

**Aus dem Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene der Universität
Tübingen**

Direktor: Professor Dr. K. Botzenhart

**IN SITU IDENTIFIKATION VON
MIKROORGANISMEN IN EINEM
KARSTAQUIFER MITTELS RIBOSOMALER
RNA – TECHNOLOGIE**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jürgen Alexander Bohnert**

aus

**Heidenheim an der Brenz
2001**

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Botzenhart
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P. Heeg

--- In situ Identifikation von Mikroorganismen in einem Karstaquifer mittels ribosomaler RNA-Technologie ---

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	
1.1 Mikroorganismen im Wasser als Krankheitserreger.....	1
1.2 Gefährdung von Karstgrundwasser durch anthropogenen Einfluß.....	2
1.3 Besiedelung der oligotrophen Grundwasserräume durch Mikroorganismen.....	3
1.4 rRNA-Technologie als Schlüssel zur <i>in situ</i> -Detektion von Mikroorganismen.....	4
1.5 Biofilme als typische Organisationsform von bakteriellen Lebensgemeinschaften in aquatischen Systemen.....	6
1.6 Fragestellung.....	7
2. Material und Methoden	
2.1 Probenahme	
2.1.1 Wasserproben.....	8
2.1.2 Glasobjektträgerbiofilme.....	8
2.1.3 Biofilme auf natürlichen Aufwuchsflächen.....	8
2.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl.....	9
2.3 Bestimmung der Koloniezahl bei 20°C und 36°C.....	9
2.4 Untersuchung der Wasserproben auf <i>E. coli</i> und Fäkalstreptokokken.....	10
2.5 Untersuchung der Wasserproben auf Salmonellen und Yersinien.....	10
2.6 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	11
2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragment-längenpolymorphismus (RFLP).....	12
2.8 Selektion und Charakterisierung von Biofilmisolaten.....	15
2.9 Vergleichende Sequenzanalyse und Sondendesign.....	16
3. Ergebnisse	
3.1 Mikrobiologische Untersuchung auf hygienisch relevante Mikroorganismen in Wasserproben aus der Wulfbachquellhöhle.....	20
3.2 Wasserchemische Untersuchung.....	25
3.3 Bestimmung von Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl und Kultivierbarkeit von Bakterien in den Wasserproben und Biofilmen.....	27
3.4 Bestimmung der <i>in situ</i> dominanten phylogenetischen Gruppen in den Biofilmen auf künstlichen und natürlichen Aufwuchsflächen in der Wulfbachquellhöhle.....	28

4	Diskussion	
4.1	Karstwasserhygienische Relevanz der Meßdaten.....	45
4.2	<i>In situ</i> -Identifikation der biofilmbildenden Mikroorganismen im Karstaquifer	
4.2.1	Optimierung der FISH-Technik für Karstgrundwasserbiofilme....	48
4.2.2	Nachweis der in den Aquiferbiofilmen vorkommenden Arten.....	54
5	Zusammenfassung.....	59
6	Literaturverzeichnis.....	60
7	Danksagung.....	64
8	Lebenslauf.....	66

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Cy3	1-(ϵ -carboxypentynyl)-1'-ethyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-5,5'-disulfonat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DOC	dissolved organic carbon (gelöster organischer Kohlenstoff)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	Fluoresceindiacetat
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar, mol/l
min	Minute
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rDNA	ribosomales RNA - Gen
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
S	<i>Svedberg</i> (1S = 10^{-13} Sekunden)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil / Einheit der Enzymaktivität
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Präfixe für Einheiten: **p**, Pico (10^{-12}); **n**, Nano (10^{-9}); **μ** , Mikro (10^{-6}); **m**, Milli (10^{-3}); **c**, Zenti (10^{-2}); **d**, Dezi (10^{-1}); **k**, Kilo (10^3); **M**, Mega (10^6); **G**, Giga (10^9)

„...any approach to identify specific microbial populations without cultivation directly in their natural environments could be revolutionary, since it could change the character of microbiology...“ (Rudolf Amann, 1995)

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Mikroorganismen im Wasser als Krankheitserreger

Seitdem Menschen unseren Planeten bevölkern, sind sie auch einer ständigen Beeinträchtigung ihrer Gesundheit durch den Kontakt mit Krankheitserregern ausgesetzt, die über Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trink-, Wasch- und Badewasser) übertragen werden können.

Der Entstehung von typischerweise durch fäkale Verunreinigung von Wasser übertragenen Krankheiten, wie z.B. Cholera, stand man bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts mehr oder weniger hilflos gegenüber und erklärte sie mit dem Auftreten sogenannter „Miasmen“, also schlecht definierten „Ausdünstungen“, die durch organische Zerfallprozesse bedingt sein sollten. Erst mit den bahnbrechenden Entdeckungen von Robert Koch konnten Mikroorganismen als auslösendes Agens der mit Fäkalien assoziierten Erkrankungen identifiziert werden (Koch, 1893).

Die Mikrobiologie des 20. Jahrhunderts klärte nachfolgend die Übertragungswege einer Fülle verschiedener Mikroorganismen und die von ihnen verursachten Krankheiten auf. Die Notwendigkeit der Reinhaltung des Trinkwassers von Krankheitserregern erforderte eine genaue mikrobiologische Untersuchung dieses Lebensmittels und gegebenenfalls eine Desinfektion desselben. Da es jedoch aus ökonomischen Gründen kaum möglich schien, das Trinkwasser mit den zur Verfügung stehenden mikrobiologischen Methoden (Anzucht und biochemische Identifikation) auf alle denkbaren Krankheitserreger zu untersuchen, die durch fäkale Verunreinigung mit dem Wasser übertragen werden können, wählte man stellvertretend für all diese Organismen den an sich harmlosen Darmbewohner *Escherichia (E.) coli*.

Bis auf den heutigen Tag hat sich dieses Indikatorprinzip bewährt. Man geht davon aus, daß in einem Wasser, in dem sich keine *E. coli* nachzuweisen lassen, auch keine durch fäkale Verunreinigung eingetragenen Krankheitserreger zu finden sind. Die heutige Trinkwasserverordnung fordert, daß in 100 ml eines für den menschlichen Genuß bestimmten Wassers keine vermehrungsfähigen *E. coli* und

sonstigen coliformen Keime nachweisbar sein dürfen. So gut belegt das Indikatorprinzip auch ist, so langwierig ist allerdings die praktische Bestimmung der Fäkalindikatoren mit den durch die Trinkwasserverordnung vorgeschriebenen Methoden (Anzucht und biochemische Differenzierung), die größtenteils schon zu Zeiten Robert Kochs etabliert wurden. Der größte Nachteil der konventionellen kulturellen Methode besteht darin, daß der komplette Untersuchungsgang etwa 48 - 96 Stunden erfordert. Im ungünstigsten Fall liegen also erst nach vier Tagen spezifische Ergebnisse vor, die zur Ergreifung entsprechender Gegenmaßnahmen durch die Gesundheitsbehörden führen können.

1.2 Gefährdung von Karstgrundwasser durch anthropogenen Einfluß

In der Bundesrepublik Deutschland wird das meiste Trinkwasser entweder aus Oberflächenwasser (z.B. Bodensee) oder aus Grundwasserleitern gewonnen. Während das Wasser in typischen Porengrundwasserleitern meistens durch geringe Fließgeschwindigkeiten gekennzeichnet ist, können sogenannte verkarstungsfähige - also durch die Kohlensäure des im Untergrundes versickernden Niederschlagswassers lösliche - Gesteine über bevorzugte Abflußbahnen oberflächlich eingetragene Verunreinigungen mit hohen Abstandsgeschwindigkeiten (bis mehrere hundert Meter pro Stunde) Richtung Vorfluter transportieren. Darum besteht in Karstgebieten immer die Gefahr, daß im Einzugsgebiet in den Untergrund eingebrachte Fäkalerreger innerhalb weniger Stunden oder Tage wieder in einer Karstquelle austreten, bevor die natürliche Elimination eine substanzielle Größe erreicht hat. Aus diesem Grund kommt der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Einzugsgebiet und Quelle größte Bedeutung zu, um Verunreinigungen des Wassers möglichst gering zu halten. Methodisch werden hierbei hauptsächlich Markierungsversuche mit Fluoreszenztracern eingesetzt (Käss, 1992).

Etwa ein Drittel der Fläche von Baden-Württemberg gilt als verkarstet. Neben dem größten zusammenhängenden Karstgebiet dieses Bundeslandes, der aus Weißjurakalken aufgebauten Schwäbischen Alb, sind vor allem die kleineren Muschelkalkkarstgebiete im Neckartal und in Hohenlohe von Bedeutung.

Viele der in diesen Karstgebieten vorhandenen Quellen werden für die Trinkwasserversorgung genutzt. Problematisch für die Wasserversorger ist dabei jedoch, daß in Abhängigkeit vom Niederschlagseintrag die Quellschüttung und die damit assoziierte Konzentration hygienisch relevanter Mikroorganismen in wenig

vorhersehbarer Weise stark schwanken. Im Regelfall müssen daher diese Karstwässer vor der Weiterleitung an den Verbraucher aufbereitet werden.

1.3 Besiedelung der oligotrophen Grundwasserräume durch Mikroorganismen

Während das Wasser der für die Trinkwasserversorgung genutzten Karstquellen regelmäßig gemäß Trinkwasserverordnung auf Koloniezahl und coliforme Keime untersucht wird, gibt es bisher nur wenige Untersuchungen über die Besiedelung der Karstgrundwasserräume, die sich im Regelfall auf die Anzucht von Bakterien stützen (Menne, 1999; Rusterholtz, 1994) . In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, daß oft nur weniger als 1 % der in einem oligotrophen Umwelthabitat mittels mikroskopischer Direktzählung nachweisbaren Bakterien tatsächlich auf Standardnährmedien sichtbare Kolonien produzieren (Staley und Konopka, 1986). Für diejenige Bakterienfraktion, die sich zwar mittels Lebendmarkern wie FDA oder Tetrazoliumsalzen anfärben läßt, die aber mit den derzeit zur Verfügung stehenden Standardmedien nicht kultivierbar ist, wurde von Roszak und Colwell (1987) der Begriff „Viable But Non Culturable Cells“ (VBNC) geprägt.

Noch ist allerdings nicht klar, ob die meisten der in einem oligotrophen System lebenden VBNC-Bakterien nicht kultivierbar sind, weil sie in einen irreversiblen, nicht mehr vermehrungsfähigen Zustand übergegangen sind, oder weil die derzeit verfügbaren Nährmedien den Ansprüchen dieser Bakterien (noch) nicht gerecht werden.

Das grundlegende Dilemma der Mikrobiologie, daß nämlich nichtkultivierbare Mikroorganismen aus verständlichen Gründen nicht mittels Anzucht und biochemischer Differenzierung identifiziert werden konnten und daß die unscheinbare und wenig differenzierte Bakterienmorphologie in den allermeisten Fällen keine weitergehende mikroskopische Direktidentifikation zuließ, verlangte nach einer neuen Methodik.

1.4 rRNA-Technologie als Schlüssel zur *in situ*-Identifikation von Mikroorganismen

Bereits im Jahre 1965 hatten Zuckerkandl und Pauling die Idee formuliert, daß sogenannte informative Makromoleküle sich als molekulare Uhren für die Rekonstruktion der Stammesgeschichte eignen. Durch eine Anhäufung von Mutationen im Gen eines bestimmten Makromoleküls während der Evolution hoffte man, Aufschluß über den Verwandtschaftsgrad verschiedener Organismen zu erhalten.

Carl Woese (1987) griff diese Idee auf und erkannte als erster das Potential ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNA) als informationstragendes Molekül für eine vergleichende Sequenzanalyse verschiedener Bakterien. Das rRNA-Molekül bietet den großen Vorteil, in allen selbstvermehrungsfähigen Organismen vorhanden zu sein. Darüber hinaus sorgen für die Funktion der Eiweißsynthese unterschiedlich wichtige Bereiche im rRNA-Molekül für eine unterschiedlich hohe Basenaustauschrate. Man unterscheidet hierbei konservierte Bereiche, die einem hohen Funktionsdruck unterliegen und deshalb ohne dramatische Konsequenzen für die Zelle kaum mutieren können, und variable Bereiche, deren Mutation für die Zelle offensichtlich zu einer weit weniger schwerwiegenden Funktionseinschränkung führt.

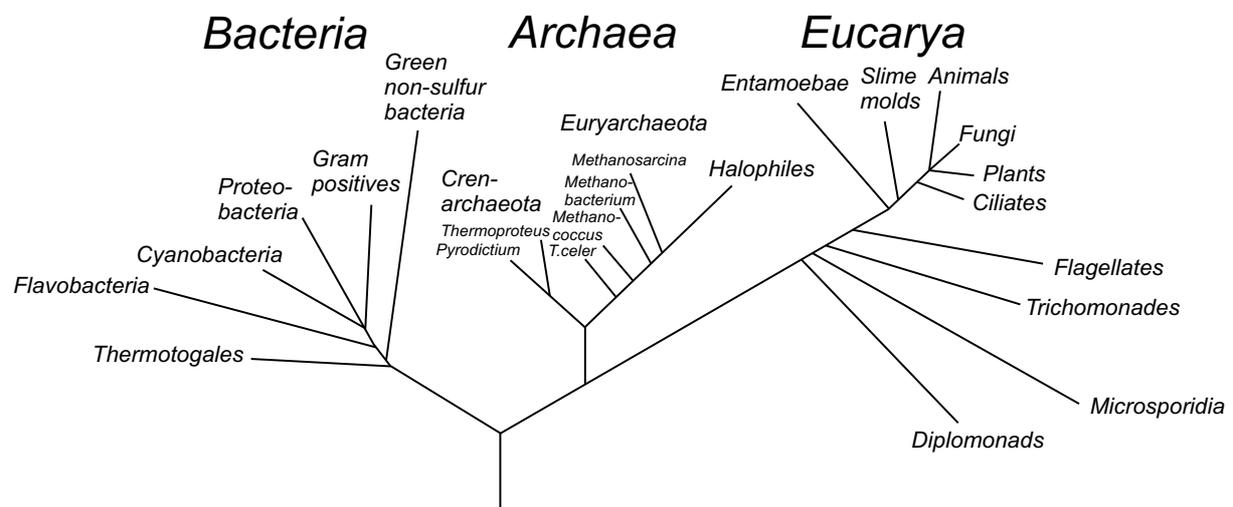


Abb. 1 Phylogenetischer Baum der drei Domänen der lebenden Organismen auf Basis der 16S (Prokaryonten) bzw. 18S (Eukaryonten) rRNA (nach Woese, 1994)

Diese unterschiedliche Verteilung läßt sich für die hierarchiespezifische Identifikation von Organismen nutzen. Mittels Computerunterstützung lassen sich nämlich sogenannte Signatursequenzen ermitteln, kurze Sequenzabschnitte also, die einer bestimmten phylogenetischen Gruppe von Organismen gemeinsam sind.

Liegt diese Signatursequenz in einem eher konservierten Bereich des rRNA-Moleküls, so lassen sich damit größere phylogenetische Einheiten identifizieren, liegen sie in einem hochvariablen Bereich so ist hingegen die Identifikation von Organismen bis auf Speziesebene möglich. Aufgrund ihres unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens in der Ultrazentrifuge unterscheidet man hierbei drei Untereinheiten bakterieller rRNA: eine 5S rRNA mit ca. 120 Nukleotiden, eine 16S rRNA mit ca. 1500 Nukleotiden und eine 23S rRNA mit ca. 3000 Nukleotiden.

Die Arbeitsgruppe von Norman Pace (Olsen et al., 1986) machte sich daran, die relativ kurze 5S rRNA für eine umfassende kultivierungsunabhängige Charakterisierung mikrobiologischer Habitats zu nutzen, was zu aufsehenerregenden Erkenntnissen führte, da viele der untersuchten Arten Sequenzen besaßen, die noch nicht in den Genbanken vorhanden waren. Auf Dauer erwies sich aber der Informationsgehalt der 5S rRNA als zu gering für die vergleichende Sequenzanalyse. Da die Sequenzierung des 23S rRNA - Genes als zu aufwendig erschien, etablierte man als Kompromiß zwischen Sequenzierungsaufwand einerseits und Informationsgehalt des Moleküls andererseits die 16S rRNA als Standardmolekül für die vergleichende prokaryontische Sequenzanalyse. Durch die Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) wurde es nunmehr möglich, die 16S rRNA-Gene (rDNA) einer Vielzahl von Mikroorganismen aus komplexen Umweltproben im Reagenzglas millionenfach zu vermehren, in entsprechende Vektoren zu klonieren und anschließend die Basensequenz mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977) zu bestimmen.

Mit diesem Datenmaterial konnten nun durch Computerunterstützung meist 15-24 Basen lange Oligonukleotide entworfen werden, deren Sequenz komplementär zu rRNA-Signatursequenzen bestimmter Organismengruppen war.

Die Aneinanderlagerung zweier einzelsträngiger Nukleinsäureabschnitte über Wasserstoffbrückenbindung - hier die Bindung von markierten Oligonukleotiden an ribosomale RNA - wird als *in situ*-Hybridisierung bezeichnet und erlaubt im Falle der Bindung an rRNA-Signatursequenzen die spezifische Detektion von phylogenetischen Gruppen. Während bis Ende der 80-er Jahre überwiegend radioaktiv markierte Oligonukleotide verwendet wurden, hat sich aufgrund der einfacheren Handhabung mittlerweile die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Cy3) durchgesetzt, die wegen der großen Anzahl von Zielmolekülen (eine Zelle kann je nach Stoffwechselaktivität bis zu 10^5 Ribosomen im Zytoplasma enthalten)

eine gute Nachweissensitivität erlaubt (DeLong, 1989). Diese sogenannte Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt die Markierung von ribosomaler RNA in der fixierten und morphologisch intakten Zelle und damit die unmittelbare Untersuchung eines Präparates im herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop. Damit ist erstmals der direkte kultivierungsunabhängige Nachweis von Bakterien am Ort ihres Wirkens möglich geworden (Amann et al., 1995).

1.5 Biofilme als typische Organisationsform von bakteriellen Lebensgemeinschaften in aquatischen Systemen

Der direkte *in situ*-Nachweis von Mikroorganismen ist vor allem für die Untersuchung von bakteriellen Biofilmen von großer Bedeutung. Mittlerweile hat sich nämlich gezeigt, daß nur ein Bruchteil der in aquatischen Systemen lebenden Bakterien in der freien Wasserphase zu finden ist (Olson und Nagy, 1984). Die meisten Bakterien hingegen heften sich an Oberflächen an und betten sich in extrapolymere Substanzen (EPS) ein, die eine wichtige Rolle bei der Bewältigung ungünstiger Lebensverhältnisse, wie z.B. Nährstoffmangel, spielen (LeChevalier et al., 1987).

Obwohl anzunehmen war, daß bakterielle Biofilme auch in den eher nährstoffarmen Karstaquiferen vorkommen, und daß sie eine für den Menschen durchaus nützliche metabolische Aktivität, z.B. beim Abbau von organischen Verunreinigungen und Nitrat, entfalten, war bislang über die reale Artenverteilung von Bakterien in Karstsystemen nichts bekannt.

Alle bisherigen Untersuchungen stützten sich auf die Kultivierung von Wasser- oder Schlammproben aus Karstsystemen, die nach neueren Erkenntnissen der Umweltmikrobiologie durch selektive Anreicherung von leichter kultivierbaren Organismen (vor allem aus der γ -Subklasse der Proteobakterien, typische Vertreter dieser Gruppe sind z.B. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* und *Enterobacteriaceae*) zu drastischen Verzerrungen des realen Artenspektrums führen können.

Bisher wurden aus dem oligotrophen Grund- und Trinkwasserbereich häufig Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium* und *Arthrobacter* isoliert (Dott, 1983; LeChevalier, 1987; Olson und Nagy, 1984; Rusterholtz et al., 1994; Balkwill et al., 1997). Eine neuere Studie, die Biofilme in aus Berliner Grundwasser gespeisten Trinkwasserleitungssystemen mittels FISH untersuchte, zeigte jedoch im Gegensatz zur hohen Kultivierungsfrequenz von

Bakterien aus der γ -Subklasse der Proteobakterien eine *in situ*-Dominanz der in der Kultur unterrepräsentierten β -Subklasse der Proteobakterien (Kalmbach et al., 1997). Obwohl Trinkwasser als eines der am besten mikrobiologisch untersuchten Lebensmittel gelten darf, führte die Anwendung von molekularbiologischen *in situ*-Verfahren im Rahmen der Berliner Studie zur Entdeckung einer neuen Gattung *Aquabacterium* (β -Subklasse der Proteobakterien), die über 60 % der Bakterien im Trinkwasserrohrleitungssystem ausmachte.

1.6 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten erstmals durch die Anwendung der rRNA-Methode konkrete Daten über die reale Artenverteilung von bakteriellen Biofilmen in einem süddeutschen Karstaquifer gewonnen werden. Als Untersuchungsobjekt wurde die geologisch im Weißjura β (Oxford 2) befindliche Wulfbachquellhöhle bei Mühlheim an der Donau (Kreis Tuttlingen) ausgewählt (Bohnert et al., 1997). Es handelt sich dabei um eine ca. 6,5 km lange Quellhöhle, in deren durch die drei tief eingeschnittenen Täler von Lipbach, Bära und Wulfbach fast vollständig vom Rest der Albtafel abgetrennten Einzugsgebiet sowohl Siedlungsflächen als auch landwirtschaftlich genutzte Areale anzutreffen sind (Abb. 10). Im Einzugsgebiet leitet eine Kläranlage fäkal belastetes Abwasser in eine Karstschwinde ein, welches nach einer Fließstrecke von etwa 800 m wieder im Wulfbach erscheint. Die fäkale Belastung des Aquifers sollte mit mikrobiologischen und wasserchemischen Verfahren untersucht werden. Da in den Hauptstrang der weit in die Albhochfläche hineingreifenden Quellhöhle mehrere Zubringer entwässern, ergab sich die Möglichkeit, Gerinne aus bestimmten Kleineinzugsgebieten zu identifizieren, die durch anthropogene Einflüsse besonders belastet sind.

Als Vergleichsobjekt sollte zudem die ca. 20 km N der Wulfbachquelle gelegene Quellhöhle des Lochbrunnens bei Unterdisgisheim mikrobiologisch beprobt werden (Jantschke, 1993). Es handelt sich hierbei um ein typisches Karstgerinne der Region, das ungefähr dem gleichen Niederschlag wie der Wulfbach ausgesetzt ist, in dessen Einzugsgebiet allerdings nur eine landwirtschaftliche und keine siedlungswirtschaftliche Nutzung vorliegt.

2. Material und Methoden

2.1 Probenahme

2.1.1 Wasserproben

Die Wasserproben wurden bei einer ganzjährig nahezu konstant bleibenden Wassertemperatur von 9,2 - 9,6° C (Käss, 1992) mit 1000 ml Polycarbonatschraubverschlußflaschen gezogen und in Kühlboxen ins Labor transportiert. Mit Ausnahme von Proben, die in den hinteren Höhlenbereichen gezogen wurden, konnten alle Wasserproben im Regelfall innerhalb von 24 h im Labor weiterverarbeitet werden.

2.1.2. Glasobjektträgerbiofilme

Polycarbonatbeschichtete 10-Feld Objektträger (Roth, Nürnberg) wurden für mindestens zwei Wochen im Bachbett des Höhlenflusses exponiert (Kalmbach et al, 1997). Anschließend wurden sie direkt am Ort der Probennahme entweder mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd in 1 M PBS (Zusammensetzung: 130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) für eine Stunde bei 9° C oder für 5 min mit 96 % Ethanol fixiert und danach bei Raumtemperatur im getrockneten Zustand bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Alternativ wurden Biofilme von unfixierten Objektträgern mit einem sterilen Kunststoffspatel abgeschabt, in sterilfiltriertem PBS resuspendiert und jeweils 100 µl der Suspension auf 100-fach verdünntem, mit autoklavierter Schlammsuspension aus der Wulfbachquellhöhle versetztem R2A-Agar (Difco, Augsburg; Zusammensetzung des 1-fach konzentrierten Mediums pro 1000 ml H₂O: 0,5 g Hefeextrakt, 0,5 g Difco Proteose Pepton Nr. 3, 0,5 g Casaminosäuren, 0,5 g Glukose, 0,5 g lösliche Stärke, 0,3 g Natriumpyruvat, 0,3 g K₂HPO₄, 0,05 g MgSO₄, 15 g Agar, pH 7,2) für mindestens 10 Tage bei 9° C im Dunkeln inkubiert. Die starke Verdünnung des Nährmediums und die niedrige Inkubationstemperatur wurden gewählt, um den realen Habitatbedingungen möglichst nahe zu kommen.

2.1.3 Biofilme auf natürlichen Aufwuchsflächen

In 50 ml sterilen Polyethylen-Röhrchen wurde am Grund des Höhlenbaches befindlicher Feinschlamm asserviert und im Laborkühlschrank bei 4° C ohne Fixation aufbewahrt.

Zur Fixation wurde die Schlammsuspension gut geschüttelt, anschließend die feinpartikulären Sedimentanteile aus dem Überstand nach einer Absetzzeit von 30 min mit einer 20 ml Spritze aspiriert und jeweils 10 ml Suspension durch einen Polycarbonatfilter mit 47 mm Durchmesser und 0,2 µm Porenweite (Millipore, Eschborn) filtriert. Die noch feuchten Filter wurden danach bei 80° C für 20 min im Heizofen gebacken und anschließend das Trockengewicht mit einer Feinwaage bis auf 0,1 mg genau bestimmt. Die Filter wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Zudem wurden vereinzelt Bachkiesel aus Weißjurakalk unter sterilen Kautelen asserviert und ebenfalls im Kühlschrank bei 4° C kurze Zeit bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

2.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl

Jeweils 100 ml Wasserprobe wurden durch einen Polycarbonatfilter mit 25 mm Durchmesser und 0,2 µm Porenweite (Millipore, Eschborn) filtriert. Für die Gesamtzellzahlbestimmung wurden die Zellen durch Benetzen eines der Filter mit 96% Ethanol abgetötet und anschließend 5 µM Sytox Green (Molecular Probes, Oregon, USA) für 5 min auf die Filteroberfläche aufgetragen. Anschließend wurde der Filter kurz vorsichtig in einer Petrischale mit destilliertem Wasser gewaschen und danach luftgetrocknet.

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden ebenfalls 100 ml Wasserprobe durch einen der oben beschriebenen Filter filtriert und sofort anschließend mit Fluoresceindiacetatlösung (5 µl einer 0,5 % (w/v) Lösung von Fluoresceindiacetat (Sigma) in Aceton wurde kurz vor der Untersuchung mit 1 ml PBS gemischt) für 15 min überschichtet.

Anschließend wurden beide Filter auf einem Objektträger mit Antibleichmittel für die Fluoreszenzmikroskopie (STZ Techn. Chemie, Reutlingen) überschichtet und nach Auflage eines Deckglases jeweils 15 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder bei 1000-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

2.3 Bestimmung der Kolonizahl bei 20° C und 36° C

Pro Wasserprobe wurden je zweimal 0,1 ml Wasser mit 10 ml flüssigem auf 44° C erwärmten Koloniezahlagar gemäß Deutsche Einheitsverfahren (DIN, 1983; in 1000

ml H₂O wurden folgende Stoffe gelöst und autoklaviert: 10 g Fleischpepton (tryptisch verdaut), 10 g Fleischextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar, pH 7,2 ± 0,3) in einer Petrischale unter gegenläufigen Achtertouren gemischt. Nach dem Erkalten wurde eine Agarplatte bei 20 ± 2 °C, die andere bei 36 ± 1 °C für 44 ± 4 h im Brutschrank inkubiert. Unter Zuhilfenahme einer 6-fach vergrößernden Lupe wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt. Der jeweilige Wert wurde mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Koloniezahl pro ml zu erhalten.

2.4 Untersuchung der Wasserproben auf *E. coli* und Fäkalstreptokokken

Je 100 ml der Wasserprobe wurden durch einen Polycarbonatfilter mit 47 mm Durchmesser und 0,2 µm Porenweite (Millipore) filtriert und einer der Filter auf Chromocult Coliformen Agar (Merck, Darmstadt) der andere auf Tetrazolium-Azid Agar (in 1000 ml H₂O wurden folgende Stoffe gelöst und autoklaviert: 20 g tryptisches Pepton aus Kasein, 5 g Hefeextrakt, 2 g D-Glukose, 4 g K₂HPO₄, 0,4 g NaN₃, 0,1 g Triphenyltetrazoliumchlorid, 15 g Agar, pH 7,2) für jeweils 48 h bei 36° C inkubiert. Auf Chromocult Coliformen Agar blau gefärbte Kolonien (β-Glukuronidasereaktion positiv) wurden gemäß den Anweisungen des Hersteller als *E. coli* gewertet, rote Kolonien (β-Glukuronidasereaktion negativ, Lactosespaltung positiv) hingegen als coliforme Keime, die nicht als *E. coli* anzusprechen sind. In der Regel handelt es hierbei um die zur Lactosespaltung befähigten *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* oder *Klebsiella pneumoniae*.

Fäkalstreptokokken stellten sich auf Tetrazolium-Azid als braune Kolonien dar. Bei sehr geringen bzw. sehr hohen Keimzahlen wurde der Versuch mit entsprechend erhöhten bzw. erniedrigten Volumina wiederholt.

2.5 Untersuchung der Wasserproben auf Salmonellen und Yersinien

Die salmonellenspezifische Oligonukleotidsonde SAL544, die yersinienspezifische Sonde YER1243 und die enterobacteriaceenspezifische Positivkontrollsonde EBAC1790 wurden unter Verwendung der Linux-Software ARB (siehe 2.9) entworfen und wie die anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden von MWG-Biotech (Ebersberg) mit dem Fluorochrom Cy3 am 5'-Ende synthetisiert (Tab 2). Von Januar bis August 2000 wurden nach jeder Probennahme in der Wulfbachquelle 100 ml Wasserprobe 44 ± 4h bei 36 ± 1° C in 100 ml doppelkonzentrierter Lactose-

Pepton-Bouillon inkubiert (in 1000 ml H₂O wurden folgende Stoffe gelöst und autoklaviert: 34 g Pepton aus Kasein (tryptisch verdaut), 6 g Pepton aus Sojamehl (papainisch verdaut), 10 g NaCl, pH 7,2 ± 0,1). 50 ml dieser Bakteriensuspension wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und 10 min bei 4500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml 99% Ethanol resuspendiert. Nach 5 min Fixationszeit wurden 5 ml PBS (pH 7,4) hinzugefügt und die Suspension bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Zur Untersuchung auf Salmonellen und Yersinien wurde jeweils 10 µl fixierte Probensuspension auf ein Objektträgerfeld aufgetragen, über der Bunsenbrennerflamme vorsichtig getrocknet und eine Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt. Die Formamidkonzentration für SAL544 betrug 10, für YER1243 30% und für EBAC1790 40%.

2.6 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Biofilmprouben (im Habitat exponierte Objektträger oder hitzefixierte sedimentbedeckte Polycarbonatfilterstücke mit 47 mm Durchmesser) wurden mit 2 % (w/v) Magermilchpulver (Oxoid, Wesel) in PBS (pH 7,4) überschichtet und in einer feuchten Kammer 45 min lang bei 46° C vorhybridisiert, um die unspezifische Bindung der Oligonukleotidsonden zu blockieren. Hitze- oder ethanolfixierte Bakteriensuspensionen wurden hingegen direkt auf einen 10-Felder Objektträger aufgetragen (10 µl pro Feld) und über der Bunsenbrennerflamme vorsichtig getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger, nicht aber die Filterstücke, jeweils 3 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50 %, 80 % und 96 % Konzentration bei Raumtemperatur dehydriert. Jeweils 9 µl Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.01% SDS, Formamidkonzentration für jedes Oligonukleotid in Tab. 2) wurden mit 1 µl 8 µM Oligonukleotidvorratslösung (Sonden am 5'-Ende mit Cy3 markiert, synthetisiert von MWG-Biotech, Ebersberg) gemischt und anschließend auf ein Objektträgerfeld aufgetragen (Kalmbach et al., 1997). Für die Filterhybridisierung eines typischen Filterstücks (geachtelter Polycarbonatfilter mit 47 mm Durchmesser, auf Glasobjektträger immobilisiert) wurde das Gesamtvolumen der Hybridisierungslösung von 10 µl auf 20 µl erhöht. Die Hybridisierung erfolgte für Glasobjektträger und Filterstücke jeweils in einer feuchten Kammer bei 46° C für mindestens 90 min und maximal 12 h. Anschließend wurden nicht gebundene

Oligonukleotidsonden durch 20-minütiges Inkubieren in auf 46° C vorgewärmten Waschpuffer entfernt. Die Zusammensetzung des Waschpuffers bestand aus 20 mM Tris-HCl, 0.01% (w/v) SDS, die NaCl-Konzentration wurde in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer unter Verwendung von folgender Gleichung berechnet:

$$\text{NaCl [mM]} = 1000 \times (2^{\text{Formamid [\%]} \times 0.1})^{-1}.$$

Nach vorsichtigem Abwaschen in doppelt destilliertem H₂O wurde das Probenmaterial getrocknet und 5 min mit DAPI (1 µg/ml) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Abwaschen in doppelt destilliertem H₂O wurde getrocknet und STZ Antibleichmittel für die Fluoreszenzmikroskopie aufgetragen. Nach Auflegen eines Deckgläschens wurde das Präparat in einem Axioplan-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit 50 Watt Quecksilberdampflampe bei 1000-facher Vergrößerung durch das Ölimmersionsobjektiv betrachtet. Folgende Filtersätze wurden verwendet: Zeiss Filtersatz Nr. 2 für DAPI (Anregung 365 nm; Strahlenteiler 395; Langpassfilter 420 nm), Nr. 9 für Fluorescein (Anregung 450-490 nm; Strahlenteiler 510 nm; Langpassfilter 520 nm), Nr. 15 für TRITC (Anregung 546 nm; Strahlenteiler 580 nm; Langpassfilter 590 nm) und HQ Filter F41-007 (AF Analysetechnik, Tübingen) für Cy3-markierte Sonden (Anregung 530-545 nm; Strahlenteiler 565 nm; Bandpassfilter 610–675 nm).

Zur Quantifizierung wurden die Bakterienzellzahlen in mindestens 15 zufällig ausgewählten mikroskopischen Feldern (Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung: $r = 125\mu\text{m}$) bestimmt und anschließend arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung unter Verwendung des Programmes StarCalc (Sun Microsystems) ermittelt. Die Aufzeichnung von Digitalbildern auf Datenträger wurde mit einer Sony 3CCD-Camera und dem KS300 Digitalbildanalyzesystem (Kontron AG, Eching) durchgeführt. Der prozentuale Anteil der einzelnen phylogenetischen Gruppen an der bakteriellen Gesamtzellzahl wurde auf die Zahl der mit Sonde EUB338 markierbaren Bakterien im gleichen Präparat bezogen.

2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Ausgewählte Isolate, die zu *in situ* dominanten phylogenetischen Gruppen gehörten, wurden bis zur sichtbaren Trübung der Nährlösung in 10 ml R2A-Bouillon

(Zusammensetzung wie R2A-Medium unter 2.1.2., allerdings ohne Agarzugabe) bei 9° C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4500 Umdrehungen wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml sterilfiltriertem hochreinem *aqua ad injectabilia* resuspendiert. Die Suspension wurde einem zweimaligen Frier-Tau-Zyklus unterworfen (Einfrieren bei -70° C und anschließendes Erhitzen für 5 min bei 96 ° C), um genomische DNA für die Amplifikation des 16S rRNA-Genes freizusetzen. 5 µl von jeder Probe wurden nun jeweils zu einem PCR-Mastermix folgender Zusammensetzung gegeben:

5,0 µl	10-fach Promega PCR-Puffer (15 mM Mg++)
0,5 µl	Promega <i>Thermus aquaticus</i> - Polymerase (5000 U/ml)
1,0 µl	Promega dNTPs (10 mM)
1,0 µl	Forward Primer (10 µM), synthetisiert von MWG-Biotech
1,0 µl	Reverse Primer (10 µM), synthetisiert von MWG-Biotech
35,5 µl	H ₂ O

Tab. 1 Verwendete PCR - Primer

Primer	Spezifität	rRNA - Position*	Sequenz (5´- 3´)	Referenz
27F	Domäne <i>Bacteria</i>	16S (27-46)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
1492R	Domäne <i>Bacteria</i>	16S (1492-1510)	GGYTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991
BONE695FW	β1 - Subgruppe der Proteobak- terien	16S (695-715)	CGGYAGAGGGGGATGGAATTC	Diese Arbeit
BONE1413RW	β1 - Subgruppe der Proteobak- terien	16S (1413-1432)	CTGGCAGAACCCGCTCCCAT	Diese Arbeit

^a*E. coli* – Nummerierung (Brosius et al., 1981)

Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer Thermocycler Gene Amp 9700 mit Deckelheizung unter Benutzung der folgenden Temperaturprofile durchgeführt:

a) Primerpaar 27F-1492R:

Initiale Denaturierung 3 min bei 94 ° C, dann 35 Zyklen mit 1,5 min Denaturierung bei 94° C, 1,5 min Primeranlagerung bei 50° C, 2 min Kettenverlängerung bei 72° C. Zum Schluß noch einmal 10 min bei 72° C.

b) Primerpaar 695FW-1413RW:

Initiale Denaturierung 3 min bei 94 ° C, dann 38 Zyklen mit 1,5 min Denaturierung bei 94° C, 1 min Primeranlagerung bei 55° C, 1,5 min Kettenverlängerung bei 72° C. Zum Schluß noch einmal 10 min bei 72° C.

Anschließend wurde das jeweilige PCR-Amplicon mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* (Erkennungssequenz 5'-GG↓CC-3') geschnitten. Dazu wurden jeweils 10 µl PCR-Amplicon direkt ohne Aufreinigung in folgenden *HaeIII*-Mastermix eingesetzt:

7,3 µl	H ₂ O
2,0 µl	10-fach Promega Restriktionspuffer
0,2 µl	BSA (10 µg / µl)
0,5 µl	<i>HaeIII</i> -Restriktionsenzym (Promega)

Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37° C wurden jeweils 20 µl des geschnittenen Amplikons pro Geltasche in einem Agarosegel (2 % w/v Agarose in 1 x TAE-Puffer (Zusammensetzung: 4,84 g Tris-Base, 1142 µl Essigsäure, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; mit H₂O auffüllen auf 1000 ml)) bei 150 V für 1 h über 10 cm Laufstrecke aufgetrennt. Das Gel wurde für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und anschließend auf einem UV-Leuchtschirm fotografiert.

2.8 Selektion und Charakterisierung von Biofilmisolaten

Die Biofilme wurden von der jeweiligen Unterlage mit einem sterilen Schaber, bzw. (bei stark unregelmäßiger Oberfläche) mit einer Zahnbürste abgeschabt und in sterilfiltriertem PBS (pH 7,4) resuspendiert. Jeweils 100 µl der Suspension wurden auf 100-fach verdünntem R2A-Agar (angesetzt mit autoklaviertem Wasser und Feinschlamm aus der Höhle) ausplattiert und für mindestens 10 Tage bei der Habitatterperatur von 9° C inkubiert. Zufällig ausgewählte Kolonien wurden dann auf konventionelle R2A-Platten überimpft und nach 2 Kultivierungspassagen mit Sonden für die *in situ* dominanten phylogenetischen Gruppen untersucht.

Um eine möglichst hohe Speziesdiversität zu gewährleisten wurden auch Proben bei 20° C und auf unverdünntem R2A-Agar inkubiert und insgesamt 20 dieser so gewonnen Isolate mittels FISH grob charakterisiert. Darüber hinaus wurden 11 morphologisch auffällige Kolonien bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop mit Hilfe einer an einem Mikromanipulator befestigten Glaskapillare vereinzelt.

Insgesamt wurden 340 Isolate mittels FISH charakterisiert, davon wurden 198 verworfen, weil sie keiner *in situ* vertretenen Gruppe angehörten, oder weil sich bereits identische Spezies in der Isolatsammlung befanden. 142 Isolate wurden mittels Gefriertrocknung archiviert und ausgewählte Isolate zur Sequenzierung eingesandt.

Archivierte Isolate wurden auf biochemische Eigenschaften untersucht. Folgende biochemischen Tests wurden durchgeführt:

a) Test auf Oxidasereaktion

Mit einer Impföse wurde eine Kolonie vom Agar abgetragen und auf einem Bactident Oxidase (Merck, Darmstadt) Teststreifen verrieben. Eine violette Verfärbung wurde als positive Reaktion gewertet.

b) Test auf Katalasereaktion

Am Rand einer Agarplatte wurde ein kleiner Tropfen einer 3 % Wasserstoffperoxidlösung auf eine Kolonie getropft. Ein kurzes Aufschäumen wurde als positive Reaktion gewertet.

c) Test auf Nitratreduktion

Zu 10 ml R2A-Bouillon wurde 2 mg KNO_3 gegeben. In dieser Nährlösung wurde das fragliche Isolat bei 9° C mindestens 4 Tage bebrütet. Anschließend wurden 350 μl Griess-Reagens (Merck) zugegeben. Eine Rotfärbung zeigte das Auftreten von Nitrit und damit die Reduktion des Nitrates bis zur Stufe des Nitrits an. Bei Ausbleiben der Verfärbung wurde etwas Zinkstaub zugegeben. Eine daraufhin eintretende Rotfärbung wurde als nicht erfolgte bakterielle Nitratreduktion interpretiert (Nitratreduktion erst durch Zinkstaub), eine ausbleibende Farbreaktion hingegen als bakterielle Nitratreduktion über die Stufe des Nitrit hinaus.

d) Indolbildung aus Tryptophan

0,1 g Tryptophan wurde zu 10 ml R2A-Bouillon gegeben. Das fragliche Isolat wurde in dieser Lösung mindesten 4 Tage bei 9° C bebrütet. Anschließend wurden einige Tropfen Kovács-Reagenz zugegeben. Eine Rotfärbung wurde als positive Indolreaktion gewertet.

e) API 20 NE

Alle zu sequenzierenden Isolate mit positiver Oxidasereaktion wurden mit einem API 20 NE Testkit (bioMérieux, Nürtingen) gemäß der Vorschrift des Herstellers einer biochemischen Identifikation unterworfen. Die Auswertung erfolgte mit dem MS-DOS-Programm Apilab unter Verwendung des numerischen Identifikationsschlüssels.

2.9 Vergleichende Sequenzanalyse und Sondendesign

Vollständige 16S rRNA-Gen-Sequenzen ausgewählter Isolate wurden von Yves Neitzel (Arbeitsgruppe Prof. Szewzyk, TU-Berlin) im Rahmen des DFG-Gesamtprojektes bestimmt und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen wurden in das rRNA-Sequenzanalyseprogramm ARB (Software für das Betriebssystem Linux, erhältlich im World-Wide-Web unter folgender Adresse: <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB>) importiert und mittels des ARB Sequenzeditors (Neighbour Joining Methode) ein Sequenzalignment berechnet. Über das Ribosomal Database Project (RDP, WWW-Adresse: <http://www.cme.msu.edu/rdp/html/index.html>) wurden 16S rRNA - Sequenzen bereits bekannter Organismen importiert, die Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen der

Wulfbachisolate mittels ARB verglichen und die nächsten Verwandten und ihre prozentuale Sequenzähnlichkeit bestimmt. Die 16S rRNA-Gensequenzen dieser bereits bekannten Organismen wurden zusammen mit den Wulfbachisolatsequenzen in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt.

Mit Hilfe des ARB EDIT Programmteils wurden aus den gegebenen 16S rRNA-Gensequenzen Oligonukleotidsonden für bestimmte phylogenetische Gruppen bis hinab zur Speziesebene berechnet, um die *in situ*-Bedeutsamkeit dieser Organismen in den Biofilmen mittels FISH überprüfen zu können (Tab. 2).

Die Sonden wurden dann von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert und dabei am 5'-Ende mit dem Indocarbocyanin Cy3 markiert.

Tab. 2 Verwendete Oligonukleotide für FISH

<u>Sonde</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Zielposition</u>	<u>Sequenz (5' - 3')</u>	<u>[%]FA in situ^b</u>	<u>Literatur</u>
EUB338	Domäne <i>Bacteria</i>	16S (338-355)	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	0	Amann et al., 1990
EUB2490	Domäne <i>Bacteria</i>	23S (2490-2507)	GAC ATC GAG GTG CCA AAC	20	Diese Arbeit
EUB879	Domäne <i>Bacteria</i> , einige <i>Archaea</i>	16S (879-894)	CGT ACT CCC CAG GCG G	20	Bohnert et al., 2001
ARC915	Domäne <i>Archaea</i>	16S (915-934)	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	40	Stahl et al., 1991
EUK516	Domäne <i>Eukarya</i>	18S (502-516)	ACC AGA CTT GCC CTC C	40	Amann et al., 1995
NB129	Nicht-bindende Negativkontroll- sonde	23S (129-147)	GTG TGA CGA GTC ACA CTG G		Bohnert et al., 2001
ALF1b	α -Subklasse der Proteobakterien, einige Gram- positive	16S (19-35)	CGT TCG YTC TGA GCC AG	30	Manz et al., 1992
BET42a	β -Subklasse der Proteobakterien	23S (1027-1043)	GCC TTC CCA CTT CGT TT	40 ^c	Manz et al., 1992
GAM42a	γ -Subklasse der Proteobakterien	23S (1027-1043)	GCC TTC CCA CAT CGT TT	40 ^c	Manz et al., 1992
SRB385	δ -Subklasse der Proteobakterien	16S (385-402)	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	40	Amann et al., 1990
CF319a	<i>Cytophaga- Flavobacterium Cluster</i>	16S (319-336)	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	40	Manz et al., 1996
LGC2043	Gram-positive mit niedrigem G+C DNA- Gehalt, ohne die meisten <i>Clostridium</i> sp.	23S (2043-2061)	CTT TCC GTC CTG TCG CGG	30	Bohnert et al., 2001
HGC69a	Gram-positive mit hohem G+C-DNA Gehalt	23S (1901-1918)	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	40	Roller et al., 1994
BONE23a	β 1-Subgruppe der Proteobakterien	16S (663-679)	GAA TTC CAT CCC CCT CT	40	Amann et al., 1996
BTWO23a	Kompetitor für BONE23a	16S (663-679)	GAA TTC CAC CCC CCT CT	40	Amann et al., 1996
Nso1225	Ammoniumoxidierer aus der β - Subklasse der Proteobakterien	16S (1225-1244)	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	40	Mobarry et al., 1996

Tabelle
fortgesetzt auf
nächster Seite

<u>Sonde</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Zielposition^a</u>	<u>Sequenz (5' - 3')</u>	<u>[%]FA in situ^b</u>	<u>Literatur</u>
PSM _G	<i>Pseudomonas</i> sp.	16S (440-454)	CCT TCC TCC CAA CTT	40	Braun- Howland et al., 1993
PSE2034	<i>Pseudomonas</i> sp.	23S (2034-2051)	AGC CGC GGA TAC ACT GCA	40	Bohnert et al., 2001
PF11030	<i>Pseudomonas fluorescens</i> - Gruppe	16S (1030-1046)	CTG TCT CAA TGT TCC CG	30	Bohnert et al., 2001
EBAC1790	<i>Enterobacteria- ceae</i>	23S (1790-1807)	CGT GTT TGC ACA GTG CTG	40	Bohnert et al., 2000
Eco543	<i>Escherichia coli</i>	23S (543-560)	GCA GTC ACA CGC CTA AGC	10	Diese Arbeit
SAL544	<i>Salmonella</i> sp.	23S (544-561)	GCA GTC ACA CAG GTA AAC	10	Diese Arbeit
Eco524	Helferoligo für SAL544	23S (524-541)	TGC TCC CAC TGC TTG TAC	10	Diese Arbeit
Eco561	Helferoligo für SAL544	23S (561-578)	CCA TTA TAC AAA AGG TAC	10	Diese Arbeit
YER1243	<i>Yersinia</i> sp.	16S (1243-1263)	GTT CGC TTC ACT TTG TAT CTG	30	Diese Arbeit
WB 26,68,73	Wulfbachisolat- cluster 26,68,73	16S (64-83)	GTT GCC CCG CGC TGC CGT TC	30	Diese Arbeit
WB72	Wulfbachisolat 72	16S (449-470)	CGT ATT AGG GCA GAC CGT TTC G	30	Diese Arbeit
WB139	Wulfbachisolat 139	16S (998-1018)	TAT CTC TAG CGA CTT CCG TAC	30	Diese Arbeit
ATX1577	<i>Bacillus anthracis</i> - cereus - Gruppe	23S (1577-1596)	GGC ACC TTT TAT CTC GCT AG	20	Diese Arbeit
BAC1577	<i>Bacillus subtilis</i> - Gruppe	23S (1577-1597)	GCA CCT CTC ACC TCG CTA G	20	Diese Arbeit
ART1254	<i>Arthrobacter</i> sp.	16S (1254-1273)	CAC CTC ACA GTA TCG CAA CC	40	Diese Arbeit

^a*E. coli*-Nummerierung (Brosius et al., 1981)

^bProzent (v/v) Formamid im *in situ*-Hybridisierungspuffer zur Diskriminierung gegen
nah verwandte Organismen (ermittelt für Markierung mit Cy3)

^cNur gültig, wenn ein Kompetitor verwendet wird.

3. Ergebnisse

3.1 Mikrobiologische Untersuchung auf hygienisch relevante Mikroorganismen in Wasserproben aus der Wulfbachquellhöhle

Von August 1998 bis August 2000 wurden die Koloniezahl bei 20° C und 36° C und die *E. coli*-Konzentration am Eingang der Wulfbachquellhöhle und des Lochbrunnens bestimmt. Bei jeder Probenahme wurden die Wasserstände am Eingang der Wulfbachquellhöhle notiert. Die Ergebnisse sind grafisch in Abb. 2-5 dargestellt. Die mediane Konzentration an *E. coli* pro ml betrug beim Lochbrunnen 0,4 (minimal 0; maximal 4 *E. coli* pro ml) und bei der Wulfbachquelle 0,5 *E. coli* pro ml (minimal 0; maximal 48 *E. coli* pro ml). Von Mitte 1999 bis August 2000 wurde zudem auch die Fäkalstreptokokkenkonzentration bestimmt (Abb. 8).

Ab Januar 2000 wurden jeweils 100 ml Wasser nach erfolgreicher Testung der Sonden SAL544 und YER1243 mittels FISH auf Salmonellen und Yersinien untersucht. Während YER1243 in den Vortests mit Referenzstämmen sehr gute Fluoreszenzsignale lieferte, konnten mit SAL544 nur recht schwache Signale erhalten werden. Der Einsatz der beiden in unmittelbarer Nähe zu SAL544 bindenden unmarkierten Helferoligonukleotide Eco524 (5'-Ende) und Eco561 (3'-Ende) entsprechend der Vorgehensweise von Fuchs et al. (2000) führte jedoch zu einer deutlichen Anhebung der Fluoreszenzintensität.

Nur an einem Probenahmetermin, nämlich am 15.7.2000, konnten im Wulfbach in 100 ml Wasserprobe Salmonellen nachgewiesen werden. An diesem Tag herrschte extremer Niedrigwasserstand, obwohl es nach einer wochenlangen Trockenperiode erstmals wieder heftig geregnet hatte. Das Wasser war schaumig getrübt. Genau zu diesem Zeitpunkt konnte im Wulfbach mit 48 *E. coli* pro ml die bis dahin höchste gemessene Konzentration dieser Fäkalindikatoren gemessen werden.

100 ml des stark getrühten und leicht schaumigen Wassers wurden durch 47 mm Polycarbonatfilter filtriert und die Filter mittels FISH untersucht. 72,8 % der mit Sytox Green markierbaren planktonischen Zellen konnten mit EUB338 hybridisiert werden. Die genaue phylogenetische Zusammensetzung ist Abb. 20 zu entnehmen. Es fällt auf, daß während des massiven Durchbruchs von Abwasser aus der Kolbinger Kläranlage in den Wulfbach mehr als 50 % der EUB338-markierbaren Bakterien zur Gruppe der Gram-positiven zu rechnen sind (darunter 36,5 % zur HGC-Gruppe), die

ansonsten im System überhaupt keine Rolle spielten und erstmals auch mit ALF1b (4,3 %) und CF319a (3 %) markierbare Bakterien nachweisbar sind.

Demgegenüber konnten am 15.7.2000 keine Yersinien detektiert werden. Nur am 18.6.2000 konnten in 100 ml Wasserprobe Yersinien nachgewiesen werden.

Bei der großen 2-tägigen Beprobungstour am 1.5.1999 konnten weder mit Chromocult Coliformen Agar noch mit Sonde Eco543 in einem der Zubringer in 10 ml Wasserprobe *E. coli* nachgewiesen werden. Im Sologang und im Siphon 8b (Abb. 10) konnten jedoch in 10 ml Wasser nach Inkubation in R2A-Bouillon Yersinien mit Sonde YER1243 detektiert werden.

In dem in Richtung Kolbinger Kläranlage ziehenden Siphon 8b konnten bei drei Einzelbeprobungen gegenüber dem Hauptzubringer nur bei Niedrigwasserstand (< -57 cm) signifikant höhere Fäkalindikatorkonzentrationen gemessen werden.

Mikrobiologische Einzelwerte von August 1998 bis August 2000

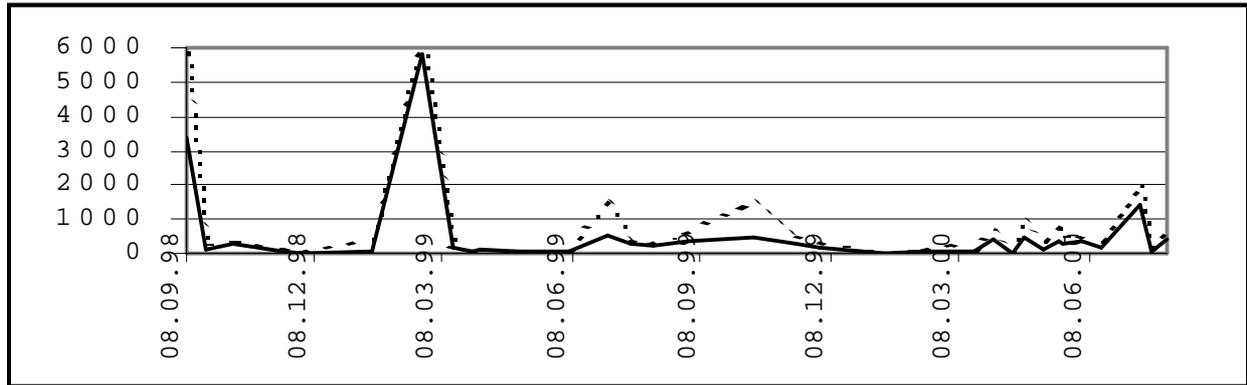


Abb. 2 Koloniezahl in 1 ml Wasser (Wulfbachquelle) bei 20° C (gestrichelte Linie) und 36° C (durchgezogene Linie)

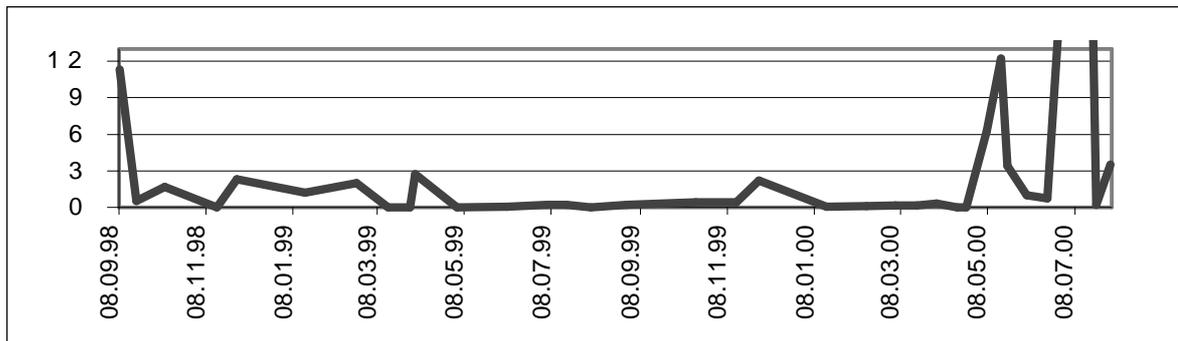


Abb. 3 *E. coli* in 1 ml Wasser (Wulfbachquelle)

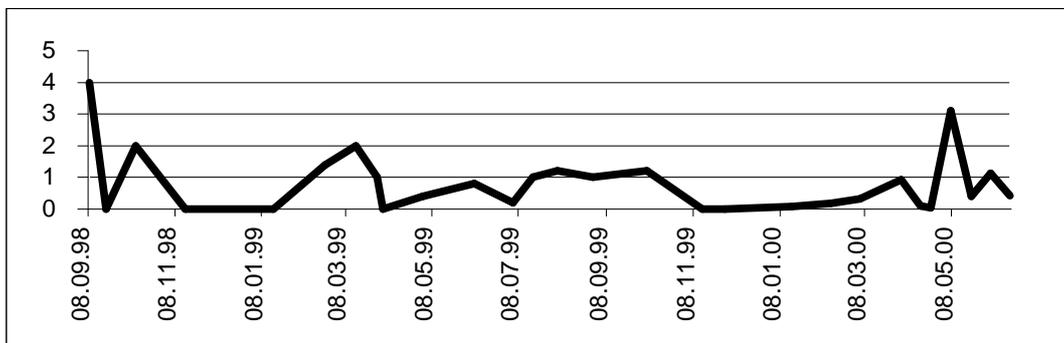


Abb. 4 *E. coli* in 1 ml Wasser (Lochbrunnen)

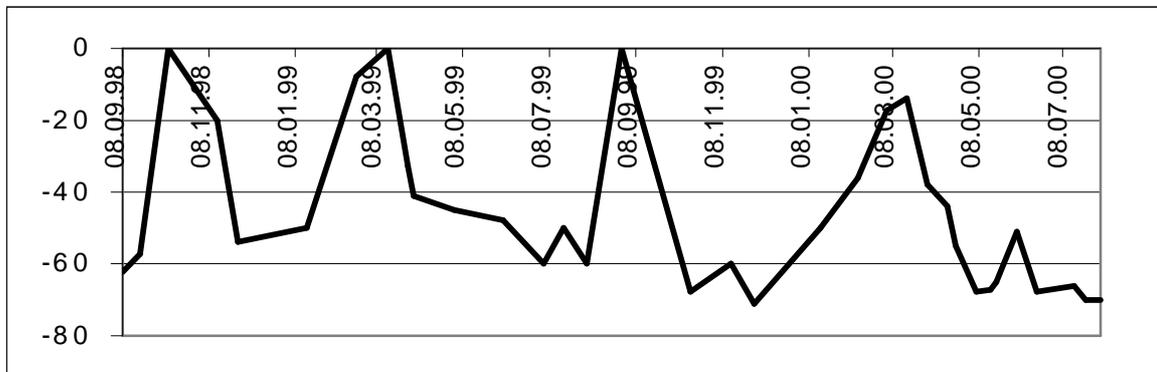


Abb. 5 Wasserstand am Eingang der Wulfbachquellhöhle (cm unter Höchststandsmarke)

Mikrobiologische Parameter von November 1999 bis August 2000

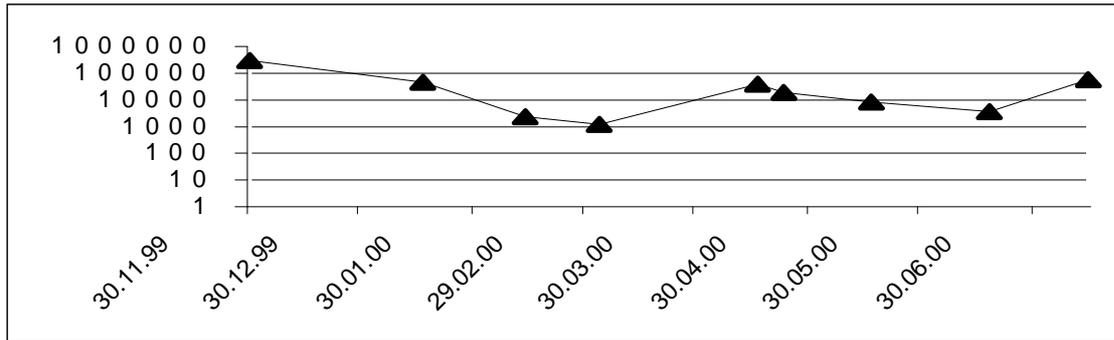


Abb. 6 Zahl der mit Sytox Green markierbaren Bakterien in Wasserproben am Eingang der Wulfbachquelle (logarithmische Darstellung der Mittelwerte aus 15 mikroskopischen Feldern)

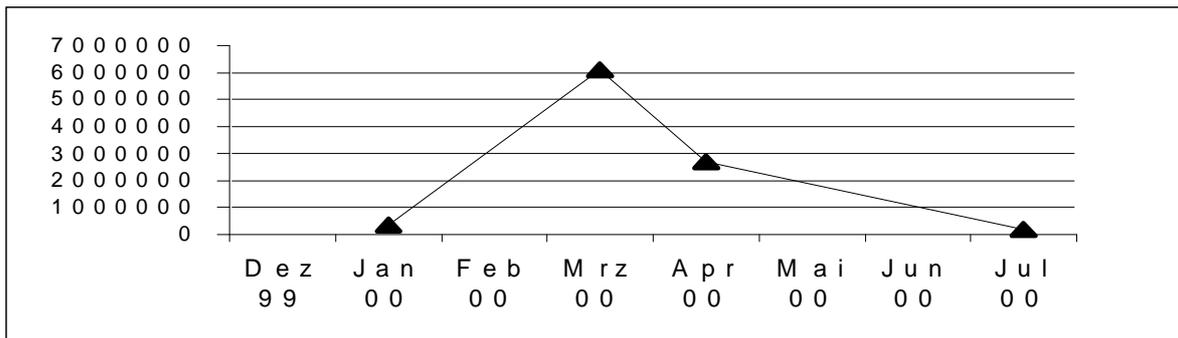


Abb. 7 EUB338-Cy3 markierte Bakterien pro mg Trockensediment in Schlammproben aus dem ersten Siphon der Wulfbachquellhöhle (Mittelwerte aus jeweils 15 mikroskopischen Feldern)

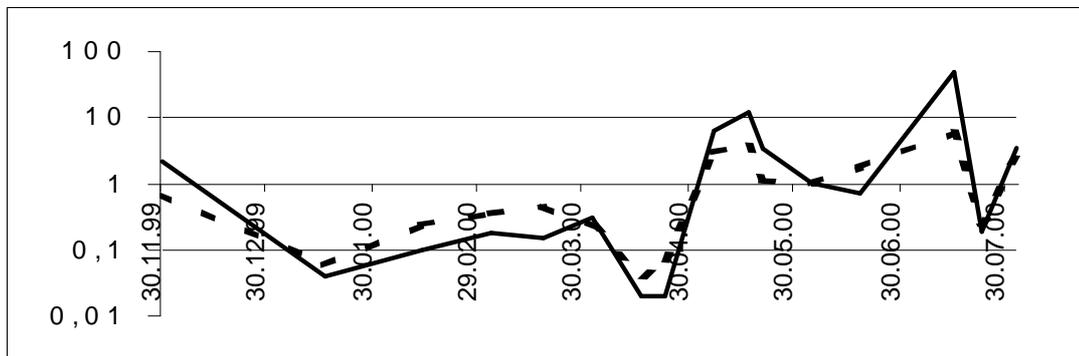


Abb. 8 *E. coli* (durchgehende Linie) und Fäkalstreptokokken (gestrichelte Linie) pro ml Wasser in der Wulfbachquellhöhle (logarithmische Darstellung der Einzelwerte)

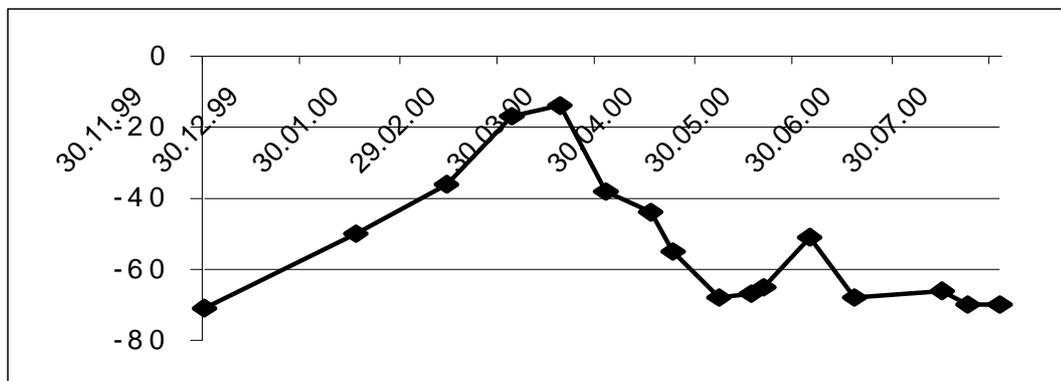


Abb. 9 Wasserstand in cm unter Höchststandsmarke am Eingang der Wulfbachquellhöhle

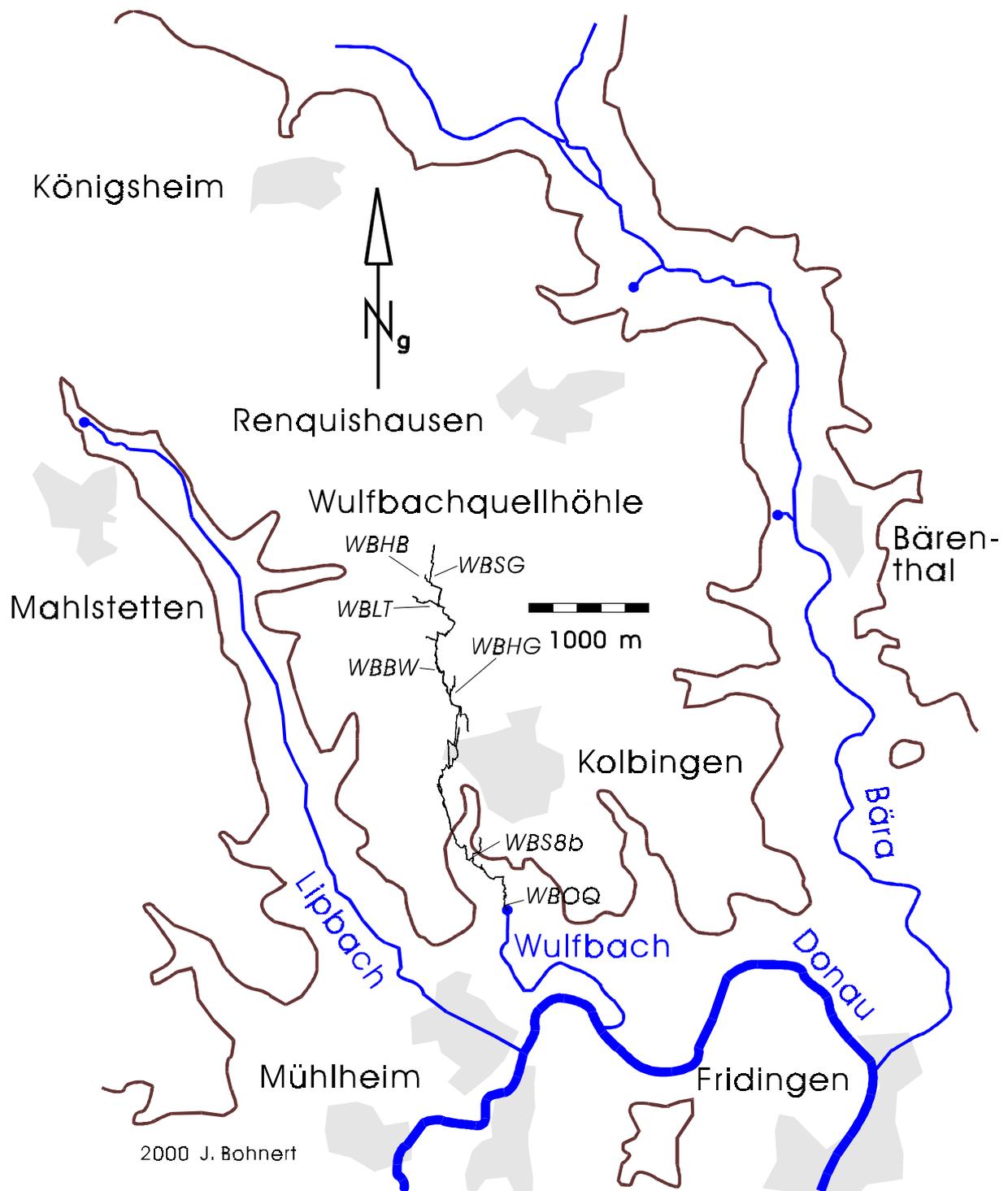


Abb. 10 Lage der Wulfbachquellhöhle innerhalb des Einzugsgebietes.

Die Probenahmestellen sind mit kursiven Buchstaben dargestellt:

<i>WBOQ</i>	Eingang der Quellhöhle
<i>WBS8b</i>	Siphon 8b
<i>WBHG</i>	Hoffnungsgang
<i>WBBW</i>	Biwak
<i>WBLT</i>	Lehmtunnel
<i>WBSG</i>	Sologang
<i>WBHB</i>	Hahnenbergversturz

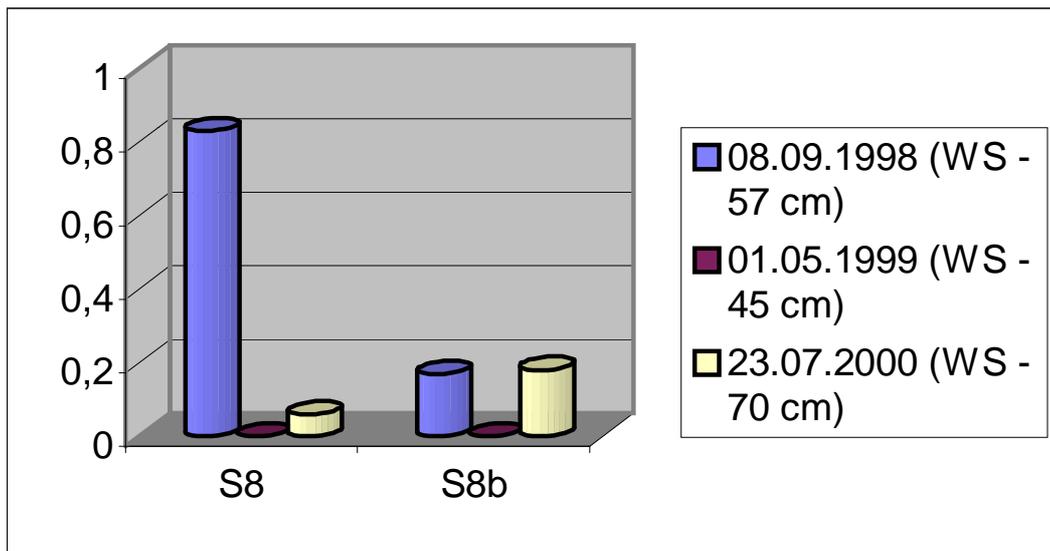


Abb. 11 *E. coli* pro ml Wasserprobe im Hauptzubringer (S8) und im Nebenzubringer (S8b) der Wulfbachquellhöhle an drei verschiedenen Probenahmeterminen. In Klammern ist der zugehörige Wasserstand am Eingang der Quellhöhle vermerkt.

3.2 Wasserchemische Untersuchung

Die wasserchemische Beprobung der verschiedenen Zubringer ergab erhöhte Natrium-, Kalium- und Nitrateinträge im Bereich von Siphon 8b (WBS8b) und erhöhte Werte für Nitrat und Phosphat im Bereich des Sologanges (WBSG) (Tab. 3).

Bei drei Einzelbeprobungsterminen am Eingang der Wulfbachquellhöhle zeigte sich ein Trend zu einer Konzentrationsabnahme von Na^+ , K^+ , Cl^- und NO_3^- mit zunehmender Schüttung (Abb. 12).

Der im Quellwasser gelöste organische Kohlenstoff (DOC) bewegte sich im Untersuchungszeitraum zwischen 0,6 und 0,9 mg/l.

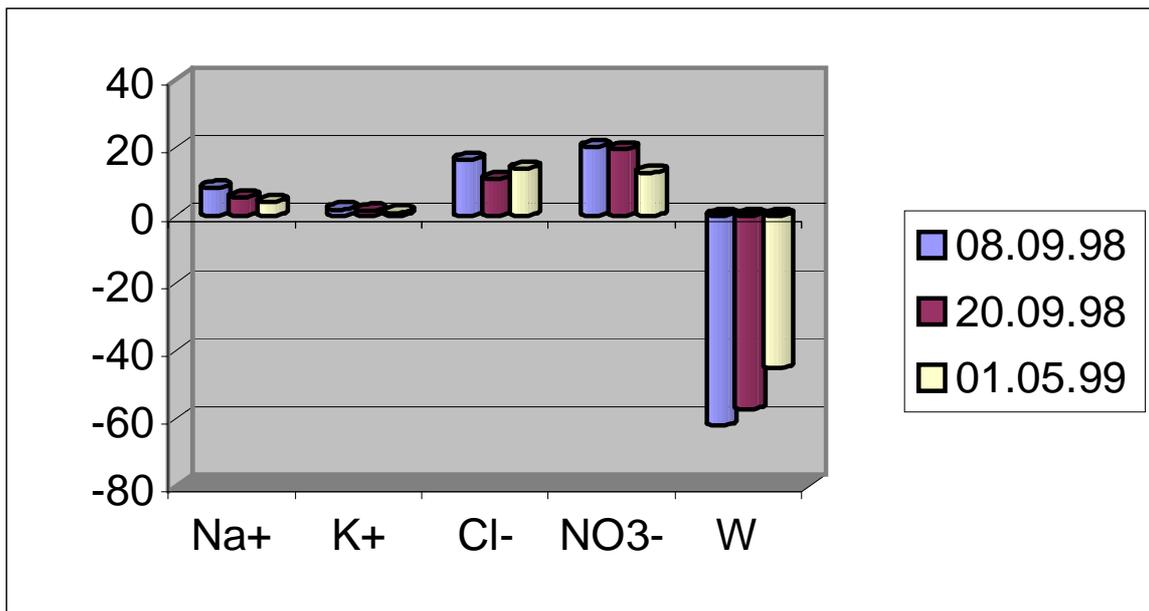


Abb. 12 Konzentration von Na^+ , K^+ , Cl^- und NO_3^- - Ionen in mg/l am Eingang der Wulfbachquellhöhle an drei verschiedenen Probenahmeterminen und zugehöriger Wasserstand (W) in cm unter Höchststandsmarke.

Tab. 3 Wasserchemische Untersuchungsergebnisse der großen Beprobungskampagne in den hinteren Bereichen der Wulfbachquellhöhle vom 1.5.1999

Alle Werte in mg/l

Entnahmeort*	Na	K	Ca	Mg	NH_4	NO_2	NO_3	SO_4	PO_4	Cl
WBOQ (0)	4,1	0,8	100	3,9	<0,1	<0,01	12,6	22,9	<0,1	13,7
WBS8b(800)	5,3	2,4	94	2,5	<0,1	<0,01	22,8	21,2	<0,1	13,2
WBHG (2600)	3,5	0,5	90	4,5	<0,1	<0,01	11,6	21,6	<0,1	13,0
WBBW (3000)	3,6	0,5	100	4,5	<0,1	<0,01	11,6	21,2	<0,1	13,3
WBLT (3900)	2,7	0,5	90	3,0	<0,1	<0,01	13,1	18,0	<0,1	12,3
WBSG (4300)	3,0	0,8	86	3,7	<0,1	<0,01	16,9	21,5	0,4	13,4
WBHB (4210)	3,8	0,5	90	4,7	<0,1	<0,01	8,4	20,2	<0,1	12,9

*in Klammern steht die Entfernung in Metern zum Eingang der Quellhöhle

3.3 Bestimmung von Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl und Kultivierbarkeit von Bakterien in den Wasserproben und Biofilmen

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl in Wasserproben wurde zuerst die Standardmethode, nämlich die Markierung der Bakterien mittels DAPI auf der Membranfilteroberfläche nach Filtration von 100 ml Wasservolumen angewandt. Bereits nach kurzer Zeit stellte sich jedoch heraus, daß dieser Nukleinsäuremarker für das in diesem Fall vorhandene Karstgrundwasser nicht besonders gut geeignet war. Zum einen erwies sich DAPI als relativ kontrastarm im Vergleich zu in diesem Wellenlängenbereich ebenfalls fluoreszierenden Kalkpartikeln, zum anderen kam es zu unspezifischer Bindung an Sedimentpartikel. Aus diesem Grunde waren auch DAPI-markierte Bakterien auf künstlich exponierten Glasobjektträgern nur sehr schwer von der Umgebung abgrenzbar. Versuche, mit anderen klassischen Nukleinsäuremarkern wie Ethidiumbromid, Propidiumiodid oder Acridinorange eine Verbesserung des Signal-Rausch-Abstandes zu erreichen, waren ebenfalls nicht von Erfolg gekrönt.

Wesentlich bessere Ergebnisse konnten mit dem Einsatz des im Grünbereich emittierenden Nukleinsäuremarkers Sytox Green erreicht werden, so daß ab November 1999 eine erfolgreiche Bestimmung der Gesamtzellzahl in der Wasserphase (Abb. 6) und der Zelldichte auf den Glasobjektträgern (Tab. 4) erreicht werden konnte. Zwischen 12,5 % und 36,4 % der auf den Glasobjektträgern mit Sytox Green markierten Bakterien konnten mit dem Lebendmarker FDA angefärbt werden.

Tab. 4 Zelldichte auf im Wulfbach exponierten Glasobjektträgern, bestimmt mit Sytox Green als Mittelwert aus jeweils 15 Feldern

Expositionsdauer	Mittlere Zellzahl / $\text{cm}^2 (\pm s)$	Wasserstand bei Entnahme (cm)
06.06.1999 - 16.10.1999	$8,2 (\pm 3,6) \times 10^4$	-68
16.10.1999 - 30.11.1999	$1,8 (\pm 0,2) \times 10^5$	-71
30.11.1999 - 16.01.2000	$2,9 (\pm 0,9) \times 10^4$	-50
16.01.2000 - 13.02.2000	$4,9 (\pm 1,6) \times 10^4$	-36
04.03.2000 - 19.03.2000	$2,5 (\pm 2,6) \times 10^3$ n.i.	-14
19.03.2000 - 16.04.2000	$1,2 (\pm 0,7) \times 10^4$	-44

n.i. s nicht interpretierbar, da $s > \bar{x}$

Die Kultivierbarkeit der planktonischen Bakterien am Quellmund (gemessen als Koloniezahl nach Inkubation bei 20° C auf Koloniezahlagar gemäß Deutsche Einheitsverfahren) schwankte im Untersuchungszeitraum November 1999 bis August 2000 zwischen 0,1 % und 6,7 % der mittels Sytox Green markierbaren Zellen. Zwischen 0,7 % und 1,2 % der Sytox Green - markierten Zellen konnten mit dem Lebendmarker FDA angefärbt werden.

3.4 Bestimmung der *in situ* dominanten phylogenetischen Gruppen in den Biofilmen auf künstlichen und natürlichen Aufwuchsflächen in der Wulfbachquellhöhle

Die Untersuchung der Biofilmbildung begann im August 1998 mit der Exposition von Glassobjektträgern an mehreren Stellen im unterirdischen Bachlauf. Nach 2-16 Wochen wurden diese Objektträger jeweils entnommen, mit Formaldehyd fixiert und anschließend im Labor mit rRNA-gerichteten Sonden für die Subklassen der Proteobakterien untersucht. Es zeigte sich jedoch, daß die Cy-3 markierten Sonden unspezifisch an auf der Glasoberfläche befindliche Partikel banden, wodurch es zu einer starken Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses kam. Ebenso kam es zu einer unspezifischen Bindung von DAPI an die auf der Glasoberfläche befindlichen Partikel. Dadurch waren weder eine Quantifizierung der Bakteriengesamtzellzahl, noch eine Charakterisierung der phylogenetischen Gruppen möglich. Ein Ausweichen auf Sytox Green anstelle von DAPI brachte hier, wie bereits unter **3.3** beschrieben, eine deutliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (Abb. 23). Eine Direkthybridisierung von Bakterien auf den Kalksteinoberflächen erwies sich aufgrund der starken Autofluoreszenz und ebenfalls auftretender unspezifischer Bindung als unmöglich. Parallel zu diesen Untersuchungen wurden Glasobjektträger im Lochbrunnen bei Unterdigisheim, in der Falkensteiner Höhle bei Urach und im Blautopf bei Blaubeuren exponiert, um festzustellen, ob die Probleme mit der *in situ*-Hybridisierung von Karstbiofilmen nur auf die Wulfbachquellhöhle beschränkt waren. Einzig in der Falkensteiner Höhle waren gute Ergebnisse mit *in situ*-Hybridisierung möglich. Es zeigte sich hier, daß etwa 2/3 der Bakterien zur β -Subklasse und 1/3 zur γ -Subklasse der Proteobakterien zu rechnen war. Die Gründe für die bessere Hybridisierbarkeit der Biofilme aus der Falkensteiner Höhle sind bisher nicht bekannt.

Die Direktuntersuchung von Kalksteinoberflächen aus der Wulfbachquellhöhle mit FDA brachte schließlich positive Ergebnisse und zeigte, daß die natürlichen Oberflächen mit metabolisch aktiven Bakterien besiedelt waren (Mittelwerte $3,3 (s \pm 1,5) \times 10^4 - 1,2 (s \pm 0,6) \times 10^5$ Zellen/cm²).

Insofern stellte sich klar heraus, daß die schlechte Hybridisierbarkeit der bakteriellen Biofilme nicht in erster Linie auf metabolische Inaktivität der Bakterien zurückzuführen war, sondern auf unspezifische Wechselwirkungen der Matrix mit den Cy3-markierten Sonden.

Es wurde nun versucht, mittels klassischer cytologischer Methoden durch Blockieren der Fehlbindung die unspezifische Hintergrundmarkierung zu verringern. Dazu wurde eine Vorhybridisierung der Glasobjektträger mit einem 10-fachen Überschuß an unmarkierten non-EUB-Oligonukleotiden bzw. mit ultraschallbehandelter Kalbsthymus-DNA benutzt. Nachdem diese Vorbehandlung sich als ergebnislos erwies, wurden weitere klassische Blockadelösungen wie Denhardt's Solution (Anderson et al., 1988), Heparin-Natrium 25000 i.E./ml (Ratiopharm, Ulm), 2 % (w/v) Rinderserumalbumin und Magermilch getestet. Während Heparin und Rinderserumalbumin keinen sichtbaren Effekt zeigten und Denhardt's Solution die unspezifische Bindung nur leicht verringerte, führte eine 2 % Lösung von Magermilchpulver in PBS (pH 7,4) zu sehr guten Ergebnissen. Nach einer 45-minütigen Vorhybridisierung mit diesem Puffer bei 46° C wurde der Hintergrund drastisch verringert (Bohnert et al., 2001).

Auf einem vom 16.10.-30.11.1999 exponierten Glasobjektträger konnten mit dieser Methode erstmals auch die phylogenetischen Gruppen in einem Biofilm aus dem 1. Siphon der Wulfbachquellhöhle charakterisiert werden.

Es zeigte sich, daß die β -Subklasse der Proteobakterien 53 % und die γ -Subklasse 21 % der mit der eubakteriellen Sonde EUB338 hybridisierbaren Bakterien ausmachten. In einem vom 16.01.-13.02.2000 exponierten Objektträger waren es dann bei zunehmender Schüttung 24 % β - und 45 % γ -Proteobakterien (Abb. 13).

Allerdings entsprach die mittlere Zellzahl der auf den künstlichen Aufwuchsflächen mit Sytox Green markierbaren Bakterien ($5,7 \times 10^4$ Zellen/cm²) in einem mikroskopischen Gesichtsfeld von 250 μ m Durchmesser (Vergrößerung x1000) gerade einmal noch 28 Zellen. Obwohl dies für die Zuordnung zu einer phylogenetischen Hauptgruppe ausreichte, erschien die Identifikation der Bakterien bis zur Speziesebene aus statistischen Gründen als wenig erfolgversprechend.

Zudem stellte sich die Frage nach einer Vergleichbarkeit des Besiedelungsspektrums von künstlichen mit natürlichen Oberflächen.

Auf der Suche nach dichter besiedelten natürlichen Oberflächen wurde das Interesse auf die im unterirdischen Flußbett ubiquitär vorhandenen Sedimente gelenkt. Zum einen erwiesen sich die Sedimente im Gegensatz zu den Kalksteinoberflächen als relativ wenig autofluoreszent, zum anderen bot die große Oberfläche der kleinen Sedimentpartikel den Bakterien eine gute Möglichkeit zur Biofilmbildung. Bei der genauen optischen Inspektion der natürlichen, wie auch künstlich exponierten Oberflächen fiel immer wieder auf, daß auf der eigentlichen Oberfläche ein dünner Sedimentüberzug zu finden war. Dieser Überzug wurde allerdings durch das Untertauchen der Objektträger in der Fixierlösung in der Regel heruntergewaschen. Zudem zeigte sich bei Hochwasserausbrüchen, daß sich im durch Sedimentpartikel stark getrübbten Wasser mittels FDA etliche metabolisch aktive Bakterien nachweisen ließen. Daher lag die Idee nahe, die mobilen Biofilme auf den Sedimentpartikeln einmal mit FISH zu untersuchen. Leider versagte die Methode initial komplett. Daraufhin wurden etliche FISH-Optimierungsprotokolle erprobt, von denen sich folgendes als hervorragend geeignet erwies: mittels einer aus der Koloniehybridisierung bekannten Hitze-fixierung von durch Polycarbonatfiltern filtrierter Schlammsuspension (80° C für 20 min) in Kombination mit dem bewährten Vorhybridisierungsprotokoll (Magermilch in PBS) ließ sich die Detektionsrate dramatisch steigern (Bohnert et al., 2001).

Erstmals in einer Schlammprobe vom 04.03.2000 (Hochwasserperiode) konnten nun bei dramatisch verbessertem Signal-Rausch-Verhältnis die Bakterien phylogenetisch charakterisiert werden (siehe Abb. 13). Es ergab sich folgende Verteilung: β -Subklasse der Proteobakterien 35 % der EUB338-markierten Bakterien (davon 65 % β 1-Subgruppe), 65,8 % γ -Subklasse (davon 58 % *Pseudomonas fluorescens*-Subgruppe). Durch die Bestimmung des Trockengewichtes der auf dem Filter befindlichen Sedimente konnte festgestellt werden, daß $6,1 \times 10^6$ der mit EUB338 markierbaren Bakterien pro mg trockenem Sediment vorhanden waren. Das entspricht in diesem konkreten Fall 430 Zellen pro Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung – mehr als ausreichend für eine exakte Auswertung bis auf Speziesebene.

Bei kontinuierlich rückläufiger Schüttung nahm nun auch die Zahl der im Sediment mittels EUB338 hybridisierbaren Zellen ab, bis am 27.05.2000 ein Minimum von nur

noch 7×10^4 Bakterien pro mg Trockengewicht erreicht war (Abb. 7). Mit abnehmender Schüttung konnte zudem eine Verschiebung des Keimspektrums hin zur β -Subklasse der Proteobakterien beobachtet werden (Abb. 13).

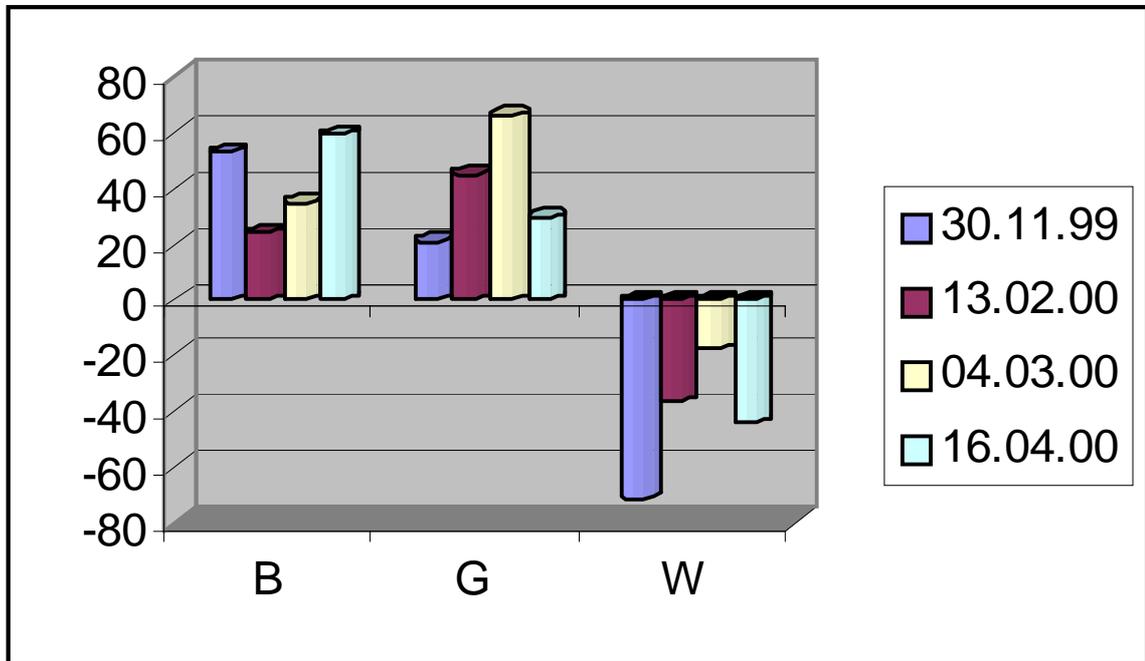


Abb. 13 Prozentualer Anteil (Mittelwerte aus 15 Gesichtsfeldern) der β (B) - und γ (G) -Subklasse der Proteobakterien an den mit der Sonde EUB338 durch FISH markierbaren Zellen an vier verschiedenen Probenahmetermi- und dazugehöriger Wasserstand (W) in cm unter Höchststandsmarke am Eingang der Wulfbachquellhöhle.

Bei den am 30.11.1999 und 13.02.2000 entnommenen Proben handelt es sich um Biofilme auf Glasobjektträgern (exponiert vom 16.10.-30.11.1999 bzw. 16.01.-13.02.2000), bei den am 04.03.2000 und 16.04.2000 entnommenen Proben um Biofilme auf Schlammpartikeln. Alle Proben stammen aus dem 1. Siphon der Wulfbachquellhöhle.

Die Schlammsuspension vom 16.04.2000 aus dem 1. Siphon der Höhle (erste Unterwasserpassage, ca. 40 m vom Eingang entfernt) erwies sich mit immer noch $2,7 \times 10^6$ Zellen/mg Trockenschlamm als hervorragend geeignet für eine umfassende Analyse des phylogenetischen Spektrums, zumal mittlerweile speziesspezifische Sonden angefertigt worden waren.

Die phylogenetischen Gruppen in den Sedimenten konnten nun mittels FISH charakterisiert werden (Abb. 22), davon 87,7 % bis zu einer subgruppenspezifischen Hierarchieebene und 52 % bis auf Speziesebene (alle Angaben beziehen sich auf die Zahl der mit EUB338 zu markierenden Zellen, da aufgrund der unspezifischen Adhärenz an die Sedimente keine Gegenfärbung mit DAPI oder Sytox Green möglich

war, vergl. Abb. 21). Mit 59,2 % der Bakterien stellte die β -Subklasse der Proteobakterien nun klar den Hauptanteil, während die γ -Subklasse immerhin noch 29,4 % ausmachte (Abb. 17). Die weitere Untergliederung der β -Subklasse zeigte eine leichte Dominanz der β 1-Subgruppe (34,8 %, Abb. 18). Nachdem die 16S rRNA-Gene einiger Isolate sequenziert worden waren und auch entsprechende clusterspezifische bzw. speziesspezifische Sonden angefertigt worden waren, ergab sich folgendes Bild: 24,3 % der Bakterien konnten mit der Sonde für die zur Oxalobactergruppe gehörenden Isolate 26, 68 und 73 markiert werden. Zusammen mit den BONE23a - markierten Bakterien (β 1-Subgruppe) sind damit fast 100 % der β -Proteobakterien mit subgruppenspezifischen Sonden erfaßt worden.

Auf Spezialebene klaffen noch einige Lücken. Während 63 % der β 1-Proteobakterien von nur einer Spezies (Isolat 139) ausgemacht werden, vertreten Isolat 26, 68 und 73 innerhalb ihres Clusters nur 47 % der mit Sonde WB26,68,73 markierten Bakterien aus der Oxalobactergruppe, wobei Isolat 73 *in situ* deutlich dominiert (Abb. 19),.

Fast alle der γ -Proteobakterien konnten mit der neuentwickelten Sonde PSE2034 (28,6 %) und der Kontrollsonde PSM_G (31,2 %) der Gruppe der Pseudomonaden zugeordnet werden, davon waren immerhin 74 % mit der Sonde Pfl1030 in die *Pseudomonas fluorescens* Gruppe zu stellen.

Die Detektionsschwelle der Nachweismethode wurde mit der Cy3-markierten Negativkontrollsonde NB129 ermittelt, sie lag bei 0,5 % der mit EUB338 markierten Bakterien. In den Schlammproben konnten darüber hinaus mit den Standardsonden ALF1b, SRB385, CF319a, HGC69a (Tab. 2) und der neuen Sonde LGC2043 (Gram-positive mit niedrigem G+C-DNA-Gehalt), sowie der Ammoniumoxidierersonde Nso1225, der *Archaeasonde* ARC915 und der Eukaryontensonde EUK516 keine Zellzahlen oberhalb der Detektionsschwelle ermittelt werden.

Eine Untersuchung von Schlammproben aus dem Lochbrunnen ergab eine ähnliche phylogenetische Verteilung. 22,9 % der EUB338-markierten Zellen waren hierbei am 21.04.2000 der β - und 23,9 % der γ -Subklasse der Proteobakterien zuzuordnen. Allerdings konnten zudem 11,9 % der Bakterien mit der Sonde LGC2043 markiert werden. Mit 66 % der γ -Proteobakterien stellte auch hier die *Pseudomonas fluorescens* -Gruppe den größten Anteil an den Pseudomonaden.

50 % der auf 100-fach verdünntem R2A-Agar bei 9° C kultivierten Biofilmisolate vom 30.11.1999 aus der Wulfbachquelle gehörten der γ -Subklasse der Proteobakterien an (davon sind alle Mitglieder der *Pseudomonas fluorescens* - Gruppe) und immerhin 21 % konnten an diesem Datum *in situ* nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigte sich klar die schlechtere Kultivierbarkeit der β -Subklasse der Proteobakterien. Während diese am 30.11.1999 *in situ* 53 % der EUB338-markierten Bakterien ausmachen, sind sie im 100-fach verdünnten R2A-Medium (9° C) mit nur 8 % vertreten (Tab. 5). Ein Extremfall ist das zur β 1-Subgruppe gehörende Isolat 139. Dieses machte *in situ* am 16.4.2000 immerhin 21,9 % der hybridisierbaren Zellen aus, war jedoch in der 100-fach verdünnten R2A-Kultur (9° C) gleichen Probenahmedatums nur mit einem Anteil von 1,4 % vertreten (Daten aus einer β 1-Proteobakterien-Screeningreihe mit 140 zufällig ausgewählten Einzelkolonien aus einer Biofilmsuspension vom 16.04.2000). Obwohl das klassische R2A-Medium nach Reasoner und Geldreich (1985) eine Inkubation von Umweltkeimen bei 20° C für 10 Tage vorsieht, wurde die Inkubationstemperatur der Habitatterperatur von 9° C angepaßt und die Nährstoffkonzentration um das 100-fache erniedrigt, was sich als günstig erwies, da in Kultivierungsvorversuchen bei 20° C im R2A-Vollmedium hauptsächlich die *in situ* unbedeutenden gram-positiven Keime (LGC- wie auch HGC-Gruppe) sowie *Acinetobacter* anzutreffen waren.

Insgesamt wurden 340 Isolate mittels FISH-Sonden untersucht, davon wurden 142 Isolate dauerhaft mittels Gefriertrocknung archiviert und die 16S rRNA-Gene der in Abb. 30 gezeigten Isolate von Yves Neitzel (Arbeitsgruppe Prof. Szewzyk) komplett sequenziert. Zusätzlich wurden insgesamt 4 morphologisch durch Bildung von langen Bakterienketten auffällige Isolate mit dem Mikromanipulator auf R2A-Agar überimpft und partiell sequenziert. Zwei der Isolate konnten als *Bacillus subtilis* (Isolat 48 und 63), die anderen beiden als *Bacillus cereus* (Isolat 43 und 44) identifiziert werden. *In situ* konnten allerdings in den mobilen Biofilmen der Wulfbachquellhöhle weder mit Sonde LGC2043 (Gram-positive mit niedrigem G+C-DNA Gehalt) noch mit den Sonden ATX1577 (*Bacillus anthracis* - *cereus* - Gruppe) und BAC1577 (*Bacillus subtilis* - Gruppe) Zellzahlen oberhalb der Detektionsschwelle gefunden werden.

Tab. 5 Phylogenetische Zugehörigkeit von Einzelkolonien (n = 60) nach Kultivierung eines von einem Glasobjektträger (exponiert von 16.10.1999 - 30.11.1999 in Siphon 1 der Wulfbachquellhöhle) auf 100-fach verdünnten R2A – Agar transferierten und für 10 Tage bei 9° C inkubierten Biofilms. Alle Einzelkolonien wurden zufällig ausgewählt.

Sonde	Zahl der markierten R2A-Isolate	Anteil in %	Anteil im Biofilm direkt (%)
BET42a	5	8	53
GAM42	30*	50	24
CF319a	18	30	< 0,5
HG69a	6	10	< 0,5
nicht identifiziert	1	2	

* davon alle mit Sonde Pfl1030 markierbar

Ein besonderes Problem stellte die Gewinnung von Reinkulturen der β -Subklasse der Proteobakterien dar, da diese Organismen, wie bereits oben dargestellt, entgegen ihrer *in situ*-Abundanz selbst auf habitatoptimiertem R2A-Medium eine recht geringe Isolationsfrequenz aufwiesen. Einzelkolonien dieser phylogenetischen Gruppe waren zudem oft sehr stark verunreinigt und es bedurfte aufwendiger Überimpfungsvorgänge unter ständiger Sondenkontrolle, um die Isolate anzureichern und Daten für die rDNA-Sequenzierung zu gewinnen. Um diesen langwierigen Vorgang für die *in situ* bedeutsame β 1-Subgruppe der Proteobakterien zu beschleunigen, wurde das spezifische Primerpaar BONE695FW-BONE1413RW verwendet, das ein ca. 760 bp langes Fragment innerhalb des 16S rRNA-Genes bereits in einer noch verunreinigten Mischkultur mittels PCR amplifizieren konnte. Über *HaeIII* - Restriktionsspaltung konnte dann initial eine grobe phylogenetische Einordnung getroffen werden.

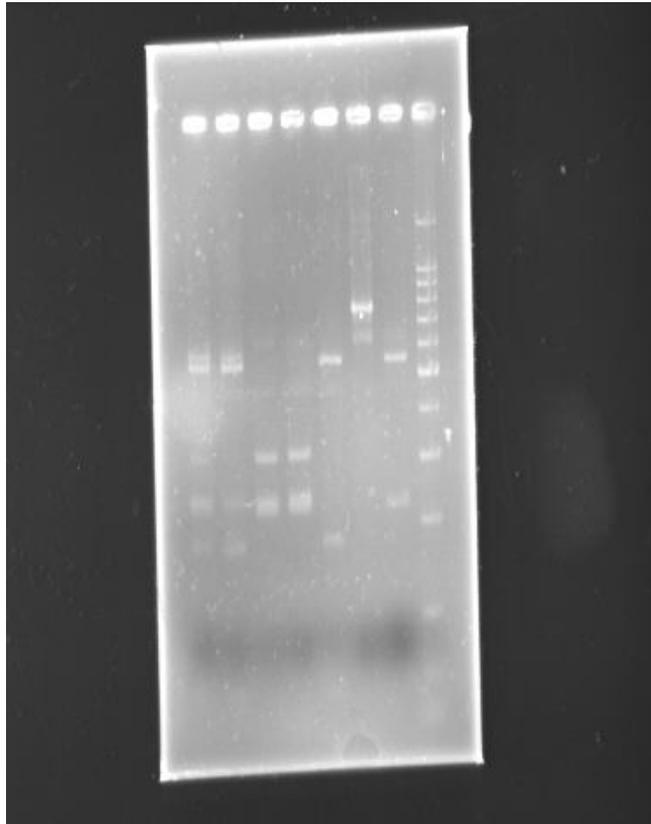


Abb. 14 PCR verschiedener noch unreiner Zwischenkulturen mit β 1-Proteobakterienspezifischem Primerpaar BONE695FW-1413RW und anschließende Restriktionsspaltung mit *HaellI*.

In Spur 3 und 4 konnte Wulfbachisolat 139 bereits in einer frühen Phase aufgrund seiner spezifischen 220 und 310 bp großen Restriktionsbanden als Mitglied der *Rhodoferox fermentans* – Gruppe identifiziert werden, was sich später durch die 16S rDNA-Sequenzierung bestätigen ließ. Als Marker wurde in Spur 7 die 100 bp DNA-Leiter (Promega) verwendet.

Falls es sich um noch nicht angetroffene Bandenmuster handelte, wurden die betreffenden Isolate der Sequenzierung zugeführt, um spezies- oder clusterspezifische Sonden für FISH entwerfen zu können.

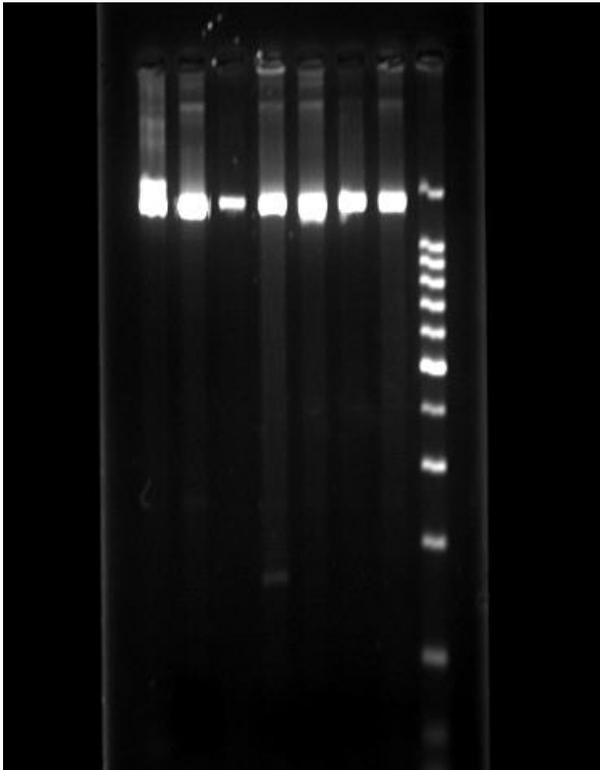


Abb. 15

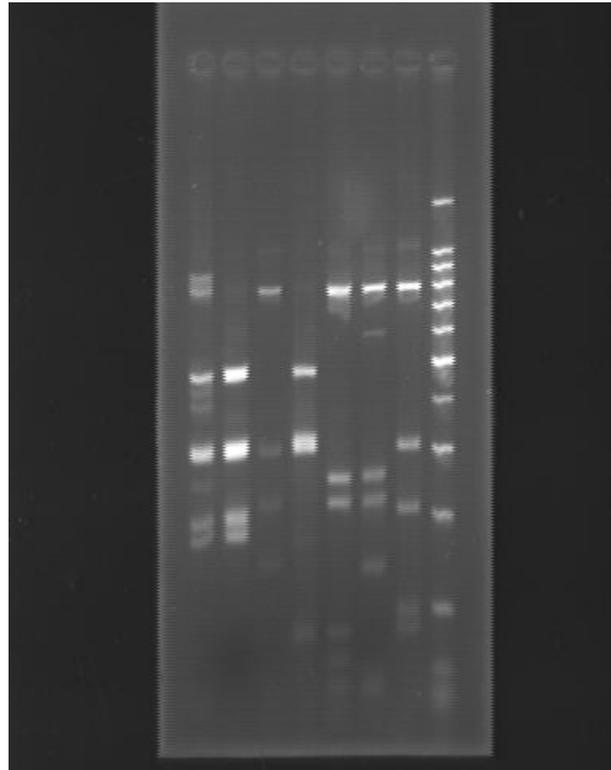


Abb. 16

Spuren von links nach rechts (identische Belegung für Abb. 15 und 16):

- 1) Isolat 140 (leicht verunreinigt)
- 2) Isolat 139
- 3) Isolat 73
- 4) Isolat 72
- 5) Isolat 68
- 6) Isolat 26
- 7) *Ralstonia pickettii* ATCC 49129
- 8) 100bp DNA – Leiter (Promega)

Abb.15: ca. 1500 bp große rDNA-Banden nach PCR einiger β -Proteobakterien aus der Wulfbachquelle mit universellen 16S rDNA Primern 27FW-1492RW.

Abb. 16: Restriktionsspaltung der PCR-Amplicons aus Abb. 15 mit *HaellI*

Reinkulturen wurden unter Verwendung bereits vorhandener Sonden und nach *HaellI*-Spaltung von mittels Primerpaar 27F und 1492R generierten PCR-Amplicons

auf Reinheit und Übereinstimmung mit bereits vorhandenen Bandenmustern geprüft und anschließend das gesamte 16S rRNA-Gen noch nicht charakterisierter Reinkulturen sequenziert.

Acht der sequenzierten Isolate besitzen 97 % oder weniger 16S rRNA-Ähnlichkeit mit bereits in den öffentlichen Datenbanken vorhandenen Sequenzen und sind daher als neue Spezies anzusprechen, davon sechs aus der β -Subklasse der Proteobakterien, ein Isolat aus der Cytophaga-Flavobakterium-Gruppe und ein Isolat aus der Gruppe der Gram-positiven mit hohem G+C-DNA-Gehalt (Abb. 30).

angegebene Werte (%) sind Mittelwerte aus 15 mikroskopischen Feldern, bezogen auf die Zahl der mit EUB338 markierbaren Bakterien im gleichen Präparat.

n.i. = nicht identifiziert

Abb. 17

Phylogenetische Hauptgruppen in Sedimenten aus der Wulfbachquellhöhle (16.4.2000, 1. Siphon)

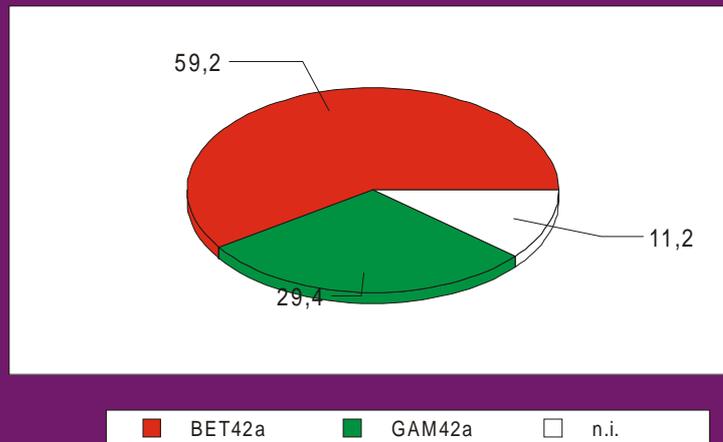


Abb. 18

Phylogenetische Gruppen der mittleren Hierarchieebene (Wulfbachquellhöhle 16.4.2000, Sedimente aus 1. Siphon)

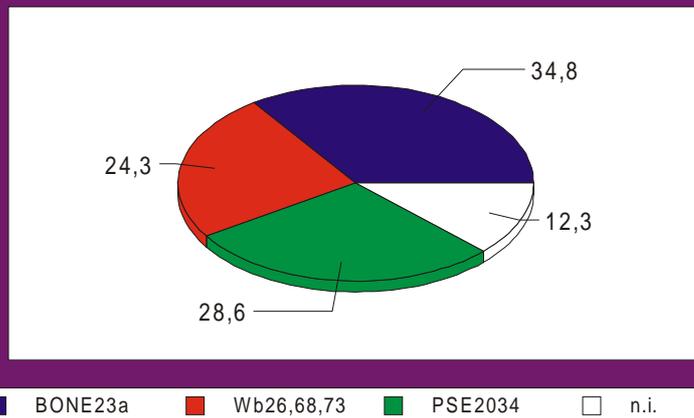


Abb. 19

Artzusammensetzung (Wulfbachquellhöhle 16.4.2000, Sedimente aus 1. Siphon)

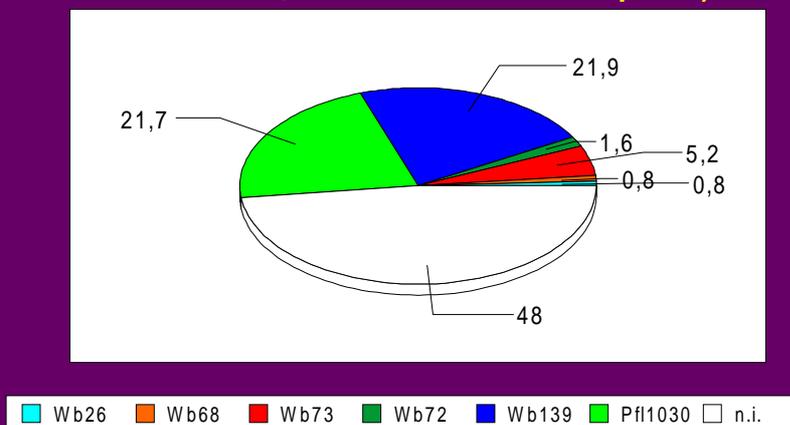


Abb. 20

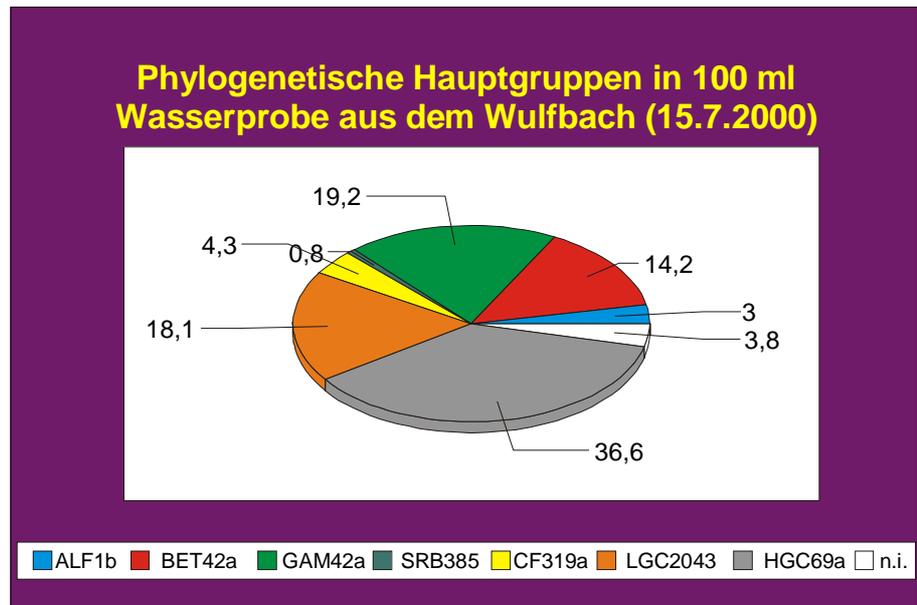


Abb. 21
DAPI-markierte
Schlamm suspension aus
dem 1. Siphon der
Wulfbachquellhöhle
(16.04.2000) mit
schlechtem Signal-Rausch-
Verhältnis durch un-
spezifische Adhärenz des
DNA-Markers.

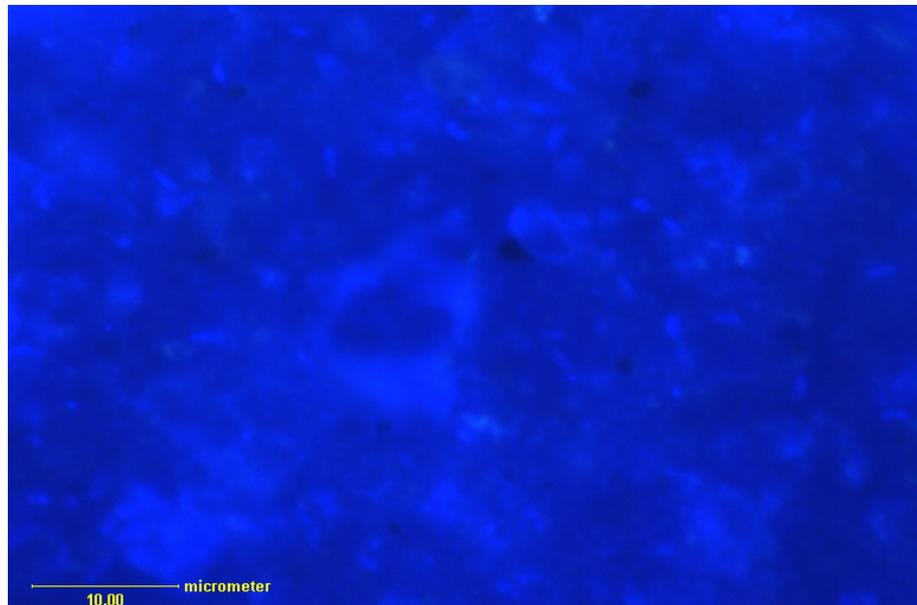


Abb. 22
Identisches Gesichtsfeld
wie Abb. 21. FISH von
Bakterien mit der Cy3-
markierten Sonde
EUB338.
Geringer Hintergrund
nach Vorhybridisierung
mit PBS-gepufferter
Magermilch.

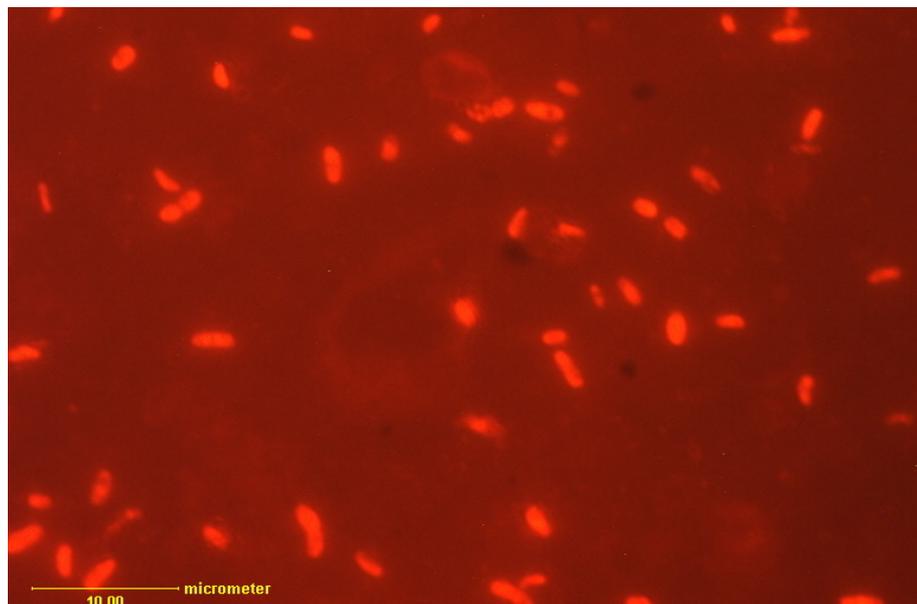


Abb. 23
Sytox Green-markierte
filamentförmige Bakterien
auf Glasobjektträger
im 1. Siphon der
Wulfbachquellhöhle
(exponiert vom
16.10.1999 -30.11.1999).

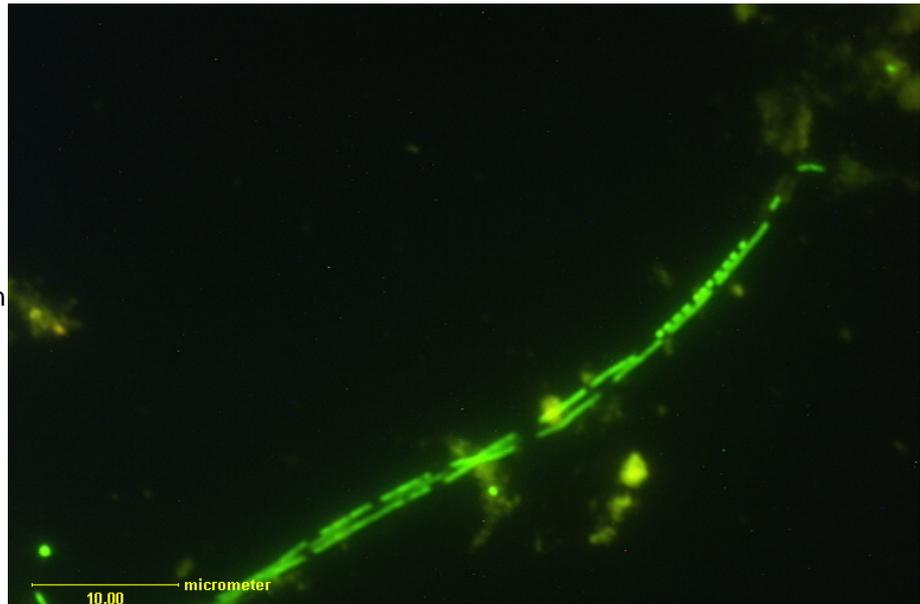


Abb. 24
R2A-Reinkultur von
Wulfbachisolat 139
nach FISH mit der Cy3-
markierten Sonde
WB139.

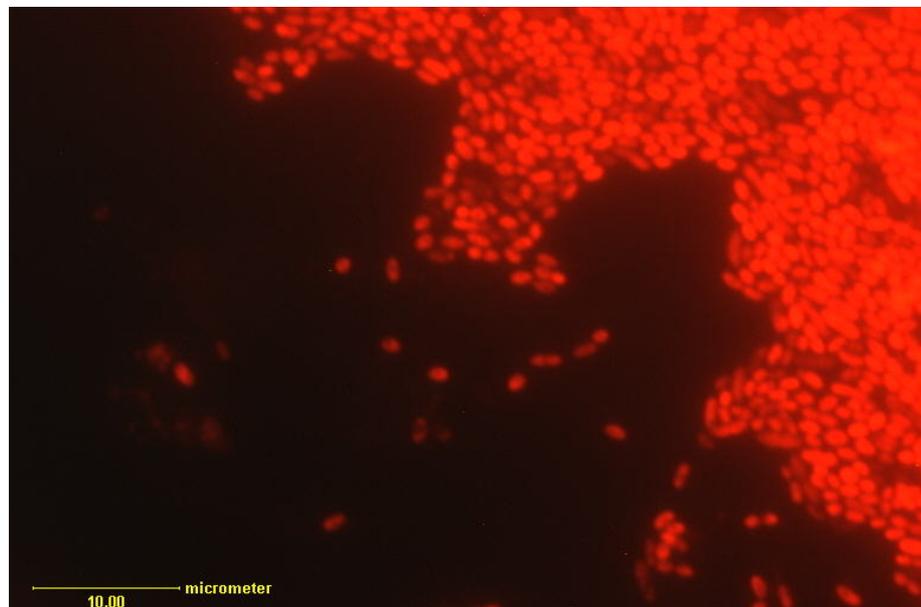


Abb. 25
Spezifisch durch FISH
mit der Cy3-markierten
Sonde SAL544 rot
angefärbte Salmonellen
und unspezifisch mit
DAPI blau angefarbte
Bakterien nach
Inkubation in Lactose-
Pepton-Bouillon
(Wulfbach 15.07.2000).

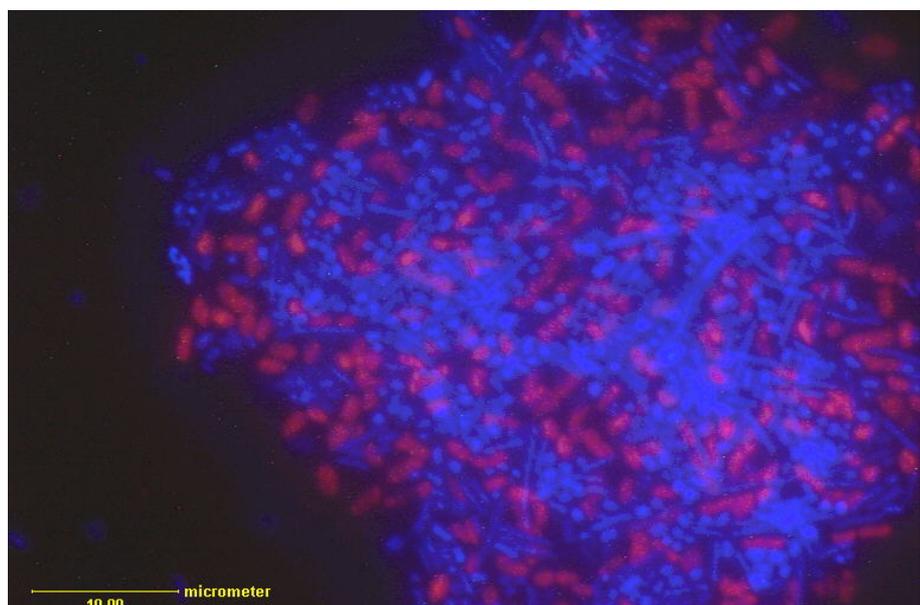


Abb. 26
FDA-Markierung von
biofilmbildenden
Bakterien auf
einer natürlichen
Kalksteinoberfläche
(Wulfbachquellhöhle
04.03.2000).

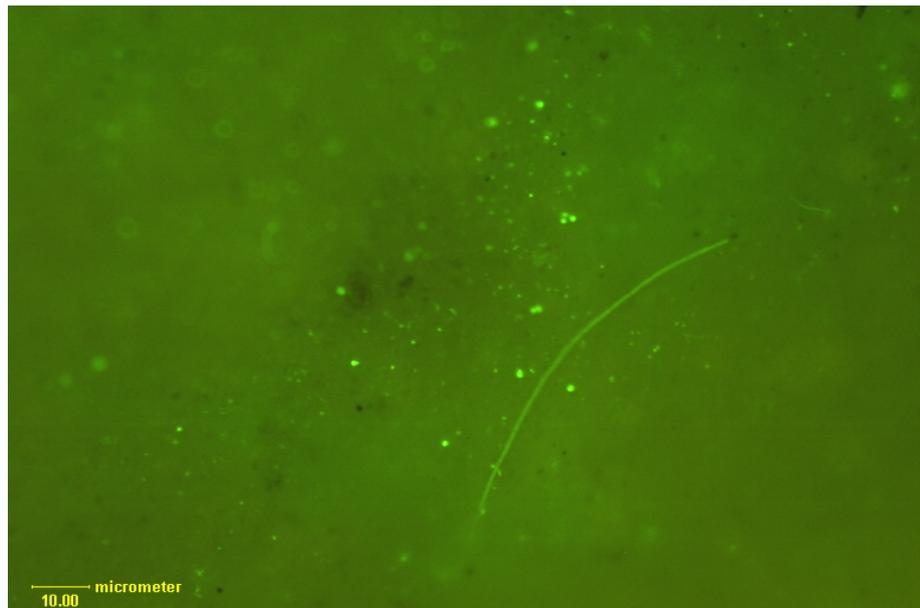


Abb. 27
Starker unspezifischer
Hintergrund nach FISH
von Schlamm suspension
mit der Cy3-markierten
Sonde EUB338 ohne
Vorhybridisierungslösung
(Lochbrunnen, Endsiphon
21.04.2000).

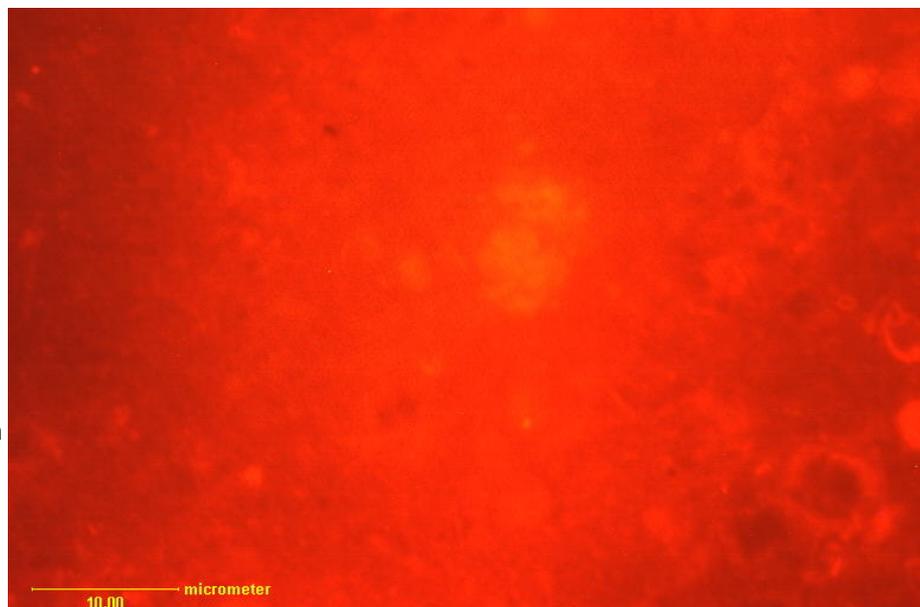
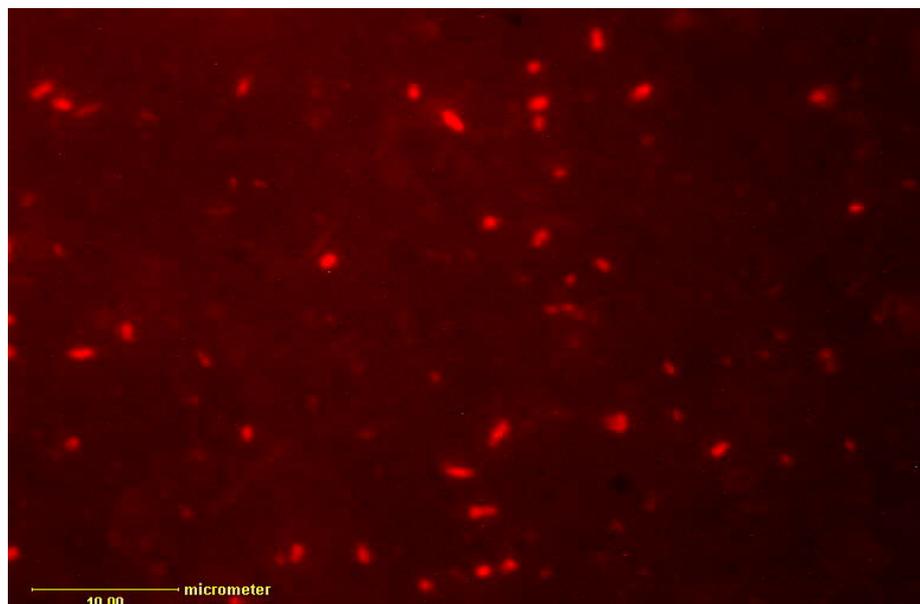


Abb. 28
Gleiches Präparat und
gleiche Sonde wie in
Abb. 27 aber nach
Vorhybridisierung mit
Magermilch.



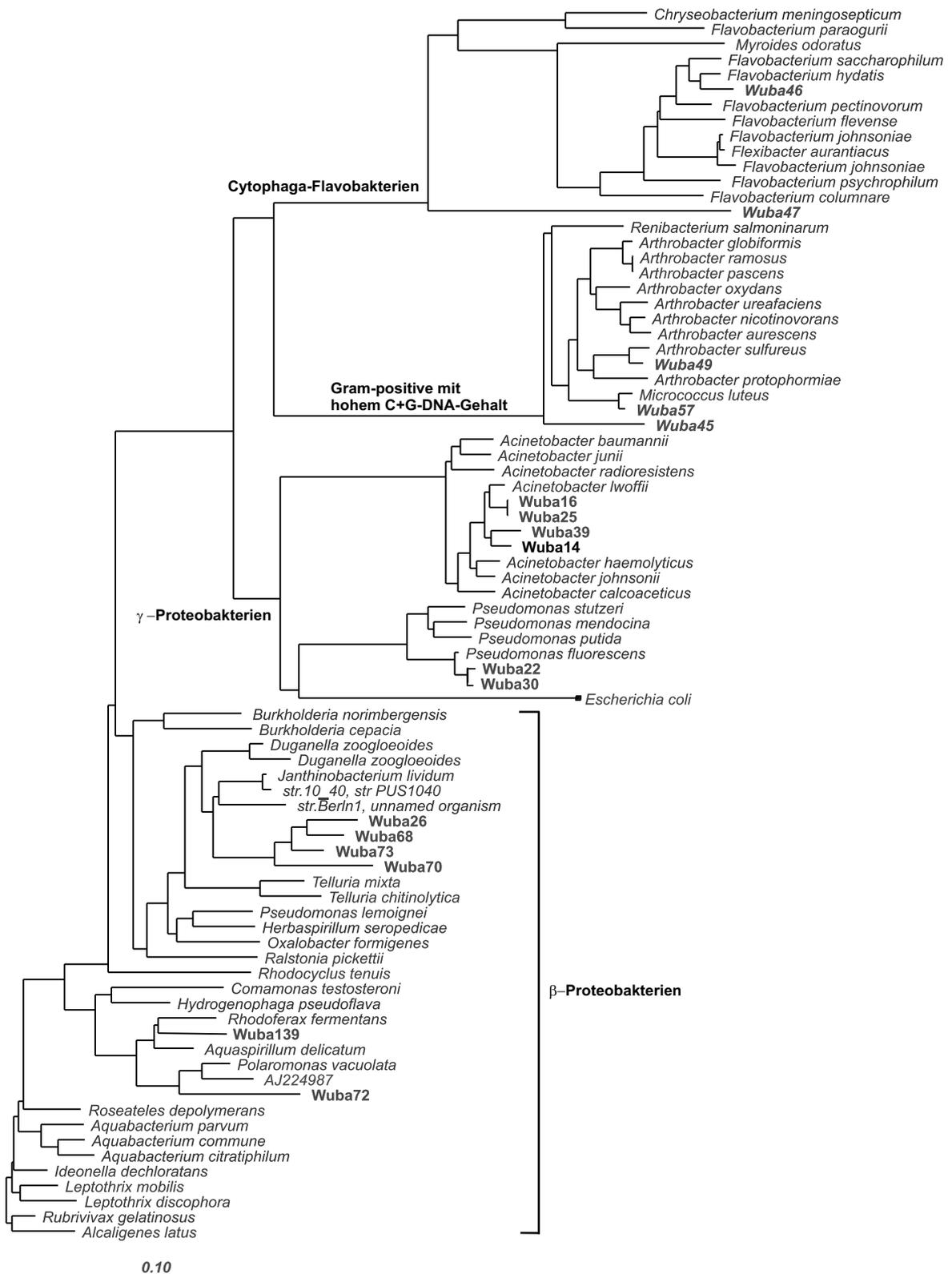


Abb. 30 Phylogenetische Einordnung der Isolate aus der Wulfbachquellhöhle (Prefix „Wuba“) anhand der von Yves Neitzel ermittelten 16S rDNA -Sequenzen. Der Maßstab repräsentiert 10 % Sequenzunterschied

Tab. 6 Morphologische und metabolische Eigenschaften der im Biofilm vom 16.04.2000 *in situ* dominanten R2A-Isolate (Schlamm suspension aus dem 1. Siphon der Wulfbachquellhöhle)

Isolat	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Wuba22, Wuba30)	Neues β -Proteobakterium Wuba72	Neues β -Proteobakterium Wuba73	Neues β -Proteobakterium Wuba139
Anteil im Sedimentbiofilm (%)	21,7	1,6	5,2	21,9
Nächster Verwandter laut 16S rDNA - Sequenzierung (Ähnlichkeit in %)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (98,1)	<i>Polaromonas vacuolata</i> (93,2)	<i>Janthinobacterium lividum</i> (95,7)	<i>Aquaspirillum delicatum</i> (96,6)
Koloniemorphologie	klein, rund	klein, rund	groß, schleimig, oval	klein, rund
Pigmentbildung	weiß	weiß	feuerrot	gelbbraun
Oxidasereaktion	+	+	+	+
Katalasereaktion	+	+	+	+
Indolreaktion	-	-	-	-
Nitratreduktion	über NO ₂ ⁻ hinaus	über NO ₂ ⁻ hinaus	über NO ₂ ⁻ hinaus	über NO ₂ ⁻ hinaus
API 20 NE – Resultat (Wahrscheinlichkeit in %)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99)	unakzeptierbares Profil	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> (99,8)	unakzeptierbares Profil

Bindungsstelle für Sonde WB139 (*E. coli* - Position 998 - 1018)

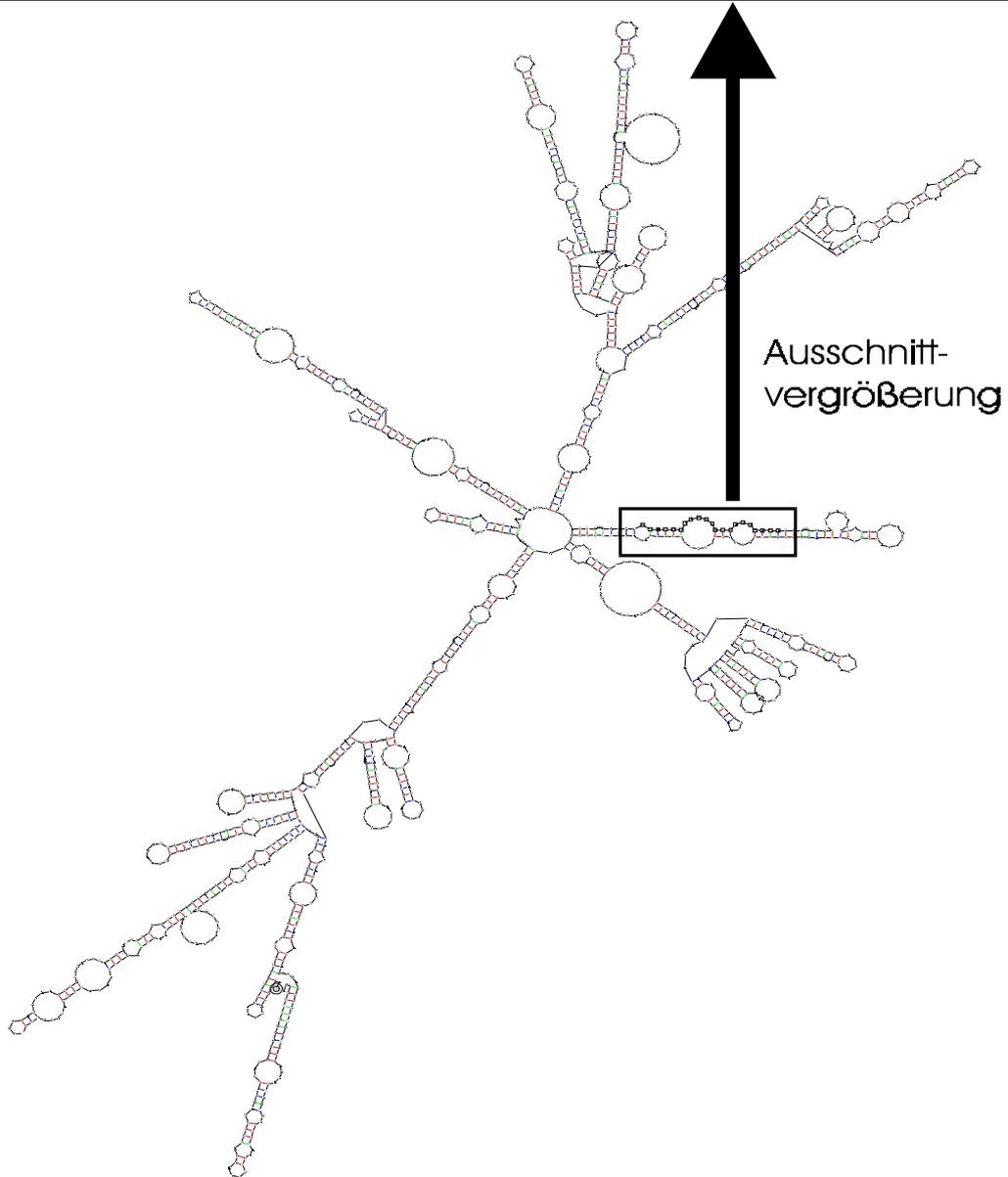
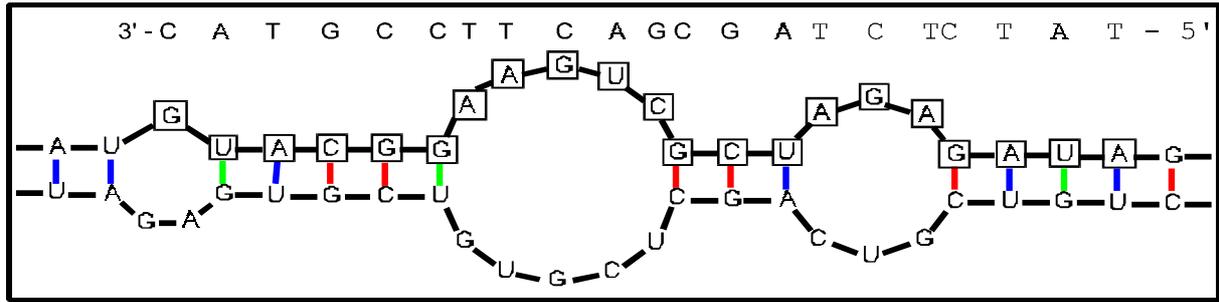


Abb. 31 Hypothetische Sekundärstruktur der 16S rRNA von Wulfbachisolat 139, berechnet mit dem Programm RNA-Draw (erhältlich unter <http://mango.mef.ki.se/~ole/rnadraw/rnadraw.html>) auf Basis der von Yves Neitzel ermittelten 16S rDNA-Sequenz mit Ausschnittvergrößerung der Bindungsstelle von Sonde WB139.

4. Diskussion

4.1 Karstwasserhygienische Relevanz der Meßdaten

Im Fall der Wulfbachquellhöhle lassen sich anthropogene Einflüsse wie Siedlungswirtschaft aber auch Landwirtschaft anhand wasserchemischer und mikrobiologischer Parameter gut nachzuvollziehen. Durch das Vorhandensein von gut entwickelten Karstabflußbahnen im Bereich der Kolbinger Berghalbinsel und die heterogene Nutzung der Karstoberfläche im Einzugsgebiet überrascht es nicht, daß die verschiedenen Zubringer innerhalb der Quellhöhle unterschiedlich stark mit Fäkalindikatoren belastet sind. Aufgrund der sehr schwierigen Probenahmeverhältnisse im hinteren Bereich der Quellhöhle läßt sich hier nur eine Momentaufnahme der Bedingungen am 01.05.1999 erheben.

Allerdings zeigt sich hierbei eine klare Tendenz zu höheren Nitrat- und Kaliumkonzentrationen in den Zubringern innerhalb der Höhle, die auf Siedlungsgebiete zulaufen (Abb. 10). So konnten im Sologang (Verlauf Richtung Renquishausen, Nitrat 16,9 mg/l) und im Siphon 8b (Verlauf Richtung Kolbingen, Nitrat 22,8 mg/l) deutlich höhere Nitratwerte als am Eingang der Quellhöhle gemessen werden. Durch diese zwei bedeutenden Zubringer, die zusammen etwa ein Drittel der Gesamtwasserführung ausmachen, steigt der Nitratgehalt von 8,4 mg/l am tagfernten Punkt des Hauptganges (4210 m vom Eingang entfernt) bis auf 12,6 mg/l am Quellsprung an.

Zum Zeitpunkt der Probennahme in den hinteren Bereichen herrschte relativ hoher Wasserstand, so daß in dem untersuchten Volumen (10 ml) in allen Zubringern offensichtlich durch ausgeprägte Verdünnungseffekte keinerlei *E. coli* nachweisbar waren und zwar weder mit Chromocult Coliformen Agar noch mit Sonde Eco543. Im Sologang und Siphon 8b fanden sich jedoch nach Inkubation von 10 ml Wasserprobe in R2A-Bouillon mit der Sonde YER1243 Yersinien. Da diese Sonde nur *Yersinia* sp. *sensu stricto* und nicht die phylogenetisch nahe verwandten und in aquatischen Habitaten häufig anzutreffenden *Rahnella* sp. detektiert, ist dies ein interessanter Befund. Die hygienische Wertigkeit einiger bisher als apathogen aufgefasster Yersinien, wie z.B. *Yersinia intermedia*, die auch im Grundwasser hin und wieder nachweisbar sind, ist allerdings überhaupt nicht klar. Trotzdem ist die klare Assoziation von Yersinien mit den zwei laut Wasserchemie am stärksten durch anthropogene Einflüsse belasteten Karstwasserzubringern bemerkenswert.

Die bei jeder der drei wasserchemischen Beprobungen nachweisbare stärkere Belastung des Siphon 8b gegenüber dem Hauptzubringer läßt sich bei Normalwasserstand (≥ -57 cm) mikrobiologisch nicht fassen (Abb. 11). Bei diesen Verhältnissen war sogar die Konzentration von *E. coli* im Hauptzubringer höher als die von Siphon 8b, der auf das Kolbinger Siedlungsgebiet zuläuft. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit bedingt durch die anthropogene Belastung des bereits relativ weit im Einzugsgebiet liegenden Sologanges der in Richtung der Gemeinde Renquishausen verläuft (Abb. 10). Alle anderen tagfernen Zubringer, vor allem der Hauptzubringer am Hahnenbergversturz, sind demgegenüber relativ gering belastet. Nur bei extremem Niedrigwasserstand (-70 cm am 23.07.2000) konnte im Siphon 8b gegenüber dem Hauptzubringer (gemessen am Probenahmepunkt S8) eine etwa 3-fach höhere *E. coli*-Konzentration gemessen werden (Abb. 11).

Der Vergleich der *E. coli*-Konzentrationen im Karstwasser von Wulfbachquelle und Lochbrunnen zeigt zudem klar, daß es in Abhängigkeit von der Quellschüttung über das Jahr hinweg zu teilweise dramatischen Schwankungen der Keimfracht kommt. Dies ist äußerst typisch für ein gut entwickeltes Karstgebiet, das auf Niederschläge innerhalb weniger Stunden bis Tage mit einer Mobilisierung von Keimen reagieren kann. Daraus ergibt sich auch ganz klar, daß eine Nutzung von Karstquellwasser für den menschlichen Gebrauch bei anthropogener Nutzung des Einzugsgebietes im Regelfall ohne eine entsprechende Aufbereitung nicht erfolgen kann.

Legt man die mikrobiologischen Grenzwerte der Trinkwasserverordnung (in 100 ml Wasser keine coliformen Keime nachweisbar und Koloniezahl bei 20 und 36° C < 100 / ml), so sind von insgesamt 34 Proben aus der Wulfbachquelle nur drei der Proben mikrobiologisch nicht zu beanstanden, im Falle des Lochbrunnens würde von 27 Proben sogar nur eine den Anforderungen der Trinkwasserverordnung gerecht. Das Wasser des Wulfbachs darf als fäkal ähnlich stark belastet gelten, denn der Median der *E. coli*-Konzentration war im Untersuchungszeitraum ungefähr gleich hoch wie im Lochbrunnen (0,5 versus 0,4 *E. coli* pro ml). Allerdings ist die Schwankungsbreite beim Wulfbach (0-48 (!) *E. coli* pro ml) deutlich höher als beim Lochbrunnen (0-3 *E. coli* pro ml). Hier scheint sich die unterschiedliche Nutzungsart der Einzugsgebiete (Siedlungsabwässer im Wulfbacheinzugsgebiet versus rein landwirtschaftliche Nutzung im Lochbrunneneinzugsgebiet) wiederzuspiegeln. Betrachtet man die grafische Darstellung der Fäkalindikatorkonzentration beider Karstquellen (Abb. 3 und Abb. 4) in Abhängigkeit vom Wasserstand am Eingang der Wulfbachquellhöhle

(Abb. 5), so stellt man fest, daß sich im Wulfbach eher bei niedriger Schüttung und im Lochbrunnen eher bei höherer Schüttung ein Trend zu hohen Fäkalindikatorkonzentrationen zeigt. Auch die wasserchemischen Parameter des Wulfbachs deuten in diese Richtung (Abb. 12). Interpretieren kann man diesen Trend wohl so, daß die im Wulfbacheinzugsgebiet mehr oder weniger kontinuierlich versickerten Siedlungsabwässer mit zunehmender Schüttung des Hauptzubringers weitgehend verdünnt werden, während der Lochbrunnen mit der klassischen Mobilisierung von überwiegend durch landwirtschaftliche Nutzung eingetragenen Keimen im Takt der Schüttung reagiert. Extreme Niederschläge wirken sich beim Wulfbach besonders dramatisch aus, da dann die Überläufe der im Einzugsgebiet befindlichen Kläranlagen geöffnet werden müssen.

Bei der Beprobung der Wulfbachquellhöhle am 15.07.2000 gelang es, den kurzfristigen Durchbruch stark fäkal belasteten Wassers in das Hauptsystem nachzuweisen. Nach wochenlanger Trockenheit im Juni 2000 war es im Juli 2000 zu starken Gewittern gekommen. Bei noch extrem niedrigem Wasserstand an der Wulfbachquelle und damit äußerst geringer Verdünnung gelangten offensichtlich Siedlungsabwässer aus dem Überlauf der örtlichen Kläranlage in den Untergrund, was bereits an Geruch und Trübung des Wasser deutlich erkennbar war. Während unter normalen Umständen im Wulfbach überwiegend Bakterien der β - und γ -Subklasse der Proteobakterien nachweisbar sind, kam es nun zu einer dramatischen Verschiebung des phylogenetischen Spektrums. Mehr als 50 % der Keime im Karstwasser ließen sich nun der Gruppe der Gram-positiven zuordnen, dazu auch erstmals Bakterien der Cytophaga-Flavobacterium Gruppe und der α -Subklasse der Proteobakterien. Erstmals im Verlauf des Jahres 2000 konnten in 100 ml Wasser mit der Sonde SAL544 auch Salmonellen nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang zeigt sich, daß das Indikatorprinzip sich hier gut bewährt hat, denn der Nachweis von obligat pathogenen Organismen ging Hand in Hand mit einem starken Anstieg der klassischen Indikatorkeime *E. coli* (48 pro ml) und Fäkalstreptokokken (6 pro ml). Bei der im Untersuchungszeitraum zweithöchsten Fäkalindikatorkonzentration (17.05.2000: 12 *E. coli* pro ml und 4 Fäkalstreptokokken pro ml) waren demgegenüber in 100 ml Wasser noch keine Salmonellen nachweisbar.

Am Beispiel der Salmonellen und Yersinien konnte klar gezeigt werden, daß der Nachweis von hygienisch relevanten Mitgliedern aus der Familie *Enterobacteriaceae*

durch eine Kombination aus kulturellem Anreicherungsschritt und nachfolgender Identifikation mittels FISH eine potente Alternative zur klassischen, ausschließlich auf Kultivierung und biochemische Identifizierung gestützten, Nachweismethode ist.

Der größte Vorteil liegt in der enormen Zeitersparnis (maximal 1,5 Tage statt maximal 5 Tage) und der hohen Spezifität der Diagnostik begründet.

Obwohl für diese Arbeit auch eine *E. coli* - Sonde angefertigt wurde, wurde für den Nachweis dieser Fäkalindikatoren überwiegend der Chromocult Coliformen Agar verwendet, da sich zeigte, daß dieses Verfahren genauso schnell wie FISH und handhabungsmäßig einfacher durchführbar ist. Dies liegt aber darin begründet, daß für *E. coli* mit der β -Glukuronidasereaktion ein hochspezifisches, an eine Farbreaktion gekoppeltes, Nachweisverfahren vorliegt, daß für viele andere Mikroorganismen in dieser Form nicht existiert. Die *E. coli* - Sonde spielte ihre Vorteile allerdings bei der Untersuchung von vorangereicherten und fixierten Wasserproben aus, da die auf 1 ml Volumen reduzierten Proben auch noch nach einer Archivierung von Monaten oder im Extremfall gar noch nach Jahren auf *E. coli* untersucht werden konnten.

4.2 *In situ*-Detektion der biofilmbildenden Mikroorganismen im Karstaquifer

4.2.1 Optimierung der FISH-Technik für Karstgrundwasserbiofilme

Während die konventionelle wasserhygienische Beprobung der Wulfbachquelle ohne größere Probleme durchführbar war, bereitete die *in situ*-Detektion der Mikroorganismen in Wasserproben und Biofilmen anfangs größte Schwierigkeiten. Durch den Einsatz des wesentlich kontrastreichereren und sehr nukleinsäurespezifischen Sytox Green an Stelle von DAPI konnte zumindest eine ungestörte Bestimmung der Gesamtzellzahl in den Wasserproben und auch der Zelldichte auf den künstlich exponierten Glasobjektträgern erfolgen. Als viel schwieriger erwies sich hingegen sowohl die Bestimmung der Zelldichte, als auch die phylogenetische Charakterisierung der biofilmbildenden Mikroorganismen auf den natürlichen Oberflächen. In den methodischen Schwierigkeiten liegt wohl auch die Tatsache begründet, daß bisher keine einzige Abhandlung über die phylogenetische Detektion von Mikroorganismen in Karstwasserbiofilmen mittels FISH in den Literaturdatenbanken zu finden war.

Bisher wurden überwiegend zwei Faktoren für das Versagen der FISH-Technik in Umweltproben verantwortlich gemacht: zum einen eine recht geringe metabolische Aktivität in den oftmals sehr nährstoffarmen Habitaten mit konsekutiver Herunterregulierung der Ribosomenzahl und zum anderen eine schlechte Permeabilität der bakteriellen Zellwand von gram-positiven Keimen (Amann et al., 1995).

Für beide Probleme wurden in der Vergangenheit mehrfach Lösungsansätze entwickelt.

Lee, et al. (1993) setzten mehrere fluoreszenzmarkierte Sonden identischer Spezifität gleichzeitig in einem Hybridisierungsansatz ein, was zu einer signifikanten Steigerung der FISH-Detektionsrate führte.

Ouverney et al. (1997) inkubierten Bakterien mit Chloramphenicol unter der Vorstellung einer Verminderung des rRNA-Abbaus bei weiterlaufender rRNA-Synthese und fanden eine signifikante Erhöhung der FISH-Detektionsrate.

Eine andere Möglichkeit liegt in der Inkubation von Umweltproben in R2A-Medium unter Gyrasehemmerschutz (z.B. Kalmbach et al., 1997). Durch die Hemmung der Zellvermehrung bei ansonsten weitgehend ungestörtem Metabolismus kann einerseits die Verwertung bestimmter Substrate durch die Bakterien in Form eines Elongationsassays (die Länge von Bakterien, die die angebotenen Substrate verwerten können nimmt dabei zu) überprüft werden und andererseits eine Steigerung der Stoffwechselrate mit nachfolgender Hochregulierung der Ribosomenzahl erreicht werden. Der enge Zusammenhang zwischen Erhöhung des Nährstoffangebotes und Vermehrung der Ribosomenzahl konnte bisher allerdings nur an wenigen Bakterien gezeigt werden (DeLong et al., 1989, Schaechter et al., 1958). Leider können Gyrasehemmer nur ein begrenztes Keimspektrum an der Vermehrung hindern, weshalb Verzerrungen des *in situ*-Keimspektrum nicht ausgeschlossen werden können.

Im konkreten Fall der Wulfbachquelle wurden alle drei Protokolle im Rahmen der Vorversuche ebenfalls getestet, allerdings ohne merklichen Effekt.

Gegen eine metabolische Inaktivierung der Bakterien im Wulfbach als primäre Ursache der geringen Detektionsrate spricht, daß die Markierung von zahlreichen Bakterien auf den natürlichen Kalksteinoberflächen mit dem Vitalmarker FDA (mittlere Zelldichte $3,3 (s \pm 1,5) \times 10^4 - 1,2 (s \pm 0,6) \times 10^5$ Zellen/cm²) trotz des äußerst geringen DOC im Karstgrundwasser (0,6-0,9 mg/l) möglich war.

Das Problem der mangelnden Zellwandpermeabilität gram-positiver Organismen ist von einigen Autoren (z.B. Roller et al., 1994) über den Ersatz von Formaldehyd durch Ethanol als Fixiermittel und durch die Vorbehandlung mit Lysozym bzw. Detergentien verringert worden.

Auch in den Wulfbachproben wurde dieser alternative Vorbehandlungsschritt eingesetzt, ohne allerdings eine deutliche Verbesserung der Detektionsrate zu bewirken. Wie sich später zeigen sollte, waren gram-positive Keime am Aufbau der Biofilme sowieso so gut wie nicht beteiligt.

Bald nach den initialen Fehlschlägen bei der *in situ*-Hybridisierung rückte jedoch noch eine andere Möglichkeit in den Vordergrund, die in der Literatur bisher offensichtlich noch nicht in Erwägung gezogen wurde. Beim Vergleich der für einige Wochen im Karstwassersystem exponierten Glasobjektträger vor und nach der Hybridisierung fiel auf, daß letztere im Cy3 - Filter des Fluoreszenzmikroskopes einen deutlich rotorangen Hintergrund aufwiesen, der offensichtlich nicht auf Autofluoreszenz der an der Oberfläche anhaftenden Partikel sondern auf eine unspezifische Bindung der Cy3-markierten Sonden zurückzuführen war. Aus diesem Grund führte auch die Simultanhybridisierung mit mehreren eubakteriellen Sonden in einem Feld (EUB338, EUB879 und EUB2490) nur zu einer Vermehrung des unspezifischen Hintergrundes und nicht zu einer Steigerung der Nutzsignalintensität. Das Problem der unspezifischen Sondenbindung ist im übrigen nicht neu. Seit der Nutzung von Hybridisierungstechniken für die Detektion spezifischer Nukleinsäuresequenzen wird mit Blockadesubstanzen experimentiert, die diese unspezifische Bindung hemmen sollen. Interessant ist nur, zu konstatieren, daß die für diesen Zweck empfohlenen Substanzen Heparin, BSA, und ultraschallzerkleinerte Kalbsthymus-DNA (Anderson et al., 1988) in diesem Fall zu keiner und Denhardt's Solution (Anderson et al., 1988) nur zu einer leichten Reduktion der unspezifischen Bindung führten. Demgegenüber konnte simple Magermilch den Hintergrund auf dramatische Weise reduzieren. Bereits Ed Southern, der Erfinder des Southern Blot, schreibt in diesem Zusammenhang 1994 bezeichnenderweise:

„Es ist bemerkenswert wie gut sich die ursprüngliche Technik gehalten hat, und obwohl erhebliche Veränderungen vorgenommen wurden - wie etwa die Verwendung von Nylonmembranen - paßten die meisten Weiterentwicklungen. Dazu gehört beispielsweise die Verwendung von billigen Papierhandtüchern anstelle von

Chromatographiepapier für das Hochsaugen der Transferlösung und Milchpulver anstelle von Denhardt's Reagenz zum Unterdrücken des Hintergrundes “.

Daher ist es äußerst verwunderlich, daß die Vorhybridisierung von bakteriellen Biofilmen mit diesem potenten Agens vor der eigentlichen FISH bisher in der Literatur keinen Platz gefunden hat.

Es ist bisher nicht ganz klar, ob die unspezifische Bindung der Cy3-markierten Sonden eher auf das Oligonukleotid oder das Fluorochrom zurückzuführen ist. Da jedoch Blockade-DNA, die normalerweise Oligonukleotidfehlbindungen an künstliche Oberflächen deutlich reduziert (Anderson et al., 1988), in diesem Fall überhaupt keinen Effekt zeigte, läßt sich zumindest indirekt schließen, daß das Cy3 in einem hohen Maße für die Fehlbindungen verantwortlich sein muß. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen einer Studie von Urdea et al. (1988), die herausfanden, daß die Sensitivität von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden durch die unspezifische Bindung der Fluorochrome und nicht durch die der Oligonukleotide limitiert wird.

Durch die Magermilchvorhybridisierung war es nun relativ einfach, die phylogenetischen Hauptgruppen auf den Glasobjektträgern zu bestimmen. Wie auch in anderen Biofilmen oligotropher Systeme (Kalmbach et al., 1997) zeigte sich, daß Vertreter der β -Subklasse der Proteobakterien einen großen Anteil am Keimspektrum hatten. Überraschenderweise bildeten jedoch auch Bakterien aus der γ -Subklasse der Proteobakterien eine fast gleichgroße Gruppe im Biofilm. Andere phylogenetische Großgruppen wie gram-positive Bakterien, andere Subklassen der Proteobakterien oder Mitglieder der Cytophaga-Flavobacterium - Gruppe fanden sich nicht.

Die feinere phylogenetische Aufschlüsselung der zwei *in situ* dominierenden Subklassen der Proteobakterien stieß jedoch an Grenzen, da die künstlich exponierten Glasoberflächen relativ gering besiedelt waren. Man muß sich vor Augen halten, daß bei einer Besiedelungsdichte von immerhin noch etwa 2×10^3 Bakterien pro cm^2 gerade einmal eine einzelne Zelle in einem 1000-fach vergrößerten mikroskopischen Gesichtsfeld zu sehen ist. Da die Anzahl der falsch positiven Objekte pro Gesichtsfeld (durch Autofluoreszenz bedingt) ebenfalls oft in dieser Größenordnung liegt, ist spätestens hier das Detektionslimit der FISH-Technik erreicht. In dicht besiedelten Biofilmen werden in der Literatur standardmäßig oft mindestens 1000 Zellen ausgezählt, um eine fundierte statistische Basis für die

phylogenetische Analyse zu erhalten. Auf den hier exponierten Glasobjektträgern waren jedoch pro mikroskopischem Gesichtsfeld selbst mit dem Nukleinsäuremarker Sytox Green im Mittel nur 28 Zellen zu detektieren, was bei einer Auswertung von 15 Feldern nur 420 Zellen entspricht. Im ungünstigsten Fall jedoch (Exposition 04.03.2000 - 19.03.2000) konnten nur 1,2 Zellen pro Gesichtsfeld detektiert werden, eine Zahl die bereits im Bereich der Detektionsschwelle liegt. Spätestens Im letzteren Fall war also eine phylogenetische Analyse nicht mehr möglich.

Ein weiteres Problem liegt in der Tatsache begründet, daß sich in natürlichen Systemen immer die Frage einer Vergleichbarkeit des Besiedlungsspektrums von künstlichen und natürlichen Oberflächen stellt. Obwohl die Exposition von künstlichen Oberflächen in aquatischen Systemen entsprechend der Studie von Kalmbach et al. (1997) eine methodisch einfache und an sich wirkungsvolle Möglichkeit zur kultivierungsunabhängigen Charakterisierung der *in situ* bedeutsamen phylogenetischen Gruppen darstellt, kann eine deutliche Diskrepanz zum Besiedlungsspektrum auf natürlichen Materialien niemals ausgeschlossen werden. Im Berliner Trinkwasserrohrleitungssystem war das Problem weniger dramatisch, weil hier sowieso nur künstliche Materialien als Anheftungsgrundlage für Bakterien aus der planktonischen Phase in Frage kamen und Rohrleitungsmaterialien in Form von kleinen Coupons separat auf ihre Besiedelungseigenschaften getestet werden konnten.

Vergleicht man die mittleren Besiedlungsdichten auf den Glasobjektträgern im Berliner Trinkwassersystem ($5,9 \times 10^5$ Zellen/cm²) und im 1. Siphon der Wulfbachquellhöhle ($5,7 \times 10^4$ Zellen/cm²), so stellt man fest, daß die Besiedelung im letzteren Fall um fast exakt eine Zehnerpotenz niedriger ist. Dies könnte auf den deutlich geringeren DOC-Wert der Wulfbachquelle zurückzuführen sein (Berliner Trinkwasser 3,2-3,8 mg/l; Wulfbach 0,6-0,9 mg/l). U.U. spielt hier auch die niedrigere Temperatur des Wulfbachs eine Rolle (Berliner Trinkwasser 9,4-15,6° C; Wulfbach ganzjährig 9,2 –9,6° C (Käss, 1992, S. 401).

Die einfache Übertragung des Berliner Konzeptes auf die Wulfbachquellhöhle stieß also an Grenzen und das Interesse an der Besiedelung der natürlichen Oberflächen rückte in den Vordergrund. Leider waren die in der Wulfbachquellhöhle am augenscheinlichsten natürlichen Oberflächen - nämlich die Kalksteinwände des Karstgerinnes - der FISH-Technik nicht zugänglich, da Kalkstein eine starke Autofluoreszenz über fast das gesamte sichtbare Lichtspektrum besitzt. Im Rahmen

dieser Arbeit war die einzig funktionierende Methode zum Direktnachweis von Bakterien der Einsatz von FDA, der trotz starker Autofluoreszenz gelang, weil der Signal-Rauschabstand extrem hoch war und damit die Autofluoreszenz überstrahlt wurde. Aus primär nichtfluoreszierendem FDA wird nämlich nur an den Orten, wo spezifische Esteraseaktivität lebender Organismen vorkommt, durch Abspaltung einer Acetatgruppe Fluorescein freigesetzt, im nicht von lebenden Organismen besiedelten Zwischenraum kommt es hingegen zu keiner Signalbildung. Insofern ist auch die unspezifische Bindung von FDA an Oberflächen ohne Bedeutung, da FDA in die lebende Zelle eindringen muß, um überhaupt in das fluoreszierende Agens umgewandelt zu werden.

Zwar war die auf Kalkstein befindlichen Biofilme der phylogenetischen Analyse nicht zugänglich, aber als Ausweg boten sich andere natürliche Oberflächen an: die im Bachlauf reichlich vorhandenen Sedimente. Bei den als Überzug an Wänden und Boden des Höhlenganges befindlichen Ganges handelt es sich überwiegend um unlösliche Rückstände aus dem Verkarstungsprozeß. Es zeigte sich, daß diese Sedimente relativ wenig autofluoreszent waren. Zudem machte die große Oberfläche der Sedimentpartikel sie zu idealen Kandidaten für eine intensive Besiedelung.

Wider Erwarten brachte aber die Verwendung des für die Glasobjektträgerhybridisierung optimierten Hybridisierungsprotokolles so gut wie keine positiven Ergebnisse. Durch einen glücklichen Umstand kam es jedoch zu einer dramatischen Steigerung der Detektionsrate: eine aus der Mikrokoloniehybridisierung bekannte Hitzefixierung bei 80° C für 20 min führte auf einmal zu exzellenten Signalen. Leider liegt der genaue Mechanismus, der zu dieser Verbesserung geführt hat, derzeit noch im Dunkeln. Während eine primäre Formaldehyd- oder Ethanolfixierung und sogar eine konventionelle Hitzefixierung über der Bunsenbrennerflamme unbefriedigende Ergebnisse lieferten, konnten diese Fixierungsmethoden als sekundärer Schritt nach der Hitzefixation bei 80° C die Detektionsrate nicht mehr beeinträchtigen (Bohnert et al., 2001). Da während der nachfolgenden Untersuchungen in den mobilen Sedimentbiofilmen überwiegend gram-negative Organismen gefunden wurden, scheint eine simple Permeabilisierung der Zellwand für die eingesetzten FISH-Sonden durch das neue Fixationsprotokoll hier nicht die primäre Rolle zu spielen. Dennoch ließe sich an dieser Stelle diskutieren, ob nicht eine von den in diesem oligotrophen Habitat lebenden Biofilmbildnern produzierte extrapolymer Matrix eine Barriere für die

FISH-Sonden darstellt, die erst durch die Hitzevorbehandlung aufgelockert wird. Denkbar wäre auch, daß durch die Hitzedenaturierung von ribosomalen Proteinen oder ribosomaler RNA bei 80° C die Zugänglichkeit der ribosomalen Nukleinsäuren für FISH-Sonden so sehr verbessert wird, daß die Zahl der effektiv für die Sondenbindung zur Verfügung stehenden Signatursequenzen erhöht wird.

Mit der Hitzefixation in Kombination mit der Magermilchvorhybridisierung ist es nun erstmals möglich geworden, Einblick in die Zusammensetzung des bakteriellen Artenspektrums natürlicher Biofilme in Karstaquiferen zu gewinnen.

4.2.2 Nachweis der in den Aquiferbiofilmen vorkommenden Arten

Entgegen der normalerweise gängigen Methode zur rRNA-gestützten Identifikation der *in situ* dominanten Bakterien eines Umwelthabitates (Extraktion von genomischer DNA aus einer Umweltprobe, Amplifikation von 16S rDNA mittels PCR, Klonierung in einen geeigneten Vektor und anschließendes Screening einer Klonbibliothek (z.B. Chandler et al., 1997)) bestand die Strategie in dieser Arbeit in einer Kombination von klassisch mikrobiologischen Kultivierungsverfahren und molekularen rRNA-gestützten Identifikationsverfahren.

Die Vorteile liegen klar auf der Hand: während Klonierungsverfahren in der Regel recht schnell zur Identifikation der *in situ* bedeutenden Organismen anhand ihrer 16S rRNA - Sequenzen führen, gelingt es mit dieser Methode in der Regel nicht, diese Bakterien auch in die Kultur zu bringen und ihre metabolischen Eigenschaften zu charakterisieren.

Der alternative - in dieser Arbeit verwendete - Ansatz geht von einem parallelen Screening sowohl der im Habitat *in situ* vorhandenen Bakterien als auch von kultivierten Isolaten auf einem Nährmedium aus, das das Wachstum eines möglichst breiten Spektrums von Umweltbakterien unterstützt (z.B. R2A-Agar).

Man beginnt in diesem Fall *in situ* mit Sonden für die phylogenetischen Großgruppen und tastet sich schrittweise in der phylogenetischen Hierarchie weiter nach unten voran. Sobald phylogenetisch bedeutsame Gruppen *in situ* charakterisiert sind, überprüft man eine zufällig ausgewählte Isolatreihe nur noch mit Sonden für diese Gruppen. Isolate, die keiner *in situ* bedeutsamen Gruppe angehören, werden verworfen und nur potentiell bedeutsame Isolate archiviert und mit einem noch feineren SONDENSATZ weiter untersucht. Auf diese Weise kompensiert man die durch

die Kultivierung entstandenen Verzerrungen im Artenspektrum. Nach mehreren Runden engt sich das Spektrum immer mehr ein und es sollten sich am Ende nur noch *in situ* dominante Isolate in der engeren Auswahl befinden.

- 1) Identifikation der phylogenetischen Hauptgruppen im Biofilm durch FISH mit einem Inventar bereits vorhandener Sonden (z.B. aus der Literatur).
- 2) Selektion relevanter Biofilmisolate durch FISH zufällig auf R2A-Agar ausgewählter Kolonien mit Sonden für *in situ* – dominante phylogenetische Gruppen. Mit jeder neuen Runde werden die Sonden zunehmend spezifischer (bis zum Erreichen der Speziesebene).
- 3) rDNA-Sequenzierung ausgewählter rR2A-Biofilmisolate und Anfertigung cluster- oder speziesspezifischer rRNA-gerichteter Sonden.
- 4) FISH im Biofilm mit den neuentworfenen R2A-Isolatspezifischen Sonden zur Überprüfung des realen Anteils der R2A-Isolate im bakteriellen Biofilm.
- 5) Verwerfen nicht relevanter Stämme und Konservieren der *in situ* – abundanten Stämme.

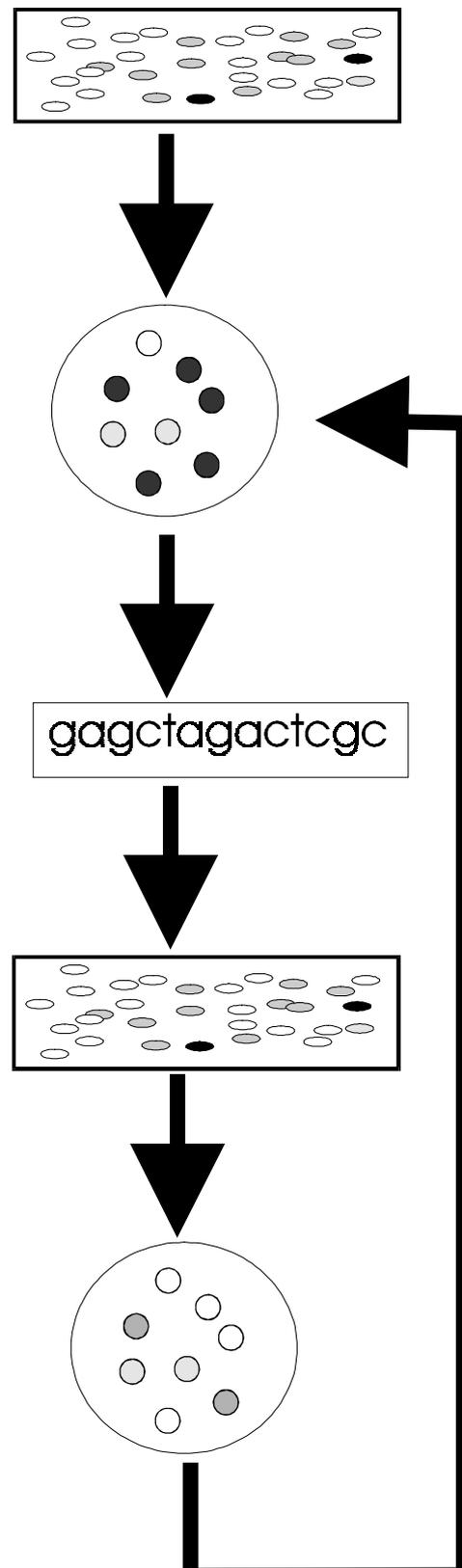


Abb. 32: Strategie für die Identifikation *in situ* – dominanter Spezies mittels rRNA-Technologie

Obwohl diese Methode recht elegant die Vorteile von konventioneller und molekularer Mikrobiologie vereint, ist auch sie nicht ohne Nachteile. Die Kultivierung von Bakterien auf R2A-Agar kann nur gelingen, wenn die fraglichen Organismen einen heterotrophen und keinen obligat autotrophen Stoffwechsel besitzen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die im Wulfbach bis auf Speziesebene identifizierten und *in situ* tatsächlich bedeutsamen Bakterien alle über einen heterotrophen Stoffwechsel verfügen.

Des weiteren ist die Isolationsfrequenz von bestimmten *in situ* bedeutsamen Umweltkeimen vor allem aus der β -Subklasse der Proteobakterien sehr gering, wie das Wulfbachisolat 139 (Anteil *in situ* 21,9 %, Isolationsfrequenz 1,4 %) und das von Kalmbach et al. (1997) aus Berliner Trinkwasserleitungsbiofilmen isolierte *Aquabacterium commune* (Anteil *in situ* 34 %, Isolationsfrequenz 1 %) eindrucksvoll belegen. Die Gewinnung einer Reinkultur ist entsprechend aufwendig, auch wenn im Fall von Wulfbachisolat 139 durch eine PCR mit β 1-Proteobakterienspezifischen Primerpaaren die Gewinnung von speziesspezifischen Sequenzdaten deutlich beschleunigt werden konnte.

Insgesamt konnten 87,7 % der im mobilen Biofilm mit der eubakteriellen Sonde EUB338 detektierbaren Bakterien bis zu einer subgruppenspezifischen Hierarchieebene und 52 % bis zu einer speziesspezifischen Hierarchieebene identifiziert werden, was bedeutet, daß auf Speziesebene noch ein paar Lücken klaffen. Während 74 % der γ -Proteobakterien erfolgreich als Mitglieder der *Pseudomonas fluorescens* - Gruppe identifiziert werden konnten, können die weißen Flecken primär im Bereich der β -Subklasse der Proteobakterien lokalisiert werden.

Unter Berücksichtigung aller gewonnenen FISH-Daten kann abgeschätzt werden, daß noch ca. 11 % der nicht bis auf Speziesebene identifizierten Bakterien zur β 1-Subgruppe der Proteobakterien und immerhin noch etwa 18 % zu dem mit Sonde WB26,68,73 markierten Cluster innerhalb der *Oxalobacter* - Gruppe zu rechnen sind.

Auch in den Schlammsuspensionen aus dem Lochbrunnen findet sich eine ähnliche phylogenetische Zusammensetzung, wobei hier allerdings β - und γ -Subklasse der Proteobakterien nur knapp 50 % der hybridisierbaren Bakterien ausmachen und im Gegensatz zum Wulfbach auch einige gram-positive Organismen mit niedrigem G+C-DNA-Gehalt zu detektieren sind. Immerhin zeigt dies, daß das verwendete

Fixierungsprotokoll auch für FISH von gram-positiven Keimen offensichtlich gut funktioniert.

Außerdem deutet sich mit den FISH-Ergebnissen aus dem Lochbrunnen an, daß der Trend zu einer starken *Pseudomonas fluorescens* - Population nicht nur auf die Wulfbachquellhöhle beschränkt ist, sondern daß diese Gruppe wohl in den Karstaquiferen des schwäbischen Weißjura eine generelle Rolle spielt. Damit läßt sich zumindest für *Pseudomonas fluorescens* die durch klassische Kultivierungsverfahren ermittelte Abundanz dieser Gruppe im Grundwasserbereich auch mit *in situ* - Verfahren belegen. Demgegenüber zeigt sich, daß die häufige Isolation von Bakterien der Gattungen *Acinetobacter*, *Flavobacterium* und *Arthrobacter* aus Karstsystemen *in situ* kein Korrelat findet und wohl auf eine deutliche Bevorzugung dieser Organismen auf den Standardnährmedien gegenüber den tatsächlich abundanten Umweltkeimen zurückzuführen ist, wie sich durch den Einsatz der Sonden ACI432, CF319a und ART1254 in den mobilen Karstbiofilmen klar zeigen läßt.

Analysiert man die 8 durch das Kriterium weniger als 97 % rRNA-Ähnlichkeit als neue Spezies definierten Isolate (Stackebrandt und Göbel, 1994), so stellt man fest, daß immerhin 6 zu den in der Regel schlecht kultivierbaren β -Proteobakterien gehören. Wie Tab. 6 zeigt, konnten die *in situ* dominanten β -Proteobakterien im Gegensatz zu den γ -Proteobakterien nicht einmal annähernd mit dem normalerweise für oxidase-positive Organismen geeigneten API 20 NE-Testkit klassifiziert werden. Unter den neuen Arten finden sich keine Vertreter der relativ gut kultivierbaren γ -Proteobakterien.

Die bis zur Speziesebene charakterisierten *in situ* dominanten Isolate weisen alle einen klassischen heterotrophen Stoffwechsel mit organischen Substraten als Elektronendonator auf, wie die Kultivierungsfähigkeit auf R2A-Agar zeigt.

Als Elektronenakzeptor kommt in durch offenes Fließen gekennzeichneten Karstwassergerinnen in erster Linie Sauerstoff in Frage, da an den Grenzflächen Wasser-Luft eine ständige Nachdiffusion von Sauerstoff erfolgen kann. Die Fähigkeit dieser Isolate zur Nitratreduktion zeigt jedoch, daß bei erniedrigtem Redoxpotential (z.B. in anaeroben Zonen im nur langsam durchströmten Karstwasserkörper) auch Nitrat eine Rolle als Elektronenakzeptor spielen kann.

Fazit: Die erstmals auf ein Karstwassersystem angewandte rRNA-Technologie hat sich in der Praxis gut bewährt. Neben hygienisch relevanten Organismen aus der Familie *Enterobacteriaceae* konnten auch biofilmbildende Bakterien aus der β - und γ -Subklasse der Proteobakterien direkt mittels FISH charakterisiert werden. Es zeigte sich, daß Artenspektrum wie auch Besiedlungsdichte in Abhängigkeit von Niederschlagsereignissen starken Schwankungen unterworfen sind. Die Änderungen des Nährstoffeintrages und die periodische Mobilisierung von Sedimentpartikeln in Abhängigkeit von unterschiedlicher Strömungsgeschwindigkeiten scheint hier einen wesentlichen Einfluß auszuüben. Trotz des extrem niedrigen DOC sind die inneren Oberflächen vor allem bei höheren Fließgeschwindigkeiten dicht mit überwiegend heterotrophen Organismen besiedelt, die gelöste Stoffe im zum Teil für den menschlichen Gebrauch genutzten Karstwasser metabolisieren können, wobei hier insbesondere die Fähigkeit zur Nitratreduktion über die Stufe des Nitrit hinaus zu nennen ist.

5. Zusammenfassung

Von August 1998 bis August 2000 wurden Wasserproben und Biofilme aus der Wulfbachquellhöhle bei Mühlheim a.d. Donau mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden untersucht. Es zeigte sich, daß zwei der in Richtung Siedlungsflächen ziehenden unterirdischen Wasserzubringer (Siphon 8b und Sologang) wasserchemisch deutlich höher belastet waren als die unter rein landwirtschaftlich genutzten Flächen befindlichen, zudem waren auch Yersinien nachweisbar. Am 15.07.2000 wurde am Quellmund der Maximalwert von 48 *E. coli* pro ml Wasser erreicht, gleichzeitig waren in 100 ml Wasserprobe erstmals auch Salmonellen nachweisbar. Durch den Verdünnungseffekt des Hauptzubringers wirkten sich die periodischen Einleitungen der im Einzugsgebiet befindlichen Kläranlage hauptsächlich bei geringer Quellschüttung in einem Anstieg der Fäkalindikatoren aus. Die jeweils für mehrere Wochen im Karstaquifer exponierten Glasobjektträger erwiesen sich als eher dünn besiedelt. Größere Zellzahlen bis $6,1 \times 10^6$ / mg Trockengewicht konnten dagegen während des niederschlagsreichen Frühjahrs 2000 auf Sedimentpartikeln (mobile Biofilme) nachgewiesen werden. Mit einem speziell für die Untersuchung von Sedimenten mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden optimierten Protokoll konnte gezeigt werden, daß fast alle mit der eubakteriellen Sonde EUB338 markierbaren Bakterien der β - und γ -Subklasse der Proteobakterien zuzurechnen sind. Mit zurückgehender Quellschüttung sank die Zahl der mit EUB338 detektierbaren Zellen kontinuierlich und das bakterielle Spektrum verschob sich von der zu Beginn des Frühjahrs dominierenden γ -Subklasse hin zur β -Subklasse. Um die am Aufbau der mobilen Biofilme beteiligten Bakterien möglichst bis auf Speziesebene zu charakterisieren, wurden auf 100-fach verdünntem R2A-Agar bei 9° C kultivierte Organismen dieser beiden Gruppen sequenziert (16S rRNA-Gene) und cluster- bzw. speziesspezifische Sonden für diese Organismen angefertigt. Insgesamt konnten am Stichtag 16.04.2000 87,7 % der in den Sedimenten mit der eubakteriellen Sonde EUB338 markierten Organismen in einer der folgenden phylogenetischen Einheiten eingeordnet werden: *Oxalobacter* – Gruppe (24,3 %), β 1- Subgruppe der Proteobakterien (34,8 %), *Pseudomonas* – Gruppe (28,6 %). 52 % konnten bis auf Speziesebene charakterisiert werden. 8 der sequenzierten Isolate besitzen weniger als 97 % 16S rRNA-Ähnlichkeit mit bereits in den öffentlichen Datenbanken vorhandenen Sequenzen und sind daher als neue Spezies anzusprechen.

6. Literaturzusammenstellung

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**:762-770.

Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olsen, 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**:1919-1925.

Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**:143-169.

Amann, R.I., J. Snaird, M. Wagner, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1996. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural bacterial community. *J. Bacteriol.* **178**:3496-3500.

Anderson, M., D.Y. Bryan 1988. Quantitative Filter Hybridization. In: nucleic acid hybridization – a practical approach. IRL Press. 73-111.

Balkwill, D.L., R.H. Reeves, G.R. Drake, J.Y. Reeves, F.H. Crocker, M.B. King, D.R. Boone. 1997. Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:201-216.

Bohnert, J., S. Geiger, H. Jantschke, A. Kücha, R. Straub. 1997. Die längste Höhle der Schwäbischen Alb. DRW-Verlag. Leinfelden-Echterdingen.

Bohnert, J, B. Hübner, and K. Botzenhart. 2000. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 203:77-82

Bohnert, J, B. Hübner, and K. Botzenhart. 2001. An optimized protocol for FISH of whole bacterial cells in subsurface sediments from a karstic aquifer. Submitted.

Braun-Howland, E.B., P.A. Vescio, and S.A. Nierzwicki-Bauer. 1993. Use of a simplified cell blot technique and 16S rRNA-directed probes for identification of common environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3219-3224.

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.

Chandler, P.D., F.J. Brockman, and J. K. Fredrickson. 1997. Use of 16S rDNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from *ex situ* perturbation of a subsurface sediment. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:217-230

- 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.
- DIN; Deutsches Institut für Normung.** 1983. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K). Beuth Verlag, Berlin.
- Dott, W., und H.J. Trampisch.** 1983. Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 5. Mitt.: Vergleichende Untersuchung an zwei Schnellsandfiltern. *Zbl. Bakt. Hyg.* **177**: 141-155.
- 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**:4973-4982.
- Fuchs, B.M., F.O. Glöckner, J. Wulf, and Rudolf Amann.** 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16 S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3603-3607.
- Jantschke, H.** 1993. Höhlen im Kartenblatt 7819 Meßstetten. Materialhefte zur Karst- und Höhlenkunde. Heidenheim. **14**:25-28.
- Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk.** 1997. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4164 - 4170.
- Käss, W.** 1992. Geohydrologische Markierungstechnik. Lehrbuch der Hydrogeologie Band 9. Gebrüder Borntraeger Verlag. Berlin – Stuttgart.
- Koch, R.** 1893. Wasserfiltration und Cholera. In: Schwalbe, J. Gesammelte Werke von Robert Koch. Thieme-Verlag Leipzig. 1912. 183-206.
- Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- LeChevalier, M.W., T.M. Babcock, and R.G.Lee.** 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2714-2724.
- Lee, S., C. Malone, and P.F. Kemp.** 1993. Use of multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **101**: 193-201.

- 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. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
- Manz, W., U. Szewzyk, P. Ericson, R. Amann, K.H. Schleifer, and T.A. Stenström.** 1993. *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA- directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2293 - 2298.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K.-H. Schleifer.** 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**:1097-1106.
- Menne, B.** 1999. Myxobacteria in cave sediments of the French Jura mountains. *Microbiol. Res.* **154**:1-8
- Mobarry, B.K., M. Wagner, V. Urbain, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl.** 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organisation of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2156-2162.
- Olson, B.H., and L.A. Nagy.** 1984. Microbiology of potable water. *Adv. Appl. Microbiol.* **30**:73-132.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, and D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:337 - 365.
- Ouverney, C.C., and J.A. Fuhrmann.** 1997. Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2735-2740.
- Pedersen, K.** 2000. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiol. Letters.* **185**:9-16.
- Reasoner, D.J., and E.E. Geldreich.** 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1-7.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K.H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high G+C DNA content using 23S rRNA - targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**:2849-2858.
- Rozzak, D.B., and R.R. Colwell.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**:365-379.
- Rusterholtz, K.J., L.M. Mallory.** 1994. Density, activity, and diversity of bacteria indigenous to a karstic aquifer. *Microb. Ecol.* **28**:79-99.
- Sanger, F., S. Nicklen, S. A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**:5463-5467.

- Saiki, R. K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DANN with a thermostable DANN polymerase. *Science*. **239**: 487-491.
- Schaechter, M.O., O. Maaloe, and N.O.Kjeldgaard.** 1958. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **19**:592-606.
- Snaidr, J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **63**:2884-2896.
- Southern, E.** 1994. Vorwort, p9-10. In: D.C. Darling und P.M. Brickell. *Nucleinsäureblotting*. Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford.
- Stackebrandt, E., and B.M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846-849.
- Stahl, D.A., and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics, p. 205-248. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England.
- Staley, J.T., and A. Konopka.** 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:321-346.
- 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, chemoluminescent and enzyme labeled synthetic oligodesoxyribonucleotide probes. *Nucleic Acid Res.* **16**:4937-4956.
- Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- Woese, C.R.** 1994. There must be a prokaryote somewhere: Microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* **58**:1-9.
- Zuckermandl, E. und L. Pauling.** 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**:357-366.

7. Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Prof. Dr. med. Konrad Botzenhart für die Betreuung bei der Bearbeitung dieses Themas, insbesondere für die materielle und ideelle Unterstützung. Sein unerschütterlicher Glaube an den Erfolg des Projektes half mir über die anfänglichen Fehlschläge hinweg und wirkte sehr motivierend.

Dipl. Biol. Barbara Hübner unterstützte mich bei der praktischen Arbeit im Labor und trug als maßgebliches Mitglied der Karstmikrobiologiearbeitsgruppe mit ihrem Sachverstand, Ideenreichtum und ihrer guten Laune wesentlich zum Gelingen des Projektes bei. Ohne Ihre bahnbrechende Entdeckung, daß die Hitzevorbehandlung von Schlammproben zu einer dramatischen Erhöhung der FISH- Detektionsrate führt, wäre die Charakterisierung von bakteriellen Biofilmen auf diesen natürlichen Oberflächen nicht möglich gewesen.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und die exzellente Hilfe bei der Einarbeitung in neue molekularbiologische Methoden danke ich darüber hinaus Dr. rer. nat. Petra Krüger und Dipl. Biol. Christine Hock.

Dr. med. Albrecht Wiedenmann stand jederzeit mit seinem Rat zur Verfügung und gab insbesondere wichtige Hinweise in Bezug auf statistische und mikrobiologische Verfahren.

Dr. rer. nat. Martina Ulrich gab mit Ihrem Hinweis auf die unspezifische Bindung von Cy3-markierten Antikörpern an künstliche Oberflächen den entscheidenden Anstoß zum Einsatz von Vorhybridisierlösungen, die die unspezifische Bindung von Cy3-markierten Oligonukleotiden erfolgreich blockieren.

Walter Langhammer und Ernst Schweizer unterstützten mich bei der chemischen Wasseranalyse.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Szewzyk (Fachbereich Ökologie der Mikroorganismen, TU-Berlin) danke ich für die praktische Einführung in die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, namentlich Uta Böckelmann, Frauke Hangen, Sybille Kalmbach, Werner Manz und Wolfgang Wenzel. Yves Neitzel sequenzierte die von unserer Arbeitsgruppe vorselektierten R2A-Isolate und entwarf einige isolatspezifische Sonden.

Zu guter letzt wäre das Projekt ohne die beständige Unterstützung durch die Höhlentauchkollegen von der Höhlenforschungsgruppe Ostalb/Kirchheim e.V. (HFGOK) nicht möglich gewesen. Bei unzähligen Probennahmen im Herzen der Schwäbischen Alb wurde ich von Marcus Bärtele, Salvatore Busche, Siegfried

Geiger, Werner Gieswein, Herbert Jantschke, Andreas Kücha, Jochen Malmann, Henning Mezger, Tobias Schmidt, Oliver Schöll, Rainer Straub und Thomas Unger tatkräftig unterstützt, darüber hinaus von Ralph Wilhelm, der nicht der HFGOK angehört.

Ein ganz besonderes Anliegen ist es mir, an meinen Studienkollegen Dr. med. Siegfried Geiger zu erinnern, der mir viele Jahre lang ein guter Freund und Höhlentauchpartner war und der durch seine Tatkraft und Disziplin wesentlich zum heutigen Forschungsstand in der Wulfbachquellhöhle beigetragen hat.

Er ist am 28.4.2000 im Alter von nur 31 Jahren zu Tode gekommen und durfte den Abschluss meiner Dissertation leider nicht mehr erleben.

8. Lebenslauf

Jürgen Bohnert

geboren am 27.2.1969 in Heidenheim a.d. Brenz

Vater: Franz-Jürgen Bohnert

Stadtoberverwaltungsrat in Heidenheim a.d. Brenz

Mutter: Rosemarie Bohnert (geb. Seyboldt)

Verwaltungsangestellte

Schulbildung:

1975 – 1979 Grundschule (Rauhbuchschule) in Heidenheim a.d. Brenz

1979 – 1985 Hellensteingymnasium in Heidenheim a.d. Brenz

1985 – 1988 Wirtschaftsgymnasium in Heidenheim a.d. Brenz

Berufsbildung:

1988 – 1990 Zivildienst im Kreiskrankenhaus in Heidenheim a.d. Brenz

1990 - 1997 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

1. Famulatur in der Anästhesiepraxis Nozic und Folger in Ulm
 2. Famulatur in der Aufnahmestation der Nervenlinik Spandau
 3. Famulatur am Centre Hospitalier Universitaire de Nice in der Unite de Soins Hyperbare
 4. Famulatur im Morrison Hospital Accident and Emergency Department in Swansea (Großbritannien)
-
1. PJ-Tertial in der Abteilung Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm
 2. PJ-Tertial in der Abteilung Chirurgie am Universitätsklinikum von Medunsa (Südafrika)
 3. PJ-Tertial in der Abteilung Neurologie des Rehabilitationskrankenhaus Ulm

06.05.1997 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1997 – 2000 Promotion am Fachbereich für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene der Universität Tübingen