

**Entwicklung von durchflußzytometrischen Methoden zur  
Analyse der Diversität und Struktur mikrobieller  
Lebensgemeinschaften des Wassers**

**Bernhard Maximilian Fuchs**

Lehrstuhl für Mikrobiologie  
der Technischen Universität München

**Entwicklung von durchflußzytometrischen Methoden zur  
Analyse der Diversität und Struktur mikrobieller  
Lebensgemeinschaften des Wassers**

**Bernhard Maximilian Fuchs**

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

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Prüfer der Dissertation: 1. Priv. - Doz. Dr. R. Amann  
2. Univ. - Prof. Dr. W. Höll

Die Dissertation wurde am 10.11.1998 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die  
Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften am 7.12.1998 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>B. Material und Methoden</b>	<b>8</b>
<b>B.1 Organismen, Anzucht, Ernte, Proben</b>	<b>8</b>
B.1.1 Referenzorganismen	8
B.1.2 Bakterienanzucht	9
B.1.3 Probennahme	9
B.1.4 Verdünnungskultur	10
<b>B.2 Zellfixierung</b>	<b>10</b>
B.2.1 Paraformaldehyd-Fixierung	10
B.2.2 Ethanolfixierung	11
B.2.3 Membranfiltration für die in situ-Hybridisierung	11
<b>B.3 Membranfiltration zur Gesamtzellzahlbestimmung</b>	<b>12</b>
<b>B.4 Sondenmarkierung mit Peroxidase (nach Urdea <i>et al.</i>, 1988)</b>	<b>13</b>
B.4.1 Aktivierung des Oligonukleotids	13
B.4.2 Abtrennung des markierten Oligonukleotids vom unmarkierten Oligonukleotid durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	14
<b>B.5 Entwicklung von Oligonukleotidsonden für die 16S-rRNA von <i>Escherichia coli</i> DSM 30083<sup>T</sup></b>	<b>17</b>
<b>B.6 In situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden</b>	<b>17</b>
B.6.1 Sondenmarkierung und Qualitätskontrolle	17
B.6.2 Charakteristika der eingesetzten Sonden	18
B.6.3 Hybridisierung auf Objektträgern	19
B.6.4 Hybridisierung auf Polycarbonatfiltern	22
B.6.5 Hybridisierung in Suspension für die Durchflußzytometrie	22
B.6.6 Hybridisierung mit Peroxidase-(POD)-markierten Oligonukleotiden auf Polycarbonatfiltern	23
B.6.7 Detektion mit TSA-Amplifikationskit	24
B.6.8 Auswertung mit dem Epifluoreszenzmikroskop	25
<b>B.7 Durchflußzytometrie</b>	<b>26</b>
B.7.1 Begriffserklärung	26
B.7.2 Allgemeine Funktionsweise eines Durchflußzytometers	26
B.7.2.1 Hydrodynamische Fokussierung	26
B.7.2.2 Lichtquelle	27
B.7.2.3 Parameter	27
B.7.2.4 Aufnahme der Lichtsignale	29
B.7.2.5 Sortierung	29
B.7.3 Gerät und Material	30
B.7.3.1 Hydraulik	30
B.7.3.2 Laser	31
B.7.3.3 Farbstoffe	32
B.7.3.4 Optik	32
B.7.3.5 Justierung	33
B.7.3.6 Typische Meßkonfigurationen	34
B.7.3.7 Analyse	34
B.7.4 Quantifizierung der Sondenfluoreszenz im Durchflußzytometer	35
B.7.5 Bestimmung relativer Häufigkeiten	36
B.7.6 Bestimmung der Gesamtkeimzahl	36
B.7.7 Sortieren	36

B.7.7.1 Justierung	36
B.7.7.2 Sortieren aus Umweltproben	37
<b>B.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit ganzen, fixierten Zellen</b>	<b>37</b>
B.8.1 Waschen der Zellen	37
B.8.2 Lösungen	38
B.8.3 Primer	38
B.8.4 Reaktionsansatz	39
B.8.5 PCR-Programm	39
B.8.6 Qualitative Analyse der PCR-Amplifikate	40
B.8.7 Reinigung der PCR-Amplifikate	41
<b>B.9 Transfer von DNA auf Nylonmembranen mittels Dot-Blot-Verfahren</b>	<b>42</b>
<b>B.10 Membranhybridisierung mit POD-markierten Oligonukleotidsonden</b>	<b>42</b>
B.10.1 Hybridisierung	42
B.10.2 Detektion der POD-markierten Oligonukleotide	44
B.10.3 Rehybridisierung der Membran	44
<b>B.11 DNA-Schnellisolierung</b>	<b>45</b>
<b>B.12 Klonierung</b>	<b>46</b>
B.12.1 T-Vektor-Ligation	46
B.12.2 Elektroporation	47
<b>B.13 Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse</b>	<b>49</b>
B.13.1 Koch-STET-Schnelltest	49
B.13.2 Restriktionsanalyse	50
<b>B.14 Nicht radioaktive Sequenzierung von 16S-rDNA Fragmenten in einem automatischen Sequenzer</b>	<b>51</b>
<b>C. Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>C.1 Durchflußzytometrische Sortierung von Mikroorganismen für nachfolgende molekularbiologische Analysen</b>	<b>53</b>
C.1.1 Sortierung von Bakterien aus Belebtschlamm nach Hybridisierung mit fluoresceinmarkierten Oligonukleotidsonden	53
C.1.2 Durchflußzytometrische Analyse von sortierten Zellen	56
C.1.3 Mehrmaliges Sortieren	57
C.1.4 PCR Amplifikation der 16S-rDNA aus fixierten Zellen	57
C.1.5 Klonierung eines PCR-Produkts aus LDI23a-sortierten Zellen	58
C.1.6 Sequenzierung	59
C.1.7 Sortierung eines auffällig großen Spirillum aus Belebtschlamm	59
<b>C.2 Analyse der in situ-Zugänglichkeit von Escherichia coli 16S-rRNA für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden</b>	<b>60</b>
C.2.1 Vorversuche zur Optimierung der Hybridisierungsprozedur	61
C.2.1.1 Sondenkonzentration	61
C.2.1.2 Zellen	61
C.2.1.3 Lagerung	62
C.2.2 Einfluß sondenspezifischer Unterschiede in der Dissoziationstemperatur ( $T_d$ ) auf die sondenvermittelte Fluoreszenz	62
C.2.3 Operondiversität	64
C.2.4 Zugänglichkeit der 16S-rRNA für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden	64
C.2.5 Feinkartierung der <i>in situ</i> -Zugänglichkeit der Helices 6 und 18	67
C.2.6 Feinkartierung der <i>in situ</i> -Zugänglichkeit der Positionen 621-693	68
<b>C.3 Durchflußzytometrische Analyse von mikrobiellen Populationen in aquatischen Ökosystemen: Entwicklung und Anwendung neuer Methoden</b>	<b>69</b>
C.3.1 Quantifizierung phylogenetischer Gruppen in Wasserproben nach Hybridisierung	69
C.3.1.1 Resuspendierung der Zellen	69
C.3.1.2 Vergleichende Quantifizierung von Wasserproben mit Mikroskopie und Durchflußzytometrie	70

C.3.2 Erhöhung der Sensitivität der <i>in situ</i> -Hybridisierung durch Kombination von peroxidasemarkierten Oligonukleotiden und Tyramid-Signalamplifikation	71
C.3.2.1 Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Sonden und Tyramid-Signalamplifikation in Suspension	72
C.3.2.2 Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Sonden und Tyramid-Signalamplifikation auf Filtern	73
C.3.3 Hybridisierung mit Alexa – markierten Oligonukleotiden	75
C.3.4 Analyse einer marinen Verdünnungskultur	77
C.3.4.1 Bestimmung der Gesamtkeimzahl	77
C.3.4.2 Sortieren von Bakterien nach Zellgröße und DAPI-Fluoreszenz und anschließende Hybridisierung mit gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden	78
<b>C.4 Erhöhung der Gerätesensitivität beim FACStar Plus</b>	<b>80</b>
C.4.1 DAPI-Fluoreszenz als Systemschwellenwert	80
C.4.2 Verwendung von hochwertigen optischen Filtern	81
C.4.3 Macro-Sort-Kopf	82
<b>D. Diskussion</b>	<b>84</b>
<b>D.1 Sortieren von definierten Zellpopulationen mittels Durchflußzytometrie</b>	<b>84</b>
D.1.1 Die Basis einer Sortierentscheidung	84
D.1.2 Anreicherungsfaktor und Reinheit der Zellen	86
D.1.3 Molekulare Analyse von sortierten Zellen	87
D.1.4 Einschränkungen	88
<b>D.2 Zugänglichkeit der 16S-rRNA für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden</b>	<b>88</b>
D.2.1 Vorbedingungen	89
D.2.2 Zugänglichkeit versus Sekundärstruktur	90
D.2.3 Zugänglichkeit versus Konserviertheit	91
D.2.3.1 Helix 18	92
D.2.3.2 Helix 6	93
D.2.3.3 Helix 22	94
D.2.3.4 Helix 30	94
D.2.3.5 Helix 23	94
<b>D.3 Anwendung durchflußzytometrischer Methoden im Kontext ökologischer Studien – Chancen und Grenzen</b>	<b>96</b>
D.3.1 Populationsanalyse von natürlichen Wasserproben im Durchflußzytometer	96
D.3.1.1 Wahl der Methode	96
D.3.1.2 Vergleich Mikroskopie - Durchflußzytometrie	97
D.3.1.3 Signalamplifikation	98
D.3.1.4 Neuentwickelte Fluoreszenzfarbstoffe	100
D.3.2 Einschränkungen in der Sensitivität des FACStar Plus	101
D.3.2.1 Stand der Technik	101
D.3.2.2 Zukünftige Entwicklungen	102
D.3.3 Sortieren nach physiologischen Parametern	103
<b>E. Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>F. Anhang</b>	<b>107</b>
<b>G. Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>

## Abkürzungen

A	Adenin; Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BP	Bandpaßfilter
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Celsius
ca.	zirka
CY3	Indocarbocyanin-Farbstoff
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
E	Absorption, Extinktion
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
FLX	Fluoreszenz X
FLUOS	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gramm; Fallbeschleunigung
G	Guanin
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	durch Umkehrosiose entionisiertes, gereinigtes und filtriertes Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LP	Langpaßfilter
m	Milli ( $10^{-3}$ ); Meter
m <sup>3</sup>	Kubikmeter
M	Molar

μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
min	Minute
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
POD	Meerrettichperoxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rDNA	DNA-Abschnitt, der für die rRNA codiert
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient in Svedberg-Einheiten
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat-Lösung, Seitwärtsstreulicht
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T <sub>d</sub>	Dissoziationstemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUM	Technische Universität München
U	Einheiten
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
w	Gewicht
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# A. Einleitung

Mikroorganismen entzogen sich sehr lange der Entdeckung aufgrund ihrer geringen Größe von einigen Tausendstel Millimetern. Erst mit der Erfindung des ersten funktionierenden Mikroskops konnte Antonie van Leeuwenhoek 1683 kleine „Animalcula“ („Tierchen“) sehen. Die Geburtsstunde der Mikrobiologie war somit eng verbunden mit einer entscheidenden technologischen Verbesserung in der Optik.

Das Cyanobakterium *Prochlorococcus*, das, wie man erst seit ca. 10 Jahren weiß, den größten Teil der marinen Biomasse in ultraoligotrophen Ozeanbereichen stellt (Chisholm *et al.*, 1988), wie auch die kleinste eukaryotische Zelle, die marine Alge *Ostreococcus tauri* (Courties *et al.*, 1994), wurden aufgrund ihrer Streulichteigenschaften und Autofluoreszenz zuerst mit Hilfe eines Durchflußzytometers entdeckt. Bei dieser Meßtechnik werden Zellen oder allgemein Partikel einzeln in einem Flüssigkeitsstrahl vermessen. Die Vorteile der Durchflußzytometrie sind die Multiparameteranalyse (bis zu sieben Parameter gleichzeitig), die Schnelligkeit (bis zu 5000 Partikel pro Sekunde) und die gezielte Sortierung von definierten Partikeln (Anreicherung bis 1000-fach). In Abbildung A.1 wird kurz die Funktionsweise eines Durchflußzytometers erklärt.

Die Parameter werden als Streulicht oder Fluoreszenz quantitativ bestimmt. Gibt das Streulicht Auskunft über die Größe und interne Beschaffenheit der Zelle, so stehen mit der Fluoreszenz eine Fülle von weiteren Informationen zur Verfügung. Das Spektrum reicht von der Autofluoreszenz von Pigmenten, über interkalierende DNA- bzw. RNA-Farbstoffe, Proteinfärbung, Lebend-Tot-Unterscheidung, fluoreszenzmarkierte Antikörper bis hin zu Enzymassays mit fluorogenem Substrat. Über die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) steht außerdem das Tor zur schnellen genotypischen Charakterisierung offen.

Zahlreiche marine Studien wurden mit Durchflußzytometern unternommen, die an Bord von Forschungsschiffen mikrobielle Lebensgemeinschaften auf DNA-Gehalt, Größe und Autofluoreszenz (Li, 1989, Li and Dickie, 1991, Li *et al.*, 1993, Olson *et al.*, 1985) ebenso wie die Primärproduktion untersuchten (Li, 1994). Bei der Entwicklung der



Verdünnungskultur wurde die Wachstumskontrolle durchflußzytometrisch durchgeführt (Button *et al.*, 1993, Schut *et al.*, 1993).

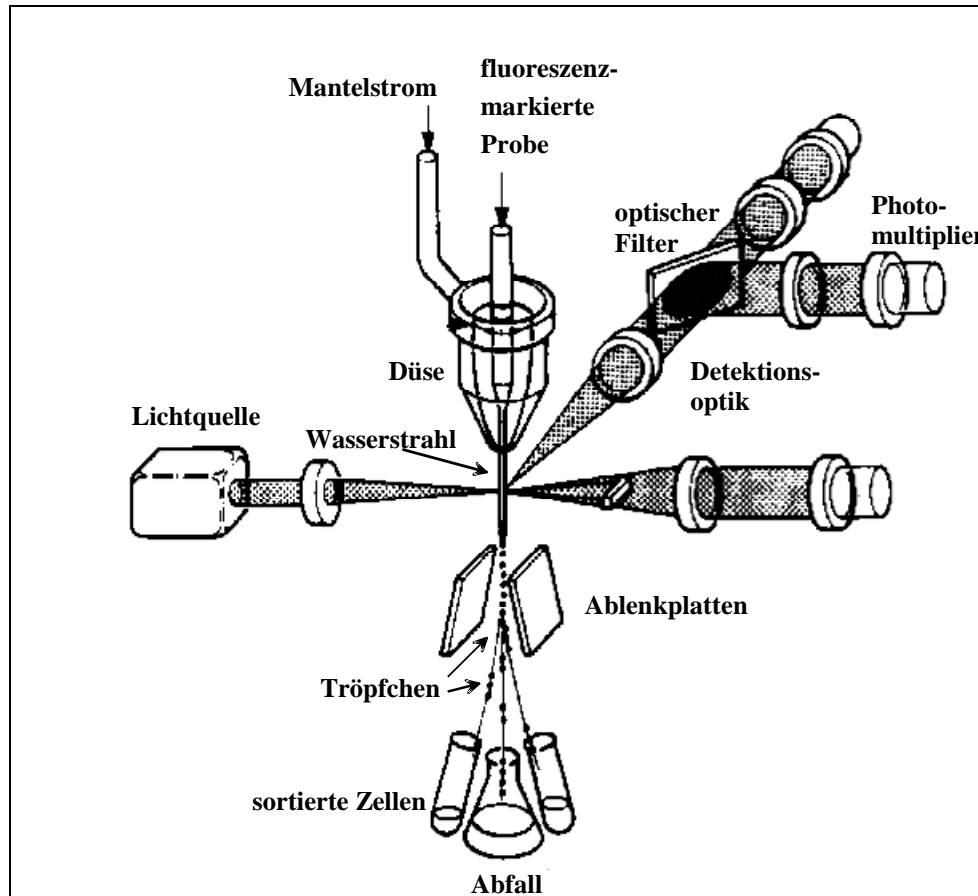


Abbildung A.1: Vereinfachtes Schema zur Funktion eines Durchflußzytometers, (nach Dean, 1990, verändert). Die Probe wird von einer Mantelstromflüssigkeit eingehüllt. Die in der Probe enthaltenen Zellen werden in der Mitte des Stroms fokussiert und verlassen so einzeln die Düse in einem Wasserstrahl. Die Zellen passieren die Lichtquelle, und das von den Zellen emittierte bzw. gestreute Licht wird über optische Filter mit Photomultipliern detektiert. Erfüllt eine Zelle vorher festgelegte Bedingungen, kann sie aussortiert werden. Durch hochfrequente Schwingungen bricht der Wasserstrahl zu Tröpfchen ab, die, wenn sie die gewünschte Zelle enthalten, aufgeladen und über elektrisch geladene Platten in Tröpfchen abgelenkt werden. Alle übrigen Zellen werden im Abfall gesammelt.

Ein wichtiger technologischer Durchbruch in der Geschichte der Mikrobiologie ist die Einführung der vergleichenden Analyse homologer Nukleinsäuresequenzen. Erstmals war es möglich, eine Systematik aufzubauen, die die tatsächliche Evolution der Organismen widerspiegelt. Ein besonders dafür geeignetes Molekül ist die ribosomale RNA, die in jedem

bekanntem Organismus die gleiche Funktion erfüllt und integraler Bestandteil jedes Zellstoffwechsels bei der Proteinbiosynthese ist. Woese (Ludwig and Schleifer, 1994, Woese, 1987) konnte 1987 basierend auf ca. 500 rRNA-Sequenzen den ersten, umfassenden phylogenetischen Baum des Lebens veröffentlichen, der klar die *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya* in drei Reiche voneinander abgrenzte. Darauf aufbauend ist die *in situ*-Hybridisierung entwickelt worden. Basis dafür sind phylogenetisch variable Bereiche der ribosomalen RNA, komplementär zu denen kurze Oligonukleotide entwickelt werden können, die je nach Variabilität der Zielsequenz eine breitere oder engere Spezifität zeigen (Stahl and Amann, 1991). Durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden können so auf Einzelzellebene Organismen im weitgehend naturgetreuen Umfeld mikroskopisch identifiziert werden (Amann *et al.*, 1990, DeLong *et al.*, 1989). Die natürliche Amplifikation des Zielmoleküls, des Ribosoms, bewirkt ausreichend hohe Fluoreszenzsignale, die darüber hinaus in bestimmten Grenzen auch Aufschluß über den physiologischen Zustand der einzelnen Zelle gibt (Poulsen *et al.*, 1993, Wallner and Amann, 1996). Mit dieser direkten Nachweismethode konnte die Häufigkeit verschiedener Populationen in einer Vielzahl von Habitaten gezählt werden (Amann *et al.*, 1995).

Amann und Mitarbeiter kombinierten die Vorteile der quantitativen und schnellen Analyse im Durchflußzytometer mit der *in situ*-Hybridisierung, um kultivierte Organismen zu charakterisieren (Amann *et al.*, 1990). Die Technik wurde von Wallner und Mitarbeitern weiterentwickelt und für die Analyse von Belebtschlamm-Organismen erfolgreich eingesetzt (Wallner *et al.*, 1993, Wallner *et al.*, 1995). Aber auch nanoplanktonische Protisten (Lim *et al.*, 1993, Rice *et al.*, 1997) und eukaryotisches Phytoplankton wurden inzwischen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden im Durchflußzytometer nachgewiesen (Lange *et al.*, 1996, Simon *et al.*, 1995).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dazu beizutragen, Mikroorganismen in komplexen aquatischen Lebensgemeinschaften mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden schnell und quantitativ durchflußzytometrisch zu erfassen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung von oligotrophen Habitaten gelegt. Da in diesen Proben niedrigere FISH-Signalintensitäten erwartet wurden, sollten auch neue Farbstoffsysteme in Verbindung mit spezifischen Oligonukleotidsonden getestet werden, um so die Detektion möglichst vieler Organismen zu erreichen. Ein weiterer Schwerpunkt wurde auf die Zugänglichkeit der 16S ribosomalen RNA in der Zelle für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide gelegt, da oft

neuentwickelte, spezifische Sonden, vermutlich aufgrund sterischer Behinderung im Ribosom, nicht an ihren Zielorganismus binden. Die Wahl der richtigen Sondenbindungsregion ist besonders bei Zellen mit einem niedrigen Gehalt an Ribosomen wichtig, um ein detektierbares Hybridisierungssignal zu erhalten. Die 16S-rRNA sollte mit einem Satz an komplementären, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden schnell im Durchflußzytometer quantitativ auf die sondenvermittelte Fluoreszenzintensität kartiert werden.

In einem weiteren Projekt wurde die durchflußzytometrische Sortierung getestet. Spezifisch gefärbte Bakterien sollten nach Hybridisierung für eine weitere phylogenetische Analyse aus so komplexen Ökosystemen wie z.B. Belebtschlamm, aussortiert werden. Mikroskopisch konnte die Dominanz der  $\beta$ -Gruppe der *Proteobacteria* im Belebtschlamm (Manz *et al.*, 1992) wie auch in oligotrophen, limnischen Systemen eindrucksvoll gezeigt werden (Glöckner *et al.*, in Vorbereitung ). Dies widersprach jedoch den Kultivierungsergebnissen, bei denen Vertreter der  $\gamma$ -Proteobakterien oft die häufigste phylogenetische Gruppe stellten (Wagner *et al.*, 1993). Das Problem der Kultivierbarkeit bestimmter Mikroorganismen stellte die Mikrobiologie vor neue Herausforderungen im Design von Medien und in der Kultivierungsstrategie. Mit dem rRNA-Ansatz von Olsen und Mitarbeitern (Olsen *et al.*, 1986) konnte das Problem der Kultivierung z.T. umgangen werden. In einem ersten Schritt isoliert man die gesamten Nukleinsäuren einer Probe. Üblicherweise wird nach Amplifikation der 16S-rDNA mittels PCR das PCR-Produkt in einen Vektor ligiert und kloniert. Klone mit Insert können anschließend mittels Membranhybridisierung mit spezifischen Sonden vorcharakterisiert oder direkt sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen werden mit einer rRNA-Datenbank, wie z.B. RDP (Maidak *et al.*, 1997), GenBank (Benson *et al.*, 1994) oder EBI (Emmert *et al.*, 1994) abgeglichen. Durch vergleichende Sequenzanalyse wird die phylogenetische Stellung der Organismen, von der die rDNA stammt, bestimmt. Wie bereits oben beschrieben können darüberhinaus spezifische, farbstoffmarkierte Oligonukleotidsonden entwickelt werden, mit Hilfe derer man die zugehörigen Mikroorganismen im Originalhabitat finden und lokalisieren kann. Dieser Ansatz trug entscheidend dazu bei, neue bisher nicht kultivierbare Organismen phylogenetisch zu beschreiben und mittels FISH in Ökosystemen zu verfolgen. Unterschied Woese 1987 noch insgesamt 11 bakterielle Gruppen, so sind inzwischen über 40 phylogenetische distinkte Phyla bekannt, von denen 13 nur durch ihre rRNA-Sequenz repräsentiert werden (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Mikroorganismen mit geringer Abundanz sind mit dem rRNA-Ansatz jedoch nur schwer zu fassen. Statistisch gesehen müßten über 100 Klone charakterisiert werden, um die Sequenz eines Organismus mit einer Häufigkeit von 1% an der Gesamtpopulation zu erhalten. Effekte wie nicht bindende Primer bei der PCR-Amplifikation (Glöckner *et al.*, in Vorbereitung), ungleiche Amplifikationseffizienz bei verschiedenen Gruppen (Suzuki and Giovannoni, 1996) und Operondiversität innerhalb der gleichen Spezies (Nübel *et al.*, 1996) sind dabei noch gar nicht berücksichtigt. Eine Lösung des Problems ist die Anreicherung des gewünschten Zelltyps. Huber und Mitarbeitern (Huber *et al.*, 1995) ist es gelungen, mit Hilfe einer optischen „Pinzette“ (Ashkin *et al.*, 1987) einzelne Zellen einer Population von *Archaea* auszusortieren, durch Kultivierung anzureichern und durch molekularbiologische Untersuchungen ihre phylogenetische Stellung zu bestimmen.

Durchflußzytometrie bietet mit der Analyse und gleichzeitigen Sortierung von einigen tausend bis zehntausend Zellen ein wesentlich größeres Potential, definierte Zellpopulationen auch ohne Kultivierung ausreichend für eine Analyse mit dem rRNA-Ansatz anzureichern. Die Diversität der Probe kann so gezielt auf eine Gruppe von Organismen eingeschränkt werden, die hochangereichert für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht. In einem methodischen Ansatz wurde von Porter und Mitarbeitern die Wiederfindung von antikörpermarkierten *E. coli*-Zellen aus Seeproben und gereinigtem Abwasser untersucht und im Durchflußzytometer auf Nährböden sortiert (Porter *et al.*, 1993, Porter *et al.*, 1995). Johnson und Mitarbeiter (Johnson *et al.*, 1995) reicherten antikörpermarkierte *Cryptosporidium*-Oocysten aus Wasserproben durch eine Sortierung im Durchflußzytometer an, um sie über spezifische PCR-Amplifikation nachweisen zu können. Aufgrund ihrer stark lichtbrechenden Magnetosomen konnten bisher nicht kultivierbare magnetotaktische Bakterien aus Sediment isoliert und über den rRNA-Ansatz beschrieben werden (Spring *et al.*, 1993, Wallner *et al.*, 1997). Setzt man Oligonukleotidsonden unterschiedlicher Spezifität ein, kann man bereits auf phylogenetischer Ebene eine Vorauswahl treffen, und die Diversität in Richtung auf den gewünschten Organismus einschränken. Dadurch können Organismen mit geringer Abundanz hoch angereichert werden und durch Sequenzanalyse auf phylogenetische Zugehörigkeit untersucht werden. Ein Flußdiagramm soll dies näher verdeutlichen (Abbildung A.2).

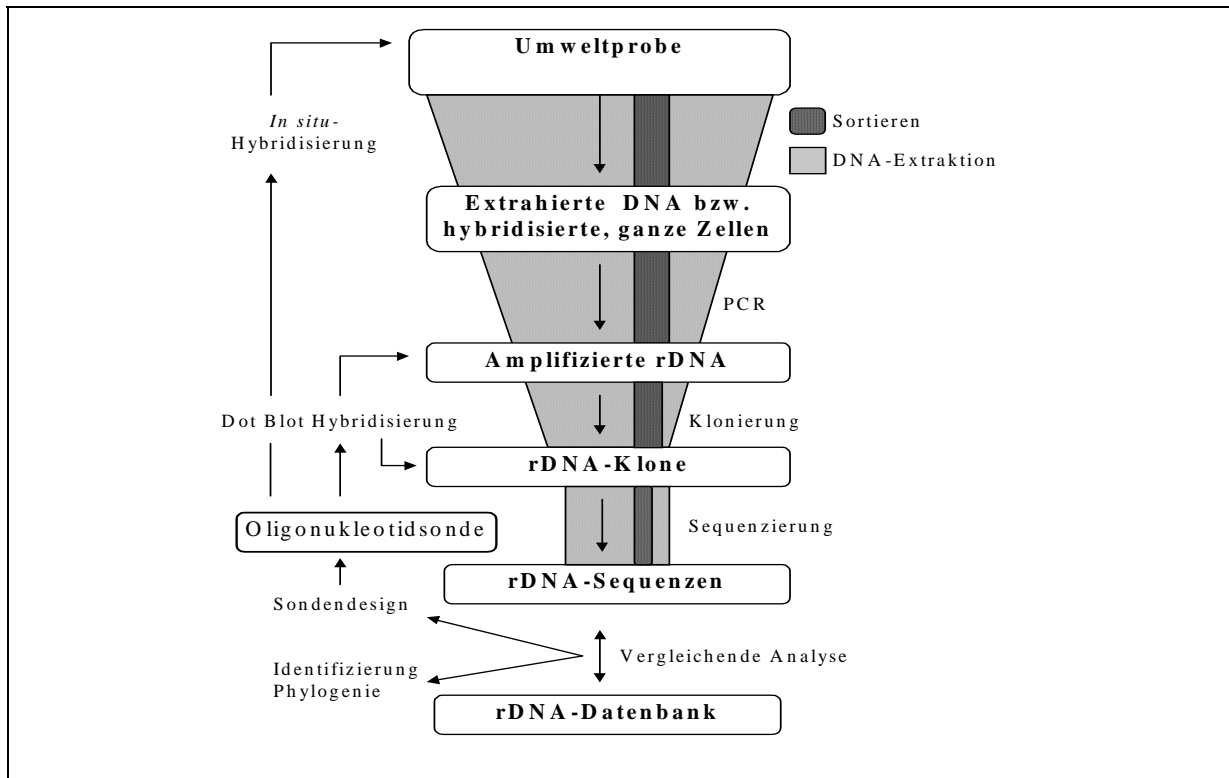


Abbildung A.2: Flußdiagramm zur Charakterisierung von Umweltproben durch vergleichende rRNA-Sequenzanalyse und Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden. Grau eingefärbte Balken repräsentieren die genetische Diversität der erhaltenen rDNA: hellgrau bei DNA-Extraktion, dunkelgrau bei Sortierung im Durchflußzytometer.

Eine Probe wird mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden hybridisiert und die sondenpositiven Zellen im Durchflußzytometer aussortiert (dunkelgraue Schattierung). Gegenüber einer Gesamt-DNA-Extraktion (hellgraue Schattierung) verringert sich die Diversität enorm zugunsten der gewünschten Zellpopulation. Wäre es möglich, direkt aus sortierten Zellen die 16S-rDNA zu amplifizieren, könnte der Schritt einer DNA-Extraktion entfallen. Der weitere Weg ist identisch mit dem üblichen rRNA-Ansatz: Nach PCR-Amplifikation der rDNA, Klonierung und Sequenzierung kann man durch Sequenzvergleich die phylogenetische Stellung der sortierten Zellen ermitteln und den Organismus im ursprünglichen Habitat durch *in situ*-Hybridisierung nachweisen. Dieser Ansatz wäre eine wichtige Ergänzung zu bestehenden Techniken, kultivierungsunabhängig und gerichtet Mikroorganismen aus komplexen Lebensgemeinschaften zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die aktuellen Möglichkeiten der Durchflußzytometrie zur Unterstützung des rRNA-Ansatzes kritisch untersucht werden und besonders die Zuverlässigkeit und Reinheit der Sortierung bestimmt werden.

## B. Material und Methoden

Zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurde über eine Reinstwasseranlage (Milli-Q-Plus, Millipore, Eschborn, Deutschland) entsalztes und filtriertes Wasser (im folgenden als H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> bezeichnet) verwendet. Sämtliche Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. (pro analysi) Qualität eingesetzt.

### B.1 Organismen, Anzucht, Ernte, Proben

#### B.1.1 Referenzorganismen

Organismus	Stamm	Organismus	Stamm
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DSM 30006 <sup>T</sup>	<i>Leptothrix cholodnii</i>	LMG 9467
<i>Acinetobacter baumannii</i>	LMG 1041 <sup>T</sup>	<i>Leptothrix discophora</i>	LMG 8141 <sup>T</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	TUB 953	<i>Microbacterium imperiale</i>	DSM 20530
<i>Aquaspirillum metamorphum</i>	DSM 1837 <sup>T</sup>	<i>Micrococcus kristinae</i>	ATCC 27570 <sup>T</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 402	<i>Nocardia calcarea</i>	DSM 43065
<i>Brevundimonas diminuta</i>	DSM 1635	<i>Paracoccus denitrificans</i>	DSM 65 <sup>T</sup>
<i>Comamonas testosteroni</i>	DSM 50244 <sup>T</sup>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	DSM 43241
<i>Cytophaga johnsonii</i>	LMG 1341 <sup>T</sup>	<i>Sphaerotilus natans</i>	LMG 7172 <sup>T</sup>
<i>Cytophaga</i> sp. <sup>1</sup>	02.11.DS22	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	LMG 11252 <sup>T</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	WS 1293	<i>Thiomicrospira</i> sp. <sup>2</sup>	t <sub>15</sub>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775 <sup>T</sup>	<i>Thiothrix nivea</i>	DSM 5205
<i>Escherichia coli</i> K12	DSM 30083 <sup>T</sup>	<i>Vibrio</i> sp. <sup>1</sup>	12.9.1
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	DSM 1100 <sup>T</sup>	<i>Zoogloea ramigera</i>	ATCC 25935

Tabelle B.1 DSM=Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig ATCC=American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; TUM=Stammsammlung der TU München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, München; LMG=Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien; TUB=Stammsammlung der Technischen Universität Berlin, Berlin; WS=Sammlung des Instituts für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch- und Lebensmittel, TU München, Freising-Weihenstephan; Isolate wurden freundlicherweise von Fr. Heike Stürmeyer<sup>(1)</sup> bzw. Herrn Thorsten Heidorn<sup>(2)</sup>, Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Bremen, zur Verfügung gestellt.

Referenzorganismen wurden mit den in den betreffenden Katalogen der Stammsammlungen angegebenen Nährmedien unter den dort genannten Bedingungen kultiviert. Für feste Medien wurde jeweils 12 g Agar l<sup>-1</sup> (DIFCO Bacto<sup>®</sup>-Agar) hinzugegeben. Alle Medien wurden bei 121°C und 1,013 x 10<sup>5</sup> Pa Überdruck für 20 min autoklaviert.

Alle Organismen wurden nativ im Mikroskop bzw. durch FISH auf Reinheit überprüft.

### **B.1.2 Bakterienanzucht**

Aerobe Mikroorganismen wurden in Flüssigkultur in Erlenmeyerkolben auf einem Rundschtüttler (Infors, Basel, Schweiz) oder auf festen Nährmedien in Petrischalen bei der jeweils angegebenen Temperatur angezogen. Die Anzucht anaerober Bakterien erfolgte in einem Anaerobiertopf unter reduzierter Atmosphäre (BBL Gas-Pak, Becton Dickinson, Mountain View, USA).

### **B.1.3 Probennahme**

**Bakterienkulturen.** Aus Suspensionskulturen wurden 2 ml während der logarithmischen Wachstumsphase (optische Dichte OD<sub>600</sub> = 0,4 - 1,0) geerntet, um einen möglichst hohen Ribosomengehalt pro Zelle zu gewährleisten. Auf festen Medien gewachsene Zellen wurden mit einem sterilen Spatel abgekratzt und in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (1 x PBS: 130 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) suspendiert. Nach Zentrifugation (4.000 x g, 4 min) wurde das Zellpellet in 1 ml 1 x PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 200 µl 1 x PBS aufgenommen.

**Belebtschlamm.** Proben aus dem Belebungsbecken 1 der kommunalen Kläranlage München 1 Großlappen (2 Millionen Einwohnergleichwerte) wurden mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung (PFA) vorfixiert und im Labor mit 50% Ethanol endfixiert (siehe B.2). Probennahme erfolgte am 25.8.1995.



**Limnische Proben.** Proben aus dem Nymphenburger Kanal (19.2.1997) und dem Piburger See (24.2.1997) wurden auf Eis ins Labor transportiert und innerhalb von 2 h abfiltriert und fixiert (siehe B.2.3)

**Algenbegleitflora.** Kommensalisch in einer Kultur der limnischen Alge *Rhodomonas minuta* vorkommende Bakterien wurden wie unter B.2.3 beschrieben auf Filter fixiert. Die Filter mit den bereits fixierten Bakterien wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jakob Pernthaler zur Verfügung gestellt.

#### **B.1.4 Verdünnungskultur**

Meerwasserproben wurden vor Helgoland, Station Kabeltonne, am 20.8.98 genommen. Durch Filtration mit einem 0,8 µm Polycarbonatfilter wurden Protozoen weitgehend abgetrennt. Kontrollen wurden direkt mit Paraformaldehyd (3% Endkonzentration) fixiert (siehe B.2.1). Die Filtration hat den Effekt, daß durch Lyse von Teilen der filtrierten Organismen weitere Nährstoffe mobilisiert werden und ins Filtrat gelangen, die dann intakten filtrierten Organismen zur Verfügung stehen. Es wurden keine weiteren Nährstoffe zugesetzt. Das Filtrat wurde 1:3, 1:10 und 1:100 mit sterilfiltriertem Meerwasser verdünnt, sowie unverdünnt bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Mit Ausnahme der 1:100 Verdünnung wurden je zwei 1 l Schott-Flaschen angesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden aus jedem Ansatz Proben genommen und fixiert.

## **B.2 Zellfixierung**

### **B.2.1 Paraformaldehyd-Fixierung**

#### **Herstellung von 50 ml einer 4%-igen Paraformaldehyd -(PFA)- Lösung:**

- 2 g Paraformaldehyd in 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 60°C erhitzten
- Lösen durch Zugabe von einigen Tropfen 1 M NaOH
- 16,6 ml 3 x PBS (390 mM NaCl, 30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 - 7,4) zugeben

- mit HCl auf pH 7,2 eingestellt
- ad 50 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
- fertige PFA-Lösung sterilfiltrieren (Porengröße 0,2 µm, „Minisart“, Sartorius)
- im Dunkeln bei 4°C nicht länger als 24 h aufbewahren

Für marine Proben wird PFA anstatt in PBS in 3,5%-iger NaCl-Lösung gelöst.

**Durchführung:**

- 3 Teile PFA-Lösung und 1 Teil Zellsuspension gut mischen
- 30 min bei 4°C inkubieren
- 2 min abzentrifugieren bei 5.000 x g, Überstand verwerfen
- Waschen mit 1 x PBS
- Zellpellet in 1 Teil 1 x PBS aufnehmen, sehr gut suspendieren
- Zugabe von 1 Teil eiskaltem, absolutem Ethanol, gut mischen
- Lagerung bei -20°C.

**B.2.2 Ethanolfixierung**

- Zellen ernten bei 5.000 x g, 2 min
- Überstand verwerfen
- Zellpellet in 1 x PBS aufnehmen
- Zugabe von 1 Teil eiskaltem, absolutem Ethanol
- Lagerung erfolgt bei -20°C.

**B.2.3 Membranfiltration für die in situ-Hybridisierung**

**Materialien:**

Das Vakuumfiltrationsgerät (Schleicher & Schuell) besteht aus Filteraufsatz (60 ml), Glasfritte für Filter mit Ø 25 mm (Filterfläche 3,1 cm<sup>2</sup>), Filterhalter, 250 ml Saugflasche von Schott und einer Vakuumpumpe Sartorius, Typ Nr. 16692. Die Absaugvorrichtung besteht aus einer Membranvakuumpumpe (Vakuubrand Typ MZ 2C, 1,7 m<sup>3</sup>h<sup>-1</sup>) und einem Steuergerät (Vakuubrand Typ CVC 2) mit elektromagnetischem Saugleitungsventil, geeignet für eine Zweipunktkontrolle der Saugleistung.

**Durchführung:**

- Auflegen eines Cellulosenitrat-Stützfilters (Sartorius, 0,45  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing$  25 mm) auf den feuchten Filterhalter (dadurch wird der Abscheidefilter durch das Vakuum nicht aufgeworfen)
- Weiße, ungefärbte Polycarbonatfilter (0,2  $\mu\text{m}$  Porenweite, Typ GTTP 2500,  $\varnothing$  25 mm, Millipore) mit der glänzenden Seite nach oben auf den Stützfilter legen
- Aufsetzen und Arretieren des Filteraufsatzes
- Zellsuspension (Umweltprobe) in den Filteraufsatz einfüllen und mit einem Unterdruck von  $1 - 2 \times 10^5$  Pa langsam auf den Polycarbonatfilter saugen
- Überschichten des Filters im Filterturm mit 3 ml 4% PFA-Lösung und 30 min bei RT fixieren, Filteraufsatz abgedecken (um Kontaminationen mit Luftkeimen zu vermeiden)
- PFA-Lösung durchsaugen
- Waschen mit 2 ml 1 x PBS und 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
- Filter dem Filterturm entnehmen und auf Filterpapier trocknen
- Lagerung der Filter bei  $-20^\circ\text{C}$  in Petrischalen

**B.3 Membranfiltration zur Gesamtzellzahlbestimmung****Materialien:**

- Filterturm wie unter B.2.3 beschrieben

**Durchführung:**

- Abflammen des Filterturmes
- Cellulosenitrat Stützfilter (Sartorius, 0,45  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing$  25 mm) auf die feuchte Glasfritte legen
- Irgalan-Schwarz-gefärbte Polycarbonatfilter (0,2  $\mu\text{m}$  Porenweite, Millipore) mit der glänzenden Seite nach oben auf den Stützfilter legen
- Aufsetzen des Filterturmes
- 5  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  und 50  $\mu\text{l}$  DAPI-Lösung. ( $1\mu\text{g ml}^{-1}$ ) versetzen
- Inkubation im Dunkeln für mindestens 15 min bei RT
- Bei abgeschaltetem Vakuum 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  im Filterturm vorgelegen und die Zellsuspension dazugegeben
- Inkubations-ERG mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  nochmal spülen und ebenfalls in den Filterturm geben
- Anlegen von ca.  $2 \times 10^5$  Pa Unterdruck für ca. 10 min
- Trocknen des Filters auf Whatman-Papier (Whatman, England) in einer Petrischale im Dunkeln
- Einbetten des Filters auf einem Objektträger in Citifluor AF1-PBS-Glycerin-Lösung (Citifluor, Canterbury, UK) (siehe B.6.8)
- Auszählen von 10 Zählfeldern bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Zählkular (Zeiss, Oberkochen)

Die Berechnung der Gesamtzellzahl pro Milliliter (GKZ ml<sup>-1</sup>) ergibt sich nach der Formel:

$$\text{GKZ ml}^{-1} = (\text{Zellzahl pro Zählfeld} - \text{Nullprobe}) \times (\text{effektive Membranfilterfläche} / \text{Zählfeldfläche}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

## **B.4 Sondenmarkierung mit Peroxidase** nach (Urdea *et al.*, 1988)

### **B.4.1 Aktivierung des Oligonukleotids**

- 100 µg Oligonukleotid werden in Vakuum eingetrocknet und in 50 µl Natriumboratpuffer (0,1 M Natriumborat, pH 9,2) aufgenommen
- Aktivierung des Oligonukleotids:
  - 10 mg Paraphenyldiisothiocyanat (DITC, Sigma) in 500 µl Dimethylformamid (DMF, Merck) lösen und zum Oligonukleotid pipettieren
  - 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Entfernung von überschüssigem DITC durch Butanol-Extraktion:
  - 5 ml n-Butanol (Merck) und 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> in ein Corex-Röhrchen vorlegen
  - Reaktionsansatz einspritzen und ausschütteln
  - 10 min bei 5000 x g zentrifugieren (Sorvall RC2-B, Rotor SS34)
  - Verwerfen der oberen Butanolphase
  - Für weiteren Extraktionsschritt nochmals 5 ml Butanol zugeben

Es folgen solange weitere Extraktionsschritte mit sukzessive reduzierten Butanolvolumen, bis das Volumen der wässrigen Phase auf ca. 50 - 100 µl eingengt ist. Neben DITC löst sich auch Wasser im Butanol, sodaß das Volumen der wässrigen Phase um jeweils ein Viertel des verwendeten Butanolvolumens abnimmt. Oft kann ab dem dritten Extraktionsschritt vom Corex-Röhrchen auf ein ERG gewechselt werden. Das Volumen an zugegebenem Butanol wird entsprechend reduziert.

- Abdampfen letzter Butanolreste für ca. 30 min. durch Trocknen in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac, Bachofer)

- 10 mg Meerrettichperoxidase (Boehringer, Mannheim) in 100 µl Natriumboratpuffer lösen und zum aktivierten Oligonukleotid geben
- Ansatz über Nacht im Dunklen bei Raumtemperatur inkubieren

#### **B.4.2 Abtrennung des markierten Oligonukleotids vom unmarkierten Oligonukleotid durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

##### **Materialien**

- Elektrophoreseapparatur (Hoefer SE400, Hoefer Scientific Instruments)
- Acrylamidstammlösung (7,5% (w/v))

Acrylamid	7,125 g
Bisacrylamid	0,375 g
10xNN-Puffer	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 100 ml

- 10%ige Ammoniumperoxodisulfat-(APS)-Lösung (Merck)
- Auftragspuffer: 20%ige Saccharoselösung (sterilfiltriert)
- 10 x No Name Puffer (NN-Puffer); Gebrauchslösung 1:10 verdünnen

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	162,0 g
Borsäure	27,5 g
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	10,3 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

- TE-Puffer

Tris/HCl	10 mM
EDTA	1 mM

pH 7.2, autoklavieren

- N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED, Serva)

- Blockgellösung

Acrylamid-stammlösung	5 ml
APS-Lösung	70 µl
TEMED	10 µl

- Trenngellösung

Acrylamid- stammlösung	45 ml
APS-Lösung	360 µl
TEMED	36 µl

### **Durchführung**

Das Gel wird zwischen zwei durch Abstandhalter (Spacer) getrennte Glasplatten in einer senkrecht stehenden Elektrophoreseapparatur gegossen

- Gießen des Blockgels als Auslaufschutz
- 10 min polymerisieren lassen
- Trenngel gießen und Auftragskamm einstecken
- 1 h polymerisieren lassen
- Kamm aus dem Gel ziehen
- In beide Pufferkammern je 250 ml 1 x NN-Puffer als Laufpuffer einfüllen
- Geltaschen durch gründliches Spülen mit 1 x NN-Puffer von Gelresten befreien
- Gesamten Reaktionsansatz mit 80 µl Auftragspuffer mischen und in die Geltaschen pipettieren
- Gellauf bei 4°C und einer Spannung von 100 V für ca. 2 h

Die thermische Belastung wird dadurch geringer gehalten als bei den sonst üblichen PAGE, die bei RT und bei Spannungen bis zu 400 V gefahren werden.

Wenn die untere, bräunliche Bande 1-2 cm in das Gel eingewandert ist, wird die Elektrophorese abgebrochen.

- Gel aus der Apparatur nehmen, in Frischhalte-Folie einschlagen und auf eine F254-Dünnschichtplatte mit fluoreszierender Beschichtung legen.

Mit Hilfe einer UV-Handlampe (254nm, Bachofer) können die Banden der markierten und unmarkierten Oligonukleotide durch Schattenbildung auf der weiß-leuchtenden Dünnschichtplatte sichtbar gemacht werden. Das unmarkierte Oligonukleotid befindet sich dabei weiter unten in Laufrichtung des Gels. Durch Vergleich der beiden Banden kann grob die Markierungseffizienz abgeschätzt werden. Zur Dokumentation werden die beiden Banden auf Folie aufgezeichnet.

- Bande des markierten Oligonukleotids mit steriler Rasierklinge ausschneiden
- Gelstück in steriles ERG überführen
- Zerkleinern des Gels mit einer sterilen, zugeschmolzenen 1 ml-Einmal-Pipettenspitze

- Zweimalige Elution des Oligonukleotids mit 2 ml sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  im Schüttler bei  $4^\circ\text{C}$ 
  - 1. Elution 1 h
  - 2. Elution 12 h
- Eluate vereinigen (ca. 2-4 ml)
- Konzentration der Eluate in Centrikon 30 - Konzentratoren (Amicon):
  - Zusammenbau der Centrikon-Röhrchen nach Angaben des Herstellers
  - auftragen von 2 ml Eluat auf den Konzentrator
  - für 15 - 30 min (je nach Füllmenge) bei  $5000 \times g$  zentrifugieren (Sorvall RC2-B, Rotor SS34)
  - Vorgang solange wiederholen, bis die Proben auf ein Endvolumen von etwa  $100 \mu\text{l}$  aufkonzentriert sind
- $5 \mu\text{l}$  dieser Sonden-Stammlösung in einem Bereich von 230 - 480 nm photometrisch vermessen (Beckman DU 650 Spektralphotometer)

Bei optimaler Markierung des Oligonukleotids gibt es zwei Absorptionsmaxima. Enzym und Oligonukleotid rufen zusammen einen Peak bei 260 nm hervor. Die Peroxidase besitzt darüber hinaus ein weiteres Absorptionsmaximum bei 404 nm. Bei einer guten 1:1 Markierung sollte das Verhältnis der Absorptionsmaxima 260 nm zu 404 nm ca. 3:1 sein. Absorption [E] (oder auch optische Dichte, OD) und molarer Extinktionskoeffizient [ $\epsilon$ ] sind nach Lambert-Beer ( $E = c \times d \times \epsilon$ ;  $c$  = Konzentration der Lösung;  $d$  = Schichtdicke der Küvette) direkt proportional. Für ein 18mer mit einem durchschnittlichen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 11,2 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$  pro Nukleotid ergibt sich ein Gesamttextinktionskoeffizient von  $201,6 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ . Für die Peroxidase wird ein Wert von  $80 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$  angenommen. Geht man von diesen Extinktionskoeffizienten aus, so ergibt sich ein Verhältnis von Enzym zu Oligonukleotid von nur 2,5. Da das Absorptionsmaximum bei 260 nm anteilig sowohl vom Enzym wie Oligonukleotid herrührt, muß also ein Korrekturfaktor  $k = 0,276$  zur Berechnung der Sondenkonzentration berücksichtigt werden:

$$\text{OD}_{260 \text{ nm}} = \text{OD}_{260 \text{ nm}} (\text{gemessen}) - \text{OD}_{404 \text{ nm}} (\text{gemessen}) \times k$$

Nach dieser Korrektur gilt:

$$1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \cong 20 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ DNA (Oligonukleotid)}$$

- Stammlösung aliquotieren und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern
- Arbeitslösungen auf  $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  verdünnen und bei  $4^\circ\text{C}$  lagern

## **B.5 Entwicklung von Oligonukleotidsonden für die 16S-rRNA von *Escherichia coli* DSM 30083<sup>T</sup>**

Oligonukleotidsonden wurden komplementär zur Sequenz von *E. coli* K12 DSM 30083<sup>T</sup> in zwei Sätzen entwickelt. Die Sonden innerhalb eines Satzes stoßen direkt aneinander, während die zwei Sätze um 5-13 Nukelotide gegeneinander verschoben sind. Der erste Satz zielt auf die komplette 16S-rRNA von Position 1 bis 1542, der zweite ist komplementär zu Position 13 bis 1535.

Sonden spezifisch für Mikroheterogenitäten zwischen den 16S-rRNA Operons *rrnH* (European Molecular Biology Laboratory (EMBL)-Datenbank-Nr.: D12649, D15061), *rrnG* (V00348), *rrnD* (M24911), *rrnA* (M87049), *rrnB* (J01695), *rrnE* (U00006), *rrnC* (L10328) im *E. coli* K12 – Stamm wurden basierend auf den EMBL-Sequenzen entwickelt. Die Länge der Sonden betrug standardmäßig 18 Nukleotide. Überschritt der theoretische Schmelzpunkt (Dissoziationstemperatur  $T_d = (4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T))$ ) (Suggs *et al.*, 1981) 60°C oder unterschritt er 48°C, wurde die Sonden entsprechend gekürzt bzw. verlängert. Alle Sondensequenzen und Zielregionen sind in Tabelle F.1 im Anhang aufgelistet.

## **B.6 In situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden**

### **B.6.1 Sondenmarkierung und Qualitätskontrolle**

Alle Sonden wurden entweder von MWG-Biotech (Ebersberg) oder von Interactiva GmbH (Ulm) synthetisiert, am 5'-Ende im letzten Schritt der Festphasen-Synthese markiert und anschließend HPLC-gereinigt. Da die Markierungsqualität entscheidenden Einfluß auf die



Sondenfluoreszenz hat, wurde von jeder Sonde ein Aliquot im Spektralphotometer (Shimadzu UV-1202, Duisburg, bzw. Beckman DU 650 Spektralphotometer, München) vermessen und die Absorptionsmaxima von Farbstoff ( $A_{\text{Farbstoff}}$ ) und Oligonukleotid ( $A_{\text{Oligo}=260\text{nm}}$ ) bestimmt. Falls die Sonde stöchiometrisch richtig markiert wurde, sollte nach dem Lambert-Beer-Gesetz das Verhältnis der Absorptionsmaxima Farbstoff zu Oligonukleotid gleich dem Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von Farbstoff und Oligonukleotid sein. Der molare Extinktionskoeffizient eines Oligonukleotids  $\epsilon_{\text{Oligo}}$  kann aus den  $\epsilon$  seiner Nukleotide aufsummiert werden ( $d\text{ATP} = 15.400 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $d\text{CTP} = 7.300 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $d\text{GTP} = 11.700 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $d\text{TTP} = 8.800 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) (Sambrook *et al.*, 1989). Ist der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{\text{Farbstoff}}$  des Farbstoffes bekannt, kann die Qualität der Markierung als Faktor  $k$  nach folgender Formel berechnet werden:

$$k = \frac{(\epsilon_{\text{Oligo}} / \epsilon_{\text{Farbstoff}})}{(A_{\text{Oligo}} / A_{\text{Farbstoff}})}$$

Werte von  $k < 1$  lassen auf unvollständige Markierung schließen, während  $k > 1$  auf überschüssigen Farbstoff hindeutet, der möglicherweise frei vorliegt. Da die Aufsummierung der  $\epsilon$  der einzelnen Nukleotide nur eine Abschätzung darstellt, sind Sonden mit  $k$ -Werten zwischen 0,7 und 1,3 als einfach-markiert angesehen und akzeptiert worden. Die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$1 \text{ OD}_{260} \cong 20 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ DNA (Oligonukleotid)}$$

Die markierten Sonden wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  vermessen und auf eine Konzentration von  $50 \mu\text{l}^{-1}$  eingestellt und aliquotiert. FLUOS-markierte Sonden müssen aufgrund ihres Fluoreszenzoptimums im Alkalischen mit Carbonatpuffer (1 M  $\text{NaHCO}_3$ , 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,0) vermessen werden. Aliquotierung und Lagerung erfolgt in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ .

### B.6.2 Charakteristika der eingesetzten Sonden

Alle gruppen- und gattungsspezifischen fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle B.2 aufgelistet.

Sonde	Zielorganismen	Sequenz (5' → 3')	Bindungsstelle <sup>1</sup>	Formamid [%] <sup>2</sup>	Quelle
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	16S, 915-935	35	(Stahl and Amann, 1991)
BET42a	β-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCCTTCGTTT	23S, 1027-1043	35	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
GAM42a	γ-Gruppe der <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	35	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	0	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
NON338	Negativ-Kontrolle	ACTCCTACGGGAGGCAGC	-	0	(Wallner <i>et al.</i> , 1993)
EUK516	<i>Eucarya</i>	ACCAGACTTGCCCTCC	16S, 502-516	0	(Amann, 1995)
ACA23a	<i>Acinetobacter</i> spp.	ATCCTCTCCCATACTCTA	16S, 652-669	35	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)
LDI23a	<i>Leptothrix</i> spp. und andere β1- Gruppen der <i>Proteobacteria</i>	CTCTGCCGCACTCCAGCT	16S, 649-666	35	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)
CF319a	<i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Bacteroides</i>	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S, 319-336	20	(Manz <i>et al.</i> , 1994)
SGR1425	<i>Flexibacter</i> spp. <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> <i>Saprospira grandis</i>	GTCACCATCTTCAGGCAC	16S, 1425-1442	20	(Snaidr, 1997)

Tabelle B.2: Charakteristika der eingesetzten Sonden; <sup>1</sup> Bindungsstelle an der rRNA, Nummerierung nach (Brosius *et al.*, 1981); <sup>2</sup> Prozent Formamid im Hybridisierungspuffer

### B.6.3 Hybridisierung auf Objektträgern

#### **Beschichtung der Objektträger mit Gelatine**

- Teflonbeschichtete Objektträger (OT) (6 Aussparungen; Paul Mariefeld) gründlich mit Spülmittel entfetten und waschen und möglichst staubfrei trocknen
- Gelatinelösung (0,1% (w/v) Gelatine (Sigma), 0,01% (w/v) Kaliumchromsulfat); zum Lösen auf 60°C erhitzen
- OT langsam in die noch warme Gelatinelösung tauchen
- ca. 3 h bei RT an einem staubarmen Ort trocknen

#### **Lösungen**

- 0,5 M EDTA-Lösung; pH 8,0; autoklaviert
- 10% Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Lösung (w/v); sterilfiltriert

- 1 M Tris-HCl-Lösung; pH 7,2-7,4; autoklaviert
- 5 M NaCl-Lösung; autoklaviert

Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden wurden bei einer Temperatur von 46°C durchgeführt und bei einer Temperatur von 48°C gewaschen.

**Standardpuffer für Hybridisierungen:**

NaCl	0,9 M
Tris-HCl (pH 7,2)	20 mM
SDS	0,01%

Zum Standardhybridisierungspuffer wurden vor der Hybridisierung Sonden zu einer Endkonzentration zwischen 1 – 5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  zugemischt. Der folgende Waschschrift erfolgte im Standardhybridisierungspuffer. Je nach benötigter Stringenz wird der Standardhybridisierungspuffer durch Zugabe von Formamid (Merck) in unterschiedlichen Konzentrationen modifiziert (siehe Tabelle B.2).

**Waschen ohne Formamid**

Um große Abfallmengen an Formamid zu vermeiden, kann die identische Stringenz durch Variation der NaCl-Konzentration eingestellt werden. Die Berechnung der hier angegebenen Konzentrationen an NaCl erfolgte mit der Formel (hergeleitet aus Lathe, 1985):

$$M_2 = \frac{M_1}{\frac{\Delta T_d}{10^{16,6}}}$$

In dieser Formel ist  $M_2$  die Konzentration an  $\text{Na}^+$ -Ionen im Waschpuffer und  $M_1$  die  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Hybridisierungspuffer.  $\Delta T_d$  errechnet sich aus der Konzentration des Formamids im Hybridisierungspuffer; dabei wird 1% Formamid einer Veränderung in der Dissoziationstemperatur ( $T_d$ ) von DNA/RNA-Hybriden von 0,5°C gleichgesetzt.

Bei geringen NaCl-Konzentrationen ist eine Zugabe von EDTA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 5 mM im Waschpuffer nötig, da bereits Spuren zweiwertiger Kationen durch ihre starke Hybridstabilisierung die Stringenz beeinflussen können.

### **Waschpuffer ohne Formamid**

1 M Tris-HCl (pH 8,0)	1000 $\mu$ l
5 M NaCl	y $\mu$ l
0,5 M EDTA (ab 20% FA)	500 $\mu$ l
10% SDS	50 $\mu$ l
	ad 50 ml H <sub>2</sub> O

Die NaCl-Konzentration ist abhängig von der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer. Aufschluß über die entsprechenden Kombinationen gibt Tabelle F.2 im Anhang.

### **Durchführung:**

- Fixierte Zellsuspension in Aussparungen der beschichteten OT pipettieren (je nach Zelldichte 5 - 30  $\mu$ l) und bei 46°C trocken
- Zur Dehydratisierung und Nachfixierung der Zellen die OT für jeweils 3 min in 50%, 80% und absolutem Ethanol tauchen und trocken lassen
- Hybridisierungspuffer mit markiertem Oligonukleotid 10:1 mischen
- Auf jedes Feld 10  $\mu$ l Sonden-Hybridisierungspuffergemisch pipettieren
- 50 ml-Röhrchen (Greiner) mit Zellstoff auslegen und mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchten
- OT in das Röhrchen stecken und mit einem Schraubdeckel verschließen

Die Hybridisierung wird in dieser feuchten Kammer durchgeführt, um ein Verdampfen der geringen Menge an Hybridisierungspuffer zu vermeiden.

- OT für 1,5 h bei 46°C hybridisieren
- OT sofort mit ca. 5 ml 48°C warmem Waschpuffer vorsichtig abspülen und in ein mit Waschpuffer gefülltes Röhrchen gleicher Temperatur überführen
- 15 min bei 48°C inkubieren
- OT vorsichtig mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> spülen und lufttrocknen
- Optional: mit 10  $\mu$ l einer 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>-DAPI-Lösung für 10 min im Dunkeln färben, abwaschen und im Dunkeln trocknen lassen
- Trockene OT in Citifluor einbetten und unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten (siehe B.6.8).

#### **B.6.4 Hybridisierung auf Polycarbonatfiltern**

Bei Hybridisierung von Wasserproben auf Filtern wurden ausschließlich Cy3 markierte Sonden verwendet, da dieser Farbstoff in Kombination mit dem entsprechenden „high quality“- Epifluoreszenz-Filtersatz hellere Signale liefert.

##### ***Lösungen:***

Die Lösungen entsprachen den bei der Hybridisierung auf OT verwendeten (siehe B.6.3).

- Hybridisierungspuffer mit Sondenarbeitslösung ( $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) im Verhältnis 10:1 mischen
- DAPI - Lösung (Sigma):  $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

##### ***Durchführung:***

Der Grundablauf entspricht dem der Hybridisierung auf OT. Die Filter werden wie unter B.2.3 beschrieben mit Mikroorganismen beschichtet.

- Polycarbonatfilter mit einer sterilen Rasierklinge vierteln
- Filterviertel mit der Pinzette auf einen Glas-OT (76 x 26 mm, geschnitten, Menzel) legen und mit 20  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer-Sondengemisch gleichmäßig überschichten
- Hybridisierung in der feuchten Kammer bei  $46^\circ\text{C}$  (siehe B.6.3)
- Zum Waschen Filterviertel in den Waschpuffer geben
- Filterviertel aus dem Waschpuffer nehmen und auf Filterpapier trocknen
- Getrocknetes Filterviertel auf OT legen
- mit 50  $\mu\text{l}$  DAPI - Lösung überschichten und 3 min bei RT im Dunkeln färben
- Anschließend das Filterviertel in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  waschen und auf Filterpapier trocknen
- Filter einbetten in Citifluor und im Epifluoreszenzmikroskop auswerten (siehe B.6.8).

##### ***Resuspendierung für Durchflußzytometrie***

- Filter nach dem Waschen nicht trocknen, sondern feucht in Streifen schneiden
- Streifen in ein ERG mit 300 $\mu\text{l}$  eiskaltem PBS geben und ca. 5 min vortexen
- Suspension mit DAPI-Lösung versetzen ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  Endkonzentration) und analysieren

#### **B.6.5 Hybridisierung in Suspension für die Durchflußzytometrie**

- Fixierte Zellen ( $10^5$ - $10^6$ , je nach Zelldichte) in einem ERG mit 100  $\mu\text{l}$  vorgewärmten Hybridisierungspuffer vermischen
- Zugabe von 1-5  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  (Endkonzentration) fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonde

- 2 h Inkubation in einem Wärmeschrank bei 46°
- Zellen bei 4.000 x g 2 min abzentrifugieren
- in 100 µl Hybridisierungspuffer für 30 min bei 46° waschen
- Zellen bei 4.000 x g 2 min abzentrifugieren und in 1 x PBS resuspendieren
- Optional: Zugabe einer DAPI-Lösung bis zur Endkonzentration von 1 µg ml<sup>-1</sup> bzw. HOECHST33342-Lösung in einer Verdünnung von 1 x 10<sup>5</sup> der Originallösung (Molecular Probes, Konzentration vom Hersteller nicht angegeben).

Nach Hybridisierung mit FLUOS-markierten Oligonukleotidsonden wurden die gefärbten Zellen in 1 x PBS, pH 8,4, aufgenommen, da das Fluoreszenzmaximum für FLUOS pH-abhängig und im alkalischen Bereich höher ist. Die Proben wurden in Polystyren-Röhrchen (12 x 75 mm; Becton-Dickinson, Heidelberg) umgefüllt und auf Eis gelagert.

### **B.6.6 Hybridisierung mit Peroxidase-(POD)-markierten Oligonukleotiden auf Polycarbonatfiltern**

#### ***Material***

- 5 mg ml<sup>-1</sup> LysozymbLösung: Lysozym (108.000 U; Fluka, Buchs, Schweiz) in Lysozymbpuffer lösen (100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0)
- Proteinase K – Lösung: Proteinase K (0,01mg ml<sup>-1</sup>; Boehringer Mannheim, Mannheim) in TE-Puffer lösen (10 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 7,8)

#### ***Durchführung***

- Filter mit PFA-fixierten Zellen mit LysozymbLösung überschichten
- bei 35°C für 30 min in einer feuchten Kammer inkubieren
- in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> waschen
- mit Proteinase K – Lösung in feuchter Kammer für 10-30 min inkubieren
- in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> waschen
- Inaktivierung der Enzyme durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (50%, 80%, 96% für je 3 min)
- Filter auf Zellstoffpapier trocknen

#### ***Hybridisierung***

Wegen der Instabilität des Enzyms bei Temperaturen über 40°C wurden Hybridisierungen mit POD-markierten Sonden bei 35°C durchgeführt. Um in etwa die gleichen Stringenzen wie bei Hybridisierungen mit 46°C zu erhalten, wurden die Formamidkonzentrationen um 20% erhöht. Dabei wird zugrunde gelegt, daß eine Erhöhung um 1% Formamid einer Erhöhung der

Hybridisierungstemperatur um 0,5°C entspricht (Wahl *et al.*, 1987). Um außerdem unspezifische Bindungen der Peroxidase zu verhindern, wurde dem Hybridisierungspuffer 20% Blocking Reagenz (Boehringer) zugegeben.

Im Waschpuffer wurde die Stringenz über die Konzentration an Na<sup>+</sup>-Ionen eingestellt. Der Zusammenhang zwischen Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer und Na<sup>+</sup>-Konzentration im Waschpuffer ist Tabelle F.3 im Anhang zu entnehmen.

Für den Waschpuffer bei 35°C ist noch ein weiterer Umstand zu berücksichtigen: da der Waschschritt im allgemeinen etwas stringenter sein soll als die Hybridisierung, und dies in diesem Fall nicht über eine höhere Temperatur erfolgt, wird die Na<sup>+</sup>-Konzentration im Waschpuffer um einen etwa 3°C entsprechenden Wert abgesenkt. Dazu wird der anhand der Formamidkonzentration errechnete  $\Delta T_d$ -Wert um 3°C erhöht.

Alle übrigen Puffer sind identisch zu den in B.6.4 angeführten

- Mischen der POD-markierten Sonde mit Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:10
- Den Filter auf OT legen und mit Sonden-Puffer-Gemisch bedecken
- OT in einer feuchten Kammer mit Hybridisierungspuffer geben und für 120 min bei 35°C inkubieren
- Filter in vorgewärmten Waschpuffer für 30 min bei 35°C waschen
- Filter nicht austrocknen lassen und wie unter B.6.7 beschrieben weiter behandeln.

### **B.6.7 Detektion mit TSA-Amplifikationskit**

#### **Materialien**

- TNT Puffer: 0,1 M Tris-HCl (pH 7.5) 0,15 M NaCl, 0,05% Tween<sup>®</sup> 20 (v/v)
- TSA-Kit (DuPont)
- Dextransulfatlösung: 40% (w/v) Dextransulfat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in H<sub>2</sub>O
- TSA<sup>™</sup>-Direct-Kit von NEN<sup>™</sup> Life Science Products (Boston, MA), enthält:
  - Amplifikationsdiluent
  - Fluorochrom-Tyramid

Die in den entsprechenden TSA™-Direct-Kits enthaltene Tyramide wurden in entsprechenden Volumina Dimethylsulfoxid (Fluorescein-Tyramid) bzw. H<sub>2</sub>O (Cy3-Tyramid) gelöst.

### **Durchführung**

- Filter in TNT Puffer für 15 min bei RT equilibrieren
- Amplifikationsdiluent mit Fluorochrom-Tyramid im Verhältnis 50:1 mischen
- Filter mit Substrat-Mix bedecken und 15 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- in TNT-Puffer kurz spülen
- in frisches TNT überführen und bei 55°C für 15 min sanft schütteln
- in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> spülen

Für Durchflußzytometrie in PBS resuspendieren, für Mikroskopie trocken lassen und in Citifluor einbetten (siehe B.6.8).

## **B.6.8 Auswertung mit dem Epifluoreszenzmikroskop**

### **Materialien:**

- Citifluor AF1 (Citifluor Ltd.)
- Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen)
- Plan-Neofluar Objektive (10-, 20-, 40-, und 100 fache Vergrößerung)
- Kamera (MC 100, Zeiss)
- Filmmaterial: Kodak EES 1600 (farbiger Diafilm)
- OT mit fixierten und hybridisierten Zellen bzw. Filter (siehe B.6.3 und B.6.4)
- Filtersysteme:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anregung [nm]</b>	<b>Farbteiler [nm]</b>	<b>Emission [nm]</b>	<b>verwendbar für</b>
01	BP 365/12	FT 395	LP 397	DAPI
09	BP 470/40	FT 510	LP 520	FLUOS
15	BP 546/12	FT 580	LP 590	Cy3
HQ-Cy3	HQ 545/50 BP	HQ 565 LP	HQ 610/75 BP	Cy3

*Tabelle B.3: Für die Epifluoreszenzmikroskopie verwendete Filtersätze (Carl Zeiss, Jena; HQ-Filtersätze über AHF Analysetechnik, Tübingen). BP, Bandpaßfilter; LP, Langpaßfilter; FT, Farbteiler; HQ, „High Quality“.*



### ***Durchführung:***

Zur Verzögerung von Ausbleicheffekten der Fluoreszenzfarbstoffe wird der Objektträger (gegebenenfalls mit Filter) in Citifluor AF1 eingebettet, mit einem Deckglas abgedeckt und im Dunkeln unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe einer Kamera mit automatischer Belichtungsmessung.

## ***B.7 Durchflußzytometrie***

### ***B.7.1 Begriffserklärung***

Durchflußzytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen oder Partikel in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl nach verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern vermessen werden können. Im nachfolgenden wird auf den gängigsten Typ, das Durchflußzytometer mit Streulicht- und Fluoreszenzmessung eingegangen.

### ***B.7.2 Allgemeine Funktionsweise eines Durchflußzytometers***

#### ***B.7.2.1 Hydrodynamische Fokussierung***

Die in Flüssigkeit vorliegende Probe wird über eine sehr feine Nadel als Probenstrom in einer Kammer in den sogenannten Mantelstrom injiziert (Abbildung B.1). Am Ende der Kammer tritt der Flüssigkeitsstrahl durch eine sich verjüngende Düse aus, wodurch der gesamte Strahl auf Düsendurchmesser (zw. 50-400  $\mu\text{m}$ , je nach Düse) eingeengt wird. In dem Maße, wie sich der Durchmesser des Mantelstroms in der Düse verjüngt, wird auch der Probenstrom in der Mitte des Mantelstroms zusammengedrückt. Durch diese sogenannte „hydrodynamische Fokussierung“ werden die Zellen vereinzelt und verlassen exakt im Zentrum des Flüssigkeitsstrahl ausgerichtet die Düsenöffnung. Die besondere Düsengeometrie ermöglicht eine laminare Strömung des Wasserstrahls, die wegen der hohen Geschwindigkeit (ca. 10  $\text{m s}^{-1}$ ) bis über den Beobachtungspunkt stabil bleibt. Im Beobachtungspunkt treten die Zellen mit

dem Anregungslicht in Wechselwirkung, bevor der Wasserstrahl über eine Absaugvorrichtung aufgefangen wird.

### ***B.7.2.2 Lichtquelle***

Als Lichtquellen kommen sowohl Quecksilberdampflampen als auch Laser zum Einsatz. Der Vorteil von Lasern gegenüber Quecksilberdampflampen besteht darin, daß sie sehr hohe Anregungsintensitäten haben und der Lichtstrahl eng gebündelt werden kann. Sie haben sehr schmale Anregungsbereiche, die vom Lasertyp abhängen. Der am häufigsten eingesetzte Lasertyp, der Argon-Ionen-Laser, hat seine stärkste Anregungslinien bei 514 nm (grün), 488 nm (blaugrün) und mehrere Linien im UV-Bereich. Daneben werden Argon-Krypton-, Helium-Neon- und neuerdings auch Dioden-gepumpte Festphasenlaser verwendet.

### ***B.7.2.3 Parameter***

Im Beobachtungspunkt trifft das Anregungslicht auf den Wasserstrahl. Passiert eine fluoreszenzmarkierte Zelle den Beobachtungspunkt, emittiert sie zwei unterschiedliche Arten von Licht.

**Streulicht:** Die Zellen streuen das Anregungslicht zu einem gewissen Prozentsatz, ohne es zu absorbieren. Die Stärke der Streuung und die Verteilung über verschiedene Streuwinkel hängen ab von Größe, Form, refraktivem Index und damit auch von der chemischen Zusammensetzung der Zellen (Shapiro, 1995). In den meisten Durchflußzytometern sind zwei Streulicht-Detektoren installiert. Einer mißt das Streulicht von sehr kleinen Winkeln (1-10° Ablenkung von der Achse des Anregungslichtes), das sogenannte Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC). Das direkt einfallende Anregungslicht wird durch einen sogenannten „obscuration bar“ abgedeckt. Ein zweiter Detektor mißt das Streulicht, das im 90°-Winkel zur Anregung reflektiert wird (side scatter, SSC). Während das Vorwärtsstreulicht vor allem mit der Größe der Zellen korreliert, kann das Seitwärtsstreulicht darüber hinaus Aufschluß über Oberflächenbeschaffenheit und innere Struktur der Zellen geben.

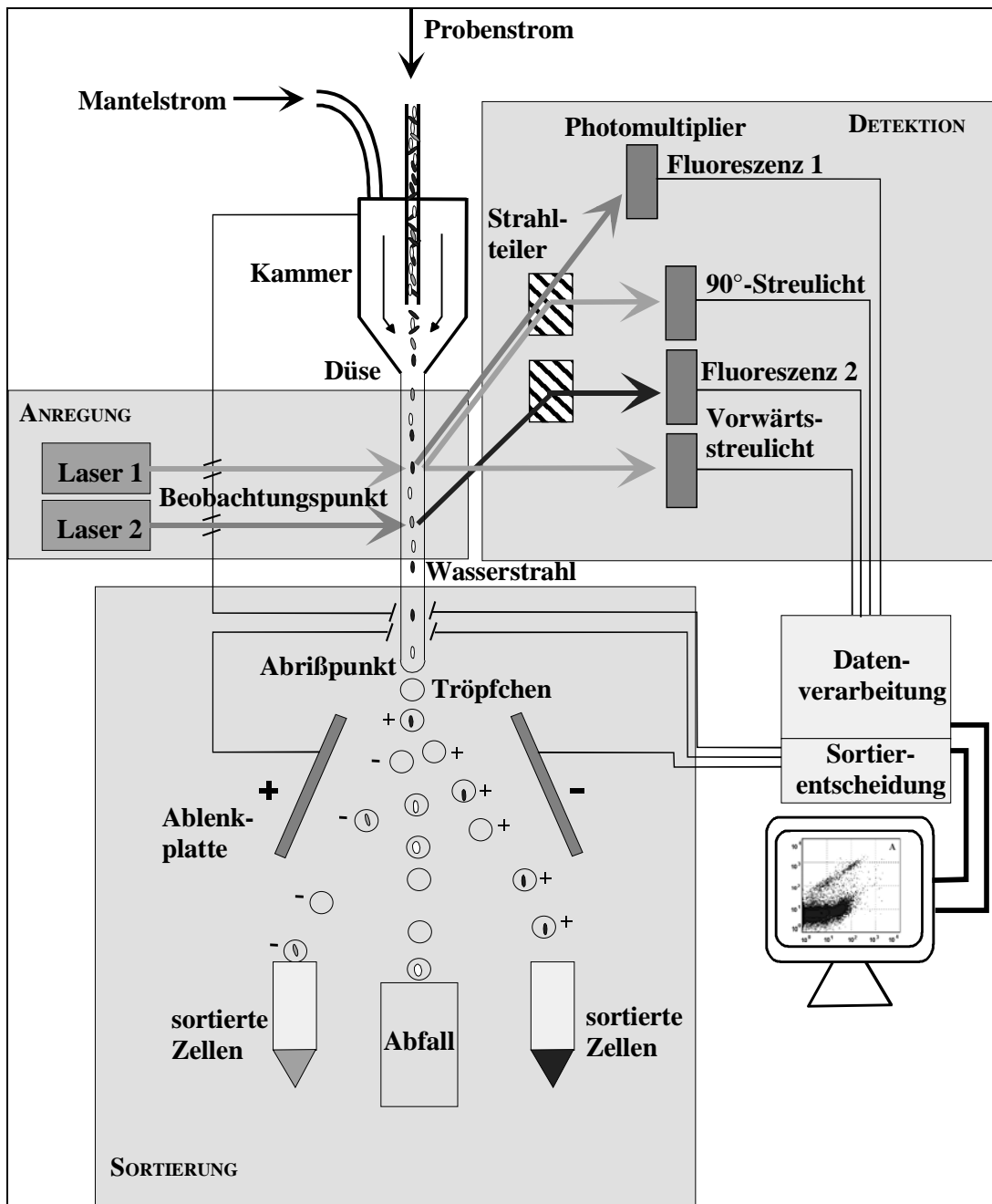


Abbildung B.1: Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers mit zwei Lasern und Sortieroption. Erläuterungen im Text.

**Fluoreszenzlicht:** Zellen, die z. B. mit einer fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde gefärbt sind oder die zelleigene, stark autofluoreszierende Substanzen besitzen, absorbieren Teile des Anregungslichts und emittieren längerwelliges Fluoreszenzlicht (Stokes'sche

Verschiebung), gleichmäßig in alle Richtungen. Üblicherweise detektiert man die Fluoreszenz im rechten Winkel zur Anregungsachse.

#### ***B.7.2.4 Aufnahme der Lichtsignale***

Durch geeignete Spiegel- und Filtersysteme können die verschiedenen Arten Streu- bzw. Fluoreszenzlicht aufgrund ihrer spektralen Unterschiede voneinander getrennt werden und jeweils eigenen optischen Detektoren zugeführt werden. Üblicherweise werden Photomultiplier verwendet, die eine hohe Empfindlichkeit und einen weiten dynamischen Bereich besitzen. Diese wandeln optische in elektrische Signale um, die in Computersystemen weiterverarbeitet, digitalisiert und gespeichert werden.

Zur Vermeidung von Hintergrundrauschen, muß ein Schwellenwert (oder „threshold“) eingestellt werden. Erst wenn der in einem Parameter (Schwellenwertkanal) eingestellte Mindestwert überschritten wird, werden auch die Signale aller anderen Parameter aufgezeichnet. Um möglichst sensitiv zu messen, stellt man den Schwellenwert gewöhnlich in einem besonders rauscharmen Parameter ein. Rauschen kann viele Ursachen haben, z.B. einfallendes Raumlicht, das in die PMT-Röhren gelangt, nicht gebundener Farbstoff, Debris in der Probe oder Reflexionen an der Oberfläche des Wasserstrahls.

Die aktuellen Meßwerte können während der Analyse auf geräteeigene Oszillographen bzw. am angeschlossenen Rechner „on-line“ verfolgt werden. Man hat die Wahl zwischen mehreren verschiedenen Darstellungsarten. Gebräuchlich sind die Darstellung der Ereignisse als Pulshöhe und als „dot-plot“ im zweidimensionalen Koordinatensystem. In der „dot-plot“-Darstellung entspricht jedes einzelne Ereignis einem einzelnen Punkt („dot“) im Diagramm. Den Koordinatenachsen können beliebige Parameter zugeordnet werden. Auch statistische Auswertungen sind in einem gewissen Rahmen „on-line“ möglich.

#### ***B.7.2.5 Sortierung***

Bei Durchflußzytometern mit Sortiereinrichtung wird die Düse in hochfrequente Schwingungen versetzt, was dazu führt, daß der Flüssigkeitsstrahl nach dem Beobachtungspunkt in feinste Tröpfchen abreißt. Bei einer hinreichend geringen Zellkonzentration befindet sich höchstens eine Zelle in einem dieser Tröpfchen, in den meisten Tröpfchen sind aber gar keine Zellen enthalten.

Die Auswahlkriterien für eine Sortierung werden vorher im Analysenmodus durch das Setzen sogenannter Fenster oder „gates“ festgelegt. Dabei handelt es sich um die Verknüpfung von zwei oder mehreren Parametern, in denen je eine Ober- wie Untergrenze für die gewünschten Zellen beschrieben wird. So entsteht ein enges Daten-“Fenster“, das die gewünschten Zielzellen enthält.

Passiert eine Zelle den Beobachtungspunkt, so werden ihre Eigenschaften gemessen und mit den Werten, die durch die Auswahlfenster vorgegeben sind, verglichen. Nähert sich die Zelle dem Tropfen-Abrißpunkt und hat sie die Kriterien des Fensters erfüllt, so wird der Flüssigkeitsstrahl elektrisch aufgeladen. Ein Tröpfchen bildet sich, umschließt die Zelle und reißt ab. Nach dem Abriß behält das Tröpfchen seine Ladung bei und wird durch die Hochspannungsplatten in ein Sammelgefäß abgelenkt. Der Wasserstrahl wird nach dem Abriß des Tröpfchen mit der Zelle wieder entladen.

Es werden nur die im Fenster enthaltenen Zellen sortiert. Wird der gewünschte Organismus durch das Auswahlfenster nicht getroffen oder ist die Ausbeute schlecht, so kann das Fenster beliebig verschoben werden, bis die richtige Population erfaßt wird.

Auf diese Weise können aus komplexen Mischpopulationen bestimmte Zelltypen aussortiert und hoch angereichert werden und sind damit zugänglich für weitere molekularbiologische Untersuchungen (Shapiro, 1995).

### **B.7.3 Gerät und Material**

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden an zwei Durchflußzytometern der Firma Becton Dickinson (Mountain View, USA), Modell „FACStar Plus“ durchgeführt. Unterschiede der beiden Geräte sind im einzelnen angeführt.

#### ***B.7.3.1 Hydraulik***

**Mantelstromflüssigkeit:**  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  zur reinen Analyse der Zellen. Zur Sortierung wurde 1:10 verdünnte, physiologische Kochsalzlösung (0,85% NaCl = 146,6 mM NaCl) bzw. 1:10 verdünntes 1 x PBS verwendet. Störende Salze wurden so auf ein Minimum reduziert, da die sortierten Zellen anschließend einer PCR-Amplifikation unterworfen wurden. Die

Mantelstromflüssigkeit wurde stets über einen Filter mit 0,2 µm Porenweite (Sartorius) partikelfrei gemacht.

**Mantelstromdruck:**  $8,6 \times 10^5$  Pa

**Überdruck Probenstrom gegenüber Mantelstrom:**  $<6,9 - 13,8 \times 10^2$  Pa (entspricht ca. 0,1 µl min<sup>-1</sup>)

**Düse:** Düsenöffnung 70 µm im Durchmesser; Messung als „stream-in-air“

### ***B.7.3.2 Laser***

Will man nur mit einem Fluoreszenzfarbstoff färben, genügt ein Laser zur Anregung des Farbstoffs. Für Doppelfärbungen wird ein zweiter Laser zugeschaltet. Der zweite Laser hat seinen Beobachtungspunkt ca. 170 µm stromabwärts vom ersten Laser. Auf diese Weise ist es möglich, Fluoreszenzlicht aus den beiden Beobachtungspunkten räumlich getrennt auf je zwei unterschiedliche Photomultiplier zu spiegeln. Fluoreszenz 1 und 2 (FL1 und FL2) stammen dann vom ersten Laser, Fluoreszenz 3 und 4 (FL3 und FL4) vom zweiten. Das Licht für beide Streulichtmessungen stammt grundsätzlich vom ersten Laser.

Die Laser werden im FACStar Plus auf einen elliptischen Querschnitt mit einer Höhe von ca. 3 µm und einer Breite von ca. 40 µm fokussiert.

Es wurden zwei Laserkonfigurationen verwendet:

#### **Konfiguration 1:**

**Laser 1:** Argon-Ionen Laser (Innova70, Coherent, Palo Alto, USA) mit einer Gesamtleistung von 5 W, auf 488 nm bzw. 514 nm justiert; meist auf 500 mW Leistung eingestellt;

**Laser 2:** Argon-Ionen Laser (Innova70) mit einer Gesamtleistung von 4 W, auf UV – Emission (351,1 bis 363,8 nm) justiert; ca. 100 mW Leistung;

#### **Konfiguration 2:**

**Laser 1:** Argon-Ionen Laser (Innova 90) mit einer Gesamtleistung von 5 W, auf UV – Emission (351,1 bis 363,8 nm) justiert; ca. 130 mW Leistung;

**Laser 2:** Dioden-gepumpter (Nd:YAG)-Festphasenlaser (DPSS532, Coherent, Palo Alto, USA), 532 nm Emission, Leistung 200 mW;

### B.7.3.3 Farbstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet:

Farbstoff	Absorption (+/-10 nm)	Emission (+/-10nm)	Quanten- Ausbeute	Extintions- Koeffizient (mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
<b>DNA Farbstoffe</b>				
DAPI	345	455	0,83 <sup>1</sup>	120.000
Hoechst 33342	343	483	0,83 <sup>1</sup>	120.000
<b>Konjugierte Farbstoffe</b>				
CY3	512 / 552	565	0,15 <sup>2</sup>	150.000
Carboxy-Fluorescein (FLUOS)	494	518	n.b.	75.000
Alexa 488	491	515	n.b.	65.000
Alexa 532	523	548	n.b.	80.000
Alexa 546	553	569	n.b.	80.000

Tabelle B.4: Spektrale Eigenschaften aller verwendeten Farbstoffe; n.b.: nicht bekannt; <sup>1</sup> aus: (Melamed et al., 1990); <sup>2</sup> Angabe des Herstellers (Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA) für Proteinkonjugate;

**Alexa**-Farbstoffe sind sulfonierte Rhodamin-Derivate von Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA); **DAPI**: 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, FRG); **HOECHST33342**: (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol) (Molecular Probes); **FLUOS**: 5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim, Mannheim); **CY3**: 5,5'-Disulfo-1,1'-(γ-carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarboyanin-N- hydroxysuccinimidester (Amersham Life Sciences)

### B.7.3.4 Optik

**Photodetektoren:** für das Vorwärtsstreulicht (FSC) kam sowohl eine Photodiode (Konfiguration 1), als auch ein Photomultiplier (FSC-PMT) (Konfiguration 2) zum Einsatz; die Empfindlichkeit der FSC-PMT kann über die angelegte Spannung reguliert werden, nicht jedoch bei der Photodiode; um die FSC-PMT nicht durch zu hohe Lichtintensitäten zu schädigen, wurde stets ein Graufilter eingeschoben (ND, neutral density; Schott, Mainz) und

ein breiterer „obscuration bar“ eingesetzt; für alle anderen Parameter wie Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzlicht standen 5 Photomultiplier zur Verfügung (SSC, FL1-4).

**Optische Filter:** Vor den beiden Streulichtdetektoren wurden Bandpaßfilter gesetzt, die nur die Wellenlänge des Anregungslichtes durchließen. Die Fluoreszenzdetektoren wurden mit Filtern bestückt, die nur das gegenüber dem Anregungslicht längerwellige Fluoreszenzlicht transmittierten. Die Charakteristika der eingesetzten Filter sind in Tabelle B.5 beschrieben.

Filterbezeichnung	Art	Hersteller	Transmissions-Grenzen (nm)
BP 363 / 15	Bandpaßfilter	Zeiss <sup>1</sup>	355 – 370
SP 375	Kurzpaßfilter	BD <sup>2</sup>	< 375
BD 424 DF 44	Bandpaßfilter	BD	400 – 450
HQ 460 / 50	Bandpaßfilter	Zeiss	435 – 485
BD 488 DF 10	Bandpaßfilter	BD	483 – 493
SS 5100 - 1	Bandpaßfilter	Schott <sup>3</sup>	500 – 520
BD 530 DF 30	Bandpaßfilter	BD	510 – 550
BD 575 DF 26	Bandpaßfilter	BD	560 - 590
BD 585 DF 42	Bandpaßfilter	BD	564 – 606
BP 600	Bandpaßfilter	Anders <sup>4</sup>	545 - 680

Tabelle B.5: Filtercharakteristika; <sup>1</sup>Zeiss, Jena; <sup>2</sup>BD = Becton Dickinson, Mountain View, USA; <sup>3</sup>Schott, Mainz; <sup>4</sup>Gesellschaft für dünne Schichten mbH Dr. Hugo Anders, Nabburg;

### B.7.3.5 Justierung

Die drei Achsen Anregungslicht, Flüssigkeitstrahl und Detektorsysteme müssen im Beobachtungspunkt exakt aufeinander abgestimmt sein. Die Grobeinstellung erfolgt mit fluoreszierenden Standardkügelchen („Beads“) von 2,0 µm Durchmesser, die eine konstante Menge an Fluoreszenzfarbstoff tragen (Polysciences, Warrington, USA). Zur Feinabstimmung setzt man 0,5 µm große Beads ein. Üblicherweise verwendet man gelbgrün fluoreszierende Beads, die über einen weiten Bereich anregbar sind. Die konstante Fluoreszenz der Beads erlaubt eine interne Standardisierung der Proben, so daß auch zeitlich weit auseinanderliegende Meßreihen miteinander vergleichbar sind.



### B.7.3.6 Typische Meßkonfigurationen

Für die verschiedenen Kombinationen aus Farbstoffen und optischen Filtern wurden verschiedene Laserleistungen bzw. Photomultiplierspannungen gewählt. Typische Einstellungen sind in Tabelle B.6 für Konfiguration 1 und Tabelle B.7 für Konfiguration 2 beschrieben.

#### Konfiguration 1

Farbstoff	Anregung		Filter für Fluoreszenz	PMT (V) für Fluoreszenz	Filter für Streulicht
	(nm)	(mW)			
FLUOS	488	500	BD 530 DF 30	550 - 600	BD 488 DF 10
Cy3	514	1000	BD 575 DF 26	650 - 750	BD 530 DF (FSC) SS 5100 - 1 (SSC)
DAPI /HOECHST33342	UV	80	BD 424 DF 44	550 - 650	--- <sup>1</sup>

Tabelle B.6: Filterkombinationen und Photomultiplier-Spannungen für Konfiguration 1; hellgrau: Laser 1; dunkelgrau: Laser 2; <sup>1</sup> DAPI-Färbung wurde stets in Kombination mit einem weiteren Farbstoff eingesetzt und über den zweiten Laser angeregt, steht damit nicht für Streulichtmessungen zur Verfügung

#### Konfiguration 2

Farbstoff	Anregung		Filter für Fluoreszenz	PMT (V) für Fluoreszenz	Filter für Streulicht
	(nm)	(mW)			
DAPI / HOECHST33342	UV	130	HQ 460/50	550 – 650	BP 363/15 (FSC) HQ 360/40 (SSC) SP 375 (FSC/SSC)
FLUOS / Alexa 488	488	200-500	BD 530 DF 30	650 – 850	BD 488 DF 10
Cy3 / Alexa 532 / Alexa 546	532	200	BD 585 DF 42 BP 600 / 120	650 – 850	BD 530 DF

Tabelle B.7: Filterkombinationen und Photomultiplier-Spannungen für Konfiguration 2; FSC-PMT typischerweise 600-650V; hellgrau: Laser 1; dunkelgrau: Laser 2;

### B.7.3.7 Analyse

Die Steuerung des Geräts erfolgte über einen angeschlossenen Computer (PowerMac, bzw. Hewlett Packard) mit graphischer Benutzeroberfläche (CellQuest, bzw. Lysys, Becton

Dickinson). Alle Parameter wurden als Pulshöhen-Signale in einem vier Dekaden umfassenden, logarithmischen Maßstab aufgezeichnet und als „list mode“ im FCS2.0 – Format abgespeichert. „List mode“ bedeutet, daß für jeden Partikel die gemessenen Parameter in Listenform abgespeichert werden. Die Daten wurden entweder direkt am Computer mit der „Cellquest“-Software ausgewertet oder durch das Programm „FASTFILE“ (Becton Dickinson) auf ein IBM-kompatibles PC-System übertragen. Dort wurden die Daten statistisch und graphisch mit dem Software-Paket „DAS V4.35 (DAS = Data Analysis Software, Beisker, 1994) weitergehend ausgewertet.

#### **B.7.4 Quantifizierung der Sondenfluoreszenz im Durchflußzytometer**

Zellen wurden in logarithmischer Wachstumsphase ( $OD_{600nm} \sim 0.5$ ) geerntet, einmal in 1 x PBS (pH 7.2) gewaschen und mit 4% PFA-Lösung fixiert.

**Datenaufnahme und -verarbeitung.** Pro Probe wurden 10,000 Ereignisse aufgezeichnet und in einem Dotplot-Diagramm die Fluoreszenz gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. Die zu messende Zellpopulation wurde durch „gating“ ausgewählt und die Sonden-vermittelte Fluoreszenz als Median der Einzelwerte bestimmt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde um die Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrollen korrigiert und auf die Fluoreszenz von Standardbeads korrigiert. Alle Werte wurden schließlich als Prozentwert der hellsten Sonde ausgedrückt.

Die sondenvermittelte Fluoreszenz wurde jeweils in Triplikaten vermessen. Jedes Replikon wurde unabhängig angesetzt und vermessen. Es wurden nur Triplikate mit einem Variationskoeffizient (CV) von weniger als 10% akzeptiert.

Für die Quantifizierung der fluoresceinmarkierten Oligonukleotidsonden für *Escherichia coli* 16S-rRNA wurden zusätzlich alle Sonden in drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten vermessen, um tägliche Variationen in der Probenbereitung und die „Tagesform“ des Durchflußzytometers zu kompensieren. Die Mittelwerte aller drei Triplikat-Messungen sind in Tabelle F.1 im Anhang aufgelistet. Es sind keine Standardabweichungen angegeben, da der CV für alle Messungen  $<10\%$  war.

### **B.7.5 Bestimmung relativer Häufigkeiten**

Proben wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI bzw. HOECHST33342 gefärbt, um alle Zellen vom Hintergrund zu diskriminieren. In einem DAPI-Vorwärtsstreulicht-Dotplot wurden alle DAPI-positiven Zellen mit einem Fenster („Gate“) ausgewählt und in einem weiteren Dotplot die Sondenfluoreszenz gegen Vorwärtsstreulicht aufgetragen. In diesem zweiten Dotplot wurden nun alle sondenpositiven Zellen in einem Gate gezählt. Wenn man die Zählwerte der DAPI-positiven mit denen der sondenpositiven Zellen ins Verhältnis setzt, erhält man die relative Häufigkeit ausgedrückt als Prozentwert von DAPI.

### **B.7.6 Bestimmung der Gesamtkeimzahl**

Wegen der ständig schwankenden Durchflußrate im Durchflußzytometer können keine absoluten Volumina vermessen werden und damit die Zellkonzentration direkt bestimmt werden. Abhilfe schafft die Messung eines internen Standards mit jeder Probe. Eine Stammlösung an Standardkugeln (Beads) wird mikroskopisch ausgezählt und die Konzentration bestimmt. Man gibt die Beads-Lösung in einem definierten Volumen der Probe zu, zählt beide, Beads und Zellen, (siehe B.7.6) und rechnet so auf die Gesamtkeimzahl pro ml der Probe zurück.

### **B.7.7 Sortieren**

#### ***B.7.7.1 Justierung***

Für eine korrekte Sortierung sind weitere Justierungsschritte notwendig. Damit nicht das falsche Tröpfchen abgelenkt wird, muß der Zeitpunkt der Aufladung (drop delay), die Tröpfchenerzeugungsfrequenz (drop drive frequency, ddf) und die Anzahl der gleichzeitig abgelenkten Tröpfchen (deflected drops) aufeinander abgestimmt sein. Übliche Einstellungen für den verwendeten FACStar Plus sind: ddf  $\approx$  25 kHz (mit eingebautem Macro-Sort-Kopf, Konfiguration 2) bzw. 27 kHz (ohne Macro-Sort-Kopf, Konfiguration 1); deflected drops: 3; drop delay: 10,5-13,5 (rel. Einheiten)

Zur Kontrolle der Justierung werden eine definierte Anzahl Beads (meist 20 Stück) auf Objektträger sortiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Stimmt die Anzahl der gezählten „Beads“ mit der eingestellten Zahl überein, so sind die Geräteparameter optimal aufeinander abgestimmt.

Wenn zwei Zellen dicht hintereinander im Wasserstrahl zu liegen kommen, gibt es Konfliktsituation, welche der beiden nun sortiert werden soll. Deswegen gibt es mehrere Sort-Modi im FACStar Plus: „Normal“, „Enrich“ und „Counter“, die den unterschiedlichen Koinzidenzen Rechnung tragen. Im „Enrich“-Modus wird Wert auf möglichst vollständige Sortierung aller Zielzellen gelegt, was zu Lasten der Reinheit geht. Im „Counter“-Modus wird eine möglichst hohe Reinheit angestrebt, die mit Einbußen in der Wiederfindungsrate der Zielzellen einhergeht. Im „Normal“-Modus wird ein Kompromiß aus beiden geschlossen, so daß eine möglichst hohe Reinheit mit möglichst hoher Wiederfindungsrate gekoppelt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde immer im „Normal“-Modus sortiert.

#### ***B.7.7.2 Sortieren aus Umweltproben***

Um zu überprüfen, ob ein bestimmter Zelltyp aus einer Mischpopulation richtig sortiert wurde, werden einige Zellen statt in ein ERG direkt auf Objektträger sortiert und unter dem Mikroskop ausgewertet. Die eingetrockneten Zellen werden in einem Citifluor-DAPI-Gemisch aufgenommen (5 Teile Citifluor mit einem Teil DAPI-Lösung ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) gut mischen) und unter dem Mikroskop ausgewertet. Sind die Zellen rein, werden sie in ERG sortiert.

### ***B.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit ganzen, fixierten Zellen***

#### **B.8.1 Waschen der Zellen**

Bevor sortierte Zellen in die PCR eingesetzt werden, müssen sie gewaschen werden, um die physiologische Kochsalzlösung, in der sie sortiert wurden, zu entfernen. Hohe Salzkonzentrationen hemmen die *Taq*-Polymerase.

- sortierte Zellsuspension mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 200 µl auffüllen
- 15 min bei 5.000 x g (Eppendorf) abzentrifugieren
- vorsichtig mit einer Pipette die oberen 190 µl abheben und verwerfen

Es wird beim Abheben des Überstandes darauf geachtet, daß nicht ganz bis zum Boden des ERG abpipettiert wird, da sonst die Gefahr besteht, daß Zellen verloren gehen.

- Gewaschenen Zellen in 72 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufnehmen, schockfrieren und auftauen („freeze-thawing“) und in die PCR-Reaktion einsetzen.

## B.8.2 Lösungen

- *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer 10x (Promega, Madison, USA) (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 9,0); 1% (v/v) Triton X-100)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (Promega)
- Desoxynukleotid-Lösung (dNTP)

Aus den 100 mM Desoxynukleotid-Stammlösungen (A,G,T,C; Pharmacia) wird eine Lösung hergestellt, die 10 mM jedes dNTPs enthält.

- *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Promega): 5 U µl<sup>-1</sup>
- Leichtes Mineralöl (Sigma)
- H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, sterilfiltriert autoklaviert

## B.8.3 Primer

Die Primer wurden so gewählt, daß die gesamte 16S-rDNA amplifiziert wurde. Sie wurden fertig synthetisiert und lyophilisiert bezogen (MWG-Biotech) und nach Herstellerangaben in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt.

	Sequenz (5'- 3')	<i>E. coli</i> – Bindungsstelle <sup>1</sup>	T <sub>d</sub> <sup>2</sup>
616V <sup>3</sup>	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	8-27	56°C
630R <sup>4</sup>	CAKAAAGGAGGTGATCC	1529-1546	50°C

M: A/C, Y: C/T, K:G/T;

<sup>1</sup> Nummerierung nach (Brosius et al., 1981); <sup>2</sup> Schmelzpunkt, berechnet nach der Formel  $T_d = 4(G+C) + 2(A+T)$  (Suggs et al., 1981); <sup>3</sup> V: Primer bindet an den für die 16S-rRNA-codierenden DNA-Strang; <sup>4</sup> R: Primer bindet an den zur 16S-rRNA identischen DNA-Strang

#### B.8.4 Reaktionsansatz

Taq-DNA-Polymerase-10 x Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	5 µl
DNTP, je 10 mM	2 µl
Primer, 25 pM	je 1 µl
Zellen bzw. DNA-lösung	X µl
mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> , autoklaviert ad	100 µl
Leichtes Mineralöl	70 µl

Zur Kontrolle der Reaktion wurde stets eine Positivkontrolle mit 1 µl reiner DNA bzw. *E. coli* aus der logarithmischen Wachstumsphase und eine Negativkontrolle ohne jegliche DNA mitgeführt.

#### B.8.5 PCR-Programm

Zur Durchführung der PCR wurde der programmierbare Thermoblock Hybaid - Omnigene (MWG-Biotech) verwendet.

- Stufe 1: 1 Zyklus
  - 5 min denaturieren bei 94°C
  - 1 min bei 70°C; währenddessen erfolgt die Zugabe von 0,3 µl der *Taq*-Polymerase

Die Temperatur wird auch nach Ablauf der Minute gehalten, bis manuell die zweite Stufe gestartet wird.

- Stufe 2: 35 Zyklen
  - 1 min denaturieren bei 94°C
  - 2 min Primer Annealing bei 48°C
  - 3 min Primer Elongation bei 72°C

Bei jedem Zyklus wird die Elongationszeit um 5 s verlängert (Increment). Damit wird der nachlassenden Tätigkeit der Polymerase Rechnung getragen.

## B.8.6 Qualitative Analyse der PCR-Amplifikate

Zur qualitativen Überprüfung der Amplifikationseffizienz und zur Gewinnung der Amplifikate wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

### Verwendete Lösungen:

- Auftragspuffer

Ficoll	25% (w/v)
Xylencyanol	0,5% (w/v)
Bromphenolblau	0,5% (w/v)
EDTA	50 mM
Orange G	0.5% (w/v)

- Lambda-Standard, *Hind*III-verdaut (Gibco-BRL). Die Abfolge der Banden vom Auftragspunkt in Laufrichtung entspricht folgenden DNA-Größen (in Basenpaaren, bp): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 und 125.
- 1-kb-ladder (Gibco-BRL). Die Abfolge der Banden vom Auftragspunkt in Laufrichtung entspricht folgenden DNA-Größen (in Basenpaaren, bp): 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018 und 506. Oberhalb der 6108 bp Bande laufen noch Banden mit 7126 bp, 8144 bp, 9162 bp, 10180 bp, 11198 bp und 12216 bp Größe.
- Elektrophoresepuffer (TAE, 100-fach konzentriert)

Tris	4 M
EDTA	0,1 M
Natriumacetat	1 M

pH 8,0 mit Eisessig einstellen

Gebrauchslösung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 1:100 verdünnen

- Agarose (Low Standard, Biorad)
- Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; Gebrauchslösung zum Färben: 20 µl Ethidiumbromidstammlösung in 300 ml Leitungswasser

### Durchführung:

- 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer aufschmelzen
- Flüssige Agarose vorsichtig, zur Vermeidung von Luftblasen, in eine vorher abgedichtete Agarosegelwanne (Gibco/BRL Apparatur, Typ H3, 11 x 14 cm, 100 ml Gelvolumen) gießen
- Kamm für die Geltaschen luftblasenfrei in die noch flüssige Agarose stecken und in die Ausparungen der Gelwanne hängen
- Gel erhärten lassen

- Zugabe von 10 µl Auftragspuffer zum gesamten PCR-Amplifikat (100 µl), mischen
- Abtrennung des PCR-Mineralöls:
  - Amplifikat vorsichtig mit der Pipettenspitze unter dem Öl herausheben
  - Auf einen sterilen Parafilm™ (Greenwich) pipettieren
  - Tropfen solange hin- und herrollen, bis keine Ölspuren mehr sichtbar sind
  - Aufnehmen des Tropfens und Überführung in ein neues ERG
- Gereinigtes Amplifikat in die Geltaschen einpipettieren: ein Aliquot von 20 µl für eine rein qualitative Überprüfung, den gesamten Ansatz von 100 µl für eine quantitative, präparative Rückgewinnung des Amplifikats
- Der Gellauf erfolgt für 1,5 h bei 120 mA.
- Färbung des Gels für 15 - 30 min in der Ethidiumbromid-Gebrauchslösung
- Entfärbung in Leitungswasser für 5 - 10 min

Die Dokumentation des Gels unter UV-Durchstrahlung (302 nm, Bachofer Transilluminator) erfolgt mit dem Cybertech CS-1-Video-Dokumentationssystem. Gleichzeitig wird mit dem dazugehörigen „Image Capture Computer“ ICC/4 das Bild auf Diskette abgespeichert.

### **B.8.7 Reinigung der PCR-Amplifikate**

Um möglichst nur die gewünschten, von der Größe korrekten, Amplifikate zu erhalten, wurden unter UV-Durchstrahlung aus dem Agarosegel (s. B.8.6) nur diejenigen Banden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, die sich im Vergleich mit den mitgelaufenen Lambda-*Hind*III- bzw. 1-kb-ladder-Standardbanden, bei ca. 1500 bp befanden. Die Überführung in ein steriles 1,5 ml ERG erfolgte mit einem sterilen Zahnstocher. Zur Reinigung und Aufkonzentrierung wurde das DNA-Reinigungs-Kit QIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN) verwendet. Die Reinigung und Konzentrierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Reinigungseffizienz überprüft, indem 1/10 (v/v) des Gesamtamplifikats mit 4 µl Auftragspuffer und H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht und der qualitativen Analyse mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe B.8.6) unterzogen wurde.



## **B.9 Transfer von DNA auf Nylonmembranen mittels Dot-Blot-Verfahren**

### **Durchführung**

- mindestens 6 ng DNA in 200 µl 0,4 N NaOH für 20 min denaturieren
- 2 Lagen dickes Whatman-Papier (Whatman, England) befeuchten und auf die geöffnete Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel) legen
- Ungeladene Nylonmembran (porablot, Macherey-Nagel, Düren) mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> benetzen und auf das nasse Papier legen
- Apparatur zusammenbauen und an eine Vakuumpumpe anschließen (Modell siehe B.6.4)
- Vakuum anlegen und Proben auftragen
- 20 min durchsaugen
- Membran der Apparatur entnehmen und bei RT trocknen
- Trockene Membran wird durch 2-4 minütige UV-Bestrahlung (254 nm) fixiert. Dabei werden die Nukleinsäuren über Thyminreste kovalent an die Membran gebunden.
- UV-Quelle: 2 x 15 W UV-C Röhren (GT15T8, Duke). Abstand der Membran zu UV-Lampe: 20 cm

## **B.10 Membranhybridisierung mit POD-markierten Oligonukleotidsonden**

### **B.10.1 Hybridisierung**

#### **Materialien**

- Hybridisierungsröhren aus Glas (Bachofer)
- 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) - Lösung
- 10% (w/v) N-Laurylsarkosin - Lösung (Sigma)
- 5 M NaCl - Lösung
- 20 x Standard-Saline-Citrat (SSC) Puffer (siehe B.9)
- 10% (w/v) Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim) in Puffer 1 gelöst, autoklaviert
- Sondenarbeitslösung (50 ng µl<sup>-1</sup>)

- Puffer 1:

NaCl	0,15 M
Maleinsäure	0,10 M
pH 7,5 mit fester NaOH eingestellt	
autoklaviert	

- Prähybridisierungslösung (ausreichend für eine Hybridisierungsröhre)

20 x SSC	5,6 ml
Blockingreagenz	4,5 ml
N-Lauryl-Sarkosin	225 µl
10% SDS	45 µl

- Hybridisierungslösung

Formamid	x µl
5 M NaCl	360 µl
Tris/HCl pH 7,0	40 µl
10% Blocking Reagenz	400 µl
10% SDS	2 µl
Sondenarbeitslösung	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 2 ml

Die Konzentration von Formamid im Hybridisierungspuffer wurde, je nach benötigter Stringenz, variiert. Da bei 35°C hybridisiert wurde, mußte grundsätzlich 20% mehr Formamid zugegeben werden. Bei Formamidkonzentrationen > 60% mußte entsprechend weniger Blocking Reagenz zugegeben werden.

- Waschlösung

5 M NaCl	x µl
1 M Tris/HCl pH 7,0	1000 µl
10% SDS	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 50 ml

Die Waschlösung enthielt im Gegensatz zur Einzelzellhybridisierung kein EDTA, um den nachfolgenden enzymatischen Schritt nicht negativ zu beeinflussen. In der Waschlösung wurde die entsprechende Stringenz durch Variation der Konzentration der Natriumionen eingestellt und da der Waschschrift bei 35°C durchgeführt wurde, mußte die NaCl-Konzentration entsprechend geringer sein als bei 48°C (siehe B.6.3.)

### **Durchführung**

Die Hybridisierung erfolgte in Glasröhren in einem Hybridisierungssofen (Bachofer).

- Membran in die Glasröhre legen, ohne daß die Enden überlappen
- Mit 10 ml Prähybridisierungslösung für mindestens 1 h bei 35°C inkubieren
- Lösung abgießen
- 100 ng einer POD-markierten Oligonukleotidsonde in 2 ml Hybridisierungspuffer pipettieren und in die Glasröhre gießen
- Hybridisierung für mindestens 30 min bei 35°C
- Zweimaliges Waschen mit auf 35°C vorgewärmtem Waschpuffer für 10 min

### **B.10.2 Detektion der POD-markierten Oligonukleotide**

#### **Materialien**

- 1 x PBS
- POD-Substrat : ECL-Substratkit (Amersham, Braunschweig)
- Whatman-Filterpapier 3mm (Whatman)
- Röntgenfilm (X-Ray 90, Agfa Gevaert, München)

#### **Durchführung**

- Membran kurz in 1 x PBS schwenken
- Auf eine mit Whatman-Papier bedeckte Glasplatte legen
- 6 ml des ECL-Substrates gleichmäßig auf die Membran verteilen
- Luftblasenfrem in Frischhaltefolie einschlagen und eine zweite Glasplatte auflegen
- Röntgenfilm zwischen die Glasplatten legen
- Exposition für 30-45 min bei RT im Dunkeln
- Film entwickeln, fixieren, wässern und trocknen

### **B.10.3 Rehybridisierung der Membran**

Eine Rehybridisierung der Membran ist nur im noch feuchten Zustand möglich.

#### **Materialien**

- Rehybridisierungslösung: 0,5% SDS; 0,1 x SSC

### **Durchführung**

- Membran nach Exposition kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> spülen
- In einem verschließbaren Kunststoffgefäß für 20 min in 100 ml Rehybridisierungslösung bei 80°C inkubieren
- Kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> schwenken

Die Membran wird entweder neu prähybridisiert oder zwischen zwei Filterpapieren luftgetrocknet.

## **B.11 DNA-Schnellisolierung**

(nach Wisotzkey *et al.*, 1990, modifiziert)

### **Lösungen**

- Saline-EDTA-Lösung: 0,15 M NaCl; 0,1 M EDTA
- 10 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym (Biomol) in Lysozypuffer (vgl. B.6.6)
- 20 mg ml<sup>-1</sup> Proteinase K in TE-Puffer (vgl. B.6.6)
- 25% SDS-Lösung
- 5 M Na-Acetat-Lösung, pH 5,5
- 3 M Na-Acetat-Lösung, pH 7,0
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung 25:24:1 (Roti<sup>®</sup>-Phenol-Chloroform, Roth)

### **Durchführung**

- 4 ml Zellen ernten (OD<sub>600</sub>= 0,8 - 1,0)
- Zugabe von 500 µl Saline EDTA, 20 µl Lysozym und 2 µl Proteinase K
- 45 min bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 40 µl 25% SDS-Lösung
- Inkubation bei 60°C für 10 min
- Zugabe von 180 µl 5 M Na-Acetat und 745 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
- 2 min zentrifugieren (5.000 x g) bei 4°C (Hettich)
- Obere Phase mit DNA vorsichtig abheben
- Zugabe von 2 Teilen absoluten Ethanol
- Mindestens 10 min bei -20°C fällen
- 5 min abzentrifugieren bei 4°C
- Überstand abkippen
- Pellet in 70% Ethanol waschen
- Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
- 2 min zentrifugieren bei 4°C

- Obere Phase abheben
- Fällung mit 1/9 Volumenteil 3 M Na-Acetat und 2 Volumenteilen Ethanol
- 5 min abzentrifugieren
- Pellet waschen mit 70% Ethanol
- Trocknen des Pellets im Speed Vac-Vacuum Concentrator (Bachofer)
- Aufnehmen in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

## **B.12 Klonierung**

### **B.12.1 T-Vektor-Ligation**

Die T-Vektor-Klonierung macht sich die Eigenheit der *Taq*-Polymerase zunutze, bei der PCR an die 3'-Enden des DNA-Stranges „template“-unabhängig ein Desoxyadenosin anzuhängen. Dadurch besitzen PCR-Amplifikate, welche mit der *Taq*-Polymerase erzeugt werden, ein überhängendes 3'-Ende. Der T-Vektor besitzt an den freien 3'-Enden ein Thymidinrest, was (1) eine spontane Religation verhindert und (2) die Ligation mit einem *Taq*-Polymerase replizierten PCR-Amplifikat fördert. Das PCR-Amplifikat, welches beidseitig an den 3'-Enden ein Desoxyadenosin besitzt, ligiert spezifisch mit dem Vektor.

Ligation und Transformation wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **Materialien**

- T-Vektor Klonierungskit (Promega, Serva) enthält: pGEM-T-Vektor; pGEM-T-Vektor Kontrolle (468 bp langes Fragment); T4 DNA-Ligase (1 U µl<sup>-1</sup>); T4 DNA-Ligase 10 x Puffer; Lagerung bei -20°C gelagert
- PCR-Produkt

Um eine effiziente Ligation zu gewährleisten, wurde das PCR-Produkt innerhalb von 2 Wochen verarbeitet, da sonst Gefahr besteht, daß der am Amplifikat überstehende Adeninrest abgespalten wird.

#### **Abschätzen der Insert-Konzentration**

Für eine effiziente Ligation sollten Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen. Schwankungen im Verhältnis von 1:8 bis 8:1 sollten sich - nach Angaben des Herstellers -

nicht allzusehr auswirken. 2 µl des gereinigten PCR-Produkts wurden mit 4 µl Auftragspuffer und 12 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> vermischt und zusammen mit 1 µl Vektor DNA (vermischt mit 4 µl Auftragspuffer und 13 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) nebeneinander auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Nach Durchführung einer qualitativen horizontalen Agarosegelelektrophorese (siehe B.8.6.) konnte das Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor DNA grob abgeschätzt werden.

### **Durchführung**

- pGEM-T-Vektor DNA bei 5.000 x g 30 s abzentrifugieren
- Reaktionsansatz in ein 0,5 ml ERG pipettieren

T4 DNA-Ligase 10 x Puffer	1 µl
pGEM-T Vektor	1 µl
PCR-Produkt	x µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 10 µl

- Kontrollansatz: das im Kit mitgelieferte 468 bp lange DNA-Stück statt des PCR-Produkts einsetzen
- 3 h bei 15°C inkubieren
- 10 min bei 71°C im PCR-Thermoblock (Hybaid-Omingene, MWG-Biotech)
- auf RT abkühlen
- nicht benötigtes Ligationsprodukt wird bei 4°C gelagert
- 3 µl des Ligationsproduktes wird zur Kontrolle der Ligationseffizienz einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe B.8.6) unterzogen

## **B.12.2 Elektroporation**

### **Materialien**

- 10% (v/v) Glycerin-Lösung, steril
- SOC-Medium (pH7,0):

Caseinpepton	2%
Hefeextrakt	0,5%
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
Glucose	20 mM

- *Escherichia coli*, Stamm DH5 $\alpha$  (Genotyp: *supE44*,  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80, *LacZ*,  $\Delta$ *M15*), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*)
- LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten: Trypton 10 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 5 g, H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ad 1l, pH = 7,2; nach dem Autoklavieren abkühlen lassen, bei einer Temperatur unter 50°C eine sterilfiltrierte Ampicillinlösung zugeben, Endkonzentration 200 mg l<sup>-1</sup>
- X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside): in DMSO gelöst, Konzentration: 20 mg ml<sup>-1</sup>
- IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid): in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst; Konzentration: 200 mg ml<sup>-1</sup>

### **Herstellung von kompetenten Zellen**

Vorbereitung der Zellen:

- Animpfen von 500 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer Übernachtskultur *E. coli* DH5 $\alpha$
- Wachstum bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,7 unter starkem Schütteln

Alle weiteren Schritte werden auf Eis ausgeführt:

- Zellen 10-15 min auf Eis stehen lassen
- Ernte der Zellen (A6.9 Kontron/Centrikon T-124, 5000 x g, 20 min, 4°C)
- Suspension des Pellets in der verbliebenen Flüssigkeit
- Waschen mit 500 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, gut mischen
- Zentrifugation (A6.9 Kontron/Centrikon T-124, 5000 x g, 20 min, 4°C)
- Suspension des Pellets in der verbliebenen Flüssigkeit
- Zugabe von 40 ml sterilem 10% Glycerinlösung, gut mischen
- Zentrifugation (A6.9 Kontron/Centrikon T-124, 4500 x g, 10 min, 4°C)
- Volumen des Pellets schätzen, Zugabe von 1 Volumen steriler 10% Glycerinlösung
- Zellen suspendieren und aliquotieren (60  $\mu$ l)
- Lagerung bei -70°C

### **DNA-Fällung**

Die DNA aus dem Ligationsansatz wird gefällt, um Salze abzutrennen, da es sonst zum Kurzschluß bei der Elektroporation kommt

- Zugabe von 1/10 Volumen 5 M NaCl-Lösung und 2-3 Volumen Ethanol absolut, unvergällt
- Bei -20°C für 1-2 h fällen
- Abzentrifugieren 30 s bei 5.000 x g und Überstand abkippen
- Pellet in 70% unvergälltem Ethanol waschen
- Pellet trocknen in der Speed Vac (Bachofer)
- DNA in 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufnehmen

### **Elektroporation**

- DNA mit 50 µl kompetente Zellen in einer gekühlten Elektroporationsküvette (BIO-RAD, 2 mm Elektrodenabstand) auf Eis mischen (höhere Temperaturen erniedrigen die Transformationseffizienz)
- Elektroporation (BIO-RAD Gene-Pulser, Capacitance Extender und Pulse Controller): Entladung von 2500 V bei einer Kapazität von 25 µF und 200 Ω für  $3-5 \times 10^{-3}$  s
- sofortige Zugabe von SOC-Medium

### **Blau-Weiß Screening der Klone**

- 1 h bei 37°C stark schütteln
- 4 LB<sub>Amp</sub>-Platten mit je 40 µl X-Gal- und 4 µl IPTG-Lösung bestreichen, 30 min einziehen lassen
- Ausplattieren von 1 x 50 µl, 1 x 100 µl, 2 x 200 µl und 1x 300 µl Zellsuspension auf die vorbereiteten Platten
- Bei 37°C über Nacht inkubieren
- Für mindestens 24 h in 4°C stellen für die bessere Ausprägung der blauen Farbe
- Weiße Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher abnehmen, auf eine neue Platte übertragen und über Nacht bei 37°C inkubieren
- Die Lagerung der Klonplatten erfolgt bei 4°C.

## **B.13 Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse**

### **B.13.1 Koch-STET-Schnelltest**

#### **Lösungen**

- STET-Puffer

40% Saccharoselösung, sterilfiltriert	80 ml
Triton X-100	20 ml
0,5 M EDTA	40 ml
Tris/HCl pH 8.0	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 400 ml



- Lysozymlösung (Biomol) 10 mg ml<sup>-1</sup>

### **Durchführung**

- Übernachtkultur mit einer Spatelspitze von der Agarplatte abnehmen
- In 300 µl STET-Puffer suspendieren
- Zugabe von 10 µl Lysozymlösung, kurz mischen, für 2-3 min stehenlassen
- 45 - 60 sec. im kochenden Wasserbad inkubieren
- Sofort 5 min auf Eis
- Abzentrifugieren (5000 x g, 15 min, Eppendorf 5415)
- Zellpellet verwerfen mit sterilem Zahnstocher
- Fällung der Plasmid - DNA mit 300 µl Isopropanol, vorsichtig mischen, 15 min inkubieren
- Zentrifugation (5.000 x g, 15 min)
- Waschen des Nukleinsäurepellets mit 500 µl 70% Ethanol, abzentrifugieren und trocknen des Niederschlags in der Speed Vac
- Aufnehmen in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
- Lagerung bei -20°C

### **B.13.2 Restriktionsanalyse**

Zur Überprüfung, ob ein Plasmid ein Insert enthält, wird eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Ein Plasmid mit Insert läuft dabei langsamer als ein Plasmid ohne Insert. Zur Größenbestimmung des Inserts kann eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden.

### **Materialien**

- NotI-Restriktionsenzym (Boehringer)
- NotI-Puffer (Boehringer)

### **Durchführung**

- Reaktionsansatz:

Plasmid-DNA	2 µl
NotI-Puffer	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	16 µl
NotI-Enzym	2 Units

- Reaktionsansatz in ein steriles ERG pipettieren
- ÜN bei 37°C inkubieren

- 4 µl Auftragspuffer zugeben
- Der Gesamtansatz wird einer horizontalen Agarosegelelektrophorese unterworfen (siehe B.8.6).

Der verwendete T-Vektor besitzt nur eine *NotI*-Schnittstelle. Dadurch wird das Plasmid nur linearisiert und kann im Vergleich mit einem DNA-Standard besser auf seine Größe abgeschätzt werden.

### ***B.14 Nicht radioaktive Sequenzierung von 16S-rDNA Fragmenten in einem automatischen Sequenzer***

Die 16S-rDNA von *E. coli* K12 DSM 30083<sup>T</sup> wurde von frisch geernteten Zellen mittels PCR amplifiziert (siehe B.8), aufgereinigt (siehe B.8.7) und fast vollständig sequenziert (*E. coli* – Positionen 8 – 1542, (Brosius *et al.*, 1981)). Damit sollte sichergestellt werden, daß die entwickelten Sonden vollständig ihren Zielregionen komplementär sind. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des ARB-Programmpakets (Strunk *et al.*, in Vorbereitung).

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Bindungsposition<sup>1</sup></b>	<b>Dissoziations- temperatur T<sub>d</sub><sup>2</sup></b>
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	8-27	56
GM1 F	CCAGCAGCCGCGGTAAT	518-534	60
GM12 R	CGTCATCCRCACCTTCCTC	1193-1175	58-60
GM6 R	CTGCTGCCTCCCCTAGG	358-342	58
1114 F	GCAACGAGCGCAACCC	1098-1113	54
GM8 R	TGGGTATCTAATCCT	798-784	42
630R	CAKAAAGGAGGTGATCC	1529-1546	50

*Tabelle B.8: Für die Sequenzierung der 16S-rRNA verwendete Primer; M: A/C, Y: C/T, K: G/T, R: A/G; <sup>1</sup>rRNA Position von E. coli (Brosius *et al.*, 1981); <sup>2</sup>Dissoziations-temperatur berechnet nach  $T_d = 4(G+C) + 2(A+T)$ , (Suggs *et al.*, 1981).*

Sämtliche Sequenzierungsarbeiten wurden am UFT Bremen von der Arbeitsgruppe Prof. Blohm durchgeführt. PCR-Amplifikate wurden nichtradioaktiv mit dem ABI PRISM<sup>TM</sup> Dye

Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer GmbH, Langen, FRG) mit der *AmpliTaq* DNA Polymerase sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion wird hierbei mit den vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) in einem Ansatz durchgeführt. Somit werden in einer Reaktion einfach markierte Sequenzierprodukte unterschiedlicher Länge und, je nach Abbruchnukleotid, unterschiedlicher Markierung erzeugt. Eingesetzt wurden etwa 100 ng des gereinigten Amplifikats. Pro Reaktion wurden 10 pmol Sequenzierprimer zugegeben. Die Sequenzierung wurde nach Angabe der Hersteller bei einer Primerbindungstemperatur von 50°C durchgeführt.

Die Auftrennung (4,5%iges Polyacrylamidgel) und Detektion der Sequenzierungsprodukte erfolgte mit einem automatischen Sequenziergerät (Modell 377; Applied Biosystems, Weiterstadt).

## C. Ergebnisse

### ***C.1 Durchflußzytometrische Sortierung von Mikroorganismen für nachfolgende molekularbiologische Analysen***

Für die Lösung vieler ökologischer Fragestellungen ist die Identifizierung bestimmter Bakterienpopulationen notwendig. Besonders bei sehr geringer Abundanz einer Population ist es oft schwierig, sie mit klassischen wie auch molekularbiologischen Techniken näher zu charakterisieren. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit der Möglichkeit, durch Sortieren im Durchflußzytometer eine Anreicherung der gewünschten Zellen zu erreichen. Dabei wurde besonders die Reinheit der sortierten Zelle verfolgt.

#### **C.1.1 Sortierung von Bakterien aus Belebtschlamm nach Hybridisierung mit fluoresceinmarkierten Oligonukleotidsonden**

Belebtschlammproben wurden mit zwei verschiedenen fluoresceinmarkierten, rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden hybridisiert. Sondenpositive Zellen wurden direkt auf Objektträger sortiert, um den Erfolg und die Reinheit der Sortierung anhand ihrer sondenvermittelten Färbung und Morphologie zu überprüfen (Tabelle C.1). Mit der *Acinetobacter*-spezifischen Sonde ACA23a zeigten sich vier distinkte Populationen im Dot-Plot-Diagramm (Abbildung C.1A und B).

Wie die mikroskopische Kontrolle ergab, waren die sortierten Zellen aus den Sortierfenstern (Gates) 1, 2 und 3 meist einzelne Kokken (Abbildung C.1B), während Gate 4 (Abbildung C.1B) von kettenförmigen Kurzstäbchen dominiert war (Abbildung C.2).

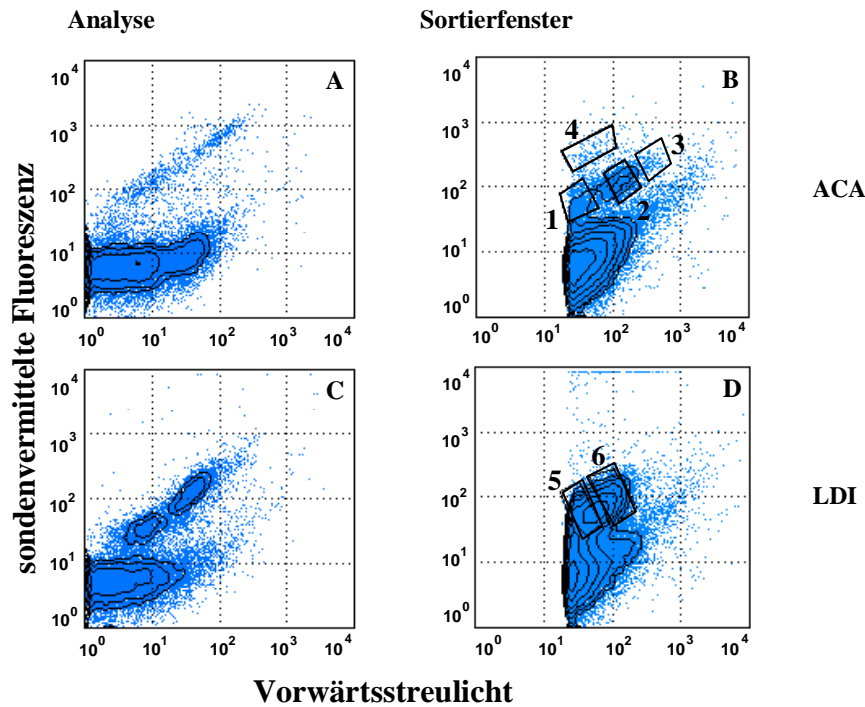


Abbildung C.1. Analyse und Sortierung von Belebtschlammproben nach Hybridisierung mit spezifischen Sonden im Durchflußzytometer. Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle. Die Häufigkeit eines Meßereignisses kann von der Dichte der Punkte und den Konturlinien abgeleitet werden (3, 6, 12, 24, 48, 96% der maximalen Häufigkeit von außen nach innen). Obere Reihe: Hybridisierung mit ACA23a; untere Reihe: Hybridisierung mit LDI23a. A und C zeigen hybridisierten Belebtschlamm im Analysemodus; man beachte die deutlich vom Hintergrund abgesetzten Populationen; B und D zeigen die Sortierfenster. Da im Sortiermodus höherer Hintergrund auftritt, mußte der Schwellenwert im Vorwärtsstreulicht erhöht werden;

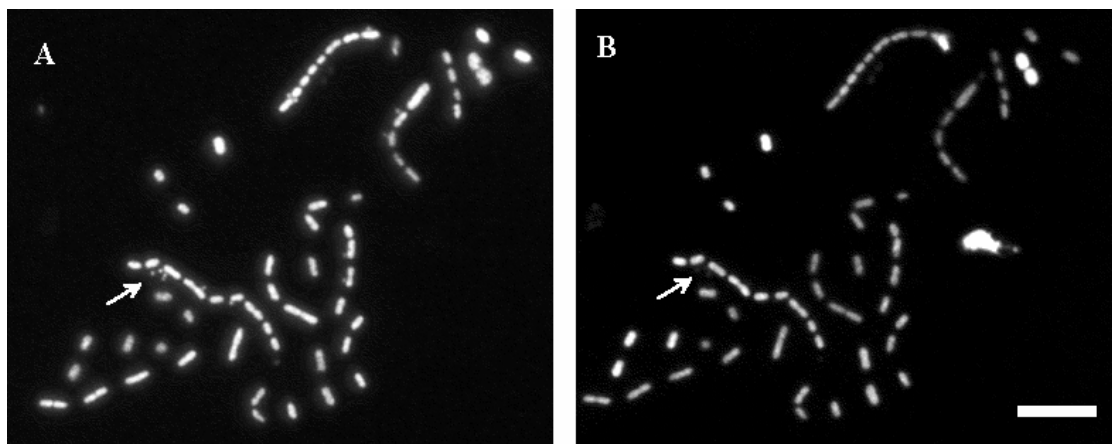


Abbildung C.2. Zellen sortiert mit Gate 4 (Abbildung C.1) nach Hybridisierung mit der *Acinetobacter* sp. spezifischen Sonde ACA23a; links: DAPI-Fluoreszenz; rechts: Sondenfluoreszenz; Pfeile deuten auf Aufwuchsbakterien, die zwar mit DAPI detektierbar sind (links), nicht aber mit der Sonde ACA23a hybridisierten (rechts); Maßstab 10 µm;

Fast alle sortierten Zellen wiesen hohe Hybridisierungssignale mit der Sonde ACA23a auf (Abbildung C.1A). Die durchflußzytometrische Analyse von Belebtschlamm nach Hybridisierung mit der *Leptothrix*-spezifische Sonde LDI23a zeigte zwei gut voneinander abgesetzte Populationen (Abbildung C.1C), die kleinen bzw. großen Stäbchen entsprachen und mit Gate 5 bzw. 6 sortiert wurden (Abbildung C.1D). Verglichen mit der hohen Diversität der Originalprobe, in der nur ein Bruchteil aller DAPI-gefärbten Zellen mit der Sonde LDI23a hybridisierten (Abbildung C.3A und B), sind die sortierten großen Stäbchen aus Gate 6 mit Durchmessern von ca. 1 µm und Zelllängen von 2,5 – 4 µm morphologisch sehr homogen (Abbildung C.3C und D). Untersucht man die sortierten Populationen im Mikroskop auf DAPI- und Fluorescein-Fluoreszenz fällt jedoch auf, daß im selben mikroskopischen Feld immer noch Zellen ohne Hybridisierungssignal vorhanden sind.

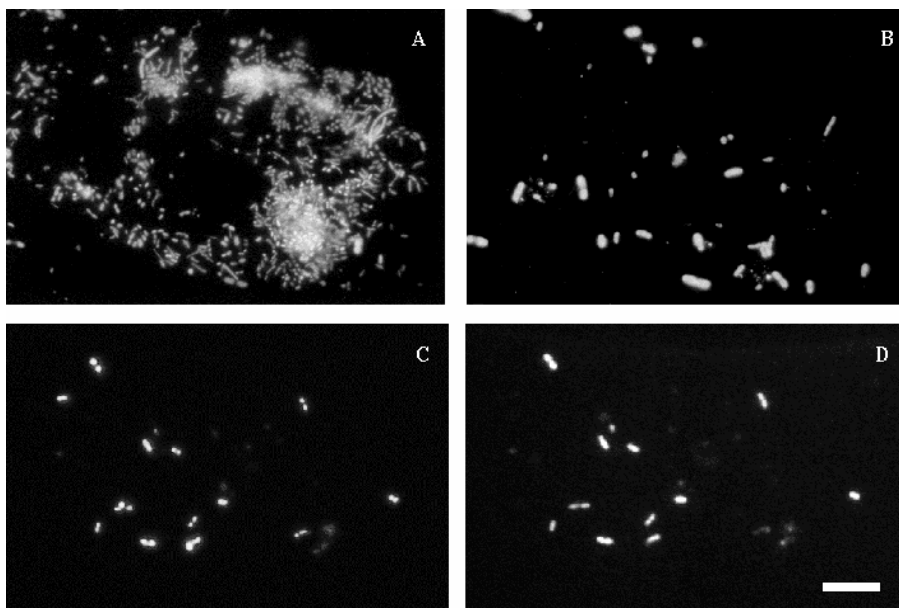


Abbildung C.3. Belebtschlamm, hybridisiert mit LDI23a, spezifisch für *Leptothrix* sp.; es ist jeweils das gleiche mikroskopische Feld gezeigt; A, C: DAPI-Fluoreszenz; B, D: sondenvermittelte Fluoreszenz; die obere Reihe zeigt die Originalprobe, die untere Reihe die durchflußzytometrisch sortierte Zellpopulation; vergleicht man die DAPI-Fluoreszenz mit der sondenvermittelten Fluoreszenz, so sind in der Originalprobe neben LDI23a-positiven (B) noch viele andere Zelltypen erkennbar (A), in der sortierten Zellpopulation zeigen fast alle DAPI-positiven (C) auch Sondenfluoreszenz (D); Maßstab ca. 10 µm;

Die Häufigkeit der LDI23a-positiven Zellen konnte um den Faktor 5 – 6 von ca. 12% in der Originalprobe auf 82% (Gate 5) bzw. 69% (Gate 6) in der sortierten Fraktion erhöht werden.

Für ACA23a betrug der Anreicherungsfaktor 90 – 280-fach von weniger als 1% in der Originalprobe auf 35% (Gate 4) bis 84% (Gate 3) (Tabelle C.1). Die Reinheit der Zellen in Gate 4 ist relativ gering, da zum einen die Ketten von Kurzstäbchen mit sehr kleinen Stäbchen bewachsen waren, die nicht mit ACA23a hybridisierten, zum anderen in dieser Sortierung auch kleine Flocken endeten, die neben anderen Bakterien ACA23a-positive Zellen enthielten.

Sonde	Sortierfenster <sup>a</sup>	Sondenpositive / DAPI-gefärbte Zellen		Anreicherungsfaktor	Morphologie
		Vor Sortierung <sup>b</sup> [%]	Nach Sortierung <sup>c</sup> [%]		
ACA23a	1	0.6	53	88	Kokken, 1.5 - 2.5 µm
ACA23a	2	0.4	66	165	Kokken, 2.5 - 3.5 µm
ACA23a	3	0.3	84	280	Kokken, 3.5 - 4.5 µm
ACA23a	4	0.3	35	117	kettenförmige Kurzstäbchen
LDI23a	5	12	82	7	Kurzstäbchen, oft in Paaren, 3 x 1 µm
LDI23a	6	13	69	5	Kurzstäbchen, oft in Paaren, 5 x 1 µm

*Tabelle C.1: Reinheit und Anreicherungsfaktoren der verschiedenen, sondenpositiven Zellen, sortiert aus Belebtschlamm nach in situ-Hybridisierung; <sup>a</sup> Sortierfenster (Gate), vgl. Abbildung C.1; <sup>b</sup> berechnet nach durchflußzytometrischer Analyse; <sup>c</sup> berechnet nach mikroskopischer Zählung von sortierten Zellen auf Objektträgern;*

### **C.1.2 Durchflußzytometrische Analyse von sortierten Zellen**

Der Anreicherungseffekt durch Sortierung konnte zusätzlich auch durch eine erneute durchflußzytometrische Analyse demonstriert werden. Für dieses Experiment wurde wiederum Belebtschlamm mit der Sonde ACA23a hybridisiert. Wie zuvor (Abbildung C.1) konnten verschiedene Populationen unterschieden werden. Die Sortierfenster B und A in Abbildung C.4 sind ähnlich Gate 1 bzw. eine Kombination aus Gate 2 und 3 aus Abbildung C.1. Die sortierten Zellfraktionen aus Gate A bzw. B (Abbildung C.4) zeichnen in der Reanalyse die gleichen Regionen nach, in denen die Sortierfenster gelegen haben und zeigen

außerdem hohe Reinheit. Die aufgezeichneten Ereignisse in der ersten x-y Dekade des Dot-Plots stammen hauptsächlich von nicht-zellulärem Hintergrund, z.B. Partikel in der Mantelflüssigkeit und Geräterauschen.

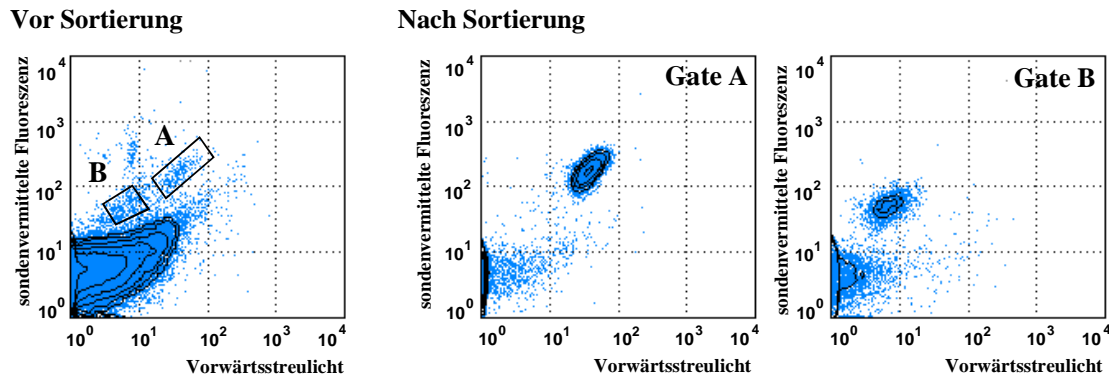


Abbildung C.4. Belebtschlamm, hybridisiert mit ACA23; zwei Populationen wurden zur Sortierung mit Gates ausgewählt (links) und im Durchflußzytometer erneut analysiert; Mitte: Analyse von sortierten Zellen aus Gate A; Rechts: Analyse von Gate B;

### C.1.3 Mehrmaliges Sortieren

Der Effekt eines zweiten Sortierschrittes wurde für sortierte ACA23a-positive Zellen aus Gate 2 (Abbildung C.1) bestimmt. Die Reinheit konnte bei drei Versuchen jeweils deutlich verbessert werden. Ausgehend von 76, 54 bzw. 66% wurde die Reinheit durch ein nochmaliges Sortieren mit demselben Gate 2 auf 91, 76 bzw. 88% erhöht. Nach dem zweiten Sortierschritt konnten mikroskopisch nur noch solche nicht-hybridisierte Zellen detektiert werden, die auf den sondenpositiven Zellen fest anhafteten, jedoch keine einzeln liegenden mehr.

### C.1.4 PCR Amplifikation der 16S-rDNA aus fixierten Zellen

Ethanol- bzw. PFA-fixierte Bakterien aus verschiedenen phylogenetischen Gruppen wurden auf die PCR Amplifizierbarkeit der 16S-rDNA hin untersucht. Mit den Standard-PCR-Primern 616V und 630R konnte aus zehn PFA-fixierten Zellpräparationen von



*Brevundimonas diminuta*, *Paracoccus denitrificans*, *Leptothrix cholodnii*, *Leptothrix discophora*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Cytophaga johnsonii*, *Haliscomenobacter hydrossis* und fünf ethanolfixierten Stämmen gram-positiver Bakterien *Microbacterium imperiale*, *Rhodococcus rhodochromus*, *Nocardia calcaerea*, *Micrococcus kristinae* und *Bacillus subtilis*, spezifisch die 16S-rDNA erhalten werden. Trotz „freeze-thawing“ konnte kein PCR-Produkt von *Sphaerotilus natans*, ein von einer Scheide umgebenes  $\beta$ -Proteobakterium, und von *Thiothrix nivea*, einem Vertreter der  $\gamma$ -Gruppe der *Proteobacteria* erhalten werden. Die Mindestzellzahl für eine reproduzierbare Amplifikation der 16S-rDNA war für *E. coli* ca. 500 und für *B. subtilis* ca. 1.000 Zellen. Die Effizienz der Amplifikation war für Zellen aus der logarithmischen wie stationären Wachstumsphase nicht signifikant verschieden. Für die Amplifikation aus sortierten Zellen genügten fast immer 10.000 Zellen, um ein detektierbares PCR Produkt zu erhalten. Eine vorgeschaltete Hybridisierung mit fluoreszierenden Oligonukleotidsonden hatte offensichtlich nur geringen Einfluß auf die Sensitivität und Spezifität der PCR. Die Länge des Amplifikats war stets identisch mit der Positivkontrolle.

### **C.1.5 Klonierung eines PCR-Produkts aus LDI23a-sortierten Zellen**

Um die Häufigkeit von unerwünschten Sequenzen zu bestimmen, wurde die 16S-rDNA von LDI23a-positiven Zellen amplifiziert, die mit Gate 6 (Abbildung C.1) sortiert worden waren. Das PCR-Produkt wurde in ein T-Vektor System kloniert. 84 Plasmide, die ein komplettes 16S-rDNA Insert besaßen, wurden isoliert und zusammen mit der 16S-rDNA von fünf Referenzstämmen auf Nylonmembran geblottet. Das Screening erfolgte mit den POD-markierten Oligonukleotidsonden EUB338, LDI23a und ACA23a. Die Spezifität der Sonde LDI23a bei den eingestellten Hybridisierungsbedingungen wurde durch eine positive Reaktion mit den Zielorganismen *L. discophora* und *A. metamorphum* und die negative Reaktion mit den Nichtzielarten *S. yanoikuyae*, *C. johnsonii*, und *A. baumannii* bestätigt. Als Negativkontrolle wurde die Sonde ACA23a eingesetzt, die erwartungsgemäß nur mit *A. baumannii* hybridisierte. Die Hybridisierung mit EUB338 zeigte etwa gleiche Mengen an DNA auf jedem der Dots. 71 der 84 untersuchten Klone (85%) hybridisierten mit LDI23a. Dies weist klar auf eine starke Anreicherung des gewünschten Zelltyps hin.

### C.1.6 Sequenzierung

Die 16S-rDNA eines der 71 LDI23a-positiven Klone wurde fast vollständig sequenziert (*E. coli* Position 8-1542, nach (Brosius *et al.*, 1981); European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Accession Nr. AJ001325). Von weiteren vier Klonen wurden vom 5' – Ende her mehr als 700 Nukleotide bestimmt. Diese zeigten >99% Ähnlichkeit mit der Vollsequenz. In allen Sequenzen konnte die LDI23a Signatur gefunden werden. Ein Vergleich der neu erhaltenen Sequenzen mit der mehr als 6000 16S-rRNA Sequenzen umfassenden Datenbank der TU München erbrachte keine Übereinstimmung mit bereits sequenzierten Organismen. Mit einer Distanzmatrix-Analyse konnten hohe Ähnlichkeiten (>98%) zu den 16S-rDNA Klonsequenzen T25, T19 und T41 errechnet werden. Dabei handelt es sich um Mitglieder einer neuen Gruppe von Organismen innerhalb der  $\beta$ 1-Untergruppe der *Proteobacteria*, dem sogenannten Cluster I, die im Belebtschlamm in hoher Abundanz gefunden wurden (Snaidr *et al.*, 1997).

### C.1.7 Sortierung eines auffällig großen Spirillums aus Belebtschlamm

Basierend auf der in dieser Arbeit entwickelten Methode konnte erstmals ein Bakterium zielgerichtet ohne aufwendige Kultivierung phylogenetisch charakterisiert werden (Snaidr, 1997). Das große Spirillum mit der Form eines Korkenziehers konnte leicht über den gesamten Anreicherungs- und Charakterisierungsprozeß anhand seiner auffälligen Morphologie verfolgt werden. In Belebtschlamm, der 4 Wochen unter mikroaeroben Bedingungen im Dunklen bei 6°C inkubiert worden war, reicherten sich die Spirillen offensichtlich etwas an (Faktor ca. 3-5, Snaidr, persönliche Mitteilung). Da die Sonde CF319a zwar mit dem Spirillum hybridisierte, aber daneben noch viele andere Morphotypen erfaßte wurden, wurde eine spezifischere Sonde konstruiert. Aufgrund der Zugehörigkeit zur *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* – Gruppe und einer gewissen morphologischen Ähnlichkeit zu *Saprospira grandis* wurde eine Oligonukleotidsonde (SGR1425) gegen eine semikonservierte Region der 16S-rRNA von *Saprospira grandis* entwickelt. Die großen, auffälligen Spirillen hybridisierten in der Tat neben anderen, relativ kleinen Bakterien mit der Sonde SGR1425. Im Durchflußzytometer wurden mehrmals 5-10.000 Zellen sortiert (Abbildung C.5). Die mikroskopische Überprüfung zeigte, daß die Häufigkeit der Spirillen

von unter  $10^{-4}$  in der Belebtschlamm-Anreicherung um einen Faktor von ca. 1000 auf 10-30% in der sortierten Fraktion angehoben worden war.

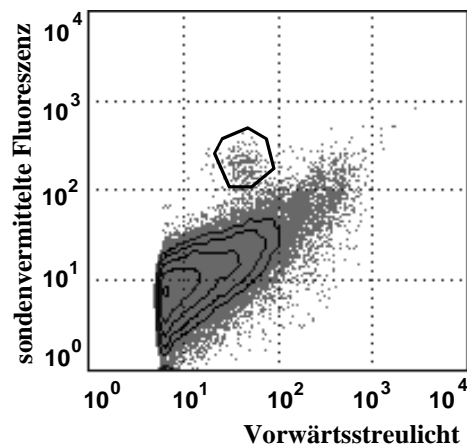


Abbildung C.5. Analyse einer Belebtschlamm-Anreicherung nach Hybridisierung mit der Sonde SGR1425; die deutlich abgesetzte Population wurde mit einem Sortierfenster eingrenzt; mehrere 5-10.000 Zellen wurden für die PCR-Amplifikation der 16S-rDNA sortiert;

Nach Wahl eines geeigneten Primerpaares konnte von den sortierten Zellen die 16S-rDNA amplifiziert, kloniert und schließlich sequenziert werden. *In situ*-Hybridisierungen mit Oligonukleotidsonden gegen die so neu erhaltene 16S-rDNA-Sequenz bewiesen, daß diese tatsächlich aus den großen korkenzieherförmigen Spirillen stammte. Die phylogenetische Analyse der 16S-rDNA-Sequenz zeigte die Zugehörigkeit des Spirillums zu einer neuen, distinkten phylogenetischen Gruppe mit einer Ähnlichkeit von ca. 85% zum nächsten Verwandten *S. grandis*.

## **C.2 Analyse der *in situ*-Zugänglichkeit von *Escherichia coli* 16S-rRNA für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden**

Vorbedingung für eine erfolgreiche *in situ*-Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden ist – neben anderen Faktoren, wie z. B. Ribosomengehalt der Zelle und Durchlässigkeit der Zellwand – die Zugänglichkeit der Sondenbindungsstelle im Ribosom. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde die sondenvermittelte Fluoreszenz von zwei Sätzen fluoresceinmarkierter Oligonukleotidsonden quantifiziert, die um 5-13 Nukleotide überlappend die gesamte 16S-rRNA abdecken. Die Sondenhelligkeit spiegelt direkt die Zugänglichkeit der korrespondierenden Sondenbindungsregion wider.

### **C.2.1 Vorversuche zur Optimierung der Hybridisierungsprozedur**

Der Erfolg der Studie hing wesentlich von der optimalen Hybridisierung und der anschließenden standardisierten Vermessung der Proben ab. Deswegen wurde das Protokoll für *in situ*-Hybridisierung in Suspension von Wallner und Mitarbeitern (Wallner *et al.*, 1993) zwar prinzipiell übernommen, jedoch nochmals in den wichtigsten Schritten überprüft und gegebenenfalls optimiert.

#### **C.2.1.1 Sondenkonzentration**

Eine Hybridisierung mit den Sonden Eco431 und Eco440 bei Endkonzentrationen von 1, 2 und 4 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  ( $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) ergab Fluoreszenzintensitäten, die innerhalb der Fehlergrenzen identisch waren. Bei 8 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  war die Fluoreszenz leicht erhöht, was möglicherweise auf beginnende unspezifische Färbung zurückzuführen ist. Um Sondenmaterial zu sparen und den Einfluß kleiner Konzentrationsunterschiede der Sondenarbeitslösung auszuschließen wurden alle Experimente bei 1,5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  durchgeführt.

#### **C.2.1.2 Zellen**

Für Zellkonzentrationen zwischen  $1 \times 10^6$  und  $8 \times 10^6$  pro  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer konnte kein Effekt der Zahl der eingesetzten Zellen auf die Signalstärke festgestellt werden. Die Zellzahlen wurden deswegen innerhalb diesen Bereichs gehalten. In einem weiteren Vorversuch wurde untersucht, ob sich die *in situ*-Zugänglichkeit von fixierten *E. coli* DSM30083<sup>T</sup>-Zellen der stationären Wachstumsphase von der *in situ*-Zugänglichkeit der logarithmischen Wachstumsphase unterscheiden. Dafür wurden 17 Sonden repräsentativ ausgewählt und die Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Erwartungsgemäß zeigten die stationären Zellen mit allen Sonden eine geringere absolute Fluoreszenz,

höchstwahrscheinlich aufgrund ihres niedrigeren rRNA-Gehalts. Die relative Fluoreszenz zwischen den Sonden hingegen war ähnlich wie bei logarithmischen Zellen. Für alle weiteren Untersuchungen der Zugänglichkeit wurden deswegen ausschließlich Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet.

### ***C.2.1.3 Lagerung***

Da meist eine sehr große Anzahl an Proben pro Tag vermessen wurde (>100), vergingen oft bis zu 5 h vom Abbruch der Hybridisierung bis zur Vermessung der letzten Probe. Die Reanalyse von Proben, die auf Eis gelagert worden waren, zeigte keinen signifikanten Signalverlust während dieser Zeitspanne. Sogar nach 30 h Lagerung waren die Signale für Eco66 und Eco440 stabil, und für Eco55, Eub338 und Eco91 nur um etwa 25% erniedrigt.

## **C.2.2 Einfluß sondenspezifischer Unterschiede in der Dissoziationstemperatur ( $T_d$ ) auf die sondenvermittelte Fluoreszenz**

Die sondenvermittelte Fluoreszenz einer Nukleinsäuresonde ist stark von der Stringenz der Hybridisierung abhängig. Es war daher für diese Studie entscheidend, die Unterschiede der thermischen Stabilität von Sonden zu berücksichtigen. Um von Anfang an maximale und gleichzeitig spezifische Bindung aller Sonden zu garantieren, wurden Sonden mit einer Schmelztemperatur  $T_d$  zwischen 48°C und 60°C entwickelt und bei einer Hybridisierungstemperatur von 46°C eingesetzt. Die hier angewandte 4+2-Regel zur Berechnung der Schmelztemperatur (Suggs *et al.*, 1981) ist jedoch nur eine grobe Abschätzung. Deshalb wurden 9 Sonden bei unterschiedlicher Stringenz hybridisiert und die Signalstärke quantifiziert (siehe Abbildung C.6). Es zeigte sich die typische sigmoide Kurvenform mit einer Übergangzone, die zwischen einer Region mit niedriger Stringenz und hoher Bindungsstärke und einer Region mit hoher Stringenz und niedriger Bindungsstärke liegt. Sieben Sonden zeigten wie erwartet maximale Fluoreszenzsignale bei der Standard-Hybridisierungstemperatur von 46°C. Die Sonden Eco422 ( $T_{d(\text{Suggs})} = 50^\circ\text{C}$ ), Eco431 ( $T_{d(\text{Suggs})} = 54^\circ\text{C}$ ), und Eco449 ( $T_{d(\text{Suggs})} = 52^\circ\text{C}$ ) hatten maximale Sondenfluoreszenz bei 41°C und nur 80% ihrer maximalen Bindung bei 46°C. Trotzdem wurde die Standardtemperatur von 46°C beibehalten und nicht auf 41°C gewechselt, da andere Sonden bei niedrigeren

Hybridisierungstemperaturen niedrigere Fluoreszenzsignale aufwiesen. Eco91 und Eco145 beispielsweise zeigten bei 41°C nur 84% bzw. 90% ihres Signals bei 46°C.

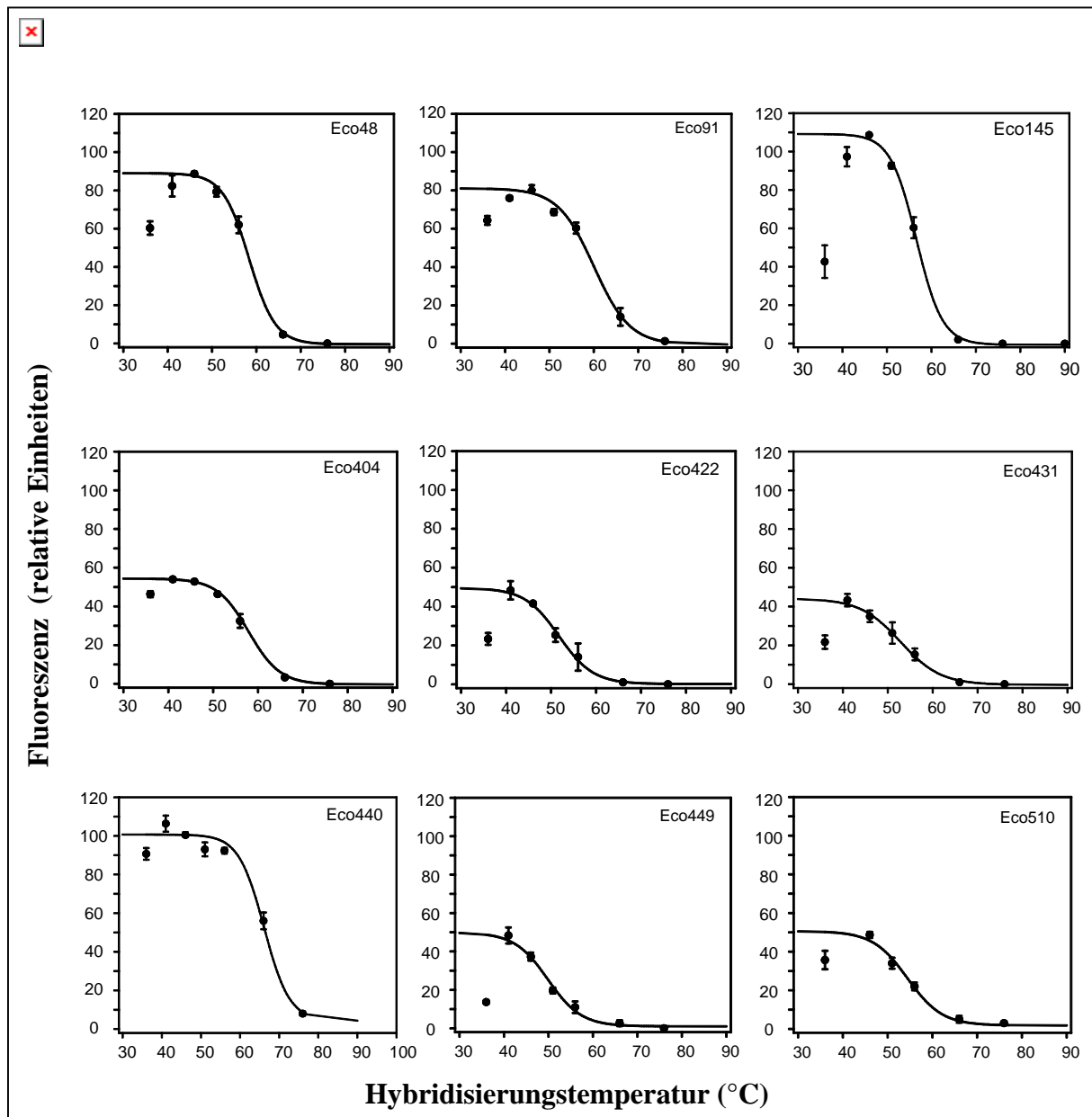


Abbildung C.6. Sondenvermittelte Fluoreszenz für neun ausgewählte Sonden unter verschiedenen Hybridisierungsbedingungen. Alle Hybridisierungen wurden bei 46°C durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur bei 36°C bzw. 41°C wurde durch Erhöhung der NaCl-Konzentration, die bei 51, 56, 66 und 76°C durch Zugabe von Formamid im Hybridisierungspuffer erreicht (vgl.B.6.3).

### C.2.3 Operondiversität

Das Standardset der Oligonukleotidsonden wurde komplementär zur 16S-rDNA Sequenz von *E. coli* Stamm DSM30083<sup>T</sup> entwickelt. Zur Sicherheit wurde die 16S-rDNA des untersuchten *E. coli* Stamms nochmals sequenziert. Wie erwartet wurden keine Unterschiede zur veröffentlichten Sequenz festgestellt (EMBL European Molecular Biology Laboratory, Accession Number X80725, Heidelberg). Ein Vergleich der 16S-rDNA Sequenz von *E. coli* DSM30083<sup>T</sup> mit den veröffentlichten Sequenzen für sieben *E. coli* K12 Operons zeige, daß die drei Operons *rrnH*, *rrnA* und *rrnC* einige Unterschiede in vier Regionen aufwiesen. Insgesamt wurden 20 Sonden neu entwickelt, die komplementär zu diesen Regionen in den verschiedenen Operons waren. Keine der Sonden erzielte eine höhere Fluoreszenzintensität verglichen mit dem Standardset. Auch der kombinierte Einsatz einer Operon-spezifischen mit der korrespondierenden Standardset-Sonde erzielte keine höheren Signale.

### C.2.4 Zugänglichkeit der 16S-rRNA für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden

Alle durchflußzytometrisch bestimmten Fluoreszenzintensitäten der gegen die 16S-rRNA von *E. coli* DSM 30083<sup>T</sup> gerichteten Oligonukleotide sind in Tabelle F.1 aufgelistet. Die hellste Fluoreszenz resultierte aus der Hybridisierung mit Sonde Eco1482, die gegen die Positionen 1482-1499 gerichtet ist. Die Intensität war 1,7-fach heller als die der häufig benutzten Sonde EUB338, und 44-mal heller als Sonden, die im Bereich der Hintergrundfluoreszenz lagen, wie z.B. Eco468. Alle Fluoreszenzintensitäten in Tabelle F.1 sind als Prozentsatz von Eco1482 ausgedrückt. Außerdem wurden alle Sonden aufgrund ihrer Signalstärke willkürlich in 6 Helligkeitsklassen eingeteilt: Klasse I (100-81% der Fluoreszenz von Eco1482), Klasse II (80-61%), Klasse III (60-41%), Klasse IV (40-21%), Klasse V (20-6%) und Klasse VI (5-0%). In Abbildung C.7 ist die Verteilung der Helligkeitsklassen über das 16S-rRNA Sekundärstrukturmodell nach Gutell und Mitarbeitern (Gutell, 1994) aufgezeichnet.

Von allen 171 Sonden fallen nur 7 Sonden, Eco440 (83%), Eco541 (96%), Eco871 (87%) Eco889 (85%), Eco1410 (90%), Eco1482 (100%), und Eco1500 (92%), in die hellste Klasse I und 24 in Klasse II. Die meisten Sonden in diesen zwei Klassen sind gegen fünf Regionen

gerichtet, die offensichtlich eine hohe Zugänglichkeit für Oligonukleotidsonden in *E. coli* besitzen:

1. Positionen 38-108 (5'-Hälften der Helices 4, 5, 6, und 3'-Hälfte der Helix 6) ohne die terminale Schleifen-Region der Helix 6 (siehe C.2.5)
2. Positionen 181 - 215 (Helix 10, 5'-Hälfte der Helix 11)
3. Positionen 316 - 359 (Helix 14, 3'-Hälften der Helices 15 and 5) außer Eco334- und EUB338-Zielregion
4. Positionen 871-933 (3'-Hälften der Helices 27 und 20, Helix 30, 5'-Hälfte der Helix 31)
5. der proximale Teil der Helix 49 einschließlich der 3' Hälfte der Helix 31 und der 5' Hälfte der Helix 50 (Positionen 1383-1427 und 1473-1517)

Neun kleinere gut zugängliche Regionen sind über die ganze Länge der 16S-rRNA verteilt. Ungefähr die Hälfte aller Sonden fallen in die Klassen III (36 Sonden) und IV (49 Sonden). Diese Klassen umfassen Sonden, die ähnlich hell sind wie die häufig benutzte EUB338 (58% von Eco1482). Das Signal-Rausch-Verhältnis selbst der weniger hellen Sonden der Klasse IV liegt immer noch über 8 für *E. coli* Zellen der logarithmischen Phase.

Ein Drittel aller Sonden zeigten nur ein schwaches oder überhaupt kein Signal (Klassen V und VI, 20-0% der Eco1482 Fluoreszenz). Offensichtlich vollständig blockierte Zielsequenzen (Klasse VI) befinden sich am 5'-Ende der 16S-rRNA, an der 3'-Hälfte der Helix 11, der Schleifen-Region und der 3'-Hälfte der Helix 18, fast auf der gesamten Helix 22, den Schleifen-Regionen der Helices 26, 37, 45, 47 und 50, sowie an den Zielregionen der Sonden Eco952, Eco1060, Eco1113, Eco1202, Eco1437 und Eco1464. Regionen, die offensichtlich nur teilweise für Oligonukleotide (Klasse V) zugänglich sind, umfassen die Schleifen-Region der Helix 6 wie auch fast die gesamte Länge der Helices 23, 41, 42, und 48, wie auch die 5'-Hälfte der Helices 27, 28, 36, 38, Teile der Helices 39, 40, 43, 44, die 3'-Hälfte der Helices 12, 21, 27, 35, 46, 47, und 50, und der proximale Stamm der Helix 45.



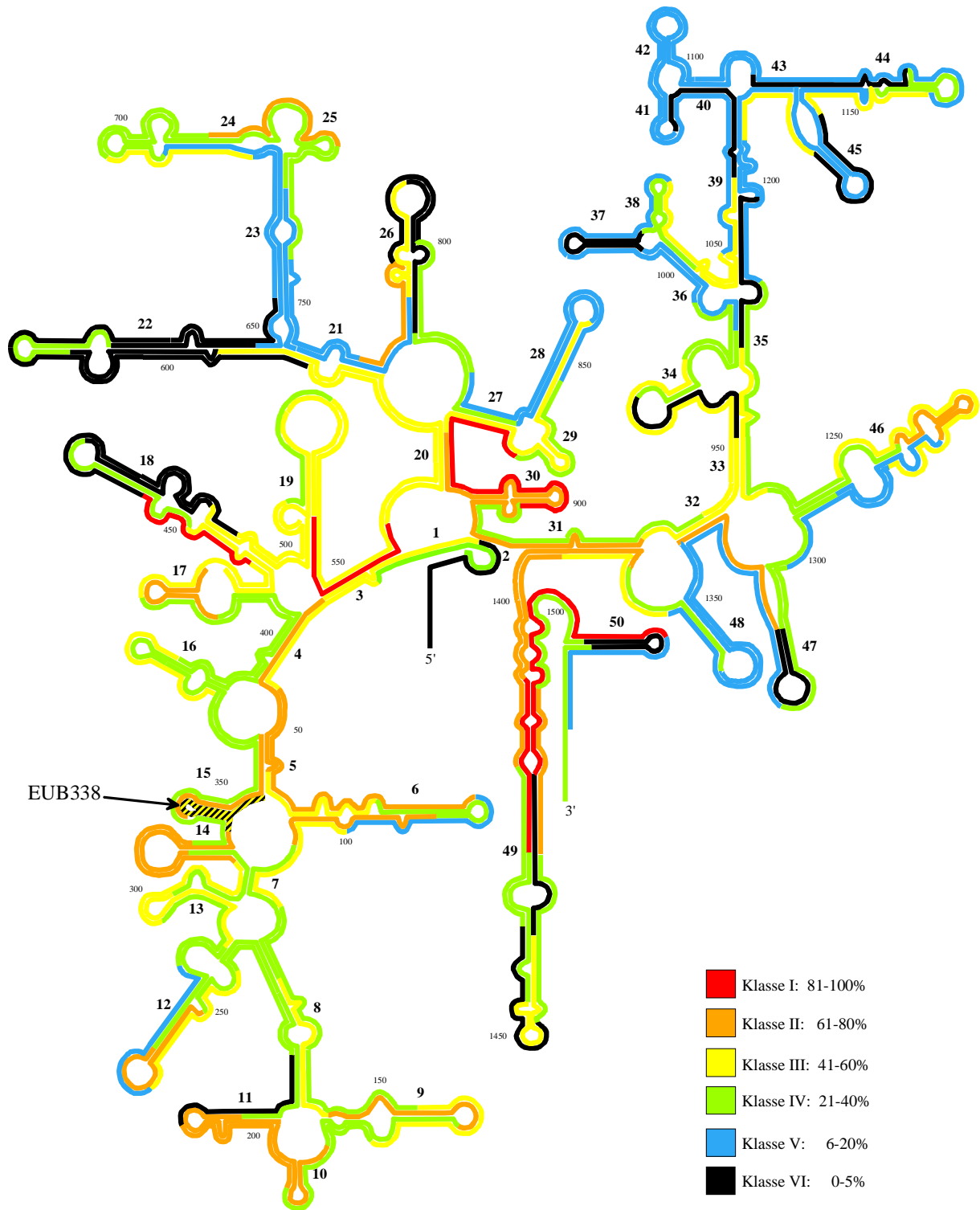


Abbildung C.7. Verteilung der relativen Fluoreszenzintensitäten aller getesteten Oligonukleotidsonden, standardisiert auf die hellste Sonde Eco1482; Sekundärstrukturmodell nach (Gutell, 1994); nur die beiden benachbarten SONDENSÄTZE sind angeführt; die verschiedenen Farben bezeichnen jeweils die verschiedenen Helligkeitsklassen;

## C.2.5 Feinkartierung der *in situ*-Zugänglichkeit der Helices 6 und 18

Die beiden Standardsätze zeigten zwischen benachbarten Sonden dramatische Veränderungen in der Zugänglichkeit der Helices 6 und 18, die zu den wichtigsten Sondenzielregionen gehören, da sie phylogenetisch weniger konserviert sind. Es wurden daher zusätzliche Sonden entwickelt, deren Zielregionen gegeneinander jeweils nur um 2 – 4 Nukleotide verschoben waren. Für Helix 6 (Abbildung C.8) konnte gezeigt werden, daß die Signalstärke von 48% für Eco70 auf 3% für Eco79 zurückging. Ein noch drastischerer Wechsel innerhalb von 4 Nukleotiden ist zwischen Eco87 (10%), Eco89 (41%) und Eco91 (70%) zu beobachten. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die Schleifen-Region der Helix 6 kaum zugänglich ist, verglichen mit der doppelsträngigen Stammregion.

Ähnliche Beobachtungen konnten an Helix 18 gemacht werden (Abbildung C.8). Das Signal fiel von über 80% (Eco440) auf Hintergrundfluoreszenz an Position 455 und stieg dann wieder über 20% für Eco478 bis 60% für Eco484. Wiederum sind die Schleifen-Region und die distale 3'-Hälfte der Helix nicht offen für Oligonukleotidsonden.

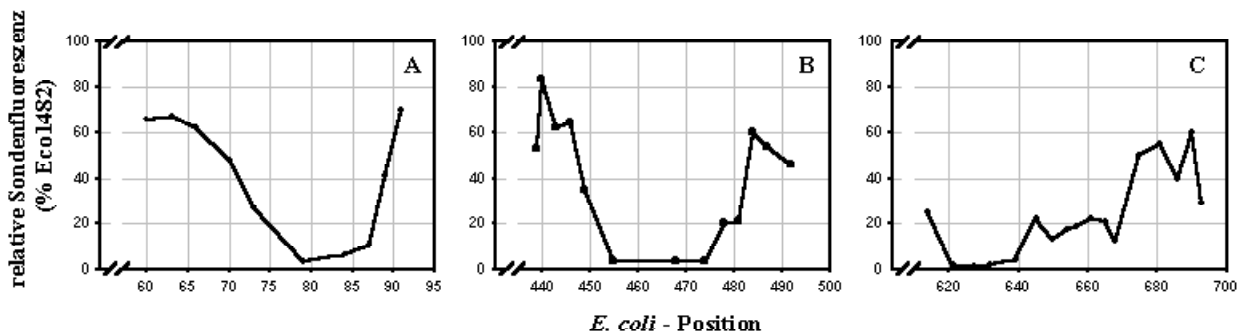


Abbildung C.8. Detaillierte Analyse von drei weniger konservierten Regionen: A, Helix 6; B, Helix 18, und C, 3'-Hälfte der Helix 22 und 5'-Hälfte der Helices 23 und 24; zusätzliche Oligonukleotidsonden wurden entwickelt, um eine höhere Auflösung zu erzielen; Alle Fluoreszenzintensitäten sind auf die hellste Sonde Eco1482 standardisiert;

## C.2.6 Feinkartierung der *in situ*-Zugänglichkeit der Positionen 621-693

Eine der meist benutzten Zielregionen für 16S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden ist die 5'-Hälfte der Helix 23, gegen die in der Vergangenheit zahlreiche helle Sonden auf Gattungsniveau (Amann *et al.*, 1995) entwickelt worden sind. Die Signale, die für *E. coli* für diese Region gemessen wurden, waren dagegen außergewöhnlich niedrig. Zusätzlich zum Standardsondenset wurden daher weitere Sonden gegen die 3'-Hälfte der Helix 22 und die 5'-Hälften der Helices 23 und 24 entwickelt, deren Zielsequenzen um meist 5 Nukleotide gegeneinander verschoben waren. Die Ergebnisse bestätigten weitgehend frühere Einzelbeobachtungen (Abbildung C.8). Die Sonden Eco645 bis Eco668 erzielten relative Intensitäten um 20%. Interessanterweise zeigten Sonden komplementär zur 3'-Hälfte der Helix 22 nur Hintergrundfluoreszenz (1-4%), während Sonden nach Position 675 um 40% oder darüber lagen. Um zu testen, ob die 5'-Hälfte der Helix 23 bei anderen Organismen besser zugänglich ist als bei *E. coli*, wurden die Signalstärken bei drei Referenzorganismen mit bereits früher publizierten Sonden quantifiziert, die mit dieser Region hybridisieren: *A. calcoaceticus* DSM 30006<sup>T</sup> mit ACA23a (652-669) (Wagner *et al.*, 1994), *Z. ramigera* ATCC 25935 mit ZBE23a (646-663) (Rossello-Mora *et al.*, 1995), und *C. testosteroni* DSM 50244<sup>T</sup> mit CTE23a (659-676) (Schleifer *et al.*, 1992). Um potentielle Unterschiede im rRNA-Gehalt und der Permeabilisierung der Zellen zu kompensieren, wurden alle Hybridisierungssignale auf EUB338 normalisiert. Mit den entsprechenden Referenzorganismen hybridisiert, erzielten die Sonden CTE23a und ZBE23a etwa die doppelte Helligkeit als EUB338, während ACA23 sogar dreifach heller strahlte. Im Gegensatz dazu zeigten Eco645 bis Eco661, die spezifisch für die korrespondierenden Zielregionen in *E. coli* sind, nur etwa ein Drittel der Signalstärke von EUB338.

### **C.3 Durchflußzytometrische Analyse von mikrobiellen Populationen in aquatischen Ökosystemen: Entwicklung und Anwendung neuer Methoden**

#### **C.3.1 Quantifizierung phylogenetischer Gruppen in Wasserproben nach Hybridisierung**

Für die Analyse im Durchflußzytometer müssen Zellen in einer Flüssigkeit suspendiert vorliegen. Wallner und Mitarbeiter (Wallner *et al.*, 1993) entwickelten ein Protokoll zur Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten, rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden. Diese Methode, ursprünglich entwickelt zur Analyse von Belebtschlamm, versagte dagegen bei Wasserproben aus oligotropheren Habitaten. Aufgrund der vielen Zentrifugationsschritte traten Zellverluste auf, was nicht nur eine Bestimmung absoluter Zellzahlen unmöglich macht, sondern theoretisch auch die Zusammensetzung der Bakterienpopulation verfälschen könnte. Glöckner und Mitarbeiter (Glöckner *et al.*, 1996) konzentrierten Proben aus oligotrophen Gewässern für die Hybridisierung auf Polycarbonatfilter. Für die Analyse im Durchflußzytometer bot sich an, Proben ebenfalls auf Filter zu konzentrieren, zu hybridisieren und anschließend die hybridisierten Zellen vom Filter in ein kleines Volumen zu überführen und die Suspension zu vermessen.

##### **C.3.1.1 Resuspendierung der Zellen**

Wasserproben aus einem eutrophen Habitat (Nymphenburger Kanal) wurden auf Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm aufkonzentriert und die Zellen in ein kleines Volumen durch Vortexen abgewaschen. Die abgewaschene Fraktion wurde wiederum auf Polycarbonatfilter gesammelt. Der abgewaschene Filter wie der Filter mit der gesammelten, abgewaschenen Fraktion wurde mit DAPI gefärbt und ausgezählt. In der Probe konnten sämtliche Zellgrößen nachgewiesen werden, der überwiegende Teil war jedoch ca. 0,5 - 1,0 µm groß, eine typische Größe für aquatische Bakterien und deshalb sehr gut für die Methodenentwicklung geeignet. Die Wiederfindungsrate der Bakterien betrug 70-90%. Der Anteil der haftengebliebenen Zellen bewegte sich zwischen 5% und 10%, die Größe war meist unter 0,5 µm, oft an der Detektionsgrenze. Bei einem statischen Gesamtfehler von ca.

10% betrug der Zellverlust durchschnittlich ca. 10%. Da in der gesammelten Fraktion wiederum alle Größenklassen vertreten waren, konnte davon ausgegangen werden, daß der Abwaschvorgang weitgehend nicht gröbenselektiv war.

### ***C.3.1.2 Vergleichende Quantifizierung von Wasserproben mit Mikroskopie und Durchflußzytometrie***

Wasserproben aus einem eutrophen (Nymphenburger Kanal) und mesotrophen Habitat (Piburger See) wurden mit FLUOS-markierten Oligonukleotidsonden auf Polycarbonat-Filtern hybridisiert, abgewaschen, mit DAPI gegengefärbt und im Durchflußzytometer bei Konfiguration 1 vermessen (1. Laser: 488 nm; 2. Laser: UV; vgl. B.7.3.6). Die eingesetzten Sonden waren spezifisch für die Domäne *Bacteria* bzw. für ausgewählte Untergruppen daraus. Relative Häufigkeiten als Prozentwert von DAPI wurden für dieselben Proben im Durchflußzytometer und im Mikroskop ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle C.2 bzw. Tabelle C.3 zusammengefaßt.

Für den Nymphenburger Kanal sind die Werte für die eubakterielle Sonde (44 bzw. 42%), sowie für die Sonden spezifisch für Planctomyceten (<1 bzw. 2%),  $\alpha$ - (<1 bzw. 2%) und  $\gamma$ -Proteobakterien (<1 bzw. 3%) sowie der Hintergrund (NON338, 2 bzw. <1%) innerhalb der Fehlergrenzen vergleichbar. Im Durchflußzytometer konnte jedoch ein fast dreimal so hoher Anteil an  $\beta$ -Proteobakterien (22%) bestimmt werden als im Mikroskop (8%). Ebenso war der Anteil an *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* mit 7% Häufigkeit im FACS fast doppelt so hoch wie im Mikroskop (4%). Für den Piburger See ist das Bild deutlich verschoben. Hier sind die Werte der Mikroskopie generell um den Faktor 3 – 4 höher als im Durchflußzytometer bestimmt. Mit der Sonde EUB338, spezifisch für *Bacteria*, erzielte man im Mikroskop eine Detektion von 48% der DAPI-gefärbten Zellen, im FACS nur etwa 13%. Ähnlich sind die Verhältnisse für die Sonde BET42a, spezifisch für  $\beta$ -*Proteobacteria* (10 bzw. 4%) und für die Sonde CF319a, spezifisch für das *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*-Cluster (7 bzw. 2%). Alle anderen phylogenetischen Gruppen konnten mit den entsprechenden Sonden mit beiden Methoden im 1%-Bereich detektiert werden.

<b>Nymphenburger Kanal</b>							
<b>Sonden</b>	<b>EUB338</b>	<b>PLA886</b>	<b>ALF968</b>	<b>BET42a</b>	<b>GAM42a</b>	<b>CF319a</b>	<b>NON338</b>
Mikroskop	44	< 1	< 1	8	< 1	4	2
Durchflußzytometer	42	2	2	22	3	7	< 1

*Tabelle C.2: Relative Häufigkeiten verschiedener mittels Fluoreszenz in situ-Hybridisierung bestimmter Großgruppen von Bakterien im Nymphenburger Kanal*

<b>Piburger See</b>							
<b>Sonden</b>	<b>EUB338</b>	<b>PLA886</b>	<b>ALF968</b>	<b>BET42a</b>	<b>GAM42a</b>	<b>CF319a</b>	<b>NON338</b>
Mikroskop	48	8	1	10	1	7	1
Durchflußzytometer	13	n.d.	1	4	1	2	1

*Tabelle C.3: Relative Häufigkeiten verschiedener mittels Fluoreszenz in situ-Hybridisierung bestimmter Großgruppen von Bakterien im Piburger See*

### **C.3.2 Erhöhung der Sensitivität der *in situ*-Hybridisierung durch Kombination von peroxidasemarkierten Oligonukleotiden und Tyramid-Signalamplifikation**

Die niedrigen Zählwerte, die in der Probe aus dem Piburger See durchflußzytometrisch erhalten wurden, sind vermutlich auf die niedrigere Sensitivität des Durchflußzytometers im Vergleich zum Mikroskop zurückzuführen. Dies macht es schwierig, sondenpositive Zellen vom Hintergrund zu unterscheiden. Daher wurde versucht, die schwache Fluoreszenz nach *in situ*-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden mittels eines neuartigen Signal-Amplifikations-Kits von DuPont zu verstärken. Es war kurz vorher gezeigt worden (Schönhuber *et al.*, 1997), daß die Kombination von *in situ*-Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Oligonukleotiden und einem fluoreszenzmarkierten Tyramid-Substrat erhebliche Signalamplifikation bewirkte. In dieser Arbeit wurde darauf aufbauend die Methode für durchflußzytometrische Anwendungen erprobt.

### ***C.3.2.1 Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Sonden und Tyramid-Signalamplifikation in Suspension***

Diese Tests wurden mit *E. coli* und dem grünfluoreszierenden Tyramid-Fluorescein Substrat durchgeführt. PFA-fixierte *E. coli* Zellen wurden vor Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Sonden stets mit Lysozym behandelt (5 mg ml<sup>-1</sup> für 5 min bei RT). Zellen aus der Anlaufphase (lag-Phase) zeigten mit einem Faktor von 10 die höchste gemessene Signalverstärkung (2575 ± 302 relative Fluoreszenzeinheiten), verglichen mit einer Standardhybridisierung mit fluoresceinmarkierten Sonden auf PFA-fixierten Zellen (264 ± 16) ohne Lysozym-Behandlung (Tabelle C.4). Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase hatten nur etwa halb so große Fluoreszenzintensitäten (1217 ± 75 bzw. 1333 ± 169). Ethanolfixierte Zellen aus der lag- bzw. log-Phase ohne Lysozym-Behandlung hatten mit 1682 ± 145 bzw. 900 ± 47 relativen Fluoreszenzeinheiten ein etwa ein Drittel schwächeres Signal als PFA-fixierte Zellen. Nach Ethanolfixierung wiesen dagegen stationäre Zellen nach Hybridisierung nur Hintergrundfluoreszenz auf (8 ± 0,5).

<b>Wachstumsphase</b>	<b>mit Amplifikation</b>		<b>ohne Amplifikation</b>
	<b>PFA<sup>1</sup></b>	<b>EtOH<sup>1</sup></b>	<b>PFA<sup>1</sup></b>
Anlaufphase	2575	1682	264
logarithmisch	1217	900	239
stationär	1333	8	29

*Tabelle C.4. Fluoreszenzintensitäten (relative Einheiten) nach Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Sonden und Tyramid-Signalamplifikation bzw. Standardhybridisierung mit einfach markierten Oligonukleotiden. <sup>1</sup> E. coli Zellen fixiert mit PFA bzw. Ethanol aus verschiedenen Wachstumsphasen;*

Die Inkubation von fixierten Zellen ohne Hybridisierung mit dem grünen Tyramid-Substrat allein resultierte in einem nur leicht erhöhten Signal von 8 gegenüber einer Autofluoreszenz der Zellen von 4. Die Negativkontrolle mit EUK516 zeigte ein Signal von 55. Das Signal/Rausch-Verhältnis war 47 (2575/55) für PFA-fixierte bzw. 73 (1682/23) für ethanolfixierte Zellen, verglichen mit dem Standardsystem, das 66-fach höhere

Fluoreszenzwerte als der Hintergrund aufwies (264/4). Eine gleichmäßige Färbung der Zellen war nicht immer gewährleistet. Bis zu 20% der ethanolfixierten (log-Phase) und bis zu 39% der PFA-fixierten Zellen (log-Phase) fluoreszierte z. T. nur sehr schwach (vgl. Abbildung C.9). Mit der konventionellen Methode hybridisierten maximal nur 2% der Zellen mangelhaft.

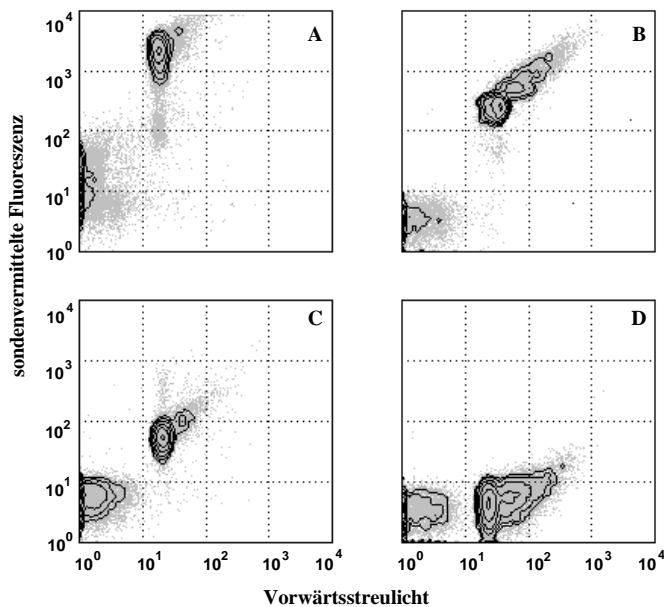


Abbildung C.9. Dot-Plot Diagramme für hybridisierte Kulturen von *E. coli*. Hybridisierung mit eubakterieller Sonde EUB338 (A und B, obere Reihe), bzw. EUK516, spezifisch für Eucarya ( C und D, untere Reihe). Links die Kombination von peroxidasemarkierten Sonden mit Tyramidsignalamplifikation (A und C), recht der Einsatz von einfach fluoresceinmarkierten Sonden (B und D).

### C.3.2.2 Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Sonden und Tyramid-Signalamplifikation auf Filtern

Für die Analyse von Wasserproben aus natürlichen Systemen mußte zudem versucht werden, die Methode auf Filter zu übertragen. In diesen Tests wurde das CY3-markierte Tyramid als Substrat eingesetzt, da CY3 ( $\epsilon \approx 150 \text{ cm}^3 \mu\text{mol}^{-1}$ ) gegenüber Fluorescein ( $\epsilon \approx 75 \text{ cm}^3 \mu\text{mol}^{-1}$ ) einen doppelt so hohen molaren Extinktionskoeffizienten besitzt, der sich auch in einer höheren Ausbeute an Fluoreszenzlicht äußern sollte. Zum Test wurden zwei marine Isolate aus der Nordsee, ein *Vibrio* sp., Stamm 12.9.1, und ein *Cytophaga* sp., Stamm 02.11.DS22,



ausgewählt, die aufgrund ihrer Größe (ca. 3 x 1 µm bzw. ca. 0,7 x 0,3 µm) und phylogenetischen Zugehörigkeit (*γ-Proteobacteria* bzw. *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) als repräsentativ für die Nordsee angesehen wurden. Beide Isolate wurden vor der Hybridisierung mit den peroxidasemarkierten Sonden EUB338 und Arch915 mit Lysozym behandelt. *Vibrio* sp. zeigte im Durchflußzytometer eine 11fache Signalverstärkung (1840 relative Einheiten) gegenüber einer Standardhybridisierung mit einfach fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (175), sehr kleine *Cytophaga* sp. jedoch nur eine um einen Faktor 1,8 höhere Fluoreszenz (186/105). Das Signal-Rausch-Verhältnis war nur für *Vibrio* sp. mit S/N=10 für die TSA-Hybridisierung ausreichend erhöht über dem Hintergrund (1840/181), nicht für *Cytophaga* sp. mit nur S/N=1,9 (186/97). Die Standardhybridisierung war für beide Stämme mit S/N-Faktoren von 2 (*Vibrio* sp., 175/88) bzw. 1,5 (*Cytophaga* sp., 105/70) knapp über dem Hintergrund. *Cytophaga* sp. wies nach Signalamplifikation (186 rel. Einheiten) zwar fast doppelt (1,8) so helle Zellen auf als nach einer Standardhybridisierung (105), die Negativkontrolle war aber ebenfalls um 30% erhöht (97).

	EUB338- POD	Arch915- POD	S/N POD	EUB338- CY3	NON338- CY3	S/N CY3	Amp.- faktor
<i>Vibrio</i> sp.	1840	181	10	175	88	2	11
<i>Cytophaga</i> sp.	186	97	1,9	105	70	1,5	1,8

Tabelle C.5: Vergleich der relativen Sondenfluoreszenz nach Hybridisierung mit peroxidasemarkierten (POD) bzw. CY3-markierten Oligonukleotidsonden; S/N: Signal-Rausch Verhältnis; Amp.-faktor: Verstärkung durch Signalamplifikation

Weitere Tests wurden mit einer Belebtschlammprobe und der bakteriellen Begleitflora einer Kultur der limnischen Alge *Rhodomonas minuta* unternommen. Alle Proben lagen PFA-fixiert vor und wurden mit Lysozym behandelt. Nach Hybridisierung mit EUB338-POD und ARCH915-POD und anschließender Tyramid-Substrat-Inkubation ließen sich jedoch keine positiven Signale detektieren. Im Mikroskop war zu erkennen, daß die Zellen noch intakt waren. Offensichtlich konnten sie durch die Vorbehandlung nicht zugänglich für

peroxidasemarkierte Sonden gemacht werden. Nach zusätzlicher Inkubation mit Proteinase K für 10 min und Hybridisierung mit EUB338-POD färbten schließlich ca. 10% aller DAPI-positiven Zellen aus Belebtschlamm bzw. ca. 14% aller Zellen der Algenbegleitflora mit TSA-CY3, wie im Mikroskop gezählt werden konnte. Die Negativkontrolle mit ARCH915-POD zeigte kaum gefärbte Zellen für Belebtschlamm (1%) bzw. es konnten für die Algenbegleitflora keine Signale nachgewiesen werden. Die Proteinase K-Behandlung erwies sich als sehr kritisch. *Vibrio* sp. war nach zehnminütiger Proteinase K-Behandlung vollständig lysiert, und es konnten nur noch Zellfragmente gefunden werden. Bei 30 minütiger Inkubation mit Proteinase K, um weitere Zellen zu permeabilisieren, gingen auch die Zellen aus Belebtschlamm und Algenbegleitflora in Lyse. Wurden nach Hybridisierung und Inkubation mit Tyramid-Substrat Belebtschlammproben oder Algenbegleitflora vom Filter abgewaschen und im FACS vermessen, konnte nur noch Hintergrundrauschen festgestellt werden. Vermutlich sind durch die starken Scherkräfte beim Abwaschvorgang die durch den Lysozym- und Protease K - Verdau fragil gewordenen Zellen lysiert. Diese Methode wurde daher hier nicht mehr weiter für die quantitative Analyse von aquatischen Proben verfolgt.

### **C.3.3 Hybridisierung mit Alexa – markierten Oligonukleotiden**

Die neuentwickelten Alexa-Farbstoffe sollten nach Angaben der Hersteller Molecular Probes eine vielfach höhere Fluoreszenz als bisher verwendete Farbstoffe wie z.B. CY3 liefern. In Zusammenarbeit mit der Firma Interactiva GmbH wurden die spezifischen rRNA-gerichteten Oligonukleotide EUB338 und NON338 mit drei unterschiedlichen Farbstoffen markiert: Alexa 488, Alexa 532 und Alexa 546. Alle Sonden wurden im Spektrophotometer in ihrem gesamten Absorptionsspektrum vermessen und die Absorptionsmaxima notiert (Abbildung C.10). Die Spektren zeigten ausnahmslos ein Maximum bei ca. 260 nm, entsprechend der Absorption des Oligonukleotids, und, abhängig vom verwendeten Farbstoff, ein Maximum bei 495 nm für Alexa 488, 515 nm für Alexa 532 und 556 nm für Alexa 546. Das Absorptionsverhältnis von Oligonukleotid zu Alexa 488 betrug für EUB338 5,8 bzw. für NON338 5,5. Für die Farbstoffe Alexa 532 und Alexa 546 betragen diese Verhältnisse 1,4 bzw. 1,5 für die EUB338 und 1,1 bzw. 1,6 für die NON338. Nimmt man für Alexa 488 eine

molare Extinktion von  $65.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  an, so war pro Mol Sonde zuwenig Farbstoff an Alexa 488-markierte Sonden gebunden gewesen. Für Alexa 532 - und Alexa 546 - markierte Sonden hingegen war unter Annahme eines molaren Extinktionskoeffizienten von  $80.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  pro Mol Sonde zuviel Farbstoff gemessen worden. Die chromatographische Kontrolle der Firma Interactiva gab keinerlei Hinweise auf überschüssige Oligonukleotide bei Alexa 488 bzw. freien Farbstoff bei Alexa 546. Der Lauf aller alexamarkierten Oligonukleotide in einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) bestätigte allerdings für Alexa 488 einen deutlichen Anteil an unmarkierten Oligonukleotid. Für Alexa 532 bzw. Alexa 546 konnte nur je eine Bande mit den markierten Oligonukleotiden detektiert werden, jedoch keine Bande von überschüssigem Farbstoff.

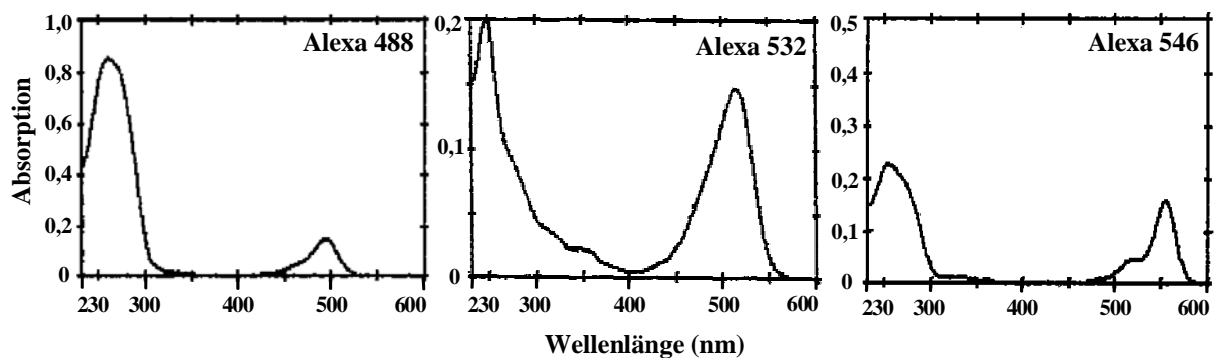


Abbildung C.10. Absorptionsspektren von EUB338, markiert mit Alexa 488 (links), Alexa 532 (mitte) bzw. Alexa 546 (rechts). Bei ca. 260 nm liegt das Absorptionsmaximum des Oligonukleotids. Im längerwelligen Bereich sieht man deutlich das Maximum des jeweiligen Farbstoffs. Man beachte die im Vergleich zum Oligonukleotid niedrige Absorption des Farbstoff Alexa 488, was auf eine nicht äquimolare Markierung des Alexa 488 - markierten Oligonukleotids schließen läßt. Für Alexa-NON338 Sonden ergab sich ein ähnliches Bild.

Die Sonden wurden zusammen mit FLUOS bzw. CY3-markierten Oligonukleotiden gegen *E. coli* DSM30083<sup>T</sup> hybridisiert, und die Sondenhelligkeit im Durchflußzytometer quantifiziert. Der Farbstoff Alexa 488 erreichte 26% höhere Fluoreszenzsignale verglichen mit einer Hybridisierung mit FLUOS-markierten Sonden. Die Hybridisierung mit Alexa 546 markierter EUB338 zeigte 34% höhere Fluoreszenz als mit CY3-markierter Sonde. Beide Alexa Farbstoffe hatten in etwa das gleiche Signal-Rausch Verhältnis wie die vergleichbaren Standardfarbstoffe CY3 bzw. FLUOS. Trotzdem blieb Alexa 546 deutlich hinter der Angabe des Herstellers zurück, etwa 3-fach höhere Fluoreszenzsignale gegenüber CY3 zu zeigen. Hybridisierung mit Alexa 532 - markierter EUB338 dagegen erfüllte tatsächlich diese

Erwartung, jedoch zeigte auch die Negativkontrolle mit der Alexa 532-markierten NON338 identisch hohe Fluoreszenz. Die Hybridisierung war offensichtlich völlig unspezifisch verlaufen.

### **C.3.4 Analyse einer marinen Verdünnungskultur**

#### ***C.3.4.1 Bestimmung der Gesamtkeimzahl***

Ein wichtiger Parameter in der Analyse von Wasserproben ist die absolute Anzahl an Zellen, die in einer Probe vorhanden sind. Üblicherweise wird eine definierte Menge des zu untersuchenden Wassers auf Filter aufkonzentriert und im Mikroskop stichprobenartig ausgezählt. Daraus wird mit statistischen Verfahren die Gesamtkeimzahl pro Milliliter berechnet. Diese Methode ist jedoch vergleichsweise arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Durchflußzytometrie kann hier einen schnelleren Durchsatz an Proben ermöglichen.

Eine Stammlösung an Standardkugeln (Beads) mit 0,5 µm Durchmesser wurde mikroskopisch ausgezählt und die Konzentration auf  $2,60 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  (CV = 5%) bestimmt. Diese Beads-Lösung wurde jeder Probe als interner Standard zugefügt. Vergleichende Zählungen eines *Thiomicrospira* sp. - Isolats (Stamm t<sub>15</sub>) auf Filter im Mikroskop und im Durchflußzytometer ergaben eine Unterschätzung von  $30 \pm 3\%$  der mikroskopischen gegenüber der durchflußzytometrischen Zählung.

Das Wachstum einer Verdünnungskultur in verschieden verdünntem, filtriertem Meerwasser wurde im Durchflußzytometer verfolgt. Es wurden keine Nährstoffe zugesetzt. Ein Großteil der Zellen nahm an Größe (Vorwärtsstreulicht) und DNA-Gehalt (HOECHST33342-Fluoreszenz) innerhalb weniger Stunden zu. Die exakte Gesamtkeimzahl wurde zum Zeitpunkt der Probennahme und nach 96 h für alle Ansätze im Durchflußzytometer bestimmt (siehe Tabelle C.6).

Ansatz	Verdünnung	GKZ (ml <sup>-1</sup> )		Faktor
		t = 0 h	t = 96 h	
0	unverdünnt	1,2 x 10 <sup>6</sup>	3,1 x 10 <sup>6</sup>	2,6
1	unverdünnt	1,2 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	0,9
2	1:3	4,0 x 10 <sup>5</sup>	2,6 x 10 <sup>6</sup>	6,5
3	1:3	4,0 x 10 <sup>5</sup>	2,4 x 10 <sup>6</sup>	6,0
4	1:10	1,2 x 10 <sup>5</sup>	2,9 x 10 <sup>6</sup>	24,4
5	1:10	1,2 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>6</sup>	25,9
6	1:100	1,2 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>6</sup>	220,8

*Tabelle C.6: Gesamtkeimzahlen (GKZ) der Verdünnungskulturansätze; Eine Meerwasserprobe wurde über einen Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 0,8 µm) vorfiltriert und in Parallelansätzen (mit Ausnahme der 1:100 Verdünnung) unverdünnt bzw. verdünnt bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Zeitpunkt t = 0 h wurde nur für die unverdünnten, filtrierten Probe bestimmt. Nach 96 h Inkubation wurden DAPI-gefärbte Aliquots aus allen Ansätzen im Durchflußzytometer vermessen und die GKZ bestimmt.*

Die einzelnen Parallelansätze entwickelten sich vergleichbar. Nur eine unverdünnte, filtrierte Parallelprobe enthielt wohl größere Mengen an Protozoen, da eine leichte Abnahme der Gesamtkeimzahl festgestellt werden konnte, und im Durchflußzytometer der Anteil an Debris deutlich erhöht war. Bemerkenswerterweise pendelten sich die Gesamtkeimzahlen aller anderen Kulturen auf ein etwa gleich hohes Niveau von 2,4 – 3,1 x 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> ein. Die Originalprobe wuchs demnach nicht so stark (Faktor 2,6) wie die 1:3 (Faktor 6) und 1:10 verdünnten Proben (Faktor 24 bzw. 25). Am stärksten wuchs die 1:100 Verdünnung um den Faktor 220. Auch im Durchflußzytometer konnte in der 1:100 Verdünnung eine besonders einheitliche Population mit hohen FSC- und DAPI-Signalen beobachtet werden.

#### ***C.3.4.2 Sortieren von Bakterien nach Zellgröße und DAPI-Fluoreszenz und anschließende Hybridisierung mit gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden***

In diesem Versuchsteil wurde der Frage nachgegangen, welcher phylogenetischen Gruppe die wachsende Zellpopulation in den Verdünnungskulturen angehörte.

Für eine unverdünnte, nicht inkubierte Probe ( $t = 0$  h), sowie für repräsentative Proben nach 36 h Inkubation aus dem 1:10 und aus dem 1:100 verdünnten Ansatz wurde die Verteilung der phylogenetischen Gruppen durch Hybridisierung mit gruppenspezifischen Sonden bestimmt (siehe Tabelle C.7). In der unverdünnten, nicht inkubierten Probe hybridisierten 65% aller DAPI-positiven Zellen mit der Sonde EUB338. Mit NON338 konnten keine autofluoreszente Partikel nachgewiesen werden. Die stärkste Population stellte die *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*-Gruppe mit 25%, gefolgt von der  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Gruppe der *Proteobacteria* mit 10% bzw. 9% aller DAPI-gefärbten Zellen. In den Verdünnungen zeigte sich nach 36 h Inkubation eine deutlich verschobene Verteilung: Waren in der 1:10 Verdünnung 49% aller DAPI-positiven Zellen mit der EUB338 detektierbar, so waren es in der 1:100 Verdünnung nur 38%. Bakterien der *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides*-Gruppe konnten ebenso wie  $\alpha$ -Proteobakterien nicht mehr nachgewiesen werden. Dagegen stieg der Anteil der  $\gamma$ -Proteobakterien auf 15% in der 1:10 bzw. 19% in der 1:100 Verdünnung an. Die Kontrolle mit NON338 fiel in beiden Fällen negativ aus.

Sonde	Ansatz		
	unverdünnt,	1:10 verdünnt,	1:100 verdünnt,
	t = 0 h	t = 36 h	t = 36 h
EUB338	65	49	38
NON338	n.d.	n.d.	n.d.
ALF968	9	n.d.	n.d.
CF319a	25	n.d.	n.d.
GAM42a	10	15	19

Tabelle C.7. Analyse von verschiedenen Verdünnungsansätzen mit gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden auf Filtern. Alle Werte sind als Prozent DAPI-positive angegeben. n.d. = nicht detektiert

Die Analyse im Durchflußzytometer zeigte nach 36 h Inkubation in den 1:10 und 1:100 Verdünnungen eine Population mit etwa fünffacher DNA – Menge und zehnfachem Streulichtsignal im Vergleich zur Originalprobe nach DAPI-Färbung. Diese stark gefärbte Population wurde aussortiert, auf Filtern aufkonzentriert und mit gruppenspezifischen Sonden hybridisiert (siehe Tabelle C.8) In der 1:10 Verdünnung hybridisierten knapp die Hälfte, in

der 1:100 Verdünnung sogar drei Viertel der Organismen mit der Sonde GAM42a. Andere Gruppen konnte aufgrund der geringen Anzahl von Zellen im mikroskopischen Feld nicht sicher bestimmt werden. Die Detektionsrate war mit über 90% ungewöhnlich hoch.

Eine Sortierung aus der unverdünnten, nicht inkubierten Probe mit einem Sortierfenster für die stärkste DAPI-Färbung zeigte eine klare Dominanz von CF319a-positiven Zellen (ca. 60%). Daneben konnten  $\gamma$ -Proteobakterien mit einem Anteil von ca. 10% aller DAPI-gefärbten Zellen detektiert werden.

Sonde	Ansatz		
	unverdünnt,	1:10 verdünnt,	1:100 verdünnt,
	t = 0 h	t = 36 h	t = 36 h
EUB338	> 90	-	-
NON338	n.d.	-	-
CF319a	ca. 60	n.d.	n.d.
GAM42a	ca. 10	ca. 45	ca. 75

*Tabelle C.8. Populationen mit starker DAPI-Fluoreszenz wurden aus verschiedenen Verdünnungsansätzen sortiert und auf Filtern mit gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert. Werte sind als Prozent DAPI-positive angegeben. n.d. = nicht detektiert*

## **C.4 Erhöhung der Gerätesensitivität beim FACStar Plus**

### **C.4.1 DAPI-Fluoreszenz als Systemschwellenwert**

Mit der anfänglich benutzten Konfiguration 1 wurde mit dem ersten Laser die Sondenvermittelte Fluoreszenz (FLUOS, CY3) und mit dem zweiten Laser DAPI (als DNA-Farbstoff) angeregt. Diese Konfiguration hatte aber einen entscheidenden Nachteil: der Systemschwellenwert konnte nicht auf die DAPI-Fluoreszenz gelegt werden. Dies ist nur mit Parametern vom ersten Laser möglich, also Streulicht und Carboxyfluorescein- bzw. CY3-Fluoreszenz. Aufgrund des sehr hohen Signal-Rausch Verhältnisses der DAPI-Fluoreszenz von 1:100 sollte es aber möglich sein, DNA-haltige Partikel vom partikulären und nicht-

partikulärem Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Deshalb wurde der erste Laser, ein Argon-Ionen Laser, auf UV-Emission eingestellt. Durch diese Änderung konnten nun auch kleinste Zellen über ihre hohe DAPI-Fluoreszenz detektiert werden. Gleichzeitig verbesserte sich durch Einsatz eines Photomultipliers die Detektion des Vorwärtsstreulichts, so daß schließlich sogar Beads mit einem Durchmesser von 0,2  $\mu\text{m}$  vermessen werden konnten. Verglichen mit 0,5  $\mu\text{m}$  Beads, die in Konfiguration 1 die Detektionsgrenze markierten und bezogen auf die entsprechenden Volumina der Beads bedeutete dies eine um den Faktor 6,25 höhere Sensitivität des Vorwärtsstreulichtes. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Photodiode ist, daß die Empfindlichkeit über die am Photomultiplier anliegende Spannung geregelt werden kann, und damit ein weiterer dynamischer Bereich als mit der Photodiode angesprochen werden kann.

Der zweite Laser in Konfiguration 2 sollte für die Anregung des farbstoffmarkierten rRNA-gerichteten Oligonukleotids dienen. Wegen seines doppelt so hohen molaren Extinktionskoeffizienten gegenüber dem bisher verwendeten Farbstoff Carboxyfluorescein wurde der Carbocyanin-Farbstoff CY3 als Markierung gewählt. Mit einem Argon-Ionen Laser kann Carboxyfluorescein mit der starken 488 nm-Linie effizient angeregt werden. CY3 hat sein Absorptionsmaximum bei 545 nm, kann aber aufgrund seiner verbreiterten Absorption zu kürzeren Wellenlängen hin auch mit der zweiten starken Emissionslinie des Argon-Ionen Lasers bei 514 nm ausreichend angeregt werden. Versuche zeigten, daß ungefähr 200 mW Leistung genügte, um eine Sättigung von CY3 zu erreichen. In der Konfiguration 2 wurde versucht, den im Unterhalt teuren Argon-Ionen Laser durch einen Festkörperlaser mit der für CY3 noch günstigeren Emission bei 532 nm zu ersetzen. Tatsächlich konnte aber eine meßbare Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnisses gegenüber den Kombinationen Argon-Ionenlaser – CY3 bzw. Argon-Ionenlaser - Fluorescein nicht nachgewiesen werden.

#### **C.4.2 Verwendung von hochwertigen optischen Filtern**

Die Detektion des Streu- bzw. Fluoreszenzlichts erfolgt über optische Filter, die selektiv bestimmte Wellenlängen passieren lassen bzw. blockieren. Die Verwendung von ungeeigneten, optischen Filtern kann zu Verlusten der Sensitivität führen, z. B. weil der Bereich, in dem der Filter für Fluoreszenzlicht durchlässig ist, enger ist als der Bereich, in



dem ein gegebener Farbstoff Licht emittiert. Eng daran gekoppelt ist die Transmission, die angibt, welcher Prozentsatz des einfallenden Lichts nach Passieren des Filters wieder zur Verfügung steht. Die extrem breite CY3-Emission konnte durch Einsatz eines Bandpassfilters mit einem Transmissionsbereich von 545-680 nm (BP600/120) gegenüber dem standardmäßig verwendeten BP575/26 (Transmission von 560-590 nm) besser detektiert werden und resultierte in 50% höheren Signalen, da der BP600/120 einerseits einen höheren Transmissionswert, aber auch einen weiteren Transmissionsbereich besitzt. Damit verbunden stieg auch der Hintergrund an, aber das Signal-Rausch-Verhältnis verbesserte sich trotzdem um ca. 25%. Für die Detektion von DAPI konnte durch den Einsatz eines High-Quality-Bandpaßfilters ( $460 \pm 25$  nm) mit hoher Transmission gegenüber dem Standardbandpass  $424 \pm 22$  nm sogar eine Verbesserung des Fluoreszenzsignals um den Faktor 3 erreicht werden. Auch die Qualität der Filter in entfernt vom Transmissionsmaximum liegenden Wellenlängen ist von entscheidender Bedeutung für die Messung. Ein vor den Streulichtkanälen gesteckter Kurzpassfilter (Transmission  $<375$  nm) sollte nur das von Partikeln gestreute Licht des ersten, auf UV eingestellten Lasers passieren lassen, alle längerwelligen Wellenlängen sollten blockiert werden. Tatsächlich konnte aber vom zweiten Laser, der mit 532 nm emittierte, soviel Licht durch diesen Filter auf den PMT, daß dieser übersättigt wurde und nur ein sehr verrauschtes Signal lieferte. Ein Austausch gegen einen geeigneten, qualitativ hochwertigen Bandpaßfilter ( $363 \pm 7,5$  nm) konnte dieses Problem beseitigen.

Generell gilt, daß jeder Filter eine gewisse Absorption in den Transmissionsbereichen besitzt, die abhängig von der Qualität des Filters ist. Je mehr Filter das Licht passieren muß, desto weniger wird auf die Detektoren gelangen. Im Strahlengang zwischengeschaltete Strahlteiler reduzieren die Fluoreszenz um ca. 15 – 20%. Es wurde deshalb versucht, möglichst wenig Filter im selben Strahlengang einzusetzen.

#### **C.4.3 Macro-Sort-Kopf**

In Konfiguration 2 wurde ein sogenannter Macrosort-Kopf als Sortiermodul eingebaut, der ein deutlich geringeres Rauschen während des Sortierens erzeugt. Wie oben beschrieben mußte im Sortiermodus aufgrund des erhöhten Hintergrundes der Schwellenwert angehoben werden. Besonders, wenn in Konfiguration 1 der Threshold auf einem der Streulichtkanäle

gesetzt werden mußte, reduzierte sich die Sensitivität und es konnten nur Bakterien erkannt werden, die einen Durchmesser von mindestens 1 µm hatten (vgl. oben). Mit diesem neuen Modul jedoch hatte man fast keine Sensitivitätseinbußen mehr. Tabelle C.9 gibt einen Überblick über alle realisierten Modifikationen.

<b>Modifikation</b>	<b>Konfiguration 1</b>	<b>Konfiguration 2</b>	<b>Auswirkung</b>	<b>Faktor</b>
1. Laser	Emission bei 488 bzw. 514 nm	UV	Threshold auf DAPI-Fluoreszenz, höhere Empfindlichkeit der PMT für UV	siehe FSC
Vorwärtsstreulicht-Detektor	Photodiode	Photomultiplier	höhere Sensitivität, breiterer dynamischer Bereich	6,25
Filter für DAPI	Bandpass 424 ± 22 nm	High-Quality Bandpass 460 ± 25 nm	Höhere Transmission, deckt gesamtes Fluoreszenzspektrum von DAPI ab	3
Filter für CY3	560 - 590 nm	545 - 680 nm	Höhere Transmission, deckt gesamtes Fluoreszenzspektrum ab	1,25
Sortiermodul	Standard	Macro Sort	rauschärmere und stabilere Sortierung	nicht bestimmt

*Tabelle C.9 Zusammenfassung aller Modifikationen am FACStar Plus von Konfiguration 1 zu Konfiguration 2.*

## **D. Diskussion**

### ***D.1 Sortieren von definierten Zellpopulationen mittels Durchflußzytometrie***

Bei der Erforschung der mikrobiellen Diversität kommen heute sowohl klassische Kultivierungsverfahren als auch moderne molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Beide Wege beschreiben die Diversität jedoch nur unvollständig und verzerrt (Amann *et al.*, 1995). Das Ausmaß, in dem bestimmte Taxa positiv oder negativ von der einzelnen Methode diskriminiert werden, ist nur ansatzweise bekannt und erforscht (z.B. Suzuki and Giovannoni, 1996). Die Durchflußzytometrie bietet mit der Sortierung von Zellpopulationen die Untersuchung wenigstens einer klar definierten und umgrenzten Teilmenge dieser Diversität.

#### **D.1.1 Die Basis einer Sortierentscheidung**

In der vorliegenden Arbeit wurden auffällige Zellen sortiert, die entweder in geringer Häufigkeit in ihrem Habitat auftraten, oder nicht anders als durch molekulare Techniken analysiert werden konnten. Diese Zellen unterschieden sich von anderen in den untersuchten Proben in ihrer Größe oder ihrem Färbeverhalten mit Farbstoffen wie z.B. DAPI oder fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden. Allgemein gesprochen können die folgenden Parameter für die Durchflußzytometrie genutzt werden:

1. Relative Zellgröße aufgrund des Vorwärtsstreulichtes
2. Interne Strukturen aufgrund des Streulichtes im 90° Winkel (Seitwärtsstreulicht)
3. Fluoreszenzlicht quantitativ und qualitativ

Oft ist ein einzelner Parameter nicht ausreichend für die Beschreibung einer bestimmten Population in einer heterogenen mikrobiellen Gemeinschaft. Durchflußzytometrie bietet den

Vorteil, daß viele Parameter gleichzeitig aufgenommen und in der Analyse miteinander kombiniert werden können. Dadurch ist es möglich, für jeden Zelltyp die Kombination an Parametern auszuwählen, der am besten unerwünschte Zelltypen und Hintergrund diskriminiert. In der Praxis geschieht dies in zweidimensionalen Dot-Plot-Grafiken, die zusätzlich logisch verknüpft werden können, sodaß dadurch auch mehr als zwei Parameter in die Analyse mit einbezogen werden können.

Wallner und Mitarbeiter (Wallner *et al.*, 1997) nutzten die stark lichtbrechenden Eigenschaften der internen Magnetosomen und die dadurch verursachten hohen Streulichtsignale zur Sortierung von lebenden magnetotaktischen Bakterien. Dieselben Autoren beschreiben auch die Sortierung nach DAPI-Fluoreszenz in Kombination mit dem Vorwärtsstreulicht, die es erlaubte, auffällig gebogene Stäbchen in fast 100% Reinheit zu erhalten. Auch in dieser Arbeit genügte zur Sortierung der wachsenden Fraktion einer Verdünnungskultur die ungewöhnlich starke Färbung mit DAPI in Kombination mit dem Vorwärtsstreulicht, um sie gegen andere Populationen mit niedrigeren Streulichteigenschaften und Fluoreszenzwerten zu diskriminieren (siehe D.3.3). Die genannten Fälle sind Beispiele dafür, wie relativ unspezifische Parameter dennoch für die Diskriminierung der gewünschten Organismen ausreichen können.

Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit Zellen aus Belebtschlamm mit Hilfe von Vorwärtsstreulicht und der Fluoreszenz von hochspezifischen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden sortiert. Die Sonden sind gegen die 16S oder 23S ribosomale RNA gerichtet und erlauben eine spezifische Färbung oft bis auf Artebene. Unabhängig von solch relativ unspezifischen Eigenschaften wie Streulicht können auch mehrere Fluoreszenzeigenschaften zur Analyse und Sortierung herangezogen werden, z. B. die Kombination von DAPI-Färbung und sondenvermittelter Fluoreszenz oder der gleichzeitige Einsatz von mehreren unterschiedlich gefärbten Sonden (Amann *et al.*, 1996, Amann *et al.*, 1995). Auch wurden Kombinationen mit der Autofluoreszenz von photosynthetischen Pigmenten (Simon *et al.*, 1995) oder mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Wallner *et al.*, 1996) bereits erfolgreich erprobt.

### **D.1.2 Anreicherungsfaktor und Reinheit der Zellen**

Die Effizienz einer Sortierung kann entweder durch den Anreicherungsfaktor (Häufigkeit nach der Sortierung dividiert durch die Häufigkeit vor der Sortierung) oder durch die Reinheit der sortierten Zellen ausgedrückt werden. Sondenpositive Zellen konnten durch Sortieren aus Belebtschlamm im Falle der seltenen Spirillen bis über 1000-fach angereichert werden. Trotzdem enthielten die sortierten Fraktionen andere und damit unerwünschte Zelltypen bis zu einem Prozentsatz von 65%. Das hat hauptsächlich zwei Gründe: Belebtschlamm besteht zu einem überwiegenden Teil aus Flocken, in denen die gewünschten Zellen oft eng mit unerwünschten Zelltypen verbunden sind. Obwohl die Hybridisierungsprozedur an sich und vor allem die Scherkräfte, die während der hydrodynamischen Fokussierung einwirken, zur Vereinzelung der Zellen beitragen (Wallner *et al.*, 1995), führt dies nicht zu einer perfekten Suspendierung in Einzelzellen. Besonders, wenn kleine Nicht-Zielzellen auf großen, einzelnen Zellen oder Aggregaten sitzen, beeinflussen sie kaum dessen Streulicht- bzw. Fluoreszenzeigenschaften und können so während der Sortierung nicht als heterogene Aggregate erkannt und diskriminiert werden.

Der zweite Grund für Fehlsortierungen ist unabhängig vom Habitat und ist auf Hintergrundrauschen vor allem in den Streulichtkanälen zurückzuführen. Verglichen mit dem Analysenmodus ist dieses Rauschen im Sortiermodus deutlich höher. Dies rührt zum einen von elektronischem Rauschen des Sortiermoduls an sich und zum anderen von der etwas unruhigeren Oberfläche des Wasserstrahls durch die Tropfenerzeugung, was zu zusätzlichen Reflexionen und damit zu Störsignalen führt. Folglich muß der Systemschwellenwert angehoben werden, das Gerät wird insensitiver und dadurch „blind“ für Zellen, dessen Streulicht und/oder Fluoreszenz unterhalb des Schwellenwerts liegen. Die Systemsoftware erkennt normalerweise Zellen, die zu dicht hintereinander im Wasserstrahl detektiert werden und verwirft diese für eine Sortierung. Liegt jedoch eine dieser kleinen Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer erwünschten Zielzelle, kann sie nicht erkannt werden und gelangt so in die sortierte Fraktion.

Die Verbesserung der Reinheit durch einen zweiten Sortierschritt um ca. 20% kann darauf zurückgeführt werden, daß die Wahrscheinlichkeit, daß eine Zielzelle dicht neben einer unerkannten, kleinen Zelle zu liegen kommt, deutlich vermindert ist. Zum einen wurden die sortierten Zellen bereits durch Hüllstromflüssigkeit verdünnt und zum anderen mag eine

zweite Passage durch das Durchflußzytometer und die dadurch einwirkenden Scherkräfte während der hydrodynamischen Fokussierung eine nochmalige Dispergierung etwaiger aufwachsender Zellen bewirkt haben. Wiederholtes Sortieren führt jedoch unweigerlich zur Ausdünnung der gewünschten Zellen, so daß eine deutlich längere Zeit zum Sortieren benötigt wird. In der Praxis wird man zuerst eine grobe Anreicherung vornehmen, um in einem zweiten exakten Sortierschritt zu hoch angereicherten Zellpopulationen zu gelangen.

### **D.1.3 Molekulare Analyse von sortierten Zellen**

Mit dem für diese Arbeit benutzten Durchflußzytometer benötigt man nur einige Minuten, um 1.000 bis 10.000 Zellen zu sortieren. Verglichen mit anderen Methoden, wie der optischen „Pinzette“ (Huber *et al.*, 1995) oder dem klassischen Mikromanipulator (Skerman, 1968), mit denen ungleich weniger Zellen in einer viel größeren Zeitspanne sortiert werden können, ist diese Methode unübertroffen. Dennoch reichte die Zahl an sortierten Zellen nicht aus, um molekularbiologische Standardmethoden wie z. B. Nukleinsäureextraktionen durchzuführen, sondern es muß auf die hochempfindliche Amplifikationstechnik der PCR zurückgegriffen werden. Eine erfolgreiche Amplifikation der 16S-rDNA aus ganzen Zellen wurde bereits früher von Spring und Mitarbeitern (Spring *et al.*, 1992) beschrieben. Vermutlich wird wenigstens ein Teil der eingesetzten Zellen durch die hohen Temperaturen während der PCR lysiert und die freigesetzte DNA wird für eine Amplifikation zugänglich. Da hybridisierte und sortierte Zellen normalerweise durch Paraformaldehyd bzw. Ethanol fixiert sind, die quervernetzend und denaturierend wirken, war es notwendig, die PCR-Protokolle anzupassen und zu testen.

In Vorversuchen wurde der Einfluß der Zellfixierung an verschiedenen Bakterien getestet und in 15 von 17 Fällen wurden auch rDNA Amplifikate erhalten. Nach „freeze-thawing“ konnten sogar Gram-positive Bakterien amplifiziert werden. Von zwei Gram-negativen Stämmen konnte jedoch kein PCR Produkt erhalten werden. Schwefelgranula bzw. Scheidenbestandteile wie Polysaccharide inhibierten möglicherweise die *Taq*-Polymerase im Falle von *T. nivea* bzw. *S. natans*. Es wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, um die PCR zu optimieren, da kein spezielles Interesse für diese Organismen bestand. Es sollte jedoch möglich sein, eine geeignete Kombination aus Zellpermeabilisierung und der

Abtrennung inhibierender Zellbestandteile zu finden, die eine PCR Amplifikation aus jeder denkbaren, sortierten Zellfraktion erlaubt. Mindestens 500 bzw. 1.000 fixierte *E. coli* bzw. *B. subtilis* Zellen sind nötig, um ein detektierbares PCR-Produkt reproduzierbar zu erhalten. Diese relativ hohe Zahl legt nahe, daß mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nur ein Teil der 16S-rRNA Gene für die Amplifikation durch die *Taq*-Polymerase zur Verfügung steht. Vermutlich bleiben der überwiegende Teil der Gene innerhalb der fixierten Zelle und somit durch das dichte Geflecht der Zellwand abgetrennt vom Enzym. Negative Effekte auf die Effizienz und Zuverlässigkeit der PCR Amplifikation durch Formaldehyd-Fixierung wurden unter anderem von DeGiorgi und Mitarbeitern (De Giorgi *et al.*, 1994) beschrieben, konnten in dieser Arbeit aber nicht beobachtet werden.

#### **D.1.4 Einschränkungen**

Für eine erfolgreiche Sortierung kann die anfängliche Häufigkeit der gewünschten Zelle relativ niedrig sein, vorausgesetzt, sie unterscheidet sich deutlich von anderen Zellen in ihren durchflußzytometrischen Eigenschaften. Im Falle des Spirillum war dies nur ca. 0,01%. Bei einer maximalen Sortiertrate von ca.  $5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  sind Zellen mit einer noch geringeren Häufigkeit jedoch schwer zu sortieren, da sich die Sortierzeit erheblich verlängert und es schwierig wird, ein vernünftiges Sortierfenster zu definieren. Diese Probleme können zum Teil durch zweimaliges Sortieren derselben Population umgangen werden. In einem ersten Schritt wird die gewünschte Zelle grob mittels eines großen Fensters angereichert, das die Definition eines genauen, engen Fensters im zweiten Lauf erlaubt.

### ***D.2 Zugänglichkeit der 16S-rRNA für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden***

Sonden werden schon seit geraumer Zeit eingesetzt, um eine schnelle *in situ*-Identifizierung von Organismen in Umweltproben durchzuführen. Kann die Zielregion einer Sonde für eine bestimmte Organismengruppe relativ leicht durch computergestützten Sequenzvergleich bestimmt werden, so ist die Funktionalität der Sonde noch lange nicht gewährleistet. Sekundärstrukturen innerhalb des Ribosoms können die Zugänglichkeit der rRNA-Moleküle

erheblich beeinflussen, wenn nicht gar vollständig blockieren. In der Vergangenheit war man gezwungen, durch Versuch und Irrtum die *in situ*-Eignung einer neu entwickelten Sonde zu testen oder auf bekanntermaßen zugängliche Stellen zurückzugreifen. Eine systematische Untersuchung der Zugänglichkeit der ribosomalen RNA, des wichtigsten Zielmoleküls für Oligonukleotidsonden, fehlte bisher. Ein Ansatz mit ähnlichem Ziel wurde zwar von Frischer und Mitarbeitern (Frischer *et al.*, 1996) verfolgt, es wurden aber nur 20 Sonden subjektiv auf ihre Helligkeit hin untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht, die Zugänglichkeit der 16S-rRNA auf voller Länge systematisch und quantitativ zu untersuchen.

### **D.2.1 Vorbedingungen**

Ziel dieser Studie war es, eine Karte der 16S ribosomalen RNA zu erstellen, mit deren Hilfe die *in situ*-Zugänglichkeit für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden abgeschätzt werden konnte (Fuchs *et al.*, 1998). Eine der wichtigsten Voraussetzungen dafür war, daß die sondenvermittelte Fluoreszenz nicht durch andere Parameter beeinflußt worden war, wie Sondenqualität und Dissoziationstemperatur, um nur die wichtigsten zu nennen. Es wurden nur carboxyfluoresceinmarkierte Sonden verwendet, die nach der hocheffektiven Festphasensynthese hergestellt und über HPLC-Säulen gereinigt worden waren. Anschließend wurden sie einer strengen Qualitätskontrolle unterzogen. Es wurden ausschließlich Sonden akzeptiert, deren Verhältnis der Absorptionen 260 nm / 496 nm möglichst nahe dem Verhältnis der theoretisch errechneten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{260} / \epsilon_{496}$ ) kam. Andererseits war es unmöglich, trotz der hohen Geschwindigkeit, mit der Fluoreszenzintensitäten quantitativ im Durchflußzytometer bestimmt werden können, die optimalen Hybridisierungsbedingungen für jede einzelne der Sonden zu bestimmen. Folglich wurden alle Sonden bei standardisierten Bedingungen eingesetzt. Die Qualität der gesammelten Daten beruhen deshalb auf zwei Annahmen:

- 1.) Sigmoides Bindungsverhalten der Sonden über der Stringenz
- 2.) Gültigkeit der 4 + 2-Regel zur Abschätzung der Dissoziationstemperatur

Um unsere Annahmen zu überprüfen, wurden in einem Vorversuch neun Sonden bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen und Stringenzen eingesetzt. Sechs der Sonden



zeigten optimale Signale bei 46°C, aber drei hatten ihr Maximum bei 41°C, obwohl ihre Schmelzpunkte auf 50°C und höher bestimmt worden waren. Trotzdem wurde die Standard-Hybridisierungstemperatur nicht verändert, da nämlich nicht alle Sonden sigmoides Bindungsverhalten zeigten. Wie bereits von Amann und Mitarbeitern 1992 (Amann *et al.*, 1992) beschrieben, kann die Sondenbindung knapp unter der Dissoziationstemperatur stärker sein als bei geringen Stringenzen. Man kann spekulieren, daß sich die Zugänglichkeit der Sondenzielregionen mit unterschiedlicher Stringenz ändert. Obwohl die einzelnen Unterschiede in den Hybridisierungsbedingungen von Sonde zu Sonde nicht ermittelt werden können, kann man dennoch argumentieren, daß dieser Effekt sekundär ist und sich die Klassifizierung der Sonden nur um maximal eine Helligkeitsklasse ändern würde, da die Hybridisierung bei 46°C mindestens 80% des maximalen Signals erreicht. Bei Betrachtung aller Faktoren, sollte man die gemessenen Fluoreszenzwerte für die mehr als 200 Sonden trotzdem mit einer gewissen Vorsicht lesen. Mit den oben beschriebenen Kontrollen sollten sie aber innerhalb von  $\pm 10\%$  der Sondenfluoreszenz von Eco1482 verlässlich sein und die Unterschiede in der Zugänglichkeit der 16S-rRNA widerspiegeln.

## **D.2.2 Zugänglichkeit versus Sekundärstruktur**

Aus Abbildung C.7 wird deutlich, daß sich die Zugänglichkeit oft stetig, teilweise aber auch abrupt und nicht vorhersehbar entlang der Primärstruktur der 16S-rRNA ändert. In jeder der drei Domänen finden sich alle Helligkeitsklassen an 16S-rRNA Sonden. Sonden, die gegen die Domäne I (Eco1-Eco541) gerichtet sind, haben mit durchschnittlich 42% bezogen auf die maximale Fluoreszenz von Eco1482 deutlich hellere Signale als Sonden, die gegen Domäne II (Eco548-Eco917) und III (Eco926-Eco1526) gerichtet sind und die durchschnittlich 32% bzw. 30% Helligkeit aufweisen. Interessanterweise befinden sich die fast unzugänglichen Zielregionen der Klasse VI oft an der Peripherie des Sekundärstrukturmodells in Schleifen (Abbildung C.7), während Regionen im Zentrum des Modells häufig offen für Sonden sind. Da für diese Studie zwei SONDENSÄTZE mit überlappenden Zielregionen entwickelt wurden, konnte nicht im Detail darauf geachtet werden, Sonden auf eine Seite der Helix zu beschränken und dadurch Selbstkomplementarität zu vermeiden. Folglich könnte auch die schlechte Bindung mancher dieser gegen Schleifen-Regionen gerichteten Sonden eher von Rückfaltung herrühren als von Unzugänglichkeit der Bindungsstelle. Die längste

Selbstkomplementarität von sieben möglichen internen Basenpaarungen wies Eco1006 (Helix 37) auf. Bei zwei weiteren Klasse-VI-Sonden, Eco1310 (Helix 47) und Eco1509 (Helix 50), können jeweils 6 Nukleotide des 5'-Endes mit denen des 3'-Ende paaren. Beachtet man aber, daß diese Sonden auf einer oder beiden Seiten von Sonden niedriger Helligkeitsklassen flankiert werden, so relativiert sich die Bedeutung der Selbstkomplementarität für die Signalstärke. Auch bei 11 Sonden, die 5 bzw. 4 interne Basenpaarungen besitzen, scheint die Rückfaltung eine untergeordnete Rolle zu spielen. Sie verteilen sich auf fast alle Helligkeitsklassen II bis VI. Darunter fällt auch EUB338, eine helle Klasse III-Sonde. Ohne jegliche Selbstkomplementarität dagegen sind Klasse-VI-Sonden, die gegen die Helices 18, 22 und 26 gerichtet sind.

### **D.2.3 Zugänglichkeit versus Konserviertheit**

In Abbildung D.1 wurden die sondenvermittelten Fluoreszenzwerte zusammen mit dem Konserviertheitsprofil gegen die entsprechenden Regionen des 16S-rRNA Moleküls aufgetragen. Mit Hilfe dieser Abbildung sollte es möglich sein, Zielregionen für hochspezifische und gleichzeitig helle Sonden für *in situ*-Hybridisierung leichter auszuwählen. Einige der Regionen mit höchster Variabilität zeigen gleichzeitig enge, aber dennoch starke Minima für die *in situ*-Zugänglichkeit. Dies erklärt möglicherweise den Mißerfolg bei vielen *in situ*-Hybridisierungsexperimenten. Häufig werden Sonden möglichst spezifisch für Arten oder Gattungen oder auch für bestimmte 16S-rDNA Sequenzen, die direkt aus der Umwelt isoliert worden sind, entwickelt. Diese Sonden zielen zwangsläufig auf die variableren Bereiche der 16S-rRNA, wie z. B. die Helices 6, 18 und 22. Obwohl diese Sonden hervorragend an extrahierter rRNA gebunden oder als PCR-Primer funktioniert haben, so kann doch keine Bindung an ganzen, fixierten Zellen erreicht werden. Ein Vergleich der *in situ*-Zugänglichkeit für *E. coli* und des Konserviertheitsprofils zeigt, daß Regionen mit hoher Variabilität häufig unzugängliche Regionen enthalten. In der Regel ist jedoch der variable Bereich breiter als die Region mit geringer Zugänglichkeit. Das heißt, daß eine hochvariable Region, die offensichtlich untauglich für eine Hybridisierung mit einer speziellen Sonde ist, durch Verschieben der Zielsequenz um nur wenige Nukleotide durchaus genutzt werden kann. Den Effekt des Verschiebens der Sondenzielregion wurde genauer bei den weniger konservierten Helices 6, 18 und 23 untersucht.

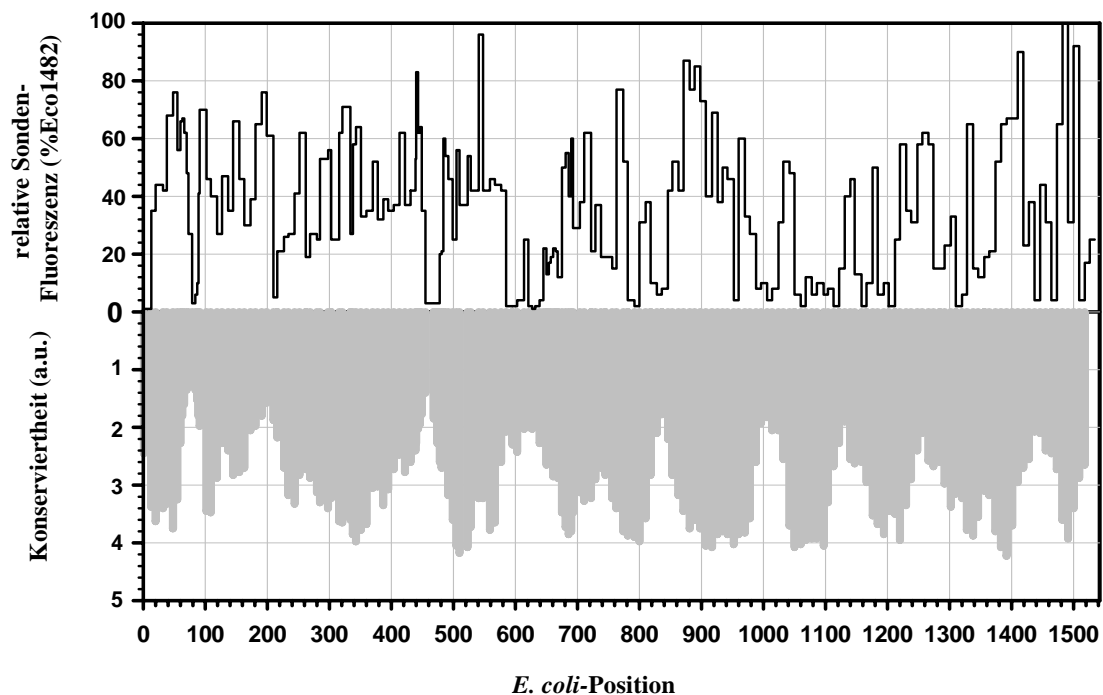


Abbildung D.1. Vergleich der relativen Sondenfluoreszenz (durchgezogene Linie) und der gemittelten Konserviertheit (grau-schattiert) aller gegen *E. coli*-gerichteten Sonden; Werte für die Konserviertheit wurden der ARB Datenbank (Strunk *et al.*, in Vorbereitung) entnommen und für die jeweiligen Sondenbindungsregionen berechnet; Konserviertheit basiert auf dem Vorhandensein gleicher Nukleotide an einer gegebenen Position für alle Bakterien im Alignment und wird als relative Einheiten (a.u.) angegeben; niedrige Werte bedeuten niedrige Konserviertheit;

### D.2.3.1 Helix 18

Helix 18 zeigte drastische Änderungen in der Zugänglichkeit. Da angenommen wurde, daß die für *E. coli* ermittelten Werte der *in situ*-Zugänglichkeit zu einem gewissen Grad auch für andere Spezies zutreffen, war es interessant, die Ergebnisse mit anderen Untersuchungen zu vergleichen. Die Sonde Nsv443 beispielsweise, spezifisch für die Genera *Nitrosolobus* sp., *Nitrosospira* sp. und *Nitrosovibrio* sp. (chemolithotrophe, Ammoniumoxidierer der  $\beta$ -Gruppe der *Proteobacteria*) zeigt helle *in situ*-Signale (Mobarry *et al.*, 1996), wo hingegen die Sonde Nsp452, die eine vergleichbare Spezifität besitzt, nur als PCR-Primer verwendet werden kann (Pommerening-Röser *et al.*, 1996) und trotz mehrfacher Versuche nicht für *in situ*-Hybridisierung funktionierte (G. Rath, persönliche Mitteilung). Unsere detaillierte Studie der

Helix 18 bei *E. coli* bestätigt diese Beobachtung. Eco440 gehört zur Klasse I, Eco455 dagegen fällt in Klasse VI und zeigt nur Hintergrundfluoreszenz.

#### **D.2.3.2 Helix 6**

Wie bei Helix 18 ist die Zugänglichkeit der Helix 6 im proximalen Stamm im Bereich der Sonden Eco60 und Eco70 auf der 5'-Hälfte und Eco89 und Eco91 auf der 3'-Hälfte gut. Der distale Teil der Helix einschließlich der Schleifenregion ist dagegen weit weniger zugänglich ,mit relativen Signalstärken von 3, 6 und 10% für Eco79, Eco84 bzw. Eco87. Nur die Sonde Eco79 besitzt gewisse Selbstkomplementarität – die 4 Nukleotide des 3'-Endes können rücfalten – wohingegen die Sonden Eco84 und Eco87 nur gegen die Schleifenregion und die 3'-Hälfte der Helix gerichtet sind und damit Selbstkomplementarität als Hauptgrund für niedrige Signalstärken ausgeschlossen werden kann. Die Intensitätsunterschiede der 10 Sonden zwischen Eco60 und Eco91 sind abgestuft (vgl. Tabelle F.1 im Anhang) und lassen darauf schließen, daß das Hauptproblem der Unzugänglichkeit bei *E. coli* zwischen Position 87 und 90 liegt. Hierbei ist schon der Umstand berücksichtigt, daß eine Fehlpaarung am Ende eines Hybrides generell weniger destabilisierend wirkt, als ein interner „Mismatch“ (Stahl and Amann, 1991). Die Bindung der Sonden Eco79, Eco84 und Eco87 sind offensichtlich nur in einer sehr schmalen Region behindert. Einige publizierte und erfolgreich eingesetzte Sonden, die gegen die Helix 6 von anderen Bakterien gerichtet sind, sparen genau diese Region aus, die bei *E. coli* blockiert ist und zielen entweder auf die 5'-Hälfte (MPA60, *Microthrix parvicella*, 60-77 (Erhart *et al.*, 1997); AER66, *Aeromonas* sp., 66-83 (Kämpfer *et al.*, 1996); Pst67, *Pseudomonas stutzeri*, 67-84 (Amann *et al.*, 1996); Hau66, *Herpetosiphon aurantiacus*, 66-84 (R. Amann, unveröffentlicht), oder den proximalen Teil der 3'-Hälfte (ARC94: 94-111 (Snaidr *et al.*, 1997)). Darunter sind Vertreter der  $\gamma$ -Untergruppe der *Proteobacteria* (*Aeromonas* sp., *P. stutzeri*) zu der auch *E. coli* gehört, aber auch zu *E. coli* nur entfernt verwandte Mitglieder der *Bacteria* (*Herpetosiphon aurantiacus*, *Chloroflexus*-Gruppe; *Microthrix parvicella*, Gram-positive mit hohem G+C Gehalt der DNA). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die für *E. coli* bestimmten *in situ*-Zugänglichkeiten für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden auch auf andere Mikroorganismen übertragbar sind.

### **D.2.3.3 Helix 22**

Ähnliches trifft für Sonden zu, die gegen Helix 22 gerichtet sind. Bei der Entwicklung von spezifischen Sonden gegen Helix 22 für verschiedenste Bakteriengruppen fiel auf, daß die Positionen 640-643 stets ein starkes Hindernis für Sondenbindung darstellten. Das bestätigte auch unsere Feinkartierung der Positionen 621-656. Eco621, Eco627 und Eco639 erreichten nur Hintergrundfluoreszenz, wohingegen Eco645 – dessen Zielsequenz benachbart lag – bereits eine erhöhte Fluoreszenzintensität von 22% aufwies. In ihren Reviews beschreiben Ehresmann und Mitarbeiter (Ehresmann *et al.*, 1990) sowie Malhorta und Harvey (Malhorta and Harvey, 1994) zahlreiche Interaktionen der Helix 22 mit den Proteinen S8, S16 und S17 der kleinen, ribosomalen Untereinheit. Besonders interessant für diese Arbeit ist in diesem Zusammenhang die Interaktion zwischen dem Protein S8 und den Nukleotiden an Position 642/643.

### **D.2.3.4 Helix 30**

Ein weiterer, kürzlich erschienener Bericht über die Konformation der 16S-rRNA stützt die hier beschriebenen Daten. Lodmell und Mitarbeiter (Lodmell and Dahlberg, 1997) postuliert einen Konformationsschalter im proximalen Stamm der Helix 30 während der mRNA – Translation. Der Schalter umfaßt die Positionen 885-890 und 910-912 und benötigt eine offene Konformation in der Umgebung. Tatsächlich konnten gute Zugänglichkeiten für Helix 30 und andere Kernregionen gefunden werden.

Die Korrelationen mit weiteren Sekundärstrukturdaten könnte noch beliebig fortgesetzt werden, war aber nicht Ziel dieser Studie. Außerdem sollte man bedenken, daß diese Studie an paraformaldehydfixierten Zellen durchgeführt worden ist, deren Ribosomen sich durchaus von nativen Ribosomen in der Konformation unterscheiden können. Außerdem wurde mit 18-meren hybridisiert, die die Zugänglichkeit zwangsläufig über größere Regionen hinweg integrieren.

### **D.2.3.5 Helix 23**

Ziemlich überraschend sind jedoch die geringen Zugänglichkeiten der 5'-Hälfte der Helix 23 in *E. coli*. Ein großer Teil aller in den letzten Jahren entwickelten Sonden ist gegen diese Region gerichtet (Amann *et al.*, 1995). Das hat zwei Gründe:

- 1.) Die Variabilität in dieser Region macht es einfach, eine Signatursequenz auf Gattungsebene zu finden;
- 2.) Die Zugänglichkeit ist meist sehr hoch, was in sehr hellen Sondersignalen resultiert;

Trotzdem lieferte die Quantifizierung von Sonden, die gegen die 5'-Hälfte der 16S-rRNA bei *E. coli* DSM30083<sup>T</sup> gerichtet waren, nur Werte zwischen 12% und 23% der Fluoreszenz von Eco1482. Drei andere Spezies, *A. calcoaceticus*, *Z. ramigera*, und *C. testosteroni*, zeigten sehr helle Signale, nachdem sie mit spezifischen Sonden quantifiziert wurden, die in genau dieser Region ihre Zielsequenz haben. Offensichtlich ist *E. coli* für Helix 23 ein schlechtes Modell für andere Bakterien. Obwohl die 16S-rRNA ein hochkonserviertes Molekül ist, gibt es offensichtlich bei ähnlicher Sekundärstruktur Unterschiede in den Strukturen höherer Ordnung, die um so ausgeprägter sein können, je entfernter verwandt die beiden Organismen sind. Bestimmte Sonden-Zielregionen, die in einem Organismus zugänglich sind, können in einem anderen deletiert sein, und ausgehend von der vorliegenden *E. coli*-Karte, kann natürlich nichts über etwaige Insertionen in anderen Phyla abgeleitet werden.

Aufgrund dieser limitierten Übertragbarkeit der 16S-rRNA Zugänglichkeit wird es auch weiterhin notwendig bleiben, eine neu entwickelte Sonde an Referenzorganismen zu testen, bevor man sie für die Untersuchung von Umweltproben einsetzt. Die in dieser Arbeit erstellte Zugänglichkeitskarte hilft aber hoffentlich dabei, die Zahl der Fehlschläge in der Sondenentwicklung zu verringern. Da die 23S rRNA aufgrund ihres höheren Informationsgehalts ebenfalls als Zielmolekül für die Sondenentwicklung interessant ist und gegebenenfalls eine feinere phylogenetische Auflösung erlaubt (vgl. Ludwig *et al.*, 1998), wäre es wünschenswert, auch diese zu kartieren.

## ***D.3 Anwendung durchflußzytometrischer Methoden im Kontext ökologischer Studien – Chancen und Grenzen***

### **D.3.1 Populationsanalyse von natürlichen Wasserproben im Durchflußzytometer**

Die Geschwindigkeit, mit der Proben vermessen werden können, prädestiniert die Durchflußzytometrie dazu, die Mikroskopie bei der Auswertung von *in situ*-Hybridisierungen an Umweltproben abzulösen. Das beschwerliche mikroskopische Zählen von einigen hundert hybridisierten Zellen für jede spezifische Oligonukleotidsonde entfiel zugunsten einer objektiveren und schnelleren Analyse von mehreren zehntausend Zellen im Durchflußzytometer. Somit wäre ein höherer Probendurchsatz möglich, der wiederum eine dichtere Beprobung des Habitats und somit eine genauere Auflösung der Populationsdynamik erlaubt. Über die Intensität des Sondensignals könnte auf die physiologische Fitneß der Mikroorganismen geschlossen werden. Die Möglichkeit einer anschließenden Sortierung erlaubte darüber hinaus den Zugriff auf ökologisch wichtige Schlüsselpopulationen.

#### ***D.3.1.1 Wahl der Methode***

Für die phylogenetische Charakterisierung von Wasserproben aus eutrophen bis oligotrophen Systemen mit spezifischen, rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden wurde bisher die Probe auf Filtern aufkonzentriert, hybridisiert und im Mikroskop ausgewertet. Für die Durchflußzytometrie stand nur ein Protokoll zur Hybridisierung in Suspension zur Verfügung, das wegen der darin enthaltenen Zentrifugationsschritte nicht geeignet für oligotrophe Wasserproben war (Wallner *et al.*, 1993, Wallner *et al.*, 1995). Um kleine Zelltypen unter 1,0 µm zu erhalten - oft die dominierende Zellgröße in natürlichen Gewässern - müßte sehr lange bzw. mit hohen Zentrifugalkräften zentrifugiert werden. Ein Teil der großen Zellen könnte unter diesen hohen Beschleunigungen lysieren und damit die Zusammensetzung der Population verschieben. Tangentialflußfiltration als Alternative wurde ebenfalls wegen ihrer Größenselektivität und wegen geringer Wiederfindungsraten verworfen (vgl. hierzu Meier, 1997). Als Methode kam – nicht zuletzt wegen ihrer Einfachheit - die Hybridisierung auf Filtern mit anschließender Rückwaschung in ein kleines Volumen in Betracht. Vorversuche mit natürlichen Proben zeigten hohe Wiederfindungsraten und eine nur

sehr geringe Größenselektivität. Polycarbonatfilter schienen gegenüber anderen Filtertypen wie Teflon und Polysulfon die besten Wiederfindungsraten zu zeigen.

#### ***D.3.1.2 Vergleich Mikroskopie - Durchflußzytometrie***

Die mikroskopisch bestimmten Verteilungen der phylogenetischen Gruppen von zwei Süßwasserhabitaten unterschieden sich deutlich von denen im Durchflußzytometer.

Die Diskrepanzen sind hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß in beiden Fällen der Systemschwellenwert (Threshold) im Vorwärtsstreulicht gesetzt wurde. Dadurch entgingen vor allem die kleinen und kleinsten Bakterien mit Größen  $< 1 \mu\text{m}$  mit ihren geringen Streulichtsignalen der Analyse. Das Verhältnis verschob sich so zugunsten großer Zellen. Dies belegt auch der überhöhte Anteil der  $\beta$ -Proteobakterien im Nymphenburger Kanal, die in dieser Probe Zellgrößen von meist über  $1 \mu\text{m}$  aufwiesen. Aufgrund ihres hohen Ribosomengehalts zeigten sie hohe Hybridisierungssignale und setzten sich deutlich vom Hintergrund ab. Im Piburger See, der zum Zeitpunkt der Probennahme mit Eis bedeckt war und relativ kleine Bakterien mit geringem Ribosomengehalt enthielt, wurden generell weniger sondenpositive Zellen gefunden.

Eine Umstellung des Geräts auf Konfiguration 2 (Laser 1: UV; Laser 2: 532 nm; vgl. C.4) ermöglichte es, den Schwellenwert für die Fluoreszenz des DNA-Farbstoffs DAPI zu setzen. Selbst kleinste Bakterien mit Zellgrößen bis nahe der optischen Auflösungsgrenze konnten jetzt durch das hohe Signal-Rausch-Verhältnis des DNA-Farbstoffs DAPI von bis zu 1:100 mit in die Analyse einbezogen werden. Die Detektionsrate, definiert durch das Verhältnis der sondenpositiven zu DAPI-gefärbten Zellen, verbesserte sich jedoch nicht gegenüber Konfiguration 1, im Gegenteil, sie verschlechterte sich sogar noch. Eine andere Einschränkung zeigte sich nun deutlich: Die niedrigere Sensitivität des Durchflußzytometers im Vergleich zum Mikroskop (vgl. hierzu auch D.3.2). Zwar konnten durch das sehr helle DAPI auch kleine Zellen deutlich über die Sensitivitätsschwelle des Durchflußzytometers gebracht werden, die Hybridisierungssignale kleiner Bakterien mit niedriger Ribosomenzahl waren aber zu schwach und konnten nicht mehr vom Hintergrund unterschieden werden. Dadurch nahm die Detektionsrate ab. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher versucht, die sondenvermittelte Fluoreszenz zu erhöhen.



### ***D.3.1.3 Signalamplifikation***

Die Hybridisierung von peroxidasemarkierten Sonden und anschließender Inkubation eines fluoresceinmarkierten Tyramidsubstrats (TSA) kann die sondenvermittelte Fluoreszenz erhöhen. Vorversuche mit kultivierten *E. coli* Zellen auf Objektträgern zeigten bis zu 10-fach, in einzelnen Fällen sogar bis zu 20-fach höhere Fluoreszenz gegenüber der Standardhybridisierung mit einfach fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (Schönhuber *et al.*, 1997). Diese Steigerung der Fluoreszenzintensität war genau in der Größenordnung, um nach Hybridisierung auch kleine Zellen aus Umweltproben mit niedrigem Ribosomengehalt vom Hintergrund deutlich abtrennen zu können.

*E. coli*-Zellen aus der lag-Wachstumsphase hatten absolut die höchsten Fluoreszenzsignale nach Hybridisierung mit peroxidasemarkierten Sonden und Inkubation mit Tyramidsubstrat. Sie lagen damit auch im Durchflußzytometer zehnfach über den Signalen von einfachmarkierten Oligonukleotidsonden. Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase lagen unter dem Niveau von Zellen aus der lag-Phase. Aufgrund der hohen Zellteilungsrate hinkte möglicherweise die Synthese der Ribosomen etwas hinterher, so daß die elongierten log-Zellen einen geringeren Ribosomengehalt pro Zellvolumen besaßen, der sich dann auch in niedrigerer Signalintensität niederschlug. Zur Hybridisierung wurden bevorzugt PFA-fixierte Zellen verwendet, die mit Lysozym behandelt waren. Mit dieser Methode konnten sogar Zellen aus der stationären Wachstumsphase angefärbt werden, wohingegen nach Ethanolfixierung dieser Zelltyp nicht mehr zugänglich für peroxidasemarkierte Sonden war. Auch im Sinne einer homogenen Signalverteilung (Standardabweichung der Einzelmessung) lagen die Vorteile eindeutig bei PFA-fixierten und Lysozym-behandelten Zellen. Ein deutlicher Nachteil der Methode ist, daß unabhängig von der Fixierung etwa ein Viertel der Zellen, im Extremfall sogar bis zu 40%, nicht angefärbt werden. Möglicherweise sind diese Zellen aufgrund dickerer Zellwände nicht zugänglich für POD-markierte Sonden, oder befanden sich bereits im Stadium der Zellyse. Auch die Möglichkeit einer unvollständigen Resuspendierung nach den Zentrifugationsschritten muß in Betracht gezogen werden, so daß die POD-markierte Sonde oder das Tyramidsubstrat keinen Zugang zu Zellen innerhalb von Klümpchen hatte, die deswegen nicht gefärbt wurden.

Um auch natürliche Wasserproben untersuchen zu können, wurde die Methodik der Tyramid-Signal-Amplifikation auf Filter übertragen und mit marinen Isolaten ausgetestet. Der in den

Zelldimensionen mit *E. coli* vergleichbare *Vibrio*-Stamm zeigte tatsächlich ähnlich hohe Signalamplifikation um den Faktor 10 wie sein phylogenetischer Vetter. Das sehr kleine *Cytophaga*-Isolat (0,7 µm x 0,3 µm) zeigte dagegen nach Standardhybridisierung wie auch mit TSA-Amplifikation Signale, die nur ca. 2-fach erhöht über dem Hintergrund lagen. Die *Cytophaga* sp. – Kultur wurde für diesen Versuch unter nährstofflimitierenden Bedingungen gezogen, so daß ein möglichst mit natürlichen Bakterien vergleichbarer Zelltyp zur Verfügung stand. Daraus resultierte ein niedriger Ribosomengehalt, wie die Hybridisierung mit einfachmarkierten Sonden zeigte. Gleichzeitig wurde offensichtlich aber auch die Zellwand für die um ein vielfaches größeren peroxidase markierten Sonden undurchlässiger.

Natürliche Proben waren erst nach sukzessiver Behandlung mit Lysozym und Proteinase K zugänglich. Nach mikroskopischer Auswertung konnten so ca. 10-14% aller DAPI-positiven Zellen im Belebtschlamm bzw. einer Algenbegleitflora mit peroxidase markierter EUB338-Sonde gefärbt werden. Eine längere Inkubation mit Proteinase K führte nicht zu verbesserter Detektion, die Fraktion an lysierten Zellen nahm dagegen zu. Ein weiteres Problem zeigte sich, als die hybridisierten und gefärbten Belebtschlammproben bzw. Algenbegleitflora vom Filter abgewaschen und im Durchflußzytometer analysiert wurden. Es konnte nur noch Zelldebris detektiert werden. Vermutlich sind durch die harschen Scherkräfte während des Schüttelns die ohnehin angeschlagenen Zellen vollends geborsten. Möglicherweise wären diese Zellen vor Resuspension nochmals durch Fixieren mit Paraformaldehyd zu festigen.

Insgesamt legt diese Studie denn Schluß nahe, daß bei gegebener Vorbehandlung immer nur ein bestimmter Prozentsatz an Zellen für peroxidase markierte Sonden zugänglich ist. Die Lyse des zur Kontrolle mitgeführten *Vibrio*-Stamms belegt dies eindrucksvoll. Je nachdem, ob man die Bedingungen milder oder härter wählt, wird die eine oder andere Zellpopulation zugänglich werden bzw. lysieren. So müßten also für jeden in einer Probe enthaltenen Zelltyp die Bedingungen vorher exakt eingestellt werden. Auf diese Weise ist es vielleicht möglich, qualitative Untersuchungen von definierten Organismen auch im Durchflußzytometer durchzuführen (F.-O. Glöckner, W. Schönhuber, persönliche Mitteilung), eine quantitative Analyse für größere Gruppen ist mit dieser Methodik jedoch aussichtslos. Eine weitere Verbesserung dieser Technik wurde daher in dieser Arbeit nicht mehr verfolgt.

#### ***D.3.1.4 Neuentwickelte Fluoreszenzfarbstoffe***

Ein Ausweg aus diesem Dilemma bot sich durch die Verwendung neuentwickelter und jüngst auf den Markt gekommener Farbstoffe der Firma Molecular Probes an. Dabei handelt es sich um sulfonierte Rhodaminderivate, die – laut Hersteller für Alexa 546 – eine bis zu 3-fach höhere Fluoreszenzintensität gegenüber CY3 erzielen sollten. Von den fünf erhältlichen Alexa-Farbstoffen wurden drei getestet. Alexa 488 ähnelt in seinen spektralen Eigenschaften Carboxyfluorescein (FLUOS), Alexa 532 und Alexa 546 sind mit CY3 vergleichbar. Nach Hybridisierung zeigte Alexa 488 26% höhere Fluoreszenzsignale als die Hybridisierung mit FLUOS-markierten Sonden. Die photometrische und gelelektrophoretische Analyse deutete darauf hin, daß nur jedes zweite Oligonukleotid tatsächlich markiert war. Durch Ausschneiden aus dem Polyacrylamidgel könnte man die korrekt markierte Sonde von unmarkiertem Oligonukleotid abtrennen. Für eine Hybridisierung mit der gereinigten Sonde würde man ca. 50% hellere Fluoreszenzsignale als mit FLUOS-markierten Oligonukleotidsonden erwarten. Für die Durchflußzytometrie bietet dieser Farbstoff trotzdem zuwenig Fluoreszenzausbeute, um die Detektionsrate deutlich zu erhöhen. Für die mikroskopische Analyse könnte Alexa 488 in Zukunft aber eine echte Alternative zu FLUOS-markierten Sonden werden.

Obwohl der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon = 80.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) deutlich unter dem von CY3 liegt, zeigten Alexa 546 – Sonden nach Hybridisierung ein Drittel höhere Fluoreszenz als CY3-markierte Oligonukleotide ( $\epsilon = 150.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Allgemein bestimmen molarer Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) und Quantenausbeute ( $\Phi$ ) die Fluoreszenzintensität eines Farbstoffs. Ist das Produkt aus  $\epsilon$  und  $\Phi$  groß, hat der Farbstoff eine hohe Fluoreszenz. Verglichen mit CY3, dem momentanen „Goldstandard“ der Fluoreszenzmarkierung, haben die Alexa-Farbstoffe deutlich niedrigere  $\epsilon$ -Werte. Soll aber die Fluoreszenz 3-fach höher sein als CY3, muß zwangsläufig die Quantenausbeute von Alexa bedeutend höher sein, als von CY3. Für CY3-Proteinkonjugate gibt Amersham eine Quantenausbeute von 15% an. Alexa 546 –müßte rechnerisch mindestens  $\Phi = 0,28$  aufweisen, um wenigstens genauso hell wie CY3 zu sein, für eine dreifach höhere Fluoreszenz entsprechend  $\Phi = 0,84$ . Der Hersteller Molecular Probes macht aber leider keine Angaben, wie hoch die Quantenausbeuten tatsächlich sind.

Ein weiterer, in seinen Fluoreszenzeigenschaften CY3 ähnlicher Farbstoff, Alexa 532, färbte dagegen tatsächlich um den Faktor 3 heller als CY3. Die Kontrolle bewies jedoch die unspezifische Färbung aller Zellen. Dies ist womöglich auf Verunreinigungen der Farbstoff-Charge zurückzuführen. Da die Farbstoffe noch relativ neu sind, sind auch die Synthesewege noch nicht sehr ausgereift, das heißt, daß mögliche Isomere des Farbstoffs enthalten sein können, die sich zwar an das Oligonukleotid binden lassen, aber sich nicht wie das eigentlich gewünschte Produkt weitgehend inert verhalten, sondern unspezifisch färben (M. Resmini, Interactiva, pers. Mitteilung; Shapiro, 1995).

### **D.3.2 Einschränkungen in der Sensitivität des FACStar Plus**

#### ***D.3.2.1 Stand der Technik***

Trotz der erzielten erheblichen Sensitivitätsgewinne in der Vorwärtsstreulicht- und DAPI-Detektion und trotz Verwendung hocheffektiver Farbstoffe konnte die Detektion von sondenvermittelter Fluoreszenz nicht wesentlich verbessert werden. Wie erklären sich diese eklatanten Unterschiede in der Sensitivität zwischen Mikroskop und Durchflußzytometer?

Der Grund dafür liegt in der Optik. Die im FACStar Plus verwendete Sammellinse besitzt eine 40-fache Vergrößerung und eine numerische Apertur von nur 0,4. Gute Ölimmersionsobjektive an Mikroskopen haben dagegen numerische Aperturen von 1,3-1,4. Tatsächlich wurden schon 1979 von Steen und Lindmo (Steen and Lindmo, 1979) Immersionsobjektive in Durchflußzytometer eingebaut. Im Gegensatz zu einem „stream-in-air“-Gerät wie dem FACStar Plus, läuft in solchen reinen Analysegeräten der Wasserstrahl in einer Küvette bzw. wird auf ein Deckgläschen gelenkt, was die Verwendung von Immersionsobjektiven ermöglicht. Dadurch sind vergleichbare optische Bedingungen wie in einem Mikroskop geschaffen worden. In solchen Systemen ist es möglich, neben kleinsten Mikroorganismen (Button *et al.*, 1996, Schut *et al.*, 1993), auch Viren (Sanders *et al.*, 1991) und DNA-Fragmente zu analysieren. Letzteres soll sogar die Gelelektrophorese von großen DNA-Fragmenten ablösen (Huang *et al.*, 1996).

Für die Tröpfchen-Sortierung, wie sie im FACStar Plus verwirklicht ist, muß der Wasserstrahl aber frei in der Luft laufen. Die Lichtsignale von Partikeln, die im Abfragepunkt den

Laserstrahl passieren, werden über eine große Distanz von ca. 2 cm hinweg detektiert. Arbeitsabstand eines Objektivs und numerische Apertur sind aber Parameter, die reziprok voneinander abhängen: hohe numerische Apertur bedingt kurzen Arbeitsabstand bzw. großen Öffnungswinkel des Objektivs und umgekehrt. Es gibt zwar andere Sortiermodi, die mechanisch funktionieren und die den Einsatz von Immersionsoptiken erlauben (verwirklicht z.B. im FACS Calibur), mit ihnen erreicht man aber bei weitem nicht die Geschwindigkeit und Reinheit der Sortierung wie im FACStar Plus und verdünnt die sortierte Fraktion in einem großen Volumen (Mechanische Sortierung  $10^4$  Zellen in 60 ml gegenüber Tröpfchensortierung  $10^4$  Zellen in 60  $\mu$ l!). Ideal wäre eine Kombination aus hochsensitiver Küvettedetektion und Tröpfchen-Sortierung. Prototypen sind angeblich bei Becton-Dickinson in der Entwicklung.

#### ***D.3.2.2 Zukünftige Entwicklungen***

Der enorme Fortschritt in der Optik und in der Elektronik bringt es mit sich, daß die Technik, die in einem FACStar Plus oder einem vergleichbarem Gerät Verwendung findet, bereits als veraltet gilt. Die aufwendige Justierarbeit zu Beginn jeder Sitzung könnte z.B. durch die Einspiegelung der Laser mittels Glasfaser entfallen. Die Halbleitertechnik bietet sicher in absehbarer Zukunft kleine und leistungsstarke Laser, die das gesamte Spektrum von UV bis Infrarot abdecken. Man bräuchte dann keine großen, kostspieligen Laser mit Wasserkühlung, sondern käme mit kleineren Leistungen aus. In Kombination mit hochwertigen Objektiven würde das ein enormes Plus an Sensitivität bedeuten. Selbstverständlich stehen high-quality Filtersätze, stabile optische Bänke und kurze optische Wege ebenfalls ganz oben auf der Wunschliste. Neuentwicklungen wie z.B. hochsensitive Photomultiplier oder CCD-Kameras sind ebenfalls schon in manchen Labors in der Testphase. Ein interessanter Aspekt wäre die standardmäßige Realisierung der zeitaufgelösten Fluoreszenz, die so gut wie keinen Hintergrund mehr zeigt (Klocke, 1996). Die Kombination von zwei Thresholdkanälen würde erlauben, die tatsächlichen Störsignale besser auszugrenzen. Dies ist bereits in manchen Geräten realisiert worden (Cytomation, Fort Collins, USA). Ein optimales Gerät für beides, hochauflösende Analyse und Sortierung in einem kleinen Volumen, gibt es heute (noch) nicht.

### D.3.3 Sortieren nach physiologischen Parametern

Die mangelhafte Sensitivität der heute zur Verfügung stehenden Durchflußzytometer erlaubt es nicht, mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden hybridisierte Zellen aus natürlichen Gewässern quantitativ zu analysieren. Ein anderes Konzept könnte dagegen die herausragenden Eigenschaften der Durchflußzytometrie, wie Sortieren, quantitative Messung der Fluoreszenz und hoher Probendurchsatz, mit der hervorragenden optischen Auflösung der neuen Mikroskope kombinieren. Eine Probe wird zuerst nach funktionellen Parametern wie DNA- oder Protein-Gehalt im Durchflußzytometer analysiert. Zahlreiche Farbstoffe wie DAPI oder Fluoresceinisothiocyanat mit hohen Signal-Rausch-Verhältnissen stehen dafür zur Verfügung. Wertet man z.B. Zellen mit hohem DNA-Gehalt als aktiv, so können diese Populationen aussortiert, auf Filtern aufkonzentriert und mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden die phylogenetische Zugehörigkeit bestimmt werden. Neben der Phylogenie kann so die Physiologie auf Einzelzellebene quantitativ bestimmt werden.

Eine einfache Verdünnungskultur mit marinem Probenmaterial zeigte ohne Zusatz von Nährstoffe Wachstum. Bei der Filtration wurden anscheinend von lysierten Zellen soviel Nährstoffe freigesetzt, daß ein Teil der bakteriellen Lebensgemeinschaft sich vermehren konnte. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl zeigte, daß nach 96 h alle Kulturen sich auf eine Zelldichte von  $1 - 3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  eingependelt hatten. Dies bedeutete, daß in der 1:100 verdünnten Wasserprobe die Mikroorganismen trotz des geringen Nährstoffangebots am stärksten gewachsen waren (ca. 6-7 Generationen), dagegen in der unverdünnten Probe kein Wachstum bzw. sogar eine Abnahme der Gesamtpopulation festzustellen war. Nach weiterer Inkubation setzten sich offensichtlich Räuber durch, da das durchflußzytometrische Bild immer mehr Debris zeigte. Es gibt also offensichtlich eine Kapazitätsgrenze, die binnen 4 Tagen erreicht wird (z.B. Azam *et al.*, 1983).

Je mehr Wachstum stattgefunden hatte, desto mehr fiel eine Population auf, die ungefähr die fünffache DNA-Menge gegenüber der Population zu Inkubationsbeginn hatte. In der unverdünnten Kultur fehlte sie, während sie in der am stärksten verdünnten Kultur (1:100) auch am deutlichsten zu detektieren war. Der Schluß lag nahe, daß hier die aktiven Zellen zu finden waren. Nach Sortierung und Hybridisierung dieses Zelltyps mit gruppenspezifischen Sonden konnte ein hoher Anteil an Zellen der  $\gamma$ -Gruppe der *Proteobacteria* detektiert werden. Vergleicht man die Zählungen der nicht-sortierten mit der sortierten Fraktion, so ergibt sich

für beide Verdünnungsstufen eine um den Faktor 3-4 höhere Abundanz der  $\gamma$ -Proteobakterien in der sortierten Population. Entsprechend müßten die Häufigkeiten der Populationen mit niedrigem DNA-Gehalt deutlich unter dem Wert für die Gesamtpopulation sein. Aber auch verglichen mit der fixierten, nicht-inkubierten Originalprobe stieg der Anteil der  $\gamma$ -Proteobakterien in den Verdünnungsstufen. Durch Sortierung konnte bewiesen werden, daß die DNA-reiche Population der Originalprobe einen mehr als doppelt so hohen Anteil an CF319a-positiven Zellen hatte als die Gesamtheit der Probe. Der Anteil der  $\gamma$ -Gruppe der *Proteobacteria* blieb in der sortierten wie nicht sortierten Population auf etwa gleichem Niveau, das heißt nur ein Teil der  $\gamma$ -Proteobakterien war zu diesem Zeitpunkt aktiv. Es konnte mit diesem einfachen Experiment eine Verschiebung von den in der Originalprobe dominierenden *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* zur  $\gamma$ -Gruppe der *Proteobacteria* durch Kultivierung festgestellt werden. Ein ähnlicher „shift“ von den  $\beta$ - zu den  $\gamma$ -Proteobakterien konnte schon früher für Belebtschlamm gezeigt werden (Wagner *et al.*, 1993).

Der Vorteil der Sortierung gegenüber der einfachen *in situ*-Hybridisierung auf Filtern ist, daß man eine metabolisch aktive Zellpopulation bereits kurz nach deren Aktivierung detektieren und eindeutig phylogenetisch charakterisieren kann. Bedenkt man, daß DAPI auch als Lebendfarbstoff eingesetzt werden kann, so können Zellen sogar lebend aus einem komplexen Gemisch für die Kultivierung angereichert werden.

Die zusätzliche Einführung eines Proteinfarbstoffs könnte eine weitere, wichtige Information über die Aktivität der einzelnen Zelle liefern. Die Fluoreszenz könnte man direkt mit dem Proteingehalt der Zelle korrelieren, der wiederum mit der Biomasse eng verknüpft ist. So könnte man bald die schwer quantifizierbaren Streulichtparameter entbehren und hätte eine schnelle Biomassenabschätzung auf Einzelzellebene.

Für sortierte Zellen stehen natürlich neben der *in situ*-Hybridisierung auf Filtern alle PCR-basierenden Techniken der Molekularbiologie offen, angefangen von Fingerprinting-Methoden wie RFLP (random fragment length polymorphism), ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), DGGE (denaturing gradient gelelectrophoresis), bis hin zur Klonierung und Sequenzierung auch ganzer Genome.

Dieser Ansatz zeigt eindrucksvoll das enorme Potential der durchflußzytometrischen Sortierung. Man trifft eine Vorauswahl nach physiologischen Parametern, die die Diversität

sinnvoll auf eine Teilmenge der gesamten Lebensgemeinschaft beschränkt, und reichert sie durch Sortierung hoch an. So erhält man eine genauere Auflösung der Teilpopulation und kann in einem späteren Ansatz die so gewonnenen Daten zu einem Gesamtbild zusammenfügen.



## E. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Methoden zur durchflußzytometrischen Analyse der Diversität und Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften des Wasser zu entwickeln. Dabei standen drei Teilaspekte im Mittelpunkt: (1) Die durchflußzytometrische Sortierung von Bakterien für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen. (2) Die *in situ*-Zugänglichkeit der 16S-rRNA ganzer, fixierter Zellen von *Escherichia coli* für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. (3) Die Verbesserung der durchflußzytometrischen Analyse natürlicher Wasserproben nach *in situ*-Hybridisierung.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß ausgewählte Zelltypen mit hoher Reinheit aussortiert und hoch angereichert werden können. Von den sortierten Zellen konnten mittels Polymerasekettenreaktion, kurz PCR, die 16S ribosomale DNA amplifiziert, kloniert und sequenziert und die verwandtschaftliche Zugehörigkeit bestimmt werden.

Die *in situ*-Hybridisierung ist oft limitiert durch geringe Fluoreszenzintensitäten. Neben der Durchlässigkeit der Zellwand und niedrigem Ribosomengehalt kann die dreidimensionale Struktur des Ribosoms die Zugänglichkeit für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide herabsetzen. In zweiten Teil wurden ca. 200 Oligonukleotidsonden, deren Bindungsregionen die gesamte 16S ribosomale RNA von *Escherichia coli* DSM 30083<sup>T</sup> abdeckten, in Bezug auf ihre sondenvermittelte Fluoreszenz im Durchflußzytometer quantifiziert. Dabei zeigten sich, wie erwartet, dramatische Unterschiede. Die Intensität der hellsten Sonde war 1,7-fach höher als die der häufig benutzten EUB338 und 44-mal heller als die der schwächsten Sonde, Eco468. Eine detailliertere Analyse definierter Bereiche mit zusätzlichen Sonden zeigte, daß schon eine kleine Verschiebung der Sondenbindungsregion um nur wenige Basen in einer Abnahme der Zellfluoreszenz von >80% auf <10% resultieren kann. Die erstellte Karte für die Zugänglichkeit von 16S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden sollte die Auswahl einer geeigneten Sondenbindungsregion in Zukunft erheblich erleichtern.

Im dritten Teil der Arbeit wurde versucht, die im Vergleich zu leistungsstarken Epifluoreszenzmikroskopen immer noch eingeschränkte Sensitivität von Durchflußzytometern zu verbessern bzw. Signalverstärkungssysteme auf die durchflußzytometrische Analyse anzupassen. Dabei zeigten sich die Grenzen der aktuellen Technologie für die direkte Analyse oligotropher Wasserproben. Die Kombination gezielter durchflußzytometrischer Sortierung mit nachfolgender mikroskopischer Analyse erlaubt aber schon heute anders nicht durchführbare Untersuchungen der Diversität und Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft aquatischer Systeme.

## F. Anhang

### 1.) Auflistung aller Sonden, die für die Zugänglichkeitsstudie der 16S ribosomalen RNA von *Escherichia coli* DSM30083<sup>T</sup> entwickelt und eingesetzt wurden.

Sonde	<i>E. coli</i> position 5' → 3' <sup>a</sup>		Sondensequenz 5'->3'	relative Sondenfluoreszenz (% Eco1482) <sup>b</sup>	Helligkeitsklasse <sup>c</sup>
Eco1	1	19	TGATCAAACCTTCAATTT	1	VI
Eco13	13	31	CAATCTGAGCCATGATCAA	35	IV
Eco20	20	37	AGCGTTCAATCTGAGCCA	44	III
Eco32	32	47	GCCTGCCGCCAGCGTT	42	III
Eco38	38	54	GTGTTAGGCCTGCCGCC	68	II
Eco48	48	65	TCGACTTGCATGTGTAG	76	II
Eco55	55	72	TTACCGTTCGACTTGCAT	56	III
Eco60	60	77	TCCTGTTACCGTTCGACT	66	II
Eco63	63	80	GCTTCCTGTTACCGTTCG	67	II
Eco66	66	83	GCTGCTTCCTGTTACCGT	62	II
Eco70	70	88	AGCAAGCTGCTTCCTGTTA	48	III
Eco73	73	90	GCAGCAAGCTGCTTCCTG	27	IV
Eco79	79	96	CAGCAAAGCAGCAAGCTG	3	VI
Eco84	84	101	TCGTGAGCAAAGCAGCAA	6	V
Eco87	87	104	CACTCGTCAGCAAAGCAG	10	V
Eco89	89	106	GCCACTCGTCAGCAAAGC	41	III
Eco91	91	108	CCGCCACTCGTCAGCAA	70	II
Eco102	102	118	ACTCACCCGTCGCCAC	46	III
Eco109	109	126	CAGACATTACTACCCGT	40	IV
Eco119	119	136	GGCAGTTTCCCAGACATT	27	IV
Eco127	127	144	CTCCATCAGGCAGTTTCC	47	III
Eco137	137	154	AGTTATCCCCCTCCATCA	35	IV
Eco145	145	162	TTTCCAGTAGTTATCCCC	66	II
Eco155	155	172	TTAGCTACCGTTTCCAGT	46	III
Eco163	163	180	ATGCGGTATTAGCTACCG	30	IV
Eco173	173	190	TTGCGACGTTATGCGGTA	39	IV
Eco181	181	198	CTTTGGTCTTTCGACGTT	65	II
Eco191	191	209	AAGGTCCCCCTCTTTGGTC	76	II
Eco199	199	215	GGCCCTAAGGTCCCCCT	61	II
Eco210	210	226	CGATGGCAAGAGGCCCG	5	VI
Eco216	216	233	GCACATCCGATGGCAAGA	21	IV
Eco227	227	243	TCCCATCTGGGCACATC	26	IV
Eco234	234	251	CTAGCTAATCCCATCTGG	27	IV
Eco244	244	261	ACCCACCTACTAGCTAA	41	III
Eco252	252	268	AGCCGTTACCCACCTA	62	II
Eco262	262	279	TCGCCTAGGTGAGCCGTT	19	V
Eco269	269	285	GGATCGTCGCCTAGGTG	27	IV

(Fortsetzung)

Sonde	<i>E. coli</i> position 5' → 3' <sup>a</sup>		Sondensequenz 5'→3'	relative Sonden- fluoreszenz (% Eco1482) <sup>b</sup>	Helligkeits- klasse <sup>c</sup>
Eco280	280	297	CAGACCAGCTAGGGATCG	25	IV
Eco285	285	302	CCTCTCAGACCAGCTAGG	53	III
Eco298	298	315	TGTGGCTGGTCATCCTCT	56	III
Eco303	303	320	TCCAGTGTGGCTGGTCAT	25	IV
Eco316	316	333	ACCGTGTCTCAGTTCCAG	62	II
Eco321	321	338	TCTGGACCGTGTCTCAGT	71	II
Eco334	334	350	CTCCCGTAGGAGTCTGG	27	IV
Eub338	338	353	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	58	III
Eco343	343	359	CACTGCTGCCTCCCGTA	64	II
Eco351	351	369	CAATATCCCCACTGCTGC	33	IV
Eco360	360	377	CCATTGTGCAATATTCCC	35	IV
Eco370	370	386	GGCTTGCGCCCATTTGTG	52	III
Eco378	378	394	CTGCATCAGGCTTGCGC	32	IV
Eco387	387	403	GCGGCATGGCTGCATCA	39	IV
Eco395	395	412	TTCATACACGGGCATGG	35	IV
Eco404	404	421	AAGGCCTTCTTCATACAC	37	IV
Eco413	413	429	TACAACCCGAAGGCCTTC	62	II
Eco422	422	439	AAAGTACTTTACAACCCG	37	IV
Eco431	431	448	TCCCCGCTGAAAGTACTT	42	III
Eco439	439	455	CCCTTCTCCCCGCTGA	53	III
Eco440	440	456	TCCCTTCTCCCCGCTG	83	I
Eco443	443	460	TTACTCCCTTCTCCCCG	62	II
Eco446	446	463	ACTTTACTCCCTTCCTCC	64	II
Eco449	449	467	ATTAACTTTACTCCCTTCC	35	IV
Eco455	455	473	AAAGGTATTAACCTTACTC	3	VI
Eco468	468	486	AACGTCAATGAGCAAAGGT	3	VI
Eco474	474	491	CGGGTAACGTCAATGAGC	3	VI
Eco478	478	495	TCTGCGGGTAACGTCAAT	20	V
Eco481	481	498	TCTTCTGCGGGTAACGTC	21	IV
Eco484	484	501	GCTTCTTCTGCGGGTAAC	60	III
Eco487	487	504	GGTGCTTCTTCTGCGGGT	54	III
Eco492	492	509	TAGCCGGTGTCTTCTCTG	46	III
Eco499	499	516	ACGGAGTTAGCCGGTGCT	25	IV
Eco505	505	522	GCTGGCACGGAGTTAGCC	56	III
Eco510	510	527	CGGCTGCTGGCACGGAGT	37	IV
Eco523	523	540	CTCCGTATTACCGCGGCT	54	III
Eco528	528	545	GCACCCTCCGTATTACCG	42	III
Eco541	541	558	CCGATTAACGCTTGCACC	96	I
Eco548	548	566	CAGTAATCCGATTAACGC	42	III
Eco559	559	576	GCTTTACGCCAGTAATT	46	III
Eco567	567	584	CTGCGTGCCTTTACGCC	44	III
Eco577	577	594	AACAAACCGCTGCGTGC	42	III
Eco585	585	602	TCTGACTTAACAAACCGC	2	VI
Eco595	595	613	GGGATTTACATCTGACTT	2	VI
Eco603	603	620	GAGCCCGGGATTTACACA	4	VI

(Fortsetzung)

Sonde	<i>E. coli</i> position 5' → 3' <sup>a</sup>		Sondensequenz 5'→3'	relative Sonden- fluoreszenz (% Eco1482) <sup>b</sup>	Helligkeits- klasse <sup>c</sup>
Eco614	614	631	GTTCCCAGGTTGAGCCCG	25	IV
Eco621	621	638	AGATGCAGTTCACAGGT	2	VI
Eco627	627	644	AGTATCAGATGCAGTTCC	1	VI
Eco632	632	649	TTGCCAGTATCAGATGCA	2	VI
Eco639	639	656	CTCAAGCTTGCCAGTATC	4	VI
Eco645	645	662	ACGAGACTCAAGCTTGCC	22	IV
Eco650	650	667	CCTCTACGAGACTCAAGC	13	V
Eco654	654	671	CCCCCTCTACGAGACTC	17	V
Eco657	657	674	CTACCCCTCTACGAGA	19	V
Eco661	661	678	AATTCACCCCTCTAC	22	IV
Eco665	665	682	CTGGAATTCTACCCCT	21	IV
Eco668	668	685	CACCTGGAATTCTACCCC	12	V
Eco675	675	692	ACCGCTACACCTGGAATT	50	III
Eco681	681	698	CATTTACCGCTACACCT	55	III
Eco686	686	703	CTACGCATTTACCGCTA	40	IV
Eco690	690	707	ATCTCTACGCATTTACCC	60	III
Eco693	693	710	CAGATCTCTACGCATTT	29	IV
Eco704	704	721	CGGTATTCTCCAGATCT	38	IV
Eco711	711	728	TCGCCACCGGTATTCCTC	62	II
Eco722	722	737	GGGCCGCCTTCGCCTC	21	IV
Eco729	729	744	GTCAGGGGGCCGCCT	37	IV
Eco738	738	755	CGTCAGTCTTCGTCCAGG	19	V
Eco745	745	762	ACCTGAGCGTCAGTCTTC	19	V
Eco756	756	773	CACGCTTTCGCACCTGAG	15	V
Eco763	763	780	TGCTCCCCACGCTTTTCGC	77	II
Eco774	774	791	CTAATCCTGTTTGTCTCCC	52	III
Eco781	781	799	CAGGGTATCTAATCCTGTT	4	VI
Eco792	792	809	CGTGGACTACCAGGGTAT	2	VI
Eco800	800	817	GTTTACGGCGTGGACTAC	31	IV
Eco810	810	827	AGTCGACATCGTTTACGG	38	IV
Eco818	818	835	AACCTCCAAGTCGTCATC	10	V
Eco828	828	845	TCAAGGGCACAACCTCCA	6	V
Eco836	836	852	CCACGCCTCAAGGGCAC	8	V
Eco846	846	862	GCTCCGGAAGCCACGCC	42	III
Eco853	853	870	ACGCGTTAGCTCCGGAAG	52	III
Eco863	863	880	GGTCGACTTAACGCGTTA	42	III
Eco871	871	888	CCCCAGGCGGTCTGACTTA	87	I
Eco881	881	897	GGCCGTACTCCCAGGC	77	II
Eco889	889	906	TAACCTGCGGCCGTACT	85	I
Eco898	898	916	ATTTGAGTTTTTAACCTTGC	73	II
Eco907	907	925	CGTCAATTCATTTGAGTTT	40	IV
Eco917	917	933	CGGGCCCCCGTCAATTC	69	II
Eco926	926	941	CGCTTGTGCGGGCCCC	38	IV
Eco934	934	951	CATGCTCCACCGCTTGTG	50	III
Eco942	942	959	TTAAACCACATGCTCCAC	46	III

(Fortsetzung)

Sonde	<i>E. coli</i> position 5' → 3' <sup>a</sup>		Sondensequenz 5'→3'	relative Sonden- fluoreszenz (% Eco1482) <sup>b</sup>	Helligkeits- klasse <sup>c</sup>
Eco952	952	969	TTGCATCGAATTAAACCA	4	VI
Eco960	960	977	TCTTCGCGTTGCATCGAA	60	III
Eco970	970	987	CAGGTAAGGTTCTTCGCG	33	IV
Eco978	978	995	GTCAAGACCAGGTAAGGT	27	IV
Eco988	988	1005	TTCCGTGGATGTCAAGAC	8	V
Eco996	996	1013	CTGAAAACCTCCGTGGAT	10	V
Eco1006	1006	1023	ATTCTCATCTCTGAAAAC	4	VI
Eco1014	1014	1031	GAAGGCACATTTCTCATCT	8	V
Eco1024	1024	1041	CACGGTTCCCGAAGGCAC	31	IV
Eco1032	1032	1049	ACCTGTCTCACGGTTCCTC	52	III
Eco1042	1042	1059	GCCATGCAGCACCTGTCT	48	III
Eco1050	1050	1067	TGACGACAGCCATGCAGC	6	V
Eco1060	1060	1077	CAACACGAGCTGACGACA	2	VI
Eco1068	1068	1085	ACATTTACACAACACGAGC	12	V
Eco1078	1078	1095	ACTTAACCCAACATTTCA	6	V
Eco1086	1086	1103	GTTGCGGGACTTAACCCA	10	V
Eco1097	1097	1112	GTTGCGCTCGTTGCGGG	6	V
Eco1104	1104	1121	AGGATAAGGGTTGCGCTC	8	V
Eco1113	1113	1130	TGGCAACAAAGGATAAGG	2	VI
Eco1122	1122	1139	CCGGACCCTGGCAACAA	15	V
Eco1131	1131	1146	TTCCCGCCGGACCCG	40	IV
Eco1140	1140	1157	TCTCCTTTGAGTTCCCGG	46	III
Eco1147	1147	1165	ACTGGCAGTCTCCTTTGAG	13	V
Eco1158	1158	1175	CCAGTTATCACTGGCAG	2	VI
Eco1166	1166	1183	ACCTTCCTCCAGTTTATC	10	V
Eco1176	1176	1193	CGTCATCCCCACCTTCCT	50	III
Eco1184	1184	1201	TGACTTGACGTCATCCCC	6	V
Eco1194	1194	1211	AGGGCCATGATGACTTGA	10	V
Eco1202	1202	1219	TGGTCGTAAGGGCCATGA	2	VI
Eco1212	1212	1229	TGTGTAGCCCTGGTCGTA	25	IV
Eco1220	1220	1237	GTAGCACGTGTGTAGCCC	58	III
Eco1230	1230	1247	ATGCGCCATTGTAGCAG	35	IV
Eco1238	1238	1255	CTCTTTGTATGCGCCATT	31	IV
Eco1248	1248	1265	GAGGTCGCTTCTTTTGT	58	III
Eco1256	1256	1273	GCTCTCGCGAGGTCGCTT	62	II
Eco1266	1266	1283	AGGTCCGCTTGCTCTCGC	58	III
Eco1274	1274	1291	ACTTTATGAGGTCGCTT	15	V
Eco1284	1284	1301	ACTACGACGCACTTTATG	15	V
Eco1292	1292	1309	CAATCCGGACTACGACGC	23	IV
Eco1302	1302	1319	TTGCAGACTCCAATCCGG	33	IV
Eco1310	1310	1327	GAGTCGAGTTGCAGACTC	2	VI
Eco1320	1320	1337	CGACTTCATGGAGTCGAG	6	V
Eco1328	1328	1345	AGCGATTCCGACTTCATG	65	II
Eco1338	1338	1355	CACGATTACTAGCGATTC	15	V
Eco1346	1346	1363	TTCTGATCCACGATTACT	12	V

(Fortsetzung)

Sonde	<i>E. coli</i> position 5' → 3' <sup>a</sup>		Sondensequenz 5'→3'	relative Sonden- fluoreszenz (% Eco1482) <sup>b</sup>	Helligkeits- klasse <sup>c</sup>
Eco1356	1356	1373	CACCGTGGCATTCTGATC	19	V
Eco1364	1364	1382	GAACGTATTACACCGTGGCA	21	IV
Eco1374	1374	1391	AAGGCCCGGGAACGTATT	52	III
Eco1383	1383	1400	GGTGTGTACAAGGCCCGG	65	II
Eco1392	1392	1409	GTGACGGGCGGTGTGTAC	67	II
Eco1401	1401	1418	TCCCATGGTGTGACGGGC	67	II
Eco1410	1410	1427	GCAACCCACTCCCATGGT	90	I
Eco1419	1419	1436	ACTTCTTTTGCAACCCAC	23	IV
Eco1428	1428	1445	AAGCTACCTACTTCTTTT	38	IV
Eco1437	1437	1454	CCGAAGGTTAAGCTACCT	4	VI
Eco1446	1446	1463	AGCGCCCTCCCGAAGGTT	44	III
Eco1455	1455	1472	AAAGTGGTAAGCGCCCTC	31	IV
Eco1464	1464	1481	ATGAATCACAAAGTGGTA	4	VI
Eco1473	1473	1490	ACCCCAGTCATGAATCAC	65	II
Eco1482	1482	1499	TACGACTTCACCCCAGTC	100	I
Eco1491	1491	1508	TTACCTTGTTACGACTTC	31	IV
Eco1500	1500	1517	CCCCTACGGTTACCTTGT	92	I
Eco1509	1509	1525	CGCAGGTTCCCCTACGG	4	VI
Eco1518	1518	1535	GTGATCCAACCGCAGGTT	17	V
Eco1526	1526	1542	TAAGGAGGTGATCCAAC	25	IV

Tabelle F.1.

<sup>a</sup> *E. coli* Position nach Brosius und Mitarbeiter (Brosius et al., 1981).

<sup>b</sup> Relative Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung als Prozentwert der hellsten Sonde, Eco1482.

<sup>c</sup> Die Sonden wurden bezüglich ihrer relativen Fluoreszenz in sechs Helligkeitsklassen eingeteilt: Klasse I (100 - 81% der Fluoreszenz von Eco 1482), Klasse II (80-61%), Klasse III (60-41%), Klasse IV (40-21%), Klasse V (20-6%) und Klasse VI (5-0%).

**2.) 16S-rDNA Sequenz von *Escherichia coli* DSM30083<sup>T</sup> (5' → 3', Position 1 – 1542, Nummerierung nach (Brosius *et al.*, 1981))**

```

AAAUUGAAGA GUUUGAUCAU GGCUCAGAUU GAACGCUGGC GGCAGGCCUA ACACAUGCAA GUCGAACGGU AACAGGAAGC
AGCUUGCUGC UUUGCUGACG AGUGGCGGAC GGGUGAGUAA UGUCUGGGAA ACUGCCUGAU GGAGGGGGAU AACUACUGGA
AACGGUAGCU AAUACCGCAU AACGUCGCAA GACCAAAGAG GGGGACCUUA GGGCCUCUUG CCAUCGGAUG UGCCCAGAUG
GGAUUAGCUA GUAGGUGGGG UAAAGCGCAC CCUAGGCGAC GAUCCCUAGC UGGUCUGAGA GGAUGACCAG CCACACUGGA
ACUGAGACAC GGUCCAGACU CCUACGGGAG GCAGCAGUGG GGAUAUUUGC ACAUUGGGCG CAAGCCUGAU GCAGCCAUGC
CGCGUGUAUG AAGAAGGCCU UCGGGUUGUA AAGUACUUUC AGCGGGGAGG AAGGGAGUAA AGUUAUUACC UUUGCUCAUU
GACGUUACCC GCAGAAGAAG CACCGGCUAA CUCCGUGCCA GCAGCCGCGG UAAUACGGAG GGUGCAAGCG UUAUUCGGAA
UUACUGGGCG UAAAGCGCAC GCAGGCGGUU UGUUAAAGUA GAUGUGAAAU CCCCGGGCUC AACCUGGGAA CUGCAUCUGA
UACUGGCAAG CUUGAGUCUC GUAGAGGGGG GYAGAAUUC AGGUGUAGCG GUGAAAUCG UAGAGAUCUG GAGGAAUACC
GGUGGCGAAG GCGGCCCCU GGACGAAGAC UGACGCUCAG GUGCGAAAGC GUGGGGAGCA AACAGGAUUA GAUACCCUGG
UAGUCCACGC CGUAAACGAU GUCGACUUGG AGGUUUGGCC CUUGAGGCGU GGUUCCGGA GCUAACCGCU UAAGUCGACC
GCCUGGGGAG UACGGCCGCA AGGUUAAAAC UCAAAUGAAU UGACGGGGC CCGCACAGC GUGGGAGAU GUGUUUUAAU
UCGAUGCAAC GCGAAGAACC UUACCUUGUC UUGACAUCCA CGGAAGUUUU CAGAGAUGAG AAUGUGCCUU CGGGAACCGU
GAGACAGUGU CUGCAUGGCU GUCGUCAGCU CGUGUUGUGA AAUGUUGGGU UAAGUCCCGC AACGAGCGCA ACCUUUAUCC
UUUGUUGCCA GCGGUCCGCG CGGGAACUCA AAGGAGACUG CCAGUGAUAA ACUGGAGGAA GGUGGGGAUG ACGUCAAGUC
AUCAUGGCC UUACGACGAC GGCUACACAC GUGCUACAAU GGCGCAUACA AAGAGAAGCG ACCUCGCGAG AGCAAGCGRA
CCUCAUAAAG UGCGUCGUAG UCCGGAUUGG AGUCUGCAAC UCGACUCCAU GAAGUCGGAA UCGCUAGUAA UCGUGGAUCA
GAAUGCCACG GUGAAUACGU UCCCGGGCCU UGUACACACC GCCGUCACA CCAUGGGAGU GGGUUGCAA AGAAGUAGGU
AGCUUAACCU UCGGGAGGGC GCUUACCACU UUGUGAUUCA UGACUGGGGU GAAGUCGUAA CAAGGUAAAC GUAGGGGAAC
CUGCGGUUGG AUCACCUCCU UA

```

**3.) 16S-rDNA Sequenz eines aus Belebtschlamm sortierten, LDI23a-positiven Bakteriums. Die Sequenz wurde beim European Molecular Biology Laboratory (EMBL) unter der Accession Nr. AJ001325 hinterlegt. (5' → 3', Position 9 – 1510, Nummerierung nach (Brosius *et al.*, 1981))**

```

AGUUUGAUUA UGGCUCAGAU UGAACGCUGG CGGCAUGCUU UACACAUGCA AGUCGAACGG UAACAGGUUA AGCUGACGAG
UGGCGAACCG GUGAGUAAUG CAUCGGAACG UGCCCGGUCG UGGGGGAUAA CGCAGCGAAA GCUGCGCUAA UACCGCAUAC
GAUCUGAGGA UGAAAGCGGG GGACCGUAAG GCCUCGCGCG AUCGGAGCGG CCGAUGUCAG AUUAGGUAGU UGGUGGGGUA
AAGGCUCACC AAGCCGACGA UCUGUAGCUG GUCUGAGAGG ACGACCAGCC ACACUGGGAC UGAGACACGG CCCAGACUCC
UACGGGAGGC AGCAGUGGGG AAUUUUGGAC AAUGGGCGCA ACCGUGAUCC AGCAAUGCCG CGUGCAGGAA GAAGGCCUUC
GGGUUGUAAA CUGCUUUUGU ACGGAGCGAA AAGGUCUJCC CUAAUACGGG AGGCUGAUGA CGGUACCGUA AGAAUAAGCA
CCGGCUAACU ACGUGCCAGC AGCCCGGUA AUACGUAGGG UGCGAGCGUU AAUCGGAUU ACUGGGCGUA AAGCGUGCGC
AGGCGGUUUU GUAAGACAGG CGUGAAAUCC CCGGGCUCAA CCUGGGAAUG GCGCUUGUGA CUGCAAAGCU GGAGUGCGGC
AGAGGGGGAU GAAAUCCGC GUGUAGCAGU GAAAUGCGUA GAUAUGCGGA GGAACACCGA UGGCGAAGGC AAUCCCUUGG
GCCUGCACUG ACGCUCAUAG ACGAAAGCGU GGGGAGCAA CAGGAUUAGA UACCCUGGUA GUCCACGCC UAAACGAUGU
CAACUGGUUG UUGGGUCUUU ACUGACUCAG UAACGAAGCU AACGCGUGAA GUUGACCGCC UGGGGAGUAC GGCCGCAAGG
UUGAAAUCUA AAGGAAUUGA CCGGGACCCG CACAAGCGGU GGAUGAUGUG GUUUAAUUCG AUGCAACGCG AAAAAACCUA
CCCACCUUUG ACAUGGUCGG AACCCUUUAG AGAUAGAGGG GUGCUCGAAA GAGAGCCGAU ACACAGGUGC UGCAUGGCUG
UCGUCAGCUC GUGUCGUGAG AUGUUGGGUU AAGUCCCGCA ACGAGCGCAA CCCUUGUCAU UAGUUGCUAC GAAAGGGCAC
UCUAAUGAGA CUGCCGGUGA CAAACCGGAG GAAGGUGGGG AUGACGUCAA GUCCUCAUGG CCCUUAUAGG UGGGGCUACA
CACGCUAUAC AAUUGGCUUGU ACAAAGGGUU GCCAACCCGC GAGGGGGAGC UAAUCCCAUA AAGCCAGUCG UAGUCCGGAU
CGCAGUCUGC AACUCGACUG CGUGAAGUCG GAAUCGCUAG UAAUCGUGGA UCAGAAUGUC ACGGUGAAUA CGUUCGGGG
UCUUGUACAC ACCGCCCGUC ACACCAUGGG AGCGGGUUCU GCCAGAAGUA GUUAGCCUAA CCGCAAGGAG GCGAAUACC
ACGGCAGGGU UCGUGACUGG GGUAGAUGC UAACAAGGUA GCCGUUACGG AAGGUGCGGC UGGAUACCUU

```

4.) **Tabelle F.2: Waschpuffer für Hybridisierungen bei 46°C in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers.**

Prozent Formamid bei der Hybridisierung	[Na <sup>+</sup> ] in M	µl 5 M NaCl auf 50 ml
0	0,900	9000
5	0,636	6300
10	0,450	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,014	40
65	0,010	0

5.) **Tabelle F.3: Waschpuffer für Hybridisierungen bei 35°C in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers.**

Prozent Formamid bei der Hybridisierung	[Na <sup>+</sup> ] in M	µl 5 M NaCl auf 50 ml
20	0,145	1350
25	0,105	950
30	0,074	640
35	0,052	420
40	0,037	270
45	0,026	160
50	0,019	90
55	0,013	30
60	0,009	0
65	0,008	0
70	0,005	0



## G. Literaturverzeichnis

1. **Amann, R., W. Ludwig, R. Schulze, S. Spring, E. Moore, and K. H. Schleifer.** 1996. rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former Pseudomonads. *System. Appl. Microbiol.* **19**:501-509.
2. **Amann, R., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* **178**(12):3496-3500.
3. **Amann, R. I.** 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 1-15, *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol. 3.3.6. Kluwer Academic Publishers.
4. **Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6):1919-1925.
5. **Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**(2):762-770.
6. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**(1):143-169.
7. **Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, and D. A. Stahl.** 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(2):614-623.
8. **Ashkin, A., J. M. Dziedzic, and T. Yamane.** 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature.* **330**:769-771.
9. **Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil, and F. Thingstad.** 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**:257-263.
10. **Benson, D. A., M. Boguski, D. J. Lipman, and J. Ostell.** 1994. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **22**(17):3441-3444.
11. **Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**:107-127.

12. **Button, D. K., B. R. Robertson, and F. Jüttner.** 1996. Microflora of a subalpine lake: bacterial populations, size, and DNA distributions, and their dependence on phosphate. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**:87-101.
13. **Button, D. K., F. Schut, P. Quang, R. Martin, and B. Robertson.** 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(3).
14. **Chisholm, S. W., R. J. Olson, E. R. Zettler, R. Goericke, J. B. Waterbury, and N. A. Welschmeyer.** 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature.* **334**:340-343.
15. **Courties, C., A. Vaquer, M. Troussellier, J. Lautier, M. J. Chretiennot-Dinet, J. Neveux, C. Machado, and H. Claustre.** 1994. Smallest eukaryotic organism. *Nature.* **370**:255.
16. **De Giorgi, C., M. F. Sialer, and F. Lamberti.** 1994. Formalin-induced infidelity in PCR-amplified DNA fragments. *Molecular and Cellular Probes.* **8**:459-462.
17. **Dean, P. N.** 1990. Commercial instruments, p. 171-186. *In* M. R. Melamed, T. Lindmo, and M. L. Mendelsohn (ed.), *Flow Cytometry and Sorting*, 2nd ed. Wiley-Liss, New York.
18. **DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science.* **243**:1360-1363.
19. **Ehresmann, B., C. Ehresmann, P. Romby, M. Mougél, F. Baudin, E. Westhof, and J.-P. Ebel.** 1990. Detailed structures of rRNAs: New approaches, p. 148-159. *In* W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger, and J. R. Warner (ed.), *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution*. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
20. **Emmert, D. B., P. J. Stoehr, G. Stoesser, and G. N. Cameron.** 1994. The European Bioinformatics Institute (EBI) databases. *Nucleic Acids Res.* **22**(17):3445-3449.
21. **Erhart, R., D. Bradford, R. J. Seviour, R. Amann, and L. L. Blackall.** 1997. Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "*Microthrix parvicella*" in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* **20**(2):310-318.
22. **Frischer, M. E., P. J. Floriani, and S. A. Nierzwicki-Bauer.** 1996. Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence in situ hybridization is a result of ribosomal higher order structure. *Can. J. Microbiol.* **42**:1061-1071.
23. **Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwippl, W. Ludwig, and R. Amann.** 1998. Flow Cytometric Analysis of the *In-Situ* Accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(12): 4973-4982.

24. **Glöckner, F. O., R. Amann, A. Alfreider, J. Pernthaler, R. Psenner, K. Trebesius, and K.-H. Schleifer.** 1996. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **19**:403-406.
25. **Glöckner, F. O., B. Fuchs, and R. Amann.** In Vorbereitung. Bacterial community structures in lakes and oceans: a comparison based on fluorescence in situ hybridization.
26. **Gutell, R. R.** 1994. Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994. *Nucleic Acids Res.* **22**(17):3502-3507.
27. **Huang, Z., J. T. Petty, B. O'Quinn, J. L. Longmire, N. C. Brown, J. H. Jett, and R. A. Keller.** 1996. Large DNA fragment sizing by flow cytometry: application to the characterization of P1 artificial chromosome (PAC) clones. *Nucleic Acids Res.* **24**(21):4202-4209.
28. **Huber, R., S. Burggraf, T. Mayer, S. M. Barns, P. Rossnagel, and K. O. Stetter.** 1995. Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by in situ RNA analysis. *Nature.* **376**:57-58.
29. **Hugenholtz, P., B. M. Goebel, and N. R. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**(18):4765-4774.
30. **Johnson, D. W., N. J. Pieniasek, D. W. Griffin, L. Misener, and J. B. Rose.** 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(11):3849-3855.
31. **Kämpfer, P., R. Erhart, C. Beimfohr, J. Böhringer, M. Wagner, and R. Amann.** 1996. Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* **32**:101-121.
32. **Klocke, A.** 1996. Fluoreszenzlebensdauer im Durchflußzytometer. Diplomarbeit. Sektion Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
33. **Lange, M., L. Guillou, D. Vaultot, N. Simon, R. I. Amann, W. Ludwig, and L. K. Medlin.** 1996. Identification of the class Prymnesiophyceae and the genus *Phaeocystis* with ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes detected by flow cytometry. *J. Phycol.* **32**:858-868.
34. **Lathe, R.** 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data - theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.* **183**:1-12.
35. **Li, W. K. W.** 1994. Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eukaryotic ultraphytoplankton: measurements from flow cytometric sorting. *Limnol. Oceanogr.* **39**(1):169-175.
36. **Li, W. K. W.** 1989. Shipboard analytical flow cytometry of oceanic ultraphytoplankton. *Cytometry.* **10**:564-579.

37. **Li, W. K. W. and P. M. Dickie.** 1991. Relationship between the number of dividing and nondividing cells of cyanobacteria in north atlantic picoplankton. *J. Phycol.* **27**:559-565.
38. **Li, W. K. W., T. Zohary, Y. Z. Yacobi, and A. M. Wood.** 1993. Ultraphytoplankton in the eastern mediterranean sea: towards deriving phytoplankton biomass from flow cytometric measurements of abundance, fluorescence and light scatter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **102**:79-87.
39. **Lim, E. L., L. A. Amaral, D. A. Caron, and E. F. DeLong.** 1993. Application of rRNA-based probes for observing marine nanoplanktonic protists. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5):1647-1655.
40. **Lodmell, J. S. and A. E. Dahlberg.** 1997. A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science.* **277**:1262-1267.
41. **Ludwig, W. and K.-H. Schleifer.** 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:155-173.
42. **Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumeier, M. Bachleitner, and K.-H. Schleifer.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis.* **19**(554-568).
43. **Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, and C. R. Woese.** 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **25**(1):109-111.
44. **Malhorta, A. and S. C. Harvey.** 1994. A quantitative model of the *Escherichia coli* 16S RNA in the 30 S ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* **240**:308-340.
45. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
46. **Manz, W., M. Wagner, R. Amann, and K.-H. Schleifer.** 1994. In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* **28**(8):1715-1723.
47. **Meier, H.** 1997. Nachweis von Fäkalstreptokokken mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden zur Anwendung in der hygienischen Trinkwasserkontrolle. Dissertation. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
48. **Melamed, M. R., T. Lindmo, and M. L. Mendelsohn (ed.).** 1990. *Flow Cytometry and Sorting*, 2nd ed. Wiley-Liss, New York.
49. **Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittman, and S. A. Stahl.** 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(6):2156-2162.

50. **Nübel, U., Engelen, B., A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus.** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**(19):5636-5643.
51. **Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, and D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal rRNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**:337-365.
52. **Olson, R. J., D. Vaultot, and S. W. Chisholm.** 1985. Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res.* **32**(10):1273-1280.
53. **Pommerening-Röser, A., G. Rath, and H.-P. Koops.** 1996. Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *System. Appl. Microbiol.* **19**:344-351.
54. **Porter, J., C. Edwards, J. A. W. Morgan, and R. W. Pickup.** 1993. Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(10):3327-3333.
55. **Porter, J., J. Robinson, R. Pickup, and C. Edwards.** 1995. Recovery of a bacterial sub-population from sewage using immunofluorescent flow cytometry and cell sorting. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**:195-199.
56. **Poulsen, L. K., G. Ballard, and D. A. Stahl.** 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5):1354-1360.
57. **Rice, J., M. A. Sleight, P. H. Burkill, G. A. Tarran, C. D. O'Connor, and M. V. Zubkov.** 1997. Flow cytometric analysis of characteristics of hybridization of species-specific fluorescent oligonucleotide probes to rRNA of marine nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(3):938-944.
58. **Rossello-Mora, R. A., M. Wagner, R. Amann, and K.-H. Schleifer.** 1995. The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(2):702-707.
59. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, p. 11.21, 2 ed, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
60. **Sanders, C. A., D. M. Yajko, P. S. Nassos, W. C. Hyun, M. J. Fulwyler, and W. K. Hadley.** 1991. Detection and analysis by dual-laser flow cytometry of bacteriophage T4 DNA inside *Escherichia coli*. *Cytometry.* **12**:167-171.
61. **Schleifer, K.-H., R. Amann, W. Ludwig, C. Rothemund, N. Springer, and S. Dorn.** 1992. Nucleic acid probes for the identification and in situ detection of pseudomonads, p. 127-134. *In* E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (ed.), *Pseudomonads: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

62. **Schönhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko, and R. Amann.** 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(8):3268-3273.
63. **Schut, F., E. J. De Vries, J. C. Gottschal, B. R. Robertson, W. Harder, R. A. Prins, and D. K. Button.** 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(7):2150-2160.
64. **Shapiro, H. M.** 1995. *Practical Flow Cytometry*, 3rd ed. Wiley-Liss, Inc., New York.
65. **Simon, N., N. LeBot, D. Marie, F. Partensky, and D. Vaultot.** 1995. Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(7):2506-2513.
66. **Skerman, B. D.** 1968. A new type of micromanipulator and microforge. *J. Gen. Microbiol.* **54**:287-297.
67. **Snaidr, J.** 1997. Phylogenie und *in situ*-Identifizierung von Bakterien im Belebtschlamm von biologischen Abwasserreinigungsanlagen. Dissertation. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München, München.
68. **Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7):2884-2896.
69. **Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, and N. Petersen.** 1992. Phylogenetic diversity and identification of nonculturable magnetotactic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **15**:116-122.
70. **Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, H. van Gernerden, and N. Petersen.** 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(8):2397-2403.
71. **Stahl, D. A. and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
72. **Steen, H. B. and T. Lindmo.** 1979. Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone. *Science.* **204**:403-404.
73. **Strunk, O., O. Gross, B. Reichel, M. May, S. Hermann, N. Stuckmann, B. Nonhoff, T. Ginhart, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K.-H. Schleifer, and W. Ludwig.** ARB: a software environment for sequence data. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München. In Vorbereitung.
74. **Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, M. J. Johnson, K. Itakura, and R. B. Wallace.** 1981. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation

- of specific cloned DNA sequences, p. 683-693. *In* D. Brown and C. F. Fox (ed.), *Developmental biology using purified genes*. Academic Press, Inc., New York.
75. **Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2):625-630.
  76. **Urdea, M. S., B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne, and T. Horn.** 1988. A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **16**(11):4937-4956.
  77. **Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K.-H. Schleifer.** 1994. Identification and *in situ* detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* **17**:405-417.
  78. **Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K.-H. Schleifer.** 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5):1520-1525.
  79. **Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K.-H. Schleifer.** 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(3):792-800.
  80. **Wahl, G. M., S. L. Berger, and A. R. Kimmel.** 1987. Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods in Enzymology.* **152**:399-407.
  81. **Wallner, G. and R. Amann.** 1996. Durchflußzytometrische Untersuchung von Belebtschlamm mit rRNA-gerichteten Oligonucleotidsonden, p. 81-92. *In* Lemmer, Griebe, and Flemming (ed.), *Ökologie der Abwasserorganismen*, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
  82. **Wallner, G., R. Amann, and W. Beisker.** 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry.* **14**:136-143.
  83. **Wallner, G., R. Erhart, and R. Amann.** 1995. Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(5):1859-1866.
  84. **Wallner, G., B. Fuchs, S. Spring, W. Beisker, and R. Amann.** 1997. Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11):4223-4231.
  85. **Wallner, G., I. Steinmetz, D. Bitter-Suermann, and R. Amann.** 1996. Combination of rRNA-targeted hybridization probes and immuno-probes for identification of bacteria by flow cytometry. *System. Appl. Microbiol.* **19**:569-576.

86. **Wisotzkey, J. D., P. Jurtshuk, and G. E. Fox.** 1990. PCR amplification of 16S rDNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. *Current Microbiology*. **21**:325-327.
87. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**(2):221-271.



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. K.-H. Schleifer bzw. am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen, Abteilung Molekulare Ökologie unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. R. Amann von März 1996 bis Dezember 1998 angefertigt.

Ich danke allen ganz herzlich, die auf ihre Weise zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

Herrn Priv.-Doz. Dr. Rudolf Amann für das mir entgegengebrachte große Vertrauen, die Durchflußzytometrie in Bremen aufbauen zu dürfen, für seine richtungsweisenden Tips und seine stets offene Tür bei Problemen,

Herrn Prof. Karl-Heinz Schleifer, für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Lehrstuhl und für die Treue zu seinen Münchnern in Bremen,

den Herren Dr. Günter Wallner und Dr. Wolfgang Beisker für ihre umfassende Einführung in die Durchflußzytometrie, für die vielen Anregungen und für den steten Notfalldienst, falls das Gerät wieder mal streikte,

meinen Kollegen Willi Schönhuber, Frank-Oliver Glöckner und Andreas Schramm nicht nur für die vielen fachlichen Diskussionen, sondern auch für die Freundschaft und die Pflege der bairischen Mundart im preußischen Norden. Andreas Schramm gilt mein besonderer Dank für das Korrekturlesen in letzter Sekunde und für den Heidenspaß in unserer „Kommune“,

meinen Münchner Kollegen für die hart aber herzliche Atmosphäre und den Bremer Kollegen für ihre freundliche Aufnahme von uns Heimatvertriebenen,

meinen Eltern für ihre stete Förderung und Unterstützung seelisch, moralisch und materiell,

und meiner lieben Frau Rita, die ohne zu Zögern ein weiteres Mal ihre Arbeitsstelle wechselte und mir nach Bremen gefolgt ist.