischen den markierten PCR-Fragmenten zu verringern, könnte auch mit biotin-markierten Primern gearbeitet werden, so dass nach entsprechender Immobilisierung ausschließlich einzelsträngige DNS vorliegt.

Zusätzlich optimiert wurde die Methode durch eine Steigerung der Probenmenge in Kombination mit einer Verlängerung der Inkubationszeit. Die Hybridisierungsdauer kann hier nur durch größere

Lösungsvolumina erzielt werden, da die Durchflussgeschwindigkeit nicht auf unter $1\mu\text{l/s}$ reduziert werden kann. Eine so durchgeführte, bloße Steigerung der Hybridisierungsdauer erhöhte weder die Qualität noch die Quantität der detektierbaren Signale. Im Vergleich dazu führte die Steigerung der Probenmenge von 500 ng auf $2\mu\text{g}$ zu einer signifikanten Signalverstärkung.

Trotz dieser Optimierungen konnten einige geringer vorhandene DNS-Sequenzen in den Bodenproben nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5.4). Dies könnte auf zu geringe Initialkonzentrationen der DNS im Ausgangsmaterial, aber auch z.T. auf die oben erwähnte Renaturierungsproblematik der PCR-Fragmente zurückzuführen sein. Durch die Verlängerung der Hybridisierungsdauer erhöht sich das Risiko der Renaturierung einzelner Stränge, da der Durchfluss der Lösung bei Raumtemperatur stattfindet. Diesen Vorgang könnte man durch ein beheizbares Magazin am Biosensor kompensieren, so dass erst sehr kurz vor der eigentlichen Hybridisierung denaturiert wird und eine Renaturierung der PCR-Fragmente verhindert wird.

Auch die DNS-Extraktion kann durch ungenügende oder präferentielle Zellyse, fragmentierte DNA, sowie biotische und abiotische Bestandteile des Bodens (anorganische Partikel, Huminstoffe), die Ergebnisse anschließend angewendeter molekularbiologischer Verfahren zur Bestimmung der Biodiversität stark beeinflussen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene DNS-Extraktionsmethoden (nach Dong *et al.* [41]; Ultra Clean™ Mega Soil DNA Kit, siehe auch Kapitel 2.4) zusätzlich zu ihrer Effizienz (siehe Kapitel 4.1) mit dem neu-konstruierten Oligonukleotidmikroarray auf vergleichbare Signalmuster in der Hybridisierung hin überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass scheinbar nicht die DNS-Extraktionsmethode an sich, sondern die Probenmenge, die für die Extraktion eingesetzt wurde (5 g bzw. 1,2 g), unter den vorliegenden Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Hybridisierungsergebnisse mit dem neu-entwickelten 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray hatte (siehe Kapitel 3.5.4.3). Es konnten deutlich mehr Signale nach einer DNS-Extraktion aus 1,2 g Boden (nach Dong *et al.* [41]) als nach einer Extraktion aus 5 g Boden (nach Dong *et al.* [41] bzw. mit dem Ultra Clean™ Mega Soil DNA Kit) detektiert werden. Möglicherweise werden aus der kleineren Probenmenge (1,2 g) verhältnismäßig weniger, störende Substanzen extrahiert, so dass die PCR unter besseren Ausgangsbedingungen abläuft.

Die Reproduzierbarkeit von Mikroarrayhybridisierungen spielt natürlich, v.a. bei so hoch komplexen Umweltproben wie Boden, eine entscheidende Rolle. Hybridisierungen, die mit der DNS einzelner 16S-rDNS Referenzklone durchgeführt wurden, wie es z.B. für die Sondenevaluierung nötig war, zeigten auch bei Mehrfachhybridisierungen ausnahmslos dasselbe Signalmuster auf dem Mikroarray. Bei Anwendung des Mikroarrays zur Analyse von Bodenproben konnte jedoch nur eine ca. 90%ige Reproduzierbarkeit festgestellt werden (siehe Kapitel 3.5.4.4). Die nicht-reproduzierbaren SONDENSIGNALE schwankten nicht in einem kleinen Bereich um den Schwellenwert und wurden deshalb als positiv oder negativ bewertet, vielmehr zeigten diese Sonden Signale, die eindeutig unter oder über dem Schwellenwert lagen (siehe Abbildung 40). Da größtenteils Sonden betroffen waren, für deren Spezifitätsbereich in der Klondatenbank (z.B. „subdivision“ 5 in der

K6-1 Datenbank, vergleiche Tabelle 19) keine Vertreter gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass die initiale Konzentration der DNS der entsprechenden „subdivision“ in der Probe an der Grenze zur Detektierbarkeit liegt. Auch die hohe Reproduzierbarkeit spricht dafür, dass die Hybridisierungen optimal ablaufen. Durch die Durchführung von vier Parallelansätzen pro Probe können die 100% reproduzierbaren Signale von den „variablen“ Signalen unterschieden werden und damit eine präzisere Auswertung erfolgen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für Hybridisierungen von Bodenproben im Vergleich zu Hybridisierungen mit der DNS einzelner Organismen höhere Mengen an markiertem PCR-Produkt (2 μg) sowie längere Hybridisierungszeiten nötig sind, um eine ausreichende Sensitivität des Mikroarrays zu gewährleisten. Zusätzlich muss bereits im Vorfeld unbedingt darauf geachtet werden, dass Fehler, wie präferentielle Amplifikation, die durch DNS-Extraktion [49] und PCR [177] eingeführt werden können, möglichst verhindert werden.

4.4.3 Anwendung des *Acidobacteria* 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Untersuchung von Bodenproben

Nach erfolgreicher Evaluierung des neu entwickelten *Acidobacteria* 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays zur Untersuchung komplexer Umweltproben, konnte er nun erstmals auf die verschiedenen Bodenproben angewendet werden. Hier stand vor allem im Vordergrund Zusammenhänge zwischen der acidobakteriellen Population und potentiell relevanten Faktoren, wie Pflanzendiversität, pH, Bodentyp etc., zu entschlüsseln. Gerade im Boden mit einer sehr hohen Dichte von Bakterien (10^9 Zellen pro cm^3), einer sehr geringen Zell-Zell-Entfernung von nur 10 μm (zum Vergleich: Plankton 112 μm), und gleichzeitig einer so großen Variabilität an Habitaten und Nährstoffen, die sich in Bereichen von Mikrometern ändern können, spielen solche Faktoren wohl eine große Rolle. Erfolgreich belegt sind bereits Zusammenhänge der bakteriellen Diversität der Rhizosphäre mit verschiedenen Gräserpezies und Bodentypen [57, 160]. Signifikante Änderungen der bakteriellen Zusammensetzung wurden auch im Zusammenhang mit Änderungen der Vegetation eines hawaiianischen Bodens von Wald zu Weide beobachtet [127]. Da diese Böden allerdings eher junge Böden und zudem geographisch isoliert sind, könnten sie empfindlicher auf Änderungen reagieren als etablierte Böden [57]. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass für letztere keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten. Auch Umweltgifte, wie 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT), scheinen einen entscheidenden Einfluss auf die Biodiversität auszuüben, wie z.B. George *et al.* [55] zeigen konnten.

Deshalb wurden unterschiedliche Bodenproben miteinander verglichen um Hinweise auf mögliche Indikatorgruppen im Phylum *Acidobacteria* und Zusammenhänge mit den vorhin genannten Faktoren zu erhalten. Dabei waren die Lysimeterproben aus Bayreuth wegen ihrer unterschiedlichen Bepflanzung von Interesse, während sich die Bodenproben der Grünschwaige Versuchsstation (Freising, D) im Bodentyp unterschieden (siehe Kapitel 2.2). Zuletzt wurden Proben TNT-

kontaminierter Böden im Vergleich zu nicht-kontaminierten Böden untersucht (siehe Kapitel 2.2.3).

4.4.3.1 Zusammenhang zwischen acidobakterieller Diversität und Pflanzendiversität?

Zusammenhänge zwischen der Flora und der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft wurden bereits in mehreren Studien nachgewiesen [113, 121, 164, 182]. Von den *Chloroflexi* z.B. ist bekannt, dass manche nur in der Abwesenheit bestimmter Pflanzen vorkommen, andere wiederum nur in Anwesenheit bestimmter Pflanzen [130]. Auch G. Braker [21] konnte zeigen, dass die Kombination verschiedener Pflanzenspezies einen signifikanten Einfluss auf die im Boden anwesende Denitrifizierergemeinschaft hatte.

Für die Acidobakterien konnte im Falle der Lysimeter Bodenproben aus Bayreuth (D) mit Hilfe des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays tendenziell ein Zusammenhang zwischen der Diversität dieser Bakterien und der der Pflanzen hergestellt werden. Eine komplexere, acidobakterielle Gemeinschaft konnte mit steigender Pflanzendiversität (von null auf acht verschiedene Pflanzenarten) festgestellt werden (siehe Tabelle 24 und Abbildung 41). Vertreter der „subdivision“ 4 konnten in diesen Bodenproben mit dem 16S-rRNS Mikroarray erst ab einer Pflanzendiversität von mindestens vier Arten überhaupt eindeutig detektiert werden. Am deutlichsten ausgeprägt ist der Unterschied jedoch bei Betrachtung der „subdivision“ 6, hier ist die höchste Diversität ebenfalls mit der höchsten Anzahl an Pflanzenspezies korreliert (siehe Abbildung 41).

Bodenprobe	Anzahl Pflanzenspezies	SD ¹ 1	SD ¹ 3	SD ¹ 4	SD ¹ 5	SD ¹ 6	Anzahl positiver Sondersignale in [%]
BI	0	+	+	-	-	+	29
BII	2	+	+	-	+	+	27
BIII	4	+	+	+	+	+	29
BIV	8	+	+	++	+	++	39

¹ SD = „subdivision“

Tabelle 24: Vergleich der acidobakteriellen Diversität im Zusammenhang mit der Pflanzendiversität. Die Ergebnisse der verschiedenen Mikroarrayhybridisierungen sind zusammengefasst dargestellt. Die Prozentzahl der Anzahl positiver Signale bezieht sich auf die Gesamtzahl der Sonden auf dem verwendeten DNS-Chip. Anhand dieser Zahl ist gut erkennbar, dass in der Bodenprobe, die mit der höchsten Anzahl an Pflanzenspezies bewachsen war, die höchste Diversität an Acidobakterien beobachtet werden konnte. + = „subdivision“-spezifische Sonden konnten detektiert werden, - = kein Signal „subdivision“-spezifischer Sonden konnte beobachtet werden, ++ = maximale Anzahl positiver Signale der entsprechenden „subdivision“ im Vergleich mit den anderen Bodenproben.

Beim Vergleich der Hybridisierungsergebnisse mit den Ergebnissen der rDNS Klondatenbanken fällt jedoch auf, dass auch in den Bodenproben BI und BII „subdivision“ 4 Vertreter gefunden wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sie in diesen Proben in geringerer Anzahl als in den Proben BIII und BIV vorliegen und deshalb (zumindest unter den momentanen Bedingungen) mit dem Mikroarray nicht detektiert werden können. Der Mikroarray bietet hier zwar keine echte Quantifizierbarkeit, doch in Relation mit den anderen Daten, können signifikante Rückschlüsse auf die Mengenverhältnisse einzelner „subdivisions“ in verschiedenen Böden zueinander gezogen werden. Generell wurden die Mikroarrayhybridisierungen durch die Klondatenbankanalysen bestätigt. Nur in den Klondatenbanken geringer vertretene Sequenzen, wie Sequenzen der „subdivision“ 10 (Klondatenbank BIV, 8,0%) oder „subdivision“ 4 (Klondatenbank BI, 3,5%), konnten mit dem Mikroarray nicht nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang zwischen Acidobakterien- und Pflanzendiversität äußert sich also evtl. nicht nur in der Zusammensetzung der acidobakteriellen Gemeinschaft, sondern vermutlich vorwiegend im quantitativen Vorkommen der entsprechenden Gruppen abhängig von der Artenvielfalt der Pflanzen.

4.4.3.2 Zusammenhang zwischen acidobakterieller Diversität und Bodentyp bzw. -charakteristika?

Genau wie für die Abhängigkeit von Bakterien- und Pflanzendiversität sind auch Zusammenhänge zwischen der bakteriellen Gemeinschaft und ihrem Habitat mehrfach beschrieben worden [57, 160]. Die Zusammensetzung der Bodenstruktur allein verursacht bereits große Unterschiede, z.B. findet man in Grob- und Feinsandfraktionen des Bodens eher einfache Bakteriengemeinschaften, während die Fraktionen, deren Partikelgröße geringer ist, wie z.B. Lehm, wesentlich komplexere bakterielle Gemeinschaften beherbergen [26]. Aber auch die Verfügbarkeit von Nährstoffen, die in Böden meist limitiert ist, spielt eine große Rolle (siehe auch Kapitel 1.2).

Wie bereits erwähnt wurden die Grünswaige Bodenproben aufgrund ihres unterschiedlichen Bodentyps und der Beweidungshäufigkeit ausgewählt. Die K6 Bodenproben sind Niedermoorboden, d.h. Böden mit hohem Nährstoffgehalt, während die K8 bzw. K15 Bodenproben Mineralböden sind, die eher durch niedrigen Nährstoffgehalt gekennzeichnet sind (siehe auch Kapitel 3.5.5.2). Die Bodenproben zeigen ähnliche pH-Werte im neutralen bis leicht sauren Bereich zwischen 6,6 und 7,1 (siehe auch Tabelle 15). Der Kohlenstoff- sowie der Stickstoffgehalt schwanken dagegen stark (siehe Kapitel 3.1) zwischen den einzelnen Proben.

In allen Grünswaige-Bodenproben können mit dem Mikroarray Vertreter der „subdivisions“ 3, 4 und 6 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Proben K6-1 und K6-2 zeigen Mikroarrayhybridisierungen mit der DNS der Proben K6-3, K8-1 bis K8-3 und K15 jedoch ein komplexeres Signalmuster: für 33-37% (24-27% K6-1 und K6-2) der Sonden können positive Signale beobachtet werden (siehe Tabelle 25 sowie Kapitel 3.1). Innerhalb der so entstandenen Gruppe (K6-3/K8-

1/K8-2/K8-3/K15) sind sich die Signalmuster zudem signifikant ähnlicher als im Vergleich zu den Signalmustern von K6-1 bzw. K6-2. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit dem Bodentyp, da die Probe K6-3 ein Niedermoorboden ist, während die K8 und K15 Proben mineralische Böden sind. Auch der Beweidungstyp ist als Ursache eher unwahrscheinlich, da zwar die Unterschiede zwischen den beweideten K6 Proben zu der unbeweideten Probe signifikant sind, doch für die K8 Bodenproben solche Unterschiede nicht beobachtet werden konnten. Möglicherweise besteht jedoch ein Zusammenhang mit den Gesamtkohlenstoffwerten. Diese liegen für die Proben K6-3, K8-1, K8-2 und K15 deutlich über denen der K6-1 und K6-2 Proben. Die Bodenprobe K8-3 zeigt hingegen deutlich niedrigere Werte als die K6-1 und K6-2 Proben. Möglicherweise ist das Wachstum der Acidobakterien durch andere Bakterien unterdrückt, die in eben diesem Bereich ein Wachstumsoptimum besitzen.

Die Klondatenbanken bestätigen auch hier die Ergebnisse der Hybridisierungen nur teilweise. Eine 100%ige Übereinstimmung zwischen Klondatenbanken und Mikroarray ist im Fall der „subdivision“ 4 und „subdivision“ 6 gegeben. Diese konnten in allen Grünschwaike Bodenproben nachgewiesen werden. Weitere Überlappungen zeigen sich bei den „subdivisions“ 3 und 5. Allerdings konnten hier mit Hilfe des Oligonukleotidmikroarrays zusätzlich Vertreter der „subdivision“ 3 in den Proben K6-1 und K6-2 gefunden werden sowie Vertreter der „subdivision“ 5 in den Proben K8-1 und K15. Die in den Klondatenbanken K6-2, K8-1 bis K8-3 vorhandenen „subdivision“ „13“ Klone konnten jedoch in keinem Fall mit dem Mikroarray detektiert werden. Da sie aber auch nur in sehr geringer Anzahl in den Klondatenbanken identifiziert wurden (zwischen 2,7 und 3,0%), kann davon ausgegangen werden, dass sie auch nur in geringer Anzahl im Boden vorkommen und deshalb nicht in jedem Fall eine Amplifikation auftritt.

Bodenprobe	Gesamtkohlenstoff [g/kg Boden]	Bodentyp	Beweidung	Anzahl positiver Sondersignale in [%]	SD ¹ 1	SD ¹ 3	SD ¹ 4	SD ¹ 5	SD ¹ 6
K6-1	88,07	Niedermoor	konstant	27	-	+	+	-	+
K6-2	92,75	Niedermoor	konstant	24	-	+	+	-	+
K6-3	134,2	Niedermoor	teilweise	37	+	+	+	+	+
K8-1	102,65	Mineralboden	ständig	35	-	+	+	+	+
K8-2	103,4	Mineralboden	ständig	35	-	+	+	+	+
K8-3	70,12	Mineralboden	teilweise	33	+	+	+	+	+
K15	129,85	Mineralboden	seltener	35	-	+	+	+	+

¹ SD = „subdivision“

Tabelle 25: Vergleich der acidobakteriellen Diversität im Zusammenhang mit dem Bodentyp, der Beweidungsart sowie des Gesamtkohlenstoffgehaltes. Die Ergebnisse der verschiedenen Mikroarrayhybridisierungen sind zusammengefasst dargestellt. Die Prozentzahl der Anzahl positiver Signale bezieht sich auf die Gesamtzahl der Sonden auf dem verwendeten DNS-Chip. Anhand dieser Zahl ist gut erkennbar, dass die Bodenproben K6-1 und K6-2 eine deutlich geringere Komplexität im Vergleich zu den restlichen Grün-schwaige Bodenproben aufweisen. + = „subdivision“-spezifische Sonden konnten detektiert werden, - = kein Signal „subdivision“-spezifischer Sonden konnte beobachtet werden.

4.4.3.3 Zusammenhang zwischen acidobakterieller Diversität und 2,4,6-Trinitrotoluen-kontaminierten Bodenproben?

2,4,6-Trinitrotoluen (TNT) ist ein Umweltgift, das man meist im Zusammenhang mit militärischen manchmal auch mit zivilen Aktivitäten findet. Es ist bekannt, dass es toxisch auf viele Makroorganismen wirkt, aber für einen Effekt auf mikrobielle Gemeinschaften gibt es bisher nur sehr wenige Beschreibungen.

Bereits 1998 beobachteten Fuller und Manning [51] eine zahlenmäßige Dominanz von Gram-positiven Bakterien in TNT-kontaminierten Böden. Wilke *et al.* [183] hingegen fanden mittels PFLA nur sehr geringe Unterschiede zwischen TNT-kontaminierten und nicht kontaminierten Böden. Es konnte auch festgestellt werden, dass unter hohen TNT-Konzentrationen die spezifische Wachstumsrate sank, während der Gehalt an organischem Material im Boden stieg [59]. Auch eine Abnahme der Denitrifikationsaktivität in TNT-kontaminierten Böden konnte beobachtet werden [159]. Diese Versuche zeigen, dass TNT einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Aktivität von Bodenbakterien ausüben kann.

Erst George *et al.* [55] beschäftigten sich mit der genauen Auflösung auf dem Gruppen- bzw. Spezieslevel in dem sie erstmals sogenannte „fingerprinting“ Methoden wie DGGE auf TNT-kontaminierte Böden anwandten. Dabei konnte ein signifikanter Einfluss des TNT auf die bakterielle Gemeinschaft festgestellt werden. Parallel galt hierbei ein besonderes Augenmerk den Acidobakterien. Der Einfluss von TNT auf die Acidobakterien war enorm, der Anteil acidobakterieller 16S-rDNS Sequenzen fiel von 10-33% in nicht-kontaminierten Böden auf weniger als 1% in TNT-kontaminierten Böden (I. George, persönliche Mitteilung). Auch die Anzahl der gefundenen OTUs in den untersuchten, spanischen Bodenproben (OUT, J29, IN, siehe auch Kapitel 3.5.5.3) fiel von 50 (OUT-Boden, nicht kontaminiert) auf 20 (J29-Boden, leicht TNT-kontaminiert) bzw. 10 (IN, stark TNT-kontaminiert).

In den von I. George zur Verfügung gestellten Bodenproben (siehe Kapitel 3.5.5.3) konnte ein drastischer Einfluss des TNT auf die acidobakterielle Population festgestellt werden. In den nicht-kontaminierten Bodenproben REF und OUT konnten ähnliche Signalmuster, wie sie auch in anderen Bodenproben detektiert wurden, beobachtet werden. Die „subdivisions“ 1, 3, 4, 5 und 6 sind in unterschiedlicher Komplexität vertreten (siehe Abbildung 43). Aber bereits geringste Mengen TNT (2 mg/kg, Bodenprobe KL2) scheinen einen leichten Einfluss auf die Zusammensetzung der *Acidobacteria* Gemeinschaft zu haben. Spätestens ab einer Konzentration von 125 mg TNT/kg Boden wird der Einfluss des TNT auf die acidobakterielle Gemeinschaft deutlich. Nur vier Gruppen-spezifische Sonden zeigen überhaupt ein Signal. Allerdings kann sowohl in den französischen als auch den spanischen Bodenproben ab einer Konzentration von 1570 mg TNT/kg Boden ein zusätzliches positives SONDENSIGNAL beobachtet werden (Hol_1463, „subdivision“ 10, siehe Abbildung 43). Diese Sonde zeigte in keiner der durchgeführten Hybridisierungen ein Signal mit der DNS eines Nicht-Zielorganismus. Dieses Signal wird zusätzlich durch das positive

Signal der allgemeinen *Acidobacteria*-Sonde Hol_1400 nach dem Mehrfachsondenkonzept als acidobakteriell verifiziert und könnte somit ein Hinweis auf eine potentielle Indikatorgruppe oder -spezies sein.

4.4.3.4 Acidobakterien als Indikatorspezies?

Die Frage, ob einzelne „subdivisions“ der *Acidobacteria* als Indikatorspezies in Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Faktoren auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft verwendet werden, muss im Falle der Pflanzendiversität und den Bodentypen bzw. -charakteristika mit der momentanen Auflösung des Mikroarrays verneint werden. Die Hinweise deuten jedoch darauf hin, dass abhängig von verschiedenen Parametern, eine Fluktuation in der Quantität verschiedener acidobakterieller Gruppen vorliegt, die als Bioindikator dienen könnte.

Eine mögliche Indikatorfunktion der „subdivision“ 10 im Hinblick auf die Kontamination mit 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT), konnte mit Hilfe des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays beobachtet werden. Das Signal der „subdivision“ 10-spezifischen Sonde Hol_1463 konnte reproduziert werden und wird durch das zusätzliche Signal der allgemeinen *Acidobacteria*-Sonde noch bestätigt. Eine genauere Identifizierung der verantwortlichen Organismen ist noch durchzuführen, v.a. im Hinblick auf ihre funktionelle Rolle im kontaminierten Habitat.

Eine zusätzliche Erweiterung des Oligonukleotidmikroarrays um 16S-rRNS- und 23S-rRNS gerichtete Sonden wie sie in den Kapiteln 3.5.2.6 und 3.5.6) angesprochen wird, könnte zusätzliche acidobakterielle Indikatorfunktionen im Boden aufdecken.

4.5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen durch Anwendung verschiedener Methoden die acidobakterielle Vielfalt in Böden näher zu charakterisieren. Die Evaluierung eines Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototypen für einen relativ umfangreichen 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray konnte durchgeführt und die Anwendbarkeit der simultanen Detektionsmethode für praktische Fragestellungen demonstriert werden. Die Kombination verschiedener Techniken (Klondatenbanken, FISH und Mikroarray) erlaubte eine detaillierte Betrachtung der acidobakteriellen Zusammensetzung in Böden.

Prozeduren der Bodenaufbereitung für FISH wurden miteinander verglichen und es stellte sich heraus, dass die Methoden nach Lunau *et al.* [111] bzw. McDonald *et al.* [118] die höchste Auftrennung von Bakterienzellen und Bodenpartikeln ermöglichten. Dessen ungeachtet scheint die Anwendung konventioneller FISH-Methoden, v.a. mono-markierter Oligonukleotidsonden, auf das Habitat Boden eher limitiert zu sein. Vor allem die störende Autofluoreszenz, aber auch

die oftmals geringe Anzahl an Ribosomen von in oligotrophen Habitaten lebenden Organismen erschwert den spezifischen Nachweis. So konnten Ergebnisse z.T. nicht reproduziert werden und es waren ausschließlich wenig und nur sehr vereinzelt acidobakterielle Zellen in der Gesamtprobe zu detektieren. Die Anwendung von mehrfach-markierten Polynukleotidsonden könnte hier evtl. Fortschritte bringen [134]. Auf Grund ihrer Länge ist es jedoch äußerst kompliziert spezifische Polynukleotidsonden für einzelne Gruppen zu konstruieren. Außerdem sind diese Sonden anfälliger für enzymatische Degradation. Eine weitere Möglichkeit wäre die Anwendung sogenannter „peptide nucleic acid“ Sonden (PNA), die wegen ihrer ungeladenen Polyaminstruktur eine bessere Hybridisierung unter niedrigen Salzkonzentrationen und hohen Temperaturen ermöglichen. Perry-O’Keefe *et al.* [135] konnten zudem stärkere Signale im Vergleich mit konventionellen Oligonukleotidsonden in Bereichen niedriger Zugänglichkeit der 16S-rRNS beobachten.

Die Verfahren für den Einsatz des Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototyp sowohl zur Sonderevaluierung also auch zur Anwendung auf Bodenproben (wie Festlegen des Schwellenwert, Überprüfen der Spothomogenität, Einführen eines Korrekturfaktors etc.) konnten optimiert werden. Die aktuell verwendete Methode zur Korrektur der Inhomogenität des evaneszenten Feldes verbessert die Qualität der Messwerte deutlich (siehe Kapitel 3.5.2.3), allerdings besteht hier noch Optimierungspotential. Mit dem bereits beschriebenen Verfahren wirkt sich der Messfehler der Werte, die den Korrekturfaktoren zugrunde liegen relativ stark auf die Ergebnisse aus, da die direkten Messwerte verwendet werden. Dies könnte aber vermieden werden, in dem statt der ursprünglichen Werte eine diesen angenäherte mathematische Funktion als Korrekturfaktor eingesetzt wird. Dazu müsste eine passende Funktion gefunden werden, die das evaneszente Feld am besten beschreibt und die Parameter für jede Hybridisierung angepasst werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray weiter ausgebaut werden kann (16S-rDNS gerichtete Sonden für kleinere Untergruppen bzw. einzelne Klonsequenzen und 23S-rDNS gerichtete Sonden) und dies im Moment nur noch durch die Problematik der Evaneszent-Feld-Technik verzögert wird. Eine Funktion der *Acidobacteria* als Indikatorspezies auf Basis der Faktor Pflanzendiversität bzw. Bodentyp konnte nicht festgestellt werden. Jedoch könnten Vertreter der „subdivision“ 10 in TNT-kontaminierten Böden eine solche Rolle spielen. Die Steigerung des Detektionslimit des Mikroarrays durch z.B. den Einsatz ausschließlich einzelsträngiger DNS (siehe auch Kapitel 4.4.2), ist von entscheidender Bedeutung für zukünftige Experimente.

Jede hier angewandte Methode für sich allein gesehen, Klondatenbanken, Mikroarray und FISH, lieferte ein unvollständiges Gesamtbild der acidobakteriellen Biodiversität (siehe Tabelle 26). Ein ähnliches Phänomen konnten auch DeSantis *et al.* [39] bei Anwendung eines „high-density“ Oligonukleotidmikroarrays beobachten, hier zeigte der Mikroarray stets größere Diversität als die entsprechende Klondatenbank. In der vorliegenden Studie konnte z.T. eine größere Diversität in den Klondatenbanken (z.B. für die Bodenprobe BI) während z.B. für die Grünschwai

Bodenproben eine höhere Vielfalt mit Hilfe der Mikroarrayhybridisierungen beobachtet werden konnte. Ähnliche Diskrepanzen konnten auch beim Vergleich von Klondatenbanken mit SSCP [76] bzw. t-RFLP [110] festgestellt werden, was evtl. auf eine präferentielle Klonierung bestimmter Sequenzen hinweisen könnte. Möglich wäre, dass die Effizienz des Klonierprozesses durch Amplifivate unterschiedlicher Länge [128] oder variable Sekundärstrukturen [97] reduziert wird. Die hier erstellten Klondatenbanken waren außerdem genau wie bei DeSantis *et al.* [39] unvollständig (siehe auch Kapitel 3.3) und die PCR-Fragmente entstanden nicht auf die gleiche Art wie für die Hybridisierung mit dem Mikroarray. Dieses Problem sollte weiter untersucht werden, um auszuschließen, dass die initiale Konzentration einzelner Sequenzen in der Probe die einzige Ursache für dieses Problem ist.

<i>Acidobacteria</i> „subdivision“	Klondatenbank	Mikroarray	FISH ¹
1	x	x	x
2	-	-	-
3	x	x	x
4	x	x	x
5	x	x	k.S.
6	x	x	x
7	-	-	k.S.
8	-	-	-
9	-	-	k.S.
10	x	-	k.S.
11	-	-	k.S.
„12“	-	-	k.S.
„13“	x	-	k.S.

¹ wurde ausschließlich anhand der Grünschwaige Bodenprobe K8-1 ermittelt
k.S. = keine spezifische FISH-Sonde vorhanden

Tabelle 26: Vergleich acidobakterieller „subdivisions“, die in unterschiedlichen Bodenproben mittels des 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarrays, FISH oder in rDNS-Klondatenbanken detektiert werden konnten.

4.6 Perspektiven

Während der Hybridisierung komplexer Proben sind sowohl spezifische als auch unspezifische Bindungen möglich, deshalb ist die beobachtete Signalintensität mit großer Wahrscheinlichkeit eine Kombination von Signalen spezifischer und unspezifischer Sequenzen, die an die gleiche Sonde gebunden haben [137, 187]. So wäre also das Signalmuster eine Überlagerung vieler verschiedener Fluoreszenzmuster, für jeden Zielorganismus eine. Diese Überlagerung könnte, wenn man die genauen Muster der einzelnen Organismen kennen würde, wieder entwirrt werden. Diese Technik wurde schon erfolgreich für die Entschlüsselung von drei verschiedenen Bakterienspezies in

einer Mischung angewandt [137]. Die einzige Einschränkung dieses Verfahrens im Moment besteht darin, dass der Organismus, den es zu entschlüsseln gilt, bekannt sein muss. Nach eingehender Weiterentwicklung und Evaluierung könnte das Verfahren in Zukunft aber auch für komplexere Proben einsetzbar sein.

Viele Studien zeigen, dass Acidobakterien in großer Anzahl in Böden präsent sind (z.B. [11, 98, 107]). Diesen Studien liegen jedoch zum Großteil Untersuchungen auf PCR-basierenden Methoden zu Grunde, die Aktivität der entsprechenden Organismen wird hier nicht unbedingt gemessen. Hjort *et al.* [69] konnten zeigen, dass nur ein Teil der gesamten bakteriellen Gemeinschaft, die mittels DGGE oder t-RFLP beobachtet wurde, tatsächlich Aktivität zeigen. Im Gegenteil waren einige der dominanten Zellpopulationen in der Gesamtgemeinschaft nur sehr schwer detektierbar in der aktiven Gemeinschaft. Dies könnte darauf hinweisen, dass es sich um ruhende Zellen, Zellen mit langen Generationszeiten oder tote Zellen handelt. Die dort verwendete Methode zur Aktivitätsmessung, die „Bromodesoxyuridinimmunocapture“, wurde bereits mehrfach zum Studium aktiver Bakterienpopulation in Böden und Meerwasser eingesetzt (z.B. [9, 20, 132]). Eine Anwendung dieser Methode auf die Acidobakterien wäre wünschenswert, um ihre Aktivität in Böden festzustellen. Mittels „Bromodesoxyuridinimmunocapture“ könnten außerdem die Auswirkungen bestimmter Zusätze wie Düngemittel auf die acidobakterielle Gemeinschaft untersucht werden. Eine Kombination mit dem Oligonukleotidmikroarray wie Adamczyk *et al.* [3] für den sogenannten „Isotope array“ praktizierten wäre hier ebenfalls denkbar.

5 Zusammenfassung

Das Phylum *Acidobacteria*, das vor knapp einem Jahrzehnt erstmals beschrieben wurde [107] ist enorm weit verbreitet und oftmals in sehr großer Anzahl in den unterschiedlichsten Habitaten vertreten. Aufgrund dessen geht man davon aus, dass den Acidobakterien eine große Bedeutung in ihrem jeweiligen Umfeld zukommt. Da die kultivierungsabhängige Untersuchung dieser Gruppe, auf Grund sehr geringer Wachstumsraten und komplexen Nähransprüchen, kaum möglich ist, müssen kultivierungsunabhängige Methoden (weiter)entwickelt werden, um dieses Phylum näher zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray zur Differenzierung dieses Phylums konstruiert und die Ergebnisse mittels FISH und Klondatenbanken verifiziert, um so erstmals ein umfassendes Bild ihrer Biodiversität im Habitat Boden aufzuzeichnen. Die Evaluierung und Anwendung dieser Mikroarrays erfolgte mit einem neuartigen Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Prototypen (ICB, Münster, D), mit dem die Verfolgung von Hybridisierungsergebnissen in Realzeit möglich ist.

Im Vorfeld mussten verschiedene Methoden der DNS-Isolierung, der Aufbereitung von Bodenproben, der Evaluierung von Oligonukleotidsonden unabhängig von Reinkulturen (z.B. Clone-FISH, [156]), sowie PCR-Techniken analysiert und modifiziert werden, um optimale Ergebnisse zu erzeugen und die eindeutige Identifizierung der Acidobakterien zu gewährleisten.

Auf der Basis einer aktualisierten 16S-rRNS Datenbank konnte ein umfangreicher SONDENSATZ *in silico* entwickelt und anschließend evaluiert werden. Die Oligonukleotidsonden wurden entsprechend des Mehrfachsondenkonzeptes entworfen, um einen spezifischen Nachweis der Acidobakterien auf mehreren hierarchischen und identischen, phylogenetischen Ebenen zu ermöglichen. Der Großteil dieser Sonden kam auf dem neu-entwickelten Mikroarray zum Einsatz (siehe unten), ein Teil wurde zusätzlich mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen evaluiert, um einen PCR-unabhängigen Nachweis der entsprechenden Acidobakterien im Boden zu ermöglichen. Hierzu wurden mehrere Protokolle zur Aufbereitung und Fixierung von Bodenproben auf ihre Tauglichkeit für die entsprechende Bodenprobe überprüft. Es stellte sich heraus, dass die Protokolle nach McDonald *et al.* [118] und Lunau *et al.* [111] die bakteriellen Zellen am effektivsten von störenden Bodenpartikeln trennten, wobei die Methanol-Methode [111] deutlich weniger zeitaufwendig ist. In der Grünschwaijee Bodenprobe konnten so die acidobakteriellen „subdivisions“ 1, 3, 4 und 6 nachgewiesen werden.

Mit der zusätzlichen Erstellung von 16S- und 23S-rDNS Klondatenbanken wurden vornehmlich zwei Ziele verfolgt: die Verifizierung von Hybridisierungsergebnissen (sowohl FISH als auch Mikroarray) und die Gewinnung von Referenzkulturen zur Sondenevaluierung. Tatsächlich konnten durch die Klondatenbanken die FISH- und Mikroarrayergebnisse in großen Teilen bestätigt werden. Einzig die in einigen Bodenproben scheinbar geringer vertretenen „subdivisions“ 4 bzw. „13“ konnten z.T. mit Hilfe des Oligonukleotidmikroarrays nicht nachgewiesen werden.

Der neu-entwickelte Mikroarray umfasst zur Zeit 54 Oligonukleotidsonden und ist somit der bisher umfangreichste Array, der mit diesem Evaneszent-Feld-DNS-Biosensor Modell evaluiert wurde. Verschiedene Verfahren sowohl zur Sondenevaluierung als auch zur Anwendung auf Bodenproben (wie Festlegen eines Schwellenwertes, Einführen eines Korrekturfaktors etc.) musste daher optimiert werden. Vor allem die Korrektur der Inhomogenität des evaneszenten Feldes verbesserte hier eindeutig die Qualität der Messwerte. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass der 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray bei Bedarf sowohl in Spezies-spezifischer Hinsicht, als auch in Hinblick auf andere funktionelle Gene, wie die 23S-rRNS, erweitert werden kann.

Die Untersuchung von verschiedenen Böden mit unterschiedlichen Eigenschaften, wie Bodentyp oder Pflanzendiversität, konnte zwar keinen direkten Zusammenhang zwischen acidobakterieller Diversität und dem jeweiligen Parameter herstellen, tendentiell könnte allerdings eine leichte Korrelation zwischen der Quantität einzelner *Acidobacteria* „subdivisions“ und der Pflanzendiversität bestehen, dies muss jedoch noch mittels Gruppen-spezifischer RT-PCR oder anderen quantitativen Nachweismethoden verifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte für 2,4,6-Trinitrotoluen-kontaminierte Böden eine potentielle Indikatorfunktion von Vertretern der „subdivision“ 10 nachgewiesen werden, da ab einer Konzentration von über 1500 mg TNT eine deutliche Verschiebung des acidobakteriellen Spektrums in diese Gruppe zu beobachten ist. Die Kombination verschiedener Techniken (Klondatenbanken, FISH und Mikroarray) erlaubte somit erstmals eine detaillierte Betrachtung der acidobakteriellen Zusammensetzung in Böden.

6 Anhang

6.1 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden zur Identifizierung von Bakterien mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Sondenkurzname	Spezifität	Sequenz 5'→3'	Annealing-temp. [°C]	Formamid-gehalt [%]	Referenz
ARCH915	Archaea	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	58,0	30	[168]
ARC344	Archaea	TGC CGC CTG CTG CJC CCC GT	62,0	30	[141]
PLA46	Planctomycetales	GAC TTG CAT GCC TAA TCC	48,0	30	[124]
CF319a	die meisten Flavobacteria, einige Bacteroidetes, einige Sphingobacteria	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	50,0	35	[114]
CFX1223	Chloroflexi	CCA TTG TAG CGT GTG TGT MG	52,0	35	[18]
GNSB-941	Chloroflexi	AAA CCA CAC GCT CCG CT	49,0	35	[56]
ALF1b	Alphaproteobacteria, einige Deltaproteobacteria, Spiro- chaetes	CGT TCG YTC TGA GCC AG	49,0	20	[115]
Bet42a	Betaproteobacteria	GCC TTC CCA CTT CGT TT	47,0	35	[115]
Gam42a	Gammaproteobacteria	GCC TTC CCA CAT CGT TT	47,0	35	[115]
LGC354A	Firmicutes (Gram-positive Bacteria mit niedrigem GC- Gehalt)	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	48,0	35	[120]
LGC354B		CGG AAG ATT CCC TAC TGC	50,0	35	[120]
LGC354C		CCG AAG ATT CCC TAC TGC	50,0	35	[120]

HGC69a	Actinobacteria (Gram-positive Bacteria mit hohem GC-Gehalt)	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	48,0	25	[145]
SRB385Db	Desulfobacterales, Desulfotomomales, Syntrophobacterales, Myxococcales, und andere Bacteria	CGG CGT TGC TGC GTC AGG	57,0	20	[138]
EUB338I	Bacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	55,0	20-35	[6]
EUB338II	vervollständig EUB338I; Planctomycetales	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	55,0	20-35	[35]
EUB338III	vervollständig EUB338I; Verrucomicrobiales	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	55,0	20-35	[35]

Tabelle 27: 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden für verschiedene bakterielle Phyla ihre Spezifität, Annealingtemperatur, Sequenz und der verwendete Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer

Sondenkurzname	Spezifität („subdivision“)	Zugänglichkeit der 16S-rRNS	Sequenz 5'→3'	Annealing- temp. [°C]	Formamid- gehalt [%]
Acidol_112	1	Klasse II	AGT CAC GTG TTA CTC ACC	52,0	20
Acidol_300_A	1	Klasse I-III	AGT GTG TCC GTG CGC CCT	60,0	20
Acidol_434 ³	1	Klasse I-II	ATC GTC CCG ATC GAA AGG	56,0	–
Acidol_837 ³	1	Klasse III-IV	ACG GCG GGA TTG GGT ACC	60,5	–
Acido2_404	2	Klasse II-III	GAG AAG CTT CAT CCC CGA	56,0	20
Acido2_426 ³	2	Klasse II	GTC GAA AGG GGT TTA CAC	53,7	–
Acido3_297	3	Klasse I	TGT GGC CGT GTG CCC TCT	60,0	20
Acido4_193	4	Klasse II-IV	TCC CCC GCT TTA ACA ACT	54,0	20
Acido4_322a ³	4	Klasse III	GAC TTA TTG CCC AGT CTG	54,0	–
Acido4_329	4	Klasse III	GTA GGA GTC TGA CCC GT	55,2	20
Acido5_140 ³	5	Klasse II	CCG GTG TTA TTC CCC ACT	56,0	–
Acido5_306 ³	5	Klasse I-III	AGT TCC AGT GTG TCC GAC	56,0	–
Acido5_1034 ³	5	Klasse II-III	AGC ACC TCC AGT AGT GTC	56,0	–
IRog1 ¹	6	Klasse II	GGT CCA GGA TGC CGC GTT	60,0	20
Gtx_817 ⁴	8	Klasse IV	CAC ACC AAG TGT TCA TCG	53,7	–
Gtx_1239	8	Klasse II-IV	ACG GTT TGT ATC GGC CAT	53,7	20
Hol_1400 ²		Klasse III	TTC GTG ATG TGA GGG GC	55,2	10-20

¹ [107]

² [192]

³ keine spezifischen Signale detektierbar mit dem 16S-rDNS Referenzklon

Tabelle 28: 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden spezifisch für Vertreter des Phylums *Acidobacteria* ihre Spezifität, Zugänglichkeit der 16S-rRNS nach Behrens *et al.* [16], Annealingtemperatur, Sequenz und der optimale Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer

6.2 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden zur Identifizierung von Vertretern des Phylums *Acidobacteria* mittels Mikroarrayhybridisierungen und deren Anordnung auf dem DNS-Chip

Sondenname	Spezifität ²	Sequenz 5'→3'	Referenz
CONT	Kontrolloligonukleotid (keine Ähnlichkeit zu bekannten 16S-rRNS Sequenzen)	AGG AAG GAA GGA AGG AAG	[103]
CONT-COMP	komplementär zu Kontrolloligonukleotid	CTT CCT TCC TTC CTT CCT	[103]
Nonsense	Negativkontrolle (keine Ähnlichkeit zu bekannten 16S-rRNS Sequenzen)	AGA GAG AGA GAG AGA GAG	[103]
UNIV_1390	<i>Bacteria</i> , keine „Epsilonproteobacteria“	GAC GGG CGG TGT GTA CAA	[188]
Eub338I	<i>Bacteria</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	[6]
Eub338Irc ¹	<i>Bacteria</i>	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	diese Doktorarbeit
616V	<i>Bacteria</i>	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	[78]
Hol_1400	<i>Acidobacteria</i>	TTC GTG ATG TGA CGG GC	[192]
Acido1_83 ¹	„subdivision“ 1	CAC TGT AGT CAG GAC CGA	diese Doktorarbeit
Acido1_112	„subdivision“ 1 und 3	AGT CAC GTG TTA CTC ACC	diese Doktorarbeit
Acido1_126a	„subdivision“ 1	ACT CCT GGG TAG GTT AGT	diese Doktorarbeit
Acido1_126b ¹	„subdivision“ 1	ACT CCA GGG TAG GTT AGT	diese Doktorarbeit
Acido1_152	„subdivision“ 1	AGC TGA GAT TTC TCC CAG	diese Doktorarbeit
Acido1_189	„subdivision“ 1	GAA TTG CTC CTT TGA CCC	diese Doktorarbeit
Acido1_300_A	„subdivision“ 1 und 6	AGT GTG TCC GTG CGC CCT	diese Doktorarbeit
Acido1_300_C	„subdivision“ 1 und 6	AGT GTG GCC GTG CGC CCT	diese Doktorarbeit
Acido1_406 ¹	„subdivision“ 1	CCA AGG GAT TTC ATC CTC	diese Doktorarbeit
Acido1_434 ¹	„subdivision“ 1	ATC GTC CCG ATC GAA AGG	diese Doktorarbeit
Acido1_639	„subdivision“ 1	ACT CCA GCA CGG TAG TTT	diese Doktorarbeit
Acido1_843 ¹	„subdivision“ 1	TTC GGC ACG ACA GGA TTG	diese Doktorarbeit
Acido1_987	„subdivision“ 1	TCC CGT ACA TTT CGA GCC	diese Doktorarbeit
Acido1_996a	„subdivision“ 1	CTA CCC CAG TCC ACT ACA	diese Doktorarbeit

Acido1_996b	„subdivision“ 1	CTA CCC CGG TCC ACT ACA	diese Doktorarbeit
Acido1_1017	„subdivision“ 1	CTA TTG CTA GGA AGG GAT	diese Doktorarbeit
Acido1_1034	„subdivision“ 1	AGC ACC TAT ATT ACG GCC	diese Doktorarbeit
Acido1_1142 ¹	„subdivision“ 1	CGG TTT CGC AAG AGT GCT	diese Doktorarbeit
Acido1_1277	„subdivision“ 1	GCC GGC TTT TTC CGA TTA	diese Doktorarbeit
Acido2_404	„subdivision“ 2	TGG GGG ATG AAG CTT CTC	diese Doktorarbeit
Acido2_426	„subdivision“ 2	GTC GAA AGG GGT TTA CAC	diese Doktorarbeit
	und 3		
Acido2_813 ¹	„subdivision“ 2	AAA CGA TCA GGA CTT GGG	diese Doktorarbeit
Acido2_1161 ¹	„subdivision“ 2	TCC GGA TAA CGG AGA GGA	diese Doktorarbeit
Acido3_129	„subdivision“ 3	CCC ACT AAA GGG TAG ATC	diese Doktorarbeit
Acido3_178	„subdivision“ 3	TTC CCT TTC CAG GCT CAT	diese Doktorarbeit
Acido3_186	„subdivision“ 3	GGA AGG TGA AAG GCG CAA	diese Doktorarbeit
Acido3_297	„subdivision“ 3	AGA GGG CAC ACG GCC ACA	diese Doktorarbeit
Acido3_307	„subdivision“ 3	AGT GCC AGT GTG GCC GT	diese Doktorarbeit
Acido3_307_rc ¹	„subdivision“ 3	ACG GCC ACA CTG GCA CT	diese Doktorarbeit
Acido3_493	„subdivision“ 3	GAA GAA GCT GCG GCT AAC	diese Doktorarbeit
Acido3_537	„subdivision“ 3	TAG GCA GCA AGC GTT GTT	diese Doktorarbeit
Acido3_581	„subdivision“ 3	GAC TGG GAA CAC CGC CTA	diese Doktorarbeit
Acido3_589	„subdivision“ 3	TCA CGC CAC TCT TAT CCA	diese Doktorarbeit
Acido3_645	„subdivision“ 3	TCC CGC ACT CTA GCT TCT	diese Doktorarbeit
Acido3_646	„subdivision“ 3	CTC CCA TAC TCC AGC GTT	diese Doktorarbeit
Acido3_718	„subdivision“ 3	CCG GTG GTG TAG ACG GCT	diese Doktorarbeit
Acido3_983	„subdivision“ 3	CCT GGG CTC GAA CGG CTT	diese Doktorarbeit
Acido3_995 ¹	„subdivision“ 3	CAG GCT GGT CCT TAG TAT	diese Doktorarbeit
Acido3_1004	„subdivision“ 3	GCT ATG TTT CCA CAG CCG	diese Doktorarbeit
Acido3_1014	„subdivision“ 3	TTG CGG GAT ACC AGT GTT	diese Doktorarbeit
Acido3_1161	„subdivision“ 3	CAG CGA TAA GTT GGA GGA	diese Doktorarbeit
Acido3_1137	„subdivision“ 3	CCT GCG AGT TCC ACC TT	diese Doktorarbeit
Acido3_1403 ¹	„subdivision“ 3	ACT TTC GGT GAT GTG ACG	diese Doktorarbeit
Acido4_84	„subdivision“ 4	ACT TTA CGC ACC CTC CGA	diese Doktorarbeit
Acido4_193	„subdivision“ 4	TCC CCC GCT TTA ACA ACT	diese Doktorarbeit
Acido4_193_rc	„subdivision“ 4	AGT TGT TAA AGC GGG GGA	diese Doktorarbeit
Acido4_322a	„subdivision“ 4	CTG AAT AAC GGG TCA GAC	diese Doktorarbeit
Acido4_322b ¹	„subdivision“ 4	AGT ATG GCC CGT GTT TCA G	diese Doktorarbeit
Acido4_329	„subdivision“ 4	GTA GGA GTC TGA CCC GT	diese Doktorarbeit
Acido4_329_rc	„subdivision“ 4	ACG GGT CAG ACT CCT AC	diese Doktorarbeit
Acido4_353	„subdivision“ 4	CCA AAA TTC CCG ACT GCT	diese Doktorarbeit
Acido4_809	„subdivision“ 4	GTC AGC ATC GTT TAA GGC	diese Doktorarbeit
Acido4_837a	„subdivision“ 4	CCC GGA GCA CAA ATT ACT	diese Doktorarbeit
Acido4_837b	„subdivision“ 4	CCC GGA GCA ATA ATG ACT	diese Doktorarbeit
Acido4_843	„subdivision“ 4	ACG GCA CCC GGA ACA ATA	diese Doktorarbeit
Acido4_998	„subdivision“ 4	GTT AGA CGA CCT TCC CTC	diese Doktorarbeit
Acido4_1004	„subdivision“ 4	CTG TTA CGC AGA CTT CCC	diese Doktorarbeit

Acido4_1005 1078_3	„subdivision“ 4 „subdivision“ 4	GAT CGG AAT TAC CCT CTC TAA TCT GCC GCA AGC TCC TC	diese Doktorarbeit [60]
Acido5_140	„subdivision“ 5	CCG GTG TTA TTC CCC ACT	diese Doktorarbeit
Acido5_177	„subdivision“ 5	AGA TCC CGC TAT CGT ATG	diese Doktorarbeit
Acido5_183	„subdivision“ 5	GAA CCA TCG TTC CCG GAT	diese Doktorarbeit
Acido5_217	„subdivision“ 5	GAC CCC TCT CAT AGC GAA	diese Doktorarbeit
Acido5_306	„subdivision“ 1, 5 und 6	AGT TCC AGT GTG TCC GAC	diese Doktorarbeit
Acido5_409	„subdivision“ 5	GTC CCA AGA GAC TTC ATC	diese Doktorarbeit
Acido5_450 ¹	„subdivision“ 5	CCG TCA ACC TTG CGG TTT	diese Doktorarbeit
Acido5_530	„subdivision“ 5 und 6	TAA TAC GGG GGG GGC GAG	diese Doktorarbeit
Acido5_732	„subdivision“ 5	GAC TCT GTC CAG ATA GCC	diese Doktorarbeit
Acido5_989	„subdivision“ 5	CTC GAA CGG CTA GTG ACA	diese Doktorarbeit
Acido5_997	„subdivision“ 5	TCA GCC AAC TTC CAC TGC	diese Doktorarbeit
Acido5_1006	„subdivision“ 5	AAA GCG ACT TTC GCC ACC	diese Doktorarbeit
Acido5_1034	„subdivision“ 5	GAC ACT AGT CGA GGT GCT	diese Doktorarbeit
Acido5_1430	„subdivision“ 5	GTC AGC TCG ACG ACT TCT	diese Doktorarbeit
Acido5_1457	„subdivision“ 5	ATA GCC GTC CAA GGT ATG	diese Doktorarbeit
Acido6_173 ¹	„subdivision“ 6	GAC AGC ATG TTA TGC GGT	diese Doktorarbeit
Acido6_182	„subdivision“ 6	CCA TTC AAG AGC GGG ATG	diese Doktorarbeit
Acido6_191	„subdivision“ 6	CGG CTT TGA TCT CTC TCT	diese Doktorarbeit
Acido6_300_G	„subdivision“ 6	AGT GTG GCC GTC CGC CCT	diese Doktorarbeit
Acido6_300_T	„subdivision“ 6	AGT GTG TCC GTC CGC CCT	diese Doktorarbeit
Acido6_365	„subdivision“ 6	TGT TCG CAA TGG GCG CAA	diese Doktorarbeit
Acido6_381 ¹	„subdivision“ 6	TTG CGT CGT GCA GGC TT	diese Doktorarbeit
Acido6_382 ¹	„subdivision“ 6	CAA GCC TGA CGA CGC AA	diese Doktorarbeit
Acido6_446	„subdivision“ 6	AGG TCG GAG CTG TTC TTC	diese Doktorarbeit
Acido6_453 ¹	„subdivision“ 6	ACG TAT TAG GTC GAC AGG	diese Doktorarbeit
Acido6_462 ¹	„subdivision“ 6	ACT CCT CCA GGA TGT TAG	diese Doktorarbeit
Acido6_467	„subdivision“ 6	CCG TCA CTC TCG CAA AGT	diese Doktorarbeit
Acido6_473 ¹	„subdivision“ 6	TCG ATA CTG TCA CCC CCT	diese Doktorarbeit
Acido6_586 ¹	„subdivision“ 6	CGT CTG ACT TAG CAA GCC	diese Doktorarbeit
Acido6_991	„subdivision“ 6	ATG GTC ATC TGC ACT TCG	diese Doktorarbeit
IRog1	„subdivision“ 6	AAG GCG GCA TCC TGG ACC	[107]
IRog2 ¹	„subdivision“ 6	GAA CAA TTC CCC ACT GC	[107]
IRog2_rc ¹	„subdivision“ 6	GCA GTG GGG AAT TGT TC	diese Doktorarbeit
OTU43/44-O360	„subdivision“ 6	CCA TTG CGA ACA ATT CCC	[77]
OTU43/44-O360_rc	„subdivision“ 6	GGG AAT TGT TCG CAA TGG	diese Doktorarbeit
Rog102	„subdivision“ 6	CGG GTA TCG ATC CCT GCC	[192]
Acido7_79	„subdivision“ 7	AGG GGC AAC TCT TCC AGT	diese Doktorarbeit
Acido7_146	„subdivision“ 7	GGA ATA CCT CGG GGA AAC T	diese Doktorarbeit
Acido7_181 ¹	„subdivision“ 7	CCT TTC ACC TCT CGG TGA T	diese Doktorarbeit
Acido7_193 ¹	„subdivision“ 7	GAT CAA AGC GGG GTC GCA	diese Doktorarbeit

Acido7_193_rc ¹	„subdivision“ 7	TGC GAC CCC GCT TTG ATC	diese Doktorarbeit
Acido7_613	„subdivision“ 7	CGT CCT CAG TTA AGC CGA	diese Doktorarbeit
Acido7_995	„subdivision“ 7	TGA GAC TTG CCT GTA CAG	diese Doktorarbeit
Gtx_59	„subdivision“ 8	AAG TCG GAT GTG CCG CAA	diese Doktorarbeit
Gtx_163	„subdivision“ 8	GGA GTG GTA ATA CCG CAT GA	diese Doktorarbeit
Gtx_817 ¹	„subdivision“ 8	CAC ACC AAG TGT TCA TCG	diese Doktorarbeit
Gtx_817_rc ¹	„subdivision“ 8	CGA TGA ACA CTT GGT GTG	diese Doktorarbeit
Gtx_1012	„subdivision“ 8	AGA GAT GTG CCT TTT CGC AAG A	diese Doktorarbeit
Gtx_1113	„subdivision“ 8	CCT TAC CCG TAG TTG CCA GCG	diese Doktorarbeit
Gtx_1239	„subdivision“ 8	ATG GGC GAT ACA AAC CGT	diese Doktorarbeit
Gtx_1420	„subdivision“ 8	CCG GGA GCA CTT GAA GAG G	diese Doktorarbeit
Gtx_1437 ¹	„subdivision“ 8	CGG TGG GCT AAC CCG CAA GG	diese Doktorarbeit
Hol_90	„subdivision“ 10	TCT GCC ACT CTA CTA ACG	diese Doktorarbeit
Acido9_183	„subdivision“ 10	GTC AAG TCC AAA GAC CCG	diese Doktorarbeit
Hol_621	„subdivision“ 10	CGA AGG CAA TTC CTC AGT	diese Doktorarbeit
Hol_1167	„subdivision“ 10	CAC CTT CCT CCC CGA TTT	diese Doktorarbeit
Hol_1463	„subdivision“ 10	CCG ATC ACA CCT TCG ACA	diese Doktorarbeit
Acido10_375	„subdivision“ „12“	GCC CGA AAG GGT GAT GCA	diese Doktorarbeit
Acido10_423	„subdivision“ „12“	GGT CGT AAA CCT CTT TCG	diese Doktorarbeit
Acido11_64	„subdivision“ „13“	TGC CCC CAC TTT CTC GTT	diese Doktorarbeit
Acido11_481	„subdivision“ „13“	TTC CTC AAC GGG TAC AGT	diese Doktorarbeit
Acido11_1158	„subdivision“ „13“	TGT CGG CGA AAA GCC GGA	diese Doktorarbeit

¹ Sonde wurde nicht auf dem *Acidobacteria* Mikroarray eingesetzt, da kein positives Signal nach der Hybridisierung mit dem fluoreszenz-markierten 16S-rDNS PCR-Fragment des perfekt paarenden Referenzstammes detektiert werden konnte oder ein unspezifisches Signal zu Nicht-Zielorganismen, die innerhalb der 16S-rDNS Zielregion Fehlpaarungen aufwiesen, beobachtet wurde. ² Der Begriff „subdivision“ bezieht sich auf die Klassifizierung des Phylums *Acidobacteria* nach [71, 193]

Tabelle 30: Verwendete 16S-rDNS Mikroarrayoligonukleotidsonden mit zugehöriger Spezifität, Sequenz sowie Referenzen. Die jeweilige Sondenanzahl auf dem Gruppen-spezifischen bzw. Spezies-spezifischen Mikroarray kann den Tabellen 31 und 32 entnommen werden.

Nonsense	Acido1 _300A	Acido1 _300C	Acido1 _112	Acido3 _307	Acido5 _306	Acido5 _530	IRog1	Acido	Gtx	Hol	Acido10 _423
UNIV _1390	Acido1 _189	Acido1 _1017	Acido3 _718	Acido 3_1137	Acido4 _809	Acido5 _140	Acido5	Rog102	Gtx _59	Hol _1167	Acido10 _375
616V	Acido1 _1277	Acido2 _426	Acido3 _1161	Acido4 _193rc	Acido4 _353	Acido5 _409	Acido5	Acido7 _613	Gtx _1012	Hol _1463	Acido11 _1158
Hol _1400	Acido1 _996a	Acido2 _404	Acido3 _983	Acido4 _322a	Acido4 _843	Acido5 _989	OTU43/44 _O360	Gtx _163	Gtx _1113	Hol _90	
	Acido1 _996b		Acido3 _537	Acido4 _329	1078_3	Acido5 _217	Acido6 _365	Gtx _1239			

Tabelle 31: Sondenanzordnung für den Gruppen-spezifischen 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray

Nonsense	UNIV _1390	Hol _1400	Acido1 _1142	Acido1 _987	Acido1 _83	Acido1 _1039	Acido1 _152	Acido1 _843	Acido1 _126a	Acido1 _126b	
Acido1 _1034	Acido1 _639	Acido11 _64	Acido3 _186	Acido3 _646	Acido3 _129	Acido3 _581	Acido3 _178	Acido3 _645	Acido3 _589	Acido5 _1006	Acido5 _177
Acido5 _732	Acido11 _481	Acido3 _1014	Acido4 _998	Acido4 _84	Acido4 _837a	Acido4 _1004	Acido4 _1005	Acido4 _837b	Acido6 _462	Acido6 _173	Acido6 _473
Acido6 _586	Acido6 _991	Acido6 _446	Acido6 _191	Acido6 _182	Acido6 _381	Acido6 _467	Acido7 _995	Acido9 _183	Acido6 _300G	Acido6 _300T	Acido3 _1004
Acido6 _453											

Tabelle 32: Sondenanordnung für den Klon-spezifischen 16S-rRNS Oligonukleotidmikroarray

Literaturverzeichnis

- [1] **Abed, R., N. Safi, J. Koster, D. de Beer, Y. El-Nahhal, J. Rullkotter, und F. Garcia-Pichel.** 2002. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1674–1683.
- [2] **Acinas, S., L. Marcelino, V. Klepac-Ceraj, und M. Polz.** 2004. Divergence and redundancy of 16s rRNA sequences in genomes with multiple rRNA operons. *J. Bacteriol.* **186**:2629–2635.
- [3] **Adamczyk, J., M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P. H. Nielsen, M. Schloter, P. Roslev, und M. Wagner.** 2003. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6875–6887.
- [4] **Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. Glockner, A. Wille, und R. Psenner.** 1996. Community Analysis of the Bacterial Assemblages in the Winter Cover and Pelagic Layers of a High Mountain Lake by In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2138–2144.
- [5] **Alvey, S., C. Yang, A. Bruerkert, und D. Crowley.** 2003. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west african soils. *Biol. Fert. Soils* **37**:73–82.
- [6] **Amann, R., B. Binder, R. Olson, S. Chisholm, R. Devereux, und D. Stahl.** 1990. Combination of 16s rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919–1925.
- [7] **Amann, R., L. Krumholz, und D. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762–770.
- [8] **Anthony, R., T. Brown, und G. French.** 2000. Rapid detection of bacteremia by universal amplification of 23s ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* **38**:781–788.
- [9] **Artursson, V. und J. Jansson.** 2003. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6208–6215.
- [10] **Bak, F., K. Finster, und F. Rothfuß.** 1992. Formation of dimethylsulfide and methanethiol from methoxylated aromatic compounds and inorganic sulfide by newly isolated anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**:529–534.
- [11] **Barns, S., E. Cain, L. Sommerville, und C. Kuske.** 2007. *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3113–3116.

- [12] **Barns, S., S. Takala, und C. Kuske.** 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom acidobacterium in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1731–1737.
- [13] **Bauer, S.** 1998. Untersuchungen zur bakteriellen diversität in der rhizosphäre von raps und mais. Dissertation, Technische Universität München .
- [14] **Behr, T.** 2002. Entwicklung und anwendung von mikrohybridisierungsverfahren zur detektion und identifizierung von enterokokken in der wasser- und lebensmittelanalytik. Dissertation, Technische Universität München .
- [15] **Behr, T., C. Koob, M. Schedl, A. Mehlen, H. Meier, D. Knopp, E. Frahm, U. Obst, K. Schleifer, R. Niessner, und W. Ludwig.** 2000. A nested array of rna targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:563–72.
- [16] **Behrens, S., B. M. Fuchs, F. Mueller, und R. Amann.** 2003. Is the *in situ* accessibility of the 16s rna of *Escherichia coli* for cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30s ribosomal subunit? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4935–4941.
- [17] **Bianchi, N., C. Rutigliano, M. Tomassetti, G. Feriotto, F. Zorzato, und R. Gambari.** 1997. Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of hiv-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction. *Clin. Diagn. Virol.* **8**:199–208.
- [18] **Bjornsson, L., P. Hugenholtz, G. Tyson, und L. Blackall.** 2002. Filamentous chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology* **148**:2309–2318.
- [19] **Bodrossy, L., N. Stralis-Pavese, J. C. Murrell, S. Radajewski, A. Weilharter, und A. Sessitsch.** 2003. Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* **5**:566–582.
- [20] **Borneman, J.** 1999. Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3398–3400.
- [21] **Braker, G., C. Bremer, und R. Conrad.** 2005. Impact of plant diversity on diversity, structure and function of denitrifier communities in experimental grassland ecosystems. Vortrag Workshop Development and control of functional biodiversity at micro- and macro-scales .
- [22] **Brodie, E., T. DeSantis, J. Moberg Parker, I. Zubieta, Y. Piceno, und G. Andersen.** 2006. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **104**:299–304.
- [23] **Brodie, E., S. Edwards, und N. Clipson.** 2002. Bacterial community dynamics across a floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystem. *Microb. Ecol.* **44**:260–270.
- [24] **Broughton, L. und K. Gross.** 2000. Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a michigan old-field. *Oecologia* **125**:420–427.

- [25] **Buckley, D. und T. Schmidt.** 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ. Microbiol.* **5**:441–452.
- [26] **Buscot, F. und V. Varma.** 2004. *Microorganisms in soils: Roles in genesis and function.* Springer, Berlin.
- [27] **Caruana, D. und A. Heller.** 1999. Enzyme-amplified amperometric detection of hybridization and of a single base pair mutation in an 18-base oligonucleotide on a 7- μ m-diameter microelectrode. *J. Am. Chem. Soc.* **121**:769–774.
- [28] **Castiglioni, B., E. Rizzi, A. Frosini, K. Sivonen, P. Rajaniemi, A. Rantala, M. Mugnai, S. Ventura, A. Wilmotte, C. Boutte, S. Grubisic, P. Balthasart, C. Consolandi, R. Bordoni, A. Mezzelani, C. Battaglia, und G. De Bellis.** 2004. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16s rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7161–7172.
- [29] **Chao, A.** 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Statistics* **11**:265–270.
- [30] **Chao, A., M.-C. Ma, und M. Yang.** 1993. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* **80**:193–201.
- [31] **Chou, Q., M. Russell, D. E. Birch, J. Raymond, und W. Bloch.** 1992. Prevention of pre-pcr mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl. Acids Res* **20**:1717–23.
- [32] **Clegg, C., K. Ritz, und B. Griffiths.** 2000. %g+c profiling and cross hybridisation of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. *Appl. Soil Ecol.* **14**:125–134.
- [33] **Coates, J., D. Ellis, C. Gaw, und D. Lovley.** 1999. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1615–1622.
- [34] **Crecchio, C., A. Gelsomino, R. Ambrosoli, J. Minati, und P. Ruggiero.** 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil. Biol. Biochem.* **36**:1873–1883.
- [35] **Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K.-H. Schleifer, und 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. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:434–444.
- [36] **Daims, H., N. Ramsing, K.-H. Schleifer, und M. Wagner.** 2001. Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5810–5818.
- [37] **Davis, K., S. Joseph, und P. Janssen.** 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:826–834.

- [38] **de los Reyes, F., W. Ritter, und L. Raskin.** 1997. Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1107–1117.
- [39] **DeSantis, T., E. Brodie, J. Moberg, I. Zubieta, Y. Piceno, und G. Andersen.** 2007. High-density universal 16s rna microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb. Ecol.* **53**:371–383.
- [40] **DeSantis, T. Z., C. E. Stone, S. R. Murray, J. P. Moberg, und G. L. Andersen.** 2005. Rapid quantification and taxonomic classification of environmental dna from both prokaryotic and eukaryotic origins using a microarray. *FEMS Microbiology Letters* **245**:271–278.
- [41] **Dong, D., A. Yan, H. Liu, X. Zhang, und Y. Xu.** 2006. Removal of humic substances from soil dna using aluminium sulfate. *J. Microbiol. Methods* **66**:217–222.
- [42] **Dunbar, J., S. Barns, L. Ticknor, und C. Kuske.** 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3035–3045.
- [43] **Erickson, D., D. Li, und U. Krull.** 2003. Modeling of dna hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Anal. Biochem.* **317**:186–200.
- [44] **Felske, A., W. de Vos, und A. Akkermans.** 2000. Spatial distribution of 16s rna levels from uncultured *Acidobacteria* in soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:118–122.
- [45] **Ferguson, J., F. Steemers, und D. Walt.** 2000. High-density fiber-optic dna random microsphere array. *Anal. Chem.* **72**:5618–5624.
- [46] **Feriotto, G., M. Borgatti, C. Mischiati, N. Bianchi, und R. Gambari.** 2002. Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified roundup ready soybean gene sequences. *J. Agric. Food Chem.* **50**:995–962.
- [47] **Filion, M., R. C. Hamelin, L. Bernier, und M. St-Arnaud.** 2004. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3541–3551.
- [48] **Fried, J.** 2002. Isolation and identification of protozoa from biological wastewater treatment plants. Dissertation, Institut für Zoologie und Limnologie, Universität Innsbruck, Österreich .
- [49] **Frostegard, A., S. Courtois, V. Ramisse, S. Clerc, D. Bernillon, F. Le Gall, P. Jeannin, X. Nesme, und P. Simonet.** 1999. Quantification of bias related to the extraction of dna directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5409–5420.
- [50] **Fry, J.** 2000. Bacterial diversity and “unculturables”. *Microbiol. today* **27**:186–188.
- [51] **Fuller, M. und J. Manning.** 1998. Evidence for differential effects of 2,4,6-trinitrotoluene and other munitions compounds on specific subpopulations of soil microbial communities. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**:2185–2195.
- [52] **Gans, J., M. Wolinsky, und J. Dunbar.** 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* **309**:1387–1390.

- [53] **Garrity, G.** 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, 2nd ed.
- [54] **Gastine, A., M. Scherer-Lorenzen, und P. Leadly.** 2003. No consistent effects of plant biodiversity on root biomass, soil biota and soil abiotic conditions in temperate grassland communities. *Appl. Soil Ecol.* **24**:101–111.
- [55] **George, I., L. Eyers, B. Stenuit, und S. Agathos.** 2007. Effect of 2,4,6-trinitrotoluene on soil bacterial populations. submitted .
- [56] **Gich, F., J. Garcia-Gil, und J. Overmann.** 2001. Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch. Microbiol.* **177**:1–10.
- [57] **Girvan, M., J. Bullimore, J. Pretty, A. Osborn, und A. Ball.** 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1800–1809.
- [58] **Gomez-Alvarez, V., G. King, und K. Nüsslein.** 2007. Comparative bacterial diversity in recent hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**:60–73.
- [59] **Gong, P., P. Gasparrini, D. Rho, J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman, und G. Sunahara.** 2000. An in situ respirometric technique to measure pollution-induced microbial community tolerance in soils contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene. *Ecotox. Environ. Saf.* **47**:96–103.
- [60] **Gordon, D., J. Priscu, und S. Giovannoni.** 2000. Origin and phylogeny of microbes living in permanent antarctic lake ice. *Microb. Ecol.* **39**:197–202.
- [61] **Grayston, S., G. Griffiths, J. Mawdsley, C. Campbell, und R. Bardgett.** 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil. Biol. Biochem.* **33**:533–551.
- [62] **Griffiths, R., A. Whiteley, A. O'Donnell, und M. Bailey.** 2003. Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:35–43.
- [63] **Guo, Z., R. Guilfoyle, A. Thiel, R. Wang, und L. Smith.** 1994. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucl. Acids Res.* **22**:5456–5465.
- [64] **Guschin, D., B. Mobarry, D. Proudnikov, D. Stahl, B. Rittmann, und A. Mirzabekov.** 1997. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2397–2402.
- [65] **Hahn, D., R. Amann, W. Ludwig, A. Akkermans, und K.-H. Schleifer.** 1992. Detection of micro-organisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* **138**:879–887.
- [66] **Hedlund, K., I. Santa Regina, W. van der Putten, J. Lep, T. Diaz, G. Korthals, S. Lavorel, V. Brown, D. Gormsen, S. Mortimer, C. Rodríguez Barrueco,**

- J. Roy, P. Smilauer, M. Smilauerová, und C. van Dijk.** 2003. Plant species diversity, plant biomass and responses of the soil community on abandoned land across europe: idiosyncrasy or above-belowground time lags. *Oikos* **103**:45–58.
- [67] **Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker, und B. S. Moore.** 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4431–4440.
- [68] **Hiraishi, A., N. Kishimoto, Y. Kosako, N. Wakao, und T. Tano.** 1995. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:91–94.
- [69] **Hjort, K., A. Lembke, A. Speksnijder, K. Smalla, und J. Jansson.** 2006. Community structure of actively growing bacterial populations in plant pathogen suppressive soil. *Microb. Ecol.* **53**:399–413.
- [70] **Holmes, A. J., N. Tujula, M. Holley, A. Contos, J. James, P. Rogers, und M. Gillings.** 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in nullarbor caves, australia. *Environ. Microbiol.* **3**:256–264.
- [71] **Hugenholtz, P., B. Goebel, und N. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765–4774.
- [72] **Hughes, J., J. J. Hellman, T. H. Ricketts, und B. J. M. Bohannan.** 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4399–4406.
- [73] **Janssen, P., P. Yates, B. Grinton, P. Taylor, und M. Sait.** 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions acidobacteria, actinobacteria, proteobacteria, and verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2391–2396.
- [74] **Johnson, M., K. Lee, und K. Scow.** 2003. Dna fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma* **114**:279–303.
- [75] **Joseph, S., P. Hugenholtz, P. Sangwan, C. Osborne, und P. Janssen.** 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7210–7215.
- [76] **Junca, H. und D. Pieper.** 2004. Functional gene diversity analysis in btex contaminated soils by means of pcr-sscp dna fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and pcr-dna clone libraries. *Environ. Microbiol.* **6**:95–110.
- [77] **Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner, und M. Wagner.** 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rna approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**:84–99.
- [78] **Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H.-P. Koops, und 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.

- [79] **Kelly, J., S. Siripong, J. McCormack, L. Janus, H. Urakawa, S. El Fantroussi, P. Noble, L. Sappelso, B. Rittmann, und D. Stahl.** 2005. Dna microarray detection of nitrifying bacterial 16s rrna in wastewater treatment plant samples. *Water Res.* **39**:3229–3238.
- [80] **Kemp, P. und J. Y. Aller.** 2003. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16s rdna libraries can tell us. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1600**:1–17.
- [81] **Kemp, P. und J. Y. Aller.** 2004. Estimating prokaryotic diversity: When are 16s rdna libraries large enough? *Limnol. Ozeanograph.: Methods* **2**:114–125.
- [82] **Kishimoto, N., Y. Kosako, und T. Tano.** 1991. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic, chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr. Microbiol.* **22**:1–7.
- [83] **Kleijung, F., F. Bier, A. Warsinke, und F. Scheller.** 1997. Fibre-optic genosensor for specific determination of femtomolar dna oligomers. *Anal. Chem. Acta* **350**:51–58.
- [84] **Klugbauer, S.** 1994. Entwicklung von molekularbiologischen methoden zur untersuchung von nicht-kultivierbaren bakterien in komplexen ökosystemen. Dissertation, Technische Universität München .
- [85] **Kovarova, M. und P. Draber.** 2000. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucl. Acids Res.* **28**:e70–.
- [86] **Kowalchuk, G., D. Buma, W. de Boer, P. Klinkhamer, und J. van Veen.** 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:509–20.
- [87] **Kreader, C.** 1996. Relief of amplification inhibition in pcr with bovine serum albumin or t4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1102–1106.
- [88] **Kreft, J. und B. Schink.** 1993. Demethylation and degradation of phenylmethylesters by the sulfide-methylating homoacetogenic bacterium strain tmbs4. *Arch. Microbiol.* **159**:308–315.
- [89] **Küper, R.** 1999. Phylogenetische untersuchungen an bisher nicht-kultivierten archaeen aus gemäßigten habitaten. Dissertation, Technische Universität München .
- [90] **Kuske, C., S. Barns, und J. Busch.** 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern united states that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3614–3621.
- [91] **Kuske, C., L. Ticknor, M. Miller, J. Dunbar, J. Davis, S. Barns, und J. Belnap.** 2002. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1854–1863.
- [92] **Lane, D.** 1991. 16s/23s rrns sequencing, p. 115–175. In E. Stackebrandt und M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley Chichester UK.
- [93] **Lehner, A., A. Loy, T. Behr, H. Gaenge, W. Ludwig, M. Wagner, und K.-H. Schleifer.** 2005. Oligonucleotide microarray for identification of *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**:133–142.

- [94] **Li, J., W. Tan, K. Wang, D. Xiao, X. Yang, X. He, und Z. Tang.** 2001. Ultra-sensitive optical dna biosensor based on surface immobilization of molecular beacon by a bridge structure. *Anal. Sci.* **17**:1149–53.
- [95] **Liesack, W., F. Bak, J. Kreft, und E. Stackebrandt.** 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., spec. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **162**:85–90.
- [96] **Lindahl, V. und L. Bakken.** 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology* **16**:135–142.
- [97] **Lindstrom, U. und E. Kool.** 2002. An orthogonal oligonucleotide protecting group strategy that enables assembly of repetitive or highly structured DNAs. *Nucl. Acids Res.* **30**:e101–.
- [98] **Lipson, D. und S. Schmidt.** 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the colorado rocky mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2867–2879.
- [99] **Liu, W. und D. Stahl.** 2002. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny, p. 114–134. *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 2nd ed.
- [100] **Liu, W.-T., A. D. Mirzabekov, und D. A. Stahl.** 2001. Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. *Environ Microbiol* **3**:619–629.
- [101] **Lonergan, D., H. Jenter, J. Coates, E. Phillips, T. Schmidt, und D. Lovley.** 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory fe(iii)-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:2402–2408.
- [102] **Lopez-Garcia, P., S. Duperron, P. Philippot, J. Foriel, J. Susini, und D. Moreira.** 2003. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the mid-atlantic ridge. *Environ. Microbiol.* **5**:961–976.
- [103] **Loy, A.** 2003. Dna microarray technology for biodiversity inventories of sulfate-reducing prokaryotes. Dissertation, Technische Universität München .
- [104] **Loy, A. und L. Bodrossy.** 2006. Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin. Chim. Acta* **363**:106–119.
- [105] **Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K.-H. Schleifer, und M. Wagner.** 2002. Oligonucleotide microarray for 16s rrna gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5064–5081.
- [106] **Loy, A., C. Schulz, S. Lucker, A. Schopfer-Wendels, K. Stoecker, C. Baranyi, A. Lehner, und M. Wagner.** 2005. 16s rrna gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order “rhodocyclales”. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1373–1386.

- [107] Ludwig, W., S. H. Bauer, M. Bauer, I. Held, G. Kirchhof, R. Schulze, I. Huber, S. Spring, A. Hartmann, und K. H. Schleifer. 1997. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**:181–190.
- [108] Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, und K. H. Schleifer. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**:554–68.
- [109] Ludwig, W., O. Stunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüssmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, S. A., N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, und K.-H. Schleifer. 2004. Arb: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* **32**:1–9.
- [110] Lueders, T. und M. Friedrich. 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2732–2742.
- [111] Lunau, M., A. Lemke, K. Walther, W. Martens-Habbena, und M. Simon. 2005. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environ. Microbiol.* **7**:961–968.
- [112] Madigan, T., J. Martinko, und J. Parker. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall International (UK) Limited, London, 9th ed.
- [113] Maloney, P., A. van Bruggen, und S. Hu. 1997. Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizospheres and in bulk soil. *Microb. Ecol.* **34**:109–117.
- [114] Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, und K.-H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16s rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**:1097–1106.
- [115] Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, und K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593 – 600.
- [116] Marilley, L. und M. Aragno. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil Ecol.* **13**:127–136.
- [117] Marschner, P., C. Yang, R. Lieberei, und D. Crowley. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil. Biol. Biochem.* **33**:1437–1445.
- [118] McDonald, R. 1986. Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation. *Soil. Biol. Biochem.* **18**:399–406.

- [119] **Mehlen, A.** 2003. Stammspezifische identifizierung pathogener und biotechnologisch relevanter bakterien durch in vitro amplifikation und detektion charakteristischer genfragmente. Dissertation, Technische Universität München .
- [120] **Meier, H., R. Amann, W. Ludwig, und K.-H. Schleifer.** 1999. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low dna g + c content. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:186–196.
- [121] **Miethling, R., K. Ahrends, und C. Tebbe.** 2003. Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community-level physiological profiles. *Soil. Biol. Biochem.* **35**:1405–1410.
- [122] **Milner, N., K. Mir, und E. Southern.** 1997. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **15**:537–541.
- [123] **Nägele, V.** 2005. Fluoreszenz *in situ* hybridisierung zur identifizierung von vertretern des phylums *Acidobacteria* im ökosystem boden. Diplomarbeit, Technische Universität München .
- [124] **Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, und K.-H. Schleifer.** 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16s rrna-targeted probes. *Microbiology* **144**:3257–66.
- [125] **Nunan, N., T. J. Daniell, B. Singh, A. Papert, J. McNicol, und J. Prosser.** 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6784–6792.
- [126] **Nunan, N., B. Singh, E. Reid, B. Ord, A. Papert, J. Squires, J. Prosser, R. Wheatley, J. McNicol, und P. Millard.** 2006. Sheep-urine-induced changes in soil microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**:310–320.
- [127] **Nüsslein, K. und J. M. Tiedje.** 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3622–3626.
- [128] **Ohara, O. und G. Temple.** 2001. Directional cDNA library construction assisted by the in vitro recombination reaction. *Nucl. Acids Res.* **29**:e22–.
- [129] **Ouverney, C., G. Armitage, und A. Relman.** 2004. Use of cloned artificial targets for fish (catfish) for the optimization of oligonucleotide probe hybridization conditions with 16s rrna clones for *in situ* quantification of uncultivated prokaryotic cells. *Molecular Microbial Ecology Manual 2nd ed.*:724–727.
- [130] **Overmann, J.** 2005. Microbial diversity - functional units and controlling factors. Vortrag Workshop Development and control of functional biodiversity at micro- and macro-scales .
- [131] **Pankratov, T., S. Belova, und S. Dedysh.** 2005. Evaluation of the phylogenetic diversity of prokaryotic microorganisms in *Sphagnum* peat bogs by means of fluorescence *in situ* hybridization (fish). *Microbiology* **74**:722–728.

- [132] **Pernthaler, A., J. Pernthaler, und R. Amann.** 2002. Fluorescence *in situ* hybridization and catalysed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3094–3101.
- [133] **Pernthaler, A., J. Pernthaler, M. Schattenhofer, und R. Amann.** 2002. Identification of dna-synthesizing bacterial cells in coastal north sea plankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5728–5736.
- [134] **Pernthaler, A., C. Preston, J. Pernthaler, E. DeLong, und R. Amann.** 2002. Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:661–667.
- [135] **Perry-O’Keefe, H., S. Rigby, K. Oliveira, D. Sorensen, H. Stender, J. Coull, und J. Hyldig-Nielsen.** 2001. Identification of indicator microorganisms using a standardized pna fish method. *J. Microbiol. Methods* **47**:281–292.
- [136] **Peter, C.** 2003. Evaneszent-feld-dna-biosensor zur schnellen, zeitaufgelösten detektion multipler hybridisierungsereignisse - einatz zur tierartendifferenzierung in lebensmitteln und für die identifizierung von mikroorganismen. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster .
- [137] **Pozhitkov, A., K. Bailey, und P. Noble.** 2007. Development of a statistically robust quantification method for microorganisms in mixtures using oligonucleotide microarrays. *J. Microbiol. Methods* **70**:281–292.
- [138] **Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes, und F. Widdle.** 1996. Degradative capacities and 16s rna-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3605–3613.
- [139] **Radajewski, S., G. Webster, D. Reay, S. Morris, P. Ineson, D. Nedwell, J. Prosser, und J. Murrell.** 2002. Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology* **148**:2331–2342.
- [140] **Ranjard, L., D. Lejon, C. Mougel, L. Schehrer, D. Merdinoglu, und R. Chaussod.** 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on dna fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. Microbiol.* **5**:1111–1120.
- [141] **Raskin, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann, und D. A. Stahl.** 1994. Group-specific 16s rna hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1232–40.
- [142] **Reysenbach, A. L., L. J. Giver, G. S. Wickham, und N. R. Pace.** 1992. Differential amplification of rna genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3417–8.
- [143] **Ritz, K., J. McNicol, N. Nunan, S. Grayston, P. Millard, D. Atkinson, A. Golotte, D. Habeshaw, B. Boag, C. Clegg, B. Griffiths, R. Wheatley, L. Glover, A. McCaig, und J. Prosser.** 2004. Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**:191–205.

- [144] **Rochelle, P. A., B. A. Cragg, J. C. Fry, R. J. Parkes, und A. J. Weightman.** 1994. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16s rna gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**:215–225.
- [145] **Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, und K. Schleifer.** 1994. In situ probing of gram-positive bacteria with high dna g + c content using 23s rna-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**:2849–2858.
- [146] **Rondon, M., P. August, A. Bettermann, S. Brady, T. Grossman, M. Liles, K. Loiacono, B. Lynch, I. MacNeil, C. Minor, C. Tiong, M. Gilman, M. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, und R. Goodman.** 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2541–2547.
- [147] **Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, und H. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science* **239**:487–91.
- [148] **Sait, M., P. Hugenholtz, und P. H. Janssen.** 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* **4**:654–666.
- [149] **Sambrook, J., E. Fritsch, und M. T.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 3rd ed.
- [150] **Sanghoon, K. und A. Mills.** 2006. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. *J. Microbiol. Methods* **66**:242–250.
- [151] **Schabereiter-Gurtner, C., C. Saiz-Jimenez, G. Pinar, W. Lubitz, und S. Rolleke.** 2002. Altamira cave paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**:7–11.
- [152] **Schabereiter-Gurtner, C., C. Saiz-Jimenez, G. Pinar, W. Lubitz, und S. Rolleke.** 2002. Phylogenetic 16s rna analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in tito bustillo cave, spain, and on its palaeolithic paintings. *Environ. Microbiol.* **4**:392–400.
- [153] **Scheller, F. und F. Schuber.** 1989. *Biosensoren.* Birkhäuser Verlag, Berlin .
- [154] **Schena, M., D. Shalon, R. Davis, und P. Brown.** 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science* **270**:467–470.
- [155] **Schloss, P. und J. Handelsman.** 2004. Status of the microbial census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:686–691.
- [156] **Schramm, A., B. M. Fuchs, J. L. Nielsen, M. Tonolla, und D. A. Stahl.** 2002. Fluorescence *in situ* hybridization of 16s rna gene clones (clone-fish) for probe validation and screening of clone libraries. *Environ. Microbiol.* **4**:713–720.
- [157] **Schuderer, J., A. Akkoyun, A. Brandenburg, U. Bilitewski, und E. Wagner.** 2000. Development of a multichannel fluorescence affinity sensor system. *Anal. Chem.* **72**:3942–3948.

- [158] **Shchepinov, M., S. Case-Green, und E. Southern.** 1997. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucl. Acids Res.* **25**:1155–1161.
- [159] **Siciliano, S., R. Roy, und C. Greer.** 2000. Reduction in denitrification activity in field soils exposed to long term contamination by 2,4,6-trinitrotoluene (tnt). *FEMS Microbiology Ecology* **32**:61–68.
- [160] **Singh, B., S. Munro, J. Potts, und P. Millard.** 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Appl. Soil Ecol.* **36**:147–155.
- [161] **Singh, B., L. Nazaries, S. Munro, I. Anderson, und C. Campbell.** 2006. Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7278–7285.
- [162] **Sipos, R., A. Székely, M. Palatinszky, S. Révész, K. Márialigeti, und M. Nikolausz.** 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and pcr cycle number on 16s rrna gene-targetting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**:341–350.
- [163] **Smalla, K., M. Oros-Sichler, A. Milling, H. Heuer, S. Baumgarte, R. Becker, G. Neuber, S. Kropf, A. Ulrich, und C. Tebbe.** 2007. Bacterial diversity of soils assessed by dgge, t-rflp and sscp fingerprints of pcr-amplified 16s rrna gene fragments: Do the different methods provide similar results? *J. Microbiol. Methods* **69**:470–479.
- [164] **Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer, und G. Berg.** 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4742–4751.
- [165] **Southern, E., K. Mir, und M. Shchepinov.** 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* **21**:5–9.
- [166] **Spring, S., R. Schulze, J. Overmann, und K.-H. Schleifer.** 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:573–590.
- [167] **Stackebrandt, E. und T. Embley.** 2000. Diversity of uncultured microorganisms in the environment. *Nonculturable Microorganisms in the Environment ASM Press, Washington, D.C.*
- [168] **Stahl, D. A. und R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205–248. *In Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- [169] **Stevenson, B., S. Eichorst, J. Wertz, T. Schmidt, und J. Breznak.** 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4748–4755.
- [170] **Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashim, M. J. Johnson, K. Itakura, und R. B. Wallace.** 1981. Developmental biology using purified genes, p. 683–693. Academic Press, New York.

- [171] **Tebbe, C. und W. Vahjen.** 1993. Interference of humic acids and dna extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant dna from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2657–65.
- [172] **Torsvik, V., F. Daae, R. Sandaa, und L. Ovreas.** 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**:53–62.
- [173] **Tsai, Y. und B. Olson.** 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2292–2295.
- [174] **Urakawa, H., P. Noble, S. El Fantroussi, J. Kelly, und D. Stahl.** 2002. Single-base-pair discrimination of terminal mismatches by using oligonucleotide microarrays and neural network analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:235–244.
- [175] **van Elsas, J., J. Trevors, und L. van Overbeek.** 1991. Influence of soil properties on the vertical movement of genetically-marked *Pseudomonas fluorescens* through large soil microcosms. *Biol. Fertil. Soils* **10**:249–255.
- [176] **Vazques, D.** 1966. Mode of action of chloramphenicol and related antibiotics. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **16**:169–191.
- [177] **von Wintzingerode, F., U. B. Gobel, und E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of pcr-based rrna analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**:213–229.
- [178] **von Wintzingerode, F., B. Selent, W. Hegemann, und U. Gobel.** 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:283–286.
- [179] **Wang, J., G. Rivas, J. Fernandes, J. Paz, M. Jiang, und R. Waymire.** 1998. Indicator-free electrochemical dna hybridization biosensor. *Anal. Chem. Acta* **375**:197–203.
- [180] **Warsen, A., M. Krug, S. LaFrentz, D. Stanek, F. Loge, und D. Call.** 2004. Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16s ribosomal dna pcr and dna microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4216–4221.
- [181] **Weber, S.** 2004. Adaption von fluoreszenz-in-situ-hybridisierungsverfahren zur untersuchung von pansenciliaten. Diplomarbeit, Technische Universität München .
- [182] **Wieland, G., R. Neumann, und H. Backhaus.** 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5849–5854.
- [183] **Wilke, B., A. Gattinger, E. Fröhlich, L. Zelles, und P. Gong.** 2004. Phospholipid fatty acid composition of a 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil and an uncontaminated soil as affected by a humification remediation process. *Soil. Biol. Biochem.* **36**:725–729.
- [184] **Wilson, K. H., W. J. Wilson, J. L. Radosevich, T. Z. DeSantis, V. S. Viswanathan, T. A. Kuczmarski, und G. L. Andersen.** 2002. High-density microarray of small-subunit ribosomal dna probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2535–2541.

-
- [185] **Wu, L., D. Thompson, G. Li, R. Hurt, J. Tiedje, und J. Zhou.** 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5780–5790.
- [186] **Zammatteo, N., L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, und J. Remacle.** 2000. Comparison between different strategies of covalent attachment of dna to glass surfaces to build dna microarrays. *Anal. Biochem.* **280**:143–150.
- [187] **Zhang, L., T. Hurek, und B. Reinhold-Hurek.** 2005. Position of the fluorescent label is a crucial factor determining signal intensity in microarray hybridizations. *Nucl. Acids Res.* **33**:e166–.
- [188] **Zheng, D., E. Alm, D. Stahl, und L. Raskin.** 1996. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4504–4513.
- [189] **Zhou, J.** 2003. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:288–294.
- [190] **Zhou, J., M. A. Bruns, und J. M. Tiedje.** 1996. Dna recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:316–322.
- [191] **Zimmermann, F.** 1999. Master's thesis, Technische Universität München.
- [192] **Zimmermann, F. J.** 2002. Oligo- und polynukleotidsonden-gestützte charakterisierung und anreicherung bisher nicht kultivierbarer acidobacteria. Dissertation, Technische Universität München .
- [193] **Zimmermann, J., J. Gonzalez, C. Saiz-Jimenez, und W. Ludwig.** 2005. Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured acidobacterial communities in altamira cave using 23s rrna sequence analyses. *Geomicrobiol. J.* **22**:379–388.

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer vom April 2004 bis August 2007 angefertigt. Die Arbeit wurde vom BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Deutschland) im Rahmen des BIOLOG Teilprojektes „Die Zusammenhänge zwischen mikrobieller und pflanzlicher Diversität von Grünlandflächen: Nitrifikanten und Acidobakterien als funktionell und zahlenmäßig wichtige Modellorganismen“

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer für die Möglichkeit dieses Thema an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten und das Interesse an der Arbeit.

Herrn Dr. Wolfgang Ludwig für die kompetente Betreuung, das angenehme Arbeitsklima und vor allem für ARB, das vieles einfacher macht.

Silvia Weber und Sybille Stindl für die vielen schönen Gespräche sowohl über Fachliches als auch vor allem Nichtfachliches und die seelisch-moralische Unterstützung.

Virginie Nägele für die gute Zusammenarbeit und das Durchhaltevermögen immer wieder zu versuchen, wenigstens ein paar Acidobakterien im Boden mit FISH zu detektieren.

Marko Pavlekovic für die Hilfe am CLSM und mit störrischen PCs.

Natalie Ludyga für eine schöne Zeit im 101 Labor und den Versuch mir ein paar polnische Sprachbrocken beizubringen.

Sibylle Schadhauer, Helga Gaenge und meinen Großpraktikantinnen (Steffi Wittmair und Marlene Pulgar Rosa) für (fast) endlose Screening-PCRs und das Anlegen von Millionen Glycerinkulturen.

den anderen ISOs für die fröhliche, angenehme Atmosphäre.

Robert Lemmen für einfach alles.

Ingrid Fleischhacker und Irmgard Maurer für ein immer offenes Ohr und die grandiose Ablenkung, wenn es mal nicht weiterging.

meiner Familie dafür, dass sie immer für mich da ist.