

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Mikrobiologie

Entwicklung und Optimierung von *in situ* Methoden zum
Nachweis von lebensmittelrelevanten Bakterien

Karin Thelen

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Höll
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer (i.R.)
2. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Die Dissertation wurde am 02.06.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.07.2009 angenommen.

Für meine Eltern

In memoriam Ulla Frese geb. Thelen

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
Herstellerverzeichnis.....	XIV
A. Einleitung.....	1
A.1 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	1
A.2 Optimierungen der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	2
A.3 Fluoreszenzquenching - Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten.....	4
A.4 Überblick über die zur Methodenentwicklung ausgewählten Modellorganismen.....	5
A.4.1 Gattung <i>Legionella</i>.....	6
A.4.2 Bierschädliche Bakterien.....	7
A.4.3 <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.).....	9
A.5 Ziel der Arbeit.....	11
B. Material und Methoden.....	12
B.1 Verwendete Mikroorganismen.....	12
B.2 Nährmedien.....	16
B.2.1 Generelle Anreicherungsmedien.....	16
B.2.2 Nährmedien zur Anzucht von Legionellen.....	16
B.2.3 Nährmedien zur Anzucht von bierschädlichen Bakterien.....	18
B.2.4 Nährmedien zur Anzucht von <i>Cronobacter</i> spp. (<i>Enterobacter sakazakii</i>).....	18
B.3 Anzucht, Stammhaltung und Zellernte.....	19
B.3.1 Anzucht.....	19
B.3.2 Stammhaltung.....	19
B.3.3 Zellernte.....	20
B.3.4 Kultivierungsbedingungen von Trinkwasserproben (nach Empfehlung des Umweltbundesamtes).....	20
B.3.5 Kultivierungsbedingungen von Bierproben (nach Back, 1994).....	21
B.3.6 Kultivierungsbedingungen von Milchpulverproben (nach ISO-Vornorm: ISO/TS 22964:2006-02).....	22
B.3.7 Inaktivierung von Zellen.....	23

B.4 Isolierung von Nukleinsäuren.....	23
B.5 Quantitative und qualitative Untersuchung von Nukleinsäurelösungen.....	23
B.5.1 Quantitative, photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	23
B.5.2 Qualitative Analyse von Nukleinsäurelösungen mittels Agarosegelelektrophorese.....	25
B.6 <i>In vitro</i>-Amplifizierung von DNS mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
B.6.1 Verwendete Primer.....	26
B.6.2 Durchführung der PCR.....	27
B.6.3 Reinigung und Konzentrierung von PCR-Amplifikaten.....	27
B.7 Sequenzanalyse mittels Li-Cor DNS-Sequencer.....	27
B.7.1 Sequenzierprimer.....	28
B.7.2 Standardreaktionsansatz und Amplifikationsbedingungen.....	28
B.7.3 Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion.....	29
B.7.4 Auswertung der Sequenzdaten.....	30
B.7.4.1 Alignment der DNS-Sequenzen.....	30
B.7.4.2 Rekonstruktion von Stammbäumen.....	31
B.7.4.3 Konstruktion von 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden.	31
B.8 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierungen.....	33
B.8.1 Zellfixierung.....	33
B.8.1.1 Ethanol-Zellfixierung.....	33
B.8.2.1 Formaldehyd-Zellfixierung.....	33
B.8.2 Verwendete Oligonukleotidsonden.....	34
B.8.3 Hybridisierung auf dem Objektträger.....	35
B.8.4 Hybridisierung auf Polycarbonatfiltern.....	37
B.8.4.1 Einzelzell-Filterhybridisierung (mod. nach Neef <i>et al.</i> , 1995).....	37
B.8.4.2 Mikrokolonie-Filterhybridisierung (nach Meier <i>et al.</i> , 1997).....	39
B.8.5 Hybridisierung in Lösung (Wallner <i>et al.</i> , 1995, mod. Thelen, 2002)...	40
B.9 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen.....	40
B.9.1 Auswertung mittels Epifluoreszenzmikroskopie.....	40
B.9.1.1 Standard Epifluoreszenzmikroskop.....	41
B.9.1.2 Epifluoreszenzstereomikroskop.....	41

B.9.2 Auswertung mittels ChemScan RDI Laserscanner.....	42
B.9.2.1 Prinzip ChemScan RDI Laserscanning System.....	42
B.9.2.2 ChemScan RDI Software und Datenverarbeitung.....	43
B.9.2.3 Mikroskopische Validierung.....	44
B.9.2.4 Vitalitätsfärbung mit ChemChrome V6.....	45
B.9.3 Auswertung mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer.....	46
B.10 Lösungen und Materialien für die FISH-Protokollentwicklungen.....	47
B.10.1 Verwendete Lösungen und Chemikalien.....	47
B.10.2 Verwendete Materialien.....	48
C. Ergebnisse.....	50
C.1 Protokollentwicklung eines FISH-basierten Nachweises von	
<i>Legionella</i>-Mikrokolonien.....	50
C.1.1 FISH-Analyse von <i>Legionella</i> -Mikrokolonien auf	
Polycarbonatfiltern.....	50
C.1.2 Optimierung des Protokolls.....	55
C.1.2.1 Evaluierung alternativer Filtermembranen.....	55
C.1.2.2 Optimierung des Signal/Rausch-Verhältnisses.....	58
C.1.2.3 Standardisierung des Protokolls.....	61
C.1.2.4 Überprüfung der Spezifität.....	63
C.1.3 Validierung des Protokolls an Trinkwasserproben.....	63
C.1.4 Etablierung einer quantitativen Auswertungsroutine.....	64
C.1.4.1 Manuelle Quantifizierung mittels Epifluoreszenzmikroskopie.....	64
C.1.4.2 Semi-automatische Quantifizierung mittels	
Fluoreszenzstereomikroskop.....	68
C.2 Protokollentwicklung zum FISH-basierten Direktnachweis von	
bierschädlichen Bakterien auf Einzelzellebene.....	70
C.2.1 FISH-Analyse von Einzelzellen auf Polycarbonatfiltern.....	70
C.2.2 Optimierung des Protokolls.....	71
C.2.2.1 Vergleich von Polycarbonat- und Polyesterfiltermembranen.....	71
C.2.2.2 Verstärkung des Sondensignals.....	72
C.2.2.2.1 Permeabilisierung der Zellen mittels Enzymbehandlung.....	72
C.2.2.2.2 Strategien zur Verstärkung des Sondensignals.....	73

C.2.3 Etablierung einer Gegenfärbung zur Maskierung bierspezifischer Autofluoreszenzen.....	75
C.2.4 Überprüfung der Spezifität.....	78
C.2.5 Analyse von chemisch und thermisch inaktivierten Zellen.....	78
C.2.6 Etablierung einer automatischen Auswertung mittels ChemScan RDI	79
C.2.7 Validierung des Protokolls an Bierproben.....	79
C.3 Protokollentwicklung zur Hybridisierung von <i>Cronobacter</i> spp.	
Zellen in flüssiger Phase.....	80
C.3.1 <i>In silico</i> und <i>in situ</i> Überprüfung der Spezifität der Sonde Esak997.....	80
C.3.2 Konstruktion von Quenchersonden.....	81
C.3.3 Entwicklung eines high-throughput tauglichen Protokolls zur Hybridisierung in Lösung.....	82
C.3.3.1 Theoretische Konzeptionierung der Hybridisierungsstrategien....	82
C.3.3.2 Selektion des Hybridisierungspuffers.....	83
C.3.3.3 Evaluierung des Sonden/ Quenchersonden Verhältnisses.....	86
C.3.3.4 Experimentelle Verifizierung der Hybridisierungsstrategien.....	88
C.3.3.5 Aufbereitung der Zellen zur Hybridisierung in der Mikrotiterplatte.....	93
C.3.3.6 Analyse von freien DNS-Molekülen.....	94
C.3.3.7 Evaluierung des Einflusses von DNS-Doppelstrang destabilisierenden Agenzien und Detergenzien.....	96
C.3.4 Bestimmung der Spezifität.....	98
C.3.4.1 Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Salzgehalt.....	98
C.3.4.2 Überprüfung des Einsatzes von Kompetitoren zur Erhöhung der Spezifität.....	101
C.3.4.3 Untersuchung von weiteren Zielorganismen.....	102
C.3.4.4 Untersuchung eines erweiterten Spektrums an Nichtzielorganismen.....	103
C.3.4.5 Untersuchung von Mischungen aus Ziel- und Nichtzielorganismen.....	105
C.3.5 Bestimmung der Sensitivität.....	106
C.3.5.1 Evaluierung der Nachweisgrenze.....	106

C.3.5.2 Einfluss des Wachstumszustands auf die Fluoreszenzintensität.....	107
C.3.5.3 Bestimmung der maximalen Hybridisierungsdauer.....	111
C.3.5.4 Enzymatische Permeabilisierung der Zellen zur Erhöhung der Sensitivität.....	113
C.3.6 Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse.....	119
C.3.7 Etablierung einer Vorkultivierungsstrategie für Milchpulverproben.....	121
D. Diskussion.....	125
D.1 Optimierung der Bedingungen für die Fluoreszenz <i>in situ</i>	
Hybridisierung (FISH) auf Filtermembranen.....	125
D.1.1 Einfluss verschiedener Membranfiltertypen.....	125
D.1.2 Möglichkeiten zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, zur Verstärkung des Sondensignals und zur Optimierung der Handhabung	126
D.1.3 Manuelle, semi-automatische und automatische Quantifizierung von Filtermembranen.....	127
D.1.4 Ausblick Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung auf Filtermembranen.....	128
D.2 Prinzip Quick-FISH.....	129
D.2.1 Reaktionsmechanismus Quick-FISH.....	130
D.2.2 Parameter zur Beeinflussung der Reaktionskinetik und Spezifität.....	134
D.2.2.1 Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Ionenstärke auf den Verlauf der Reaktionskinetik.....	136
D.2.2.2 Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Ionenstärke auf die Spezifität.....	138
D.2.2.3 Zusätzliche Möglichkeiten zur Erhöhung der Spezifität.....	142
D.2.3 Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Quick-FISH-Reaktion.....	143
D.2.4 Ausblick Quick-FISH.....	146
E. Zusammenfassung/ Summary.....	148
F. Literaturverzeichnis.....	150
G. Anhang.....	164

Übersicht Tabellen

Tabelle A1:	Übersicht Arten und Serogruppen der Gattung <i>Legionella</i>	6
Tabelle A2:	Übersicht bierschädliche Bakterienarten.....	8
Tabelle A3:	Übersicht Arten der Gattung <i>Cronobacter</i>	9
Tabelle B.1:	Verwendete Mikroorganismen.....	12
Tabelle B.2:	Basenspezifische physikalische Daten.....	24
Tabelle B.3:	Verwendete PCR-Primer.....	26
Tabelle B.4:	Primer für die Sequenzanalyse.....	28
Tabelle B.5:	Standardreaktionsansatz.....	28
Tabelle B.6:	Spezifikationen der Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
Tabelle B.7:	Übersicht verwendete Quenching-Farbstoffe.....	32
Tabelle B.8:	Optimale Kombinationen Fluoreszenz- und Quenching-Farbstoffe.....	32
Tabelle B.9:	Auflistung aller verwendeten und bereits entwickelten Oligonukleotidsonden.....	34
Tabelle B.10:	NaCl-Konzentrationen im Waschpuffer für Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden.....	36
Tabelle B.11:	Spezifikationen der verwendeten Filter.....	41
Tabelle C.1:	Vergleich verschiedener Filtermembranen zur Kultivierung von Mikrokolonien.....	56
Tabelle C.2:	Evaluierte Blockierungsstrategien für Hybridisierungs- und Waschpuffer...	59
Tabelle C.3:	Evaluierte Prä-Hybridisierungsstrategien.....	60
Tabelle C.4:	Verwendete Lösungen und Inkubationsdauer.....	62
Tabelle C.5:	Fluoreszenzintensitäten der verlängerten Sonde Lbbr465.....	74
Tabelle C.6:	Fluoreszenzintensitäten der doppelt FAM-markierten Sonde Pela761.....	74
Tabelle C.7:	Fluoreszenzintensitäten von mehreren parallel eingesetzten Sonden.....	74
Tabelle C.8:	Fluoreszenzintensitäten von chemisch und thermisch inaktivierten Zellen.	78
Tabelle C.9:	Übersicht verwendete Sonden und korrespondierende Quenchersonden..	81
Tabelle C.10:	Fluoreszenzmaxima der Sonden EUB338 und Esak997-3 in verschiedenen Puffern.....	84
Tabelle C.11:	Kombinationen Sonden und Quenchersonden.....	85
Tabelle C.12:	Prozentuale Quenchingeffizienz.....	88
Tabelle C.13:	Verifizierte Substitutionen des Basispuffers.....	97
Tabelle C.14:	Untersuchung eines erweiterten Spektrums an Nichtzielorganismen.....	104
Tabelle C.15:	Übersicht Versuchsvarianten enzymatische Vorbehandlung.....	114
Tabelle C.16:	Fluoreszenzintensitäten unterschiedlicher Produktionschargen.....	119
Tabelle C.17:	Vergleich verschiedener Chargen der Sonde Esak997-3-TAMRA.....	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle D.1:	Prozentuales Verhältnis der Signalintensitäten der Nichtzielorganismen zum Signal des Zielorganismus.....	139
Tabelle G.1:	Spezifitätstests der Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3.....	164
Tabelle G.2:	Vergleichende Analyse von Trinkwasserproben.....	166
Tabelle G.3:	Übersicht Validierung der manuellen Auswertung.....	168
Tabelle G.4:	Untersuchung von verschiedenen Farbstoffen zur Maskierung bierspezifischer Autofluoreszenze.....	168
Tabelle G.5:	Spezifitätsprüfung der Sonde Pela761 bei einer Konzentration von 200 ng/μl.....	169
Tabelle G.6:	Übersicht Parameter zur Diskriminierung der FISH-Sondensignale von Partikeln.....	170
Tabelle G.7:	Übersicht Ergebnisse vergleichende Analyse von Bierproben.....	170
Tabelle G.8:	ARB-Sondenmatch der Sonde Esak997.....	172
Tabelle G.9:	Quenchingeffizienz der Sonden/ Quenchersonden Paare EUB338-TAMRA/ Quen-EUB338-BHQ2 und Esak977-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2.	173
Tabelle G.10.1:	Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C.....	173
Tabelle G.10.2:	Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C.....	175
Tabelle G.10.2:	Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C.....	176
Tabelle G.10.2:	Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 70 °C.....	178

Übersicht Abbildungen

Abbildung B.1:	Empfehlung des Umweltbundesamtes zum Nachweis von Legionellen.....	21
Abbildung B.2:	Nachweis von <i>Enterobacter sakazakii</i> in Säuglingsnahrung nach ISO-Vornorm ISO/TS 22964:2006-02.....	22
Abbildung B.3:	Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl.....	39
Abbildung B.4:	ChemScan RDI	42
Abbildung B.5:	ChemScan Software.....	44
Abbildung B.6:	Flx800 Mikrotiterplatten-Fluorometer.....	46
Abbildung C.1/1:	Dokumentation <i>Legionella</i> -Mikrokolonien auf Polycarbonatfiltern.....	52
Abbildung C.1/2:	Dokumentation von <i>Legionella</i> -Einzelzellen und <i>Legionella</i> -Mikrokolonien	54
Abbildung C.2:	Komponenten der Hybridisierungseinheit.....	61
Abbildung C.3:	Dokumentation von <i>Legionella</i> -Mikrokolonien auf Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen	65
Abbildung C.4:	Schematische Darstellung der manuellen Quantifizierung.....	66
Abbildung C.5:	Software-Makro zur Quantifizierung von Mikrokolonien auf Membranfiltern.....	69
Abbildung C.6:	Dokumentation bierschädliche Bakterien auf Polyestermembranen.....	77
Abbildung C.7:	Hybridisierung in Lösung kombiniert mit Fluoreszenzquenching Strategie A	82
Abbildung C.8:	Hybridisierung in Lösung kombiniert mit Fluoreszenzquenching Strategie B.....	83
Abbildung C.9:	Quenchingeffizienz unterschiedlicher Quenching-Farbstoffe.....	85
Abbildung C.10:	Verdünnungsreihen der Sonden EUB338 und Esak997-3.....	86
Abbildung C.11:	Optimales Sonden/ Quenchersonden Verhältnis.....	87
Abbildung C.12:	Reaktionskinetik Strategie A in modifiziertem PCR-Puffer.....	90
Abbildung C.13:	Reaktionskinetik Strategie A in Standardhybridisierungspuffer 0 % Formamid.....	90
Abbildung C.14:	Reaktionskinetik Strategie B in modifiziertem PCR-Puffer.....	91
Abbildung C.15:	Reaktionskinetik Strategie B in Standardhybridisierungspuffer 0 % Formamid.....	91
Abbildung C.16:	Untersuchung von unterschiedlichen Vorbehandlungsvarianten der Zellen	94
Abbildung C.17:	Evaluierung alternativer Hybridisierungsziele für die Hybridisierung in Lösung.....	95
Abbildung C.18:	Untersuchung von unterschiedlichen Reaktionspuffern (Messpunkte: 2 h, 4 h).....	97
Abbildung C.19:	Effekt der Temperatur und der Salzkonzentration (Messpunkt: 4 h).....	99
Abbildung C.20:	Reaktionskinetik bei 30 °C und 45 °C sowie einem Salzgehalt von 50 mM NaCl.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung C.21:	Einfluss des Kompetitors Esak997C2 auf die Spezifität der Hybridisierung in Lösung.....	101
Abbildung C.22:	Hybridisierung von weiteren Zielorganismen bei 30 °C und 45 °C.....	103
Abbildung C.23:	Hybridisierung von Mischungen aus Ziel- und Nichtzielorganismen.....	105
Abbildung C.24:	Bestimmung der Nachweisgrenze.....	106
Abbildung C.25:	Wachstumskurve von <i>C. sakazakii</i> (LMG 2760 und LMG 2766) in M1-Medium.....	107
Abbildung C.26:	Einfluss des Wachstumszustands bezogen auf die gemessene Fluoreszenzintensität.....	108
Abbildung 27/1:	Exemplarische Dokumentation des Wachstumsversuchs von <i>C. sakazakii</i> LMG 2760.....	109
Abbildung 27/2:	Exemplarische Dokumentation der EtOH-Fixierungen von <i>C. sakazakii</i> LMG 2760.....	110
Abbildung C.28:	Bestimmung des Fluoreszenzmaximums bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C.....	111
Abbildung C.29:	Bestimmung des Fluoreszenzmaximums bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C.....	112
Abbildung C.30:	Enzymatische Zellpermeabilisierung und Hybridisierung bei 30 °C.....	114
Abbildung C.31:	Enzymatische Zellpermeabilisierung und Hybridisierung bei 45 °C.....	115
Abbildung C.32/1:	Exemplarische Dokumentation der EtOH-Fixierungen von <i>C. sakazakii</i> LMG 2760.....	117
Abbildung C.32/2:	Exemplarische Dokumentation der FAD-Fixierungen von <i>C. sakazakii</i> LMG 2760.....	118
Abbildung C.33:	Vergleich verschiedener Chargen der Sonde Esak997-3-TAMRA.....	120
Abbildung C.34:	Exemplarische Dokumentation der künstlich mit <i>C. sakazakii</i> kontaminierten Milchpulverproben.....	122
Abbildung C.35:	Untersuchung von künstlich mit <i>C. sakazakii</i> kontaminierten Milchpulverproben.....	123
Abbildung D.1:	Schematische Darstellung der hypothetisch angenommenen Reaktionsgleichgewichte der DNS:DNS- und RNS:DNS-Hybridisierungen	129
Abbildung D.2:	Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Effektivität der DNS:RNS-Hybridisierung bei konstanter Ionenstärke (50 mM NaCl).....	135
Abbildung D.3:	Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Salzgehalt auf die Quick-FISH-Reaktion von <i>C. sakazakii</i>	136
G.11	Vergrößerte Darstellung der Abbildungen C.19 A, B, C und	179
G.12	Vergrößerte Darstellung der Abbildungen C.20 A und B.....	181
G.13	Vergrößerte Darstellung der Abbildungen C.21 A und B.....	182

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere
α	Alpha
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Å	Ångström; 1 Å = 0,1 nm
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract (<i>Legionella</i> Selektivmedium)
BHQ	Black Hole Quencher
BMPA	<i>Legionella</i> Selektivsupplement für den BCYE-Agar
bp	Basenpaar(e)
BP	Bandpaßfilter
BPW	Puffered Peptone Water (gepuffertes Peptonwasser)
bzw.	beziehungsweise
c	molare Konzentration
ca.	zirka
C	Cytosin
<i>C.</i>	<i>Cronobacter</i>
CARD	Catalyzed Reporter Deposition
°C	Grad Celsius
<i>Ci.</i>	<i>Citrobacter</i>
CY3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3',3'-tetramethylindolocarbo cyanin-N-hydroxysuccinimidester
Dabcyl	4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl] azo]-benzoesäure
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
ds	double stranded, (doppelsträngig)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DVGW	Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.
E	Extinktion
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EE-Broth	<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment Broth (Mossel-Anreicherungsmedium)
<i>Ed.</i>	<i>Edwardsiella</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>En.</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Er.</i>	<i>Erwinia</i>

Abkürzungsverzeichnis

ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat. für, und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EtOH _{abs.}	96% Ethanol, unvergällt
f	Femto (10^{-15})
FA	Formamid
FAD	Formaldehyd
FAM	5,6-Carboxyfluorescein
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration (US)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm, Fallbeschleunigung
G	Guanin
GE	Genomäquivalent
GC	Guanin und Cytosin
GVPC	Glycin, Vancomycin, Polymyxin B, Cycloheximid (<i>Legionella</i> Selektivsupplement für den BCYE-Agar)
h	Stunde(n), hekto (10^2)
HP	Hybridisierungspuffer
http	hypertext transfer protocol (Hypertext-Übertragungsprotokoll)
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest.}	bidestilliertes Wasser
I.E.	internationale Einheit
inkl.	inklusive
ISO	Internationale Organisation für Normung
k	kilo, (10^3)
kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie bildende Einheit
Konz.	Konzentration
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Legionella</i>
lat.	Lateinisch
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LP	Langpaßfilter
log	Logarithmus zur Basis 10
m	Milli (10^{-3}); Meter
max.	maximal
μ	Mikro (10^{-6})
M	Molar (mol/l); Mikroskopfaktor
<i>M.</i>	<i>Megasphaera</i>
MB	Molecular Beacon
min	Minute(n)
mind.	mindestens

Abkürzungsverzeichnis

mLST	modifizierte Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon
MM	Missmatch (Basenunterschied)
mod.	modifiziert
MRS	<i>Lactobacillus</i> -Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe
mRNS	messenger RNS, (Boten RNS)
MW	Molekulargewicht
MWY	modifizierter Wadowsky Yee Oxoid Agar
n	Nano (10^{-9})
NZO	Nichtzielorganismus
OD	optische Dichte
p	Piko (10^{-12})
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
Pa	Pascal
p.a.	<i>pro analysis</i> (zur Analyse)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>Pe.</i>	<i>Pectinatus</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMT	Photomultiplier
PNA	Peptide nucleic acid (Peptid-Neukelinsäure)
QUAL	Quenched Autoligating
Quen	Quenchersonde
Quick	Quenching Induced Contact Competition
R	Rückwärts
rDNS	DNS kodierend für ribosomale Ribonukleinsäure
RFU	Relative Fluorescence Unit (relative Fluoreszenz Einheit)
RING	Recognition of Individual Genes
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	single stranded, (einzelsträngig)
sp.	Spezies/ Art
spp.	Plural von sp., mehrere Spezies/ Arten
ssp.	Subspezies
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
T _a	Annealingtemperatur
T _d	Dissoziationstemperatur
TEMAC	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Abkürzungsverzeichnis

TSB	Trypton-Soja Bouillon
u	unit
U	Uracil
UBA	Umweltbundesamt
URL	Uniform Resource Locator, (einheitlicher Quellenanzeiger)
USA	Vereinigten Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
ün	über Nacht
V	Volt; Verdünnungsfaktor, Vorwärts
VBNC	viable but non-culturable
Vol.	Volumen
www	world wide web (weltweites Netz)
w/v	Masse/Volumen
WHO	World Health Organization
WP	Waschpuffer
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZO	Zielorganismus

Herstellerverzeichnis

Abkürzung	Unternehmen	Ort	Land
Aes Chemunex	AES CHEMUNEX	Bruz cedex	Frankreich
a1-Biotech	a1-Biotech GmbH	Martinsried	Deutschland
AHF	AHF Analysentechnik AG	Tübingen	Deutschland
Applied Biosystems	Applied Biosystems Inc.	Foster City	USA
bioMerieux	BioMerieux	Marcy l'Etoile	Frankreich
Biomers	Biomers.net GmbH	Ulm	Deutschland
Biosearch Technologies	Biosearch Technologies Inc.	Novato	USA
Biotek	BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall	Deutschland
Biozym	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf	Deutschland
Consort	Consort nv	Turnhout	Belgien
Döhler	Döhler Natural Foods & Beverages GmbH	Darmstadt	Deutschland
FMC	FMC Bioproducts	Rockland	USA
GE Healthcare	GE Healthcare	Chalfont St. Giles	England
Greiner	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Heraeus	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Hettich	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen	Deutschland
KNF	KNF Neuberger GmbH	Freiburg	Deutschland
Leica	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar	Deutschland
Li-Cor	LI-COR Biosciences GmbH	Bad Homburg	Deutschland
Mallinckrodt Baker	Mallinckrodt Baker	Deventer	Niederlande
Marienfeld	Paul Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen	Deutschland
Memmert	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach	Deutschland
Merck	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Millipore	Millipore GmbH	Schwalbach	Deutschland
MWG-Biotech	MWG-Biotech AG	Ebersberg	Deutschland
Nikon	Nikon	Amstelveen	Niederlande
Oxoid	Oxoid GmbH	Wesel	Deutschland
Pall	Pall GmbH	Dreieich	Deutschland
Peqlab	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen	Deutschland
Perkin Elmer	Perkin Elmer	Norwalk	USA
Plano	Plano W. Plannet GmbH	Wetzlar	Deutschland
Prior	Prior Scientific Instruments	Cambridge	England
Promega	Promega GmbH	Mannheim	Deutschland
Qiagen	Qiagen GmbH	Hilden	Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	Deutschland
Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Sartorius	Sartorius AG	Göttingen	Deutschland
Schleicher & Schuell	Schleicher & Schuell	Dassel	Deutschland
Serva	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	Deutschland
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich GmbH	München	Deutschland
System	System GmbH	Wettenberg	Deutschland
USF	USF Deutschland	Ransbach Baumbach	Deutschland
UVP	UVP	Upland	USA
VWR	VWR International GmbH	Darmstadt	Deutschland
Vygon	YVYON GmbH & Co. KG	Aachen	Deutschland
Wagner & Munz	Wagner & Munz GmbH	München	Deutschland
Whatman	Whatman GmbH	Dassel	Deutschland
Zeiss	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Göttingen	Deutschland

A. Einleitung

Carl Woese formte mit seinem Konzept „zur bakteriellen Evolution“ (Woese, 1987) eine wichtige Grundlage für das Verständnis der stammesgeschichtlichen Entwicklung (Phylogenie) von Mikroorganismen. In Kombination mit der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S- und 23S-ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNS) konnten die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse von Mikroorganismen auf Basis ihrer genotypischen Merkmale rekonstruiert werden (u. a. Woese, 1987, Hugenholtz *et al.*, 1988, Schleifer und Ludwig, 1989a, Stahl und Amann, 1991, Stackebrandt, 1992, Olsen *et al.*, 1994, Ludwig und Schleifer, 1994). Diese Vorarbeiten lieferten nicht nur eine Retrospektive auf die stammesgeschichtlichen Entwicklung, sondern sie bildeten darüber hinaus die Grundlage, um die phylogenetischen Charakteristika auch für den Nachweis von Mikroorganismen heranzuziehen.

A.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Edward DeLong und Mitarbeiter stellten vor etwa 20 Jahren die als phylogenetische Färbung bezeichnete Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) für den spezifischen Nachweis von Mikroorganismen vor (DeLong *et al.*, 1989). Die FISH-Methode basiert auf der Hybridisierung von einzelsträngigen DNS-Oligonukleotiden, die komplementär zu ihren Zielsequenzen auf der rRNS sind.

Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Oligonukleotidsonden (abgekürzt: Sonden), können spezifisch für Phyla, Gattungen und teilweise auch für Arten konstruiert werden (u. a. Stahl und Amann, 1991, Manz *et al.*, 1992 und 1996 Neef *et al.*, 1998, Daims *et al.*, 1999, O'Sullivan *et al.*, 2002). Sie gelangen durch einfache Diffusion an ihre Bindungsstelle auf der rRNS der Mikroorganismen (Amann *et al.*, 1990). Nach der Anregung mit energetisiertem Licht kann die Bindung der Sonde an das Zielmolekül als Fluoreszenzsignal an einem Epifluoreszenzmikroskop detektiert werden. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Morphologie der Zellen während des Nachweises intakt bleibt und diese direkt vor Ort (lat. *in situ*) in ihren natürlichen Habitaten lokalisiert werden können.

Bis heute wurde die FISH-Methode erfolgreich zur Aufklärung von verschiedenen Fragestellungen herangezogen. Zum Beispiel wurde im Bereich der mikrobiellen Ökologie die Zusammensetzung von mikrobiellen Populationen in einer Vielzahl

A. Einleitung

unterschiedlicher Habitate untersucht (u. a. Amann *et al.*, 1992 und 1995, Wagner *et al.*, 1993, Burgraf *et al.*, 1994, Snaidr *et al.*, 1997, Glöckner *et al.*, 1999). Des Weiteren wurden insbesondere im Abwasserbereich prozessrelevante Mikroorganismen wie z. B. Nitrifikanten oder filamentöse Bakterien identifiziert und deren relative Abundanz bestimmt (u. a. Wagner *et al.*, 1995, Mobarry *et al.*, 1996, Erhart *et al.*, 1997, Juretschko *et al.*, 1998, Schmid *et al.*, 2001 und 2003, Levantesi *et al.*, 2004). Auch in den Bereichen der Lebensmittelmikrobiologie (u. a. Beimfohr *et al.*, 1993, Thelen, 2002) sowie der medizinischen Mikrobiologie und Hygiene (u. a. Grimm *et al.*, 1998, Horn, *et al.*, 1999, Schmid *et al.*, 2003) wurde die FISH-Technik zum Nachweis von relevanten Mikroorganismen etabliert.

A.2 Optimierungen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Das grundlegende Prinzip der FISH-Technik ist über die Jahre unverändert geblieben. Um weitere Applikationsfelder zu erschließen und um das Spektrum der Auswertegeräte zu erweitern, wurde das ursprüngliche Protokoll durch verschiedene Modifikationen verändert oder durch Kombination mit anderen Methoden ergänzt. Insbesondere wurden dabei alternative Hybridisierungsformate, Optimierungen zur Zugänglichkeit der Zielzellen und der Sondenbindungsstellen sowie verschiedene Konzepte und Mechanismen zur Verstärkung des Sonden Signals etabliert.

Das ursprüngliche Protokoll der FISH-Technik ist auf einem Objektträger-basierten Assay ausgerichtet. Zur Untersuchung größerer Probenvolumina übertrugen Neef *et al.*, (1995) und Meier *et al.*, (1997) dieses Protokoll erfolgreich auf das Format der Membranfiltration. Wallner *et al.*, (1993), Fuchs *et al.*, (1998) sowie Thelen (2002) optimierten das Protokoll zur Einzelzellhybridisierung in Lösung mit anschließender durchflusszytometrischer Detektion.

Um die Penetration der Sonden in die Zielzellen zu ermöglichen bzw. zu verbessern, wurden zumeist enzymatische oder detergentbasierende Vorbehandlungen etabliert, die die Zellhülle perforieren (z. B. Beimfohr *et al.*, 1993 und 1996, Burgraf *et al.*, 1994, Pernthaler *et al.*, 2004).

Auch durch den Einsatz von ungeladenen Peptid-Nukleinsäure Sonden (PNA) kann das Passieren der Zellwand-Barriere erleichtert werden (Stender *et al.*, 1999). Im Vergleich zum negativ geladenen Zuckerphosphat-Rückgrat der Nukleinsäuren haben diese ein neutrales Polypeptid-Rückgrat. Dieses verleiht ihnen einen relativ hydrophoben Charakter und forciert die Diffusion der PNAs in die Zellen. Die

A. Einleitung

sogenannten Pseudo-Peptide weisen zusätzlich noch sehr günstige Hybridisierungseigenschaften, wie eine hohe Spezifität und Affinität zum Zielmolekül (RNS oder DNS) auf, die auch den zeitlichen Ablauf der Reaktionskinetik positiv beeinflussen (Stender *et al.*, 1999, Rigby *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2002, Sogaard *et al.*, 2005 und 2007).

Fuchs *et al.*, (2000) konnten zeigen, dass durch den Einsatz sogenannter unmarkierter Helfersonden besonders helikale Regionen der rRNS für Sonden zugänglich gemacht werden können. Die Helfersonden flankieren das 5' und 3' Ende der eigentlichen Sondenbindungsstelle und ermöglichen dadurch auch die Sondenbindung in bisher ungeeigneten Bereichen.

Eine Strategie zur Verstärkung des Sonden Signals stellt die CARD-FISH Methode (Catalysed Reported Deposition-FISH) dar. Hierbei werden die Sonden mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase markiert. Das Fluoreszenzsignal wird durch die enzymatische Radikalisierung und anschließende Präzipitierung mehrerer Fluoreszenz-markierter sekundärer Reportermoleküle (Tyramid) in der unmittelbaren Nähe der Sondenbindungsstelle verstärkt (Schönhuber *et al.*, 1997, Pernthaler *et al.*, 2002). Im Vergleich zur Standard-FISH-Technik konnte durch die gezielte Signalamplifikation ein mehr als 30 % höherer Anteil an Mikroorganismen in marinen Habitaten nachgewiesen werden (Pernthaler *et al.*, 2002).

Des Weiteren wurden alternativ zu Oligonukleotidsonden mehrfach-markierte Polynukleotidsonden zur Detektion der 16S- oder 23S-rRNS eingesetzt (u. a. Ludwig *et al.*, 1994b, Trebesius *et al.*, 1994, Stoffels *et al.*, 1999). Auch zum Nachweis anderer Zielmoleküle wie mRNA (Pernthaler *et al.*, 2004) oder einzelner chromosomaler DNS-Abschnitte (RING-FISH Methode; Recognition of Individual Genes-FISH; Zwirgmaier *et al.*, 2003, 2004 und 2005, Pratscher *et al.*, 2008) können Polynukleotidsonden verwendet werden. Die erzielte Signalamplifikation liegt im Vergleich zur Standard-FISH-Technik mit einfach-markierten Oligonukleotidsonden bei einem 10- bis 50-fach höheren Signal (Trebesius *et al.*, 1994, DeLong *et al.*, 1999).

Weitere Techniken wie die RCA-FISH-Methode (Rolling-circle Amplification-FISH) wurden alternativ zu Polynukleotidsonden zum Nachweis einzelner Gene in intakten Zellen entwickelt. Hierbei wird zur Signalverstärkung eine enzymatische Amplifikation mit einer Detektion durch Fluoreszenz-markierte DNS- oder PNA-

A. Einleitung

Oligonukleotidsonden kombiniert (Maruyama *et al.*, 2005, Smolina *et al.*, 2007 und 2008).

A.3 Fluoreszenzquenching - Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten

Die Intensität von Fluoreszenzsignalen kann auch durch das sogenannte Fluoreszenzquenching beeinflusst werden. Generell wird als Fluoreszenzquenching die Abschwächung oder die Auslöschung eines Fluoreszenzsignals bezeichnet. Quenching-Effekte können dabei ungewollt auftreten (z. B. durch eine zum Fluoreszenzfarbstoff benachbarte Base, Nazarenko *et al.*, 2002) oder gezielt durch den Einsatz eines sogenannten Quenchers (Auslöscher) herbeigeführt werden. Für eine optimale Quenchingeffizienz ist dabei eine genaue Abstimmung von Fluoreszenzfarbstoff und korrespondierendem Quencher entscheidend (Marras, 2006a).

Ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) ist ein Molekül, das Licht bei einer charakteristischen Wellenlänge (idealerweise an seinem Absorptionsmaximum) absorbiert bzw. davon energetisch angeregt wird. Dieses Licht (Photon) wird nach einer bestimmten Zeit z. B. wieder in Form von Fluoreszenz oder als Schwingungsenergie (Wärme) emittiert. Das Fluorophor kehrt dabei in den energetisch günstigeren nicht angeregten Ausgangszustand zurück.

Ein Quencher (Akzeptor) ist ein Molekül, das Energie von einem angeregten Fluorophor (Donator) absorbiert und damit die Fluoreszenzemission auslöscht.

Als Quencher können je nach verwendetem Donor, Fluorophore (z. B. TAMRA) oder nicht fluoreszente Moleküle (z. B. Dabcyl, Black-Hole-Quencher) fungieren.

Prinzipiell werden zwei Typen des Fluoreszenzquenchings unterschieden. Als dynamisches Quenching, dem sogenannten FRET-Quenching (Fluorescence Resonance Energy Transfer), bezeichnet man einen Vorgang, bei dem das angeregte Fluorophor seine Energie auf den Quencher überträgt und danach strahlungslos in den Grundzustand zurückkehrt. Donator und Akzeptor befinden sich in einem räumlichen Abstand von 40-100 Å (entspricht ca. 3 bis 30 Nukleotiden innerhalb einer dsDNS). Eine Voraussetzung für FRET-Quenching ist zudem auch, dass das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt.

Im Gegensatz dazu bildet sich beim sogenannten statischen Quenching bzw. Kontaktquenching im angeregten Zustand ein nicht-fluoreszenter Komplex zwischen

A. Einleitung

Fluorophor und Quencher. Donator und Akzeptor befinden sich beim statischen Quenching räumlich sehr nahe ($< 20 \text{ \AA}$). Die Moleküle interagieren dabei direkt durch einen Protonen-gekoppelten Elektronentransfer mittels der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (Förster, 1948, Lakowicz, 1999, Marras *et al.*, 2002, Marras, 2006a).

Silvermann und Kool (2005) stellten die sogenannten QUAL Sonden (Quenched Autoligation) für die FISH-Analyse von Bakterien vor. Das Verfahren basiert auf einer statischen Quenching-Reaktion. QUAL Sonden bestehen aus einem Paar von kurzen ssDNS-Oligonukleotiden. Die elektrophile Sonde enthält einen internen Farbstoff (zumeist FAM) und an ihrem 5' Ende einen Dabcyl-Quencher. Die nukleophile Sonde trägt an ihrem 3' Ende eine Phosphorothioat-Gruppe. Im Vorhandensein eines Zielmoleküls binden beide Sonden direkt nebeneinander. Dabei führt die nukleophile Verdrängung des Quenchers durch die Phosphorothioat-Gruppe zu einer Ligation beider Sonden und das statische Quenching des Fluorophors wird aufgehoben.

Tyagi und Kramer (1996) stellten zum ersten Mal Molecular Beacons (MB), als Sonden vor, „die nur fluoreszieren, wenn sie hybridisieren“. MBs sind ssDNS-Oligonukleotide, die eine stem-and-loop (Stamm und Ring) Struktur ausbilden. Der Ring enthält dabei eine Sequenz, die komplementär zur Zielsequenz ist. Der Stamm wird aus einer komplementären Sequenz an beiden Seiten des Rings geformt. Ein Fluorophor ist kovalent an den einen Arm des Stammes gebunden und ein Quencher an den anderen. Durch statisches Quenching ist das MB ohne Zielmolekül dunkel. DNS- und PNA-MBs wurden in ersten Versuchsreihen auch für die FISH-Analyse von Bakterien verwendet (Xi *et al.*, 2003, Marras *et al.*, 2006b, Li *et al.*, 2008).

Quenching-Methoden haben den großen Vorteil, dass die Waschschrte die bei der Standard-FISH-Technik zur Entfernung der ungebundenen Sonden benötigt werden, entfallen. Die Fluoreszenzsignale der ungebundenen Sonden werden durch das Quenching ausgelöscht.

A.4 Überblick über die zur Methodenentwicklung ausgewählten Modellorganismen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung von FISH-basierten Sonden- und Sonden-technologien zum Schnelldachweis von lebensmittelrelevanten Bakterien. Jede Technologie wurde exemplarisch für erste Modellorganismen entwickelt. Die nachfolgenden Kurzbeschreibungen geben Aufschluss über die lebensmitteltechnologische und diagnostische Relevanz der ausgewählten

A. Einleitung

Modellorganismen (*Legionella*, bierschädliche Bakterien und *Cronobacter* spp.).

A.4.1 Gattung *Legionella*

Die Gattung *Legionella* wurde im Jahr 1979 nach einem schweren Ausbruch von Lungenentzündung (sogenannte „Legionärs-Krankheit“) unter Mitgliedern der amerikanischen Fremdenlegion etabliert, die auf ein bis dato unbekanntes Bakterium (*Legionella pneumophila*) zurückgeführt werden konnte (Fraser *et al.*, 1977, Brenner *et al.*, 1979).

Legionellen werden als Gram-negative, gewöhnlich aerobe, nicht Sporen bildende, bewegliche Stäbchen (Länge: 2-5 µm, Durchmesser: 0,5-0,8 µm) klassifiziert und sind phylogenetisch der Familie *Legionellaceae* innerhalb der *Gammaproteobacteria* zugeordnet.

Der Gattung *Legionella* werden 52 Arten einschließlich 70 unterschiedlicher Serogruppen zugeordnet (Tabelle A1).

Tabelle A1: Übersicht Arten und Serogruppen der Gattung *Legionella*

Nr.	Art	Anzahl der Serogruppen	Anzahl assoziiert mit einer Erkrankung	Nr.	Art	Anzahl der Serogruppen	Anzahl assoziiert mit einer Erkrankung
01.	<i>L. pneumophila</i>	15	15	27.	<i>L. israelensis</i>	1	0
02.	<i>L. bozemanii</i>	2	2	28.	<i>L. quinlivanii</i>	2	0
03.	<i>L. dumoffii</i>	1	1	29.	<i>L. brunensis</i>	1	0
04.	<i>L. micdadei</i>	1	1	30.	<i>L. moravica</i>	1	0
05.	<i>L. longbeachae</i>	2	2	31.	<i>L. gratiana</i>	1	0
06.	<i>L. jordanis</i>	1	1	32.	<i>L. adelaidensis</i>	1	0
07.	<i>L. wadsworthii</i>	1	1	33.	<i>L. fairfieldensis</i>	1	0
08.	<i>L. hackeliae</i>	2	2	34.	<i>L. shakespearei</i>	1	0
09.	<i>L. feeleyi</i>	2	2	35.	<i>L. waltersii</i>	1	0
10.	<i>L. maceachernii</i>	1	1	36.	<i>L. genomospecies</i>	1	0
11.	<i>L. birminghamensis</i>	1	1	37.	<i>L. quateirensis</i>	1	0
12.	<i>L. cincinnatiensis</i>	1	1	38.	<i>L. worsleiensis</i>	1	0
13.	<i>L. gormanii</i>	1	1	39.	<i>L. geestiana</i>	1	0
14.	<i>L. sainthelensi</i>	2	2	40.	<i>L. natarum</i>	1	0
15.	<i>L. tucsonensis</i>	1	1	41.	<i>L. londoniensis</i>	1	0
16.	<i>L. anisa</i>	1	1	42.	<i>L. taurinensis</i>	1	0
17.	<i>L. lansingensis</i>	1	1	43.	<i>L. lytica</i>	1	0
18.	<i>L. erythra</i>	2	1	44.	<i>L. drozanskii</i>	1	0
19.	<i>L. parisiensis</i>	1	1	45.	<i>L. rowbothamii</i>	1	0
20.	<i>L. oakridgensis</i>	1	1	46.	<i>L. fallonii</i>	1	0
21.	<i>L. spiritensis</i>	1	0	47.	<i>L. gresilensis</i>	1	0
22.	<i>L. jamestowniensis</i>	1	0	48.	<i>L. beliardensis</i>	1	0
23.	<i>L. santacrucis</i>	1	0	49.	<i>L. busanensis</i>	1	k.A.
24.	<i>L. cherii</i>	1	0	50.	<i>L. drancourtii</i>	1	k.A.
25.	<i>L. steigerwaltii</i>	1	0	51.	<i>L. impletisoli</i>	1	k.A.
26.	<i>L. rubrilucens</i>	1	0	52.	<i>L. yabuuchiae</i>	1	k.A.

Legende:

modifiziert und aktualisiert nach Fields *et al.*, 2002; k.A. = keine Angabe

Legionellen sind weltweit verbreitet und bevorzugen Warmwasser (> 30°C). Sie konnten aber auch häufig in Wasser-assoziierten Habitaten wie z. B. Erdboden

A. Einleitung

(Steele, 1989) oder in Protozoen als intrazelluläre Parasiten nachgewiesen werden (Manz, *et al.*, 1995, Fields, 1996, Rigby *et al.*, 1997).

L. pneumophila ist in 90 % aller Fälle (davon in etwa 80 % durch *L. pneumophila* Serogruppe 1) als Ursache der schweren Lungenentzündung nachweisbar.

Aber auch bei anderen Legionellenarten konnte pathogenes Potenzial nachgewiesen werden (Tabelle 1). Schätzungen haben ergeben, dass in den USA jährlich 8.000 bis 18.000 Personen an einer schweren Legionellen-Infektion erkranken (Marston *et al.*, 1997). In Deutschland wird mit einer ähnlich hohen Zahl an infizierten Personen gerechnet. Die Lethalitätsrate beträgt 15-20 % (Müller, 1989). Hauptinfektionsquellen sind Warmwassersysteme (z. B. Duschen und Whirlpools), Rückkühlwerke von Klimaanlage und Aerosol-produzierende Geräte (z. B. Luftbefeuchter).

Der Standard-Nachweis für Legionellen erfolgt in Deutschland nach Empfehlung des Bundesumweltamts (siehe auch Abbildung B.3.4) und benötigt 7-10 Tage bis zum Ergebnis. Ein quantitativer Nachweis ist erforderlich, da der Maßnahmenkatalog über spezifische Schwellenwerte reguliert ist (z. B. für Hausinstallation über das DVGW-Merkblatt 551).

Ein beschleunigter und vereinfachter quantitativer Legionellen-Nachweis wäre u. a. wünschenswert um Präventions-, Desinfektionsmaßnahmen sowie die Überprüfung der Maßnahmen zur Infektionsvermeidung schneller abschließen zu können.

A.4.2 Bierschädliche Bakterien

Der Begriff bierschädliche Bakterien fußt auf einer künstlichen Zusammenstellung von Bakterien, die phylogenetisch nur entfernt miteinander verwandt sind. Jedoch besitzen alle das Potential in Bier zu wachsen und dieses dadurch optisch, sensorisch und geschmacklich zu schädigen.

Gram-positive bierschädliche Bakterien verderben Bier hauptsächlich durch die Herabsetzung des pH-Wertes aufgrund der Bildung von Milch- und Essigsäure. Zudem wurden CO₂-Bildung, Trübung aber auch gelegentliche Diacetyl-Bildung beobachtet (Back, 1994). Der Verderb durch Gram-negative bierschädliche Bakterien geht zumeist mit Trübung und der Ausbildung von Fehlgeschmack und -geruch einher. Dieses wird durch die Bildung von organischen Säuren und schwefeligen Komponenten wie H₂S verursacht (Haikara und Helander, 2002).

Nach heutigem Kenntnisstand werden hauptsächlich Gram-positive Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* (Phylum:

A. Einleitung

Firmicutes, Familie: *Lactobacillaceae*), sowie Gram-negative Vertreter der Gattungen *Pectinatus* und *Megasphaera* (Phylum: *Firmicutes*, Familie: *Veillonellaceae*) im Bier vorgefunden und somit als bierschädliche Bakterien bezeichnet (u. a. Haikara *et al.*, 1981; Engelmann und Weiss, 1985; Richards und Macrae, 1964 und Back, 1978, 1981a+b, 1994, Schleifer *et al.*, 1990 und 1995).

Lactobacillus backii (Bohak *et al.*, 2006) *Lb. collinoides* und *Lb. paracollinoides* (Suzuki *et al.*, 2004), *Lb. rossiae* (eigene Recherchen, Daten nicht publiziert) sowie *Pectinatus haikarae*, *Megasphaera paucivorans* und *M. sueciensis* (Juvonen und Suihko, 2006) wurden erst kürzlich als weitere bierschädliche Bakterien beschrieben. Tabelle A2 fasst alle bierschädlichen Bakterien zusammen.

Tabelle A2: Übersicht bierschädliche Bakterienarten

Gram-positive bierschädliche Bakterienarten	Gram-negative bierschädliche Bakterienarten
<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Pectinatus frisingensis</i>
<i>Lactobacillus brevisimilis</i>	<i>Pectinatus haikarae</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i> und <i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Megasphaera cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus casei</i> und <i>Lb. paracasei</i>	<i>Megasphaera paucivorans</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i> und <i>Lb. paracollinoides</i>	<i>Megasphaera sueciensis</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	
<i>Lactobacillus frigidus</i>	
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	
<i>Lactobacillus lindneri</i>	
<i>Lactobacillus perolens</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i> und <i>Lb. pseudopantarum</i>	
<i>Lactobacillus rossiae</i>	
<i>Pediococcus damnosus</i>	
<i>Pediococcus inopinatus</i>	

Legende:

modifiziert und aktualisiert nach Back, 1994

In der Praxis werden mehr als 90 % des Bierverderbs durch Gram-positive Bakterien verursacht (Back, 1994, Thelen *et al.*, 2004 und 2006).

Bislang erfolgte der konventionelle Nachweis durch 7- bis 9-tägige Anreicherung der Untersuchungsprobe in einem Selektivmedium und anschließender Lichtmikroskopie (Beschreibung der Methode, siehe B.3.5).

Die Nachteile dieser Methode liegen in der langen Analysedauer, welche erhebliche logistische Kosten vor allem bezogen auf die Lagerhaltung in den Brauereien verursacht. Darüber hinaus besteht bei Auslieferung von Produkten, deren mikrobiologischer Befund noch nicht einwandfrei feststeht, die Gefahr einer Rückholaktion. Diese beinhalten ein hohes Kosten- und Imagerisiko für die

A. Einleitung

Brauereien. Durch die Etablierung von molekularbiologischen Nachweisverfahren basierend auf der FISH-Technik (Thelen, 2001) oder auf der PCR-Technik (z.B. Juvonen *et al.*, 1999, Bischoff *et al.*, 2001, Haakensen *et al.*, 2008) wurde die Nachweisdauer auf zumeist 48 h Vorkultur plus Dauer der Nachweismethode reduziert.

A.4.3 *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.)

Enterobacter sakazakii wird seit 1958 als Erreger selten auftretender, aber zumeist akut verlaufender Meningitis, Bakteriämie, und nekrotisierender Enterokolitis bei Neugeborenen und Säuglingen assoziiert (Nazarowec-White und Farber, 1997, Bowen und Braden, 2006, Mullane *et al.*, 2007 und 2008). Die Infektionen sind dabei mit einer hohen Lethalitätsrate von 40-80 % verbunden.

Farmer *et al.*, (1980) beschrieben den als „gelb-pigmentierter“ *Enterobacter cloacae* bekannten, *Enterobacter sakazakii* als eigenständige Art.

Mittels DNS-DNS-Hybridisierung konnte allerdings keine eindeutige phylogenetische Zuordnung für *En. sakazakii* erzielt werden. Die Isolate wiesen 53-54 % DNS-DNS-Ähnlichkeit zu *En. cloacae* und *Citrobacter freundii* auf. Aufgrund der tendenziell größeren phänotypischen und genotypischen Ähnlichkeit zu *En. cloacae*, wurden die damaligen Isolate als *En. sakazakii* innerhalb der Gattung *Enterobacter* klassifiziert.

Kürzlich haben neue taxonomische Studien von Iversen *et al.*, (2007a) zu einer alternativen Klassifizierung von *En. sakazakii* als fünf eigenständige Arten innerhalb der neuen Gattung *Cronobacter* geführt (Tabelle A3).

Tabelle A3: Übersicht Arten der Gattung *Cronobacter*

Art bzw. Subspezies	Anzahl der zugeordneten <i>En. sakazakii</i> Isolate	Assoziiert mit neonataler Meningitis
<i>Cronobacter sakazakii</i> ssp. <i>sakazakii</i>	163	+
<i>Cronobacter sakazakii</i> ssp. <i>malonaticus</i>	22	+
<i>Cronobacter muytjensii</i>	7	o
<i>Cronobacter dublinensis</i>	8	o
<i>Cronobacter turicensis</i>	8	+
<i>Cronobacter</i> genomospecies I	2	o

Legende:

modifiziert nach Iversen *et al.*, 2007a (+ = erwiesen; o = bis dato nicht erwiesen)

Vertreter der Gattung *Cronobacter* werden als Gram-negative, gewöhnlich fakultativ anaerobe, nicht Sporen bildende, bewegliche Stäbchen (Länge: 3 µm, Durchmesser:

A. Einleitung

1 µm) klassifiziert und sind phylogenetisch der Familie *Enterobacteriaceae* innerhalb der *Gammaproteobacteria* zugeordnet.

Isolate, die mit einer neonatalen Meningitis assoziiert wurden, sind *C. sakazakii* ssp. *sakazakii*, *C. sakazakii* ssp. *malonicus* und *C. turicensis* zugeordnet worden. Einige *C. muytjensis*- und *C. dublinensis*-Stämme sind allerdings auch humanen Ursprungs und wurden aus Knochenmark oder Blut isoliert. Eine potentielle Pathogenität kann deshalb nicht ausgeschlossen werden (Iversen *et al.*, 2007a und b).

Cronobacter wurde bis dato aus einer Vielzahl von verschiedenen Lebensmitteln, im Umfeld der Lebensmittelproduktion sowie aus Umweltproben und im klinischen Bereich isoliert. Das natürliche Habitat dieser Bakterien ist bis dato allerdings noch unbekannt.

Bei einer Reihe von infantilen *Cronobacter*-Infektionen konnte pulverförmige Säuglingsnahrung als Infektionsquelle identifiziert werden. Da nach dem heutigen Stand der Produktionstechnik eine sterile Herstellung von pulverförmiger Säuglingsnahrung nicht möglich ist, besteht von Seiten der weltweiten Gesundheitsbehörden (u. a. FAO, WHO, FDA, EFSA, BGA) sowie der Säuglingsnahrungshersteller ein hohes Bestreben, die mikrobiologische Sicherheit dieser Produkte zu optimieren. Ein Aspekt dabei ist der möglichst frühzeitige Nachweis. Insbesondere da einige Hersteller mitteilten, dass zum Zeitpunkt des Rückrufes ein Großteil der mit *Cronobacter* spp. kontaminierten ausgelieferten Chargen bereits verbraucht war (Friedmann, 2008). Ein weltweit standardisiertes Verfahren und damit verbindlich fixierte Grenzwerte gibt es bis dato noch nicht. Der angestrebte Zielwert ist zumindest in Deutschland eine Nulltoleranz gegenüber *Cronobacter* in pulverisierter Säuglingsnahrung. Die etablierte ISO-Vornorm ISO/TS 22964:2006-02 zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii* behält auch nach der Re-Klassifizierung bis auf Weiteres ihre Gültigkeit (siehe auch Abbildung B.3.6).

A.6 Ziel der Arbeit

Im Gegensatz zur mikrobiellen Forschung basieren die meisten Nachweisverfahren in der Lebensmittelindustrie fast ausschließlich auf Kultivierungsmethoden. Mit diesen können nahezu alle lebensmittelrelevanten Bakterien kostengünstig und vermeintlich einfach nachgewiesen werden. Eine derartige Diagnostik beinhaltet allerdings auch erhebliche Einschränkungen für die Produktsicherheit, den Produktionsablauf und die Logistik. Die Nachteile lassen sich in einer langen Analysendauer und in einer z. T. zu ungenauen Nachweissicherheit, die in Verbindung mit einer subjektiven Auswertung steht, zusammenfassen. Abgesehen davon stehen im Moment nur wenige Möglichkeiten zur Verfügung, um einen hohen parallelen Probendurchsatzes (high-throughput) praktikabel zu realisieren.

In dieser Arbeit sollen verschiedene Nachweissysteme auf Basis der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) entwickelt werden, die für unterschiedliche Anwendungsfelder in der Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung der Lebensmittelindustrie geeignet sind. Die entwickelten Assays sollen sich dadurch auszeichnen, dass die Nachweiszeit bei entsprechender Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu konventionellen Nachweisverfahren signifikant verbessert wird. Durch die Entwicklung des statischen Quenching-Assays Quick-FISH (Quenching Induced Contact Competition-FISH) soll zusätzlich ein hoher Probendurchsatz in Kombination mit einer automatischen Auswertung realisiert werden.

Insgesamt werden drei verschiedene Technologieentwicklungen dargestellt. Es wird die Entwicklung eines Nachweises von *Legionella*-Mikrokolonien und der Direkt-nachweis von Einzelzellen auf Filtermembranen am Beispiel von bierschädlichen Bakterien angestrebt. Darüber hinaus soll die Entwicklung eines FISH-basierten Nachweises in flüssiger Phase im Mikrotiterplattenformat am Beispiel von *En. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) als high-throughput Technologie realisiert werden.

B. Material und Methoden

Für die Herstellung aller Lösungen wurde über eine Reinstwasseranlage (*PURELAB™ Plus*, USF) entsalztes und filtriertes Wasser (im folgenden $H_2O_{bidest.}$) verwendet. Die Verwendung von einfach entionisiertem Wasser (im folgendem $H_2O_{dest.}$) ist bei den jeweiligen Lösungen angegeben. Chemikalien wurden bei den Firmen Roth oder Merck (für detaillierte Herstellerangaben siehe Herstellerverzeichnis), soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität bezogen und verwendet. Verwendete Puffer und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (5075 ELV, System) sterilisiert. Abweichende Vorgehensweisen sind gesondert vermerkt.

B.1 Verwendete Mikroorganismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Organismen sind in der nachfolgenden Tabelle B.1 aufgeführt.

Tabelle B.1: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Stammbezeichnung	Herkunft
<i>Acetobacter aceti</i>	DSM 3508 ^T	
<i>Aeromonas schubertii</i>	DSM 4882 ^T	
<i>Aeromonas trota</i>	DSM 7312 ^T	
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 31 ^T	
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 7 ^T	
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	DSM 13697	
<i>Edwardsiella tarda</i>	DSM 30052	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053 ^T	
<i>Enterobacter amnigenus</i>	DSM 4486	
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054 ^T	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	DSM 9245 ^T	
<i>Enterobacter helveticus</i>	UZH 513/05	
<i>Enterobacter pulveris</i>	UZH 601/105	
<i>Enterobacter intermedius</i>	DSM 4581	
<i>Enterobacter kobei</i>	DSM 13645	
<i>Enterobacter pyrinus</i>	DSM 12410	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2758	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2759	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2760	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2762	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2763	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2766	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2786	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG 2787	

B. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle B1:

Organismus	Stammbezeichnung		Herkunft
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG	2788	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	LMG	2789	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	56	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	73	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	76	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	83	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	107	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	67	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	68	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> sp.)	VER	70	Milchpulver
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter dublinensis</i>)	UZH	237	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter muytjensii</i>)	ATCC	51329	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter turicensis</i>)	UZH	3032	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter genomospecies</i> I)	UZH	9529	
<i>Enterobacter turicensis</i>	UZH	3032	
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM	20478 ^T	
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM	20477 ^T	
<i>Enterococcus hirae</i>	DSM	20160 ^T	
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	DSM	30168 ^T	
<i>Erwinia cypripedii</i>	DSM	3873	
<i>Erwinia rubrifaciens</i>	DSM	4483 ^T	
<i>Escherichia coli</i>	DSM	30083 ^T	
<i>Gluconobacter oxydans</i>	DSM	3503 ^T	
<i>Hafnia alvei</i>	DSM	30163 ^T	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM	5175	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	DSM	30104 ^T	
<i>Kluyvera ascorbata</i>	DSM	4611 ^T	
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	DSM	4588 ^T	
<i>Lactobacillus brevis</i>	WSB	L32	Bier
<i>Lactobacillus brevisimilis</i>	WSB	L43	Bier
<i>Lactobacillus buchneri</i>	TMW	1.75	
<i>Lactobacillus casei</i>	TMW	1.14	
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>coryniformis</i>	DSM	20001 ^T	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	TMW	1187	
<i>Lactobacillus frigidus</i>	TMW	1119	
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	TMW	1.59	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DSM	20075 ^T	
<i>Lactobacillus lindneri</i>	WSB	L2	Bier
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	DSM	20006	
<i>Lactobacillus perolens</i>	TMW	1223	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW	1.64	
<i>Lactobacillus spec.</i>	WSB	00369/1	Bier
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM	20481 ^T	
<i>Legionella anisa</i>	ATCC	35290	
<i>Legionella birminghamensis</i>	ATCC	43702	

B. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle B1

Organismus	Stammbezeichnung		Herkunft
<i>Legionella bozemanii</i>	ATCC	33217	
<i>Legionella brunensis</i>	ATCC	43878	
<i>Legionella cherrii</i>	ATCC	35252	
<i>Legionella cincinnatiensis</i>	ATCC	43753	
<i>Legionella drozanskii</i>	ATCC	497990	
<i>Legionella dumoffii</i>	ATCC	33279	
<i>Legionella erythra</i>	ATCC	35303	
<i>Legionella fairfieldensis</i>	ATCC	49588	
<i>Legionella fallonii</i>	ATCC	497992	
<i>Legionella feeleeii</i>	ATCC	35072	
<i>Legionella geestiana</i>	ATCC	49504	
<i>Legionella gormanii</i>	ATCC	33297	
<i>Legionella gratiana</i>	ATCC	49413	
<i>Legionella gresilensis</i>	ATCC	700509	
<i>Legionella hackeliae</i>	ATCC	35999	
<i>Legionella israelensis</i>	ATCC	43199	
<i>Legionella jamestowniensis</i>	ATCC	35298	
<i>Legionella jordanis</i>	ATCC	33623	
<i>Legionella lansingensis</i>	ATCC	49751	
<i>Legionella londiniensis</i>	ATCC	49505	
<i>Legionella longbeachae</i>	ATCC	33462	
<i>Legionella maceachernii</i>	ATCC	35300	
<i>Legionella micdadei</i>	ATCC	33204	
<i>Legionella moravica</i>	ATCC	43877	
<i>Legionella nautarum</i>	ATCC	49506	
<i>Legionella oakridgensis</i>	ATCC	33761	
<i>Legionella parisiensis</i>	ATCC	35299	
<i>Legionella pneumophila</i>	VER	144	Trinkwasser
<i>Legionella pneumophila</i>	VER	449	Trinkwasser
<i>Legionella pneumophila</i>	VER	450	Trinkwasser
<i>Legionella pneumophila</i> ssp. <i>fraseri</i> , Sg4	ATCC	33156	
<i>Legionella pneumophila</i> ssp. <i>fraseri</i> , Sg5	ATCC	33216	
<i>Legionella pneumophila</i> ssp. <i>pascullei</i>	ATCC	33735	
<i>Legionella pneumophila</i> ssp. <i>pneumophila</i> , Sg5	ATCC	33733	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg1	ATCC	33153	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg10	ATCC	33154	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg11	ATCC	33155	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg12	ATCC	33155	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg13	ATCC	33216	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg14	ATCC	33215	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg2	ATCC	33823	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg3	ATCC	43283	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg4	ATCC	43130	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg5	ATCC	43290	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg6	ATCC	43736	

B. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle B1

Organismus	Stammbezeichnung		Herkunft
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>bellingham</i> , Sg7	ATCC	33153	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>knoxville</i> , Sg1	ATCC	33152	
<i>Legionella pneumophila</i> , ssp. <i>philadelphia</i> , Sg1	ATCC	43703	
<i>Legionella quateirensis</i>	ATCC	49507	
<i>Legionella quinlivanii</i>	ATCC	43830	
<i>Legionella rowbothamii</i>	ATCC	497991	
<i>Legionella rubrilucens</i>	ATCC	35304	
<i>Legionella sainthelensi</i>	ATCC	35248	
<i>Legionella santicrucis</i>	ATCC	35301	
<i>Legionella shakespearei</i>	ATCC	49655	
<i>Legionella spiritensis</i>	ATCC	35249	
<i>Legionella steigerwaltii</i>	ATCC	35302	
<i>Legionella taurinensis</i>	ATCC	700508	
<i>Legionella tucsonensis</i>	ATCC	49810	
<i>Legionella wadsworthii</i>	ATCC	33877	
<i>Legionella worsleiensis</i>	ATCC	49508	
<i>Leuconostoc gelidum</i>	DSM	5578 ^T	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	TMW	2.3	
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM	20462 ^T	
<i>Megasphaera elsdenii</i>	DSM	20460 ^T	
<i>Micrococcus luteus</i>	WSB	MK14-1	
<i>Pantoea agglomerans</i>	DSM	3493	
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM	20467 ^T	
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM	6306 ^T	
<i>Pediococcus damnosus</i>	WSB	SaE	Bier
<i>Pediococcus inopinatus</i>	WSB	P99	Bier
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM	50071 ^T	
<i>Selenomonas lactificex</i>	DSM	20757 ^T	
<i>Serratia marcescens</i>	DSM	4550	
<i>Shigella boydii</i>	DSM	7532 ^T	
<i>Shigella flexneri</i>	DSM	4782 ^T	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM	20617 ^T	
<i>Vibrio vulnificus</i>	DSM	11507 ^T	
<i>Weissella confusa</i>	DSM	20194 ^T	
<i>Zymophilus raffinovorans</i>	DSM	20765 ^T	

Abkürzungen:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA

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

LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien

Sg: Serogruppe

TMW: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan, Deutschland

UZH: Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Universität Zürich, Schweiz

VER: Isolat/ vermicon AG, München, Deutschland

WSB: Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Freising-Weihenstephan, Deutschland

B.2 Nährmedien

Die Nährmedien wurden in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven für 20 min bei 121 °C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Wenn nicht anderes spezifiziert enthielten feste Medien 15 g/l Agar (Roth). Hitzelabile Substanzen wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter sterilen Bedingungen zugegeben (Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße, Millipore).

B.2.1 Generelle Anreicherungsmedien

Nutrient Medium/ M1 Medium

Casein-Pepton	5,0 g
Fleischextrakt	3,0 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 7,0	

BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion)

Verwendet als dehydratisiertes Fertigmedium 37 g/l (Oxoid)

B.2.2 Nährmedien zur Anzucht von Legionellen

BCYE α -Agar mit Cystein/ BCYE +CYS Agar (Edelstein, *et al.*, 1981)

Aktivkohle	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
ACES-Puffer	10,0 g
L-Cystein	0,4 g
Eisen(III)-pyrophosphat	0,25 g
α -Ketoglutarat	1,0 g
Agar	13,0 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 6,9 \pm 0,2	

BCYE α -Agar ohne Cystein/ BCYE -CYS Agar (Edelstein, *et al.*, 1981)

Die Zusammensetzung entspricht bis auf die Komponente L-Cystein dem Medium 2.2.1. L-Cystein wird nicht zugegeben.

B. Material und Methoden

GVPC-Agar (Dennis, *et al.*, 1984)

Aktivkohle	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
ACES-Puffer	10,0 g
L-Cystein	0,4 g
Eisen(III)-pyrophosphat	0,25 g
α -Ketoglutarat	1,0 g
Glycin	3,0 g
Vancomycin-HCl	0.01 g
Polymyxin B	79.200 I.E.
Cycloheximid	80 mg
Agar	13,0 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 6,9 \pm 0,2	

M.W.Y.-Agar (Edelstein, *et al.*, 1982)

Aktivkohle	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
ACES-Puffer	10,0 g
L-Cystein	0,4 g
Eisen(III)-pyrophosphat	0,25 g
α -Ketoglutarat	1,0 g
Glycin	3,0 g
Vancomycin-HCl	1,0 mg
Polymyxin B	50.000 I.E.
Anisomycin	80 mg
Bromthymolblau	10 mg
Bromkresolpurpur	10 mg
Agar	16,0 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 6,9 \pm 0,2	

BMBA- α -Agar (Bopp *et al.*, 1981, Edelstein, *et al.*, 1981)

Aktivkohle	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
ACES-Puffer	10,0 g
L-Cystein	0,4 g
Eisen(III)-pyrophosphat	0,25 g
α -Ketoglutarat	1,0 g
Glycin	3,0 g
Cefamandol	4,0 mg
Polymyxin B	80.000 I.E.
Anisomycin	80,0 mg
Agar	16,0 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 6,9 \pm 0,2	

B. Material und Methoden

B.2.3 Nährmedien zur Anzucht von bierschädlichen Bakterien

NBB-Bouillon (NBB-B), flüssiges Fertigmedium (Döhler)

NBB-Agar (NBB-A), festes Fertigmedium (Döhler)

NBB-Konzentrat (NBB-C), flüssiges Fertigmedium (Döhler)

MRS-Medium (de Man, *et al.*, 1960)

Hefeextrakt	5,0 g
Fleischextrakt	2,5 g
Pepton aus Casein	10,0 g
Glukose	20,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Natriumacetat	5,0 g
Diammoniumhydrogencitrat	2,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,05 g
Tween 80	1 ml
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 6,5	

MRS-Medium pH 5,2

MRS-Medium, pH 5,2

(zur pH-optimierten Anzucht von *Lactobacillus lindneri* und *Pediococcus damnosus*)

B.2.4 Nährmedien zur Anzucht von *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)

Gepuffertes Peptonwasser (BPW)

Caseinpepton	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat	3,5 g
Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 7,0 ± 0,2	

TS-Medium (Trypton-Soja Medium)

Trypton	15,0 g
Sojapepton	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 7,2 ± 0,1	

B. Material und Methoden

Mossel-Anreicherungsmedium (EE-Broth), (Mossel *et al.*, 1963, 1970 und 1974)

Pepton	10,0 g
Glukose	5,0 g
Kaliumhydrogenphosphat	2,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	6,45 g
Entwässerte Rindergalle	20,0 g
Brillantgrün	0,0135 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 7,2 ± 0,2	

mLST-Medium (modifiziertes Lauryl-Sulfat-Tryptose Medium)

Tryptose	20,0 g
Laktose	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
di-Natriumphosphat	2,75 g
Kaliumphosphat	2,75 g
Natriumlaurylsulfat	0,1 g
Vancomycin	0,01 g
H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml; pH 6,8 ± 0,2	

B.3 Anzucht, Stammhaltung und Zellernte

B.3.1 Anzucht

Die Anzucht von aerob wachsenden Stämmen erfolgte entweder als Flüssigkultur mit Belüftung oder auf agarhaltigen Nährböden in Petrischalen. Mikroaerophil wachsende Stämme (z. B. Laktobazillen oder Pediokokken) wurden als Flüssigkultur ohne Belüftung oder auf festen Nährboden im Anaerobentopf unter Verwendung des GENbox microaer Systems (bioMerieux) angezogen. Anaerob wachsende Stämme (z. B. *Pectinatus* oder *Megasphaera*) wurden als Flüssigkultur ohne Belüftung oder auf festen Nährboden im Anaerobentopf unter Verwendung des GENbox anaer Systems (bioMerieux) angezogen. Unter CO₂-Atmosphäre wachsende Stämme (z. B. Legionellen) wurden auf festen Nährboden im Anaerobentopf unter Verwendung des GENbox CO₂ Systems (bioMerieux) angezogen.

B.3.2 Stammhaltung

Alle Bakterienstämme wurden bei 4°C auf festen Nährböden oder in 10 ml Flüssigkultur mehrere Monate aufbewahrt. Die Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch und mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit den jeweiligen spezifischen Sonden (s. Tabelle B.9) auf ihre Reinheit überprüft. Langfristig wurden die Stämme als Glycerinkulturen (1:1 Glycerin und Flüssigkultur) bei – 20°C und – 80°C gelagert.

B.3.3 Zellernte

Während des exponentiellen Zellwachstums (OD_{600} 0,6 – 0,8) wurden die in Flüssigkultur angezogenen Stämme in einem sterilen 2 ml ERG durch Zentrifugation geerntet (8000 rpm, 4°C, Rotina 35 R, Hettich). Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit 1 x PBS (B.8.1). Die gewaschenen Zellen wurden in $H_2O_{bidest.}$ resuspendiert oder mit $EtOH_{abs.}$ fixiert (s. B.8.1) und bei – 20°C gelagert.

B.3.4 Kultivierungsbedingungen von Trinkwasserproben (nach Empfehlung des Umweltbundesamtes)

Da es im Moment in Deutschland kein normiertes Verfahren zum Legionellennachweis gibt, wurde vom Umweltbundesamt (UBA) eine Empfehlung zum Nachweis von Legionellen in Trinkwasser und Badebeckenwasser angelehnt an die internationale Norm ISO 11731 herausgegeben (Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz, 2000). Diese Empfehlung wurde vom UBA zur Untersuchung von Trink- und Badewässern ausgesprochen, da die ISO 11731 Norm für ein sehr breites Spektrum an Untersuchungsproben ausgelegt ist und dadurch sehr viele Variationsmöglichkeiten in der Versuchsdurchführung zulässt. Durch alleinige Verwendung der ISO 11731 Norm kann deshalb nicht sichergestellt werden, dass die Methode zur Untersuchung von Trink- und Badewässern einheitlich eingesetzt wird und vergleichbare Ergebnisse erhalten werden.

Herstellung des Säurepuffers

Zur Herstellung des Säurepuffers, der zur Inaktivierung der nicht Säure toleranten Trinkwasser-spezifischen Begleitflora eingesetzt wird, werden zwei Lösungen benötigt:

- 0,2 mol/l Salzsäure (HCl) Lösung (Lösung A):
17,4 ml konz. HCl werden zu einem Liter $H_2O_{bidest.}$ gegeben.
- 0,2 mol/l Kaliumchlorid (KCl) Lösung (Lösung B):
14,9 g KCl werden in einen Liter $H_2O_{dest.}$ Gegeben.

Der Säurepuffer setzt sich aus 3,9 ml Lösung A und 25 ml Lösung B zusammen. Der pH-Wert wird durch Zugabe von einmolarer Kaliumhydroxid Lösung (KOH) auf pH

B. Material und Methoden

2,2 ± 0,2 eingestellt. Der Puffer wird bei RT im Dunklen gelagert und kann bis zu einem Monat verwendet werden.

In Abbildung B.1 sind alle wesentlichen Schritte zum Nachweis von Legionellen in Trinkwasserproben nach UBA-Empfehlung dargestellt.

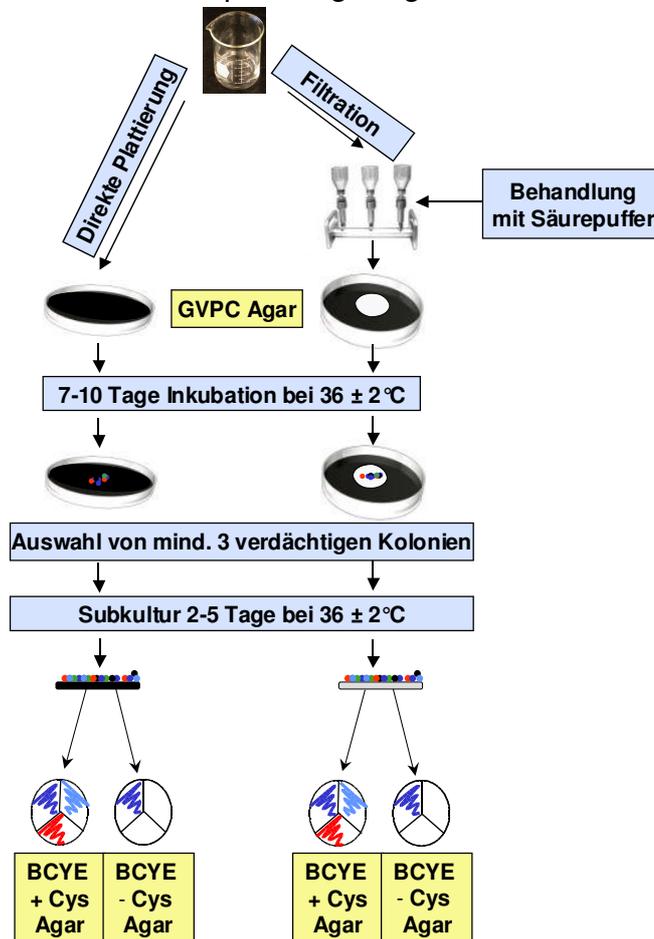


Abbildung B.1: Empfehlung des Umweltbundesamtes zum Nachweis von Legionellen

Die Trinkwasserprobe wird dabei jeweils über direkte Plattierung und über Membranfiltration untersucht. Anschließend folgen jeweils Inkubation und Subkultur.

B.3.5 Kultivierungsbedingungen von Bierproben (Back, 1994)

Um den unterschiedlichen Gegebenheiten (Nährstoffe, pH, Alkohol, Hefezusatz usw.) der verschiedenen Stufen des Brauprozesses gerecht zu werden, erfolgt die Anreicherung zum Spurennachweis für bierschädliche Bakterien probenabhängig. Spülwässer und klare Biere werden meistens membranfiltriert und der Filter wird anschließend auf NBB-A (B.2.3) bei 28 °C für 5 – 7 Tage inkubiert. Der Membranfilter kann auch alternativ 5 Tage bei 28 °C in NBB-B (B.2.3) inkubiert werden. Eine weitere Möglichkeit für die Anreicherung von Proben aus dem Filtratbereich besteht

B. Material und Methoden

in der direkten Zugabe von 5 % NBB-C (B.2.3) zur Bierprobe.

Hefehaltige Gär- und Lagerkellerproben sowie Hefeweißbier werden in 5 % NBB-C für 7-12 Tage bei 28 °C inkubiert.

Hefeprouben (Reinzucht-, Ernte- oder Betriebshefen u. Hefebodensätze) werden mit 10 % - 20 % NBB-B versetzt und 5 – 7 Tage bei 28 °C inkubiert.

Der Nachweis erfolgt durch wachstumsbedingte Trübung (NBB-C, NBB-B), Koloniebildung (NBB-A) oder durch Farbumschlag von rot nach gelb durch Säurebildung des im NBB-B Medium enthaltenen Indikatorfarbstoffes.

Die Absicherung des Befundes erfolgt durch Lichtmikroskopie. Für die Untersuchung mittels FISH-Analyse (Thelen, 2002) wurden die Bierproben mit 5 % NBB-C versetzt und für 48 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Anreicherung abzentrifugiert und mit EtOH_{abs.} fixiert (B.8.2).

B.3.6 Kultivierungsbedingungen von Milchpulverproben (nach ISO-Vornorm ISO/TS 22964:2006-02)

Da es im Moment in Deutschland kein normiertes Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Säuglingsnahrung gibt, wurde die Kultivierung der Milchpulverproben in Anlehnung an die ISO-Vornorm ISO/TS 22964:2006-02 durchgeführt (Abbildung B.2).

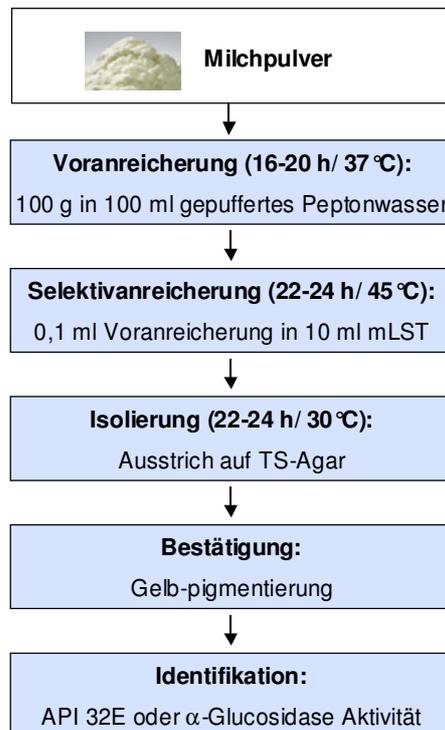


Abbildung B.2: Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung nach ISO-Vornorm ISO/TS 22964:2006-02

B.3.7 Inaktivierung von Zellen

Die Zellen wurden wie unter Punkt B.3.3 beschrieben angezogen. Die thermische Inaktivierung erfolgte mittels Autoklavierung (20 min bei 121 °C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck) sowie Inkubation (20 min bei 68 °C) im Heizblock. Die chemische Inaktivierung erfolgte mittels Natriumhypochlorit-Lösung (Endkonzentration: 6 mg/l , Inkubationsbedingung: 30 min bei RT). Die Effizienz der Inaktivierung wurde über Plattierung geprüft.

B.4 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung hochmolekularer DNS erfolgte mit dem Reagenziensystem „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers.

B.5 Quantitative und qualitative Untersuchung von Nukleinsäurelösungen

B.5.1 Quantitative, photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur quantitativen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen (nach Clark und Swika, 1977) wurde ein Aliquot der Nukleinsäurelösung in einem Spektralphotometer (Perkin Elmer) bei 260 nm vermessen. Folgende Näherungswerte (Cryer *et al.*, 1975) wurden zur Konzentrationsberechnung von hochmolekularen Nukleinsäuren zugrunde gelegt:

doppelsträngige (ds) DNS:	1 OD _{260nm} entspricht ~ 50 µg/ml
einzelsträngige (ss) RNS	1 OD _{260nm} entspricht ~ 37 µg/ml
einzelsträngige (ss) DNS	1 OD _{260nm} entspricht ~ 20 µg/ml

Für die Berechnung der Konzentration von einzelsträngigen DNS-Oligonukleotiden ist die Ermittlung des Oligonukleotid-spezifischen Extinktionskoeffizienten notwendig. Er ist abhängig von der Basenzusammensetzung und der Länge des Oligonukleotids.

B. Material und Methoden

Tabelle B.2: Basenspezifische physikalische Daten

Base	Extinktionskoeffizient ($\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^2$)	Molekulargewicht (g mol^{-1})
A	15,0	313,2
C	7,4	289,2
G	13,5	329,2
T	8,8	304,2
N	-	308,9

Der Oligonukleotid-spezifische Extinktionskoeffizient e_{oligo} errechnet sich aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen des Oligonukleotids. Die molare Konzentration c [mol ml^{-1}] des Oligonukleotids lässt sich mit folgender Gleichung bestimmen:

$$\frac{V_{\text{Meß}} \times \text{OD}_{260\text{nm}}}{V_{\text{Probe}} \times e_{\text{oligo}} \times d} = c$$

$V_{\text{Meß}}$: Meßvolumen
 V_{Probe} : Probenvolumen
 d : Schichtdicke in cm

Verunreinigungen von Nucleinsäuren können durch Bestimmen der Extinktionen (E) bei 230 nm und 280 nm und Bildung der Quotienten $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ und $E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}}$ nachgewiesen werden. Die Sollwerte sind:

$$E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}} > 1,8 \text{ bzw. } E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}} > 2,2$$

Um die Anzahl an einzelnen Nucleinsäuren in einer Nucleinsäurelösung abzuschätzen, wird die Anzahl der Genomäquivalente [GE] in dieser Lösung berechnet. Das Gewicht eines Genomäquivalents einer Nucleinsäurelösung errechnet sich aus dem ungefähren Molekulargewicht [g/mol] der Nucleinsäure (Anzahl der Basen \times Molekulargewicht der Base N (308,9 g/mol) geteilt durch die Avogadrokonstante ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

1 μg einer 1000 bp-langen DNS-Nucleinsäure entspricht in etwa $9,1 \times 10^{11}$ Molekülen bzw. GE. Unter Berücksichtigung der bei 260 nm photometrisch bestimmten Konzentration der Nucleinsäurelösung kann die Anzahl an Genomäquivalente in dieser Lösung abgeschätzt werden.

B.5.2 Qualitative Analyse von Nukleinsäurelösungen mittels Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse der einzelnen Nukleinsäurepräparationen wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Elektrophoreseapparatur: R.A.G.E™ System, RGX-60, a1-Biotech; Spannungsquelle: Consort E844, Consort).

Lösungen:

- TAE-Puffer (100 x konzentriert):
 - 4 M Tris-Base
 - 1 M Na-Acetat
 - 0,1 M EDTA
 - pH 8,0 mit Eisessig einstellen
- Laufpuffer und Puffer für die Gelbereitung: 1 x TAE-Puffer
- Auftragspuffer:
 - 50 mM EDTA, 25 % (w/v) Ficoll 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (w/v) Xylencyanol
- Agarosegel:
 - 1 % Agarose (BMA Seakem®GTG®, Biozym) in 1 x TAE-Puffer aufschmelzen
- Längenstandard: 120 bp - 8,5 kbp DNS-Leiter (KBL) (Peqlab)
- Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml H₂O_{dest.}

Elektrophorese:

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt bei einer Stromstärke von etwa 130 mA (maximal 160 mA) und bei maximal 150 V Spannung ca. 30-60 min.

Färben:

Das Gel in eine Färbewanne mit 500 ml H₂O_{dest.} und 50 µl Ethidiumbromid-Stammlösung färben. Nach 20-30 minütigem Färben wurde das Gel in eine Wanne mit H₂O_{dest.} überführt und für ca. 10 min gewässert.

Dokumentation:

Videodokumentationssystem (UVP, Gel Dokumentation System, UVP) unter UV Durchstrahlung (302 nm, Transilluminator und Mini Darkroom, UVP).

B. Material und Methoden

Abschätzen der Menge und Größe von DNS-Molekülen:

Die Bestimmung der Konzentration von DNS-Lösungen (kleine Mengen) und der Größe von linearisierten DNS-Fragmenten erfolgte durch visuellen Vergleich der Banden mit einem mitgeführten DNS-Längenstandard bekannter Menge. Die Konzentrationen und Größen der entsprechenden Fragmente sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

B.6 *In vitro*-Amplifizierung von DNS mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Vervielfältigung von DNS-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt (Saiki *et al.*, 1988).

B.6.1 Verwendete Primer

Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit als Primer in der *in vitro*-Amplifikation mittels PCR verwendet. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech und Biomers bezogen.

Tabelle B 3: Verwendete PCR-Primer

Primer	Orientierung ¹⁾	rRNS	T _a ²⁾	5'-Sequenz-3'	Position ³⁾
616	V	16S	56 °C	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	8-25
630	R	16S	50 °C	CAK AAA GGA GGT GAT CC	1529-1545
118	R	23S	44 °C	GTT BCC CCA TTC GG	115-128

Abkürzungen:

¹⁾ Orientierung: V: Vorwärts, an den Plus-Strang bindend; R: Rückwärts, an den Minus-Strang bindend

²⁾ T_a: Annealingtemperatur

³⁾ Position: Position bezogen auf die *E. coli*-Sequenz (Brosius *et al.*, 1981)

Basensymbole (IUB/UWGCG; Nomenclatur Committee, 1985)

M = A und C V = A und C und G R = A und G H = A und C und T

W = A und T D = A und G und T S = C und G B = C und G und T

Y = C und T N = A und C und G und T K = G und T

Lösungen:

- Taq-Polymerase (Promega): 5 U/μl
- 10-fach Reaktionspuffer (Promega)
- 10-fach MgCl₂ (Promega)
- Nukleotidmix (Peqlab): je Nukleotid 2,5 mM/μl
- Leichtes Mineralöl (Sigma-Aldrich)
- H₂O_{bidest.}

B. Material und Methoden

B.6.2 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der Amplifikation wurde ein programmierbarer Thermoblock (Primus 96 *plus*, MWG-Biotech) verwendet. Zu jedem Amplifikationsexperiment wurden Kontaminations-Kontrollen ohne jede Zugabe von DNS mitgeführt.

Standardreaktionsansatz:

10-fach Reaktionspuffer	5 μ l
10-fach MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
Nukleotidmix (10 mM)	1,5 μ l
Vorwärtsprimer (50 mM)	0,5 μ l
Rückwärtsprimer (50 mM)	0,5 μ l
Taq-Polymerase	0,5 μ l
DNS (0,1 ng – 1 μ g)	x μ l
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 μ l

Programm des Thermocyclers Primus 96 *plus*:

Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	1	95	10
Denaturierung	35	95	1
Annealing		T _a	1,5
Elongation		72	3
Finale Elongation	1	72	10

Die optimalen Annealingtemperaturen T_a der verwendeten Primer sind in Tabelle B.3 angegeben.

B.6.3 Reinigung und Konzentrierung von PCR-Amplifikaten

Die Reinigung und Konzentrierung der erhaltenen PCR-Amplifikate erfolgte über das Reagenziensystem „PCR-Purification Kit“ (Qiagen), nach Angaben des Herstellers.

B.7 Sequenzanalyse mittels Li-Cor DNS-Sequencer

Die Sequenzanalyse von DNS-Fragmenten wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

B. Material und Methoden

B.7.1 Sequenzierprimer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sequenzierprimer sind am 5'-Terminus mit dem Infrarotfarbstoff IRD800 (MWG-Biotech) gekoppelt. Die Detektion des Infrarotfarbstoffes erfolgte mit Hilfe eines Infrarot-Laserdetektors.

Tabelle B.4: Primer für die Sequenzanalyse

Primer	Orientierung ¹⁾	rRNS	T _a ²⁾	5'-Sequenz-3'	Position ³⁾
609	R	16S	46 °C	ACT ACY AGG GTA TCT AA	785-802
630	R	16S	54 °C	AAG GAG GTG ATC CAR CC	1525-1542

Abkürzungen:

¹⁾ Orientierung: V: Vorwärts, an den Plus-Strang bindend; R: Rückwärts, an den Minus-Strang bindend

²⁾ T_a: Annealingtemperatur

³⁾ Position: Position bezogen auf die *E. coli*-Sequenz (Brosius *et al.*, 1981)

Basensymbole (IUB/UWGCG; Nomenclatur Committee, 1985)

M = A und C V = A und C und G R = A und G H = A und C und T

W = A und T D = A und G und T S = C und G B = C und G und T

Y = C und T N = A und C und G und T K = G und T

B.7.2 Standardreaktionsansatz und Amplifikationsbedingungen

Lösungen und Materialien:

- Infrarot-markierte Primer (Farbstoff: IRD800, MWG-Biotech)
- 96-well Mikrotiterplatte (Biozym)
- Terminationsmix, 7-deaza-dGTP Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare)
- Auftrags- und Stop-Puffer:

Formamid	47,5 ml
EDTA (Natriumsalz)	20 mM
Bromphenolblau	250 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml

Tabelle B.5: Standardreaktionsansatz

Komponente	Menge
Gereinigtes PCR-Produkt	5 – 10 µl
Primer	5 µl (2,5 pmol)
H ₂ O _{bidest.}	ad 25 µl

Jeweils 6 µl dieses Standardreaktionsansatzes wurden auf die, bereits in einer Mikrotiterplatte vorgelegten, 2 µl des jeweiligen Terminationsmixes pipettiert.

B. Material und Methoden

Die Mikrotiterplatte wurde mit einer hitzestabilen Folie (Microseal „A“ Film, Biozym) versiegelt und im Primus 96 *plus* Thermocycler (MWG-Biotech) amplifiziert.

Die optimalen Annealingtemperaturen T_a der verwendeten Primer sind in Tabelle B.4 angegeben.

Amplifikationsbedingungen:

Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	1	94	3
Denaturierung		94	0,5
Annealing	25	45	0,5
Finale Elongation	1	68	10

Im Anschluß an das Amplifikationsprogramm wurden die Sequenzierreaktionen durch Zugabe von 2,5 µl Stop-Puffer terminiert. Die Proben wurden bis zum Auftragen auf das Sequenzgel auf Eis gekühlt. Jeweils 2 µl wurden anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

B.7.3 Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion

Die Sequenzanalyse wurde mit einem LiCor 4200S-1A Global IR² DNA Analyzer System (MWG - Biotech) gemäß der Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Lösungen:

- 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, APS
- Harnstoff, ultrarein (Sigma-Aldrich)
- Acrylamidstammlösung, Long Ranger™ Gel Solution (FMC)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Mallinckrodt Baker)
- N, N, N', N'-Tetraethylenmethyldiamin, TEMED
- γ- Methacryloxypropyltrimethoxysilan (Sigma-Aldrich)
- Silan-Lösung:
 - 0,5 % γ- Methacryloxypropyltrimethoxysilan in 96 % Ethanol

B. Material und Methoden

- 10 x TBE-Puffer:

Tris	162 g	(1340 mM)
Borsäure	27,5 g	(450 mM)
EDTA	9,3 g	(25 mM)
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml /pH 8,3 – 8,7	

Standardansatz für das Polyacrylamidgel:

Harnstoff	21 g
H ₂ O _{bidest.}	32 ml
Long Ranger Gel Solution	4,3 ml
10 x TBE	5 ml
10 % APS	350 µl
TEMED	50 µl

Elektrophorese:

Für die Elektrophorese 0,8 x TBE Laufpuffer verwendet. Alle weiteren Daten des Gellaufs sind in Tabelle B.6 enthalten. Die computerunterstützte Detektion und Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm e-Seq 1.1 (MWG - Biotech).

Tabelle B.6: Spezifikationen der Polyacrylamidgelelektrophorese

Geltyp	4,3 % Long Ranger
Schichtdicke des Gels	0,25 cm
Gelhöhe	66 cm
Elektrophoresepuffer	0,8 x TBE
Vorlauf	2000 V, 37 mA, 50 W , 30 min
Elektrophorese	2000 V, 37 mA, 50 W, 12 h

B.7.4 Auswertung der Sequenzdaten

B.7.4.1 Alignment der DNS-Sequenzen

Das Alignment der Sequenzdaten wurde im ARB – Silva Programmpaket (Strunk *et al.*, 1993, Ludwig *et al.*, 2004, Pruesse *et al.*, 2007) durchgeführt. Dieses Programm ist aus verschiedenen Komponenten aufgebaut und ermöglicht die phylogenetische Analyse von Bakterien anhand evolutionärer Basengleichheiten an bestimmten Alignmentpositionen.

B. Material und Methoden

Dabei wurden die 16S-rDNS Sequenzdaten mittels des in ARB implementierten Autoalignmentprogramms „Fast-Aligner“ mit vorhandenen Sequenzen der Referenzdatenbank (ARB Silva, Version: SSU-Ref_94_SILVA_04_04_08) unter Berücksichtigung von homologen Sequenzbereichen verglichen. Zur manuellen Kontrolle dieses automatisierten Vorgangs wurden die Sequenzen anhand der 16S-rDNS nah verwandter Spezies, dem allgemeinen Alignment und den Sekundärstrukturdaten der 16S-rDNS überprüft.

B.7.4.2 Rekonstruktion von Stammbäumen

Die Ermittlung der Sequenzähnlichkeiten und die dazu benötigten phylogenetischen Distanzwerte (Jukes und Cantor, 1969) wurden mit Hilfe der entsprechenden Programmkomponente des ARB-Silva Paketes erstellt.

Die für die vergleichende 16S-rDNS Sequenzanalyse berechneten phylogenetischen Bäume wurden, wie folgt beschrieben, erstellt. Die Identität der Klonsequenzen wurde mit Hilfe der vergleichenden 16S-rDNS Sequenzanalyse bestimmt. Die Topologie des Konsensusbaumes wurde über eine Maximum-Likelihood Analyse evaluiert (Ludwig *et al.*, 1994 und 1995, Stackebrandt *et al.*, 1999, Woese *et al.*, 1987 und 1990).

Der Messbalken entspricht 0,1 erwarteten Veränderungen (Austauschen) pro Nukleotid. Alle berechneten Bäume wurden mit einer Wurzel versehen, die im Baum als „outgroup“ bezeichnet wurde.

B.7.4.3 Konstruktion von 16S-rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Die Konstruktion von spezifischen Oligonukleotidsonden, Helfersonden und Quenchersonden wurde mit Hilfe der entsprechenden Programmkomponente „Probe Design“ des ARB-Silva Paketes durchgeführt. Die Spezifität der konstruierten Oligonukleotidsonden wurde durch die Programmkomponente „Probe Match“ überprüft. Die entworfenen Sonden wurden dabei, je nach Bindungsstelle und Erwartung der Spezifität, auf eine Länge zwischen 18 und 22 Basen eingestellt.

Helfer-Oligonukleotidsonden

Helfer-Oligonukleotidsonden wurden nach Fuchs *et al.* (2000) konstruiert. Die unmarkierten Helfer-Oligonukleotidsonden waren zwischen 19 und 22 Basen lang und flankierten die Sondenbindungsregion der (mit einem Fluoreszenzfarbstoff)

B. Material und Methoden

markierten Oligonukleotidsonde am 5'- und 3'-Ende und hatten jeweils eine Base Abstand zu dieser.

Quenchersonden (Quencher)

Als Quenchersonden werden in dieser Arbeit Oligonukleotidsonden bezeichnet, deren Sequenzen revers und komplementär zu einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Oligonukleotidsonde sind und die am 5'- oder 3'-Ende mit einem Quenching-Farbstoff (Tabelle B.7) markiert sind.

Tabelle B.7: Übersicht verwendete Quenching-Farbstoffe

Quenching-Farbstoff	Absorption max. [nm]	Emission max. [nm]
Dabcyl	~ 460	--
BHQ-1	534	--
TAMRA	546	576
BHQ-2	579	--

Abkürzungen:

(BHQ-1 = Black Hole Quencher 1 (Formel: C₃₀H₃₁N₇O₇); BHQ-2: Black Hole Quencher 2 (Formel: C₂₉H₂₉N₇O₈), Dabcyl: 4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl] azo]-benzoesäure)

Die optimalen Kombinationen aus Fluoreszenzfarbstoff und korrespondierendem Quenchingfarbstoff, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in nachfolgender Tabelle B.8 zusammengefasst.

Tabelle B.8: Optimale Kombinationen Fluoreszenz- und Quenching-Farbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Korrespondierende Quenching-Farbstoffe
FAM	Dabcyl, BHQ-1, TAMRA
TAMRA	BHQ-2
CY3	BHQ-2

Die Quenchersonden wurden von der Firma Biomers bezogen.

B.8 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen

B.8.1 Zellfixierungen

B.8.1.1 Ethanol-Zellfixierungen

Lösungen:

- Phosphat-Puffer-Stammlösung (NaXPO₄) (PBS-Stammlösung)
200 mM NaH₂PO₄
200 mM Na₂HPO₄
pH 7,2-7,4
- 1 x PBS-Lösung
130 mM NaCl
10 mM Na_xPO₄ (PBS-Stammlösung)
pH 7,2-7,4
- EtOH_{abs.}

Durchführung:

Die Zellsuspension wurde 5 min zentrifugiert (8000 x g, 4°C, Rotina 35 R, Hettich), der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden danach mit 1 x PBS-Lösung gewaschen (5 min; 8000 x g, 4°C). Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 x PBS-Lösung (je nach Zellvolumen) aufgenommen, mit 1 Vol. eiskalten EtOH_{abs.} versetzt und bei -20°C gelagert.

B.8.1.2 Formaldehyd-Zellfixierung

Lösungen:

- 37 %-ige Formaldehydlösung (
- 1 x PBS-Lösung (B.8.1.1)
- EtOH_{abs.}

Durchführung:

Drei Teile 4 %-ige Formaldehydlösung wurden mit einem Teil Zellsuspension vermischt und mindestens 1 h 30 min bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde 5 min zentrifugiert (8000 x g, 4°C, Rotina 35 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D), der Überstand wurde verworfen und die fixierten Zellen wurden danach mit 1 x PBS-

B. Material und Methoden

Lösung gewaschen (5 min; 8000 x g, 4°C). Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 x PBS-Lösung aufgenommen, mit 1 Vol. eiskalten EtOHabs. versetzt und bei -20°C gelagert.

B.8.2 Verwendete Oligonukleotidsonden

Folgende fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit als Sonden für die *in situ* Hybridisierung verwendet. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech und Biomers bezogen und mit den Fluoreszenzfarbstoffen CY3, TAMRA und 6`FAM markiert.

Tabelle B.9: Auflistung aller verwendeten und bereits entwickelten Oligonukleotidsonden

Sonde ¹⁾	Spezifität	(5´->3´) Sequenz	Ziel-molekül	[%] FA ²⁾	Quelle
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCT GCC TCC CTA GGA GT	16 S	0 - 45	Manz <i>et al.</i> , 1992
NonEub338	Nonsense; Sequenz komplementär zur EUB338	ACT CCT ACG GGA GGC AGC		0	Amann <i>et al.</i> , 1990
LGCa354	Gruppe innerhalb der grampositiven Bakterien mit niedrigen DNS G+C-Gehalt	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	16 S	20	Meier, 1997
Pela761	diverse Milchsäurebakterien	GCT ACC CAY GCT TTC GAG	16 S	35	vermicon AG, 2000*
Lbbr465	<i>Lactobacillus brevis</i>	ACC GTC AAC CCT TGA ACA GT	16 S	35	vermicon AG, 2000*
Lbbr465+2	<i>Lactobacillus brevis</i>	ACC GTC AAC CCT TGA ACA GTT A	16 S	35	Verlängerte Variante von Lbbr465
Leg705	Gattung <i>Legionella</i>	CTG GTG TTC CTT CCG ATC	16 S	20	Manz <i>et al.</i> , 1995
Legpne1	<i>Legionella pneumophila</i>	ATC TGA CCG TCC CAG GTT	16 S	25	Grimm <i>et al.</i> , 1998
Esak997	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG	16 S	35	vermicon AG, 2004*
Esak997C2	Kompetitor Esak997	CAT CTC TGC AGG CTT CTC TGG A	16 S	35	vermicon AG, 2004*

Abkürzungen:

* Sondensequenzen sind patentrechtliches Eigentum der vermicon AG, München, D

¹⁾ Nummer nach dem Sonden-Namen gibt die Position des Sondenbeginns auf dem Zielmolekül an: Position bezogen auf die *E. coli*-Sequenz (Brosius *et al.*, 1981)

²⁾ [%] FA = Formamidkonzentration bei der *in situ* Hybridisierung

Basensymbole (IUB/UWGCG; Nomenclatur Committee, 1985):

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

B.8.3 Hybridisierung auf dem Objektträger

Materialien:

- Epoxydharz beschichtete Objektträger (Marienfeld)
- Probengefäß (Greiner)
- Deionisiertes Formamid (Merck)
- 5 M NaCl
- 1 M Tris/HCl pH 8,0
- 0,5 M EDTA pH 8,0
- 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lösung)
- Lysozym (Serva), gelöst in H₂O_{reinst}

Hybridisierungspuffer:

Substanz	Menge
5 M NaCl	360 µl
1 M Tris/HCl pH 8,0	40 µl
Formamid	x µl
10 % (w/v) SDS	2 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 2 ml

Der Hybridisierungspuffer wurde je nach benötigter Stringenz durch Zugabe verschiedener Mengen an Formamid modifiziert. Die Dissoziationstemperatur der Oligonukleotide (Länge zwischen 10 und 50 Nukleotiden) wurde mit folgender Formel berechnet (modifiziert nach Lathe, 1985 und Wahl *et al.*, 1987):

$$T_d = 81,5 + 16,6 \log M + 0,4 [\%G + C] - 820/n - 0,5 (\% \text{Formamid})$$

M	Konzentration an monovalenten Kationen
n	Länge des Nukleotids
T_d	Dissoziationstemperatur [°C]
%G+C	Anteil Guanin und Cytosin an den Gesamtbasen

Waschpuffer:

Substanz	Menge
5 M NaCl	x µl
1 M Tris/HCl pH 8,0	1 ml
0,5 M EDTA	500 µl
10 % (w/v) SDS	50 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml

B. Material und Methoden

Um große Abfallmengen an Formamid zu vermeiden, wurde die Stringenz im Waschpuffer mit NaCl eingestellt. Da bei geringen NaCl-Konzentrationen (ab 20 % Formamid im Hybridisierungspuffer) bereits Spuren von zweiwertigen Kationen die Stringenz durch ihre Hybridstabilisierung beeinflussen können, wurde die Zugabe von (bis zu) 5 mM EDTA im Waschpuffer notwendig. Die NaCl-Konzentration (s. Tabelle B.10) errechnete sich aus folgender Formel:

$$0,5 \times (\text{Prozent Formamid}) = -16,6 \log [\text{Na}^+]$$

Tabelle B.10: NaCl-Konzentrationen im Waschpuffer für Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden

% Formamid	[NaCl] in mol	µl 5M NaCl auf 50 ml	0,5 M EDTA [µl]
0	0,900	9000	--
5	0,636	6300	--
10	0,450	4500	--
15	0,318	3180	--
20	0,225	2150	500
25	0,159	1490	500
30	0,112	1020	500
35	0,080	700	500
40	0,056	460	500
45	0,040	300	500
50	0,028	180	500
55	0,020	100	500
60	0,014	40	500
65	0,010	--	500
70	0,007	--	350
75	0,005	--	250
80	0,0035	--	175

Durchführung:

Auf die Aussparungen des Objektträgers wurden 1-10 µl Zellen aufgebracht, 10 bis 15 Minuten bei 46°C im Hybridisierungsofen (Mettler) getrocknet und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 min in 50 %, 80 % und 96 %-igem EtOH) dehydratisiert.

Zur Analyse von Gram-positiven Zellen wurden folgende Schritte optional durchgeführt. Um die Zellhülle Gram-positiver Bakterien für das Eintreten der Gensonden zu permeabilisieren, wurde auf jedes Feld des luftgetrockneten Objektträgers 10 µl Lysozym (Konzentration 1 mg/ml) pipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Enzymbehandlung wurde der Objektträger sorgfältig mit H₂O_{dest.} gespült und in 96 % Ethanol dehydratisiert. Nach anschließendem Lufttrocknen

B. Material und Methoden

wurde auf jedes Feld 9 µl Hybridisierungspuffer und je 1 µl fluoreszenzmarkierter Sonde (Konzentration 50 ng/µl) pipettiert und vorsichtig vermischt. Der Objektträger wurde in ein 50 ml Probengefäß, in dem ein mit 2 ml Hybridisierungspuffer benetztes Stück Zellstoff ausgelegt wurde, überführt. Das Hybridisierungsröhrchen wurde sorgfältig verschlossen und in horizontaler Lage 1,5 Stunden bei 46°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Danach wurde der Objektträger kurz mit 1 ml bereits auf 48°C vorgewärmten Waschpuffer gespült und in dem mit Waschpuffer gefüllten 50 ml-Probengefäß für 15 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Objektträger sorgfältig mit H₂O_{dest.} gespült und in senkrechter Lage im Dunklen getrocknet.

B.8.4 Hybridisierung auf Polycarbonatfiltern

Materialien:

Anstelle von beschichteten Objektträgern wurden hier weiße Polycarbonatfilter mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Porengröße von 0,2 µm verwendet (PC 20, Schleicher & Schuell).

Die Vakuumfiltrationseinheit (GV 025/2, Schleicher & Schuell) besteht aus Filteraufsatz (60 ml), Glasfritte für Filter mit Ø 25 mm (Filterfläche 3,1 cm²); Filterhalter, 250 ml Saugflasche und einer Vakuumpumpe (Laboport[®]-Membran-Vakuumpumpe, KNF).

Alternativ zur Vakuumfiltrationseinheit GV 025/2 wurde auch bei hoher Probenzahl, eine Dreifachfiltrationsleiste (Pall) mit autoklavierbaren Plastikaufsätzen (Fassungsvermögen: 50 ml, VWR) verwendet.

Die Zusammensetzungen des Hybridisierungs- und Waschpuffers für die Hybridisierung von Polycarbonatfiltern entsprachen den unter Punkt B.8.2 beschriebenen Lösungen.

B.8.4.1 Einzelzell-Filterhybridisierung (modifiziert nach Neef *et al.* 1995)

Das nachfolgende Protokoll wurde von Neef *et al.*, 1995 zum quantitativen Nachweis von mikrobiellen Einzelzellen in Aerosolen entwickelt. Es bildet die Grundlage der Protokollentwicklung zum quantitativen Direktnachweis von bierschädlichen Bakterien in Bierproben.

B. Material und Methoden

Durchführung:

Der Polycarbonatfilter wurde mit der glänzenden Seite nach oben auf das Lochsieb des Filtrationsturms gelegt. Der Zusammenbau der Filtrationseinheit erfolgte unter sterilen Bedingungen nach Herstelleranweisung (Einzelteile des Filtrationsturms wurden mit 70 % Ethanol abgeflammt). Bei sehr kleinen Probenvolumina ($< 100 \mu\text{l}$) wurde 1 ml steriles $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ in die Filtrationseinheit vorgelegt, bevor die Probe zugegeben wurde. Bei größeren Probenvolumina wurde die Probe direkt in die Filtrationseinheit überführt. Durch das Anlegen eines Vakuums (5 min) wurde die Probe auf den Membranfilter filtriert. Zur Zellfixierung wurde der Filter bei abgeschaltetem Vakuum mit 4 ml eiskaltem $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$ überschichtet und für 5 min bei RT inkubiert. Die Fixierungslösung wurde anschließend durch erneutes Anlegen eines Vakuums entfernt. Der Filter wurde mit einer sterilen Pinzette auf einen Glasobjektträger überführt und an der Luft getrocknet.

Zur Analyse von Gram-positiven Zellen wurden folgende Schritte optional durchgeführt. Um die Zellhülle Gram-positiver Bakterien für das Eintreten der Gensonden zu permeabilisieren, wurde auf den getrockneten Filter 40 μl Lysozym (Konzentration 1 mg/ml) aufgebracht und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Enzymbehandlung wurde der Filter vorsichtig in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült und in 96 % Ethanol dehydratisiert.

Auf die Filterfläche wurde ein Mastermix, bestehend aus 18 μl Hybridisierungspuffer und je 2 μl fluoreszenzmarkierter Sonde (Konzentration 50 ng/ μl), pipettiert. Der Objektträger wurde in ein 50 ml Probengefäß, in dem ein mit 2 ml Hybridisierungspuffer benetztes Stück Zellstoff ausgelegt wurde, überführt. Das Hybridisierungsröhrchen wurde sorgfältig verschlossen und in horizontaler Lage 1,5 Stunden bei 46 °C im Hybridisierungssofen (Mettler) inkubiert. Danach wurde der Filter in einem mit Waschpuffer gefüllten 50 ml-Probengefäß für 5 Minuten bei 48 °C gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Filter kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und in $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$ gespült und auf Whatman-Filterpapier im Dunklen getrocknet.

Die Filtermembranen wurden anschließend mit DAPI (4'-6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, Konzentration: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich) gegengefärbt.

Zur Erstellung einer Negativkontrolle wurde oben aufgeführte Prozedur ohne Zellsuspension durchgeführt.

B. Material und Methoden

Mikroskopische Auswertung:

Der Polycarbonatfilter wurde in einem Tropfen Citifluor AF1 (Plano) eingebettet und unter UV-Anregung bei 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zähllokulars (10x10 Einheiten, Fläche 14400 μm^2 bei 1000x) an einem Epifluoreszenzmikroskop (Filter 01, Axioplan 2 imaging, Zeiss) ausgezählt. Um eine statistisch vertretbare Aussage zu erhalten, wurden mindestens 20 Felder ausgezählt.

Die Gesamtzellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl/ml} = \frac{\text{Gesamtzahl an gezählten Zellen in der Probe} - \text{Zellzahl Negativkontrolle}}{\text{Zahl der ausgezählten Felder}} \times M \times V$$

$$M = \text{Mikroskopfaktor} = \frac{\text{effektive Filterfläche}}{\text{Fläche des Gitternetzes}} \quad M \text{ ist vom verwendeten Zähllokular abhängig}$$

V=Verdünnungsfaktor der Probe

Abbildung B.3: Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl

B.8.4.2 Mikrokolonie-Filterhybridisierung (nach Meier *et al.* 1997)

Das nachfolgende Protokoll wurde von Meier *et al.*, 1997 zum quantitativen Nachweis von Enterokokken-Mikrokolonien (als Hygienmonitoring von Trinkwasserproben) entwickelt. Es bildete die Grundlage der Protokollentwicklung zum quantitativen Nachweis von *Legionella*-Mikrokolonien in Trinkwasserproben.

Durchführung:

Die Membranfiltration der Probe wurde, wie unter B.4.1 beschrieben, durchgeführt. Danach werden die Polycarbonatfilter auf selektiven oder nicht selektiven Medien für 4-20 h inkubiert, um Mikrokolonien auszubilden.

Nach der Inkubation wurden die Mikrokolonien mit EtOH_{abs.} behandelt und durch Hitze (20 min bei 80°C) fixiert.

Die Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erfolgte wie unter B.4.1 beschrieben.

B.8.5 Hybridisierung in Lösung (Wallner *et. al.*, 1995; modifiziert Thelen, 2002)

Materialien:

Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für die Hybridisierung in Suspension entsprach den unter Punkt B.8.2 beschriebenen Lösungen.

Durchführung:

Die fixierten Zellen (Zelldichte: 10^2 - 10^7) wurden in einem ERG bei 46°C dehydratisiert.

Um die Zellhülle Gram-positiver Bakterien für das Eintreten der Gensonden zu permeabilisieren, wurden 40 µl Lysozym (Konzentration 1 mg/ml) auf die dehydratisierten Zellen aufgebracht und 10 min bei RT inkubiert.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurden 80 µl 96 % Ethanol zugegeben. Die Suspension wurde kurz gevortext, zentrifugiert (4000 x g, 2 min bei RT, Rotina 35 R, Hettich). Anschließend wurde der Überstand mittels einer Pipette abgehoben und verworfen.

Die Zellen wurden erneut bei 46°C dehydratisiert und danach mit 100 µl auf 46°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer vermischt.

Nach der Zugabe von 1-5 ng markierter Oligonukleotidsonde erfolgte eine 3 stündige Inkubation in einem Hybridisierungsofen (Memmert) bei 46°C. Danach wurden die Zellen bei 4000 x g 2 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 100 µl Hybridisierungspuffer (ohne Sonde) für 30 min bei 46°C gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen bei 4000 x g 2 min abzentrifugiert und in 100 µl 1 x PBS resuspendiert.

B.9 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen

B.9.1 Auswertung mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Um Ausbleichungseffekte während der mikroskopischen Auswertung zu verhindern, wurden die hybridisierten Zellen in Citifluor-AF1 (Plano) eingebettet und nach 5 minütiger Inkubationszeit unter dem Mikroskop oder Stereomikroskop ausgewertet.

B. Material und Methoden

B.9.1.1 Standard Epifluoreszenzmikroskop

Zur Detektion von Zellen auf Objektträgern und Membranfiltern wurde das Axioplan 2 imaging (Zeiss) Epifluoreszenzmikroskop verwendet. Es wurden Plan-Neofluar Objektive für die Mikroskopie in Öl mit 40-, 63- und 100-facher Vergrößerung sowie für die Mikroskopie ohne Öl mit 2,5x, 4x, 5x und 10-facher Vergrößerung eingesetzt. Je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff, wurden die in Tabelle B.9 aufgeführten Filter eingesetzt.

Die Dokumentation erfolgte mittels einer CCD-Kamera (AxioCam color, Zeiss) mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware (Axio Vision 2.05, Zeiss).

Tabelle B.11: Spezifikationen der verwendeten Filter

Filtersatz	Anregungs- bzw. Bandpassfilter	Farbteiler (nm)	Emissionsfilter	Fluoreszenzfarbstoff
Zeiss 01	BP 365	FT 395	LP 397	DAPI
Zeiss 09	BP 450-490	FT 510	LP 520	6'-FAM
Zeiss 10	BP 450	FT 510	BP 515-565	6'-FAM
Zeiss 15	BP 546	FT 580	LP 590	CY3
Zeiss 20/ HQ-CY3	BP 546	FT 560	575-640	CY3
AHF F51-024	k. A.	k. A.	k. A.	Dualbandfilter (6'-FAM / CY3)

Abkürzungen:

(BP = Bandpassfilter, FT = Farbteiler, LP= Langpassfilter, HQ= High Quality, k. A. = keine Angabe)

B.9.1.2 Epifluoreszenzstereomikroskop

Alternativ zur Auswertung mit dem Epifluoreszenzmikroskop wurde zusätzlich für die Auswertung von mit *Legionella*-Mikrokolonien bewachsenen Membranfiltern ein Fluoreszenzstereomikroskop verwendet (Leica MS5 Stereomicroscope, Leica). Um den gesamten Membranfilter (Durchmesser: 25 mm) abzubilden, wurde ein Achromat-Objektiv mit 1-facher Vergrößerung und 89 mm Arbeitsabstand eingesetzt. Zur gleichzeitigen Anregung der Farbstoffe FAM und TAMRA bzw. CY3 wurde ein Dualband-Filter (Filtersatz FITC/CY3, Art.-Nr.: F51-009, AHF) eingesetzt.

Die Dokumentation erfolgte mittels einer Digitalkamera (Leica DFC320 R2, Leica) mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware (Leica QWin V3 Runner, Leica).

In der Software „QWIN V3 Runner“ wurde ein Makro erstellt, durch das eine erste automatische Quantifizierung der Mikrokolonien realisiert werden konnte.

B.9.2 Auswertung mittels ChemScan RDI Laserscanner

B.9.2.1 Prinzip ChemScan RDI Laserscanning System

Der ChemScan RDI Laserscanner (Aes Chemunex) wird prinzipiell als Festphasen-Zytometer (SPC = solid phase cytometer) beschrieben, da jede Fluoreszenz als singuläres Ereignis auf einer Filtermembran detektiert werden kann. Das gesamte System besteht dabei aus einem analytischen Scan-Modul inkl. Laserquelle, Fluoreszenzmikroskop mit motorisiertem x/y-Tisch, sowie Computer inkl. Software zur Datenverarbeitung (Abbildung B.4).



Abbildung B.4: ChemScan RDI (analytisches Scan-Modul inkl. Laserquelle und Computer)

Im Gegensatz zur Flüssigphasen-Durchflusszytometrie (FCM = flow cytometry) werden die Zellen für die Detektion durch das Festphasen-Durchflusszytometer ChemScan RDI mittels Filtration auf einen Membranfilter aufgebracht und optimalerweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff mit Absorptionsmaximum zwischen 480 nm – 510 nm (z. B. ChemChrome V6, Fluorescein, FAM) markiert. Der Filter wird anschließend in einer Halterung zentriert und die gesamte Filtermembran (gescannter Bereich: rechteckig 25 mm x 25 mm) wird im ChemScan RDI mittels eines luftgekühlten Argonlasers (Durchmesser des Laserstrahls: 6 μm , Emissionswellenlänge: 488 nm) abgescannt. Die Scangeschwindigkeit des Gerätes beträgt 2 m/ sek und der Laserstrahl scannt in 9545 Linien in etwa 3 bis 3,5 min über die gesamte Membran. Die individuellen Scanlinien haben einen Abstand von 2,2 μm zueinander, so dass jeder Bereich der Filtermembran mindestens zweimal überlappend vom Laserstrahl abgerastert wird. Drei Photomultiplier (PMT) werden als Detektoren für die emittierten Fluoreszenzsignale eingesetzt. Die Wellenlängenbereiche, die von den drei PMTs detektiert werden, sind auf das

B. Material und Methoden

Emissionspektrum des Fluorescein-Farbstoffes bei 500-530 nm (grüner PMT), 540-585 nm (oranger PMT) und 540-585 nm (roter PMT) ausgelegt. Die über die PMTs gesammelten Fluoreszenzsignale werden in elektronische Signale umgewandelt und der digitalen Datenverarbeitung zugeführt.

Dabei werden grundsätzlich Fluoreszenzsignale, die nicht durch zwei aufeinanderfolgende Scans auf der gleichen Position der Membran lokalisiert sind, von der weiteren Datenverarbeitung ausgeschlossen.

B.9.2.2 ChemScan RDI Software und Datenverarbeitung

Die Datenverarbeitung der gemessenen Fluoreszenzsignale erfolgt mit der Software „ChemScan“ (Aes Chemunex), mit der die durch die PMTs detektierten Fluoreszenzsignale weiter prozessiert werden.

Generell werden von dieser Software alle gemessenen Fluoreszenzen dargestellt und somit als einzelne Fluoreszenzereignisse quantifiziert. Eine Zuordnung der Messdaten in valide Signale (mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Bakterien) oder nicht valide Signale (freier Farbstoff, autofluoreszente Partikel, Hintergrundrauschen der Membran usw.) erfolgt unter zu Hilfenahme von Makros bzw. Softwareapplikationen, die spezifisch auf die verwendete Färbemethode und Farbstoffe eingestellt und validiert werden müssen.

Dabei stehen mehrere Parameter zur Diskriminierung der gemessenen Fluoreszenzen zur Verfügung, die in die Erstellung der spezifischen Softwareanwendung einfließen können.

Zur Diskriminierung und Bestimmung von validen Signale wird ein Bereich für das Farbverhältnis, die Farbverteilung, die Lichtintensität, die Signalform und Signalgröße festgelegt, der spezifisch für die Fluoreszenz-markierten Bakterien ist. Signale die außerhalb dieser Toleranzbereiche liegen, werden als nicht valide ausgeschlossen.

Die Daten werden als absolut gemessene Fluoreszenzereignisse (Spots) oder in Form einer „Scan Map“, die die Lokalisation des gemessenen Spots auf der Filterfläche anzeigt, dargestellt (siehe Abbildung B.5).

B. Material und Methoden

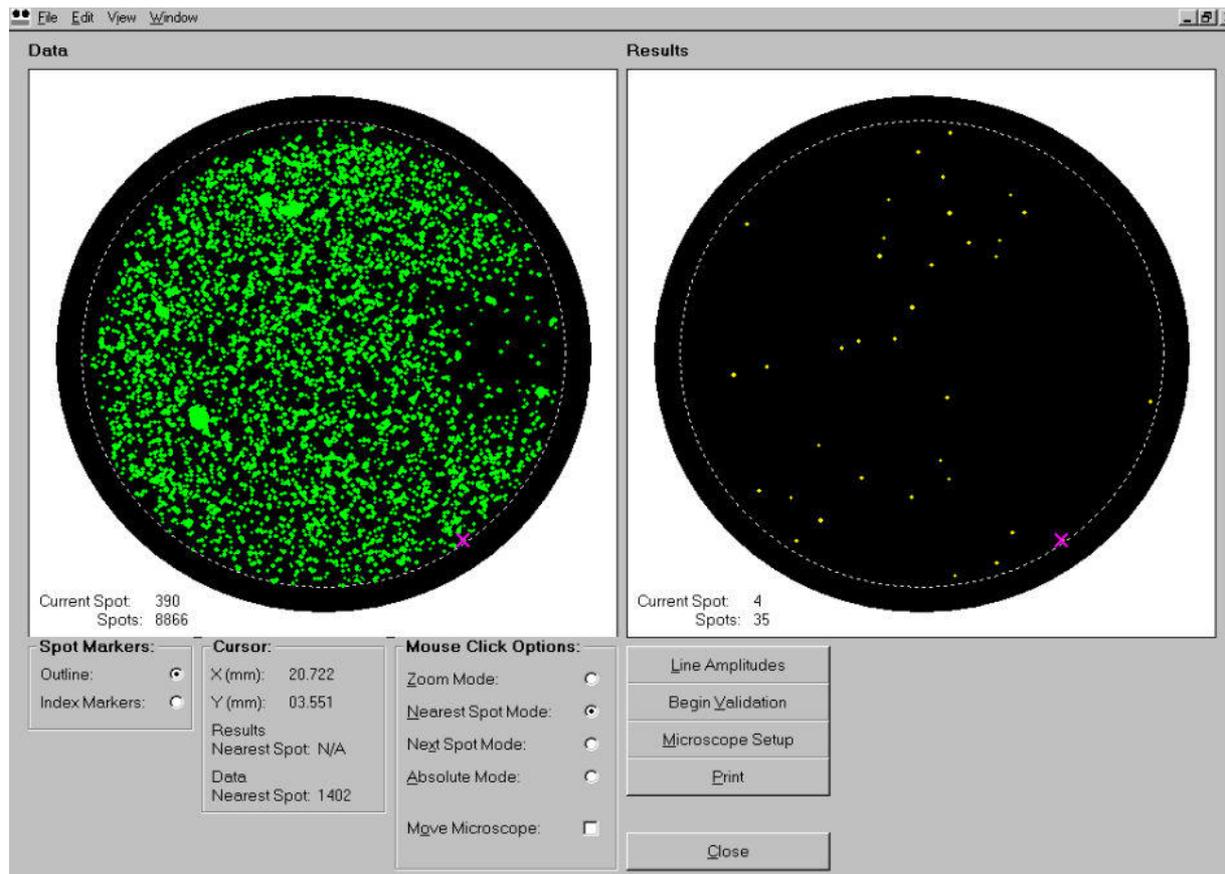


Abbildung B.5: ChemScan Software (links „Data“ = alle Signale, rechts „Results“= valide Signale)

Es werden sowohl alle gemessenen Rohdaten („Data“) als auch die nach Software-Diskriminierung als valide Signale („Results“) bestimmten Fluoreszenzsignale ausgewiesen.

Der Daten-Export erfolgt in einem tabellen-artigen Blatt, das die Kalibrierungsinformationen, ein komplettes Ergebnisdossier und eine statistische Trendanalyse enthält. Um die Daten auch außerhalb der ChemScan Software zu bearbeiten, ist auch optional ein Datenexport als Windows Excel-Dokument möglich.

B.9.2.3 Mikroskopische Validierung

Da sowohl nach ChemChrome V6 Vitalitätsfärbung als auch nach FISH-Analyse die fluoreszenz-markierten Bakterien morphologisch intakt bleiben, können zusätzlich alle am ChemScan RDI Laserscanner erhaltenen Daten auch mikroskopisch verifiziert werden. Dazu wird der Membranfilter, fixiert in seiner Halterung, auf ein Fluoreszenzmikroskop (Optiphot Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einem B-2A Fluoreszenzfilter und einem A-Plan Objektiv mit 60-facher Vergrößerung, Nikon)

B. Material und Methoden

mit motorisiertem x/y-Tisch (Prior) übertragen, der direkt über die ChemScan Software ansteuerbar ist. Auf diese Weise kann jedes Fluoreszenzereignis, welches auf der „Scan Map“ dargestellt ist, auch über das Mikroskop automatisch angesteuert und das Ergebnis somit visuell verifiziert werden.

B.9.2.4 Vitalitätsfärbung mit ChemChrome V6

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde eine Färbung mit dem Farbstoff ChemChrome V6 (CV6, Aes Chemunex) durchgeführt. Dieser Farbstoff ist ein nicht fluoreszierender Precursor, der in die Zellen diffundiert und durch die intrazellulären Esterasen in ein grünes fluoreszierendes Produkt (Emissionswellenlänge: 520 nm) gespalten wird und anschließend präzipitiert.

Materialien:

ChemScan RDI Laserscanning System (s. B.9.2.1)

Vakuumsfiltrationsgerät (s. B.8.4)

Labelling Pad (Färbe-Pad) – Durchmesser 25 mm, steril (Aes Chemunex)

ChemFilter CB04 – Durchmesser 25 mm, 0.4 mm, steril (Aes Chemunex)

Support Pad – Durchmesser 25 mm, 0.45 mm, steril (Aes Chemunex)

Lösungen:

CSE/2 (Aes Chemunex)

ChemSol B16 (Aes Chemunex)

ChemChrome V6 (Aes Chemunex)

Färbelösung: 1 Teil ChemChrome V6 + 99 Teile ChemSol B16

Durchführung:

Der ChemFilter wurde mit der glänzenden Seite nach oben auf das Lochsieb des Filtrationsturmes gelegt. Der Zusammenbau der Filtrationseinheit erfolgte unter sterilen Bedingungen (siehe B.8.4.1). Durch das Anlegen eines Vakuums wurde die zu untersuchende Probe auf den Membranfilter filtriert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml sterilfiltrierter CSE/2 Lösung auf die Filtrationsmembran. Nach einer kurzen Einwirkzeit (< 1 min) wird diese Flüssigkeit über Filtration entfernt. Das Färbe-Pad (Labelling Pad) wird in eine leere Petri-Schale gelegt und mit 600 µl frisch hergestellter Färbelösung (bei 4°C, max. 4 h haltbar) getränkt. Der ChemFilter wird

B. Material und Methoden

mit der glänzenden Seite auf das Färbe-Pad (Labelling Pad) gelegt und mind. für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die gefärbten Zellen werden mit dem ChemScan RDI Laserscanner (ChemScan Standard-Applikation: TVCBIO1.app) quantifiziert und am angeschlossenen Fluoreszenzmikroskop Nikon Optiphot verifiziert.

B.9.3 Auswertung mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer

Zur Detektion von Zellen, die in Lösung hybridisiert wurden, wurde das Flx800 Mikrotiterplatten-Fluorometer (Biotek) verwendet (Abbildung B.6).



Abbildung B.6: Flx800 Mikrotiterplatten-Fluorometer

Das Mikrotiterplatten-Fluorometer ist dazu geeignet die gängigen Standard-Mikrotiterplatten Formate 6-, 12-, 24-, 48-, 96- und 384-wells auszulesen. Als Lichtquelle kommt in diesem Gerät ein 20 W Halogenlampe zum Einsatz, mit der ein Wellenlängenbereich von 300 bis 650 nm abgebildet wird. Die Selektion der Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Fluoreszenzfarbstoffe FAM und TAMRA/CY3 erfolgt über Filter (FAM: Anregungsfilter: 485/20 nm, Emissionsfilter 528/20 nm und TAMRA/CY3 Anregungsfilter: 530/25 nm, Emissionsfilter 590/20 nm), die über ein Filterrad miteinander kombiniert werden. Das emittierte Fluoreszenzsignal wird über einen Photomultiplier (PMT) detektiert und in elektrische Impulse umgewandelt, die von der Software KC junior (Biotek) als relative Fluoreszenz-Einheiten (RFU = Relative Fluorescence Unit) ausgegeben werden. Die Messung erfolgt von oben in die Mikrotiterplatte hinein und der Hersteller bescheinigt eine untere Sensitivitätsgrenze von 20 pg/ml Fluorescein-Farbstoff gelöst in PBS-Puffer.

B.10 Lösungen und Materialien für die FISH-Protokoll-entwicklungen

B.10.1 Verwendete Lösungen und Chemikalien

- Hybridisierungspuffer (B.8.3)
- Waschpuffer (B.8.3)
- 10-fach PCR-Reaktionspuffer (Promega)
- modifizierter 1-fach PCR Reaktionspuffer
 - 5 M NaCl 50 mM
 - 1 M Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM
 - TritonX100 0,1 %
- Carbonatpuffer:
 - NaHCO₃/Na₂CO₃ 1 M
 - pH 9,0
- Maleinsäure-Puffer:
 - Maleinsäure 100 mM
 - NaCl 150 mM
 - pH 7,5, eingestellt mit NaOH
- 10 % Blocking Reagenz (Roche):
 - Verhältnis: 10,0 g Blocking Reagenz auf 100 ml Maleinsäurepuffer
 - zum Lösen bis 65 °C erhitzen, danach autoklavieren und bei 4 °C lagern
- Roti-Block, 10x Konzentrat (Roth)
- Lachsspermien-DNS (Sigma-Aldrich)
- Formamid, deionisiert (Merck)
- Glycerin
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Mallinckrodt Baker)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich)
- PEG 8000 (Sigma-Aldrich)
- Kaliumchlorid

B. Material und Methoden

- Tetramethylammoniumchlorid, TEMAC (Sigma-Aldrich)
- Diverse Farbstoffe bzw. Färbelösungen:
 - Giensa Stammlösung
 - Hämatoxylinlösung (Roth)
 - Alcianblau (Roth)
 - Methylenblau (Roth)
 - Eosin Methylenblau (Sigma-Aldrich)
 - Chlorazol-Schwarz (Sigma-Aldrich)
 - Lactophenolblau (Sigma-Aldrich)
 - Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich)
 - Fluorescent Brightener 28 (Sigma-Aldrich)
 - Bromphenolblau (Sigma-Aldrich)
 - Xylencyanol (Sigma-Aldrich)
 - Indigo carmine (Sigma-Aldrich)
 - Resazurin (Sigma-Aldrich)
 - Acid Black (Sigma-Aldrich)
 - Acid Violet (Sigma-Aldrich)
 - Evan's Blue (Sigma-Aldrich)
 - Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich)
 - Preußisch-Blau (Sigma-Aldrich)
 - Brillantblau (Sigma-Aldrich)

B.10.2 Verwendete Materialien

- Diverse Membranfiltertypen (alle Durchmesser 25 mm):
 - Cellulose-Nitrat, Type113, Porengröße: 0,45 µm (Sartorius)
 - Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat, HAWP, Porengröße: 0,45 µm (Millipore)
 - Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat, HAWG, Porengröße: 0,45 µm (Millipore)
 - Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat, GSWP, Porengröße: 0,22 µm (Millipore)
 - Polyester, CB 0.4, Porengröße: 0,4 µm (Aes Chemunex)
 - Polycarbonat, weiß, GTTP, Porengröße: 0,2 µm (Millipore)
 - Polycarbonat, weiß, HTTP, Porengröße: 0,4 µm (Millipore)
 - Polycarbonat, schwarz, GTBP, Porengröße: 0,2 µm (Millipore)
 - Polycarbonat, schwarz, GTTP, Porengröße: 0,4 µm (Millipore)

B. Material und Methoden

- Spritzenvorsatz aus Polycarbonat, Durchmesser 25 mm (Sartorius)
- Stützkartonscheibe, Durchmesser 25 mm (Millipore)
- Universal-Verschlussstopfen, Luer-Lock (Vygon)
- Tropfflaschen (PE-LD, weich, 20 ml, Wagner & Munz)
- Tropfflaschen (PE-HD, naturfarben, 25 ml, Wagner & Munz)
- 96 well Polypropylen Mikroplatten, schwarz (F-Boden: schwarz, Greiner)
- 96 well Polypropylen Mikroplatten, schwarz (F-Boden: klar, Greiner)
- Microseal A Film (Biozym)

C. Ergebnisse

C.1 Protokollentwicklung eines FISH-basierten Nachweises von *Legionella*-Mikrokolonien

Der Nachweis von Mikrokolonien auf Polycarbonatfiltern mittels fluoreszenzmarkierter Sonden wurde prinzipiell bereits früher durch Meier *et. al.*, 1997 beschrieben. Jedoch sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein routinetaugliches Protokoll für den Nachweis von Legionellen entwickelt werden, das eine vergleichbare Spezifität und Sensitivität liefert wie das klassische Kulturverfahren nach UBA-Empfehlung (B.3.4). Ein besonderer Augenmerk wurde deshalb bei der Entwicklung auf die Kriterien Nachweisdauer, Sensitivität, Signal/Rausch-Verhältnis, Handhabung und Reproduzierbarkeit gelegt.

Da insbesondere die Auswahl von verdächtigen Legionellen-Kolonien (B.1) die Analysten in der Routineanalytik vor Probleme stellt und ein großes Maß an Erfahrung voraussetzt, fokussierte sich diese Entwicklung zudem auch auf die Vereinfachung und Standardisierung der mikroskopischen Auswertung.

C.1.1 FISH-Analyse von *Legionella*-Mikrokolonien auf Polycarbonatfiltern

In einem ersten Schritt wurde die zu erwartende Signalstärke des FISH-Sondensignals der Sonden Leg705-FAM (spezifisch für die Gattung *Legionella*) und Legpne1-CY3 (spezifisch für *L. pneumophila*) auf EtOH-Fixierungen von *Legionella pneumophila* ssp. *philadelphia* (ATCC 43703) und *Legionella longbeachae* (ATCC 33462) mittels Standard-FISH-Analyse auf dem Objektträger verifiziert (B.8.3).

Mit der Sonde Leg705 wurden sowohl für *Legionella pneumophila* ssp. *philadelphia* als auch für *Legionella longbeachae* sehr helle Sondensignale erzielt (Abb. C.1/2, Bild A). Mit der Sonde Legpne1 wurde wie erwartet nur ein Signal für *Legionella pneumophila* ssp. *philadelphia* erhalten. Das Signal dieser Sonde wurde ebenfalls als sehr hell eingestuft (Abb. C.1/2, Bild B). *Legionella longbeachae* zeigte mit dieser Sonde kein Signal (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten Schritt wurde das von Meier *et. al.*, 1997 entwickelte Protokoll (B.8.4.2) für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von *Legionella*-Mikrokolonien evaluiert.

C. Ergebnisse

Als Referenzorganismen wurden *Legionella pneumophila* ssp. *philadelphia* und *Legionella longbeachae* ausgewählt. Diese wurden auf BCYE α -Agar (B.2.2) angezogen und über eine Verdünnungsreihe die Verdünnungsstufen selektiert, bei denen in etwa ≤ 10 KBE und ≤ 100 KBE pro Membranfilter zu erwarten waren. Die Membranfiltration erfolgte wie unter B.8.4.1 beschrieben. Die Polycarbonatfilter wurden im Anschluss an die Filtration jeweils auf die Legionellen-Selektivagars BCYE α und GVPC aufgelegt (B.2.2) und aerob bei 37 °C inkubiert.

Da die optimale Inkubationszeit bis zum Erhalt von mikroskopisch detektierbaren *Legionella*-Mikrokolonien nicht bekannt war, wurde ein Zeitraum von 5 Tagen als Kultivierungsdauer festgelegt. Dabei wurde jeweils alle 12 h, ein Membranfilter von BCYE α - und GVPC-Agar abgenommen und wie unter B.8.4.2 beschrieben, mit EtOH_{abs.} und Hitze sowie ausschließlich mit EtOH_{abs.}-fixiert.

Für die FISH-Analyse wurden die Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3 (B.8.2) bei 20 % FA eingesetzt (B.8.4.2).

Für die mikroskopische Auswertung (B.9.1) der hybridisierten Polycarbonatfilter wurden die Kriterien Sensitivität, Signal/Rausch-Verhältnis, Handhabung und Reproduzierbarkeit zur Bewertung der Ergebnisse herangezogen.

Als optimale Inkubationsdauer für die Kultivierung von *Legionella*-Mikrokolonien wurden auf BCYE α -Agar 36 h und auf GVPC-Agar 48 h bestimmt (Daten nicht gezeigt). Nach dieser Anreicherungszeit wurden durchschnittliche Mikrokoloniegrößen mit einem Durchmesser von 50-150 μm erhalten, die mikroskopisch bei einer 400-1000-fachen Vergrößerung gut detektiert werden konnten. Der Durchmesser der Mikrokolonien wurde unter Zuhilfenahme des Zähllokulars abgeschätzt (B.8.4.1).

Ab einer Inkubationsdauer von ≥ 72 h war die gesamte Filtermembran überwachsen und einzelne Mikrokolonien konnten nicht mehr identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Mikrokolonien wiesen unter Verwendung der Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3, die generell auf fixierten Einzelzellen gute bis sehr gute Fluoreszenzsignale lieferten, nur schwache bis mittelmäßig helle Signale auf (z. B. Abb. C.1/1, Bilder A, B und D), obwohl davon ausgegangen werden musste, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung in der exponentiellen Wachstumsphase befunden haben.

C. Ergebnisse

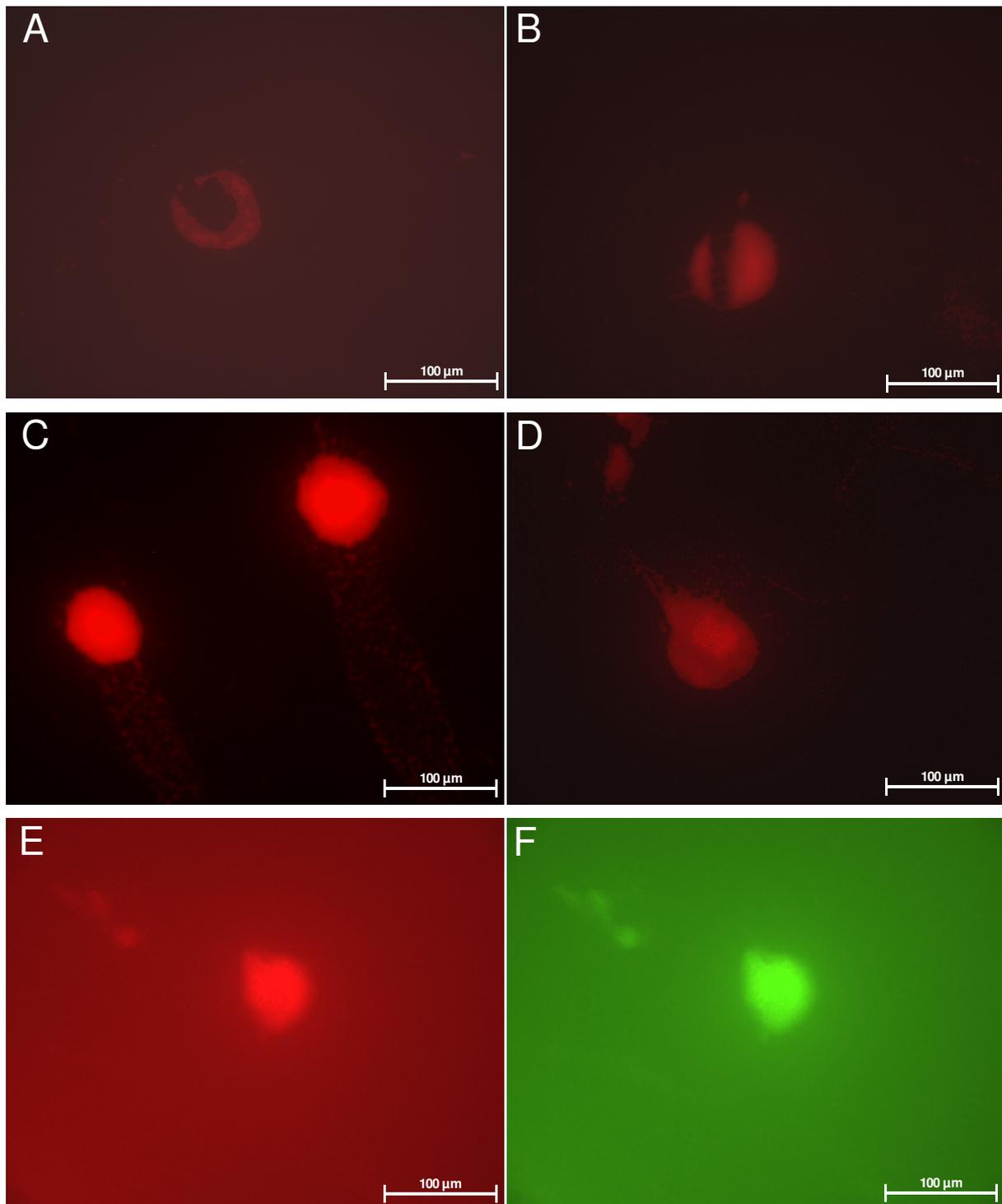


Abbildung C.1/1: Dokumentation *Legionella*-Mikrokolonien auf Polycarbonatfiltern

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 10-fachen Gesamtvergrößerung fotografiert. Bilder A bis E: *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Legpne1-CY3. Bild F: *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Leg705-FAM

A und B: Verschiedene Epifluoreszenzbilder von partiell abgelösten Mikrokolonien nach EtOH_{abs.}- und Hitze-fixierung. **C und D:** Verschiedene Epifluoreszenzbilder von „schweifartig“ verrutschten Mikrokolonien nach EtOH_{abs.}-Fixierung. **E:** Dokumentation der Autofluoreszenz von Polycarbonatfiltern. **F:** Identischer Bildausschnitt wie E.

C. Ergebnisse

Zum Teil wurden sehr starke Autofluoreszenzen der Polycarbonatfiltermembran beobachtet (Abb. C.1/1, Bilder E und F). Diese Ergebnisse wurden auch unter Verwendung der *Eubacteria*-Sonden EUB338-CY3 und EUB338-FAM (B.8.2) reproduziert (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren fiel bei der mikroskopischen Auswertung auf, dass sich die Mikrokolonien über eine kombinierte Fixierung aus EtOH_{abs.} und Hitze, sowie über eine EtOH_{abs.}-Fixierung nicht permanent auf dem Polycarbonatfilter verankern ließen. Ein partielles oder vollständiges Ablösen von zu meist größeren Mikrokolonien (Durchmesser > 100 µm) wurde vor allem nach kombinierter Fixierung aus EtOH_{abs.} und Hitze beobachtet (s. Abb. C.1/1, Bilder A und B). Nach ausschließlicher Fixierung mit EtOH_{abs.} wurde dieses nicht festgestellt. Jedoch war bei dieser Fixierungsvariante vor allem ein „schweifartiges“ verrutschen der Mikrokolonien auf der Filtermembran zu bemerken (s. Abb. C.1/1, Bilder C und D).

Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass nicht auch während des Waschschriffs und der anschließenden Spülschritte (B.8.4.2), bei denen der Membranfilter frei in der Lösung floriert (Waschpuffer) oder kurz eingetaucht wird (H₂O_{dest.} und EtOH_{abs.}), ein weiteres Ablösen von Zellen bzw. Mikrokolonien forciert wird.

Bezüglich der Handhabung wurde festgehalten, dass sich Polycarbonatfilter generell erschwert manipulieren lassen. Die Membranen sind sehr dünn und empfindlich und können deshalb leicht durch die Pinzette oder sonstige mechanische Einflüsse beschädigt werden. Zudem wurde beobachtet, dass sich die Membranen insbesondere nach der Kultivierung und Fixierung im trockenen Zustand sehr leicht einrollten. Sie ließen sich erst durch eine erneute Befeuchtung wieder glätten und weiter verarbeiten.

Zusammenfassend war nach diesen Versuchen festzuhalten, dass eine FISH-Analyse mittels des publizierten Protokolls prinzipiell möglich war. Hinsichtlich der Polycarbonatfiltern (Kultivierung, Handhabung), der Reproduzierbarkeit und des Signal/Rausch-Verhältnisses wurde das Protokoll jedoch als nicht routinetauglich eingestuft.

C. Ergebnisse

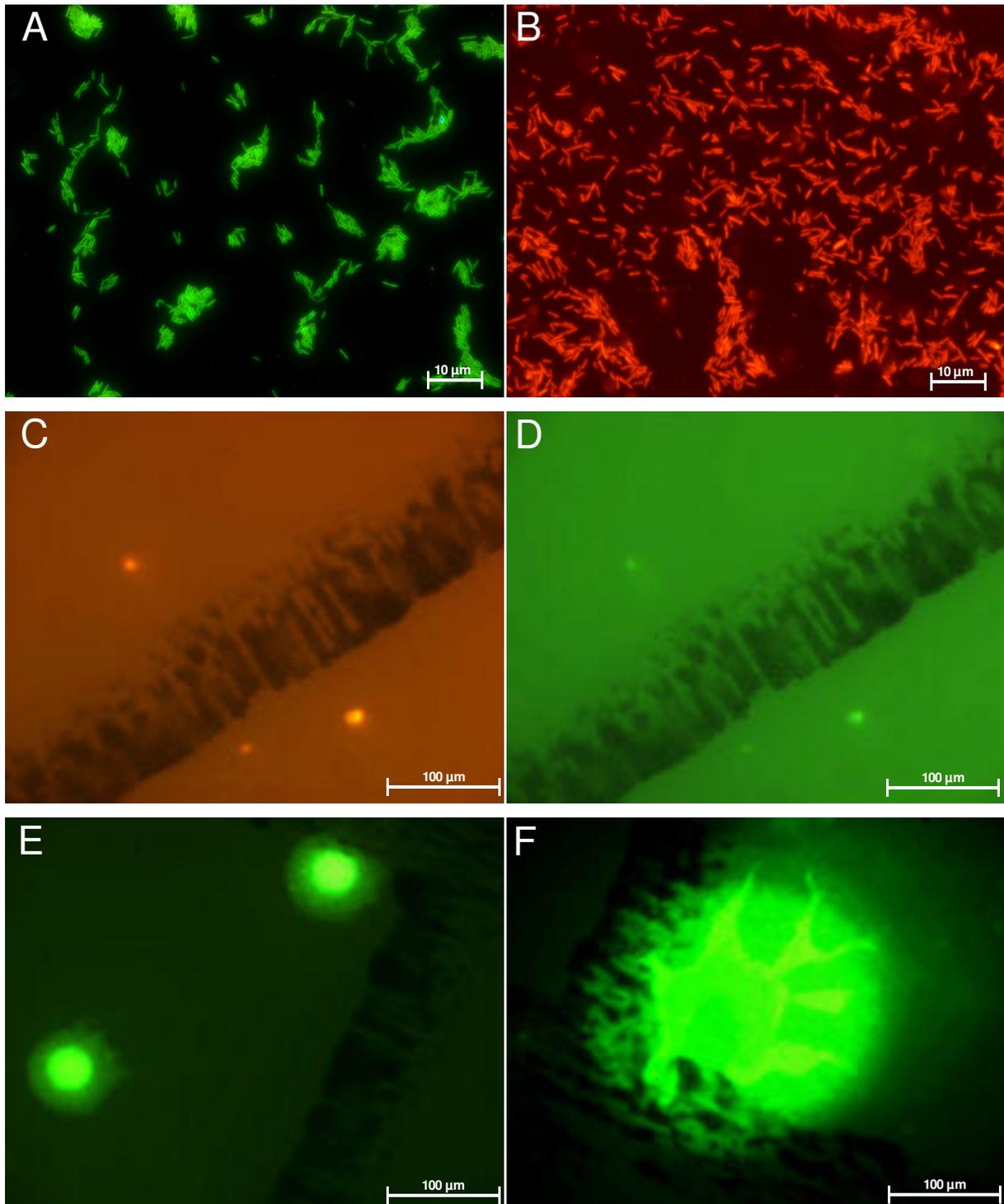


Abbildung C.1/2: Dokumentation von *Legionella*-Einzelzellen und *Legionella*-Mikrokolonien

Bild A und B wurden bei einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung und Bilder C bis F bei einer 10-fachen Gesamtvergrößerung fotografiert. Bilder A und C: *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Legpne1-CY3. Bilder A, D, E und F: *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Leg705-FAM

A: Epifluoreszenzbild von *L. longbeachae* (ATCC 33462) Einzelzellen. **B:** Epifluoreszenzbild von *L. pneumophila* ssp. *philadelphia* (ATCC 43703) Einzelzellen. **C:** Durchmesser von *L. pneumophila* ssp. *philadelphia* Mikrokolonien nach 48 h Kultivierung auf Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Membranfiltern. **D:** Identischer Bildausschnitt wie C. **E** und **F:** Durchmesser von *L. pneumophila* ssp. *philadelphia* Mikrokolonien nach 72 h Kultivierung auf Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Membranfiltern. Blockierung der Membran wie in Tab. C.3/ Versuch Nr. 12 beschrieben.

C.1.2 Optimierung des Protokolls

Die unter Punkt C.1.1 erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass das FISH-Protokoll zur Hybridisierung von Mikrokolonien für eine Anwendung als routinetaugliche Praxisapplikation weiter optimiert werden muss.

C.1.2.1 Evaluierung alternativer Filtermembranen

Um zu überprüfen, ob sich andere Filtermembranen als Alternative zu Polycarbonatfiltermembranen zur Kultivierung und Hybridisierung von *Legionella*-Mikrokolonien eignen, wurden weitere Membranfiltertypen evaluiert (Tabelle C.1).

Aufgrund der mikroskopischen Auswertung wurde bei der Auswahl der Filter der Fokus darauf gelegt, dass die Membranen einen Durchmesser von 25 mm hatten (Spezifikationen der Filter s. B.10.2). Zum einen sollte der Membranfilter für die Mikroskopie auf einem Präparathalter platziert werden. Für Standardmikroskope eignet sich hierfür am besten ein Glas-Objektträger (Breite: 25 mm). Zum anderen verlängert sich die mikroskopische Auswertung proportional zur Filterfläche die evaluiert werden muss.

Ein weiteres Kriterium war die grundsätzliche Eignung des Filtermaterials für die Kultivierung von Bakterien.

Für den Vergleich der Filtermembranen wurde *Legionella pneumophila* ssp. *philadelphia* (ATCC 43703), kultiviert auf BCYE α -Agar, als Referenzorganismus verwendet. Um möglichst realistische Versuchsbedingungen zu simulieren, wurde eine Kolonie mit der Impföse abgenommen, zweimal in autoklaviertem Trinkwasser gewaschen und final in 1 ml autoklaviertem Trinkwasser resuspendiert. Diese Suspension wurde $\bar{u}N$ bei 4°C im Dunklen aufbewahrt und über eine Verdünnungsreihe eine Konzentration von etwa ≤ 100 KBE/ml eingestellt. Die tatsächliche Konzentration der Lösung von 85 KBE/ml wurde über eine parallele Plattierung auf GVPC-Agar verifiziert.

Die Membranfiltration erfolgte wie unter B.8.4.1 beschrieben. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit dieser Versuchsreihe wurde für jeden Membranfiltertypen ein Triplikatansatz durchgeführt.

Die Membranfilter wurden im Anschluss auf GVPC-Agar aufgelegt und 48 h aerob bei 37°C inkubiert. Die Fixierung erfolgte ausschließlich mit EtOH_{abs.} und die FISH-Analyse wurden, wie unter C.1.1 beschrieben, durchgeführt. Tabelle C.1 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

C. Ergebnisse

Tabelle C.1: Vergleich verschiedener Filtermembranen zur Kultivierung von Mikrokolonien

Filtermaterial	Hersteller	Porengröße	Filter 1 KBE/ml	Filter 2 KBE/ml	Filter 3 KBE/ml
Polycarbonat, weiß	Millipore	0,2 µm	2	6	10
Polycarbonat, weiß	Millipore	0,45 µm	9	17	15
Polycarbonat, schwarz	Millipore	0,2 µm	0	0	0
Polycarbonat, schwarz	Millipore	0,45 µm	0	0	0
Polyester, schwarz	Aes Chemunex	0,4 µm	31	25	20
Cellulose-Nitrat, weiß	Sartorius	0,45 µm	76	61	65
Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat, weiß	Millipore	0,22 µm	20	20	25
Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat, weiß	Millipore	0,45 µm	69	61	76

Legende: Für detaillierte Herstellerangaben siehe Herstellerverzeichnis

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die höchste Anzahl an Kolonien auf Cellulose-Nitrat- und Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Membranfiltern mit einer Porengröße von 0,45 µm wiedergefunden wurden. Durchschnittlich wurden auf diesen Membranfiltern 67 KBE/ml (Cellulose-Nitrat) und 69 KBE/ml (Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat) nachgewiesen. Dieses entspricht, im Vergleich zu der über Plattierung bestimmten Ausgangskonzentration, einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 79 % bzw. 81 %.

Die Koloniezahlen, die für alle anderen Membranfiltertypen bestimmt wurden, lagen deutlich unter diesen Werten.

Auf den schwarzen Polyestermembranen (Porengröße: 0,45 µm) wurden in etwa 25 % der eingesetzten Kolonien wiedergefunden. 22 % der eingesetzten Zellen bildeten auf Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Membranen (0,22 µm Porengröße) detektierbare Mikrokolonien aus.

Polycarbonatfilter wiesen in dieser Versuchsreihe mit Abstand die schlechteste Wiederfindungsrate auf. Durchschnittlich wurden für weiße Polycarbonatfilter nach Hybridisierung 6 KBE/ml (Porengröße: 0,22 µm) und 14 KBE/ml (Porengröße: 0,45 µm) bestimmt. Auf den schwarzen Polycarbonatfiltern wurde kein Wachstum nachgewiesen.

Diese Ergebnisse wurden in weiteren Versuchsreihen reproduziert (Daten nicht gezeigt).

C. Ergebnisse

Des Weiteren stellte sich heraus, dass die verschiedenen untersuchten Filtermaterialien nach 48 h mikroskopisch unterschiedlich große Mikrokolonien aufwiesen.

Auf den weißen Polycarbonat- und auf den schwarzen Polyesterfiltermembranen wurden Mikrokolonien mit einem Durchmesser von 50-150 μm bestimmt. Die Größe der Mikrokolonien fiel auf Cellulose-Nitrat- und Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen mit $< 50 \mu\text{m}$ deutlich kleiner aus (s. Abb. C.1/2, Bilder C und D).

Diese Größe wurde für eine eindeutige mikroskopische Detektion als zu gering eingestuft. Aus diesem Grund wurde der unter C.1.1 durchgeführte Wachstumsversuch unter gleichen Rahmenbedingungen für Cellulose-Nitrat- und Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen wiederholt. Die Filtermembranen wurden in diesem Fall ausschließlich auf GVPC-Agar aufgelegt und nach jeweils 48 h, 54 h, 60 h, 66 h, 72 h und 78 h Inkubation mit $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$ -fixiert und hybridisiert (B.8.4.2).

Eine Mikrokoloniengröße von 50-150 μm wurde für beide Membrantypen nach einer Anreicherungsdauer von 72 h erhalten (s. Abb. C.1/2, Bilder E und F). Dieses Ergebnis wurde mehrfach reproduziert (Daten nicht gezeigt).

Die unter C.1.1 erhaltenen Ergebnisse zur Autofluoreszenz der Polycarbonatfilter (s. Abb. C.1/1), sowie die schwachen FISH-Signale der Mikrokolonien, wurden in dieser Versuchsreihe ebenfalls an allen getesteten Membranfiltertypen bestätigt. Abbildung C.1/2 zeigt das Signal/Rausch Verhältnis exemplarisch für Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen (Bilder C und D).

Bezüglich der Handhabung manifestierte sich in diesen Versuchen ein weiterer Vorteil von Cellulose-Nitrat- und Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen. Beide sind deutlich dicker und unempfindlicher gegenüber mechanischen Einflüssen (z. B. Manipulation mit Pinzette) als Polycarbonatmembranen, was zusätzlich zur besseren Wiederfindungsrate auch eine verbesserte Manipulation der Membranen zuließ.

Zudem waren die Mikrokolonien im Vergleich zu den wesentlich dünneren Polycarbonatfiltern nach der Kultivierung deutlich tiefer in den Membranen verankert (Abb. C.1/2, Bild F) und ein Ablösen oder Verrutschen der Mikrokolonien wurde auf Cellulose-Nitrat- und Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen zu keiner Zeit beobachtet.

C.1.2.2 Optimierung des Signal/Rausch-Verhältnisses

Die unter C.1.1 und C.1.2.1 durchgeführten Versuche zeigten, dass Mikrokolonien trotz exponentiellen Zellwachstums nur schwache FISH-Sondensignale aufwiesen. Des Weiteren wurde auf allen Membrantypen eine starke Autofluoreszenz der Filtermembranen nach der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung festgestellt.

Diese beiden Phänomene wurden für verschiedene Filtermaterialien bestätigt (C.1.2.1). Sie ließen darauf schließen, dass die Autofluoreszenz nicht durch das Filtermaterial selbst verursacht wurde, sondern, dass die Sondenmoleküle möglicherweise unspezifisch an die Filtermembranen binden und dadurch die Autofluoreszenz der Membran verursachen.

Um einer unspezifischen Bindung von Sondenmolekülen entgegen zu wirken, wurden in den nachfolgenden Versuchen verschiedene Strategien zur Blockierung der Filtermembranen entwickelt und deren Einfluss auf die FISH-Analyse überprüft.

Dafür wurden ausschließlich Cellulose-Nitrat- und Cellulose-Nitrat/Cellulose/Acetat-Filtermembranen mit *Legionella pneumophila* ssp. *philadelphia* (ATCC 43703) Mikrokolonien evaluiert. Diese Membrantypen hatten unter C.1.2.1 die besten Wiederfindungsraten für *Legionella*-Mikrokolonien gezeigt.

Für die FISH-Analyse wurden die Oligonukleotidsonden (B.8.2) Leg705-FAM und Legpne1-CY3 in Kombination miteinander bei 20 % FA verwendet (B.8.3).

Zur Blockierung der Filtermembranen wurden die verschiedenen Blockingsubstanzen Blocking Reagenz (B.10.1), Roti-Block (B.10.1) und Lachsspermien-DNS (B.10.1) in unterschiedlichen Konzentrationen in den Standardhybridisierungspuffer und Standardwaschpuffer eingesetzt (Tabelle C.2, Standardpuffer s. B.8.3).

C. Ergebnisse

Tabelle C.2: Evaluierte Blockierungsstrategien für Hybridisierungs- und Waschpuffer

Versuch-Nr.	Hybridisierungspuffer substituiert mit	Waschpuffer substituiert mit	Ergebnis mikroskopische Auswertung (prozentuale Reduktion der Autofluoreszenz)
1	0,5% Blocking-Reagenz	0,5% Blocking-Reagenz	10 %
2	1% Blocking-Reagenz	1% Blocking-Reagenz	25 %
3	2% Blocking-Reagenz	2% Blocking-Reagenz	40 %
4	0,5% Roti-Block	0,5% Roti-Block	10 %
5	1% Roti-Block	1% Roti-Block	25 %
6	2% Roti-Block	2% Roti-Block	30 %
7	0,5% Blocking-Reagenz + 0,5% Roti-Block	0,5% Blocking-Reagenz + 0,5% Roti-Block	60 %
8	1% Blocking-Reagenz + 1% Roti-Block	1% Blocking-Reagenz + 1% Roti-Block	80 %
9	2% Blocking-Reagenz + 2% Roti-Block	2% Blocking-Reagenz + 2% Roti-Block	80 %
10	1 ng/µl Lachsspermien DNS	1 ng/µl Lachsspermien DNS	10 %
11	5 ng/µl Lachsspermien DNS	5 ng/µl Lachsspermien DNS	10 %

Legende: Die angegebenen Konzentrationen entsprechen der jeweiligen Endkonzentration im Puffer

Die mikroskopische Auswertung der Versuchsvarianten zeigte, dass die verschiedenen Konzentrationen an Blocking-Reagenz (Versuche Nr. 1-3, Tab. C.2), sowie der alleinige Einsatz von Roti-Block (Versuche Nr. 4-6, Tab. C.2) und Lachsspermien-DNS (Versuche Nr. 10 und 11, Tab. C.2) zu keiner signifikanten Verbesserung führten. Alle evaluierten Membranen wiesen noch eine deutliche Autofluoreszenz auf.

Die Versuchsansätze Nr. 8 und 9 (Tab. C.2) zeigten hingegen eine deutliche Verbesserung im Signal/Rausch Verhältnis der Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen. Die Autofluoreszenz der Membranen wurde durch den kombinierten Einsatz von Blocking-Reagenz und Roti-Block in Hybridisierungs- und Waschpuffer im direkten Vergleich zu nicht blockierten Membranen um 80 % reduziert. Die FISH-Sondensignale zeigten noch eine mittlere Helligkeit. Für Cellulose-Nitrat-Membranen konnte die Autofluoreszenz über diese Strategie nur geringfügig reduziert werden. Insbesondere im Bereich der Membranporen war die Autofluoreszenz noch störend zu bemerken (Daten nicht gezeigt).

C. Ergebnisse

Um insbesondere für Cellulose-Nitrat-Cellulose/Acetat-Filtermembranen eine weitere Reduktion der Autofluoreszenz zu erzielen, wurde analog zu anderen Membranhybridisierungsverfahren (z. B. Southern-Blot-Hybridisierung, Dot-Blot-Hybridisierung) versucht, über eine Prä-Hybridisierung, mit blockierenden Substanzen, freie Stellen der Membranen bereits vor der eigentlichen Hybridisierung abzusättigen.

Für die Prä-Hybridisierung wurde Standardhybridisierungspuffer verwendet. Basierend auf den Ergebnissen der Versuche Nr. 1-11 wurde der Prä-Hybridisierungspuffer ausschließlich mit unterschiedlichen Konzentrationen an Blocking-Reagenz und Roti-Block substituiert und in Kombination mit verschiedenen Hybridisierungs- und Waschpuffern eingesetzt (Tabelle C.3).

Tabelle C.3: Evaluierte Prä-Hybridisierungsstrategien

Versuch-Nr.	Prä-Hybridisierungslösung substituiert mit	Hybridisierungspuffer substituiert mit	Waschpuffer substituiert mit	Ergebnis mikroskopische Auswertung (prozentuale Reduktion der Autofluoreszenz)
12	1% Blocking-Reagenz	1% Blocking-Reagenz + 1% Roti-Block	1% Blocking-Reagenz + 1% Roti-Block	95 %
13	1% Blocking-Reagenz + 1% Roti-Block	1% Blocking-Reagenz + 1% Roti-Block	1% Blocking-Reagenz + 1% Roti-Block	80 %
14	2% Blocking-Reagenz	2% Blocking-Reagenz + 2% Roti-Block	2% Blocking-Reagenz + 2% Roti-Block	85 %
15	2% Blocking-Reagenz + 2% Roti-Block	2% Blocking-Reagenz + 2% Roti-Block	2% Blocking-Reagenz + 2% Roti-Block	80 %

Legende: Die angegebenen Konzentrationen entsprechen der jeweiligen Endkonzentration im Puffer

Die Prä-Hybridisierungslösungen wurden jeweils nach der Fixierung der Filter mit EtOH_{abs.} und vor der Hybridisierung auf die Filtermembran appliziert (120 µl, 10 min bei RT).

Um eine Steigerung des FISH-Sondensignals der Mikrokolonien zu erreichen, wurde zudem für diesen Versuch die Konzentrationen der beiden Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3 jeweils von 50 ng/µl auf 100 ng/µl erhöht

Im direkten Vergleich der Versuchsreihen Nr. 12 bis 15 (Tab. C.3) erwies sich die unter Versuch-Nr. 12 beschriebene Blockierungsstrategie als am effizientesten. Die Autofluoreszenz der Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembran (Abb. C.1/2, Bild E und F) wurde im Vergleich zu nicht blockierten Membranen (Abb. C.1/2, Bild C und D) um 95 % reduziert. In Kombination mit der Erhöhung der Sondenkonzentration wiesen die *Legionella*-Mikrokolonien nun auch deutlich hellere FISH-Sondensignale auf. Die Autofluoreszenz der Cellulose-Nitrat-Membranen konnte auch mittels Prä-Hybridisierung nicht signifikant verbessert werden (Daten

C. Ergebnisse

nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde dieser Membrantyp für weitere Versuche nicht mehr verwendet.

C.1.2.3 Standardisierung des Protokolls

Unter C.1.2.1 und C.1.2.2 wurde das Protokoll der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zur Analyse von Mikrokolonien auf Membranfiltern von der reaktionstechnischen Seite optimiert. Im Nachfolgenden sollte dieses Protokoll weiter vereinfacht und für eine routinetaugliche Durchführung standardisiert werden.

Dafür musste insbesondere die Handhabung und Manipulation des Membranfilters analog zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Objektträgern weiter vereinfacht werden (B.8.4.2). Als Kernstück wurde aus verschiedenen Einzelkomponenten eine Hybridisierungseinheit zusammengestellt, in der die Filtermembran während der gesamten FISH-Analyse fixiert werden konnte. Bei diesem Aufbau wurde zusätzlich darauf geachtet, dass die verschiedenen applizierten Lösungen (z.B. Hybridisierungspuffer, Waschpuffer) möglichst einfach via Filtration entfernt werden konnten.

In Abbildung C.2 ist der Aufbau der Hybridisierungseinheit aus den Einzelkomponenten schematisch dargestellt.

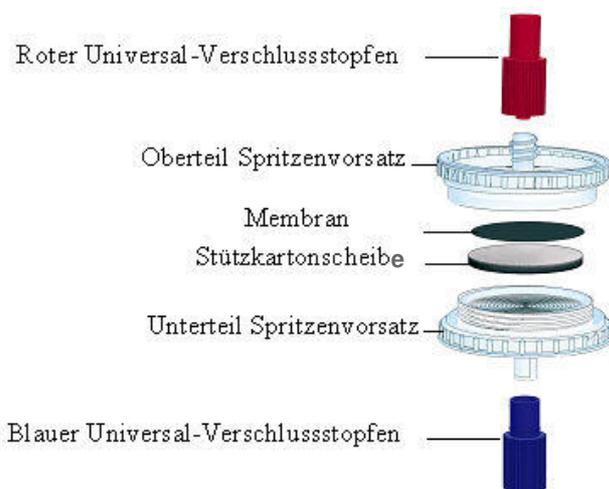


Abbildung C.2: Komponenten der Hybridisierungseinheit

Das Kernstück der Hybridisierungseinheit stellt ein handelsüblicher Spritzenvorsatz (Sartorius, für detaillierte Herstellerangaben siehe Herstellerverzeichnis) für Membranfilter mit einem Durchmesser von 25 mm dar. Das Unterteil des Spritzenvorsatzes wird mit einer Stützkartonscheibe (Durchmesser: 25 mm, Millipore) ausgekleidet. Diese sollte zum einem den welligen Boden des Spritzenvorsatzes

C. Ergebnisse

ebnen, damit die Membran nicht während der Hybridisierung deformiert wurde. Zur Etablierung der feuchten Kammer sollte diese zum anderen auch als Trägermaterial für den Hybridisierungspuffer eingesetzt werden. Zur Abdichtung wurde der Spritzenvorsatz am Oberteil (Luer-Ventil) und am Unterteil (Lock-Ventil) jeweils mit einem Luer-Lock Universal-Verschlussstopfen (Vygon) abgedichtet.

Zur Durchführung der FISH-Analyse wurden die Mengen der unter B.8.4.1 angegebenen und z. T. unter C.1.1.2 optimierten Lösungen auf diese Hybridisierungseinheit angepasst.

Die nachfolgende Tabelle C.4 fasst die modifizierten Angaben zusammen.

Tabelle C.4: Verwendete Lösungen und Inkubationsdauer

Schritt	Lösung	Menge pro Filter	Inkubation
EtOH-Fixierung	EtOH _{abs.}	150 µl	RT, 15 min
Prä-Hybridisierung	Hybridisierungspuffer + 1 % Blocking Reagenz	120 µl	RT, 10 min
Hybridisierung: Befeuchtung Stützkartonscheibe	Hybridisierungspuffer + 1 % Blocking Reagenz	500 µl	46 °C, 90 min
Hybridisierung: Filter	Hybridisierungspuffer + 1 % Blocking Reagenz + 1 % Roti-Block kombiniert im Verhältnis 9:1 mit Sondenlösung (100 ng/µl)	120 µl	
Waschen	Waschpuffer + 1 % Blocking Reagenz + 1 % Roti-Block	2 ml	46 °C, 15 min
Spülen	H ₂ O _{dest.}	2 ml	RT, keine Inkubation

Das endgültig entwickelte Protokoll zur *Legionella*-Mikrokolonie FISH-Analyse umfasst folgende Teilschritte:

- Filtration der Probe (B.8.4.1) auf eine Cellulose-Nitrat/Cellulose/Acetat Filtermembran (Porengröße: 0,45 µm, Typ HAWP oder HAWG, B.10.2)
- Zur Analyse von Trinkwasserproben: Überschichtung des Membranfilters mit 10 ml Säurepuffer (B.3.4, RT, 5 min) und Spülen des Membranfilters mit 10 ml sterilem Trinkwasser
- Inkubation des Membranfilters auf GVPC-Agar (37 °C, 72 h)
- Überführung der Membran in eine sterile Petri-Schale und EtOH-Fixierung durch Überschichtung (Tab. C.4)
- Prä-Hybridisierung (Tab. C.4)

C. Ergebnisse

- Zusammenbau der Hybridisierungseinheit (Abb. C.2)
- Befeuchtung der Stützkartonscheibe (Tab. C.4)
- Auflage des Membranfilters auf die Stützkartonscheibe und Zugabe des Hybridisierungspuffers (Tab. C.4)
- Verschließung der Hybridisierungseinheit und Hybridisierung (Tab. C.4)
- Öffnung des Luer-Ventils am Oberteil des Spritzenvosatzes und Zugabe von vorgewärmten Waschpuffer (Abb. C.2 und Tab. C.4)
- Entfernung des Lock-Ventils am Unterteil des Spritzenvosatzes und Entfernung der Flüssigkeit mittels Filtration (Abb. C.2)
- Zugabe von H₂O_{dest.} und Entfernung der Flüssigkeiten mittels Filtration (Tab. C.4)

C.1.2.4 Überprüfung der Spezifität

Nachdem die Bedingungen für die Hybridisierung von *Legionella*-Mikrokolonien standardisiert worden waren (C.1.2.3), konnte die Spezifität des entwickelten Protokolls überprüft werden.

Dafür wurde das Protokoll an weiteren *Legionella*-Arten verifiziert. Die Mikrokolonien wurden hierfür wie unter Punkt C.1.2.1 beschrieben, auf GVPC-Agar angezogen. Als Nichtzielorganismen wurden verschiedene *Enterobacteriaceae*-Arten und *Pseudomonas aeruginosa* ausgewählt (Tabelle G.1, Anhang, Seite 164). Da die meisten dieser Stämme nicht auf GVPC-Agar wachsen, wurden die Mikrokolonien dieser Stämme auf M1-Agar angezogen (30 °C oder 37 °C, 8-24 h). Dabei wurden für jeden Nichtzielorganismus jeweils zwei Filter mit Mikrokolonien hergestellt. Der erste Filter wurde mit der Sondenkombination Leg705-FAM/Legpne1-CY3 und der zweite Filter wurde als Positivkontrolle mit der Sonde EUB338-CY3 hybridisiert (B.8.2).

Die in Tabelle G.1 aufgeführten Daten zeigten, dass das entwickelte Protokoll spezifisch eingesetzt werden kann.

C.1.3 Validierung des Protokolls an Trinkwasserproben

Um die Nachweisgenauigkeit des entwickelten Protokolls zu verifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 69 Trinkwasserproben untersucht. Die Proben wurden vom Landesuntersuchungsamt Oberschleißheim (LGA Oberschleißheim) zur Verfügung gestellt. In einer ersten vergleichenden Studie an 69 Trinkwasserproben wurde die Sensitivität des Protokolls im Vergleich zur Empfehlung des

C. Ergebnisse

Umweltbundesamts (UBA) zum Nachweis von Legionellen überprüft. Dafür wurden die Trinkwasserproben halbiert und ein Teil mittels FISH-Analyse, der zweite Teil nach UBA-Empfehlung (B.3.4) untersucht. Die Untersuchung nach UBA-Empfehlung wurde vom LGA Oberschleißheim durchgeführt.

Die FISH-Analyse wurde nach dem unter C.1.2.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Mittels UBA-Empfehlung wurden vom LGA Oberschleißheim in 34 von 69 Trinkwasserproben (49,9 %) Legionellen nachgewiesen. In der parallel durchgeführten FISH-Analyse wiesen 46 von 69 analysierten Trinkwasserproben (66,6 %) einen positiven Befund für Legionellen auf.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle G.2 des Anhangs (Seite 166) zusammengefasst.

C.1.4 Etablierung einer quantitativen Auswertungsroutine

Um eine quantitative Auswertung für Filtermembranen, bewachsen mit *Legionella*-Mikrokolonien zu etablieren, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurde die manuelle Quantifizierung mittels Epifluoreszenzmikroskop standardisiert, zum anderen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Leica eine semi-automatische Quantifizierung mittels Fluoreszenzstereomikroskop realisiert.

Einige ausgewählte Trinkwasserproben aus C.1.3 mit eindeutig positivem oder negativem mikroskopischen Befund wurden für die Validierung der Auswertungsroutinen verwendet.

C.1.4.1 Manuelle Quantifizierung mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Zur Standardisierung der manuellen Auswertung wurde ein Zeiss Axiplan imaging Epifluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit Neofluar-Objektiven verwendet. Um die Farbstoffe CY3 und FAM parallel anzuregen, erfolgte die Auswertung mittels Dualbandfilter (B.9.1). Im ersten Schritt wurde geprüft, welche Vergrößerung (2,5-, 4-, 5-, 10- und 40-fach) sich am besten für die manuelle Auswertung eignete. Dabei wurde Wert darauf gelegt eine möglichst niedrige Vergrößerung zu wählen, um die Anzahl der zu beurteilenden Gesichtsfelder gering zu halten und damit die Auswertung zu beschleunigen (Abb C.3, Bilder A bis F). In einer vergleichenden Beurteilung erwies sich die 10-fache Vergrößerung als optimal geeignet um Mikrokolonien sicher von Artefakten zu unterscheiden (Abb C.3, Bild E).

C. Ergebnisse

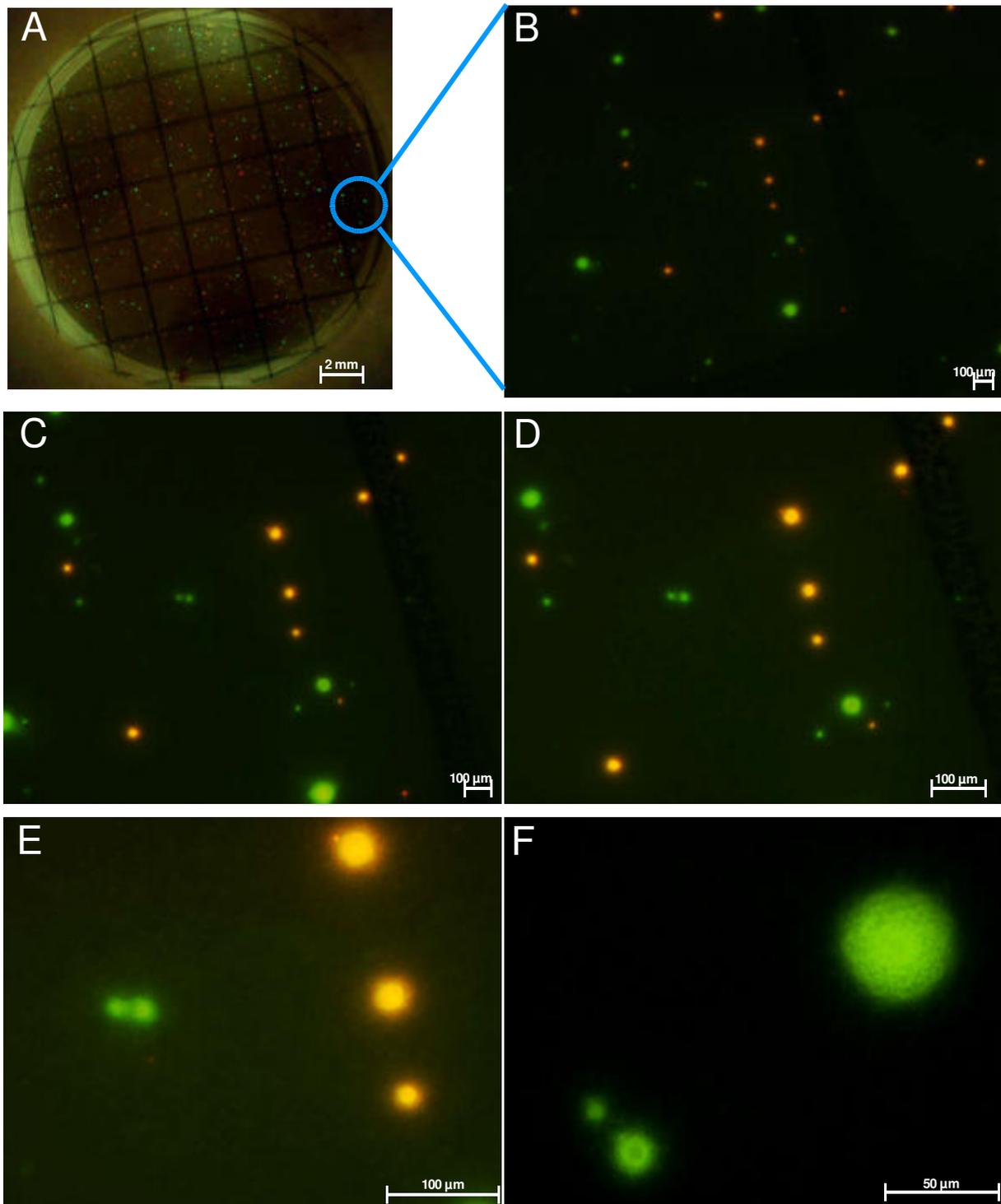


Abbildung C.3: Dokumentation von *Legionella*-Mikrokolonien auf Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat-Filtermembranen

Bilder A bis E stellen jeweils den gleichen Bildausschnitt bei verschiedenen Vergrößerungen dar. Bild F wurde auf einem anderen Bereich der Filtermembran fotografiert. Das Bild A wurde mittels Fluoreszenzstereomikroskop dokumentiert. Die Bilder B bis F wurden am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Die *in situ* Hybridisierung erfolgte mit den Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3. Die parallele Fluoreszenzanregung beider Farbstoffe erfolgte bei allen Aufnahmen mittels Dualbandfilter (B.9.1).

A: Epifluoreszenzaufnahme der gesamten Membran (Gesamtvergrößerung: 1x) **B:** Teilausschnitt von Bild A, Objektiv mit 2,5x Vergrößerung **C:** Teilausschnitt von Bild A, Objektiv mit 4x Vergrößerung **D:** Teilausschnitt von Bild A, Objektiv mit 5x Vergrößerung **E:** Teilausschnitt von Bild A, Objektiv mit 10x Vergrößerung **F:** Alternativer Bildausschnitt, Objektiv mit 40x Vergrößerung

C. Ergebnisse

Um insbesondere stark bewachsene Membranfilter standardisiert und zügig auszuwerten, wurde nachfolgende Auswertungsroutine entwickelt:

Für eine leichtere Orientierung bei der mikroskopischen Auswertung wurden dafür Cellulose-Nitrat/Cellulose/Acetat-Filtermembranen mit aufgedrucktem Gitternetz verwendet (Typ HAWG, B.10.2). Der Membranfilter gliedert sich bei Auswertung mit einem Okular der Maßstabszahl 10x/ Sehfeldzahl 23 (Zeiss) und einem Objektiv mit 10-facher Vergrößerung (Zeiss) in 71 Gesichtsfelder auf.

Die Quantifizierung erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die Auswertung von Petrischalen. Dabei wird die Anzahl der Mikrokolonien auf einer Teilfläche quantifiziert und die ermittelten Daten auf die Gesamtkoloniezahl pro Membranfilter hochgerechnet. Abbildung C.4 stellt die Auswertungsroutine schematisch dar.

Startpunkt der Auswertung ist die Mitte des Membranfilters (blaue Linie). Vom oberen Rand (Startpunkt: dunkelgrünes Quadrat) werden alle Gesichtsfelder (grüne Kreise) bis zum unteren Rand des Membranfilters evaluiert und die Mikrokolonien gezählt. Danach wird das Gesichtsfeld um eine Position verschoben und wiederum alle Gesichtsfelder vom unteren Rand des Membranfilters bis zum oberen Rand ausgewertet. Insgesamt werden auf diese Weise alle Gesichtsfelder (alle grünen Kreise) in drei kompletten Reihen bewertet (rote Pfeile). Werden in drei kompletten Reihen keine Mikrokolonien gezählt, dann wird die Anzahl der zu quantifizierenden Reihen bis zum äußeren seitlichen Rand (orange Kreise) des Filters erweitert, so dass insgesamt die halbe Filterfläche ausgewertet wird.

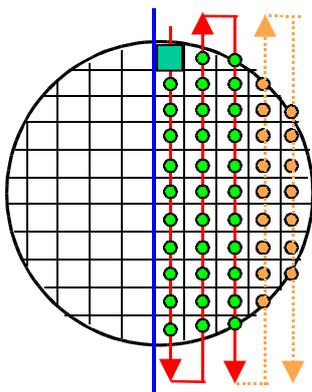


Abbildung C.4: Schematische Darstellung der manuellen Quantifizierung

C. Ergebnisse

Berechnung der Gesamtkoloniezahl (KBE):

Während der Quantifizierung werden zur Berechnung der Gesamtkoloniezahl folgende Werte ermittelt:

Anzahl der gezählten Gesichtsfelder (grüne Kreise) = **A**

Anzahl der ermittelten Kolonien pro gezählte Gesichtsfelder = **B**

Berechnung des Multiplikationsfaktors:

Gesamtgesichtsfeldzahl pro Filter / Anzahl der gezählten Gesichtsfelder **A** = Faktor **F**

$$71 / A = F$$

Berechnung der Gesamtkoloniezahl pro Filter:

Anzahl der ermittelten Kolonien pro gezählte Gesichtsfelder **B** x Faktor **F** =

Gesamtkoloniezahl pro Filter **G**

$$B \times F = G$$

Berechnung der Gesamtkoloniezahl pro Liter (bei Filtrationsvolumen 50 ml):

Gesamtkoloniezahl pro Filter **G** x Verdünnungsfaktor 20 = Gesamtkoloniezahl (KBE) pro Liter

$$G \times 20 = \text{KBE/l}$$

Diese Auswertungsroutine wurde an 10 Proben evaluiert. Bei 7 von 10 Quantifizierungen wurden über die entwickelte Auswertungsroutine KBE Werte in der gleichen Zehnerpotenz ermittelt, wie bei manueller Quantifizierung der gesamten Filterfläche. In 3 von 10 Quantifizierungen lag der erhaltene Wert eine Zehnerpotenz höher oder niedriger als der bei manueller Quantifizierung der gesamten Filtermembran erhaltene Wert. Tabelle G.3 im Anhang (Seite 168) weist alle pro 3 Reihen (Abb. C.4), pro halber und gesamter Filtermembran quantifizierten Werte detailliert aus. (s. Tabelle G.3, Anhang).

C.1.4.2 Semi-automatische Quantifizierung mittels Fluoreszenzstereomikroskop

Um die gesamte Filtermembran in einem Bildausschnitt abzubilden (Abb C.3, Bild A), wurde ein Leica MS5 Fluoreszenzstereomikroskop verwendet. Dieses Mikroskop wurde mit einem Achromat-Objektiv mit 1-facher Vergrößerung, einem Dualband-Fluoreszenzfilter, sowie einer Digitalkamera zur Dokumentation ausgestattet (B.9.2.1).

Für die Auswertung mittels Fluoreszenzstereomikroskop wurden Cellulose-Nitrat/Cellulose-Acetat Filtermembranen ohne Gitternetz verwendet (Typ HAWP, B.10.2) oder die Membranen des Typs HAWG wurden umgedreht, so dass sich das Gitternetz auf der Unterseite der Membran befand.

Um standardisierte Bilder zu generieren, wurde die Belichtungszeit auf eine Sekunde fixiert.

Basierend auf diesem Aufbau wurden die Filtermembranen von Trinkwasserproben mit positivem und negativem *Legionella*-Befund dokumentiert und für die Etablierung des Softwaremakros herangezogen.

In Zusammenarbeit mit der Firma Leica wurde basierend auf der Software „QWIN V3 Runner“ ein erstes Makro erstellt, welches sich genereller Funktionen dieser Software bedient.

Das Software-Makro besteht dabei aus sechs nacheinander abfolgenden Schritten (Abbildung C.5, Bilder A bis F).

Zuerst wird das Bild des Membranfilters aufgerufen (Bild A) und manuell die Filterfläche definiert, auf der sich die Mikrokolonien befinden (Bild B, blauer Kreis).

Im nächsten Schritt wird das Farbbild automatisch in ein Graustufenbild umgewandelt und über Justage der Helligkeit und des Kontrastes wird das Signal/Rausch Verhältnis manuell definiert (Bild C). Die Fläche der Mikrokolonie wird zur einfacheren Visualisierung koloriert (Bild D). Eventuell zusammengewachsene Mikrokolonien können dabei manuell getrennt werden (Bild E). Im letzten Schritt wird die Anzahl der kolorierten Mikrokolonien quantifiziert (Bild F) und der gezählte Wert ausgegeben.

C. Ergebnisse

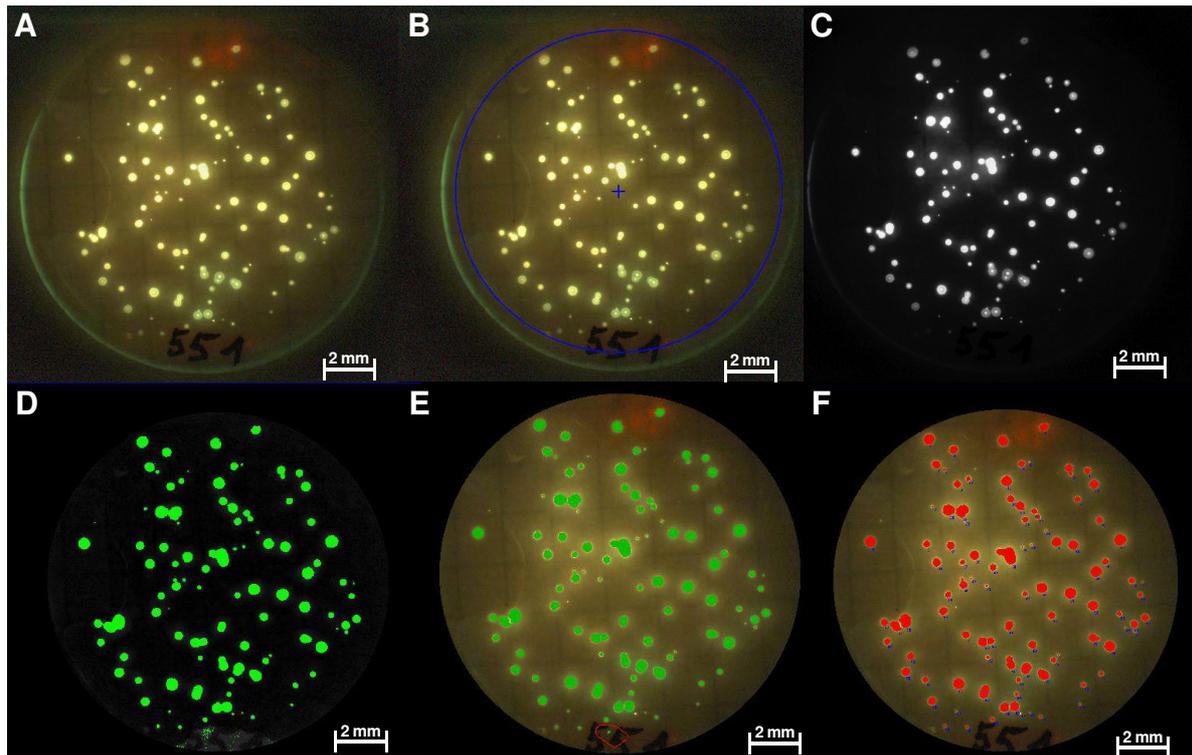


Abbildung C.5: Software-Makro zur Quantifizierung von Mikrokolonien auf Membranfiltern

Die *in situ* Hybridisierung erfolgte mit den Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3. Die parallele Fluoreszenzanregung beider Farbstoffe erfolgte mittels Dualbandfilter (B.9.1) am Stereomikroskop.

A: Fluoreszenzaufnahme eines Membranfilters mit *L. pneumophila* Mikrokolonien **B:** Definition des Auswertungsbereiches **C:** Konvertierung des Originalbildes in ein Graustufenbild und Justage der Helligkeit und des Kontrastes **D:** Kolorierung der Fläche der detektierten Mikrokolonien **E:** Option zur Trennung von zusammengewachsenen Mikrokolonien **F:** Quantifizierung der kolorierten Mikrokolonien

C.2 Protokollentwicklung zum FISH-basierten Direktnachweis von bierschädlichen Bakterien auf Einzelzellebene

Das unter C.1 entwickelte FISH-Protokoll zum Nachweis von *Legionella*-Mikrokolonien sollte in diesem Versuchsteil für den Direktnachweis von bierschädlichen Bakterien adaptiert werden. Es war davon auszugehen, dass der Ribosomengehalt von bierschädlichen Bakterien in ihren natürlichen Habitaten deutlich geringer ausfallen würde, als der Ribosomengehalt, den Bakterien nach Vorkultur aufweisen. Demzufolge lag bei der Entwicklung eines Direktnachweises für bierschädliche Bakterien im Gegensatz zum Nachweis von Mikrokolonien ein Entwicklungsschwerpunkt auf der Verstärkung des Sondensignals. Des Weiteren war ein routinetauglicher quantitativer Nachweis von Einzelzellen auf Filtermembranen routinetauglich nur mittels automatischer Auswertung zu realisieren. Das entwickelte FISH-Protokoll sollte daher über eine automatische Auswertung unter Verwendung eines ChemScan RDI Laserscanners ausgewertet werden.

C.2.1 FISH-Analyse von Einzelzellen auf Polycarbonatfiltern

Das für *Legionella*-Mikrokolonien entwickelte Protokoll (C.1.2.3) wurde auf eine generelle Eignung zur Analyse von Einzelzellen überprüft. Für den Filter-basierten Einzellzahlachweis eignen sich generell nur einschichtige Filtermembranen, wie z.B. Polycarbonat- und Polyestermembranen, in die die Zellen nicht einsinken können. Da bei diesen Versuchen keine Kultivierung der Zellen vorgesehen war (s. auch Tabelle C.1), wurden neben weißen auch schwarze Polycarbonatmembranen verwendet (B.10.2, Porengröße 0,2 µm).

Als Referenzorganismen wurden EtOH-fixierte *Lactobacillus brevis* (WSB L32) und *Pediococcus damnosus* (WSB SaE) Zellen ausgewählt. Nach der Membranfiltration (B.8.4.1) wurde die Zellhülle der Gram-positiven Bakterien wie unter B.8.4.1 beschrieben, in der Filtrationseinheit permeabilisiert.

Die Auswertung der hybridisierten Filtermembranen erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskop (B.9.1.1) und ChemScan RDI Laserscanner (B.9.2.1).

Da der ChemScan RDI Laserscanner ausschließlich mit einem Argonlaser (Emissionswellenlänge: 488 nm) ausgestattet ist, wurden alle, für den Einzellnachweis verwendeten Oligonukleotidsonden, mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM markiert.

C. Ergebnisse

Für die FISH-Analyse wurden die Oligonukleotidsonden (B.8.2) EUB338-FAM und Pela761-FAM (spezifisch für die meisten Lactobazillen und *Pediococcus* sp.) bei 35 % FA eingesetzt.

Es wurde festgehalten, dass sich das für Mikrokolonien entwickelte FISH-Protokoll (C.2.3) auch prinzipiell zur FISH-Analyse von Einzelzellen eignet.

Die für Cellulose-basierte Filtermembranen entwickelte Blockierungsstrategie (C.1.2.2) konnte mit gleichem Erfolg auch zur Eliminierung von Autofluoreszenzen auf Polycarbonatmembranen zur Anwendung gebracht werden.

Die hybridisierten Zellen wiesen bei Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop zumeist gute bis sehr gute Signalstärken auf und ließen sich visuell deutlich vom Hintergrund der Filtermembran diskriminieren. Die unter B.8.4.1 beschriebene enzymatische Permeabilisierung wurde allerdings als nicht ausreichend eingestuft, da nicht alle, auf der Filtermembran vorhandenen Zellen, homogen permeabilisiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Für eine Auswertung mittels ChemScan RDI Laserscanner war das Signal/Rausch Verhältnis auf den verwendeten schwarzen und weißen Polycarbonatfiltern zu gering. Der Hintergrund der Membran wurde von den Detektoren des Gerätes zu stark wahrgenommen und die Signalstärke der hybridisierten Zellen war zu niedrig, um eindeutig detektiert zu werden (Daten nicht gezeigt).

C.2.2 Optimierung des Protokolls

Die unter Punkt C.2.1 erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass das entwickelte FISH-Protokoll zur Hybridisierung von Mikrokolonien generell zur FISH-Analyse von Einzelzellen geeignet war. Im Folgenden sollte dieses Protokoll für eine automatische Auswertung mittels ChemScan RDI Laserscanner optimiert werden.

C.2.2.1 Vergleich von Polycarbonat- und Polyesterfiltermembranen

Als Alternative zu Polycarbonatmembranen wurden für die weiteren Versuche schwarze Polyestermembranen (CB 0.4, B10.2) verwendet. Diese Membranen sind dreifach schwarz eingefärbt, um einen möglichst hohen Kontrast zu den entsprechenden Fluoreszenzsignalen zu gewährleisten (persönliche Kommunikation Aes Chemunex).

Der unter C.2.1 beschriebene Versuch wurde mit diesen Membranen wiederholt und die Detektion der hybridisierten Zellen mittels ChemScan RDI Laserscanner konnte

C. Ergebnisse

auf diesem Membrantyp durchgeführt werden. Das Signal/Rausch Verhältnis der schwarzen Polyestermembranen wurde dabei als ausreichend gut eingestuft (Daten nicht gezeigt).

C.2.2.2 Verstärkung des Sondensignals

Da bei der Untersuchung von Realproben nicht davon ausgegangen werden kann, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Analyse in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden, musste insbesondere der Aspekt Verstärkung des Sondensignals für die weitere Protokollentwicklung berücksichtigt werden.

Hierfür wurden sowohl die Permeabilisierung der Zellen mittels Enzymbehandlung als auch verschiedene Strategien zur Verstärkung des Sondensignals evaluiert.

Um möglichst realistische Versuchsbedingungen zu simulieren, wurden *Lactobacillus brevis* (WSB L32) und *Pediococcus damnosus* (WSB SaE) in NBB-B Bouillon angezogen und aus dieser Kultur jeweils 2 ml entnommen und mittels Zentrifugation (5000 x g, 5 min) konzentriert. Um verbleibende Rückstände des Mediums zu entfernen wurde das Zellpellet zweimal in sterilem 1xPBS Puffer gewaschen und final in 180 ml Lagerbier resuspendiert. Diese Suspension wurde für 3 Wochen bei 4°C aufbewahrt und parallel zu Zellen, die sich in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase befanden in die folgenden Versuchsreihen eingesetzt.

C.2.2.2.1 Permeabilisierung der Zellen mittels Enzymbehandlung

Um einen homogenen Zellaufschluss zu erzielen (C.2.1) und die Enzymbehandlung von Seiten der Handhabung möglichst günstig im Protokollverlauf zu verankern wurde evaluiert, ob prinzipiell auch unfixierte Zellen enzymatisch behandelt werden können und die Fixierung mittels EtOH_{abs.} im Anschluss daran erfolgen kann.

Eigene Vorarbeiten (Thelen, 2002) hatten gezeigt, dass für eine homogene Permeabilisierung von EtOH-fixierten Laktobazillen und Pediokokken auf Objektträgern eine 10-minütige Enzymbehandlung mit Lysozym (1 mg/ml, B10.2) bei RT ausreichend war.

Diese Enzymkonzentration wurde auch für den nachfolgenden Versuch verwendet und die Behandlung von unfixierten und EtOH-fixierten Zellen parallel untersucht.

Die Zellen wurden auf den Membranfilter filtriert und die Enzymbehandlung wurde direkt im Anschluss im Filtrationsturm durchgeführt. Um die Filtermembran

C. Ergebnisse

vollständig mit Enzymlösung zu benetzen, wurde das applizierte Volumen pro Filtermembran von 40 µl (B.8.4.1) auf 500 µl erhöht.

Die Inkubation wurde in Zeitschritten von 5 min, 7 min, 10 min und 15 min bei RT durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Enzymlösung via Filtration entfernt und die Reaktion durch Zugabe von 100 µl EtOH_{abs.} abgestoppt.

Die FISH-Analyse erfolgte wie unter C.2.1 beschrieben.

In einer vergleichenden Beurteilung erwies sich eine 7-minütige Enzymbehandlung von unfixierten exponentiell und stationär gewachsenen *Lactobacillus brevis* (WSB L32) sowie *Pediococcus damnosus* (WSB SaE) als optimaler Zellaufschluss. Über 95 % aller Zellen wurden über diese Behandlung für Sonden permeabilisiert. Keine der weiteren untersuchten Optionen (5 min, 10 min und 15 min Inkubation bei RT) erbrachte ein vergleichbares Ergebnis und die Permeabilisierung der Zellen fiel schlechter aus (Daten nicht gezeigt).

Die Permeabilisierungsbedingungen (500 µl Lysozym, 7 min Inkubation bei RT) wurden für alle nachfolgenden Versuche beibehalten.

C.2.2.2.2 Strategien zur Verstärkung des Sondensignals

Zu Verstärkung des Sondensignals wurden eine Verlängerung der SONDENSEQUENZ der Sonde Lbbr465 von 18 Basen auf 20 Basen, eine Doppel-Markierung des Oligonukleotids Pela761 (6-FAM am 5' und 3' Ende) sowie der parallele Einsatz von bis zu 3 FAM-markierten Sonden (LGCa354, Pela761 und Lbbr465) untersucht (B.8.2). Diese Strategien wurden zudem auch mit einer Erhöhung der Sondenkonzentration von 100 ng/µl auf 150 ng/µl und 200 ng/µl kombiniert.

Alle drei Varianten wurden auf exponentiell und stationär gewachsenen *Lactobacillus brevis* (WSB L32) und *Pediococcus damnosus* (WSB SaE) Zellen sowie auf den *Lb. brevis*-Zellen, die für 3 Wochen in Bier gelagert wurden, angewendet. Die Signalintensitäten wurden visuell und mittels ChemScan RDI bewertet. Tabellen C.5, C.6 und C.7 fassen die Ergebnisse der visuellen Beurteilungen und der durchschnittlich am ChemScan RDI gemessenen Fluoreszenzintensitäten zusammen.

C. Ergebnisse

Tabelle C.5: Fluoreszenzintensitäten der verlängerten Sonde Lbbr465

Konzentration Sondenlösung:	100 ng/μl		150 ng/μl		200 ng/μl	
	Lbbr465	Lbbr465+2	Lbbr465	Lbbr465+2	Lbbr465	Lbbr465+2
Sonde:						
<i>Lb. brevis</i> , exponentiell	++/120	+++/160	++/150	+++/180	+++/180	+++/>200
<i>Lb. brevis</i> , stationär	+/80	+/90	+/95	++/130	++/130	+++/>200
<i>Lb. brevis</i> , gelagert in Bier	+/75	+/80	+/80	++/110	+/85	++/130

Legende: (visuelle Beurteilung der Signalintensitäten/ gemessene Fluoreszenzintensitäten ChemScan RDI) - = kein Signal, 0 = Schatten, + schwaches Signal, ++ = helles Signal, +++ = sehr helles Signal

Das Intensitätsmaximum wurde mittels verlängerter Sonde Lbbr465+2 bei einer Konzentration von 200 ng/μl erzielt (s. auch Abb. C.6, Bild A).

Tabelle C.6: Fluoreszenzintensitäten der doppelt FAM-markierten Sonde Pela761

Konzentration Sondenlösung:	100 ng/μl		150 ng/μl		200 ng/μl	
	Pela761 1x FAM	Pela761 2x FAM	Pela761 1x FAM	Pela761 2x FAM	Pela761 1x FAM	Pela761 2x FAM
Sonde:						
<i>Lb. brevis</i> , exponentiell	++/120	+++/>200	+++/180	+++/>200	+++/190	+++/>200
<i>P. damnosus</i> , exponentiell	++/110	+++/200	+++/180	+++/>200	+++/200	+++/>200
<i>Lb. brevis</i> , stationär	+/75	+++/>200	+/95	+++/>200	++/145	+++/>200
<i>P. damnosus</i> , stationär	+/70	+++/>200	+/90	+++/>200	++/140	+++/>200
<i>Lb. brevis</i> , gelagert in Bier	+/70	++/120	+/80	++/140	++/120	+++/>200

Legende: (visuelle Beurteilung der Signalintensitäten/ gemessene Fluoreszenzintensitäten ChemScan RDI) - = kein Signal, 0 = Schatten, + schwaches Signal, ++ = helles Signal, +++ = sehr helles Signal

Das Intensitätsmaximum wurde mittels doppelt-markierter Sonde Pela761 bei einer Konzentration von 200 ng/μl erzielt (s. auch Abb. C.6, Bild A).

Tabelle C.7: Fluoreszenzintensitäten von mehreren parallel eingesetzten Sonden

Konzentration Sondenlösung:	jeweils 100 ng/μl		jeweils 150 ng/μl		jeweils 200 ng/μl	
	Pela761	LGCa354 Pela761 Lbbr465	Pela761	LGCa354 Pela761 Lbbr465	Pela761	LGCa354 Pela761 Lbbr465
Sonden:						
<i>Lb. brevis</i> , exponentiell	++/120	+++/200	+++/180	+++/>200	+++/190	+++/>200
<i>P. damnosus</i> , exponentiell	++/110	+++/200	+++/180	+++/>200	+++/200	+++/>200
<i>Lb. brevis</i> , stationär	+/75	+++/190	+/95	+++/>200	++/145	+++/>200
<i>P. damnosus</i> , stationär	+/70	++/150	+/90	++/170	++/140	+++/>200
<i>Lb. brevis</i> , gelagert in Bier	+/70	+++/190	+/80	+++/>200	++/120	+++/>200

Legende: (visuelle Beurteilung der Signalintensitäten/ gemessene Fluoreszenzintensitäten ChemScan RDI) - = kein Signal, 0 = Schatten, + schwaches Signal, ++ = helles Signal, +++ = sehr helles Signal

C. Ergebnisse

Das Intensitätsmaximum wurde mittels parallelem Einsatz von bis zu 3 FAM-markierten Sonden (LGCa354, Pela761 und Lbbr465) für alle *Lb. brevis*-Fixierungen bei einer Konzentration von 150 ng/μl und für alle *P. damnosus*-Fixierungen bei einer Konzentration von 200 ng/μl erzielt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde als Standardbedingung die Sondenlösung für alle nachfolgenden Versuche in einer Konzentration von 200 ng/μl eingesetzt und präferentiell Oligonukleotide der Länge ≥ 20 Basenpaare verwendet.

C.2.3 Etablierung einer Gegenfärbung zur Maskierung bierspezifischer Autofluoreszenzen

Bevor Realproben aus der Brauerei untersucht wurden, sollte in diesem Versuch überprüft werden, ob durch Bierinhaltsstoffe das Signal/Rausch Verhältnis für eine Auswertung mittels ChemScan RDI negativ beeinflusst werden konnte. Hierfür wurden exemplarisch als Referenz verschiedene filtrierbare Biere (z. B. Lagerbier, Helles, Pilsnerbier) aus unterschiedlichen europäischen Brauereien mit dem zur Analyse von Einzelzellen optimierten FISH-Protokoll (C.2.2) untersucht.

Für die untersuchten deutschen Biere wurde kein störender Einfluss festgestellt. Durchschnittlich wurden mittels ChemScan RDI 5 bis 10 Partikel auf 100 ml filtriertes Bier detektiert. Im Gegensatz dazu wurden in Lagerbieren aus England, Holland, Belgien, Polen, Spanien und Tschechien zwischen 100 und 10000 Partikel und Hefen auf 100 ml filtriertes Bier detektiert.

Da diese Partikel ähnlich hohe Fluoreszenzintensitäten aufwiesen und zum Teil auch der gleichen Größe entsprachen wie markierte Zellen, wurden diese mittels ChemScan Software (B.9.2.2) als falsch-positiv gewertet (Abb. C.6, Bild C). Über eine visuelle Auswertung konnten diese Partikel oder Hefen jedoch eindeutig von markierten Zellen diskriminiert werden.

Europäische Biere werden im Gegensatz zu den meisten deutschen Bieren generell nicht nach dem Reinheitsgebot gebraut. D. h., dass diese Biere, neben den über das deutsche Reinheitsgebot spezifizierten Rohstoffen Hopfen, Malz und Brauwasser auch weitere Zusatzstoffe wie z. B. Enzyme, Fällungs- und Flockungsmittel, Stabilisatoren sowie Konservierungsmittel beinhalten können. Auch thermische Konservierungsverfahren (wie Kurzzeiterhitzung und Pasteurisierung) werden standardmäßig zur Haltbarmachung eingesetzt und können das Präzipitieren von Bierkomponenten (wie z. B. Proteinen) verursachen.

C. Ergebnisse

Da über eine schwache chemische (z. B. mittels NaOH oder HCl) oder enzymatische (z. B. Proteinase K) Vorbehandlung keine effektive Beseitigung der Partikel erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde im Nachfolgenden versucht, die Partikel über eine Gegenfärbung zu maskieren und auf diese Weise von der Detektion mittels ChemScan RDI auszuschließen. Hierfür wurden unterschiedliche Farbstoffe und Färbelösungen ausgewählt, die vornehmlich verschiedene Proteine anfärben.

Die verschiedenen Farbstoffe (B.10.1) wurden generell auf Ihre Eignung zur Maskierung der Partikel überprüft. Dazu wurde Bier, welches die oben beschriebenen Partikel aufwies, hybridisiert (C.2.2) und im Anschluss mit jedem der aufgeführten Farbstoffe gegengefärbt (Konzentrationen siehe Tabelle G.4, Anhang, Seite 168). Hierbei wurde evaluiert, ob der Farbstoff die Partikel färbte, keinen Einfluss hatte oder zusätzlich selbst Autofluoreszenzen verursacht. Tabelle G.4 fasst die Ergebnisse zusammen. Mit den Farbstoffen Chlorazol-Schwarz, Acid Violet, Evan´s Blue und Hämatoxylinlösung konnte eine unterschiedlich starke Maskierung der Partikel erzielt werden. Im direkten Vergleich der vier Farbstoffe erwies sich 0,1 %-ige Evan´s Blue Lösung als am effektivsten (Abb. C.6, Bilder D bis F). Über diese Färbung konnte 99 % aller Partikel maskiert werden und wurden von der ChemScan Software nicht mehr als falsch-positiv detektiert.

Auch autofluoreszente Hefezellen wurden über diese Färbung nahezu vollständig maskiert (Abb. C.6, Bild D).

Um einen möglichen Einfluss der Färbung auf die Signalintensität von Zielzellen zu überprüfen, wurden diese Bierproben in weiteren Versuchen künstlich mit *Lactobacillus brevis* (WSB L32) und *Pediococcus damnosus* (WSB SaE) Zellen kontaminiert, im Anschluss hybridisiert und mit 0,1 %-iger Evan´s Blue Lösung gegengefärbt. Dabei wurde kein negativer Einfluss der Gegenfärbung auf das FISH-Sondensignal detektiert (Abb. C.6, Bilder E und F).

C. Ergebnisse

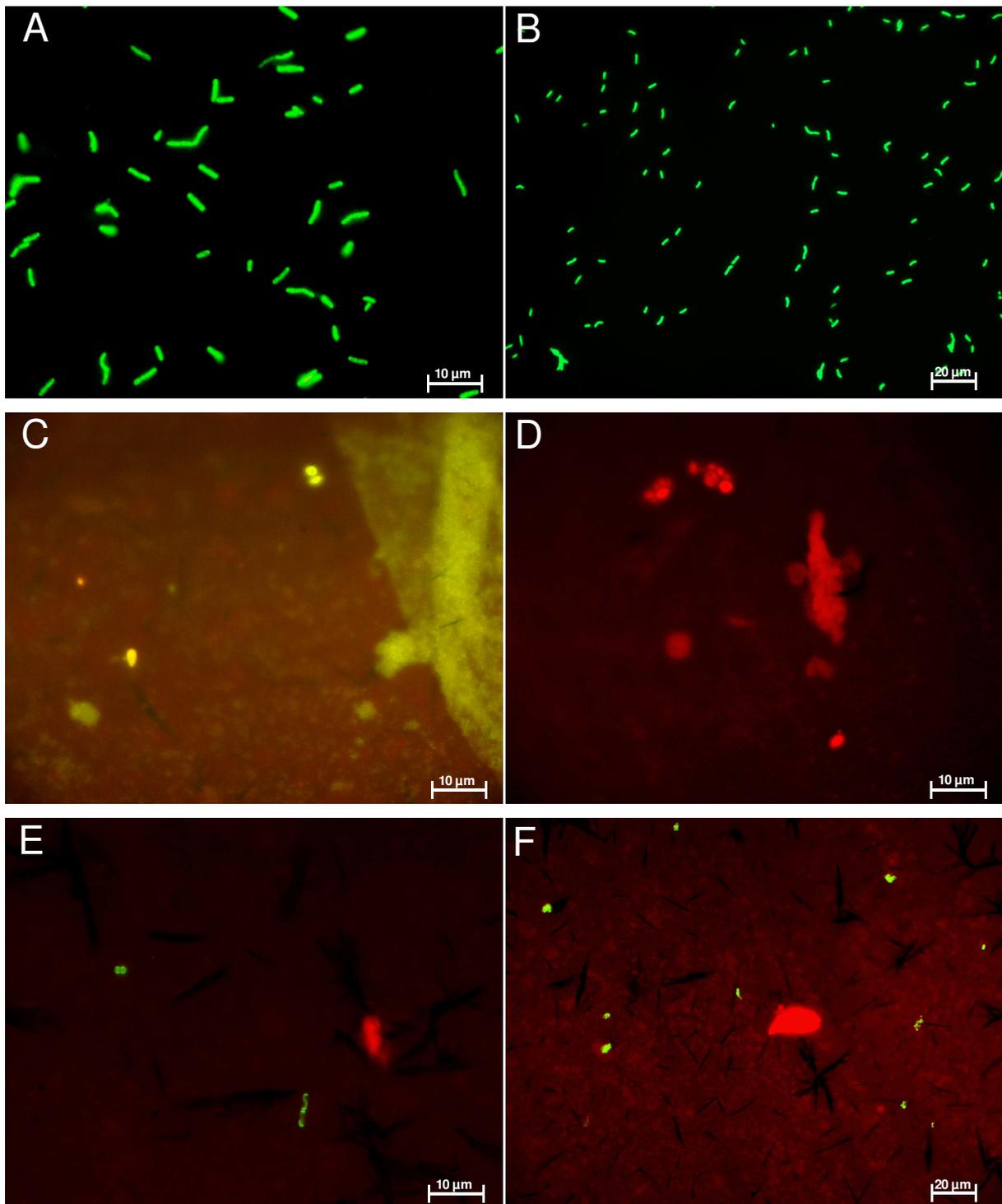


Abbildung C.6: Dokumentation bierschädliche Bakterien auf Polyestermembranen

Epifluoreszenzaufnahmen A, C, D und E wurden bei einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung und Epifluoreszenzaufnahmen B und F bei einer 650-fachen Gesamtvergrößerung fotografiert.

A: EtOH-Fixierung von *Lactobacillus brevis*. *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Lbbr465+2 (Konzentration: 200 ng/μl) **B:** EtOH-Fixierung von *Lactobacillus brevis*. *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Pela761 mit 3' und 5' FAM-Markierung (Konzentration: 200 ng/μl) **C:** Autofluoreszenz von Partikeln und Hefezellen in realer Bierprobe. *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Pela761-FAM (Konzentration: 200 ng/μl) **D:** Probe und *in situ* Hybridisierung wie C, Gegenfärbung der Partikel und Hefezellen mit 0,1 %-iger Evan's Blue Lösung **E:** und **F:** Künstlich kontaminierte Bierprobe. *In situ* Hybridisierung mit der Sonde Pela761-FAM (Konzentration: 200 ng/μl) und Gegenfärbung der Partikel mit 0,1 %-iger Evan's Blue Lösung

C.2.4 Überprüfung der Spezifität

Die Sonde Pela761 erfasst bis auf *Lactobacillus coryniformis* und *Lb. backii* alle relevanten, Gram-positiven bierschädlichen Bakterien. Zusätzlich werden auch diverse andere nicht bierschädliche Milchsäurebakterien von dieser Sonde detektiert. Die Spezifität dieser Sonde wurde bereits in Vorstudien umfangreich überprüft (Thelen, 2002). Im Nachfolgenden wurde deshalb explizit untersucht, ob sich die durchgeführten Protokolloptimierungen (z. B. Erhöhung der Sondenkonzentration) negativ auf die Sondenspezifität auswirken.

Aus den in Tabelle G.5 (Anhang, Seite 169) aufgeführten Daten konnte ermittelt werden, dass die Sonde Pela761 auch bei einer Konzentration von 200 ng/μl spezifisch eingesetzt werden kann.

C.2.5 Analyse von chemisch und thermisch inaktivierten Zellen

Die chemische und thermische Inaktivierung von *Lactobacillus brevis* (WSB L32), *Pediococcus damnosus* (WSB SaE) und *Enterobacter aerogenes* (DSM 30053) Zellen erfolgte wie unter B.3.7 beschrieben.

Diese Zellen wurden mittels FISH-Analyse (C.2.2 und C.2.3), ChemChrome V6 Vitalitätsfärbung (B.9.2.4) und mittels Plattierung auf NBB-Agar (bierschädliche Bakterien) und M1-Agar (*En. aerogenes*) untersucht.

Die nachfolgende Tabelle C.8 fasst die erhaltenen Ergebnisse für die FISH-Analyse und die Vitalitätsfärbung mittels ChemChrome V6 zusammen.

Tabelle C.8: Fluoreszenzintensitäten von chemisch und thermisch inaktivierten Zellen

Inaktivierung:	Autoklavieren		Erhitzung		Chlorierung	
	FISH	ChemChrome V6	FISH	ChemChrome V6	FISH	ChemChrome V6
<i>Lb. brevis</i>	+ / <70	- / <20	++ / <100	- / <20	0 / <40	- / <20
<i>P. damnosus</i>	+ / <70	- / <20	+++ / <100	- / <20	0 / <40	- / <20
<i>En. aerogenes</i>	- / <20	- / <20	+ / <100	- / <20	0 / <40	- / <20

Legende: (visuelle Beurteilung der Signalintensitäten/ gemessene Fluoreszenzintensitäten ChemScan RDI) = kein Signal, 0 = Schatten, + schwaches Signal, ++ = helles Signal, +++ = sehr helles Signal

Die parallel durchgeführte Plattierung aller behandelten Zellsuspensionen wies eine 100 %-ige Inaktivierung (kein Wachstum) auf.

C.2.6 Etablierung einer automatischen Auswertung mittels

ChemScan RDI

Die automatische Quantifizierung der gemessenen Fluoreszenzsignale erfolgte mit der Software „ChemScan“ (B.9.2.2). In dieser Software wurde eine Applikation erstellt, mit der die FISH-Sondensignale von Partikeln automatisch diskriminiert werden konnten. Die Parameter, die zur Unterscheidung von Signalen und Nichtsignalen verwendet wurden, waren das Farbverhältnis, die Farbverteilung, die Fluoreszenzintensität, die Signalform und Signalgröße. Signale, die außerhalb der festgelegten Toleranzbereiche lagen, wurden als nicht valide ausgeschlossen.

Zur Validierung der Applikation wurden negative und künstlich kontaminierte Bierproben mittels optimiertem FISH-Protokoll hybridisiert (C.2.2 und C.2.3) und die zur Diskriminierung festgelegten Schwellenwerte wurden über eine mikroskopische Evaluierung (B.9.2.3) verifiziert. Durch die definierten Parameter (G.6, Anhang, Seite 170) wurden über 95 % der Zielzellen automatisch detektiert.

C.2.7 Validierung des Protokolls an Bierproben

Um die Nachweisgenauigkeit des entwickelten Protokolls zu bestimmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 60 Bierproben aus dem laufenden Betrieb verschiedener deutscher Brauereien untersucht. Dabei wurden jeweils 100 ml Bierprobe direkt mittels FISH-Analyse (C.2.2 und C.2.3) und ChemChrome V6 Vitalitätsfärbung (B.9.2.4) sowie nach NBB-Anreicherung (B.3.5) untersucht.

Mittels klassischem Nachweis in NBB Medium wurden in 11 von 60 Bierproben (18,3 %) bierschädliche Bakterien nachgewiesen. In der parallel durchgeführten FISH-Analyse wiesen 14 (23,3 %) und mittels Vitalitätsfärbung 39 (63,3 %) der 60 analysierten Bierproben einen positiven Befund auf.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle G.7 des Anhangs (Seite 170) zusammengefasst.

C.3 Protokollentwicklung zur Hybridisierung von *Cronobacter* spp. Zellen in flüssiger Phase

Die mikrobielle Routineanalytik in der Lebensmittelindustrie ist in vielen Bereichen mit einem hohen Probenaufkommen (> 100 Proben pro Tag) konfrontiert, welches schnell und möglichst parallel abgearbeitet werden muss. Um die Verarbeitung eines derartig großen Probendurchsatzes (high-throughput) mit einem molekularbiologischen Schnellnachweissystem zu realisieren, bietet sich als Reaktionsformat die Mikrotiterplatte an. In Standardausführung können hiermit bis zu 96 Analysen parallel durchgeführt werden. Die Voraussetzung zum Einsatz dieses Reaktionsformats ist, dass die Analysen in Suspension durchführbar sind.

Protokolle zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in flüssiger Phase wurden bereits für eine Detektion mittels Durchflusszytometer etabliert (Wallner *et al.*, 1995 und Thelen, 2002). Diese basieren auf dem Reaktionsmechanismus der Standard-FISH-Technik (A.1). Alle Schritte der Hybridisierungsreaktion wurden dabei nahezu unverändert vom Format Objektträger auf das Format Reaktionsgefäß übertragen und die verschiedenen Lösungen via Zentrifugation entfernt. Konzeptionell sind diese Protokolle für die Bearbeitung von einzelnen Analysen ausgerichtet.

In dieser Arbeit wurde daher der Fokus auf die Entwicklung eines high-throughput Protokolls im Mikrotiterplattenformat gelegt, mit dem möglichst einfach, ohne komplexe Geräteausstattung (wie z. B. Mikrotiterplatten-Zentrifuge) und mit objektiver automatischer Auswertung am Mikrotiterplatten-Fluorometer ein Schnellnachweis von *Cronobacter* spp. (A.4.3) in Milchpulverproben realisiert werden kann.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Lösung wurde dazu mit einem statischen Fluoreszenzquenching-Verfahren (A.3) kombiniert und ein neuer Reaktionsmechanismus entwickelt.

C.3.1 *In silico* und *in situ* Überprüfung der Spezifität der Sonde Esak997

Die Sonde Esak997 (B.8.2) wurde 2004 von der vermicon AG zum spezifischen Nachweis von *Enterobacter sakazakii* entwickelt. Um deren Spezifität nach der Re-Klassifizierung von *Enterobacter sakazakii* als *Cronobacter* spp. (s. A.4) zu evaluieren, wurde ein *in silico* (B.7.4.3) und ein *in situ* (B.8.3) Abgleich auf allen zur

C. Ergebnisse

Verfügung stehenden *Cronobacter*-Arten (Sequenzen = ARB Silva, Version: SSU-Ref_94SILVA_04_04_ und Stämme = Tabelle B1) mit dieser Sonde durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die Sonde Esak997 *in silico* und *in situ* alle bis dato beschriebenen *Cronobacter*-Arten als Gattungsspezifische Sonde nachweist (Sondenmatch siehe auch Tabelle G.8, Anhang, Seite 172; *in situ* Nachweis = Daten nicht gezeigt).

C.3.2 Konstruktion von Quenchersonden

Die Quenchersonden wurden wie unter B.7.4.3 beschrieben, konstruiert und mit verschiedenen Quenching-Farbstoffen markiert (Tabelle B.7).

Tabelle C.9 fasst die verwendeten Sonden sowie die in dieser Arbeit entwickelten korrespondierenden Quenchersonden zusammen. Des Weiteren sind in dieser Tabelle auch die Markierungspositionen des Fluoreszenzfarbstoffes oder Quenchingfarbstoffes am 3' oder 5' Ende der Oligonukleotide ausgewiesen.

Die Sonde Esak997 wurde für die Hybridisierung in Lösung am 3' Ende um eine Base verkürzt und zur Differenzierung als Esak997-3 bezeichnet. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich insbesondere GC-reiche Stellen am Ende des Oligonukleotids negativ auf die Trennung des Sonden/ Quenchersonden Hybrids auswirken können (Daten nicht gezeigt).

Tabelle C.9: Übersicht verwendete Sonden und korrespondierende Quenchersonden

Sonde/ Quenchersonde	Sequenz (5'-->3')	Basen- anzahl	T _M [°C]	GC- Gehalt [%]	Position der Modifikation (5' oder 3' Ende) ³⁾
Esak997 ¹⁾	ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG	20	52	50	5'
Esak997-3 ¹⁾	ATC TCT GCA GGA TTC TCT G	19	43	47	5'
Quen1-Esak997-3 ²⁾	TAG AGA CGT CCT AAG AGA C	19	43	47	5'
Quen2-Esak997-3 ²⁾	CAG AGA ATC CTG CAG AGA T	19	43	47	5'
Quen3-Esak997-3 ²⁾	CAG AGA ATC CTG CAG AGA T	19	43	47	3'
EUB338 ¹⁾	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	18	55	67	5'
Quen-EUB338 ²⁾	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	18	55	67	5'

Legende: ¹⁾ Sonde, ²⁾ Quenchersonde, ³⁾ Markierungsposition des Farbstoffes oder Quenchers

C.3.3 Entwicklung eines high-throughput tauglichen Protokolls zur Hybridisierung in Lösung

C.3.3.1 Theoretische Konzeptionierung der Hybridisierungsstrategien

Zur Kombination der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit einem statischen Fluoreszenzquenching Verfahren (A.3), wurden theoretisch zwei mögliche Strategien für eine Hybridisierung in Lösung definiert, die im weiteren Verlauf experimentell überprüft werden sollten.

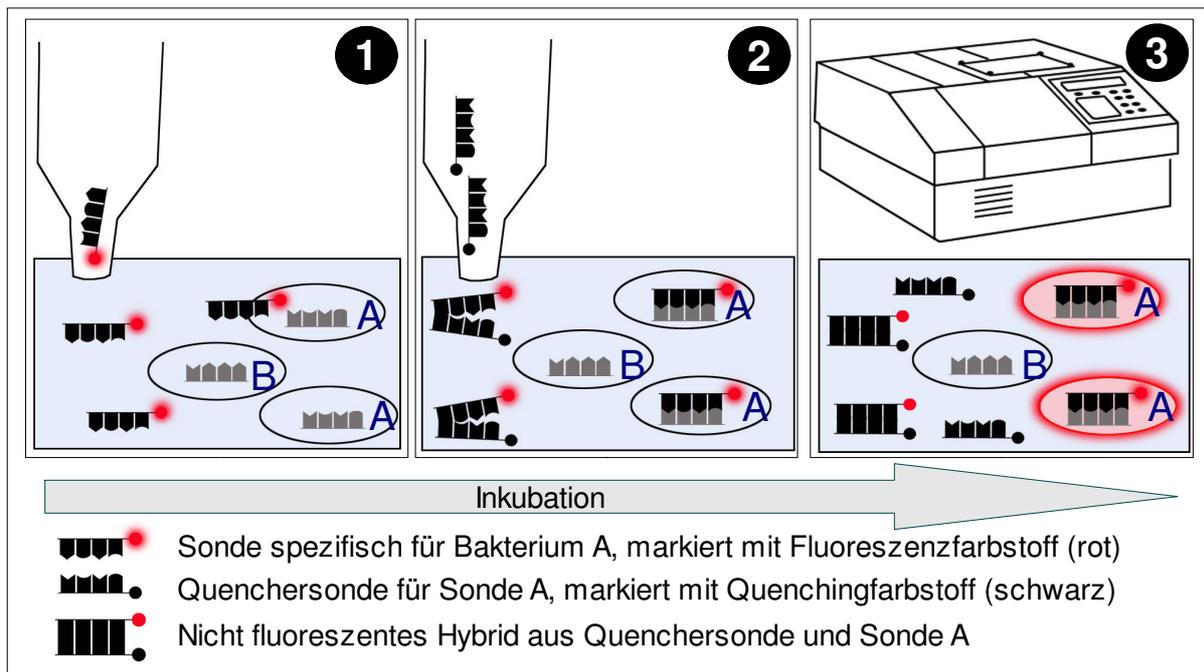


Abbildung C.7: Hybridisierung in Lösung kombiniert mit Fluoreszenzquenching Strategie A

Strategie A (Abb. C.7) basierte auf der typischen Reaktionskinetik der Standard-FISH-Technik (A.1). Im ersten Schritt diffundieren die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sonden zu ihren Bindungsstellen auf der rRNS und binden an diese (Abb. C.7, Bild 1). Ungebundene und überschüssige Sonden werden bei der Standard-FISH-Technik über einen stringenten Waschschrift entfernt (siehe auch B.8.5). Dieser Waschschrift soll in Strategie A durch das Fluoreszenzquenching ersetzt werden. Dazu werden Quenchersonden, die mit einem nicht fluoreszierenden Quenching-Farbstoff markiert wurden, zugegeben. Diese hybridisieren mit den ungebundenen Sonden und bilden ein nicht fluoreszierendes Hybrid aus (Abb. C.7, Bild 2). Hatten die Sonden zuvor an passenden Zielstellen gebunden, emittieren diese bei Anregung mit Fluoreszenzlicht ein Signal, welches mittels eines

C. Ergebnisse

Mikrotiterplatten-Fluorometers gemessen wird. Sind keine entsprechenden Zielstellen für die Sonden vorhanden, werden die Sonden von den Quenchersonden gebunden und ihr Fluoreszenzsignal in der Lösung ausgelöscht (Abb. C.7, Bild 3).

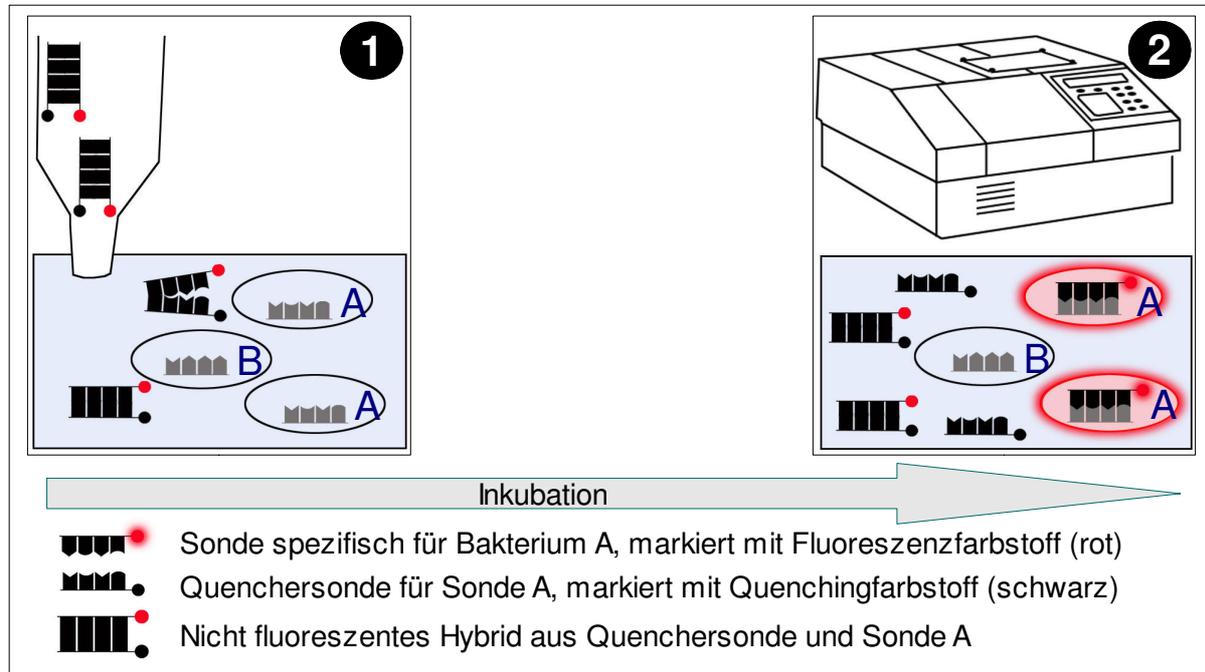


Abbildung C.8: Hybridisierung in Lösung kombiniert mit Fluoreszenzquenching Strategie B

Dem gegenüber verfolgt Strategie B ein anderes Modell zur Hybridisierung in Lösung (Abb. C.8). Im ersten Schritt wird ein nicht fluoreszierendes Hybrid aus einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Sonde und einer mit einem Quenching-Farbstoff gekoppelten Quenchersonde zugegeben (Abb. C.8, Bild 1). Im Fall, dass Zellen mit Bindungsstelle für die entsprechenden Sonden vorhanden sind, dissoziiert das Hybrid in Sonde und Quenchersonde. Die Sonden binden an die Zielstellen auf der rRNA innerhalb der Zellen und die Quenchersonden verbleiben ungebunden in der Lösung. Sofern keine Zellen mit passender Sondenbindungsstelle vorhanden sind, verbleibt das Hybrid im nicht fluoreszierenden Ausgangszustand in der Lösung. Die Fluoreszenzsignale werden bei Strategie B ebenfalls mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer detektiert (Abb. C.8, Bild 2).

C.3.3.2 Selektion des Hybridisierungspuffers

Da im Vorfeld keine Aussage über die Reaktionskinetik von Hybridisierungsstrategie A und B getroffen werden konnte, wurden verschiedene Puffersysteme als Reaktionsraum für die Hybridisierung in Lösung evaluiert.

C. Ergebnisse

Dafür wurden Standardhybridisierungspuffer (0 % und 20 % Formamid, B.8.3), Standardwaschpuffer (für 0 % FA mit 0,9 mol NaCl und für 20 % FA mit 0,225 mol NaCl, B.8.3), 1-fach PCR-Reaktionspuffer (Promega, B.10.1), modifizierter PCR-Puffer (B.10.1) sowie Carbonatpuffer überprüft.

Zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenzintensitäten wurden die Sonden EUB338-FAM, EUB338-CY3, EUB338-TAMRA sowie Esak997-3-CY3 und Esak997-3-TAMRA jeweils alle in der Konzentration 50 ng/µl im Verhältnis 1:9 in den entsprechenden Puffern resuspendiert (Endkonzentration der Sonde: 5 ng/µl).

Die Fluoreszenzintensitäten jedes Puffers wurden auch ohne Sondenzugabe als Nullwert bestimmt. Die Fluoreszenzsignale wurden mittels Flx800 Mikrotiterplatten-Fluorometer detektiert (B.9.3). Die Messung erfolgte von oben in die Mikrotiterplatte (B.10.2) hinein und die Fluoreszenzverstärkung des Mikrotiterplatten-Fluorometers wurde für alle durchgeführten Messungen auf den Gain 80 fixiert. Der Fluoreszenzfarbstoff FAM wurde mit der Filterkombination FAM (B.9.3) und die Fluoreszenzfarbstoffe CY3 und TAMRA mit der Filterkombination TAMRA/CY3 (B.9.3) vermessen. Die erhaltenen Messwerte sind in der nachfolgenden Tabelle C.10 zusammengefasst.

Tabelle C.10: Fluoreszenzmaxima der Sonden EUB338 und Esak997-3 in verschiedenen Puffern

	EUB338-FAM	EUB338-CY3	EUB338-TAMRA	Esak997-CY3	Esak997-TAMRA	Puffer
HP 0 % FA	45589	89457	35372	87623	68147	33
HP 20 % FA	72614	88448	48215	77507	91349	133
WP 0 % FA	53129	99999	41339	99999	83872	63
WP 20 % FA	62144	99999	39550	99999	89055	64
1-fach PCR-Puffer	56141	99999	35452	79725	66861	22
mod. 1-fach PCR-Puffer	43340	73658	26078	69596	60019	24
Carbonat-puffer	59710	99999	35110	99999	87513	74

Legende: HP = Standardhybridisierungspuffer, WP = Standardwaschpuffer

Um die Effektivität der Auslöschung des Sondensignals durch die Quenchersonde (Quenchingeffizienz) zu bestimmen, wurden alle Sonden (Tab. C.10) in der Konzentration 50 ng/µl mit ihrer korrespondierenden Quenchersonde in der Konzentration 100 ng/µl (Tab. C.9) im Verhältnis 1:9 in den entsprechenden Puffern

C. Ergebnisse

resuspendiert (Tab. C.10). Der Quenching-Farbstoff wurde dabei wie in Tabelle B.8 aufgeführt, auf den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff der Sonde angepasst (Tabelle C.11). Die Messung der Quenchingeffizienz erfolgte direkt nach Überführung der Suspensionen in die Mikrotiterplatte. Die Fluoreszenzintensitäten wurden unter den gleichen Messbedingungen evaluiert, die zuvor auch für die Bestimmung der Fluoreszenzmaxima der Sonden herangezogen wurden.

Tabelle C.11: Kombinationen Sonden und Quenchersonden

	EUB338-FAM	EUB338-CY3	EUB338-TAMRA	Esak997-3-CY3	Esak997-3-TAMRA
Quen-EUB338-Dabcyl	x				
Quen-EUB338-BHQ1	x				
Quen-EUB338-BHQ2		x	x		
Quen1-Esak997-3-BHQ2				x	x
Quen2-Esak997-3-BHQ2				x	x
Quen3-Esak997-3-BHQ2				x	x

Legende: x = Sonde und Quenchersonde kombiniert, graue Zelle = Sonde und Quenchersonde nicht kombiniert

Die erhaltenen Messwerte zur Quenchingeffizienz sind in Tabelle G.9 (Anhang, Seite 173) aufgeführt und wurden zusätzlich in der nachfolgender Abbildung C.9 zusammengefasst.

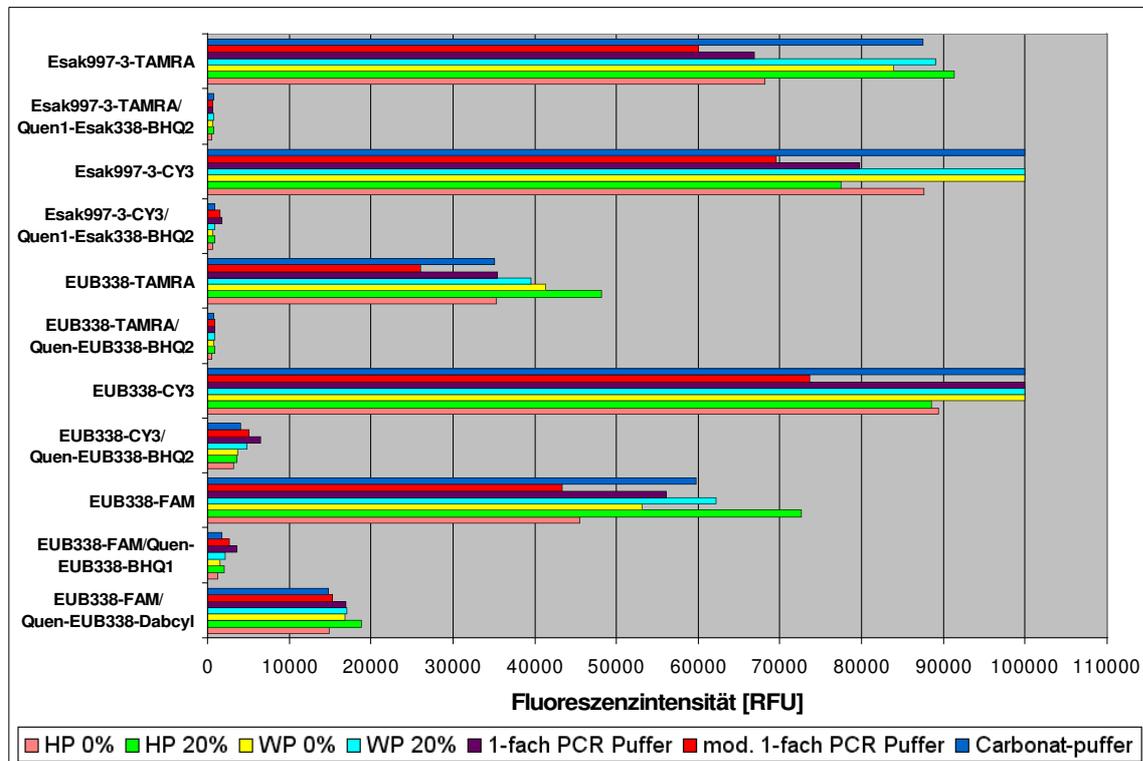


Abbildung C.9: Quenchingeffizienz unterschiedlicher Quenching-Farbstoffe

C. Ergebnisse

Aus den Daten ergab sich, dass in allen Puffersystemen eine Fluoreszenzauslöschung des Sondensignals durch die entsprechende Quenchersonde erfolgte. Dabei war die Quenchingeffizienz in den verschiedenen Puffersystemen und für die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff/ Quenching-Farbstoff Kombinationen (Tab. C.11) unterschiedlich hoch (Abb. C.9).

Kein Fluoreszenzquenching wurde jeweils für die Kombinationen der Sonden Esak977-3-CY3 und Esak977-3-TAMRA mit den Quenchersonden Quen1-Esak997-3-BHQ2 und Quen2-Esak997-3-BHQ2 (Tab. C.9) erhalten (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der zumeist höchsten Quenchingeffizienz in allen Puffersystemen wurde die Fluoreszenzfarbstoff/ Quencher-Farbstoff Kombination TAMRA/BHQ2 für die weiteren Versuche als Standard definiert.

C.3.3.3 Evaluierung des Sonden/ Quenchersonden Verhältnisses

Die Sonden wurden in den entsprechenden Puffern in die Endkonzentrationen 5 ng/μl, 500 pg/μl, 50 pg/μl, 5 pg/μl, 500 fg/μl sowie 50 fg/μl verdünnt und im Anschluss daran vermessen. Die Konzentration 5 ng/μl entspricht dabei der unter C.3.3.2 verwendeten Sondenkonzentration.

Die niedrigste, mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer (Gain 80), messbare Sondenkonzentration, sollte für die Sonden EUB338-TAMRA und Esak977-3-TAMRA gelöst in Standardhybridisierungspuffer mit 0 % Formamid (HP 0 %) und modifiziertem PCR-Puffer bestimmt werden.

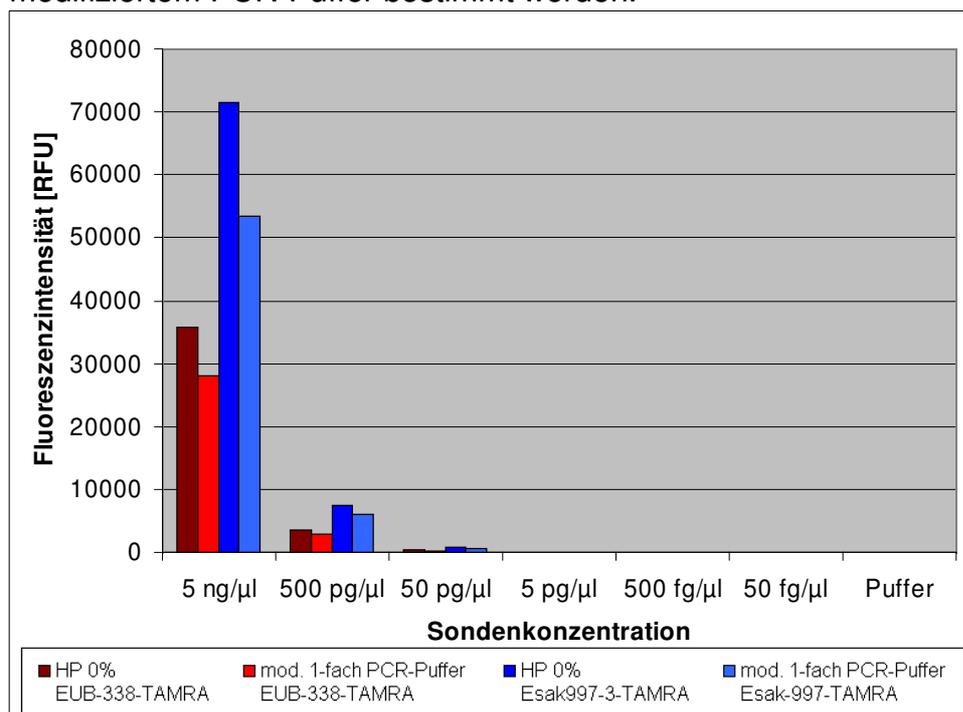


Abbildung C.10: Verdünnungsreihen der Sonden EUB338 und Esak997-3

C. Ergebnisse

Die erhaltenen Messergebnisse zeigen (Abb. C.10), dass die niedrigste Sondenkonzentration, die bei einem Gain von 80 mittels Flx800 Mikrotiterplatten-Fluorometer nachgewiesen werden konnte, 5 ng/μl ist. Die Fluoreszenzintensitäten aller niedrigeren Sondenkonzentrationen näherten sich der Nulllinie.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Sondenkonzentration für alle weiteren Hybridisierungen auf 5 ng/μl fixiert.

In einem weiteren Versuch wurde für diese Sondenkonzentration das optimale Verhältnis der korrespondierenden Quencherprobe ermittelt, bei dem > 95 % des Sondersignals ausgelöscht werden. Dazu wurden die korrespondierenden Quencherproben in den Endkonzentrationen 5 ng/μl, 7,5 ng/μl, 10 ng/μl, 12,5 ng/μl sowie 15 ng/μl in Kombination mit der entsprechenden Sonde (5 ng/μl) eingesetzt.

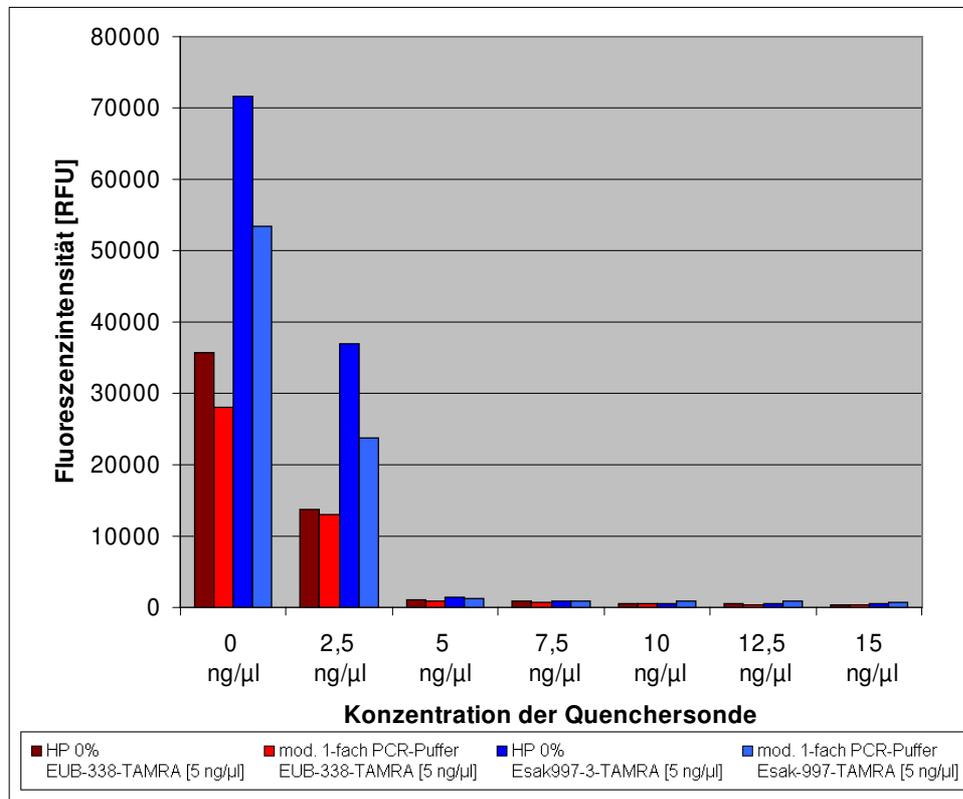


Abbildung C.11: Optimales Sonden/ Quencherproben Verhältnis

Das optimale Verhältnis Sonde zu Quencherprobe wurde exemplarisch für die Sonden/ Quencherproben Kombinationen EUB338-TAMRA/ Quen-EUB338-BHQ2 und Esak977-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 in HP0 % und modifiziertem PCR-Puffer bestimmt (Abbildung C.11).

Tabelle C.12 weist die prozentuale Effizienz des Fluoreszenzquenchings pro entsprechender Konzentration der Quencherprobe aus.

C. Ergebnisse

Tabelle C.12: Prozentuale Quenchingeffizienz

Endkonzentration der Quenchingsonde:	0 ng/μl	2,5 ng/μl	5 ng/μl	7,5 ng/μl	10 ng/μl	12,5 ng/μl	15 ng/μl
HP 0% EUB-338-TAMRA [5 ng/μl]	0,0 %	61,5 %	97,1 %	97,6 %	98,5 %	98,6 %	98,8 %
mod. 1-fach PCR-Puffer EUB-338-TAMRA [5 ng/μl]	0,0 %	53,8 %	96,5 %	97,2 %	98,3 %	98,4 %	98,8 %
HP 0% Esak997-3-TAMRA [5 ng/μl]	0,0 %	48,4 %	98,1 %	98,7 %	99,1 %	99,2 %	99,2 %
mod. 1-fach PCR-Puffer Esak-997-TAMRA [5 ng/μl]	0,0 %	55,6 %	97,8 %	98,3 %	98,3 %	98,5 %	98,6 %

Legende: Die prozentuale Quenchingeffizienz bezieht sich auf die Auslöschung des Sondensignals pro Quenchersondenkonzentration. Grauer Bereich markiert eine Quenchingeffizienz > 95 %

Bei einer Sondenkonzentration von 5 ng/μl wurden ab einer Quenchersondenkonzentration von 5 ng/μl für alle untersuchten Sonden/Quenchersonden Kombinationen eine Quenchingeffizienz von > 95 % erzielt (Tab. 12, grauer Bereich). Unter Verwendung von 10 ng/μl Quencherprobe wurde die Quenchingeffizienz auf > 98 % gesteigert. Quenchersondenkonzentrationen von > 10 ng/μl führten zu keiner weiteren signifikanten Steigerung in der Signalauslöschung.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für alle weiteren Hybridisierungen 10 ng/μl als Standardkonzentration für Quenchersonden definiert.

C.3.3.4 Experimentelle Verifizierung der Hybridisierungsstrategien

Auf Basis der unter C.3.3.2 und C.3.3.3 durchgeführten Experimente wurde im Folgenden ein Versuchsaufbau spezifiziert, über den die generelle Eignung von Strategie A und B (C.3.3.1) zur Hybridisierung in Lösung experimentell überprüft werden konnte.

Als Hybridisierungstemperatur wurde, angelehnt an die zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Objektträgern und Membranfiltern verwendete Temperatur von 46 °C (B.8.3, B.8.4) 45 °C ± 2 °C ausgewählt.

Da im Vorfeld noch keine Aussage zur möglichen Stringenz der Reaktion getroffen werden konnte, wurden zwei Puffer mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration für die Hybridisierung ausgewählt. Zum einen wurde modifizierter PCR-Puffer (B.10.2, NaCl-Konzentration: 50 mM) und zum anderen Standardhybridisierungspuffer mit 0 % Formamid (B.8.3, NaCl-Konzentration: 800 mM) als Puffersystem definiert. Diese

C. Ergebnisse

Puffer wurden im Verhältnis 9:1 mit den Sonden (Endkonzentration: 5 ng/μl) und Quenchersonden (Endkonzentration: 10 ng/μl) kombiniert.

Für die Reaktion wurde ein Gesamtvolumen (Reaktionspuffer/ Sonde/ Quenchersonde) von 100 μl pro Ansatz in die Mikrotiterplatte (B.10.2) eingesetzt.

Als Zielorganismus wurde eine EtOH-Fixierung (B.8.1) von *Cronobacter sakazakii* LMG 2760 verwendet. Als Nichtzielorganismen wurden EtOH-Fixierungen von *Citrobacter freundii* DSM 30039 (4 Basenunterschiede (MM) zur Sondenbindungsstelle), *Enterobacter cloacae* DSM 30054 (4 MM zur Sondenbindungsstelle), *Erwinia chrysanthemii* DSM 4610 (1 MM zur Sondenbindungsstelle) und *Edwardsiella tarda* DSM 30052 (2 MM zur Sondenbindungsstelle) in diesem Versuch mitgeführt.

Im ersten Schritt wurden die fixierten Zellen in der Mikrotiterplatte dehydratisiert (60 °C, 30 min). Für Strategie A wurden 90 μl Reaktionspuffer inkl. Sondenlösung (Endkonzentration Sonde: 5 ng/μl) auf die dehydratisierten Zellen gegeben und die Mikrotiterplatte bei 45 °C für 1,5 h im Hybridisierungssofen (Memmert) inkubiert.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden 10 μl Reaktionspuffer inkl. Quenchersondenlösung (Endkonzentration Quenchersonde: 10 ng/μl) in die Suspension pipettiert und die Inkubation im Hybridisierungssofen fortgesetzt (45 °C für 2,5 h).

Die Fluoreszenzmessung im Mikrotiterplatten-Fluorometer erfolgte direkt nach Zugabe der Sondenlösung (Messpunkt 0 h) sowie nach 0,5 h und 1 h Inkubation. Eine weitere Messung wurden direkt nach Zugabe der Quenchersonde (Messpunkt: 1,5 h) durchgeführt.

Die Kinetik des Fluoreszenzquenchings wurde zusätzlich auch nach 2 h, 2,5 h, 3 h und 4 h Inkubation über weitere Messungen bestimmt.

Der gesamte Reaktionsverlauf der Strategie A ist für den modifizierten PCR-Puffer in Abbildung C.12 und für Standardhybridisierungspuffer mit 0 % Formamid (HP 0 %) in Abbildung C.13 für *C. sakazakii* und die evaluierten Nichtzielorganismen zusammengefasst.

C. Ergebnisse

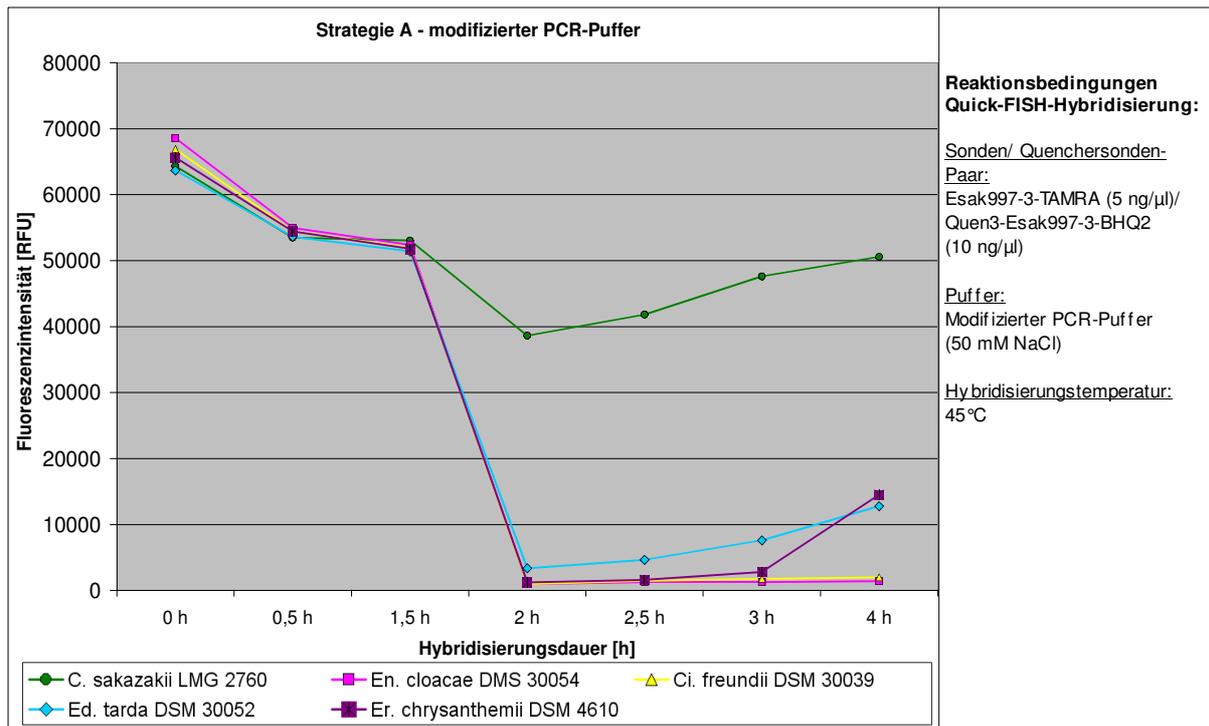


Abbildung C.12: Reaktionskinetik Strategie A in modifiziertem PCR-Puffer

Für Strategie B wurden 100 μl Reaktionspuffer inkl. Sonden- und Quenchersondenlösung (Endkonzentration Sonde: 5 ng/μl/ Quencher-sonde: 10 ng/μl) auf die dehydratisierten Zellen pipettiert und die Mikrotiterplatte bei 46°C für 4 h im Hybridisierungsofen inkubiert. Die Fluoreszenzmessung im Mikrotiterplatten-Fluorometer erfolgte nach Zugabe der Sonden-/ Quencherlösung (Messpunkt 0 h) sowie nach 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h und 4 h Inkubation.

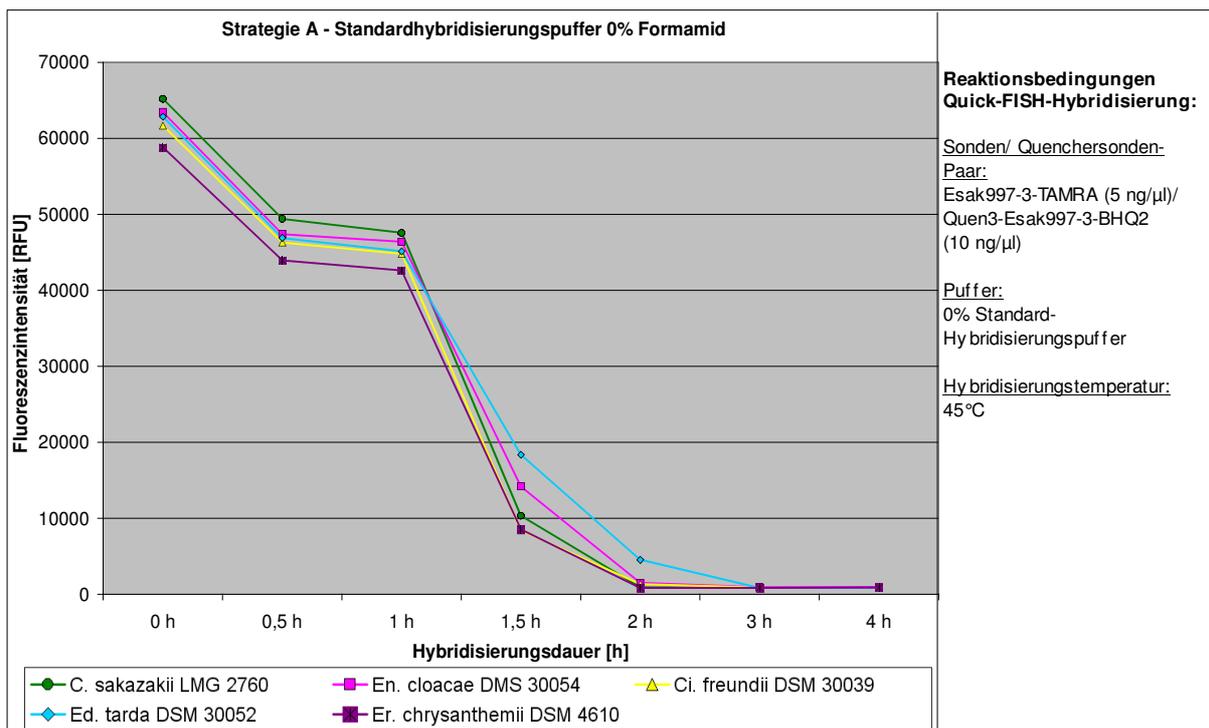


Abbildung C.13: Reaktionskinetik Strategie A in Standardhybridisierungspuffer 0 % Formamid

C. Ergebnisse

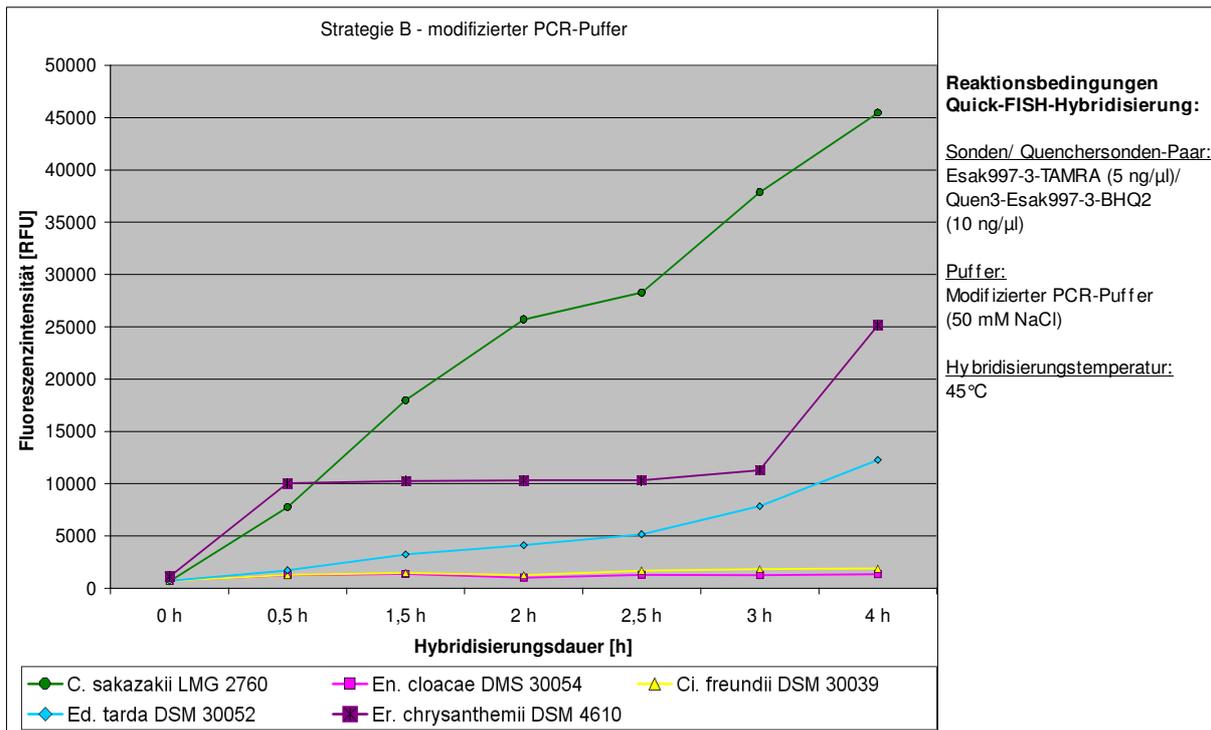


Abbildung C.14: Reaktionskinetik Strategie B in modifiziertem PCR-Puffer

Die Reaktionskinetik der Hybridisierung in Lösung ist für Strategie B für modifizierten PCR-Puffer in Abbildung C.14 und für Standardhybridisierungspuffer mit 0 % Formamid in Abbildung C.15 dargestellt.

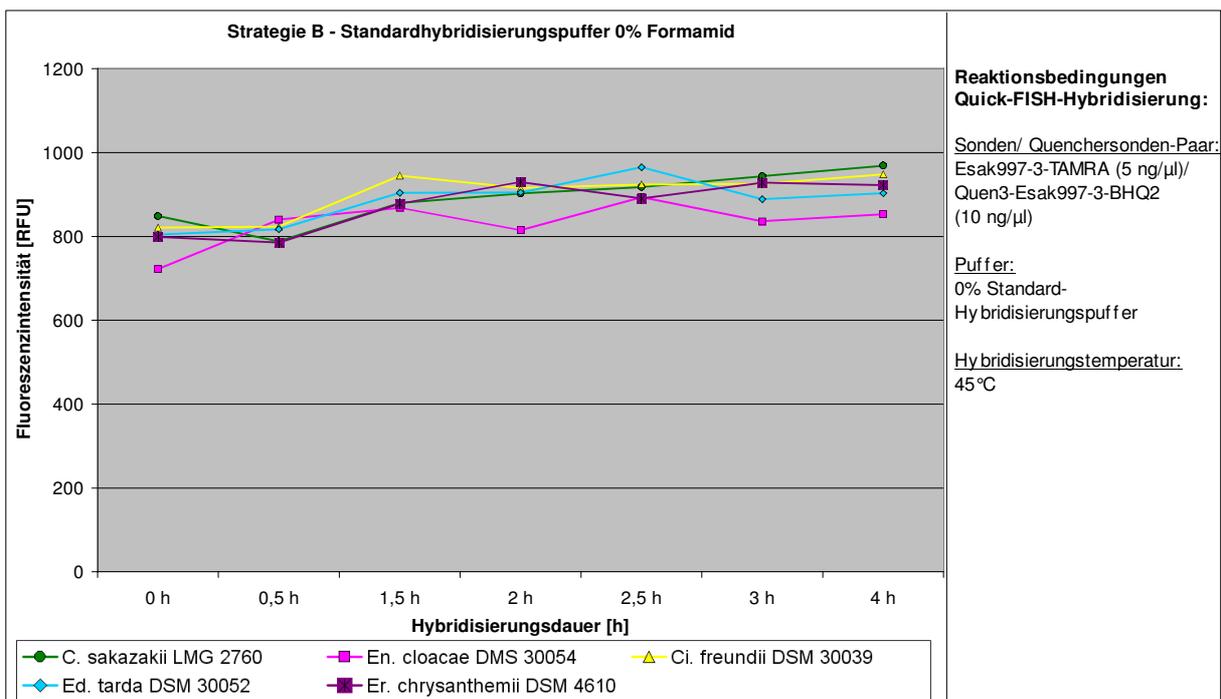


Abbildung C.15: Reaktionskinetik Strategie B in Standardhybridisierungspuffer 0 % Formamid

C. Ergebnisse

Dem Verlauf der Kurven in den Abbildungen C.12 und C.14 ist zu entnehmen, dass ein Nachweis von *C. sakazakii* mittels Strategie A und B in modifiziertem PCR-Puffer prinzipiell möglich ist.

Nach Zugabe der Quenchersonden in den modifizierten PCR-Puffer wurden im Reaktionsverlauf von Strategie A (Abb. C.12, grüne Kurve) für *C. sakazakii* je nach Messpunkt, Fluoreszenzintensitäten zwischen 40000 und 50000 RFU gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten der mitgeführten Nichtzielorganismen lagen im Vergleich < 15000 RFU.

C. sakazakii erreichte nach Strategie B (Abb. C.14, grüne Kurve) im gleichen Puffersystem Fluoreszenzintensitäten von > 45000 RFU. Die Signale der Nichtzielorganismen verblieben im Bezug dazu < 25000 RFU.

Im Gegensatz dazu schlug eine Hybridisierung in Standardhybridisierungspuffer mit 0 % Formamid für beide Strategien fehl (Abb. C.13 und C.15).

Nach Zugabe der Quenchersonden wurden die Signale von Zielorganismus und Nichtzielorganismen in Strategie A gleichermaßen ausgelöscht (Abb. C.13).

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten aller Fixierungen fielen von ihrem Ausgangswert von > 40000 RFU auf ein Niveau von < 1000 RFU.

Für Strategie B verblieben die Fluoreszenzsignale in HP0 % über die gesamte Hybridisierungsdauer für Zielorganismus und Nichtzielorganismen < 1000 RFU.

Als Schlussfolgerung bleibt festzuhalten, dass diese experimentellen Untersuchungen generell die Erwartungen, die aufgrund der vorangegangenen theoretischen Überlegungen an sie gestellt wurden, erfüllten.

Eine erste Unterscheidung von Zielorganismus und Nichtzielorganismen konnte in modifiziertem PCR-Puffer gezeigt werden und ein erster funktioneller „proof of concept“ wurde für beide Strategien erbracht.

Die Methode zur Hybridisierung in Lösung nach Strategie A wurde in dieser Arbeit jedoch nicht mehr weiter untersucht. Der weitere Fokus der Methodenentwicklung wurde auf Strategie B gelegt, da sich diese bei vergleichbarer Hybridisierungsdauer durch eine einfachere Handhabung und ein kürzeres Protokoll auszeichnete.

Basierend auf dem Reaktionsmechanismus wird Strategie B im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „quenching induzierte Kontakt Verdrängungs“-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (quenching induced contact competition) oder abgekürzt als Quick-FISH bezeichnet.

C.3.3.5 Aufbereitung der Zellen zur Hybridisierung in der Mikrotiterplatte

Um zu evaluieren in welcher Art und Weise die Zellen für die Penetration der Sonden in die Mikrotiterplatte appliziert werden müssen, wurden im nachfolgenden Versuch verschiedene Fixierungs- und Dehydratisierungsvarianten verifiziert. Das Sonden/Quenchersonden-Paar EUB338-TAMRA/ Quen-EUB338-BHQ2 wurde unter Standardbedingungen (C.3.3.2 bis C.3.3.4) für diese Hybridisierung verwendet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in den gleichen Intervallen wie unter C.3.3.4 beschrieben.

EtOH-Fixierungen (B.8.1) von *Cronobacter sakazakii* LMG 2760 und LMG 2766 wurden als Referenzorganismen eingesetzt. Als Variante 1 (Abb. C.16, gelber Kurvenverlauf) wurden diese analog zu C.3.3.4 vor der Zugabe des Reaktionspuffers in der Mikrotiterplatte dehydratisiert (60°C, 30 min). Des Weiteren wurden die Fixierungen auch direkt, ohne vorherige Dehydratisierung, in den Puffer eingesetzt (Abb. C.16, Variante 2, türkiser Kurvenverlauf). Zusätzlich dazu wurde ein entsprechendes Aliquot jeder Fixierung (gleiches Volumen wie für Variante 1 und 2) in der Mikrotiterplatte abzentrifugiert (5 min, 5000 x g, Labofuge 400R, Heraeus), der flüssige Überstand mittels Pipette abgehoben und das Zellpellet in Reaktionspuffer resuspendiert (Abb. C.16, Variante 3, roter Kurvenverlauf).

Um zu untersuchen, ob grundlegend eine EtOH-Fixierung zur erfolgreichen Penetration von Sonden in die Zellen von Nöten war, wurden als Kontrollexperiment unfixierte exponentiell gewachsene Zellen des L1-Organismus *Enterobacter pyrinus* DSM 12410 (Abb. C.16, Variante 4, grüner Kurvenverlauf) in die Hybridisierung eingesetzt. Modifizierter PCR-Puffer wurde als Negativkontrolle mitgeführt (Abb. C.16, grauer Kurvenverlauf).

Betrachtet man die Ergebnisse dieses Versuchs zusammenfassend (Abb. C.16) und setzt sie in Relation zu den maximal nach 4 h Hybridisierung erhaltenen Fluoreszenzsignalen, so erzielten die Varianten 2 und 3 für beide Referenzstämme die höchsten Fluoreszenzsignale (zwischen 18043 RFU und 18833 RFU). Mittels Variante 1 wurde diese Fluoreszenzintensität (18516 RFU) nur für einen der beiden Stämme erreicht (*Cronobacter sakazakii* LMG 2760). Für die zweite Referenz (LMG 2766) wurde nach 4 h Inkubation in etwa eine 70 % niedrigere Fluoreszenzintensität (6636 RFU) gemessen.

Für die unfixierten *En. pyrinus*-Zellen wurde ein Signal von 551 RFU an der Nulllinie des Puffers (502 RFU) erhalten.

C. Ergebnisse

Der direkte Einsatz von EtOH-fixierten Zellen in den Reaktionspuffer (Variante 2) wurde aufgrund der einfacheren Handhabung für alle weiteren Versuche als Standard verwendet.

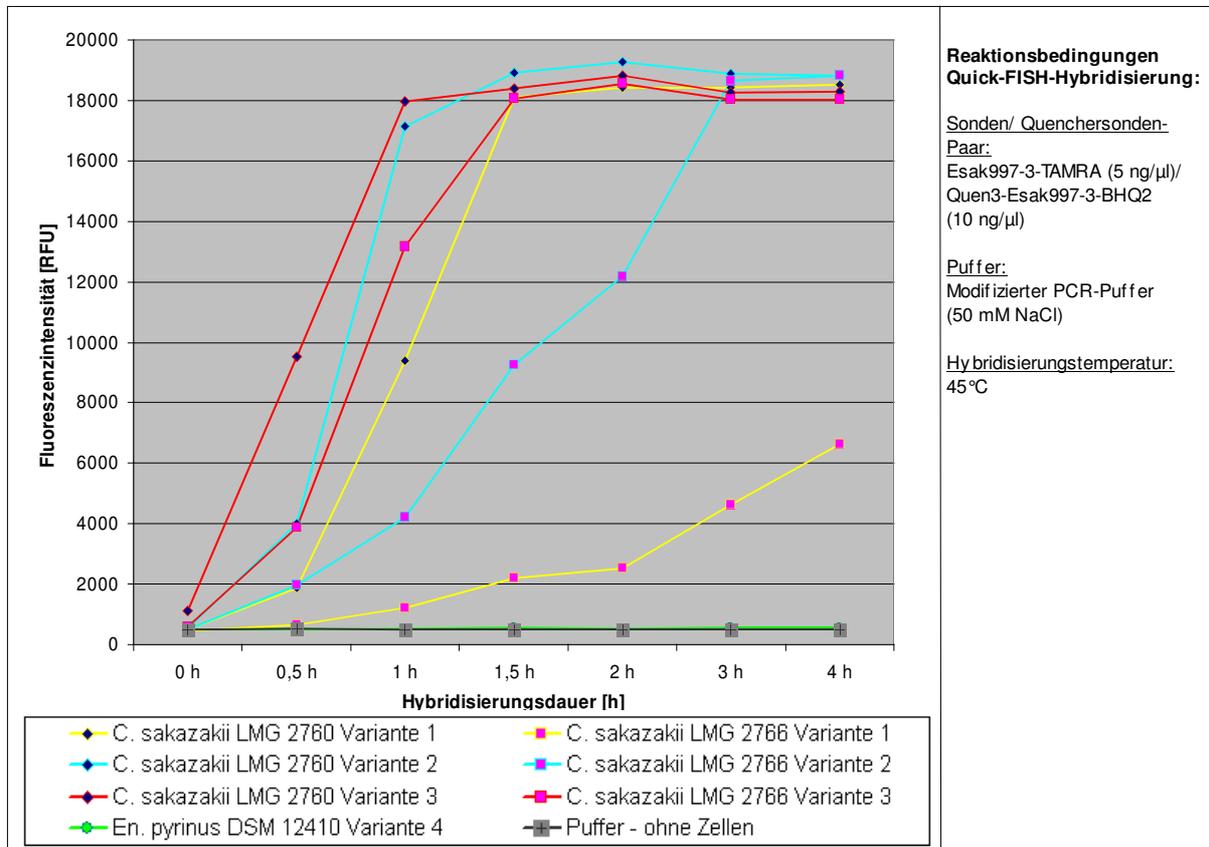


Abbildung C.16: Untersuchung von unterschiedlichen Vorbehandlungsvarianten der Zellen

C.3.3.6 Analyse von freien DNS-Molekülen

Alternativ zu fixierten Zellen wurden auch genomische DNS (*C.sakazakii* LMG 2760 und LMG 2766, B.4), 16S-rDNS PCR-Produkte (*C.sakazakii* LMG 2760, PCR-Primer Kombination 616V-630R, B.6) sowie das unmarkierte Oligonukleotid RC_Esak997, welches der Sequenz der Quenchersonde entspricht, als mögliche weitere Hybridisierungsziele für die Hybridisierung in Lösung evaluiert.

10 μl DNS-Extrakt (B.4) der beiden *Cronobacter*-Stämme wurden direkt in den Reaktionspuffer eingesetzt (Abb. C.17, türkise Reaktionskurven). Die 16S-rDNS PCR-Produkte wurden in den Endkonzentrationen 1 μg und 5 μg für die Hybridisierung in Lösung verwendet (Abb. C.17, grüne Reaktionskurven). Das unmarkierte Oligonukleotid RC_Esak997 wurde in den Endkonzentrationen 10 ng/μl, 20 ng/μl, 30 ng/μl und 40 ng/μl in die Reaktion eingesetzt (Abb. C.17, dunkelrote Reaktionskurven). Die Hybridisierung in Lösung wurde bei einer Inkubationstemperatur von 45°C über eine maximale Inkubationsdauer von 4 h in

C. Ergebnisse

modifiziertem PCR-Puffer (50 mM NaCl) durchgeführt (Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2, (C.3.3.2 bis C.3.3.4)).

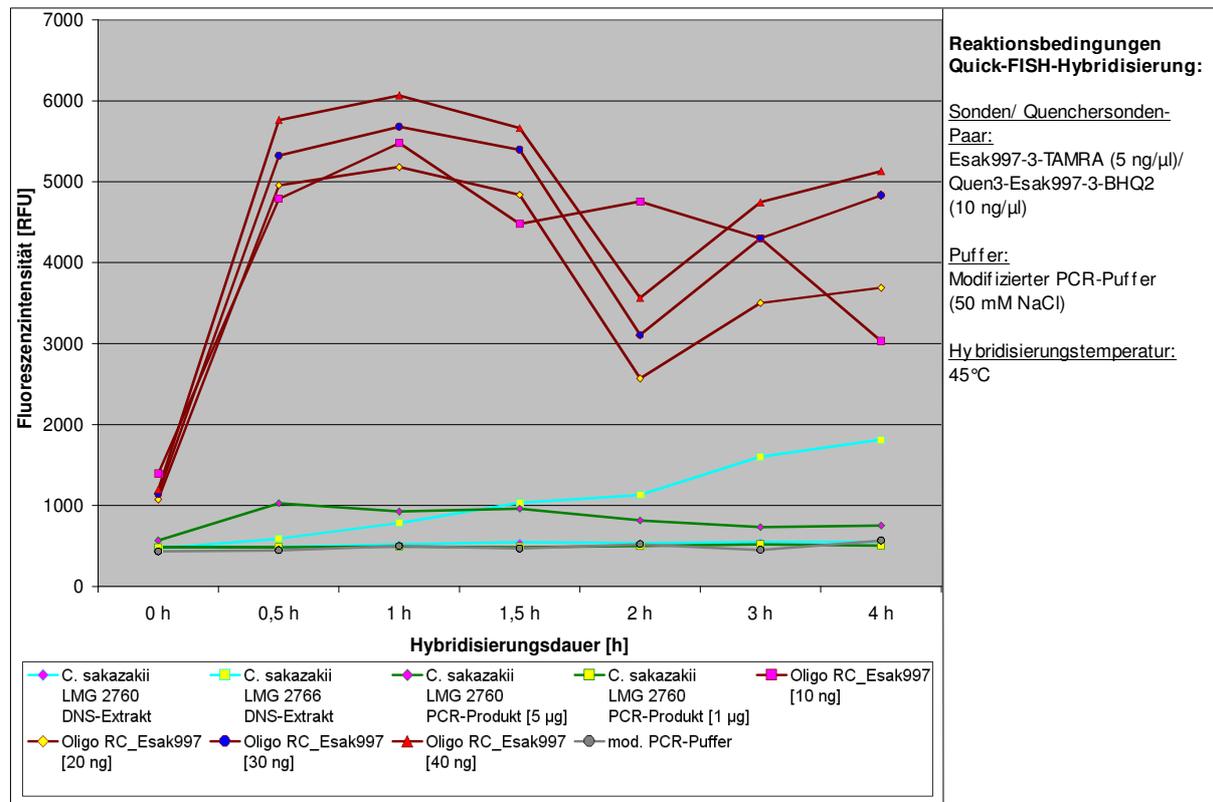


Abbildung C.17: Evaluierung alternativer Hybridisierungsziele für die Hybridisierung in Lösung

Die DNS-Extrakte der Referenzorganismen wurden nach 4 h Hybridisierung mit Fluoreszenzintensitäten von 474 (LMG 2766) und 1811 RFU (LMG 2760) detektiert. Für die 16S-rDNS PCR-Produkte wurden maximale Fluoreszenzintensitäten von 503 RFU (1 μg PCR-Produkt) und 752 RFU (5 μg PCR-Produkt) gemessen.

Das unmarkierte Oligonukleotid hob sich mit Messwerten von 3033 RFU (10 ng/μl), 3690 RFU (20 ng/μl) 4832 RFU (30 ng/μl) und 5131 RFU (40 ng/μl) nach 4 stündiger Hybridisierung detektierbar vom Nullwert des Puffers (569 RFU) ab.

Die alternativ zu fixierten Zellen verwendeten Hybridisierungsziele erreichten nicht annähernd die Signalintensitäten, die in den zuvor durchgeführten Versuchen für fixierte Zellen detektiert wurden.

Für eine weiterführende Interpretation dieser Ergebnisse siehe Diskussion D.2.1 (Seite 130).

C.3.3.7 Evaluierung des Einflusses von DNS-Doppelstrang destabilisierenden Agenzien und Detergenzien

Im Nachfolgenden wurde der Einfluss der DNS-Doppelstrang destabilisierenden Agenzien Formamid, TEMAC und DMSO auf die Kinetik und Stabilität der Hybridisierungsreaktion von Quick-FISH überprüft. Des Weiteren wurde ein möglicher Effekt von Detergenzien (SDS, Triton X-100, Tween 80), Oberflächen aktiven Substanzen (PEG 8000) oder von Viskosität beeinflussenden Stoffen (Glyzerin) auf die Beschleunigung des Hybridisierungsablaufs untersucht (B.10.1).

Als Basispuffer wurde für die Versuche modifizierter PCR-Puffer ohne Triton X-100 (B.10.1) verwendet und mit den aufgeführten Stoffen substituiert (Tabelle C.13).

Der Einfluss der verschiedenen Puffer wurde jeweils an *C. sakazakii* LMG 2760 und den Nichtzielorganismen *En. cloacae* DSM 30054 und *Er. chrysanthemii* DSM 4610 verifiziert.

Das Sonden/ Quenchersonden-Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 wurde unter den bereits standardisierten Versuchs- und Messbedingungen (C.3.3.2 bis C.3.3.5) für diese Hybridisierung verwendet. Als Negativkontrolle wurde das Sonden/ Quenchersonden-Paar im jeweiligen Puffer ohne Zusatz von Zellen mitgeführt.

Abbildung C.18 fasst die erhaltenen Messwerte nach 2- und 4-stündiger Hybridisierungsdauer zusammen.

Die Ergebnisse dieser Graphik lassen sich unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten analysieren. Zum einen wird der Einfluss der verschiedenen Puffervarianten auf die Quick-FISH-Reaktion direkt miteinander verglichen, zum anderen werden die Veränderungen in den Signalintensitäten von Zielorganismus und Nichtzielorganismen innerhalb eines Puffersystem nach der Messzeit von 2 h und 4 h dargestellt.

Im direkten Vergleich zum Referenzpuffer Nr.1 verhalten sich die Puffer Nr. 4 ,12 und 13 (Zusätze: 1 % DMSO, 1 % und 5 % Glycerin) hinsichtlich der für Zielorganismus und Nichtzielorganismen nach 2 h und 4 h gemessenen Fluoreszenzintensitäten nahezu identisch. Formamid im Puffer (Puffer Nr. 2) führt im Vergleich zur Referenz zu einem leichten Anstieg in den Fluoreszenzsignalen aller Fixierungen.

C. Ergebnisse

Tabelle C.13: Verifizierte Substitutionen des Basispuffers

Puffer-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Substituiert mit	ohne Zusatz	20 % FA	100mM TEMAC	1 % DMSO	0,1 % Triton X-100	0,1 % SDS	1 % SDS	1 % Tween 80	5 % Tween 80	1 % PEG 8000	5 % PEG 8000	1 % Glycerin	5 % Glycerin

Legende: Die angegebenen Konzentrationen entsprechen der jeweiligen Endkonzentration im Puffer

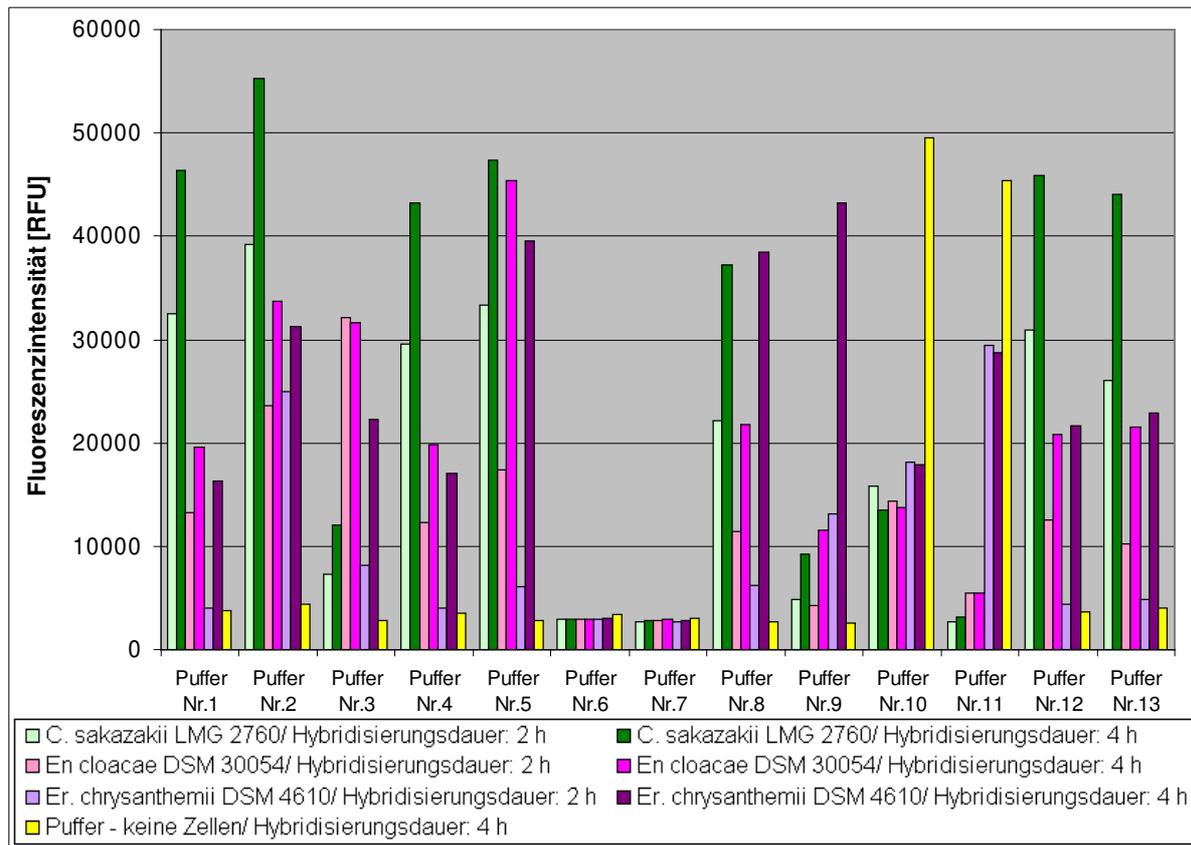


Abbildung C.18: Untersuchung von unterschiedlichen Reaktionspuffern (Messpunkte: 2 h, 4 h)

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quenchersonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) bei 45°C in verschiedenen Puffern (Tabelle C.13).

Die Reaktionskinetik von Quick-FISH wurde dagegen deutlich negativ durch den Zusatz von TEMAC (Puffer Nr. 3), Triton X-100 (Puffer Nr. 5), SDS (Puffer Nr. 6 und Nr. 7), Tween 80 (Puffer Nr. 8 und 9) und PEG 8000 (Puffer Nr. 10 und Nr. 11) beeinflusst.

Die für die Nichtzielorganismen gemessene Fluoreszenzintensität stieg bei Verwendung von TEMAC (Puffer Nr. 3), Tween 80 (Puffer Nr. 8 und Nr. 9) und PEG 8000 (Puffer Nr. 10 und Nr. 11) über das Signal des Zielorganismus. Der Zusatz von PEG 8000 führte zudem dazu, dass das Hybrid aus Sonde und Quenchersonde in reinem Puffer ohne Zellen (Puffer Nr. 10 und Nr. 11, gelber Balken) destabilisiert wurde und Fluoreszenzintensitäten von > 45000 RFU gemessen wurden. Eine gegenteilige Reaktion trat durch den Zusatz von SDS in den Puffer auf (Puffer Nr. 6

C. Ergebnisse

und Nr.7). Hier wurde eine Dissoziation des Sonden/ Quenchersonden Hybrids unterbunden und das Fluoreszenzquenching über die gesamte Hybridisierungsdauer aufrecht erhalten.

Ein Effekt von Triton X-100 (Puffer Nr. 5) trat erst nach einer Inkubationsdauer von länger als 2 h auf. Bis zu diesem Zeitpunkt verhielt sich der Puffer analog zum Referenzpuffer. Am Messpunkt 4 h erreichten die Nichtzielorganismen nahezu die identische Fluoreszenzintensität, die auch für den Zielorganismus gemessen wurde. Für eine weiterführende Interpretation dieser Ergebnisse siehe Diskussion D.2.1 (Seite 130).

C.3.4 Bestimmung der Spezifität

C.3.4.1 Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Salzgehalt

Die Spezifität und die Reaktionskinetik von Hybridisierungsreaktionen wird vor allem durch die Hybridisierungstemperatur und den Salzgehalt des Reaktionspuffers beeinflusst. Im Nachfolgenden wurden der Effekt dieser Parameter für Quick-FISH evaluiert.

Zur Untersuchung des Einflusses der Hybridisierungstemperatur wurden alle Versuchsansätze parallel bei 30 °C, 45 °C, 60 °C und 70 °C inkubiert.

Der Salzgehalt des modifizierten PCR-Puffers wurde über eine variable Na⁺-Konzentration beeinflusst. Hierbei wurde ein Konzentrationsspektrum von 0 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 600 mM und 800 mM NaCl im Puffer untersucht.

Als Zielorganismus wurde eine EtOH-Fixierung (B.8.1) von *C. sakazakii* LMG 2760 verwendet. Zur Verifizierung der Spezifität der Reaktion wurden Fixierungen von *Ci. freundii* DSM 30039, *En. cloacae* DSM 30054, *Er. chrysanthemii* DSM 4610 und *Ed. tarda* DSM 30052 als Nichtzielorganismen eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit dem Sonden/ Quenchersonden-Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 unter den bereits standardisierten Versuchs- und Messbedingungen (C.3.3).

Alle ermittelten Messwerte sind unter G.10 im Anhang (Seite 173) zusammengefasst. In Abbildung C.19 sind die Werte dargestellt, die nach 4 h Inkubation bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur und den verschiedenen Salzkonzentrationen gemessen wurden.

Der direkte Vergleich zeigte, dass der Zielorganismus *C. sakazakii* (grüne Balken, Abb. C.19) im Temperaturbereich von 30 °C bis 60 °C nur bei Salzkonzentration von 0 mM bis 150 mM NaCl Fluoreszenzsignale von > 5000 RFU lieferte (Abb. C.19, Bild

C. Ergebnisse

A, B und C). Signalstärken von > 35000 RFU wurden nur in einem Temperaturbereich von 30°C bis 45°C und einer Salzkonzentration von 0 mM bis 100 mM NaCl erzielt (Abb. C.19, Bild A und B). Die größtmögliche Unterscheidung der Fluoreszenzsignale des Zielorganismus von den Fluoreszenzsignalen der Nichtzielorganismen wurde bei einer Temperatur von 30°C und einem Salzgehalt von 50 mM NaCl erreicht (Abb. C.19, Bild A). Das Signal von *C. sakazakii* (38158 RFU) war unter diesen Bedingungen um mehr als 90 % höher, als das stärkste Signal eines Nichtzielorganismus (*Er. chrysanthemii*: 3616 RFU, *Ed. tarda*: 2622 RFU, *En. cloacae*: 1672 RFU, *Ci. freundii*: 914 RFU).

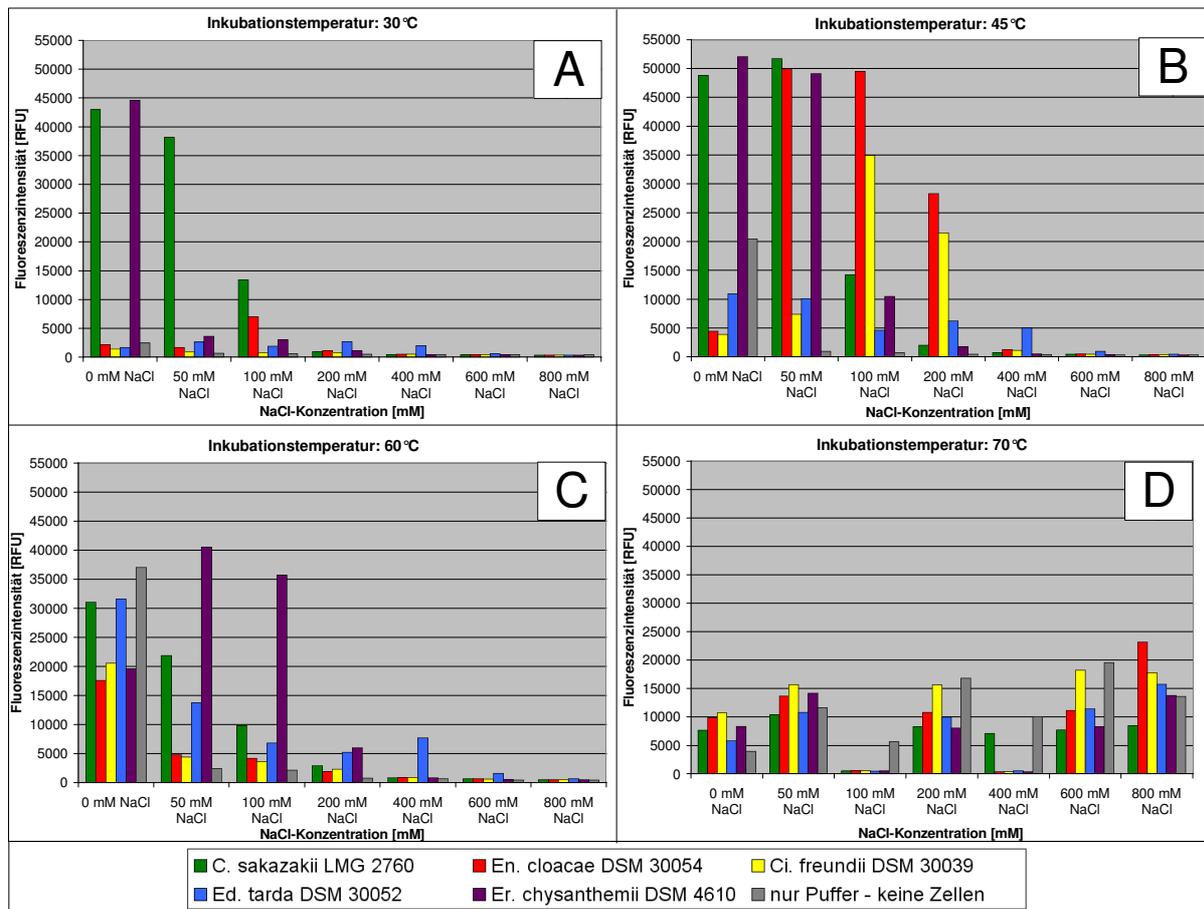


Abbildung C.19: Effekt der Temperatur und der Salzkonzentration (Messpunkt: 4 h)

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quenchersonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) bei 30°C (Abb. C.19, A), 45°C (Abb. C.19, B), 60°C (Abb. C.19, C), 70°C (Abb. C.19, D) in modifiziertem PCR-Puffer mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration. (Vergrößerte Darstellung von C.19 A, B, C und D unter G.11, Anhang, Seite 179).

Abbildung C.20 stellt alle erhobenen Einzelmesswerte als Reaktionskinetik über eine maximale Hybridisierungsdauer von 4 h gegenüber. Der Verlauf der Quick-FISH-Reaktion wird dabei für die Hybridisierungstemperaturen von 30°C (Abb. C.20, Bild A) und 45°C (Abb. C.20, Bild A) bei einem konstanten Salzgehalt von 50 mM NaCl direkt miteinander verglichen.

C. Ergebnisse

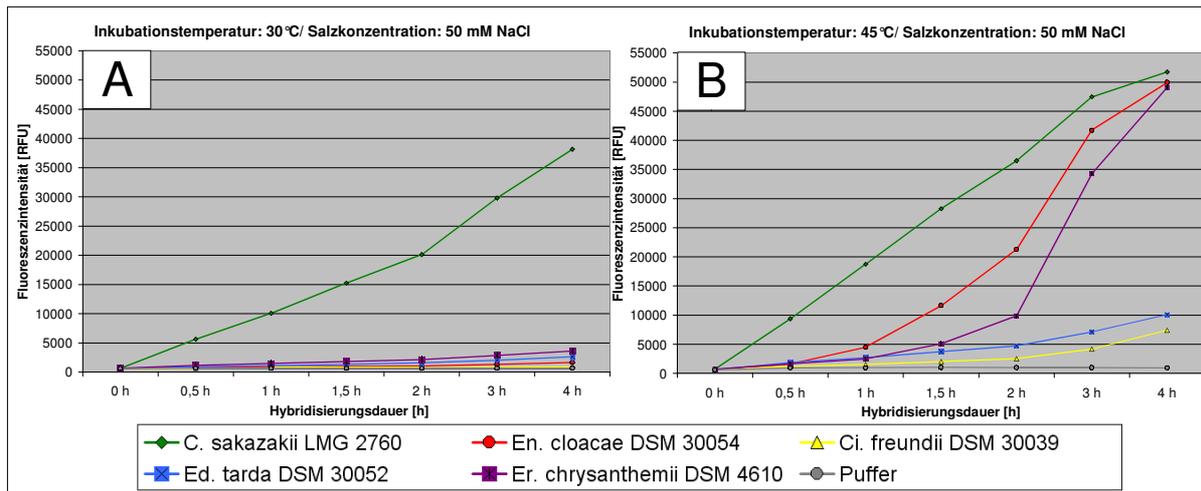


Abbildung C.20: Reaktionskinetik bei 30°C und 45°C sowie einem Salzgehalt von 50 mM NaCl

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quencher-Sonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) bei 30°C (Abb. C.20, A) und 45°C (Abb. C.20, B) in modifiziertem PCR-Puffer (50mM NaCl). (Vergrößerte Darstellung von Abb. C.20 A und B unter G.12, Anhang, Seite 181).

Die vergleichende Betrachtung aller Kurvenverläufe in Bild A (Abb. C.20) zeigt, dass bei einer Hybridisierungstemperatur von 30°C eine Diskriminierung von Zielorganismus (grüne Kurve) und Nichtzielorganismen (rote, gelbe, blaue und violette Kurve) über die gesamte Hybridisierungsdauer erfolgte. Die Fluoreszenzintensitäten der Nichtzielorganismen verblieben dabei unter einem Wert von 5000 RFU. Im Vergleich dazu stieg das Signal von *C. sakazakii* nach 4 h Hybridisierung bis auf knapp 40000 RFU an.

Im Gegensatz dazu konnte bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C (Abb. C.20, Bild B) beobachtet werden, dass das Fluoreszenzsignal von *En. cloacae* (rote Kurve) und *Er. chrysanthemii* (violette Kurve) bereits nach 1,5 h Hybridisierung auf einen Messwert von ≥ 5000 RFU angestiegen war. Maximal erreichten diese beiden Nichtzielorganismen nach 4 h Hybridisierung ein Fluoreszenzmaximum von knapp 50000 RFU. Die anderen beiden Nichtzielorganismen (*Ed. tarda* und *Ci. freundii*) verbleiben im Gegensatz dazu über den gesamte Messzeitraum bei Fluoreszenzintensitäten von ≤ 10000 RFU.

C. sakazakii konnte bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C bis zu einer Hybridisierungsdauer von 2 h eindeutig von den Nichtzielorganismen diskriminiert werden. Das nach 4 h erreichte Fluoreszenzmaximum lag jedoch nur knapp höher als das von *En. cloacae* und *Er. chrysanthemii* und eine eindeutige Unterscheidung war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich (Abb. C.20, Bild B). Für eine

C. Ergebnisse

weiterführende Interpretation dieser Ergebnisse siehe Diskussion D.2.1 (Seite 130) und D.2.2 (Seite 134).

C.3.4.2 Überprüfung des Einsatzes von Kompetitoren zur Erhöhung der Spezifität

Da die Nichtzielorganismen bei einer Hybridisierungstemperatur von 30°C (Abb. C.20, Bild A) im Vergleich zur Hybridisierungstemperatur von 45°C nur ein marginales Signal zeigten (Abb. C.20, Bild B), wurde ein möglicher Einsatz von Kompetitoren zur Erhöhung der Spezifität der Quick-FISH-Reaktion ausschließlich bei 45°C und einer Salzkonzentration von 50 mM NaCl überprüft. Der Kompetitor Esak997C2 (B 8.2, spezifisch für *Er. chrysanthemii*) wurde in einer Endkonzentration von 5 ng/µl eingesetzt und zeitgleich mit Sonde und Quencher-sonde (Abb. C.21, Bild A) und 30 min vor der Zugabe der Sonden/ Quencher-sonden-Lösung appliziert (Abb. C.21, Bild B).

Im Vergleich zur Hybridisierung in Lösung ohne Kompetitor (Abb. C.20 Bild B) war durch den Einsatz des Kompetitors eine leichte Verringerung des Fluoreszenzsignals für den Zielorganismus *C. sakazakii* zu verzeichnen (Abb. C.21 Bild A und B).

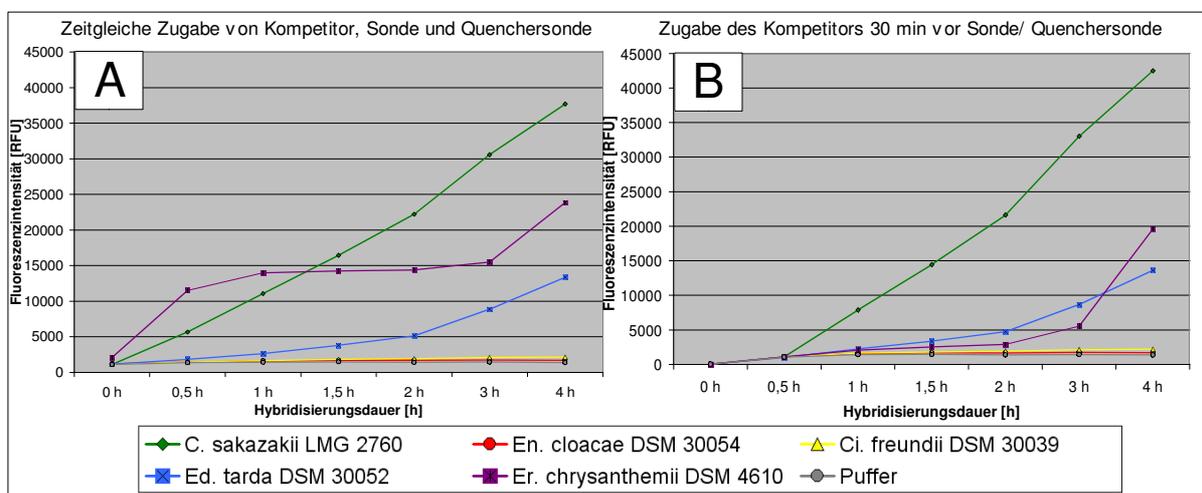


Abbildung C.21: Einfluss des Kompetitors Esak997C2 auf die Spezifität der Hybridisierung in Lösung

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quencher-sonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/µl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/µl) sowie dem Kompetitor Esak997C2 (5 ng/µl) bei 45°C in modifiziertem PCR-Puffer (50mM NaCl). Zeitgleiche (Abb. C.21, A) und um 30 min verzögerte Zugabe des Kompetitors (Abb. C.21, B). (Vergrößerte Darstellung von Abb. C.21 A und B unter G.13, Anhang, Seite 182).

Die zeitgleiche Applikation von Kompetitor, Sonde und Quencher-sonde führte zu einer marginal verbesserten Diskriminierung von *C. sakazakii* und den mitgeführten Nichtzielorganismen (Abb. C.21, Bild A).

C. Ergebnisse

Das Fluoreszenzsignal von *Er. chrysanthemii* (Abb. C.21, Bild A, violette Kurve) wurde durch den Einsatz des Kompetitors abgeschwächt. Interessanterweise wurde durch diesen Kompetitor auch das Signal von *En. cloacae* (Abb. C.21, Bild A, rote Kurve) im Vergleich zur Hybridisierung ohne Kompetitoren (Abb. C.20, Bild B) unterbunden. Wurde der Kompetitor 30 min früher als Sonde und Quencher-sonde zugegeben (Abb. C.21, Bild B), wurde eine deutliche Abschwächung des Signals von *Er. chrysanthemii* (violette Kurve) beobachtet. Das falsch-positive Signal wurde bis zu einer Hybridisierungsdauer von 3 h bei einer Fluoreszenzintensität von ≤ 5000 RFU gehalten. Erst am Messpunkt 4 h war wieder ein Anstieg des Signals auf 20000 RFU zu verzeichnen. Die für *Ed. tarda* (Abb. C.21, Bilder A und B, blaue Kurve) bestimmte Fluoreszenzintensität blieb jedoch durch die Zugabe der Kompetitoren unbeeinflusst.

C. sakazakii erreichte bei vorzeitiger Zugabe des Kompetitors nach 4 h Hybridisierung eine maximale Fluoreszenzintensität von knapp 43000 RFU (grüne Kurve, Abb. C.21, Bild B). Dieser Wert lag in etwa um 5000 RFU höher, als das bei zeitgleicher Zugabe von Kompetitor, Sonde und Quencher-sonde nach 4 h Hybridisierung bestimmte Fluoreszenzsignal (grüne Kurve, Abb. C.21, Bild A).

C.3.4.3 Untersuchung von weiteren Zielorganismen

Für die vorhergegangenen Untersuchungen wurden zumeist die beiden *C. sakazakii*-Stämme LMG 2760 und LMG 2766 als Referenzorganismen verwendet.

Um zu bestätigen, dass die bisher mittels Quick-FISH für *C. sakazakii* erhaltenen Ergebnisse reproduzierbar waren, wurden weitere *Cronobacter*-Stämme untersucht (siehe Abb. C.22).

Diese wurden über eine maximale Hybridisierungsdauer von 4 h bei den Inkubationstemperaturen 30 °C und 45 °C sowie einem Salzgehalt von 50 mM NaCl in modifiziertem PCR-Puffer hybridisiert (Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2, C.3.3).

Alle weiteren *C. sakazakii*-Stämme wurden eindeutig mittels Hybridisierung in Lösung nachgewiesen (Abb. C.22). Die erzielten Fluoreszenzintensitäten lagen für die untersuchten Stämme bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C (Abb. C.22, violette Balken) zwischen 32346 RFU (*C. sakazakii* LMG 2759) und 74882 RFU (*C. sakazakii* LMG 2758). Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C (Abb. C.22,

C. Ergebnisse

dunkelrote Balken) wurden Fluoreszenzintensitäten zwischen 55428 RFU (*C. mutjensii* ATCC 51329) und 60177 (*C. sakazakii* LMG 2758) gemessen.

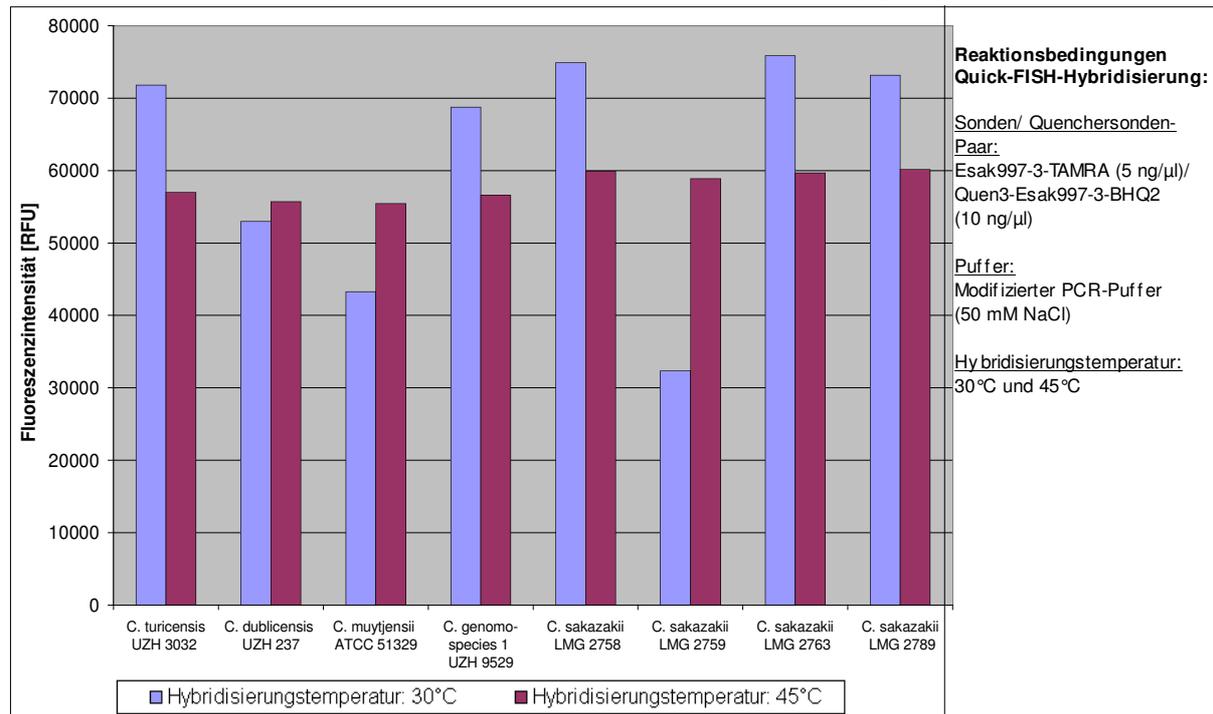


Abbildung C.22: Hybridisierung von weiteren Zielorganismen bei 30°C und 45°C

C.3.4.4 Untersuchung eines erweiterten Spektrums an Nichtzielorganismen

Die Prüfung der Spezifität des Sonden/ Quenchersonden-Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 wurde im Nachfolgenden auf einem erweiterten Spektrum an Nichtzielorganismen fortgesetzt (Tabelle C.14, Nr. 3 – Nr. 25). Diese wurden über eine maximale Hybridisierungsdauer von 4 h bei den Inkubationstemperaturen 30°C und 45°C sowie einem Salzgehalt von 50 mM in modifiziertem PCR-Puffer hybridisiert. Als Positivkontrolle wurden *C. sakazakii* (LMG 2760 und LMG 2766) in dieser Hybridisierung mitgeführt.

Tabelle C.14 fasst die jeweils nach 2 h und 4 h Hybridisierung erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Die für den Zielorganismus *C. sakazakii* (LMG 2760 und LMG 2766) gemessenen Fluoreszenzintensitäten lagen bei beiden Inkubationstemperaturen (30°C und 45°C) immer höher, als die für alle untersuchten Nichtzielorganismen gemessenen Fluoreszenzsignale. Fluoreszenzintensitäten von > 5000 RFU wurden bei einer Inkubationstemperatur von 30°C ausschließlich für *En. pulveris* (nach 2 h Inkubation: 6523 RFU und nach 4 h Inkubation: 10956 RFU) detektiert. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C erreichten *E. coli* (nach 4 h: 11713 RFU), *Ed. ictaluri* (nach 2 h: 8660, nach 4 h: 20352 RFU), *En. helveticus* (nach 4 h: 8008 RFU),

C. Ergebnisse

En. pulveris (nach 2 h: 11399 RFU, nach 4 h: 53417), *En. turicensis* (nach 2 h: 6837 RFU, nach 4 h: 16458), *Pantoea agglomerans* (nach 4 h: 5665) Fluoreszenzintensitäten von > 5000 RFU.

Tabelle C.14: Untersuchung eines erweiterten Spektrums an Nichtzielorganismen

Nr.	Organismus	MM	Inkubations- temperatur 30°C		Inkubations- temperatur 45°C	
			Fluoreszenz- intensität [RFU] nach 2 h Inkubation	Fluoreszenz- intensität [RFU] nach 4 h Inkubation	Fluoreszenz- intensität [RFU] nach 2 h Inkubation	Fluoreszenz- intensität [RFU] nach 4 h Inkubation
1	<i>C. sakazakii</i> LMG 2760	0	16688	32981	61607	60829
2	<i>C. sakazakii</i> LMG 2766	0	14043	29496	34509	57048
3	<i>E. coli</i> DSM 30039	4	1769	2620	4019	11713
4	<i>Ed. ictaluri</i> DSM 13697	2	1871	3104	8660	20352
5	<i>En. aerogenes</i> DSM 30053	4	789	856	1014	1034
6	<i>En. amnigenus</i> DSM 4486	4	794	890	1015	1050
7	<i>En. gergoviae</i> DSM 9245	4	975	1265	963	975
8	<i>En. helveticus</i> UZH 513/05	4	2608	4209	4538	8008
9	<i>En. intermedius</i> DSM 4581	4	984	1213	1369	1602
10	<i>En. kobei</i> DSM 13645	6	908	1020	1052	1300
11	<i>En. pulveris</i> UZH 601/105	4	6523	10956	11399	53417
12	<i>En. pyrinus</i> DSM 12410	4	1004	1333	945	928
13	<i>En. turicensis</i> UZH 3032	4	3211	4507	6837	16458
14	<i>Erwinia carotovora</i> DSM 30168	3	770	887	1021	1288
15	<i>Erwinia cyripedii</i> DSM 3873	4	664	657	694	659
16	<i>Erwinia rubrifaciens</i> DSM 4487	3	861	965	1346	3166
17	<i>Hafnia alvei</i> DSM 30163	3	912	1230	1707	2280
18	<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM 5175	3	895	1011	1180	1805
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	5	2021	4198	1228	1258
20	<i>Kluyvera ascorbata</i> DSM 4611	4	890	1008	1089	1351
21	<i>Kluyvera cryocrescens</i> DSM 12410	4	2039	3472	1674	2696
22	<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493	3	1754	2662	3181	5665
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	6	715	719	869	895
24	<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 4487	5	3751	3854	1336	1333
25	<i>Vibrio vulnificus</i> DSM 11507	4	775	874	876	931

Legende: MM = Missmatch (Basenunterschied) zur Sondenbindungsstellen, fett gedruckte Nichtzielorganismen wiesen Fluoreszenzintensitäten von > 5000 RFU auf (siehe auch Sondenmatch, G.8, Anhang, Seite 172).

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quencher-Sonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) bei 30°C und 45°C in modifiziertem PCR-Puffer (50mM NaCl).

Für eine weiterführende Interpretation dieser Ergebnisse siehe auch Diskussion D.2.2 (Seite 134).

C. Ergebnisse

C.3.4.5 Untersuchung von Mischungen aus Ziel- und Nichtzielorganismen

In einem weiteren Versuch wurden die Nichtzielorganismen *En. cloacae* DSM 30054, *Er. chrysanthemii* DSM 4610 und *Ed. tarda* DSM 30052 alleine und in Mischung mit dem Zielorganismus *C. sakazakii* LMG 2760 bei 30°C und 45°C hybridisiert. Abbildung C.23 stellt die jeweils bei 30°C und 45°C nach 2 h und 4 h Hybridisierungsdauer erhaltenen Messwerte dar.

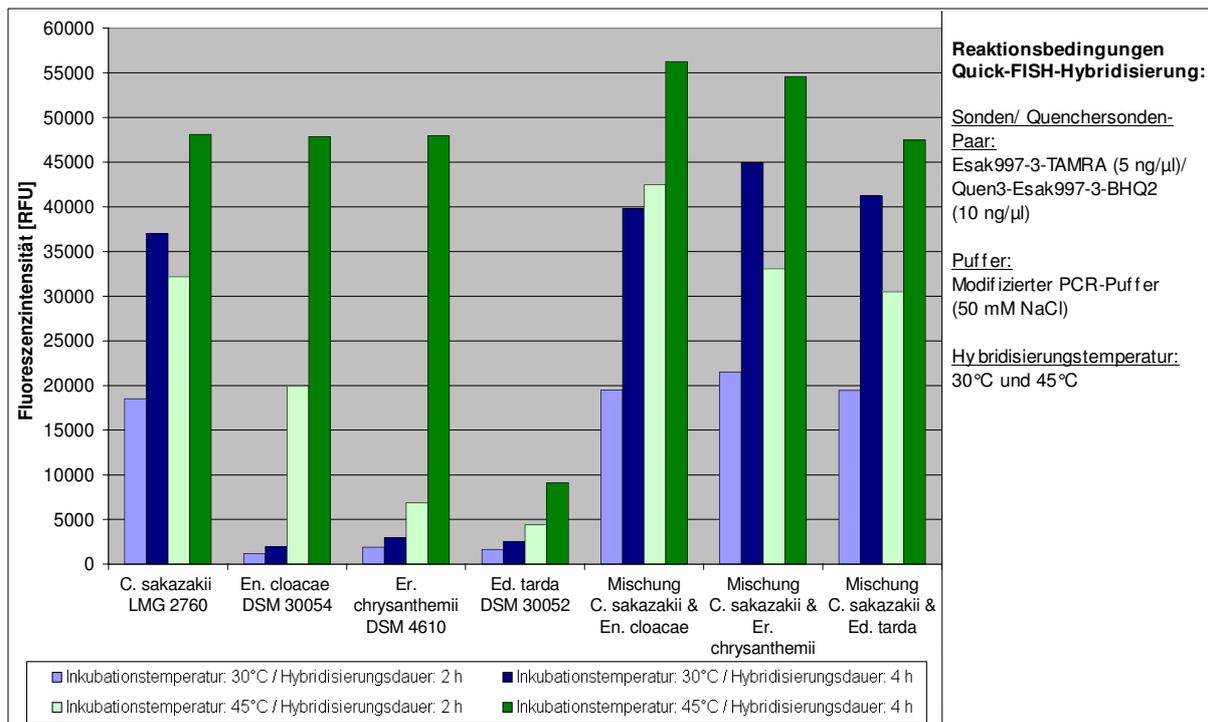


Abbildung C.23: Hybridisierung von Mischungen aus Ziel- und Nichtzielorganismen

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 30°C (Abb. C.23, hellblaue und dunkelblaue Balken) wirkte sich die Beimischung eines Nichtzielorganismus zu *C. sakazakii* nur sehr unwesentlich auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten des Zielorganismus aus. Das Fluoreszenzsignal erhöhte sich in der Mischung aus Ziel- und Nichtzielorganismus in etwa um den Wert, der jeweils für den Nichtzielorganismus allein bestimmt wurde.

Diese Tendenz wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C (Abb. C.23, hellgrüne und dunkelgrüne Balken) nicht beobachtet. Die Messwerte, die für die Mischungen aus Ziel- und Nichtzielorganismus bestimmt wurden, lagen zumeist höher als die jeweiligen Einzelwerte der Fixierungen. Der Anstieg entsprach dabei nicht wie bei 30°C in etwa dem Wert, der für den Nichtzielorganismus allein bestimmt wurde, sondern lag für die Mischung *C. sakazakii* und *En. cloacae* um 8127 RFU und *C. sakazakii* und *Er. chrysanthemii* um 6461 RFU höher, als der Wert, der für *C. sakazakii* alleine gemessen wurde. Der für die Mischung *C. sakazakii* und *Ed. tarda*

C. Ergebnisse

bestimmte Messwert lag um -659 RFU niedriger, als die für *C. sakazakii* ermittelte Fluoreszenzintensität (siehe auch D.2.2.2, Diskussion, Seite 138)

C.3.5 Bestimmung der Sensitivität

C.3.5.1 Evaluierung der Nachweisgrenze

Um die Nachweisgrenze von Quick-FISH in Kombination mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer Detektion zu eruieren, wurden von den EtOH-fixierten Referenzorganismen *C. sakazakii* (LMG 2760, LMG 2766 und LMG 2787) jeweils die Gesamtzellzahlen der verwendeten Fixierungen nach B.8.4.1 bestimmt. Als Konzentrationen wurden jeweils 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 und 1×10^{10} Zellen pro Reaktion eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit dem Sonden/ Quenchersonden-Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 (C.3.3) bei 45°C und die Messdaten wurden ausschließlich nach 4-stündiger Inkubation erhoben (Abb. C.24).

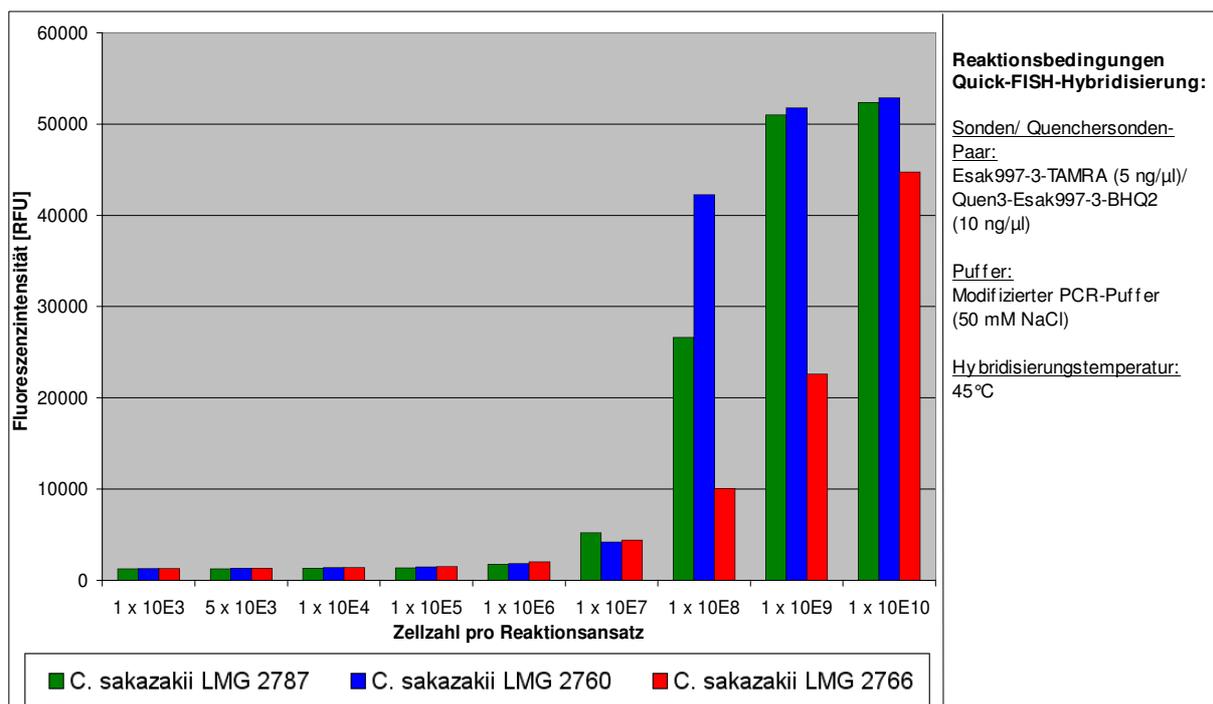


Abbildung C.24: Bestimmung der Nachweisgrenze

Abbildung C.24 ist zu entnehmen, dass für die Zellzahlen zwischen 1×10^3 und 1×10^6 nur marginale Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten auftraten, die so gering waren, dass sie als nicht eindeutig detektierbar bezeichnet werden mussten. Erst ab einer Zellzahl von 1×10^7 hoben sich die Messwerte von dieser Fluoreszenzintensität ab. Ein Fluoreszenzmaximum von etwa 50000 RFU wurde für *C. sakazakii* LMG 2760 und 2787 bei einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro

C. Ergebnisse

Reaktionsansatz erreicht. Bei der nächst höheren Zellzahl (1×10^{10} Zellen pro Reaktionsansatz) stiegen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit Ausnahme von *C. sakazakii* LMG 2766 nur noch marginal an.

In diesem Versuch wurde die höchste Fluoreszenzintensität von 52898 RFU für *C. sakazakii* LMG 2760 bei einer eingesetzten Zellzahl von 1×10^{10} Zellen pro Reaktionsansatz gemessen.

Auf Basis dieser Daten kann zusammengefasst werden, dass mindestens 1×10^8 Zellen pro Reaktionsansatz vorhanden sein müssen, um mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer eindeutig (> 30000 RFU) detektierbar zu sein (s. auch D.2.3, Seite 143).

C.3.5.2 Einfluss des Wachstumszustands auf die Fluoreszenzintensität

Der Einfluss des Wachstumszustands der *C. sakazakii*-Zellen (LMG 2760 und LMG 2766) auf die gemessene Fluoreszenzintensität wurde über einen Wachstumsversuch in M1-Medium und einer Kultivierungstemperatur von 30°C überprüft.

Dafür wurde innerhalb von 24 h mehrfach Proben (Abb. C.25) aus der Kultur entnommen und pro Messpunkt je 1 ml Zellsuspension zur Bestimmung der optischen Dichte ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) und je 2 ml Zellsuspension für eine EtOH-Fixierung verwendet. In Abbildung C.25 sind die Wachstumsverläufe der beiden *C. sakazakii*-Stämme (LMG 2760 und LMG 2766) in Korrelation zu der ermittelten optischen Dichte als Wachstumskurven zusammengefasst.

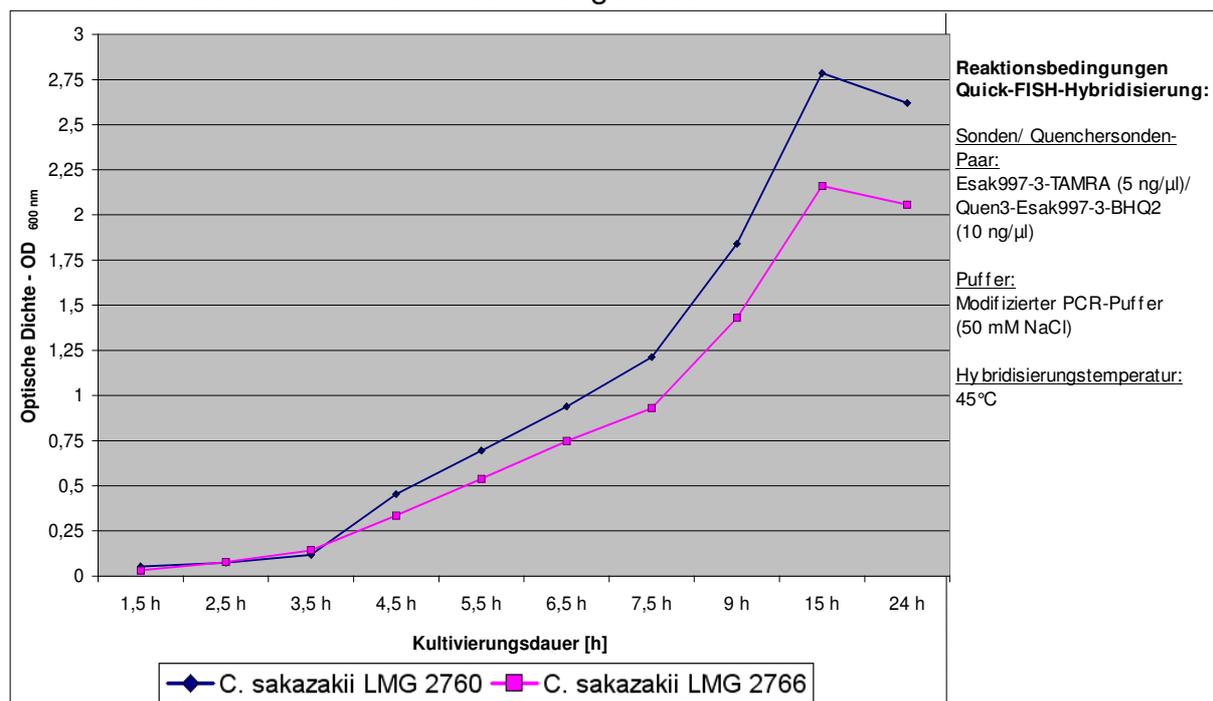


Abbildung C.25: Wachstumskurve von *C. sakazakii* (LMG 2760 und LMG 2766) in M1-Medium

C. Ergebnisse

Alle Fixierungen wurden auch parallel mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf dem Objektträger (Sonde Esak997-TAMRA, B.8.3, jeweils 1 µl Fixierung pro Ansatz) und Quick-FISH bei 30 °C und 45 °C (Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2, C.10.3, jeweils 10 µl Fixierung pro Ansatz) analysiert.

Abbildung C.26 fasst die mittels Quick-FISH bestimmten Messwerte bei den Hybridisierungstemperaturen 30 °C und 45 °C jeweils nach 4 h Hybridisierungsdauer für beide Stämme zusammen.

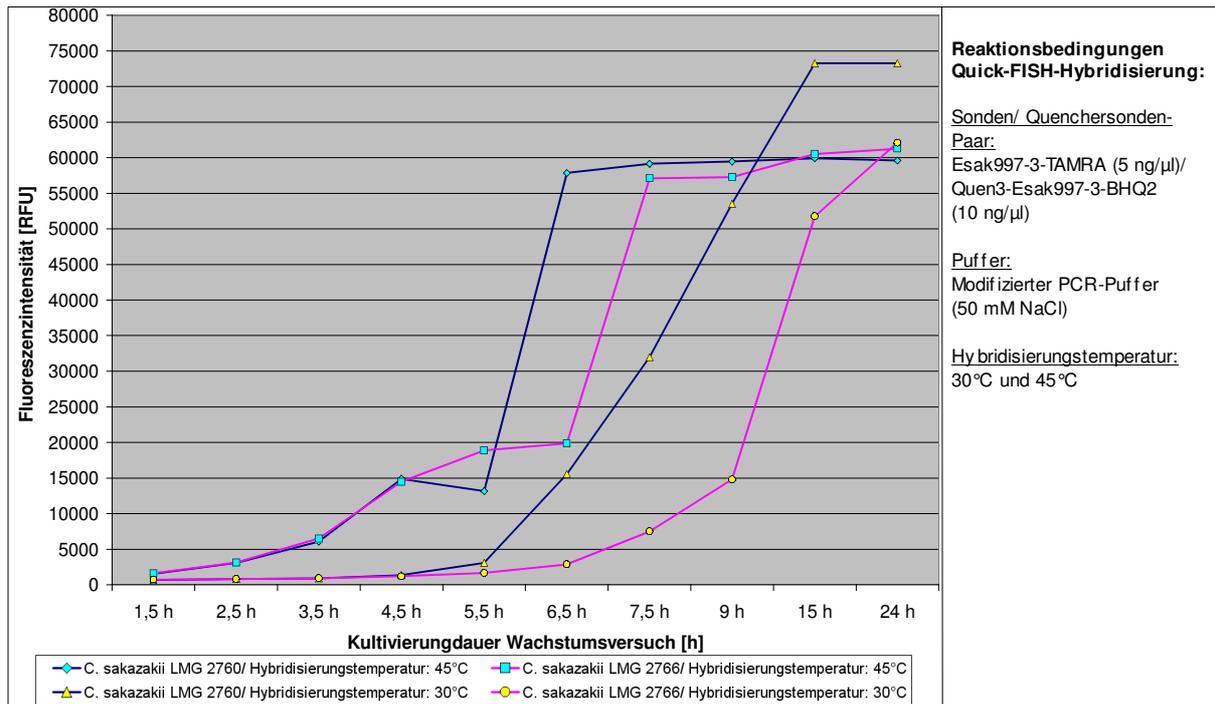


Abbildung C.26: Einfluss des Wachstumszustands bezogen auf die gemessene Fluoreszenzintensität

Bei 30 °C wurden Messwerte von > 50000 RFU für LMG 2760 nach 9 h Kultivierungsdauer (OD_{600nm} von 1,84 (Abb. C.25)) und für LMG 2766 nach 15 h Kultivierungsdauer (OD_{600nm} von 2,16 (Abb. C.25)) erreicht. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C erreichte *C. sakazakii* LMG 2760 diese Fluoreszenzintensität bereits nach 6,5 h (OD_{600nm} von 0,94 (Abb. C.25)). *C. sakazakii* LMG 2766 überschritt diesen Schwellenwert nach 7,5 h (OD_{600nm} von 0,93 (Abb. C.25)). Die erzielten Fluoreszenzmaxima waren für LMG 2760 bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C in etwa um 15000 RFU höher als bei 45 °C (Abb. C.26). Für LMG 2766 konnte dieser Wert nicht bestimmt werden, da der Wachstumsversuch nach 24-stündiger Inkubation abgebrochen wurde und der Kurvenverlauf zeigt (Abb. C.19 LMG 2766 pinke Kurve), dass das Maximum zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht war (siehe auch D.2.3, Diskussion, Seite 143).

C. Ergebnisse

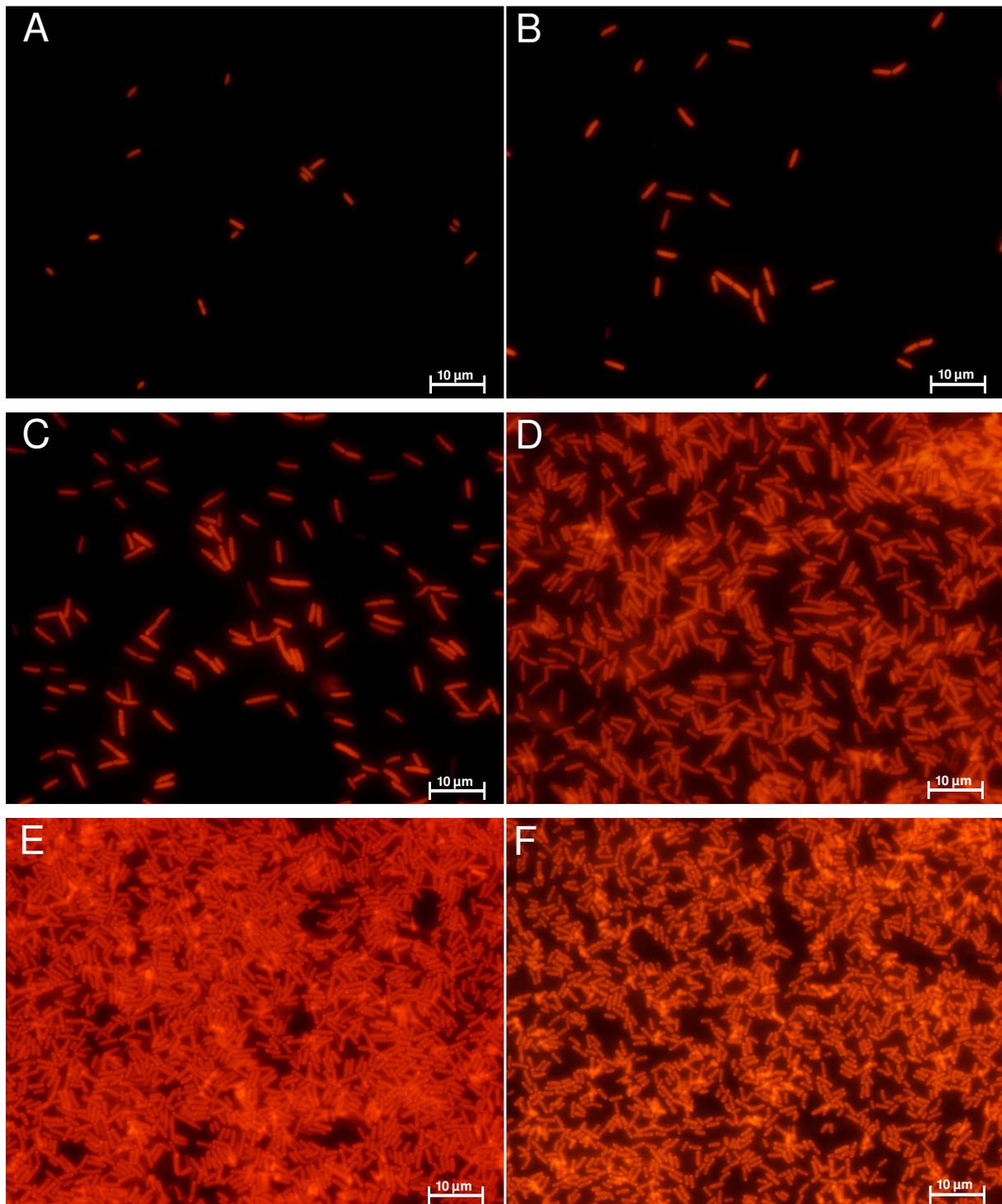


Abbildung 27/1: Exemplarische Dokumentation des Wachstumsversuchs von *C. sakazakii* LMG 2760

Alle Fixierungen wurden mit der Sonde Esak977-TAMRA hybridisiert. Es wurden ausschließlich die jeweiligen Epifluoreszenzaufnahmen abgebildet. Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung und einer Belichtungszeit von 2500 ms fotografiert.

A: Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 1,5 h Kultivierung **B:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 2,5 h Kultivierung **C:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 3,5 h Kultivierung **D:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 4,5 h Kultivierung **E:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 5,5 h Kultivierung **F:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 6,5 h Kultivierung

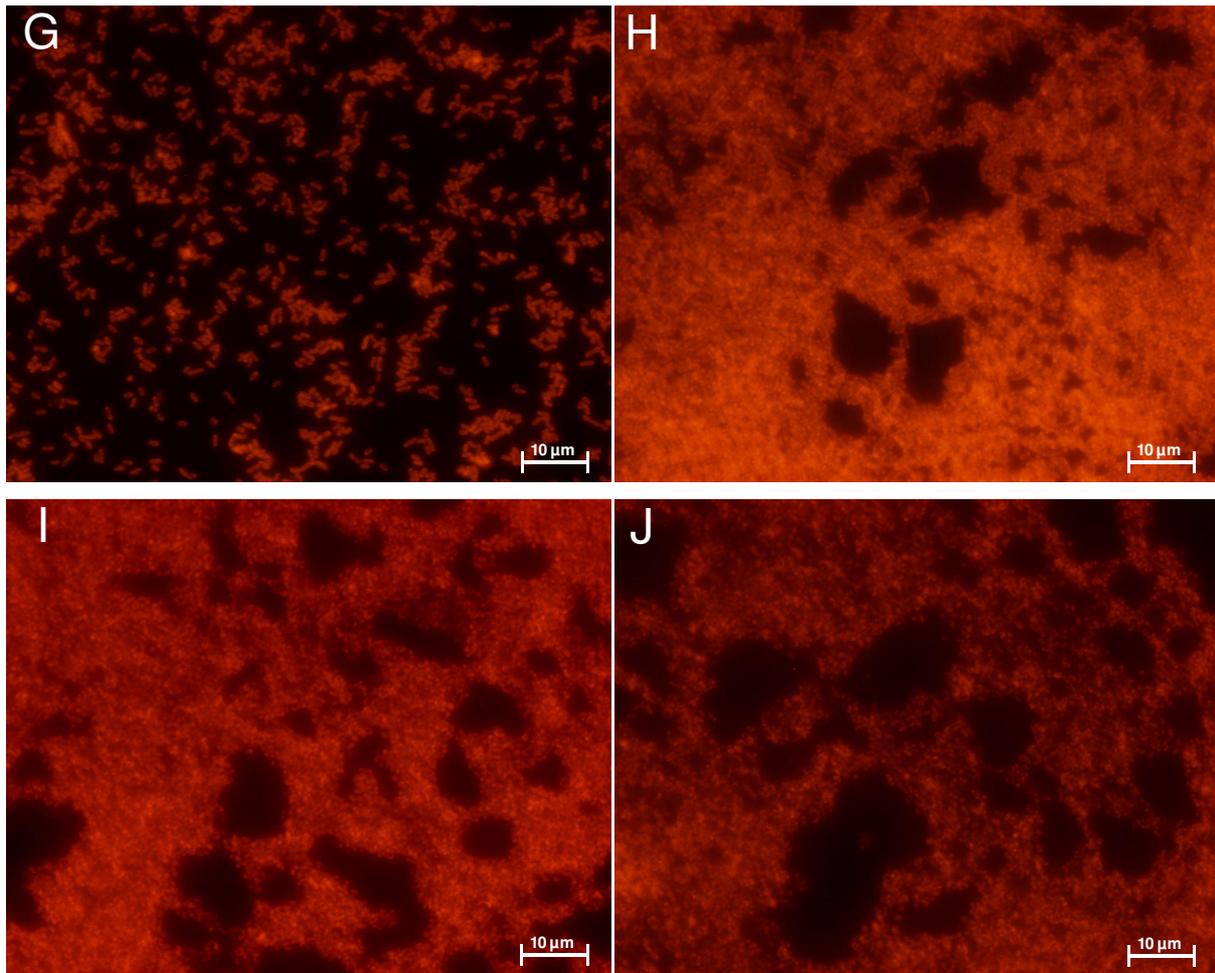


Abbildung 27/2: Exemplarische Dokumentation der EtOH-Fixierungen von *C. sakazakii* LMG 2760

Alle Fixierungen wurden mit der Sonde Esak977-TAMRA hybridisiert. Es wurden ausschließlich die jeweiligen Epifluoreszenzaufnahmen abgebildet. Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung und einer Belichtungszeit von 2500 ms fotografiert.

G: Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 7,5 h Kultivierung **H:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 9 h Kultivierung **I:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 15 h Kultivierung **J:** Epifluoreszenzbild der Fixierung nach 24 h Kultivierung

Im Gegensatz zu den Quick-FISH Messwerten, wurde *C. sakazakii* LMG 2760 bei der mikroskopischen Evaluierung der Hybridisierung auf dem Objektträger bereits in der Fixierung nach 1,5 h Kultivierung eindeutig nachgewiesen (Abb. C.27/1, Bild A). Auch in allen weiteren Fixierungen war eine mikroskopische Detektion möglich (Abbildung C.27/1 und C.27/2). Die Fluoreszenzsignale wurden ab einer Kultivierungsdauer von 7,5 h im direkten Vergleich zu den zuvor fixierten Zellen etwas dunkler (Bilder G bis J, Abbildung C.27/2).

C. Ergebnisse

C.3.5.3 Bestimmung der maximalen Hybridisierungsdauer

Die Hybridisierungsdauer, die bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenzintensität erforderlich war, wurde für verschiedene *Cronobacter*-Stämme (Legende Abb. C.28) und exemplarisch für den Nichtzielorganismus *Enterobacter pulveris* (UZH 601/105) für die Hybridisierungstemperaturen 30°C und 45°C bestimmt.

Die Hybridisierung in Lösung wurde bei einem Salzgehalt von 50 mM in modifiziertem PCR-Puffer durchgeführt (Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2, C.3.3) und die Messintervalle wurden so lange fortgesetzt, bis das Fluoreszenzmaximum für beide Inkubationstemperaturen erreicht wurde.

Abbildung C.28 fasst die Ergebnisse für die Inkubationstemperatur 30°C zusammen.

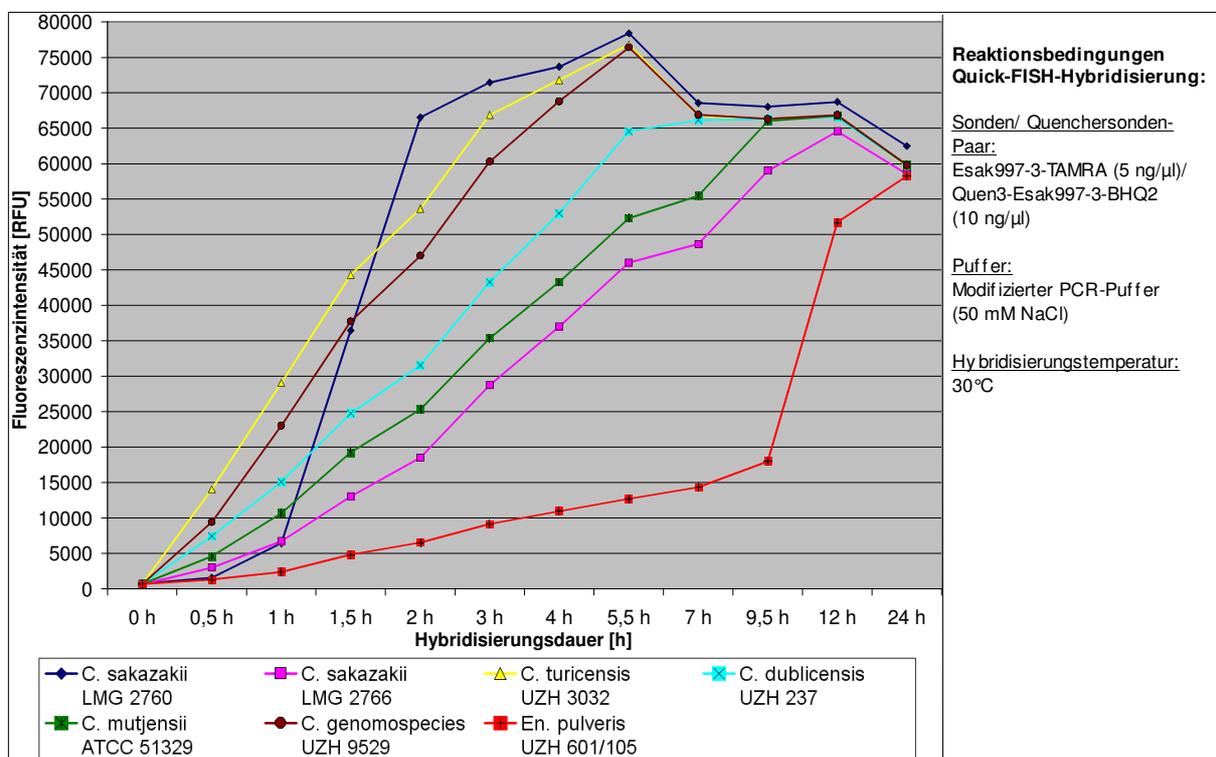


Abbildung C.28: Bestimmung des Fluoreszenzmaximums bei einer Hybridisierungstemperatur von 30°C

Die *Cronobacter*-Stämme *C. sakazakii* LMG 2760 (Abb. C.28, blauer Kurvenverlauf), *C. turicensis* UZH 3032 (Abb. C.28, gelber Kurvenverlauf) und *C. genomospecies* UZH 9529 (Abb. C.28, blauer Kurvenverlauf) erreichten das Fluoreszenzmaximum nach 5,5 h Hybridisierungsdauer. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde für *C. dublicensis* UZH 237 (Abb. C.28, türkiser Kurvenverlauf) nach 7 h Hybridisierung gemessen. *C. mutjensii* ATCC 51329 (Abb. C.28, grüner Kurvenverlauf) und *C. sakazakii* LMG 2766 (Abb. C.28, pinker Kurvenverlauf) erreichten dieses Maximum

C. Ergebnisse

nach 12-stündiger Hybridisierungsdauer. Das Fluoreszenzsignal des mitgeführten Nichtzielorganismus *En. pulveris* UZH 601/105 (Abb. C.28, roter Kurvenverlauf) stieg nach einer Hybridisierungsdauer von 9,5 h sehr deutlich an und erreichte nach 24 h Hybridisierung in etwa die gleiche Intensität (58248 RFU), die auch für die *Cronobacter*-Stämme detektiert wurde.

Bei einer Inkubationstemperatur von 45°C (Abb. C.29) erreichte *C. sakazakii* LMG 2760 (Abb. C.29, blauer Kurvenverlauf) das Fluoreszenzmaximum bereits nach 1 h Hybridisierungsdauer. *C. turicensis* UZH 3032 (Abb. C.29, gelber Kurvenverlauf), *C. genomospecies* UZH 9529 (Abb. C.29, brauner Kurvenverlauf) und *C. dublicensis* UZH 237 (Abb. C.29, türkiser Kurvenverlauf) erreichten ihr maximales Fluoreszenzsignal nach 2-stündiger Hybridisierung.

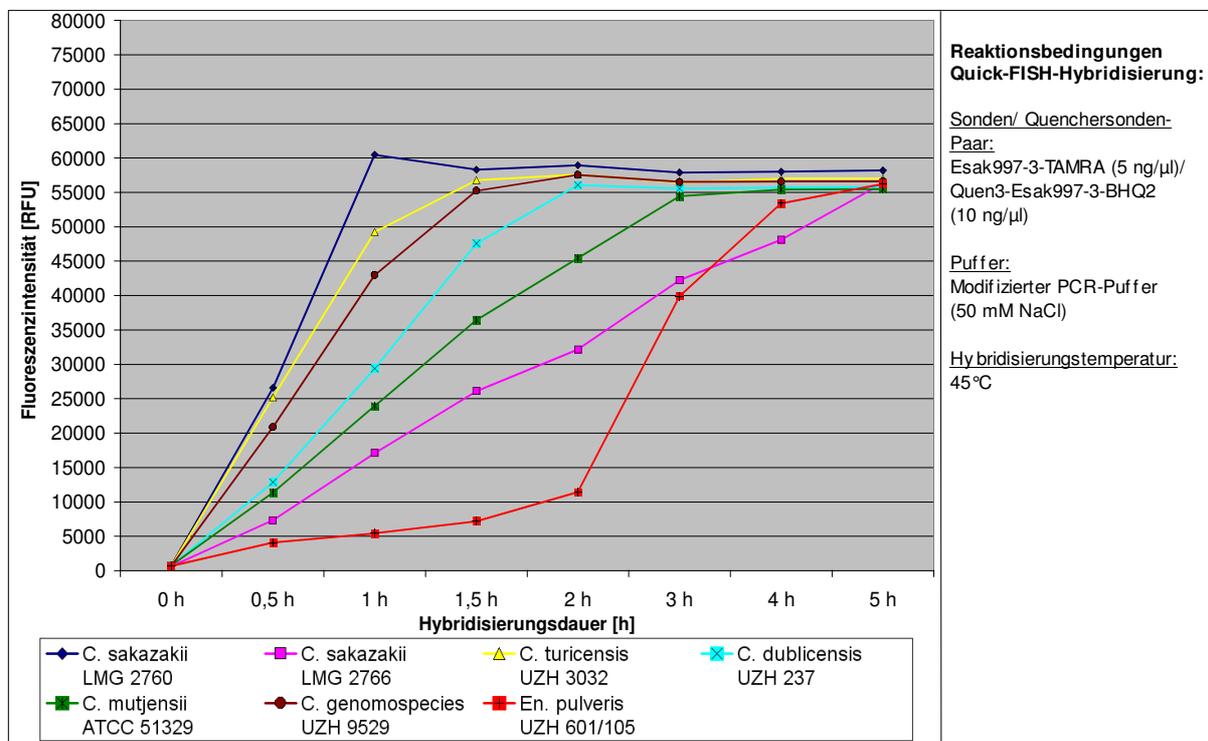


Abbildung C.29: Bestimmung des Fluoreszenzmaximums bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C

Für *C. mutjensii* ATCC 51329 (Abb. C.29, grüner Kurvenverlauf) wurden 3 h und für *C. sakazakii* LMG 2766 (Abb. C.29, pinker Kurvenverlauf) 5 h benötigt, um diese Intensität zu erzielen. Das Fluoreszenzsignal von *En. pulveris* UZH 601/105 (Abb. C.29, roter Kurvenverlauf) stieg nach einer Hybridisierungsdauer von 2 h sehr deutlich an und erreichte nach 4 h Hybridisierung in etwa die gleiche Intensität (53417 RFU), die auch für die *Cronobacter*-Stämme detektiert wurde.

Für eine weiterführende Interpretation dieser Ergebnisse siehe Diskussion D.2.3 (Seite 143).

C.3.5.4 Enzymatische Permeabilisierung der Zellen zur Erhöhung der Sensitivität

Es wurde untersucht, ob eine schwache enzymatische Vorbehandlung zu einer verbesserten Sondenpenetration führen könnte, sich daraus stärkere Fluoreszenzsignale ableiten ließen und sich dieses auch in einer schneller ablaufenden Hybridisierungskinetik widerspiegelt.

Als Ausgangsbasis für diesen Versuch wurden exponentiell angezogene *C. sakazakii*-Zellen (LMG 2760 und LMG 2766) verwendet. Diese wurden als Referenz ohne enzymatische Behandlung mit Ethanol (Variante 1) und Formaldehyd (Variante 4) fixiert (B.8.1). Für alle anderen Varianten (2, 3 und 5) wurde für die enzymatische Vorbehandlung das Enzym Lysozym verwendet (s. auch Tabelle C.15).

Als Versuchsvariante 2 wurden jeweils 2 ml der exponentiell gewachsenen Kulturen abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl Lysozymlösung (Konzentration: 0,1 mg/ml in H₂O_{bidest.}) resuspendiert. Diese Suspensionen wurden für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 200 µl EtOH 50 % resuspendiert.

Versuchsvariante 3 entsprach in der Durchführung der Versuchsvariante 2. Die Dauer der Enzymbehandlung wurde hier von 5 min auf 10 min bei RT erweitert.

Der enzymatischen Behandlung in Versuchsvariante 5 ging eine FAD-Fixierung (Formaldehyd-Fixierung) der Zellen voran (Pernthaler *et al.*, 2002b).

Dazu wurden jeweils 2 ml exponentiell gewachsene Kultur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl 4 %-iger Formaldehydlösung resuspendiert. Nach 1 stündiger Inkubation bei RT wurde die Formaldehydlösung über Zentrifugation entfernt (5000 rpm, 5 min) und die Zellen in 1 ml 1 x PBS-Lösung gewaschen (5000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in 500 µl Lysozymlösung (Konz.: 10 mg/ml in H₂O_{bidest.}) resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen final in 200 µl 50% EtOH resuspendiert.

Tabelle C.15 fasst die verschiedenen Versuchsvarianten als Übersicht zusammen.

C. Ergebnisse

Tabelle C.15: Übersicht Versuchsvarianten enzymatische Vorbehandlung

Variante-Nr.	1	2	3	4	5
Vorfixierung	keine	keine	keine	FAD-Fixierung	FAD-Fixierung
Enzymatische Permeabilisierung	keine	Lysozym 0,1 mg/ml / 5 min bei RT	Lysozym 0,1 mg/ml / 10 min bei RT	keine	Lysozym 10 mg/ml / 60 min bei 37 °C
Endfixierung	EtOH-Fixierung	EtOH-Fixierung	EtOH-Fixierung	EtOH-Fixierung	EtOH-Fixierung

Das Sonden/ Quenchersonden-Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 wurde unter den bereits standardisierten Versuchs- und Messbedingungen (C.3.3) für diese Hybridisierung bei 30 °C und 45 °C verwendet.

Die Ergebnisse der Hybridisierung in Lösung sind in den Abbildungen C.30 (Hybridisierungstemperatur: 30 °C) und C.31 (Hybridisierungstemperatur: 45 °C) zusammengefasst.

Parallel dazu wurden alle Fixierungen zur visuellen Kontrolle auf dem Objektträger mit der Sonde Esak997-TAMRA hybridisiert (B.8.3). Die mikroskopische Evaluierung aller Versuchsvarianten ist exemplarisch für *C. sakazakii* LMG 2760 in den Abbildungen C.32/1 und C.32/2 dargestellt.

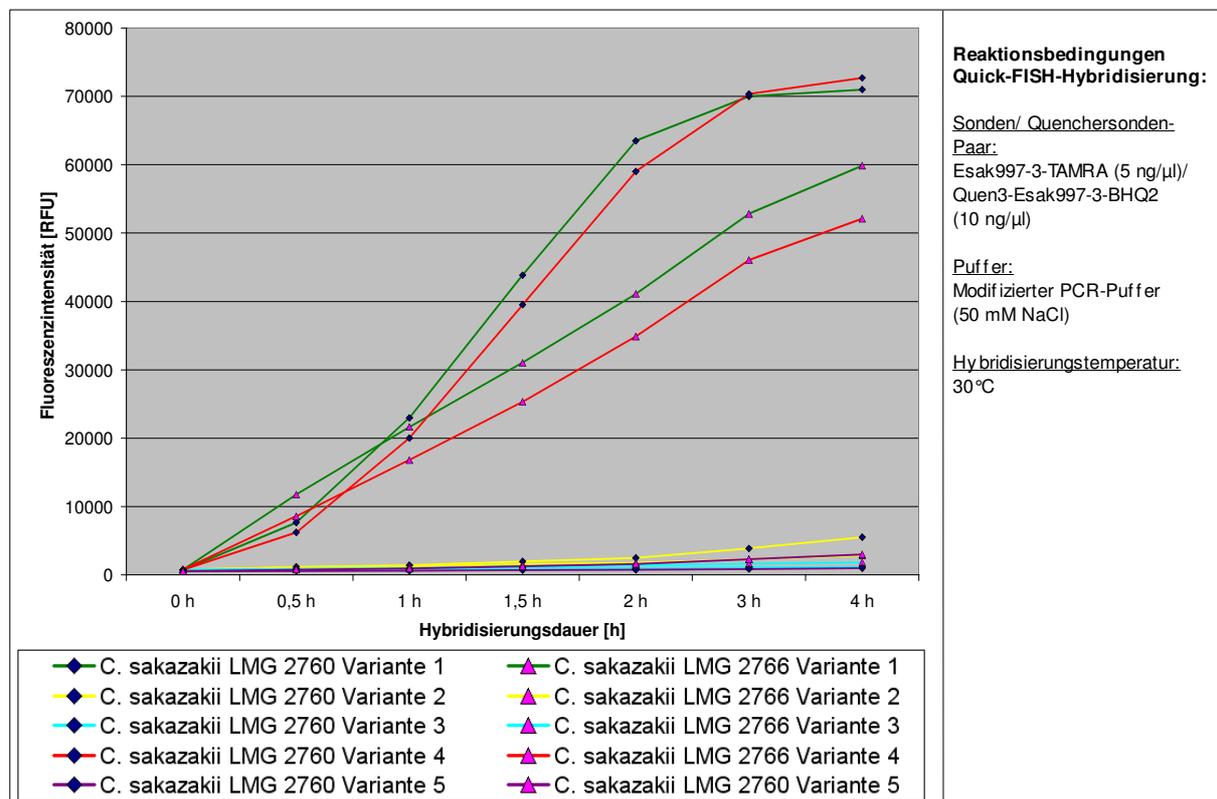


Abbildung C.30: Enzymatische Zellpermeabilisierung und Hybridisierung bei 30 °C

C. Ergebnisse

Für die unbehandelten EtOH- (Abb. C.30, Variante 1, grüne Kurven) und FAD-Fixierungen (Abb. C.30, Variante 4, rote Kurven) zeichnete sich ein vergleichbarer Reaktionsverlauf ab. Die maximal nach 4 h Hybridisierung detektierten Fluoreszenzsignale lagen im direkten Vergleich für die fixierten Zellen von *C. sakazakii* LMG 2560 tendenziell höher (Abb. C.30, EtOH-Fixierung: 70981 RFU und FAD-Fixierung: 72684 RFU) als für die parallel fixierten Zellen von *C. sakazakii* LMG 2766 (Abb. C.30, EtOH-Fixierung: 59863 RFU und FAD-Fixierung: 52112 RFU). Für die enzymatisch vorbehandelten EtOH-Fixierungen (Varianten 2 und 3) sowie für die nach FAD-Fixierung permeabilisierten Zellen (Variante 5) wurden bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C Fluoreszenzmaxima zwischen 997 RFU (LMG 2760, Abb. C.30, Variante 5) und 5527 RFU (LMG 2760, Abb. C.30, Variante 2) gemessen.

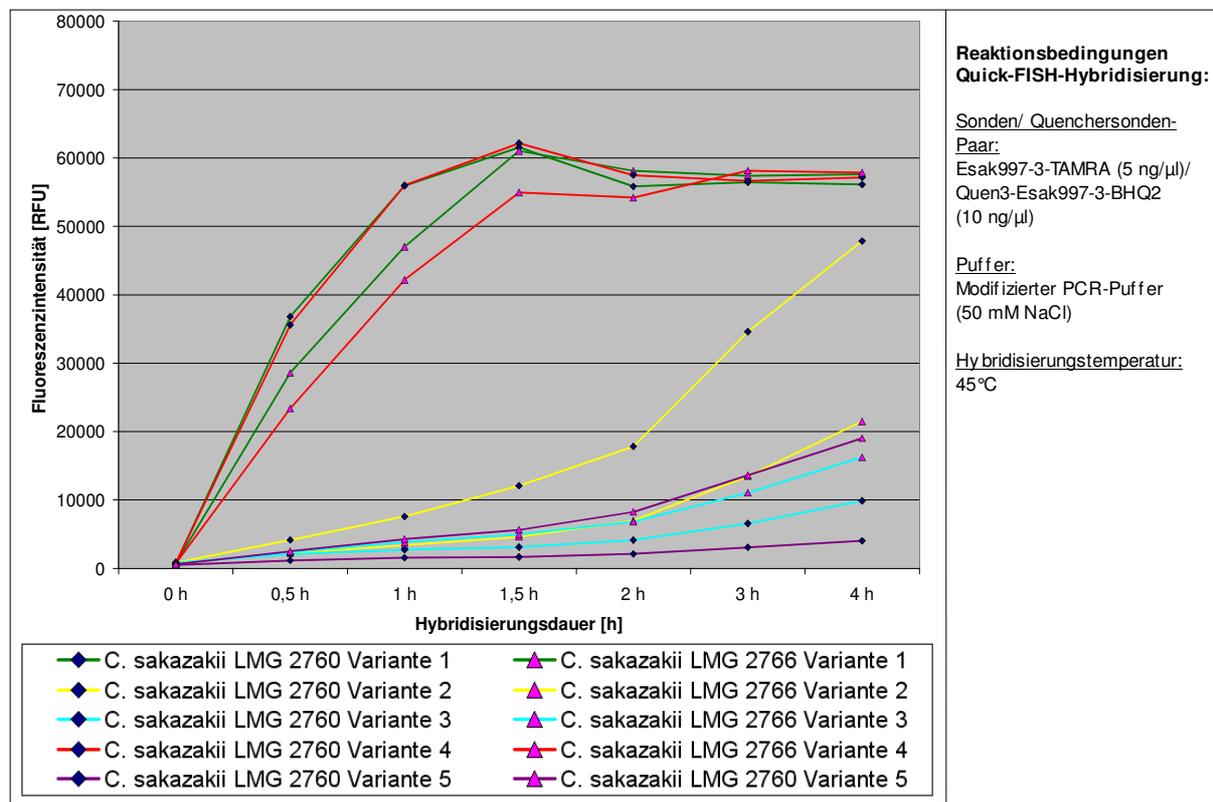


Abbildung C.31: Enzymatische Zellpermeabilisierung und Hybridisierung bei 45 °C

Im Vergleich dazu wurden bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C für die EtOH- und FAD-Fixierungen beider Stämme tendenziell vergleichbare Fluoreszenzmaxima detektiert (Abb. C.31, Varianten 1 und 4). Die Messwerte von *C. sakazakii* LMG 2760 betragen 56098 RFU (EtOH-Fixierung) und 57166 RFU (FAD-Fixierung). Die Messwerte für *C. sakazakii* LMG 2766 beliefen sich mit 57630 RFU

C. Ergebnisse

(EtOH-Fixierung) und 57838 RFU (FAD-Fixierung) auf einem vergleichbaren Intensitätsniveau. Für die nach Variante 2 (Abb. C.31) permeabilisierten Zellen wurden nach 4 h Hybridisierung Fluoreszenzmaxima von 47842 RFU (LMG 2760) und 21495 RFU (LMG 2766) gemessen. Für Variante 3 (Abb. C.31.) wurden Fluoreszenzintensitäten von 9883 RFU (LMG 2760) und 16263 RFU (LMG 2766) ermittelt. Die nach Variante 5 (Abb. C.31) permeabilisierten Zellfixierungen erzielten Messwerte von 4035 RFU (LMG 2760) und 19035 RFU (LMG 2766).

Die in den Abbildungen C.30 und C.31 zusammengefassten Ergebnisse verdeutlichen, dass durch eine enzymatische Zellpermeabilisierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellfixierungen keine Steigerungen im Fluoreszenzmaximum und der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt wurden. Vielmehr lagen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der permeabilisierten Zellfixierungen deutlich unter denen der unbehandelten Zellfixierungen. Die Differenz in der Fluoreszenzintensität im direkten Vergleich von unbehandelten und permeabilisierten Zellen prägte sich dabei am deutlichsten für die Hybridisierungstemperatur von 30 °C aus (Abb. C.30).

Die erhebliche Abschwächung des Fluoreszenzsignals, die in den Reaktionskinetiken (Abb. C.30 und C.31) beobachtet wurde, konnte mikroskopisch nicht reproduziert werden (Abb. C.32/1 und C.32/2).

Im Vergleich zur Hybridisierung in Lösung wurde für die Objektträger basierte Hybridisierung 1/10 der Zellmenge (1 µl pro Ansatz) verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen (Abb. C.32/1 und C.32/2) wurden alle mit der Belichtungszeit von 3000 ms aufgenommen. Die enzymatisch permeabilisierten Zellfixierungen wiesen im direkten Bezug zu den unbehandelten Referenzfixierungen leicht schwächere aber dennoch ausreichend gut detektierbare Fluoreszenzsignale auf (EtOH-fixierte Zellen: Abb. C.32/1, Bilder B, D und F; FAD-fixierte Zellen: Abb. C.32/2, Bilder B und D).

Morphologisch war im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine leichte Veränderung der Zellform durch die enzymatische Behandlung erkennbar (Abb. C.32/1, Bilder C, E und Abb. C.32/2, Bild C).

Für eine weiterführende Interpretation dieser Ergebnisse siehe Diskussion D.2.1 (Seite 130).

C. Ergebnisse

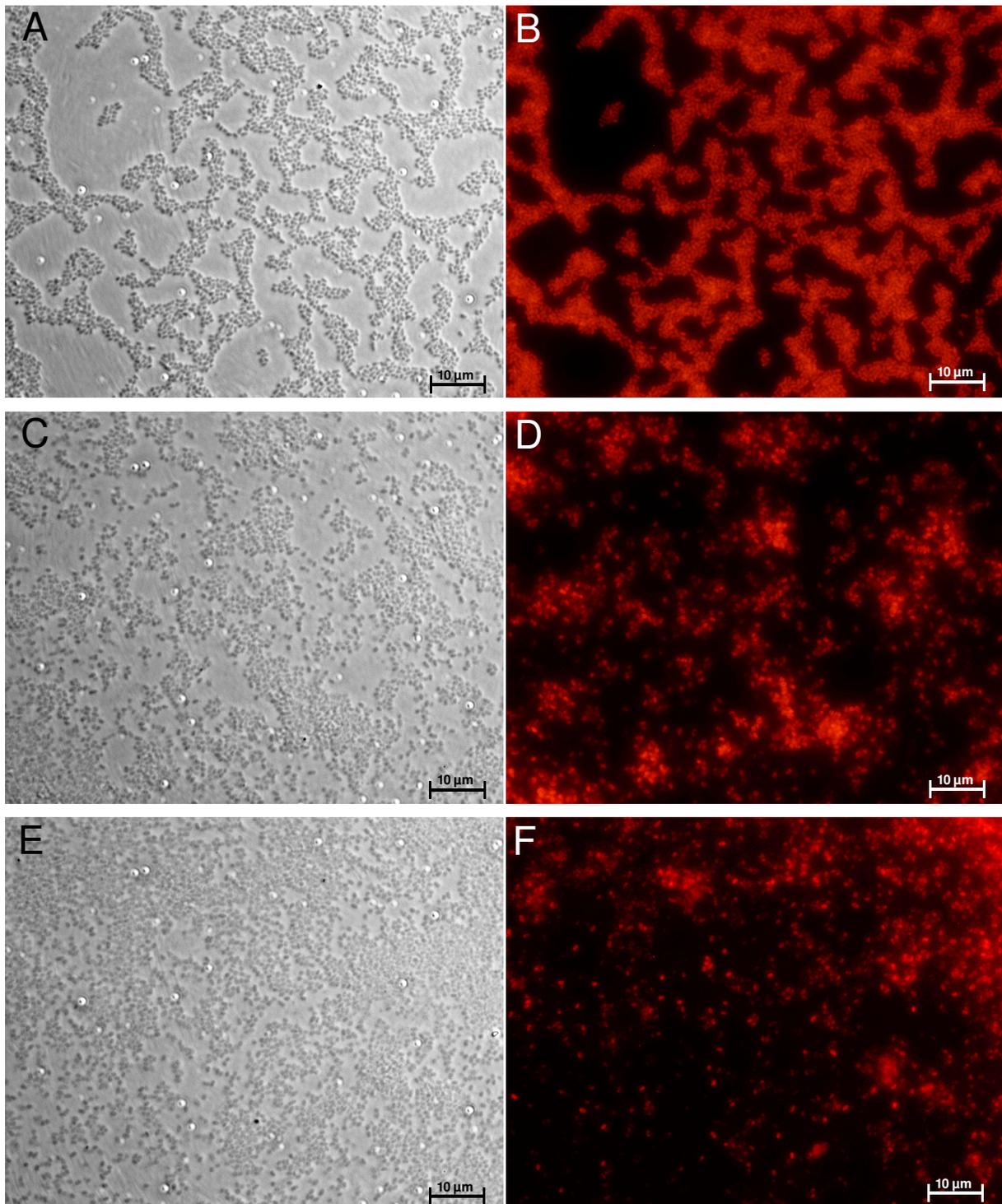


Abbildung C.32/1: Exemplarische Dokumentation der EtOH-Fixierungen von *C. sakazakii* LMG 2760

Alle Fixierungen wurden mit der Sonde Esak977-TAMRA hybridisiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung fotografiert.

A: Phasenkontrastaufnahme von nicht permeabilisierten EtOH-fixierten *C. sakazakii*-Zellen (Variante 1) **B:** Korrespondierendes Epifluoreszenzbild zu Bild A **C:** Phasenkontrastaufnahme von enzymatisch permeabilisierten EtOH-fixierten *C. sakazakii*-Zellen (Variante 2) **D:** Korrespondierendes Epifluoreszenzbild zu Bild C **E:** Phasenkontrastaufnahme von enzymatisch permeabilisierten EtOH-fixierten *C. sakazakii*-Zellen (Variante 3) **F:** Korrespondierendes Epifluoreszenzbild zu Bild E

C. Ergebnisse

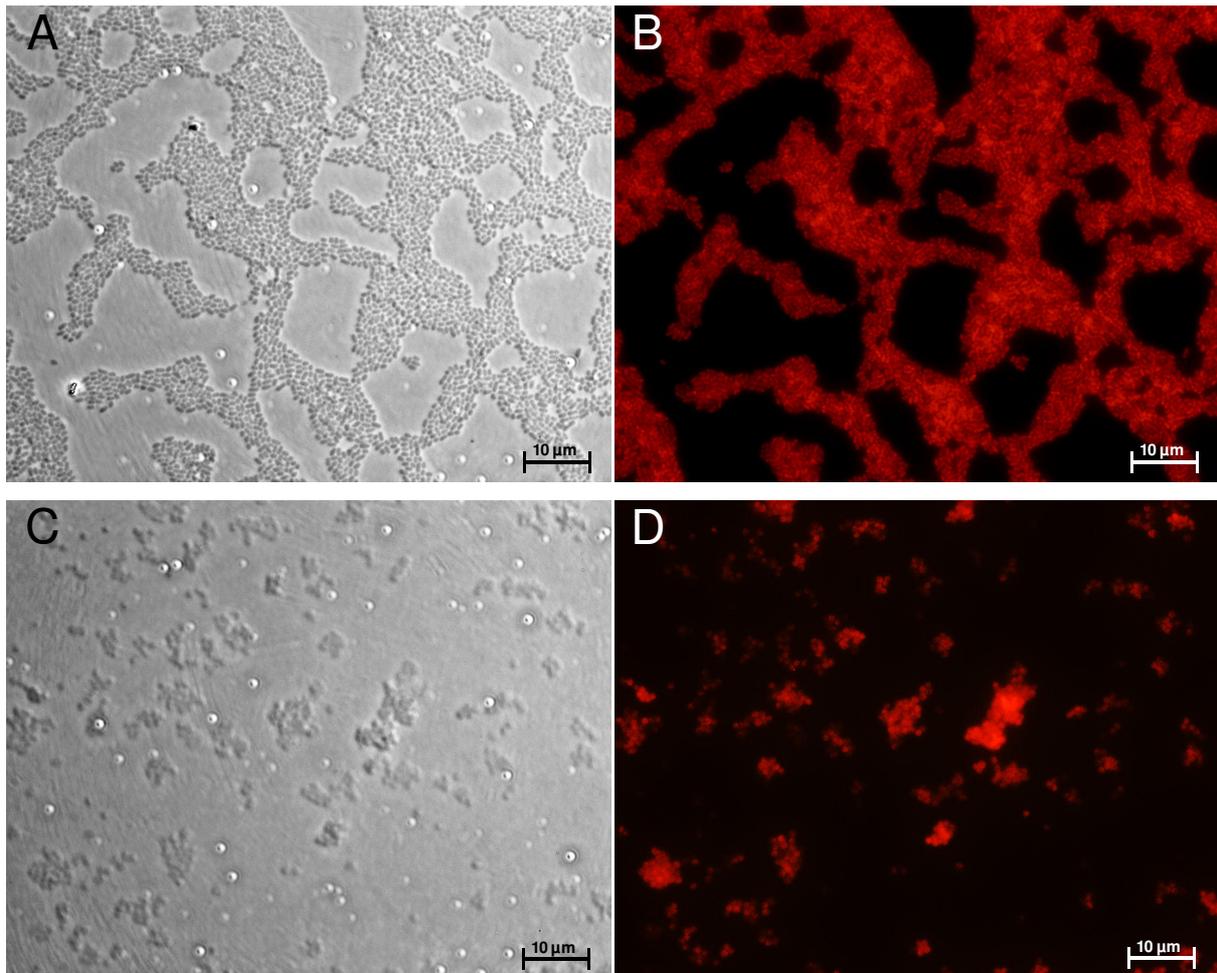


Abbildung C.32/2: Exemparische Dokumentation der FAD-Fixierungen von *C. sakazakii* LMG 2760

Alle Fixierungen wurden mit der Sonde Esak977-TAMRA hybridisiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung fotografiert.

A: Phasenkontrastaufnahme von nicht permeabilisierten FAD-fixierten *C. sakazakii*-Zellen (Variante 4)
B: Korrespondierendes Epifluoreszenzbild zu Bild A **C:** Phasenkontrastaufnahme von enzymatisch permeabilisierten FAD-fixierten *C. sakazakii*-Zellen (Variante 5) **D:** Korrespondierendes Epifluoreszenzbild zu Bild C

C.3.6 Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse

Für *C. sakazakii* LMG 2760 wurden bei einer vergleichbar eingesetzten Zellzahl (in etwa 10^8 Zellen pro Reaktionsansatz) in den bisher durchgeführten Messreihen nach 4 h Hybridisierungsdauer und einer Hybridisierungstemperatur von 30°C Fluoreszenzintensitäten von 32000 RFU bis 75000 RFU gemessen. Durchschnittlich lagen die Fluoreszenzintensitäten in etwa bei 40000 RFU. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C wurden nach 4 h Hybridisierung minimal 18000 RFU und maximal 60000 RFU gemessen. Durchschnittlich lagen die Fluoreszenzintensitäten bei 45000 RFU.

Durchschnittlich wurden für den Nichtzielorganismus *Enterobacter cloacae* DSM 30054 nach 4 h Hybridisierung Fluoreszenzintensitäten von 1500 RFU (30°C) und 50000 RFU (45°C) gemessen.

Ausgehend von den bisher erhaltenen Messwerten, wurde nachfolgend der Einfluss von unterschiedlichen Produktionschargen der Sonde Esak997-3-TAMRA auf die Intensitäten der erzielten Fluoreszenzsignale untersucht.

Die Sonden wurden jeweils in modifiziertem PCR-Puffer auf die Endkonzentrationen 5 ng/µl verdünnt und im Anschluss daran am Mikrotiterplatten-Fluorometer vermessen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle C.16 zusammengefasst.

Tabelle C.16: Fluoreszenzintensitäten unterschiedlicher Produktionschargen

Sonde	Charge	Fluoreszenzintensität [RFU] in modifiziertem PCR-Puffer
Esak977-3-TAMRA	00077996-1	72599
Esak977-3-TAMRA	00078516-1	65137
Esak977-3-TAMRA	00075208-1	76164
Esak977-3-TAMRA	00074214-3	87891
Esak977-3-TAMRA	00079457-1	63053
Esak977-3-TAMRA	00079457-2	57288

Für die verschiedenen Produktionschargen der Sonde Esak997-3-TAMRA wurden Fluoreszenzintensitäten zwischen 57288 RFU und 87891 RFU gemessen (Tab. C.16).

C. sakazakii LMG 2760 und *En. cloacae* DSM 30054 wurden mit den in Tabelle C.16 aufgeführten Sonden jeweils in Kombination mit der Quenchersonde

C. Ergebnisse

Quen3-Esak997-3-BHQ2 für 4 h in modifiziertem PCR-Puffer (50 mM NaCl) bei 30 °C und 45 °C hybridisiert (C.3.3). Um einen möglichen Einfluss der jeweiligen Sondenchargen auf die Quencheffizienz zu untersuchen, wurden alle Sonden (Tab. C.16) mit den entsprechenden Quenchersonden in modifiziertem PCR-Puffer (50 mM NaCl) zusätzlich auch ohne Zellen bei 30 °C und 45 °C hybridisiert.

Tabelle C.17 und Abbildung C.33 fassen die erhaltenen Messwerte zusammen.

Tabelle C.17: Vergleich verschiedener Chargen der Sonde Esak997-3-TAMRA

Sondencharge	Sondenmaximum [RFU]	Hybridisierungstemperatur: 30 °C			Hybridisierungstemperatur: 45 °C		
		<i>C. sakazakii</i> LMG 2760 [RFU]	<i>En. cloacae</i> DSM 30054 [RFU]	Quencheffizienz ohne Zellen [RFU]	<i>C. sakazakii</i> LMG 2760 [RFU]	<i>En. cloacae</i> DSM 30054 [RFU]	Quencheffizienz ohne Zellen [RFU]
00079457-1	63053	31032	1138	841	48826	49129	773
00079457-2	57288	31152	1148	792	47596	46646	746
00074214-3	87891	73210	1980	609	59476	57689	1068
00078516-1	65137	40278	1325	790	50448	47368	2150
00077996-1	72599	70981	1845	912	56098	52979	1242

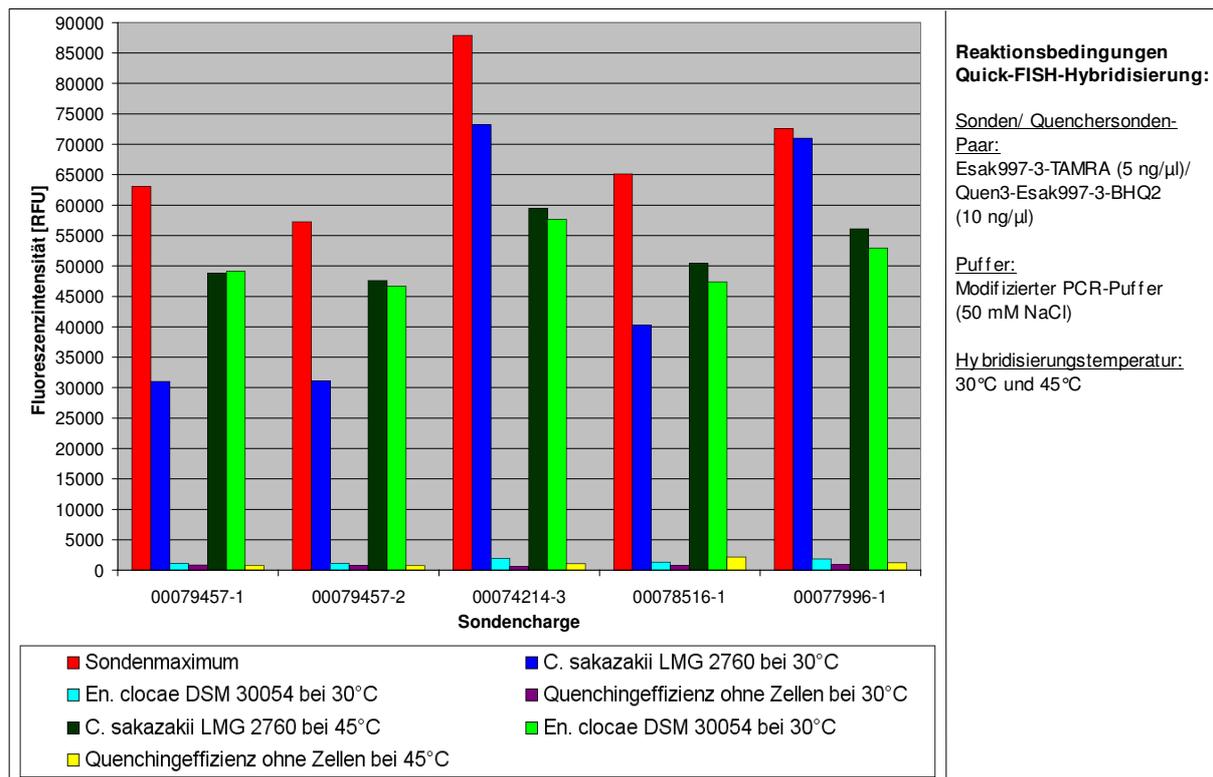


Abbildung C.33: Vergleich verschiedener Chargen der Sonde Esak997-3-TAMRA (siehe auch Tab. C.17)

Bei Verwendung von verschiedenen Sondenchargen (Tab.16) wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C ein deutlicher Einfluss auf die Signalintensität von *C. sakazakii* beobachtet (Abb. C.33 blaue Balken). Die erzielten Fluoreszenzmaxima resultierten in Messwerten zwischen 31032 RFU und

C. Ergebnisse

73210 RFU (Tab. C.17). Die Schwankungsbreite (minimale und maximale Fluoreszenzintensität) der Messwerte belief sich für *C. sakazakii* auf 42178 RFU. Die Messwerte für den Nichtzielorganismus *En. cloacae* und die Quenchingeffizienz wurden hingegen bei 30°C nur marginal beeinflusst (Tab. C.17).

Erfolgte die Hybridisierung bei 45°C wurden für *C. sakazakii* Fluoreszenzmaxima zwischen 47596 RFU und 59476 RFU gemessen (Tab. C.17). Daraus wurde eine Messwertschwankung von 11880 RFU berechnet. Für *En. cloacae* schwankten die erhaltenen Messwerte zwischen 46646 RFU und 57689 RFU (berechnete Differenz: 11043 RFU).

Die Quenchingeffizienz wurde bei 45°C ebenfalls nur unwesentlich beeinflusst. Durchschnittlich wurde hier die Fluoreszenz der verschiedenen Sonden durch Bindung an die Quenchingsonde auf 1200 RFU reduziert.

C.3.7 Etablierung einer Vorkultivierungsstrategie für Milchpulverproben

Als Vorkultivierungsdauer wird die Zeit definiert, die für das Wachstum von *C. sakazakii* benötigt wird, damit dieser über Kultivierung eine Konzentration erreicht, die im Nachweisbereich des Detektionssystems liegt.

Angelehnt an die ISO-Vornorm ISO/TS 22964:2006-02 (B.3.6) wurde eine Vorkultivierungsstrategie etabliert, mit der *C. sakazakii* in Milchpulverproben mittels Quick-FISH und Mikrotiterplatten-Fluorometer Detektion nachgewiesen werden kann. Dazu wurde analog zu den Kultivierungsbedingungen gemäß ISO-Vornorm eine zweistufige Anreicherungsstrategie, bestehend aus einer Voranreicherung und einer Selektivanreicherung implementiert.

Dazu wurden Milchpulverproben künstlich mit *C. sakazakii*-Zellen kontaminiert (10 Zellen/ 100 g) und bis zur Verarbeitung vier Wochen bei 4°C gelagert. Die eingesetzte Zellzahl wurde mittels Plattierung auf Trypton-Soja Agar bestätigt (B.2.4). 100 g Milchpulver (als Negativkontrolle) und 100 g künstlich mit *C. sakazakii* kontaminiertes Milchpulver wurden jeweils für die Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser (BPW, B.2.4), Trypton-Soja Bouillon (TSB, B.2.4), modifizierter Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon (mLSTB, B.2.4) und destilliertem Wasser (H₂O_{dest.}) resuspendiert und für 24 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Zur Selektivanreicherung wurden jeweils 0,1 ml Voranreicherung in Mossel-

C. Ergebnisse

Anreicherungsmedium (EE-Broth, B.2.4) und in modifizierte Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon (mLSTB) überführt und für weitere 24 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Ein Aliquot (2 ml) wurde aus jeder Selektivanreicherung entnommen, abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm) und das Zellpellet in 100 µl EtOH_{abs.} aufgenommen und fixiert.

Die EtOH-Fixierungen wurden zuerst mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf dem Objektträger (Sonde Esak997-TAMRA, B.8.3, jeweils 1 µl Fixierung pro Ansatz) analysiert. In allen parallel mitgeführten Negativkontrollen (nicht kontaminiertes Milchpulver) wurde *C. sakazakii* mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf dem Objektträger nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). In allen untersuchten Fixierungen des künstlich kontaminierten Milchpulvers war *C. sakazakii* mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf dem Objektträger jedoch eindeutig nachweisbar.

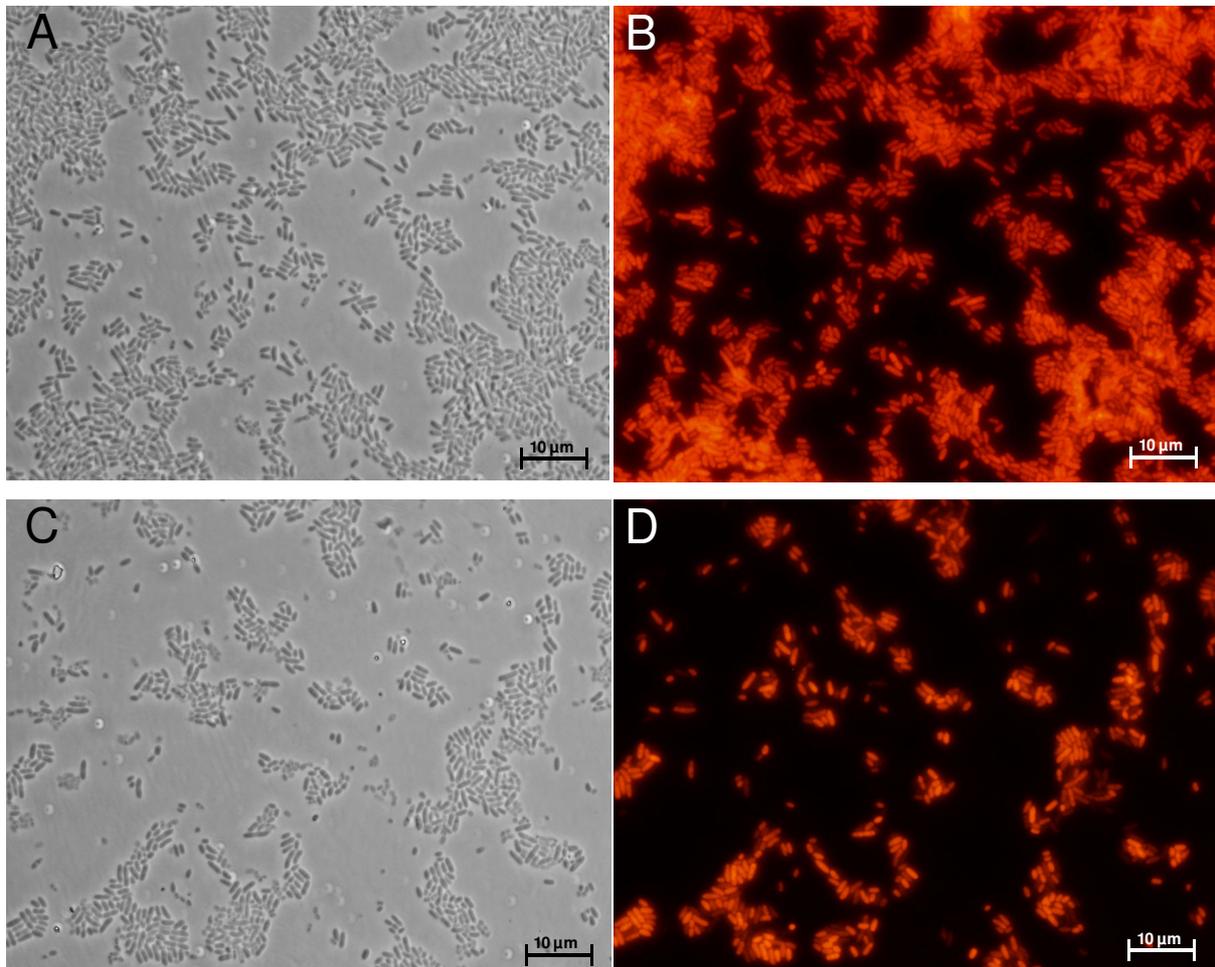


Abbildung C.34: Exemplarische Dokumentation der künstlich mit *C. sakazakii* kontaminierten Milchpulverproben (1000-fache Gesamtvergrößerung). Alle Fixierungen wurden mit der Sonde Esak977-TAMRA hybridisiert.

A: Phasenkontrastaufnahme der EtOH-fixierten Milchpulver Anreicherung (Voranreicherung: H₂O_{dest.}; Selektivanreicherung: EE-Broth) **B:** Korrespondierendes Epifluoreszenzbild zu Bild A **C:** Phasenkontrastaufnahme der EtOH-fixierten Milchpulver Anreicherung (Voranreicherung: mLSTB; Selektivanreicherung: EE-Broth) **D:** Korrespondierendes Epifluoreszenzbild zu Bild C

C. Ergebnisse

Für die *C. sakazakii*-Zellen wurden mittels der verschiedenen Vorkultivierungsstrategien jedoch mikroskopisch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten detektiert (Daten nicht gezeigt). Im direkten Vergleich der Fixierungen wiesen *C. sakazakii*-Zellen, die in mLSTB oder H₂O_{dest.} vorangereichert und zur Selektivanreicherung in EE-Broth überführt wurden, die hellsten und homogensten Fluoreszenzsignale auf (Abb C.34).

Ausschließlich diese Fixierungen wurden auch für die Hybridisierung in Lösung verwendet und über eine maximale Inkubationsdauer von 4 h bei den Inkubationstemperaturen 30 °C und 45 °C sowie einer NaCl-Konzentration von 50 mM in modifiziertem PCR-Puffer hybridisiert (Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2, C.3.3).

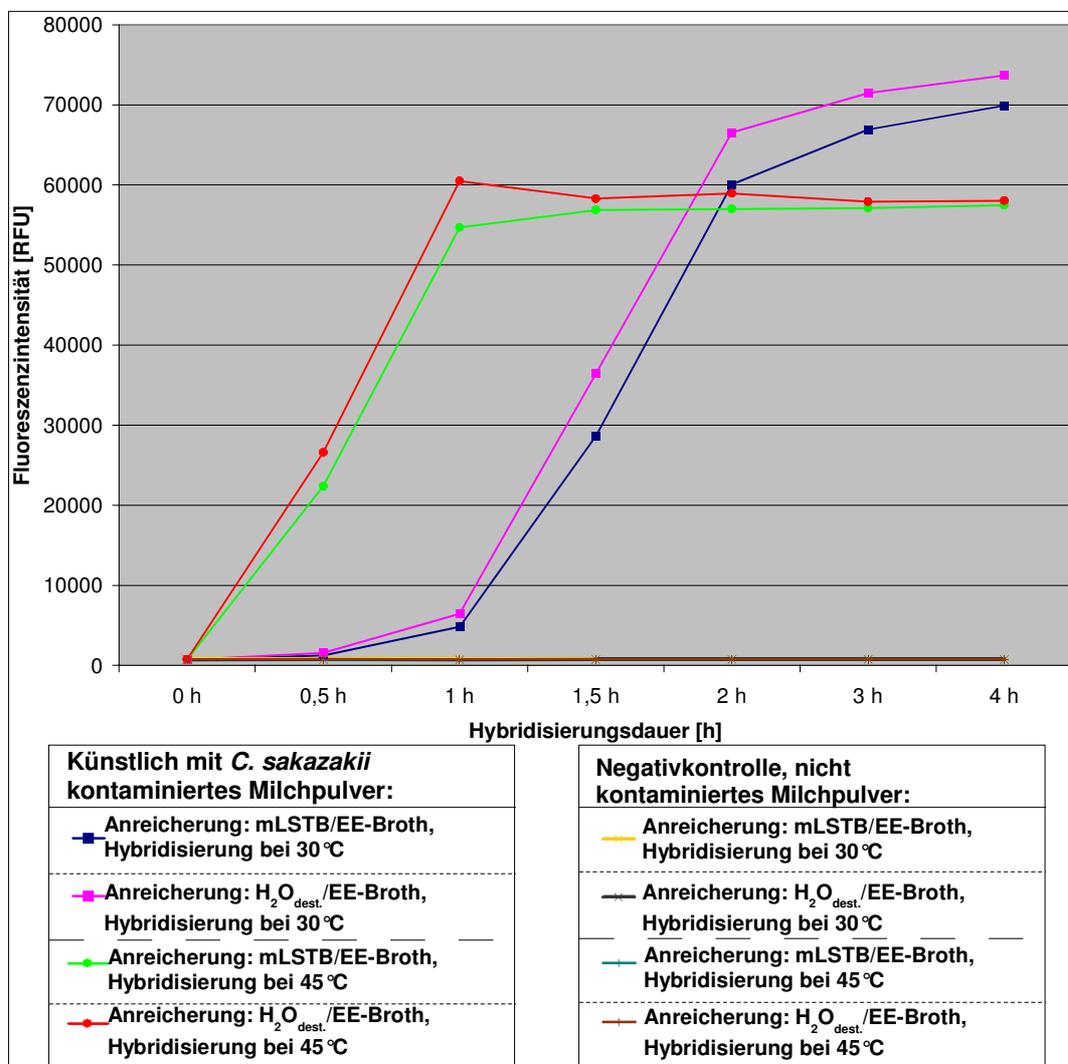


Abbildung C.35: Untersuchung von Milchpulverproben mittels Quick-FISH-Hybridisierung

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quencher-Sonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) bei 30 °C und 45 °C in modifiziertem PCR-Puffer (50 mM NaCl).

C. Ergebnisse

Die Abbildung C.35 zeigt die erhaltenen Reaktionskinetiken für die hybridisierten Fixierungen in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur und –dauer.

Den Kurvenverläufen ist zu entnehmen, dass in den künstlich mit *C. sakazakii* kontaminierten Milchpulverproben sowohl mittels Anreicherung in mLSTB (Voranreicherung) und EE-Broth (Selektivanreicherung) (Abb. C.35, blaue und hellgrüne Kurve), als auch mittels Anreicherung in H₂O_{dest.} (Voranreicherung) und EE-Broth (Selektivanreicherung) (Abb. C.35, pinke und rote Kurve), *C. sakazakii* eindeutig nachweisbar war. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C wurde die maximale Fluoreszenzintensität von *C. sakazakii* nach 1 h und bei 30 °C nach ca. 3 h Hybridisierung erreicht.

In allen parallel mitgeführten Negativkontrollen (nicht kontaminiertes Milchpulver) wurde *C. sakazakii* mittels Quick-FISH-Hybridisierung nicht nachgewiesen (Abb. C.35, gelbe, graue, dunkelgrüne und braune Kurve).

D. Diskussion

D.1 Optimierung der Bedingungen für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auf Filtermembranen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden routinetaugliche Protokolle für den FISH-basierten Nachweis von Mikrokolonien und Einzelzellen auf Filtermembranen entwickelt.

Der Nachweis von Mikrokolonien erfolgte am Beispiel von *Legionella*. Für den Direktnachweis von Einzelzellen, wurde die Entwicklung der Hybridisierung auf Filtermembranen exemplarisch für bierschädliche Bakterien durchgeführt. Ein besonderer Augenmerk wurde bei der Entwicklung auf die Kriterien Nachweisdauer, Sensitivität, Signal/Rausch-Verhältnis, Handhabung und Reproduzierbarkeit der Protokolle gelegt.

D.1.1 Einfluss verschiedener Membranfiltertypen

Aus den Ergebnissen (C.1 und C.2) geht hervor, dass die Auswahl der Filtermembran ein entscheidendes Kriterium für die Entwicklung der jeweiligen Applikation war. Die Selektion einer geeigneten Filtermembran hing dabei nicht nur von der generellen Handhabbarkeit für die FISH-Analyse ab, sondern für das Signal/Rausch-Verhältnis im Bezug auf das zur Auswertung ausgewählte Detektionsgerät eine entscheidende Rolle. Für den Nachweis von Mikrokolonien war ferner wichtig, dass sich die Filtermembran generell zur Kultivierung von Bakterien eignen musste und sich die Mikrokolonien im Anschluss an die Kultivierung ausreichend gut für die FISH-Analyse mit der Membran verankern ließen (C.1.1). In einer vergleichenden Studie an verschiedenen Filtermaterialien (C.1.2.1) konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Filtermembranen zum Teil signifikante Unterschiede in der Kultivierungseffizienz für Legionellen aufwiesen (Tabelle C.1, Seite 56). Die besten Wiederfindungsraten (79 % - 81 %) wurden in der vergleichenden Analyse für Cellulose-basierte Filtermembranen (Cellulose-Nitrat- und Cellulose-Nitrat/Cellulose/Acetat-Filtermembranen) erhalten. Die wenigsten Mikrokolonien wuchsen auf Polycarbonatmembranen (je nach Membran 0 % bis 16 %). Die unterschiedliche Kultivierungseffizienz der Membranen kann dabei auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. Ein Einfluss ist durch die mechanische Beschädigung der Bakterienzellen im Moment des Auftreffens auf die Membran annehmbar. Basierend auf den Ergebnissen (siehe Tabelle C.1, Seite 56) ist vorstellbar, dass einschichtige

Membranen wie z. B. Polycarbonat- oder Polyestermembranen diesen Effekt stärker forcieren können als mehrschichtige Membranen. Letztere könnten über ihre netzwerkartigen Strukturen einen schonenden Rückhalt der Zellen im Filtermaterial ermöglichen und damit der mechanischen Beschädigung entgegen wirken. Des Weiteren wird die Diffusion der Nährstoffe vom Nährmedium durch den Filter zu den Zellen über das Filtermaterial und eventuell auch über die Porengröße des Filters beeinflusst. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass ein Inhaltsstoff des Filtermaterials oder ein Farbstoff, der zum Einfärben der Membran verwendet wurde, einen toxischen Einfluss auf das Zellwachstum ausüben kann. Dieses könnte das vollständige Ausbleiben des Wachstums auf schwarzen Polycarbonatmembranen im Vergleich zu weißen Polycarbonatmembranen erklären.

D.1.2 Möglichkeiten zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, zur Verstärkung des Sondensignals und zur Optimierung der Handhabung

Die Optimierung des Signal/Rausch-Verhältnisses in Kombination mit einer Verstärkung des Sondensignals waren weitere entscheidende Aspekte für die Realisierung beider Protokollentwicklungen (Mikrokolonie- und Einzelzelldetektion). Aus den erhaltenen Ergebnissen geht hervor, dass unabhängig vom Material der Filtermembran eine Blockierung der Filteroberfläche von Nöten war, um den Filter während der Hybridisierung vor einer unspezifischen Bindung durch die Sondenmoleküle abzuschirmen. Die Ergebnisse (C.1.2.2) zeigten, dass sich auch hierfür analog zu anderen Membranhybridisierungsverfahren (z. B. Southern-Blot-, Western-Blot-Hybridisierung) eine Prä-Hybridisierung mit einer blockierenden Substanz (Hybridisierungspuffer mit 1 % Blocking Reagenz) zur Absättigung von freien Stellen auf der Membran eignete. In Kombination mit der Substitution von Hybridisierungs- und Waschpuffer mit blockierenden Substanzen (jeweils mit 1 % Blocking Reagenz und 1 % Roti-Block) konnte eine 95 %-ige Reduktion der Autofluoreszenzen erzielt werden. Diese Strategie konnte erfolgreich für die Hybridisierung von verschiedenen Filtermaterialien (Cellulose-Nitrat/Cellulose/Acetat, Polycarbonat und Polyester) eingesetzt werden (C.1.2.2, C.2.1, C.2.2).

Neben Autofluoreszenzen wurden im Vergleich zur Hybridisierung auf Objektträgern auch schwächere Signale der Zellen oder Mikrokolonien nach Hybridisierung auf Membranen detektiert (C.1.1, C.1.2.2, C.2.2.2). Es war davon auszugehen, dass trotz erfolgreich entwickelter Blockierungsstrategie immer noch zu wenige Sondenmoleküle für die spezifische Hybridisierung mit der rRNS der Zielzellen

D. Diskussion

verfügbar waren, um adäquat detektierbare Signalintensitäten zu erzielen. Für die Hybridisierung von Mikrokolonien konnte das Defizit an verfügbaren Sondenmolekülen durch Erhöhung der Sondenkonzentration von 50 ng/µl auf 100 ng/µl bei gleichbleibender Spezifität der Reaktion erfolgreich eliminiert werden (C.1.1). Für den Nachweis von Einzelzellen auf Filtermembranen wurde nach experimenteller Evaluierung verschiedener Signalverstärkungsmaßnahmen, ebenfalls eine Erhöhung der Sondenkonzentration (hier auf 200 ng/µl) in Kombination mit einer Verlängerung der Sondensequenzen auf 20 Basen das geeignete Vorgehen dar (C.2.2.2).

Bei der Analyse von Bierproben, fiel auf, dass diese Proben sehr viele Partikel und z. T. auch autolytierte Hefezellen enthielten, die einen störenden Effekt auf die automatische Auswertung mittels ChemScan RDI Laserscanner aufwiesen (C.2.3). Da keine genauere Charakterisierung der Partikel möglich war, wurden verschiedene Farbstoffe und Färbelösungen zur Gegenfärbung und somit Maskierung dieser Störeffekte überprüft (C.2.3). Dabei erwies sich 0,1 %-ige Evan's Blue Lösung, die im Anschluss an die Hybridisierung auf die Filtermembran appliziert wurde, als effektivste Maßnahme, um eine störungsfreie automatische Auswertung dieser Proben mittels ChemScan RDI zu realisieren.

Abschließend wurde die Handhabung der Filtermembranen und die Durchführung von beiden Protokollen über eine adaptierte Hybridisierungseinheit (Abb. C.2, Seite 61) für den robusten routinetauglichen Einsatz erfolgreich optimiert (C.1.2.3).

D.1.3 Manuelle, semi-automatische und automatische Quantifizierung von Filtermembranen

Im Zuge dieser Arbeit wurden zudem verschiedene Optionen zur routinetauglichen Quantifizierung von Mikrokolonien und Einzelzellen auf Filtermembranen entwickelt und evaluiert. Entsprechend der eingesetzten Auswertegeräte Epifluoreszenzmikroskop, Epifluoreszenzstereomikroskop oder ChemScan RDI Laserscanner wurden hierbei verschiedene Strategien zur manuellen, semi-automatischen oder automatischen Auswertung von Realproben angewendet (C.1.4, C.2.6.). Für die Quantifizierung von *Legionella*-Mikrokolonien konnte gezeigt werden, dass mittels manueller Auswertung der gesamten Filtermembran oder eines Teilbereichs der Membran am Epifluoreszenzmikroskop (C.1.4.1) eine gute Übereinstimmung zum klassischen Kulturverfahren nach UBA-Empfehlung (B.3.4) erzielt werden konnte. Die höhere Anzahl an Trinkwasserproben mit positiven

D. Diskussion

Befunden für Legionellen wurde dabei mittels FISH-Analyse detektiert (C.1.3). Dieses kann dadurch erklärt werden, dass über die FISH-Analyse jede gewachsene Kolonie auf der Filtermembran bestätigt wurde und nach UBA-Empfehlung die Gesamtzahl an Legionellen pro Analysevolumen ausschließlich über die Bestätigung von 3 bis 5 verdächtigen Kolonien abgeschätzt wurde. Eine erste semi-automatische Quantifizierung von Mikrokolonien mittels der Kombination Epifluoreszenzstereomikroskop und eines Softwremakros zeigte eine gute Alternative zur manuellen Quantifizierung (C.1.4.2).

Der FISH-basierte Direktnachweis von bierschädlichen Bakterien lieferte in Kombination mit einer automatischen Quantifizierung am ChemScan RDI Laserscanner eine sehr gute Korrelation zum klassischen Kulturverfahren (C.2.7) und kann zukünftig in Brauereien zu einer deutlichen Beschleunigung der mikrobiologischen Freigabe eingesetzt werden.

D.1.4 Ausblick Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Filtermembranen

Die durchgeführten Protokollentwicklungen zeigten, dass die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Membranfiltern erfolgreich in routinetaugliche Reaktionsformate überführt werden konnte. Die umfangreichen Validierungsstudien bescheinigen beiden entwickelten Protokollen mindestens eine vergleichbare oder verbesserte Sensitivität, Spezifität und Nachweisgeschwindigkeit im Vergleich zu den entsprechenden klassischen Kultivierungsverfahren. Auf Grundlage dieser Entwicklungen sind weiteren Applikationen zur FISH-basierenden Analyse von flüssigen Proben auf Filtermembranen denkbar. Je nach Ausrichtung und Anforderung der Applikation stehen Optionen zum Nachweis von Mikrokolonien oder Einzelzellen bereit, die entsprechend der Auswertungseinheit über eine manuelle, semi-automatische oder vollautomatische Quantifizierung für die Bedürfnisse eines Labors in der Lebensmittelindustrie skaliert werden können.

D.2 Prinzip Quick-FISH

Basierend auf der Standard-FISH-Technik (A.1) wurde in dieser Arbeit ein neuer Reaktionsmechanismus zur Hybridisierung in Lösung entwickelt, über den eine hohe Probenanzahl parallel (high-throughput) im Mikrotiterplattenformat auf das Vorhandensein von lebensmittelrelevanten Bakterien untersucht werden kann.

Damit dieses Verfahren zukünftig in der Routineanalytik der Lebensmittelindustrie etabliert werden kann, wurde bereits bei der Konzipierung des Nachweissystems ein Hauptaugenmerk auf eine einfache, aus möglichst wenigen Arbeitsschritten bestehende Durchführung sowie auf eine vollautomatische Auswertung gelegt.

Zur Realisierung dieses Vorhabens wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Lösung (Wallner *et al.*, 1995 und Thelen, 2002) mit einem statischen Fluoreszenzquenching-Verfahren (A.3) kombiniert. Dieses hatte den Vorteil, dass durch den Einsatz einer Fluoreszenzquenching-Technologie Wasch- und Spülschritte, die bei der Standard-FISH-Technik zur Entfernung von ungebundenen Sonden eingesetzt werden, obsolet wurden und die Analyse ohne komplexe Geräteausstattung (wie z. B. Mikrotiterplatten-Zentrifuge) durchgeführt werden konnte. Für den Modellorganismus *Cronobacter* spp. wurden zwei Reaktionsstrategien (A und B) entwickelt (C.3.3.1), über die sich die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Lösung mit einem statischen Fluoreszenzquenching-Verfahren kombinieren ließen. Der Reaktionsmechanismus von Strategie A (Abb. C.7, Seite 82) war dabei an den der Standard-FISH-Technik (A.1) angelehnt. Anstelle des Waschschrilles wurden Quenchersonden eingesetzt, die durch Hybridisierung mit den überschüssigen oder ungebundenen Sonden ungewollte Fluoreszenzen in der Lösung auslöschen sollten. Für Strategie B (Abb. C.8, Seite 83) wurde ein alternativer Reaktionsmechanismus entwickelt. Sonden und Quenchersonden wurden hierbei direkt von Beginn der Reaktion an gleichzeitig zu den Zellen appliziert. Auf diese Weise sollte sich eine Signalentwicklung ausschließlich für die Zielzellen entwickeln, für die die Sonde konzipiert wurde. Nichtzielzellen sollten dadurch von Reaktionsbeginn an diskriminiert werden können.

Ein experimenteller „proof of concept“ (C.3.3.4) wurde für beide konzeptionierten Hybridisierungsstrategien an *Cronobacter sakazakii* und ausgewählten Nichtzielorganismen erbracht. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C in Kombination mit modifiziertem PCR-Puffer als Hybridisierungspuffer wurde der Zielorganismus eindeutig von den Nichtzielorganismen diskriminiert (Strategie A:

D. Diskussion

Abb. C. 12, Seite 90 und Strategie B: Abb. C. 14, Seite 91). Die Methode zur Hybridisierung in Lösung nach Strategie A wurde in dieser Arbeit jedoch nicht mehr weiter untersucht. Der weitere Fokus der Methodenentwicklung wurde auf Strategie B gelegt, da sich diese bei vergleichbarer Hybridisierungsdauer durch eine einfachere Handhabung und ein kürzeres Protokoll auszeichnete. Für die als Quick-FISH bezeichnete Strategie B (Abb. C.8, Seite 83) wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Parameter aufgeklärt, die für den Reaktionsmechanismus, die Spezifität, die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verantwortlich sind.

D.2.1 Reaktionsmechanismus Quick-FISH

Betrachtet man den Ablauf der Quick-FISH-Reaktion (Abb. C.8, Seite 83), so ist festzustellen, dass die gesamte Reaktion aus zwei verschiedenen Hybridisierungen besteht. Zum einen bilden Sonde und Quencherprobe über eine DNS:DNS-Hybridisierung ein nicht fluoreszentes Hybrid aus und zum anderen hybridisiert die Sonde nach Dissoziation dieses Hybrides über eine DNS:RNS-Hybridisierung an ihre Zielstelle auf der rRNS innerhalb der Bakterienzelle (Abb. C.7, Seite 82). Die Zuwachsrates der DNS:RNS-Hybride kann dabei über die Zunahme der Fluoreszenzsignale am Mikrotiterplatten-Fluorometer bestimmt werden.

Basierend auf den experimentellen Daten (C.3) sind in Abbildung D.1 die hypothetisch angenommenen Abhängigkeiten der DNS:DNS- und DNS:RNS-Hybridisierungen zueinander schematisch als Gleichgewichtsreaktionen dargestellt.

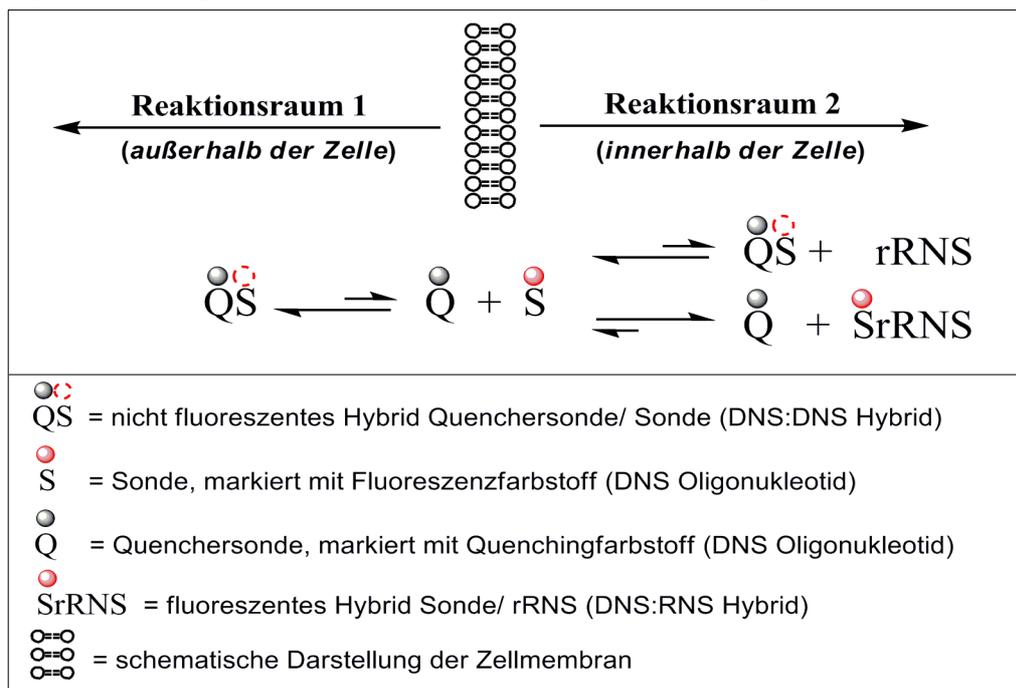


Abbildung D.1: Schematische Darstellung der hypothetisch angenommenen Reaktionsgleichgewichte der DNS:DNS- und RNS:DNS-Hybridisierungen

D. Diskussion

Die beiden möglichen Hybridisierungsziele (Quenchersonde (DNS) und Bindungsstelle auf der rRNS (RNS)) stehen dabei in dieser Reaktion in direkter Konkurrenz um die Sonde (DNS).

Zu Beginn der Quick-FISH-Reaktion oder in Abwesenheit von rRNS-Bindungsstellen liegen Quenchersonden und Sonden als DNS:DNS-Hybride vor. Da Quenchersonden und Sonden nicht in gleichen Teilen, sondern im Verhältnis 3:1 in die Reaktion eingesetzt wurden, wird das Sondersignal in der Lösung nahezu vollständig ausgelöscht (98 % bis 99 %, Tab. C.12, Seite 88) und das Reaktionsgleichgewicht verschiebt sich anfänglich zu Gunsten der DNS:DNS-Hybridisierung.

Im Fall, dass potenzielle Zielstellen auf der rRNS für die Sonden verfügbar sind, verschieben sich die Gleichgewichte der Reaktionen in Abhängigkeit von der Hybridisierungsdauer vom DNS:DNS-Hybrid in Richtung DNS:RNS-Hybrid. Die Sonden werden dabei durch die Bindung an die rRNS stetig aus der Gleichgewichtsreaktion entzogen und forcieren auf diese Weise eine weitere Dissoziation der Quenchersonden/ Sonden-Hybride.

Dieser Verlauf setzt sich so lange fort, bis keine freien Sondenmoleküle für die Hybridisierung an die rRNS aus der Dissoziation der Quenchersonden/ Sonden-Hybride zur Verfügung stehen oder alle potenziellen Zielstellen durch eine Sondenbindung abgedeckt wurden. Zu diesem Zeitpunkt wird die maximale Fluoreszenzintensität in der Lösung erhalten und die Reaktion erreicht einen stabilen gesättigten Zustand. Die Konkurrenz der beiden möglichen Zielstellen (Quenchersonde oder rRNS) um die Sondenmoleküle kommt zum Erliegen (siehe z. B. auch Abb. C.29, Seite 112). Ein Großteil der Sonden ist dabei als DNS:RNS-Hybrid an die rRNS gebunden. Ein kleinerer Anteil an Sondenmolekülen verbleibt im DNS:DNS-Hybrid mit der Quenchersonde. Experimentell (C.3.6) wurde das prozentuale Verhältnis von DNS:DNS-Hybriden zu DNS:RNS-Hybriden nach 4 h Hybridisierung durchschnittlich als 30,7 % zu 69,3 % (Hybridisierungstemperatur: 30°C) und 23,4 % zu 76,6 % (Hybridisierungstemperatur: 45°C) bestimmt. Eine deutlich messbare Rückreaktion der an die rRNS gebundenen Sonden an die nun freien Quenchersonden wurde zu keinem Zeitpunkt experimentell beobachtet.

Für die räumliche Aufteilung der DNS:DNS- und DNS:RNS-Hybridisierungen innerhalb des Quick-FISH-Reaktionsmechanismus besteht folgende Hypothese (siehe auch Abb. D.1):

D. Diskussion

Es wird vermutet, dass die DNS:DNS-Hybride aus Quenchersonden/ Sonden hauptsächlich außerhalb der Zelle von Bestand sind. Durch Diffusionsprozesse gelangen die DNS:DNS-Hybride zu den Zellen und dissoziieren vor dem Eintritt durch die Zellhülle in die Zelle wieder in freie Quenchersonden- und Sondenmoleküle. Dieser Prozess wird dabei vermutlich entscheidend durch die Zellhülle beeinflusst. Es wird angenommen, dass diese als semi-permeable Barriere für einzelsträngige DNS-Moleküle die Dissoziation der DNS:DNS-Hybride fördert und, so fern entsprechende Zielstellen auf der rRNS vorhanden sind, auf diese Weise eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zu Gunsten der DNS:RNS-Hybridisierung ermöglicht.

Über die Versuche C.3.3.5, C.3.3.6, C.3.3.7 und C.3.5.4 konnten diese Annahmen experimentell belegt werden. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde dabei als Maß für die Aufhebung des Fluoreszenzquenchings und somit für die Dissoziation des DNS:DNS-Hybridides und die Hybridisierung der Sonde an die rRNS herangezogen. Für intakte fixierte *Cronobacter*-Zellen (EtOH- oder FAD-Fixierung) wurden nach 4 h Hybridisierungsdauer bei einer Inkubationstemperatur von 30°C Fluoreszenzintensitäten von > 50000 RFU erzielt (siehe z. B. Abb. C.30, Seite 114). Wurde die Zellhülle dieser Zellen jedoch durch eine enzymatische Behandlung (Lysozym) perforiert (3.5.4), war unter gleichen Versuchsbedingungen ein Abfallen der Fluoreszenzintensitäten auf < 6000 RFU zu beobachten. Da eine Zelllyse der Zellen durch die Lysozymbehandlung über eine parallel auf dem Objektträger durchgeführte Standard FISH-Analyse visuell ausgeschlossen wurde (siehe Abb. C32/1, Seite 117), kann angenommen werden, dass die Barriere-Funktion der Zellhülle durch die Enzymbehandlung aufgehoben wurde und Quenchersonden sowie Sonden nicht als einzelsträngige freie Moleküle sondern als DNS:DNS-Hybride in die Zelle gelangen konnten. Der Reaktionsschwerpunkt verblieb somit auf der DNS:DNS-Hybridisierung und eine DNS:RNS-Hybridisierung wurde nur in einem geringfügigen Umfang (< 6000 RFU) detektiert. Versuche an freien DNS-Molekülen als alternatives Hybridisierungsziel zur rRNS lieferten weitere Indizien für diese Hypothese. Wurden diese (z. B. genomische DNS, 16S-rDNS PCR Produkte oder Oligonukleotide, alle mit entsprechender Bindungsstelle für die Sonden), anstelle von intakten fixierten Zellen in die Reaktion eingesetzt, wurden ähnlich niedrige Fluoreszenzintensitäten (< 6000 RFU) gemessen wie für die enzymatisch perforierten Zellen (siehe Abb. C.17, Seite 95). Auch die Ergebnisse, die über einen

D. Diskussion

Zusatz des proteindenaturierenden und lipidlösenden Detergenzes SDS (Natriumdodecylsulfat) zum modifizierten PCR-Puffer erhalten wurden (C.3.3.7), stützen die Hypothese zur essentiellen Funktion der Zellhülle für den Quick-FISH-Reaktionsmechanismus. Bereits durch den Zusatz von geringen Konzentrationen an SDS (0,1 %) war ein Effekt des Detergenzes auf die Integrität der Zellhülle erkennbar. Für die fixierten *Cronobacter*-Zellen wurden unter diesen Bedingungen nur niedrige Signalintensitäten von < 5000 RFU (siehe Abb. C.18, Seite 97) erzielt.

Das Ergebnis aus der Hybridisierung von unfixierten Zellen am Beispiel von *En. pyrinus* (C.3.3.5) lässt jedoch darauf schließen, dass eine gewisse Permeabilisierung der Zellhülle durch die Fixierung von Nöten ist, um diese für Sonden und Quenchersonden Moleküle durchlässig zu machen und die Diffusionsprozesse der ssDNS-Oligonukleotide in die Zelle zu ermöglichen. Die Messdaten in Abbildung C.16 (Seite 94) zeigen, dass für unfixierte Zellen keine Fluoreszenzsignale messbar waren. Die Fluoreszenzintensitäten von 551 RFU entsprachen in etwa denen (502 RFU), die auch für die Negativkontrolle (Puffer inklusive Sonde und Quenchersonde) des Versuchs erhalten wurden. Eine DNS:RNS-Hybridisierung hatte somit für die unfixierten Zellen nicht stattgefunden.

Die aufgeführten Ergebnissen verdeutlichen folglich, dass davon ausgegangen werden kann, dass insbesondere die Zellhülle entscheiden zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zu Gunsten der DNS:RNS-Hybridisierung beiträgt (siehe Abb. D1). Denn erst durch die angenommene Impermeabilität der Zellhülle für DNS:DNS-Hybride kann ein Druck zur Dissoziation auf die Hybride aus Quenchersonden/ Sonden ausgeübt werden, der im weiteren Reaktionsverlauf die Bindung der Sondenmoleküle an die rRNS im stärkeren Maße forciert.

Des Weiteren lassen die ähnlichen strukturchemischen Eigenschaften (Größe und Struktur) von Quenchersonden und Sonden den Schluss zu, dass beide Moleküle prinzipiell in einzelsträngiger Form und unter vergleichbaren Bedingungen durch Diffusionsprozesse in die Zellen gelangen können. Die Annahme über ein vergleichbares Reaktionsverhalten von Quenchersonden und Sonden beruht darauf, dass beide Moleküle in etwa übereinstimmende Molekulargewichte (MW) aufweisen (MW Quenchersonde: 6348 Da, MW Sonde: 6404 Da) und die Modifikationen BHQ2 und TAMRA zudem eine ähnliche räumlichen Struktur besitzen (siehe Biosearch Technologies (BHQ2), Applied Biosystems (TAMRA)). Nach Diffusion beider ssDNS-Moleküle in die Zelle, bilden die Sondenmoleküle aufgrund des Überangebotes an

D. Diskussion

potenziellen Zielstellen auf der rRNS präferentiell ein DNS:RNS-Hybrid aus und eine Reassoziaton mit den Quenchersonden findet deshalb nur in deutlich geringerem Umfang statt (siehe Abb. D1).

D.2.2 Parameter zur Beeinflussung der Reaktionskinetik und Spezifität

Der für Quick-FISH beschriebene Reaktionsmechanismus (D.2.2) verdeutlicht, dass innerhalb dieser Reaktion zwei vollständig konträre Ereignisse ablaufen, die für eine erfolgreiche Detektion des gewünschten Zielorganismus innerhalb der gleichen Reaktion miteinander verknüpft werden müssen. Zum einen soll eine möglichst hohe Dissoziationsrate für das DNS:DNS-Hybrid aus Sonde und Quenchersonde erzielt werden und zum anderen müssen in der gleichen Reaktion Bedingungen geschaffen werden, damit eine möglichst hohe Assoziationsrate der Sonde mit der rRNS forciert wird. Daraus wird deutlich, dass die Kinetik der Reaktion einen direkten Einfluss auf die Spezifität hat und die Optimierung dieser beiden Faktoren folglich in direkter Abhängigkeit zueinander steht. Für die gezielte Steuerung der Reaktionsbedingungen war deshalb eine Untersuchung der Parameter entscheidend, die einen Effekt auf die Kinetik und Spezifität dieser Nukleinsäurehybridisierungen haben können.

Die meisten Informationen zu diesen Parametern, stammen aus DNS:DNS-Reassoziationsexperimenten sowie aus filterbasierten Hybridisierungsstudien (z.B. Southern-Blot-, Northern-Blot-, Dot-Blot-Hybridisierungen etc.). Es zeigte sich, dass diese ebenfalls für die Regulierung der Spezifität der Standard-FISH-Technik mit Oligonukleotidsonden herangezogen werden können (siehe auch A.1 und A.2). Als Faktoren, die einen Einfluss auf die Assoziation und Dissoziation von Nukleinsäuresträngen haben, wurden Parameter wie Temperatur, Salzgehalt (Ionenstärke) des Puffers, denaturierende Agenzien, Basenzusammensetzung, Länge der Stränge und Anzahl der Basenunterschiede identifiziert (Schleifer *et. al.*, 1993). Bei gleicher Basenzusammensetzung nimmt dabei die Stabilität der Hybride in der Reihenfolge DNS:DNS-Hybrid → DNS:RNS-Hybrid → RNS:RNS-Hybrid zu (Saenger, 1984).

Für Quick-FISH kann die Effektivität der Dissoziation des Hybrids (Sonde/Quenchersonde) neben der Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen der Nukleinsäuren möglicherweise auch von der Trennung der

D. Diskussion

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Quenchingfarbstoff beeinflusst werden.

Da Assoziation und Dissoziation der beiden Hybride (DNS:DNS und DNS:RNS) innerhalb der Quick-FISH-Reaktion aufgrund der komplexen Wechselwirkungen zueinander nicht als singuläre Ereignisse betrachtet werden können, war demzufolge eine experimentelle Verifizierung des Einflusses der Farbstoff-Modifikationen auf die thermische Stabilität der Hybride nicht näher spezifizierbar. Erste Studien von Moreira (Moreira *et al.*, 2005) und Zhang (Zhang *et al.*, 2007) stützten allerdings die Vermutung, dass die thermische Stabilität von DNS:DNS-Hybriden entschieden durch die Modifikation beeinflusst werden kann. Eine 5'-Modifikation mit dem Farbstoff TAMRA führte bei DNS:DNS-Hybriden z. B. zu einer Erhöhung des T_M -Werts um $+0,6^\circ\text{C}$. Hingegen führte eine 3'-Modifikation mit dem Quenchingfarbstoff BHQ2 zu einer Erhöhung des T_M -Wertes des Hybrides um $2,3^\circ\text{C}$. Für Molecular Beacons, bei denen das Fluoreszenzsignal des Fluoreszenzfarbstoffes ähnlich wie bei der Quick-FISH-Reaktion auch mittels Kontaktquenching ausgelöscht wird (siehe auch A.3), konnte eine Erhöhung des T_M -Werts entsprechend der Addition aus den einzelnen Temperaturen der beiden Modifikationen beobachtet werden (Moreira *et al.*, 2005).

Im Fall von Quick-FISH ist eine starke Stabilisierung insbesondere für das zweite Hybrid aus DNS-Sonde und rRNS erwünscht. Das DNS:DNS-Hybrid aus Sonde und Quenchersonde soll für den weiteren Reaktionsverlauf in einem möglichst reaktiven Zustand verbleiben und nur so stark stabilisiert sein, dass eine spontane ungerichtete Dissoziation unterbunden wird und das Fluoreszenzquenching aufrecht gehalten wird (siehe auch Abb. D.1).

Der Faktor Spezifität ist folglich für die erste Hybridisierung (DNS:DNS) der beiden Oligonukleotide (Sonde und Quenchersonde) von sekundärer Bedeutung. Die Dynamik der Quenchingreaktion konnte über eine fluorometrische Messung der Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität (RFU) beobachtet werden. Die experimentellen Daten zeigten (z. B. Abbildungen C.9 und C.11), dass die DNS:DNS-Hybridisierung von Sonde und Quenchersonde innerhalb einer Minute abläuft. Die Effizienz dieser Hybridisierung lag bei konstanter Sondenkonzentration (5 ng/ μl) und variabler Quenchersondenkonzentration (5 ng/ μl bis 15 ng/ μl) je nach Sonden/ Quenchersonden Kombination und Reaktionspuffer in einem Bereich von 96,5 % bis 99,2 % (Tabelle C.12, Seite 83).

D. Diskussion

Für die zweite Hybridisierung (DNS:RNS) innerhalb der Quick-FISH-Reaktion ist der Faktor Spezifität jedoch entscheidend. Anschließend an die Dissoziation der DNS:DNS-Hybride aus Sonden und Quenchersonden soll eine möglichst spezifische Hybridisierung der Sonden an die Zielstellen auf der rRNS erzielt werden.

D.2.2.1 Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Ionenstärke auf den Verlauf der Reaktionskinetik

Um die Dynamik der Wechselwirkungen zwischen DNS:DNS-Hybriden und DNS:RNS-Hybriden zu verstehen, wurde trotz direkter Abhängigkeit von Reaktionskinetik und Spezifität versucht die Faktoren zu ermitteln, die die jeweilige Hybridisierung beeinflussen können.

Aus Abbildung D.2 geht hervor, dass bei fixierter Ionenstärke (50 mM NaCl) die Hybridisierungstemperatur die Geschwindigkeit und Effizienz der Dissoziation des DNS:DNS-Hybrides und der anschließenden DNS:RNS-Hybridisierung innerhalb der Quick-FISH-Reaktion entscheidend bestimmt.

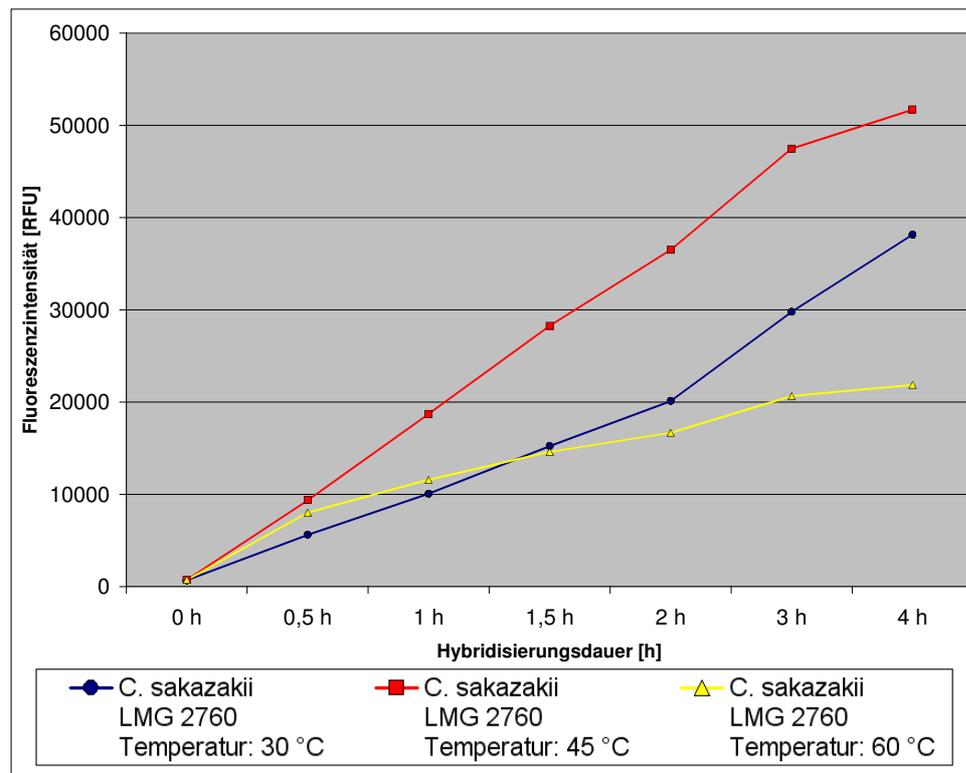


Abb D.2: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Effektivität der DNS:RNS-Hybridisierung bei konstanter Ionenstärke (50 mM NaCl)

Quick-FISH-Hybridisierung von *C. sakazakii* (LMG 2760) mit dem Sonden/ Quenchersonden Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 bei 30°C, 45°C, 60°C in modifiziertem PCR-Puffer (50 mM NaCl).

D. Diskussion

Nach 4 h Hybridisierung wurden die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten bei einer Temperatur von 45°C beobachtet und die geringste Zuwachsrate an Fluoreszenzsignalen erfolgte bei 60°C. Die Fluoreszenzsignale des Zielorganismus *C. sakazakii* nahmen dabei in Abhängigkeit von Hybridisierungstemperatur und -dauer unterschiedlich schnell zu.

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Temperatur (30°C bis 60°C) in Kombination mit einem variablen Salzgehalt des Reaktionspuffers auf den Zielorganismus *C. sakazakii* untersucht (C.3.4.1). Die Ionenstärke des Puffers wurde bei einer konstanten Tris-HCl Konzentration von 10 mM über eine variable NaCl Konzentration von 0 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 600 mM und 800 mM variiert. Die Auswertung dieser Experimente zeigte (Abbildungen C.19, Seite 99 und C.20, Seite 100), dass neben der Hybridisierungstemperatur auch die Ionenstärke des Puffers einen erheblichen Einfluss auf die Kinetik der Quick-FISH-Reaktion hat.

Abbildung D.3 fasst dieses aus den unter C.3.4.1 erhaltenen Ergebnissen zusammen.

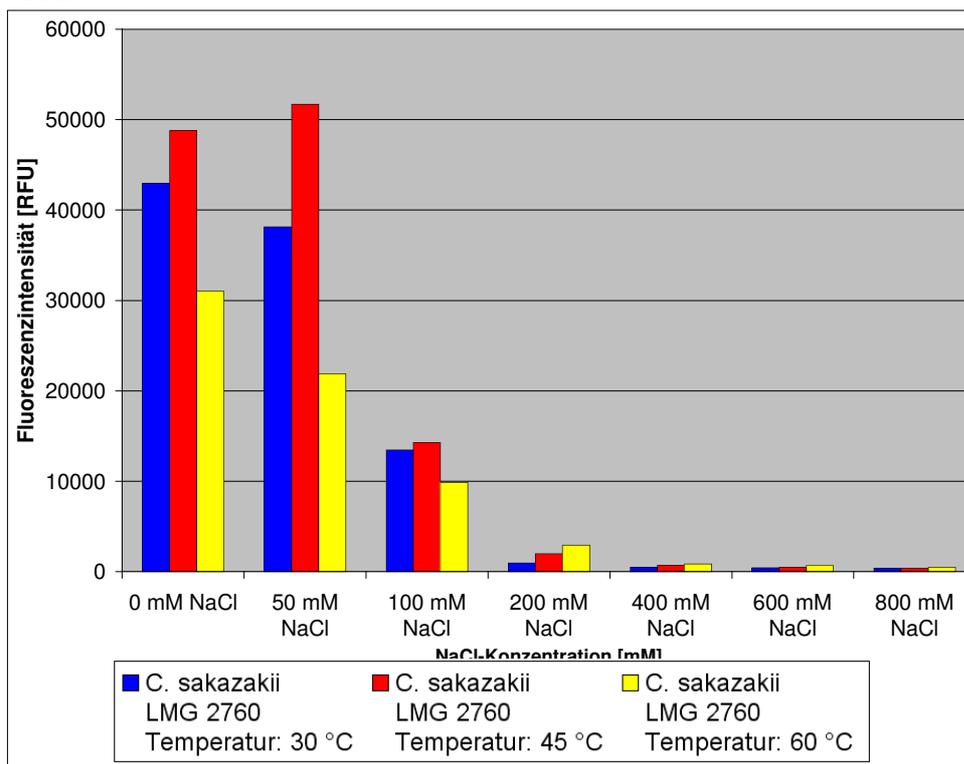


Abbildung D.3: Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Salzgehalt auf die Quick-FISH-Reaktion von *C. sakazakii*

Quick-FISH-Hybridisierung von *C. sakazakii* (LMG 2760) mit dem Sonden/ Quenchersonden Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 bei 30°C, 45°C, 60°C in modifiziertem PCR-Puffer mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration.

Fokussiert sich die Betrachtung auf den Temperaturbereich und die Salzkonzentrationen in denen überhaupt eine Dissoziation des DNS:DNS-Hybrides

D. Diskussion

und eine DNS:RNS-Hybridisierung an den Zielorganismus erfolgreich möglich war, dann wird apparent, dass eine deutlich messbare Dissoziation des Hybrides (> 20000 RFU) bei Temperaturen zwischen 30°C und 60°C sowie bei NaCl-Konzentrationen zwischen 0 mM und 50 mM erfolgte (Abb. D.3). Ab einem Salzgehalt von > 100 mM NaCl wurde das DNS:DNS-Hybrid so stark stabilisiert, dass die DNS:RNS-Hybridisierung nur noch geringfügig (NaCl-Konzentration: 100 mM) bis nicht mehr deutlich messbar (NaCl-Konzentrationen: 200 mM bis 800 mM) verlief.

Basierend auf den Erfahrungen mit der Standard-FISH-Technik war ein derartig starker Einfluss der Ionenstärke auf die Quick-FISH-Reaktion nicht erwartet worden. Es ist zwar bekannt, dass monovalente Kationen (z. B. Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺) mit zunehmender Konzentration einen stabilisierenden Effekt auf Nukleinsäurehybride ausüben (Schildkraut und Lifson, 1965, Owczarzy *et al.* 2004, 2008 a und b). Im Vergleich zur Standard-FISH-Technik (Hybridisierungspuffer 800 mM NaCl, Waschpuffer: variabel, B.8.3) war der Effekt der Erhöhung der Ionenstärke für die Quick-FISH-Hybridisierung sehr viel signifikanter und hatte einen gravierenden Einfluss auf die Reaktionskinetik. Demzufolge kann die Quick-FISH-Reaktion verglichen mit der Standard-FISH-Analyse generell nur bei einer sehr viel geringeren Stringenz ablaufen.

D.2.2.2 Einfluss von Hybridisierungstemperatur und Ionenstärke auf die Spezifität

Die bisher aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass gemessen an der Dissoziationseffizienz der DNS:DNS-Hybride die Regulierung der Spezifität der DNS:RNS-Hybridisierung über die Parameter Temperatur und Salzgehalt ausschließlich bei Temperaturen von < 60°C und einem Salzgehalt von ≤ 50 mM NaCl erfolgen konnten.

Zur Untersuchung der Spezifität der DNS:RNS-Hybridisierung wurden *Ci. freundii* (4 Basenunterschiede (MM) zur Sondenbindungsstelle), *En. cloacae* (4 MM zur Sondenbindungsstelle), *Er. chrysanthemii* (1 MM zur Sondenbindungsstelle) und *Ed. tarda* (2 MM zur Sondenbindungsstelle) bei den Hybridisierungstemperaturen 30°C und 45°C sowie einem Salzgehalt von 0 mM und 50 mM NaCl herangezogen (Abb. C.19, Seite 99). Dabei zeigte sich, dass *C. sakazakii* (~ 40000 RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 30°C und einem Salzgehalt von 50 mM NaCl über die gesamte Hybridisierungsdauer von 4 h spezifisch von diesen Nichtzielorganismen

D. Diskussion

(alle < 5000 RFU) diskriminiert werden konnte (siehe auch Abb. C.20, Bild A, Seite 100). Ohne Zusatz von Na⁺-Ionen (0 mM NaCl) konnte der Unterschied von einer Base zur Sondenbindungsstelle für *Er. chrysanthemii* nicht mehr diskriminiert werden. Nach 4 h Hybridisierung erreichte dieser Nichtzielorganismus eine höhere Signalintensität (~ 45000 RFU) als *C. sakazakii*. Für mehr als zwei Basenunterschiede zur Sondensequenz (*Ci. freundii*, *En. cloacae* und *Ed. tarda*) war jedoch unter diesen Bedingungen weiterhin eine spezifische Diskriminierung möglich (Abb. C.19, Seite 99).

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C war vermutlich wegen der vergleichsweise höheren Reaktionsgeschwindigkeit als bei 30°C (siehe auch Abb. D.2) auch ein höheres Maß an unspezifischen DNS:RNS-Hybridisierungen für die Nichtzielorganismen zu erkennen (siehe Abb. C.19, Seite 99). Dieses betraf vor allem *En. cloacae* und *Er. chrysanthemii*. Die gemessenen Signalintensitäten verliefen dabei analog zum steigenden Signal des Zielorganismus über die Zeit auch für diese beiden Nichtzielorganismen über eine zunehmende Hybridisierungsdauer progressiv (siehe z. B. für 50 mM NaCl, Abb. C.20, Bild B, Seite 100). Das Signal der Nichtzielorganismen nahm dabei bis zum Messpunkt 2 h mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung zum Signal des Zielorganismus zu. Diese anfängliche Verzögerung wurde vermutlich durch die Sequenzunterschiede in der Sondenbindungsstelle verursacht. Ab einer Hybridisierungsdauer von > 2 h minimierte sich dieser Effekt und das Signal der Nichtzielorganismen stieg sprunghaft an (siehe Abb. C.20, Bild B, Seite 100). So wurden für *Er. chrysanthemii* und *En. cloacae* nach 2 h 9884 RFU und 21297 RFU (*C. sakazakii* nach 2 h: 36501 RFU) und nach 4 h 49096 RFU und 49938 RFU gemessen (*C. sakazakii* nach 4 h: 51705 RFU). Ohne Zusatz von Na⁺-Ionen (0 mM NaCl) war entsprechend zur Hybridisierungstemperatur von 30°C eine Diskriminierung von *Er. chrysanthemii* nicht möglich (Abb. C.19, Bild B, Seite 99). Die nach 4 h Hybridisierung für *Ci. freundii*, *En. cloacae* und *Ed. tarda* gemessenen Fluoreszenzintensitäten ließen weiterhin eine signifikante Diskriminierung im Vergleich zum Zielorganismus zu. Für diese wurden Signalintensitäten von ≤ 11000 RFU bestimmt. Der Vergleichswert für *C. sakazakii* lag bei ca. 49000 RFU.

Um einen Abgleich dieser ersten Ergebnisse zur Spezifität der DNS:RNS-Hybridisierung mit den Ergebnissen aus einem erweiterten Spezifitätstest bei einer Salzkonzentration von 50 mM (C.3.4.4, Seite 103) zu ermöglichen, wurde eine

D. Diskussion

mögliche Übertragbarkeit von Messwerten aus verschiedenen Versuchen evaluiert. Aus den Ergebnissen in Tabelle C.17 (Seite 120) wird sichtbar, dass in Abhängigkeit von der verwendeten Produktionscharge der Sonde Esak997-3-TAMRA sowohl für *C. sakazakii* als auch für die Nichtzielorganismen unterschiedlich hohe Signalintensitäten erhalten werden.

Nachdem für beide Versuche zur Spezifität von Quick-FISH unterschiedliche Produktionschargen der Sonde Esak997-3 verwendet wurden, musste für einen versuchsunabhängigen Datenabgleich eine Relativierung der unter C.3.4.4 erhaltenen Messdaten vorgenommen werden (Tabelle C.14, Seite 104). Hierzu wurde die Signalintensität, die pro Versuch für *C. sakazakii* bestimmt wurde, als 100 % angesehen. Die jeweils pro Nichtzielorganismus erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden dafür als prozentuale Anteile auf die normierte Signalintensität (100 %) von *C. sakazakii* bezogen (Tabelle D.1).

Tabelle D.1: Prozentuales Verhältnis der Signalintensitäten der Nichtzielorganismen zum Signal des Zielorganismus

Organismus	MM	Inkubationstemperatur 30 °C		Inkubationstemperatur 45 °C	
		Anteil [%] am Signal des ZO 2 h Inkubation	Anteil [%] am Signal des ZO 4 h Inkubation	Anteil [%] am Signal des ZO 2 h Inkubation	Anteil [%] am Signal des ZO 4 h Inkubation
<i>C. sakazakii</i> LMG 2760 = ZO	0	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
<i>Er. chrysanthemii</i> DSM 4610	1	10,8 %	9,5 %	18,1 %	95,0 %
<i>Ed. tarda</i> DSM 30052	2	7,9 %	6,9 %	13,2 %	19,6 %
<i>Ci. freundii</i> DSM 30039	4	3,8 %	2,4 %	7,3 %	14,3 %
<i>En. cloacae</i> DSM 30054	4	5,4 %	4,4 %	41,2 %	96,6 %
<i>E. coli</i> DSM 30039	4	10,6 %	7,9 %	6,5 %	19,3 %
<i>Ed. ictaluri</i> DSM 13697	2	11,2 %	9,4 %	14,1 %	33,5 %
<i>En. aerogenes</i> DSM 30053	4	4,7 %	2,6 %	1,6 %	1,7 %
<i>En. amnigenus</i> DSM 4486	4	4,8 %	2,7 %	1,6 %	1,7 %
<i>En. gergoviae</i> DSM 9245	4	5,8 %	3,8 %	1,6 %	1,6 %
<i>En. helveticus</i> UZH 513/05	4	15,6 %	12,8 %	7,4 %	13,2 %
<i>En. intermedius</i> DSM 4581	4	5,9 %	3,7 %	2,2 %	2,6 %
<i>En. kobei</i> DSM 13645	6	5,4 %	3,1 %	1,7 %	2,1 %
<i>En. pulveris</i> UZH 601/105	4	39,1 %	33,2 %	18,5 %	87,8 %
<i>En. pyrinus</i> DSM 12410	4	6,0 %	4,0 %	1,5 %	1,5 %
<i>En. turicensis</i> UZH 3032	4	19,2 %	13,7 %	11,1 %	27,1 %
<i>Erwinia carotovora</i> DSM 30168	3	4,6 %	2,7 %	1,7 %	2,1 %
<i>Erwinia cypripedii</i> DSM 3873	4	4,0 %	2,0 %	1,1 %	1,1 %
<i>Erwinia rubrifaciens</i> DSM 4487	3	5,2 %	2,9 %	2,2 %	5,2 %
<i>Hafnia alvei</i> DSM 30163	3	5,5 %	3,7 %	2,8 %	3,7 %
<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM 5175	3	5,4 %	3,1 %	1,9 %	3,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104	5	12,1 %	12,7 %	2,0 %	2,1 %
<i>Kluyvera ascorbata</i> DSM 4611	4	5,3 %	3,1 %	1,8 %	2,2 %
<i>Kluyvera cryocrescens</i> DSM 12410	4	12,2 %	10,5 %	2,7 %	4,4 %
<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493	3	10,5 %	8,1 %	5,2 %	9,3 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	6	4,3 %	2,2 %	1,4 %	1,5 %
<i>Serratia liquefaciens</i> DSM 4487	5	22,5 %	11,7 %	2,2 %	2,2 %
<i>Vibrio vulnificus</i> DSM 11507	4	4,6 %	2,7 %	1,4 %	1,5 %

Legende: MM = Mismatch (Basenunterschied) zur Sondenbindungsstelle, ZO = Zielorganismus, **schwarz fett:** Unterschied zum Signal des Zielorganismus (ZO) <70 %, **rot fett:** Unterschied zum Signal des Zielorganismus (ZO) < 15 %

D. Diskussion

Aus Tabelle D.1 geht hervor, dass auch im erweiterten Spezifitätstest bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer Salzkonzentration von 50 mM weiterhin eine eindeutige Diskriminierung des Signals von *C. sakazakii* von den Signalen der untersuchten Nichtzielorganismen erfolgte. Im direkten Vergleich der Hybridisierungsdauer 2 h und 4 h wies bis auf *Klebsiella pneumoniae* jeder andere Nichtzielorganismus am Messpunkt 4 h eine höhere Differenz in der Signalintensität zum Zielorganismus auf als am Messpunkt 2 h.

Dieser Trend kann durch die verhältnismäßig größeren Zunahme der Signalstärke des Zielorganismus über die Hybridisierungsdauer im Vergleich zu der deutlich langsameren Signalerhöhung der Nichtzielorganismen erklärt werden. Lediglich *En. pulveris* wies bei dieser Temperatur ein verhältnismäßig hohes Signal auf, welches aber dennoch um 67 % niedriger war als das von *C. sakazakii*.

Im Gegensatz dazu geht aus dieser Tabelle ebenfalls hervor, dass die Diskriminierung von Nichtzielorganismen bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C über die Zeit deutlich schlechter möglich ist. Diese Tendenz wird vermutlich durch die generell höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei 45 °C verursacht (siehe auch Abb. D.2).

Nach 2 h Hybridisierungsdauer bei 45 °C wies nur *En. cloacae* in Relation zum Zielorganismus *C. sakazakii*, mit einem prozentualen Anteil von 41,2 % ein erhöhtes Signal auf. Nach 4 h Hybridisierung wiesen neben *En. cloacae* (96,6 %) auch *Er. chrysanthemii* (95 %) und *En. pulveris* (87,8 %) Signalstärken auf, die keine eindeutige Diskriminierung vom Zielorganismus *C. sakazakii* zuließen. Bezogen auf die angenommenen Sequenzunterschiede von 4 MM zur Sondenbindungsstelle ist dieser Effekt allerdings für *En. cloacae* und *En. pulveris* nicht vollständig plausibel. Vor allem da für andere Nichtzielorganismen mit > 2 MM zur Bindungsstelle der Sonde kein vergleichbar hoher Anstieg der Signalstärke über die Zeit beobachtet wurde. Folglich muss dieser Effekt über die Position der Basenunterschiede innerhalb Sondenbindungsstelle (siehe Sondenmatch, Anhang G.8, Seite 172) und in Kombination mit der höheren Reaktionskinetik bei 45 °C verursacht werden.

Diese Beobachtungen werden auch durch die Erkenntnisse zur Spezifität von DNS-Microarray-Hybridisierungen gestützt. Bei diesen, ebenfalls in flüssiger Phase ablaufenden DNS-Microarray-Hybridisierungen, wurden neben sequenzabhängigen Effekten auch Einflüsse der Reaktionskinetik wie z. B. Menge der verfügbaren Ziel- und Nichtzielmoleküle, Dauer der Hybridisierung, freie Energie, elektrostatische

D. Diskussion

Effekte sowie Energiezufuhr (Hybridisierungstemperatur) auf die Spezifität der Hybridisierung beobachtet (z. B. Binder und Preibisch, 2005, Deng *et al.*, 2008, Gong und Levicky, 2008, Koltai und Weingarten-Baror, 2008).

Um folglich die DNS:RNS-Hybridisierung der Quick-FISH-Reaktion bei einer Salzkonzentration von 50 mM NaCl unter spezifischen Voraussetzungen ablaufen zu lassen, sollte diese, für den Nachweis von *Cronobacter* spp. bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C über eine Hybridisierungsdauer von mindestens 4 h erfolgen. Unter diesen Voraussetzungen war auch eine Diskriminierung von *Cronobacter sakazakii* in einer Mischung mit Nichtzielorganismen erfolgreich möglich (Abb. C.23, Seite 105).

D.2.2.3 Zusätzliche Möglichkeiten zur Erhöhung der Spezifität

Der Einsatz von denaturierenden Agenzien wie Formamid, TEMAC oder DMSO (C.3.3.7) führte für die Quick-FISH-Reaktion zu keiner weiteren Optimierung der Reaktionskinetik oder Spezifität. Die Agenzien Formamid und DMSO hatten in den eingesetzten Konzentrationen kaum einen Effekt auf die Diskriminierungseffizienz und der Einsatz von TEMAC führte sogar zu einer Herabsetzung der Spezifität (siehe Abb. C.18, Seite 97).

Hingegen konnte analog zur Standard-FISH-Technik eine Optimierung der Spezifität der Quick-FISH-Reaktion durch den Einsatz von unmarkierten Kompetitoren erzielt werden (C.3.4.2). Eine effektive Diskriminierung des einen Basenunterschiedes der rRNS-Sequenz von *Er. chrysanthemii* zur Bindungsstelle der Sonde Esak997-3 wurde bei 45 °C und einer NaCl Konzentration von 50 mM erzielt, wenn der Kompetitor 30 min früher als die Sonden/ Quenchersonden-Hybride zugegeben wurde (Abb. C.21, Bild B, Seite 101). Hierdurch wurde das falsch positive Signal von *Er. chrysanthemii* in der Fluoreszenzintensität bis zu einer Hybridisierungsdauer von 3 h um mehr als 85 % und nach 4 h immer noch um 60 % im Vergleich zur Hybridisierung ohne Kompetitor unterdrückt. Bei gleichzeitiger Zugabe von Kompetitor, Sonde und Quencher war zwar bereits eine signifikante Unterdrückung des Signals von *Er. chrysanthemii* zu erkennen (nach 3 h um ~60 %; nach 4 h um 50 %, siehe auch Abb. C.21, Bild A, Seite 101). Aber die Absättigung der Bindungsstelle durch den Kompetitor war in diesem Fall bei weitem nicht so effektiv, wie bei vorzeitiger Zugabe des Kompetitors. Dieses kann dadurch erklärt werden, dass bei vorzeitiger Zugabe des Kompetitors keine direkte Konkurrenz um die potenzielle

D. Diskussion

Bindungsstelle vorhanden ist. Eine Blockierung der meisten Zielstellen ist somit bereits erfolgt, bevor Sonde und Quenchersonde in dieses System appliziert werden. Werden Kompetitor, Sonde und Quenchersonde jedoch gleichzeitig zugegeben, dann stehen Kompetitor und Sonde in direkter Konkurrenz um die Bindungsstelle auf der rRNS. Durch den Sequenzunterschied wird zwar präferentiell die Bindung des Kompetitors an die rRNS forciert. Die Messerergebnisse zeigen jedoch, dass trotzdem eine Bindung der Sonde erfolgen konnte (Abb. C.21, Bild A, Seite 101). Des Weiteren kann in dieser Konkurrenzsituation ein möglicher Einfluss der Quenchersonde auf den Kompetitor durch unspezifische Bindung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In beiden Fällen wurde jedoch eine Abnahme in der Effizienz des Kompetitors zur Unterdrückung des unerwünschten SONDENSIGNALS über die Zeit festgestellt (Abb. C.21, Seite 101). Vermutlich kann der reversible Effekt dadurch erklärt werden, dass das DNS:RNS-Hybrid des Kompetitors aufgrund des fehlenden Farbstoffes nicht so stabil wie das DNS:RNS-Hybrid der Sonde ist. Über die Zeit ist deshalb eine Verdrängung des Kompetitors durch die Sonde möglich.

D.2.3 Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Quick-FISH-Reaktion

Im Gegensatz zur visuellen Überprüfung am Mikroskop besteht bei Auswertung mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer keine Möglichkeit, unspezifische Bindungen an Nichtzielorganismen oder Artefakte von einer spezifischen Detektion zu unterscheiden. Die Auswertung erfolgt somit nicht mehr auf Einzelzellebene, sondern die Fluoreszenzintensität der gesamten Lösung muss hierbei als qualitatives Kriterium für einen positiven oder negativen Nachweisbefund herangezogen werden. Um dieses zu ermöglichen, müssen die Faktoren bekannt sein, die neben Reaktionskinetik und Spezifität einen Einfluss auf die Nachweisgenauigkeit der Quick-FISH-Reaktion haben können. Dieses ist die Voraussetzung, um für eine routinetaugliche Anwendung einen Schwellenwert oder ein Detektionslimit zu bestimmen, das von einem positiven Signal überschritten werden muss, um sich von Nichtzielorganismen oder Autofluoreszenzen abzuheben. Basierend auf den experimentellen Daten aus C.3 kann zusammengefasst werden, dass generell die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Quick-FISH-Reaktion durch die Faktoren Aufbereitung der Zellen (C.3.3.5), Zellzahl pro Reaktion (C.3.5.1), Wachstumszustand der Zellen (C.3.5.2), Hybridisierungsdauer (C.3.5.3) sowie

D. Diskussion

Produktionscharge der Sonde (C.3.6) beeinflusst. Des Weiteren stellt das Detektionslimit des Mikrotiterplatten-Fluorometers (C.3.3.3) für alle aufgeführten Faktoren eine direkte Abhängigkeit dar.

Es zeigte sich, dass die Aufbereitungsform der Zellen in der Mikrotiterplatte einen Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz und damit auf die maximal erreichbare Signalstärke der Quick-FISH-Reaktion hatten. Für eine effektiv ablaufende DNS:RNS-Hybridisierung, die in möglichst hohen Fluoreszenzintensitäten für den Zielorganismus resultiert, werden die fixierten Zellen optimalerweise ohne vorherige thermische Dehydratisierung direkt in den Hybridisierungspuffer eingebracht (Abb. C.16, Seite 94). Vermutlich erfolgt die Diffusion der Sonden zu den Zellen und/oder die Penetration der Sonden in die Zellen während der Hybridisierung in Lösung nur eingeschränkt, wenn die Zellen analog dem Vorgehen der Standard-FISH-Technologie zuvor in der Mikrotiterplatte eingetrocknet werden. Die vergleichsweise höchsten Signalintensitäten wurden erzielt, wenn die fixierten Zellen in der Mikrotiterplatte über Zentrifugation von überschüssigem Ethanol befreit wurden, bevor der Hybridisierungspuffer mit Sonde und Quenchersonde zugesetzt wurde. Akzeptable Fluoreszenzintensitäten wurden aber auch erreicht, wenn die fixierten Zellen direkt in den Hybridisierungspuffer appliziert wurden. Diese Vorgehensweise wurde für ein Volumen von bis zu 20 μl EtOH-fixierte *C. sakazakii*-Zellen verifiziert und wegen der einfacheren Durchführbarkeit als Standardbedingung für alle Versuche in dieser Arbeit angewendet.

Für die Bestimmung der absoluten Nachweisgrenze des Quick-FISH-Protokolles mittels Detektion am Mikrotiterplatten-Fluorometer wurden vorab die mittels EUB338 quantifizierbaren Zellzahlen von EtOH-fixierten *C. sakazakii*-Zellen bestimmt (C.3.5.1). Über den Einsatz unterschiedlicher Verdünnungsstufen dieser geeichten Fixierungen konnten je nach verwendeter Fixierung eine Nachweisgrenze von 1×10^9 bis 1×10^{10} Zellen pro Reaktionsansatz bestimmt werden (Abb. C.24, Seite 106). Die am Mikrotiterplatten-Fluorometer detektierten Fluoreszenzintensitäten lagen für diese Zellzahlen zwischen 45000 RFU und 50000 RFU. Diese Nachweisgrenze erscheint auf den ersten Blick im Vergleich zur Standard-FISH-Technik mit visueller mikroskopische Auswertung relativ hoch. Betrachtet man unter diesem Aspekt allerdings auch die Mindestsondenmenge von 5 ng/ μl , die ohne jede Hybridisierung für eine deutlich messbare fluorometrische Detektion am Mikrotiterplatten-Fluorometer eingesetzt werden muss (Abb. C.10, Seite 86), dann zeigt sich, dass

D. Diskussion

diese verhältnismäßig schlechte Sensitivität von Quick-FISH vor allem primär durch das Auswertegerät Mikrotiterplatten-Fluorometer verursacht wird. Als elektronische Verstärkung wurde für alle Messbedingungen der Gain 80 am Gerät festgelegt. Diese war notwendig, da zur Erschließung des Quick-FISH-Reaktionmechanismus und zum Verständnis der Parameter, die für Reaktionskinetik, Spezifität, sowie Detektionsgenauigkeit verantwortlich sind, alle Versuche möglichst unverzerrt unter den gleichen Messbedingungen durchgeführt werden sollten. Es kann deshalb sicherlich davon ausgegangen werden, dass noch nicht alle elektronischen Verstärkungsmöglichkeiten wie z. B. ein „Autogain“, der automatisch die optimale Verstärkung des Signals über die PMTS steuert oder Mehrfachmessungen pro well („well-scanning“), zur Optimierung der Sensitivität des Mikrotiterplatten-Fluorometers evaluiert wurden.

Als Alternative zur Geräteoptimierung besteht zudem auch die Möglichkeit, eine ausreichend hohe Anzahl an Bakterien durch die Vorkultivierung zur Überschreitung des Detektionslimits des Mikrotiterplatten-Fluorometers verfügbar zu machen.

Über die durchgeführten Kultivierungsversuche zeigte sich, dass auch die erreichte Signalstärke für die Quick-FISH-Reaktion analog zur Standard-FISH-Technik in direktem Zusammenhang mit dem Wachstumszustand und somit dem Gehalt an potenziellen Zielstellen auf den Ribosomen steht. Aus einem Wachstumsversuch (C.3.5.2) mit zwei verschiedenen *C. sakazakii*-Stämmen ging hervor, dass bei einer Inkubationstemperatur von 45°C nach 4 h Hybridisierung die höchste Signalintensität von ca. 60000 RFU bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von ca. < 1 erreicht wurde. Höhere Signalintensitäten wurden auch bei einer längeren Kultivierungsdauer der Zellen nicht mehr erreicht. Die Intensität der erhaltenen Signale blieb konstant bei diesem Maximalwert (Abb. C.26, Seite 108). Für eine Hybridisierungstemperatur von 30°C zeigte sich in diesem Versuch ein neuer Aspekt, der auch eindeutig die Sensitivität der Quick-FISH-Reaktion bei dieser Temperatur beeinflusst. Bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von ca. < 1 wurden für die beiden Fixierungen nach 4 h Hybridisierung bei 30°C Fluoreszenzintensitäten von < 5000 RFU und 15000 RFU gemessen. Wurden allerdings die Messwerte der gleichen Stämme bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von ca. < 2 betrachtet, dann war auffällig, dass die Messwerte hier zwischen ~ 60000 RFU und ~ 75000 RFU lagen (Abb. C.26, Seite 108). Demzufolge wurde, wenn auch erst nach einer deutlich längeren Inkubationszeit, bei 30°C eine höhere Gesamtfluoreszenzintensität erreicht als bei 45°C. Dieses Ergebnis verdeutlichte,

D. Diskussion

dass bei 30°C eine Hybridisierungsdauer von 4 h nicht unbedingt ausreichend lang genug ist, um die maximale Fluoreszenzintensität für eine Fixierung in Abhängigkeit von der Zellmenge und des Ribosomengehaltes zu erreichen. Diese Vermutung wurde über eine Verlängerung der Hybridisierungsdauer auf maximal 24 h an verschiedenen *Cronobacter*-Stämme bestätigt (Abb. C.28, Seite 111). Je nach Fixierung war in diesem Versuch eine Hybridisierungsdauer von bis zu 12 h notwendig, um bei einer Hybridisierungstemperatur von 30°C jeweils die maximale Fluoreszenzintensität zu erreichen.

Die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität hängt neben der Menge und dem Zustand der Zellen, auch von der verwendeten Produktionscharge der Sonde ab (C.3.6). Diese sollte im Vorfeld der Versuche fluorometrisch bestimmt werden, um in etwa abzuschätzen, welche Fluoreszenzintensitäten erwartet werden können.

In der Regel war aber in allen durchgeführten Versuchen eine Hybridisierungsdauer von 4 h bei 30°C ausreichend lang, um eine eindeutige Detektion von *C. sakazakii* zu gewährleisten. Dieses wurde auch über einen ersten praxisnahen Versuch mit künstlich kontaminierten Milchpulverproben bestätigt (C.3.7). Über eine zweistufige Anreicherung in mLST-Boullion/ EE-Broth oder in H₂O_{dest.}/ EE-Broth wurde *C. sakazakii* bei 45°C nach einer Hybridisierungsdauer von 1 h eindeutig nachgewiesen. Für die Hybridisierungstemperatur von 30°C war dieser Nachweis nach 2 h Hybridisierung erfolgreich möglich (Abb. C.35, Seite 123).

D.2.4 Ausblick Quick-FISH

Die in dieser Arbeit erhaltenen ersten praxisnahen Ergebnisse zum Nachweis von *Cronobacter* spp. in Milchpulverproben mittels Quick-FISH und Mikrotiterplatten-Fluorometer Detektion sind sehr erfolgversprechend. Ein Routineeinsatz von Quick-FISH ist nach einer weiteren umfangreichen Validierung, Festlegung der Reaktionsbedingungen (30°C oder 45°C) sowie Definition eines Schwellenwertes vorstellbar.

Die Auswertung mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer birgt die Vorteile der Automatisierung und Objektivität bei einer sehr hohen Auswertegeschwindigkeit (ca. 1 min/ pro 96 well Mikrotiterplatte) und bietet damit eine gute Alternative zur mikroskopischen Auswertung. Für Lebensmittelproduzenten, die täglich in Abhängigkeit vom Produktionsvolumen bis zu 150 Proben mikrobiologisch zu analysieren haben, könnte das Mikrotiterplatten-Fluorometer im Zuge einer

D. Diskussion

Automatisierung als Auswertungseinheit effektiv eingesetzt werden. Die erhaltenen Daten zeigen aber auch, dass die Sensitivität der automatischen Auswertung mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer grundsätzlich noch verbesserungsbedürftig ist. Weitere Optimierungen sollen zukünftig in Zusammenarbeit mit den Geräteherstellern evaluiert werden. Es wäre aber auch durchaus vorstellbar, ein Durchflusszytometer als alternatives Auswertegerät einzusetzen und auf diesem Weg über Einzelzelldetektion die Sensitivität der automatischen Auswertung für Quick-FISH zu steigern.

Hinsichtlich einer Übertragbarkeit von Reaktionsbedingungen (Reaktionskinetik und Spezifität) auf weitere Applikationen der Quick-FISH-Technologie sei angefügt, dass für jedes neue System die genauen Parameter festgelegt werden müssen. Am Beispiel der Sonde Esak997 wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass generell davon ausgegangen werden kann, dass Oligonukleotidsonden, die für die Standard-FISH-Technik entwickelt wurden, auch für Quick-FISH einsetzbar sind. Eine mögliche Anpassung und Optimierung der Sonden ist hinsichtlich der Oligonukleotidlänge, der Reaktionstemperatur und des Salzgehaltes im Reaktionspuffer für die jeweilige Quick-FISH Applikation zu evaluieren. Des Weiteren ist, basierend auf der Annahme zur essentiellen Funktion einer intakten Zellhülle für den Quick-FISH-Reaktionsmechanismus, voraussichtlich eine spezielle Optimierung der Zugänglichkeit für Gram-positive Bakterien von Nöten.

E. Zusammenfassung

Für die Qualitätssicherung in der modernen Lebensmittelindustrie sind möglichst schnelle und zuverlässige Methoden für eine zügige mikrobiologische Freigabe von Produkten unerlässlich. Durch die eingesetzten Nachweisverfahren soll die mikrobielle Stabilität der Endprodukte sichergestellt und eine Kontamination mit pathogenen Bakterien ausgeschlossen werden. Darüber hinaus benötigen insbesondere Qualitätssicherungslabore, die mit einem hohen Probenaufkommen (> 100 Proben pro Tag) konfrontiert sind, neue Strategien und Methoden für die möglichst einfache, objektive, schnelle und parallele Analyse ihrer Proben.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Nachweissysteme auf Basis der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) entwickelt, die für eine Anwendung in der Qualitätssicherung der Lebensmittelindustrie geeignet sind. Im Vergleich zu den etablierten konventionellen Nachweisverfahren zeichnen sich die entwickelten Assays durch eine signifikant reduzierte Nachweiszeit aus und erzielen dabei mindestens eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität.

Für die Analyse von flüssigen Proben wurden routinetaugliche Protokolle für den Nachweis von Mikrokolonien am Beispiel von Legionellen und ein Direktnachweis von Einzelzellen für bierschädliche Bakterien auf Filtermembranen entwickelt und ausführlich validiert. Über verschiedene Auswertungsoptionen (manuell, semi-automatisch oder vollautomatisch) können diese Protokolle auf die jeweiligen Bedürfnisse eines Labors in der Lebensmittelindustrie angepasst werden.

Des Weiteren wurde am Beispiel von *Cronobacter* spp. ein völlig neuer Reaktionsmechanismus (Quick-FISH) zur Hybridisierung in Lösung entwickelt. Mit Hilfe von Quick-FISH, konnte eine hohe Probenanzahl parallel (high-throughput) im Mikrotiterplattenformat analysiert werden. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Lösung wurde dazu mit einem statischen Fluoreszenzquenching-Verfahren kombiniert. Quick-FISH bietet überdies den Vorteil, dass Wasch- und Spülschritte, die bei der Standard-FISH-Technik zur Entfernung von ungebundenen Sonden eingesetzt werden, überflüssig werden. Die Handhabung wird dadurch entscheidend vereinfacht und die Analyse kann ohne komplexe Geräteausstattung in einem Mikrotiterplatten-Fluorometer automatisch durchgeführt werden. Erste praxisnahe Untersuchungen waren erfolgversprechend und ein Routineeinsatz dieses Assays steht nach einer weiteren umfassenden Validierung in Aussicht.

E. Summary

Rapid and reliable methods for the detection of food-relevant bacteria are indispensable for quality assurance in modern food industry to release finished products faster to the market. By applying these detection procedures the microbial stability of the final products should be guaranteed and it should be prevented that products, which are contaminated with pathogenic bacteria reach the consumers. Moreover, quality assurance laboratories with a high daily sample turnaround (> 100 samples per day) need to apply new strategies and methods to process these sample amounts as simple, objective, fast and in parallel as possible.

Based on the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) different detection procedures were developed in the scope of this thesis, which are suitable for routine use in the quality assurance of the food industry. In comparison to conventional cultivation-based detection procedures the developed assays are characterized by a significant reduction of the detection time and at least achieve a comparable sensitivity and specificity.

For routine analysis of liquid samples filter-based protocols for the detection of micro-colonies (model organisms: *Legionella*) and for the direct detection of single cells (model organisms: beer-spoiling bacteria) were developed and validated in detail. By establishing different evaluation options (manual, semi-automatic or fully automatic evaluation) these detection assays can be adjusted individually to the requirements of a laboratory in the food industry.

For parallel analysis of a high sample amount (high-throughput) in microplate format a new reaction mechanism (Quick-FISH) for *in situ* hybridization in solution was developed. For the detection of *Cronobacter* spp. fluorescence *in situ* hybridization in solution was combined with static fluorescence quenching. Quick-FISH offers the advantage that washing and rinsing steps, which are required to remove unbound probes during the standard-FISH-technology become unnecessary. Thereby, the protocol is simplified and the analysis can be performed automatically in a standard microplate-fluorometer without any further special equipment. Preliminary investigations with Quick-FISH using artificially spiked samples revealed promising results. Hence, the routine application of this assay in food industry is very likely following further comprehensive validation tests.

F. Literaturverzeichnis

- Amann R. I., Krumholz L., and Stahl D. A. (1990):** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**: 762-770.
- Amann R. I., Ludwig W., and Schleifer K.-H. (1992):** Identification and *in situ* detection of individual cells. *FEMS Microbiol. Letters* **100**: 45-50.
- Amann R. I., Ludwig W., and Schleifer K.-H. (1995):** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Amann R., and Fuchs B. (2008):** Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology.* **6**: 339-350.
- Back W. (1978a):** Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*. Phänotypische und genotypische Abgrenzung der bisher bekannten Arten sowie Beschreibung einer neuen bierschädlichen Art: *Pediococcus inopinatus*. *Brauwiss.* **31**, 237–250; 312–320; 336–343.
- Back W., and E. Stackebrandt (1978b):** DNS/DNS-Homologiestudien innerhalb der Gattung *Pediococcus*. *Arch. Microbiol.* **118**: 79–85.
- Back W. (1981a):** Schädliche Mikroorganismen in Fruchtsäften, Fruchtnektaren und süßen, alkoholfreien Erfrischungsgetränken. *Brauwelt* **121**: 43–48.
- Back W. (1981b):** Nachweis und Identifizierung Gramnegativer bierschädlicher Bakterien *Brauwiss.* **34**: 197–204.
- Back W., (1994):** Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Band 1, Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- Beimfohr C., Krause A., Amann R., Ludwig W., and Schleifer K.-H. (1993):** *In situ* identification of lactococci, enterococci and streptococci. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 450-456.
- Beimfohr, C., (1996):** Nachweis lebensmitteltechnologisch relevanter Bakterien mit Hilfe verschiedener Hybridisierungstechniken. Dissertation an der Technischen Universität München.
- Binder H., and Preibisch S. (2005):** Specific and Nonspecific Hybridization of Oligonucleotide Probes on Microarrays. *Biophysical Journal* **89**: 337-352.
- Bischoff E., Bohak I., Back W., and Leibhard S. (2001):** Schnelldachweis von bierschädlichen Bakterien mit PCR und universellen Primer. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Heft 1/2.

F. Literaturverzeichnis

- Bohak I., Thelen K., and Beimfohr C. (2006):** Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an Obligate Beer-Spoiling Bacterium. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* March/April 78-82.
- Bopp C. A., Summer J. W., Morris G. K., and Wells J. G. (1981):** Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use ODF a selective medium. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 714-719.
- Bowen A. B., and Braden C. R. (2006):** Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1185-1189.
- Brenner D. J., Steigerwalt A. G., and McDade J. E. (1979):** Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus *novum*, species *nova*, of the family *Legionellaceae*, familia *nova*. *Ann Intern. Med.* **90**: 656-658.
- Brosius J., Dull T. L., Sleeter D. D., and Noller H. F. (1981):** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.* **148**: 107-127.
- Burggraf S., Mayer T., Amann R., Schadhauer S., Woese C. R., and Stetter K. O. (1994):** Identifying members of the domain *Archaea* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3112-3119.
- Clark J. M., and Swika R. L. (1977):** *Experimental Biochemistry*. 2nd ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Cryer D. R., Eccleshall R., and Mamur J. (1975):** Isolation of yeast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2114.
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H., and Wagner M. (1999):** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444.
- DeLong E. F., Wickham G. S., and Pace N. R. (1989):** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360-1363.
- DeLong E. F., Taylor L. T., Marsh T. L., and Preston C. M. (1999):** Visualization and enumeration of marine planctonic *Archaea* and *Bacteria* by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5554-5563.
- De Man J., Rogosa M., and Sharpe M. (1960):** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.
- Deng Y., He Z., Van Nostrand J. D., and Zhou J. (2008):** Design and analysis of mismatch probes for long oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* **9**: 491-503.
- Dennis P. J., Bartlett C. L. R., and Wright A. E. (1984):** Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. In Thornsby C., *et al.* (eds) *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium* Washington D. C. - Am. Soc. Microbiol., 224-296.

F. Literaturverzeichnis

- DVGW Arbeitsblatt 551:** Trinkwassererwärmungs- und Leitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasserinstallationen. 04/2004.
- Edelstein P. H., and Finegold S. (1979):** Use of a semi-selective medium to culture *Legionella pneumophila* from contaminated lung specimens. *J. Clin. Microbiol.* **10:** 141-143.
- Edelstein P. H. (1981):** Improved semi-selective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* **14:** 293-303.
- Edelstein P. H. (1982):** Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J. Clin. Microbiol.* **16:** 697-699.
- Edelstein P. H. (1985):** Legionnaire's Disease Laboratory Manual. Los Angeles, California.
- EFSA (2004).** European Food Safety Authority. Microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal*, **113:** 1-35.
- Empfehlung des Umweltbundesamtes (2002):** Nachweis von Legionellen in Trinkwasser und Badebeckenwasser: Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trink- und Badewasserkommission des Umweltbundesamtes. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz. **43:** 911-915.
- Engelmann U., and Weiss N. (1985):** *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: A new obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. *Syst. Appl. Microbiol.* **6:** 287-290.
- Erhart R., Bradford D., Seviour R. J., Amann R., and Blackall L. L. (1997):** Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "Microthrix parvicella" in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **20:** 310-318.
- Euzéby J. P. (1997):** *List of bacterial names with standing in nomenclature:* a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47:** 590-592.
- FAO-WHO (2006):** *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powered infant formula: Meeting report.
- Farmer J. J., Asbury M. A., Hickmann F. W., and Brenner D. J. (1980):** *Enterobacter sakazakii* – a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30:** 569-584.
- FDA (2002).** Food and Drug Administration. Isolation and enumeration of *Enterobactersakazakii* from dehydrated powder infant formula. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>; Stand 10. März 2003.
- Fields B. S. (1996):** The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **4:** 286-290.

F. Literaturverzeichnis

- Fields B. S., Benson R. F., and Besser R. E. (2002):** *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 506-526.
- Förster T. (1948):** Intermolecular energy transference and fluorescence. *Ann. Phys.* **2**: 55-75.
- Fraser D. W., Tsai T. R., Orestein W., Parkin W. E., Beecham H. J., Sharrar R. G., Harris J., Mallison G. F., Martin S. M., McDade J. E., Shepard C. C., and Brachman P. S. (1977):** Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **297**: 1189-1197.
- Friedemann M. (2008):** Gesundheitliches Gefährdungspotential von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp. nov.) in Säuglingsnahrung. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* **51**: 664-674.
- Fuchs B. M., Wallner G., Beisker W., Schwippl I., Ludwig W., and Amann R. (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., Glöckner F. O., Wulf J., and Amann R. (2000):** Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3603-3607.
- Glöckner F. O., Amann R., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Trebesius K. H. and Schleifer K.-H. (1996):** An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **9**: 403-406.
- Gong P., and Levicky R. (2008):** DNA surface hybridization regimes, *PNAS* **105**: 5301-5306.
- Grimm D., Merkert H., Ludwig W., Schleifer K.-H., Hacker J. and Brand B. C. (1998):** Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2686-2690.
- Haakensen M., Schubert A., and Ziola B. (2008):** Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer-spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists.* **66**(2): 63-70.
- Haikara A., Enari T.-M., and Lounatmaa K. (1981):** The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria. *European Brewery Convention, Proceedings of the 18th Congress, Copenhagen, Denmark, 1981.* IRL Press Limited, London, UK, 229–240.
- Haikara A., and Lounatmaa K. (1987):** Characterization of *Megasphaera* sp., a new anaerobic beer spoilage coccus. *In: European Brewery Convention. Proceedings of the 21st Congress, Madrid, Spain, 1987.* IRL Press Limited, Oxford, UK, 473–480.
- Haikara A., and Helander I. (2002):** *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. *In The prokaryotes: an Evolving Electronic Database for the Microbiological Community*, 3rd edn. Release 3.5. Edited by M. Dworkin. New York, Springer.

F. Literaturverzeichnis

- Horn M., Fritsche T. R., Gautom R. K., Schleifer K. H., and Wagner M. (1999):** Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ. Microbiol.* **1**: 357-367.
- Hugenholtz P., Goebel B. M., and Pace N. R. (1988):** Impact of Culture-independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal Bacteriol.* **180**: 4765-4774.
- ISO 11731. (1998):** Water Quality – Detection and enumeration of *Legionella*. International Organization Standardization.
- ISO 11731-2:2004 (2004):** Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella* -- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts. International Organization Standardization.
- ISO/TS 22964. IDF/RM 210 (2006):** TECHNICAL SPECIFICATION. Working document for ISO/TC/SC9/*Enterobacter sakazakii* ad'hoc group. Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*. International Organization Standardization.
- Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., and Joosten H. (2007a):** The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. Nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. *BMC Evol. Biol.* **7**:64.
- Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., and Joosten H. (2007b):** Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3814-3816.
- Jukes T. H., and Cantor C. R. (1969):** Evolution of protein molecules. p. 21-132. In: *Mammalian protein metabolism*, Murano N. H. 8ed.), Academic Press, New York.
- Juretschko S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K.-H., Pommerening-Röser A., Koops H. P., and Wagner M. (1998):** Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3042-3051.
- Juvonen R., Satokari R., Mallison K., and Haikara A. (1999):** Detection of Spoilage Bacteria in Beer by Polymerase Chain Reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57**: 99-103.
- Juvonen R., and Suihko M.-L. (2006):** *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikare* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 695-702.
- Kapuscinski J., and Szer W. (1979):** Interactions of 4',6'-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucl. Acids Res.* **6**: 3519-3534.

F. Literaturverzeichnis

- Koltai H., and Weingarten-Baror C. (2008):** Specificity of DNA microarray hybridization: characterization, effectors and approaches for data correction. *Nucl. Acids. Res.* **36**: 2395-2405.
- Kragelund C., Kong Y., van der Waarde J., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., Thomsen T. R., and Nielsen P. H. (2006):** Ecophysiology of different filamentous *Alphaproteobacteria* in industrial wastewater treatment plants. *Microbiology.* **152**: 3003-3012.
- Kragelund C., Levantesi C., Borger A., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., Kong Y., van der Waarde J., Krooneman J., Rossetti S., Thomsen T.R., and Nielsen P.H. (2007):** Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol.* **59**: 671-82.
- Kragelund C., Levantesi C., Borger A., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., Kong Y., Krooneman J., Larsen., Thomsen T. R., and Nielsen P. H. (2008):** Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the *Bacteroidetes* present in activated sludge plants. *Microbiology.* **154**: 886-94.
- Lakowicz J. R. (1999):** Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Lathe R. (1985):** Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.* **183**: 1-12.
- Lehner A., Nitzsche S., Breeuwer P., Diep B., Thelen K., and Stephan R. (2006):** Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol.* **23**: 15.
- Levantesi C., Beimfohr C., Geurkink B., Rossetti S., Thelen K., Krooneman J., Snaidr J., van der Waarde J., and Tandoi V. (2004):** Filamentous *Alphaproteobacteria* associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 716-27.
- Levantesi C., Rossetti S., Thelen K., Kragelund C., Krooneman J., Eikelboom D., Nielsen P. H., and Tandoi V. (2006a):** Phylogeny, physiology and distribution of '*Candidatus Microthrix calida*', a new *Microthrix* species isolated from industrial activated sludge wastewater treatment plants. *Appl. Environ Microbiol.* **8**: 1552-63.
- Levantesi C., Rossetti S., Beimfohr C., Thelen K., Krooneman J., van der Waarde J., and Tandoi V. (2006b):** Description of filamentous bacteria present in industrial activated sludge WWTPs by conventional and molecular methods. *Water Sci. Technol.* **54**: 129-37.
- Li X., Morgenroth E., and Raskin L. (2008):** Quantitative rRNA-Targeted Solution-Based Hybridization Assay Using Peptide Nucleic Acid Molecular Beacons. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7297-7305.
- Ludwig W., and Schleifer K.-H. (1994a):** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 155-173.

F. Literaturverzeichnis

- Ludwig W., Dorn S., Springer N., Kirchhof G., and Schleifer, K.-H. (1994b):** PCR-based Preparation of 23S rRNA-Targeted Group-Specific Polynucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3236-3244.
- Ludwig W., Rosselló-Mora R., Aznar R., Klugbauer S., Spring S., Reetz K., Beimfohr C., Brockmann E., Kirchhoff G., Dorn S., Bachleitner M., Klugbauer N., Springer N., Lane D., Nietupsky R., Weizenegger M., and Schleifer, K.-H. (1995):** Comparative sequence analysis of 23S rRNA from *proteobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 164-188.
- Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Klugbauer N., Weizenegger M., Neumaier J., Bachleitner M., and Schleifer K.-H. (1998):** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhumakar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lümann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., and Schleifer K.-H. (2004):** ARB: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* **32**: 1363-1371.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., and Schleifer K.-H. (1992):** Phylogenetic Oligonucleotide Probes for the Major Subclasses Of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- Manz W., Amann R., Szewzyk R., Szewzyk U., Stenström T.-A., Hutzler P. and Schleifer K.-H. (1995):** In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* **141**: 29-39.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., and Schleifer K.-H. (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.
- Marras S. A. E., Kramer F. R., and Tyagi S. (2002):** Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucl. Acids Res.* **30**: e122.
- Marras S. A. E. (2006a):** Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. In: *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Design and Protocols. Methods in Molecular Biology.* **335**: 3-16.
- Marras S. A. E., Tyagi S., and Kramer F. R. (2006b):** Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent hybridization probes. *Clinica Chimica Acta.* **363**: 48-60.
- Marston B. J., Plouffe J. F., File T. M., Hackman B. A., Salstrom S. J., Lipman H. B., Kolczak M. S., and Breiman R. F. (1997):** Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization—results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Arch. Intern. Med.* **157**: 1709-1718.

F. Literaturverzeichnis

- Maruyama F., Kenzaka T., Yamaguchi N., Tani K., and Nasu M. (2005):** Visualization and enumeration of bacteria carrying a specific gene sequence by using *in situ* rolling circle amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7933-7940.
- Meier H., Koob C., Ludwig W., Amann R., Frahm E., Hoffmann S., Obst U., and Schleifer K.-H. (1997):** Detection of Enterococci with rRNA targeted DNA probes and their use for hygienic drinking water control. *Pergamon Wat. Sci. Tech.* 35. No. **11-12**: 437-444.
- Mobarry B. K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B. E., and Stahl D. A. (1996):** Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2156-2162.
- Mossel D. A. A., Vissar M., and Cornellisen A. M. R. (1963):** The Examination of Foods for Enterobacteriaceae using a Test of the Type Generally Adopted for the Detection of Salmonellae. *J. Appl. Bact.* **26**: 444-452.
- Mossel D. A. A., and Ratto M. A. (1970):** Rapid Detection of Sublethally Impaired Cells of *Enterobacteriaceae* in Dried Foods. *Appl. Env. Microbiol.* **20**: 273-275.
- Mossel D. A., Harrewijn G. A., and Nesselrooy-van Zadelhoff C. F. (1974):** Standardization of the selective inhibitory effect of surface active compounds used in media for the detection of Enterobacteriaceae in foods and water. *Health Lab. Sci.* **11**: 260-267.
- Mullane N. R., Iversen C., Healy B., Walsh C., Whyte P., Wall P. G., Quinn T., and Fanning S. (2007):** *Enterobacter sakazakii*, an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. *Minerva Pediatr.* **59**: 137-148.
- Mullane N., Healy B., Meade J., Whyte P., Wall P. G., and Fanning S. (2008):** Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a Powdered Milk Protein Manufacturing Facility. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5913-5917.
- Müller H. E. (1989):** Das Legionellen-Infektrisiko und seine Verhinderung durch Hygienetechnische Maßnahmen. *Dtsch. med. Wschr.* **114**: 1754-1759.
- Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M. and Rshtchian A. (2002):** Effects of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucl. Acids Res.* **30**: 2089-2195.
- Nazarowec-White M., and Farber J. M. (1997):** *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. Food. Microbiol.* **34**: 103-113.
- Neef A., Amann R. I., and Schleifer K.-H. (1995):** Detection of microbial cells in aerosols using nucleic-acid probes. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 113-122.
- Neef, A., Amann R., Schlesner H., and Schleifer K.-H. (1998):** Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* **144**: 3257-3266

F. Literaturverzeichnis

- Oliveira K., Procop G. W., Wilson D., Coull J., and Stender H. (2002):** Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 247-251.
- O'Sullivan L. A., Weightman A. J., and Fry J. C. (2002):** New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 201-210.
- Owczarzy R., You Y., Moreira B. G., Manthey J. A., Huang L., Behlke M. A., and Walder J. (2004):** Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures. *Biochemistry.* **43**: 3537-3554.
- Owczarzy R., Tataurov A. V., Wu Y., Manthey J. A., McQuisten K. A., Almabrazi H. G., Pedersen K. F., Lin Y., Garretson J., McEntaggart N. O., Sailor C. A., Dawson R. B., and Peek A. S. (2008a):** IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucl. Acids Res.* **36**: W163-W169.
- Owczarzy R., Moreira B. G., You Y., Behlke M. A., and Walder J. (2008b):** Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations. *Biochemistry* **47**: 5336-5353.
- Pernthaler A., Pernthaler J., and Amann R. (2002):** Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3094-3101.
- Pernthaler A., and Amann R. (2004):** Simultaneous Fluorescence In Situ Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5426-5433.
- Porter K. G., and Feig Y. S. (1980):** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948.
- Pratscher J., Stichternoth C., Fichtl K., Schleifer K.-H., and Braker G. (2008):** Application of RING-FISH to detect nitrite reductase genes (*nirK*) in denitrifier pure cultures and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B., Ludwig W., Peplies J., and Glöckner F. O. (2007):** SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nuc. Acids Res.* **35**: 21, 7188-7196.
- Richards M., and M. Macrae (1964):** The significance of the use of hops in regard to the biological stability of beer. II. The development of resistance to hop resins by strains of lactobacilli. *J. Inst. Brewing* **70**: 484-488.
- Rigby S., Plouffe J. F., Hackman B. A., Hill D. S., Benson R. F., and Breiman R. F. (1997):** Stability of *Legionella* urinary antigens over time. *Diagn. Infect. Dis.* **28**:1-3.

F. Literaturverzeichnis

- Rigby S., Procop G. W., Haase G., Wilson D., Hall G., Kurtzmann C., Oliviera K., von Oy S., Hyldig-Nielsen J. J., Coull J., and Stender H. (2002):** Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2182-2186.
- Saenger W. (1984):** Principles of Nucleic Acid Structure. Berlin: Springer-Verlag.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., and Ehrlich H. A. (1988):** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **293**: 487 – 491.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schildkraut C., and Lifson S. (1965):** Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers* **3**: 195-208.
- Schleifer K.-H., and Ludwig W. (1989):** Phylogenetic relationships among bacteria. In: B. Fernholm, K. Brenner, and H. Jörnwall (eds.) *The Hierarchy of Life*, pp. 103-117. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Schleifer K.-H., Leuteritz M., Weiss N., Ludwig W., Kirchhof G., and Seidel-Rüfer H. (1990):** Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* sp. nov., *Selenomonas lactificifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 19-27.
- Schleifer K.-H., Ludwig W., and Amann R. (1993):** Nucleic Acid Probes. In: *Handbook of Bacterial Systematics*. pp. 463 -522. Academic Press Ltd.
- Schleifer K.-H., and Ludwig W. (1995):** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 461-467.
- Schmid M., Schmitz-Esser S., Jetten M., and Wagner M. (2001):** 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **3**: 450-459.
- Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra I. C. W., Schonen van de Pas K., Verbruggen J. M., Hill T., Moffet B., Fuerst J., Schouten S., Damstè S. S. J., Harris J., Shaw P., Jetten M., and Strous M. (2003a):** Two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 529-538.
- Schmid M., Walcher M., Bubert A., Wagner M., and Schleifer K.-H. (2003b):** Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *L. monocytogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**: 215-225.
- Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra I. C. W., Schonen van de Pas K., Verbruggen J. M., Hill T., Moffet B., Fuerst J., Schouten S., Damstè S. S. J., Harris J., Shaw P., Jetten M., and Strous M. (2003):** Two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 529-538.

F. Literaturverzeichnis

- Sharpe M. E. (1981):** *The genus Lactobacillus*, p. 1653–1679. In: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin.
- Snaidr, J., (1997a):** Phylogenie und *in situ* Identifizierung von Bakterien im Belebtschlamm von biologische Abwasserreinigungsanlagen. Dissertation an der Technischen Universität München.
- Snaidr J., Amann R., Huber I., Ludwig W., and Schleifer K.-H. (1997b):** Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:7, 2884-2896.
- Schönhuber W., Fuchs B., Juretschko S., and Amann R. (1997):** Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3268-3273.
- Silvermann A. P., and Kool E. T. (2005):** Quenched autoligation probes allow discrimination of live bacterial species by single nucleotide differences in rRNA. *Nucl. Acids Res.* **33**: 4978-4986.
- Smolina I., Lee C., and Frank-Kamenetski M. (2007):** Detection of low copy genomic DNA sequences in individual bacterial cells using PNA-assisted rolling circle amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 2324-2328.
- Smolina I. V., Kuhn H., Lee C., Frank-Kamenetskii M. D. (2008):** Fluorescence-based detection of short DNA sequences under non-denaturing conditions. *Bioorg. Med. Chem.* **16**: 84–93.
- Søgaard M., Stender H., and Schønheyder H. C. (2005):** Direct identification of major blood culture pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, by a panel of fluorescence *in situ* hybridization assays using peptide nucleic acid probes. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1947-1949.
- Søgaard M., Hansen D. S., Fiandaca M. J., Stender H., and Schønheyder H. C. (2007):** Peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* from positive blood cultures. *J. Med. Microbiol.* **56**: 914-917.
- Stackebrandt, E. (1992).** "Unifying phylogeny and phenotypic diversity." In *The prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds). 2nd edition, New York, Berlin: Springer Verlag, 219-47.
- Stackebrandt, E., and Goebel B. M. (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.
- Stackebrandt E., Kramer I., Swiderski J., and Hippe H. (1999).** Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **24**: 253-258.

F. Literaturverzeichnis

- Stahl D. A., and Amann, R. (1991):** Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics. In *Sequencing and Hybridization Techniques in Bacterial Systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), John Wiley and Sons, Chichester, England, pp. 205-248.
- Steele T. W. (1989):** Legionnaires' disease in South Australia, 1979-1988. *Med. J. Aust.* **151**: 322, 325-326, 328.
- Stephan R., Van Trappen S., Cleenwerck I., Vancanneyt M., de Vos P., and Lehner A. (2007):** *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder. *Int. J. Evol. Microbiol.* **57**: 820-826.
- Stephan R., Van Trappen S., Cleenwerck I., Iversen C., Jooste H., de Vos P., and Lehner A. (2008):** *Enterobacter pulveris* sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment. *Int. J. Evol. Microbiol.* **58**: 237-241.
- Stender H., Mollerup T. A., Lund K., Petersen K. H., Hongmanee P., and Godtfredsen S. E. (1999):** Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid probes. *Int. J. Lung. Dis.* **3**: 830-837.
- Stoffels M., Ludwig W., and Schleifer K. H. (1999):** rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1**: 259.
- Strunk O. (1993):** Rechnergestützte phylogenetische Analyse von Bakterien aufgrund evolutionärer Basengleichheiten an bestimmten Alignment-Positionen. Diplomarbeit an der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Informatik.
- Suzuki K., Funahashi W., Koyanagi M, and Yamashita H. (2004):** *Lactobacillus paracollinooides* sp. nov., isolated from brewery environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 115-117.
- Thelen K., Beimfohr C., Bohak I., and Back W. (2001):** Spezifischer Schnelldiagnose von bierschädlichen Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter Sonden. *Brauwelt* **38**: 1596-1603.
- Thelen, K. (2002):** Entwicklung eines routinetauglichen Schnelldiagnoses für bierschädliche Milchsäurebakterien basierend auf der FISH-Technik. Diplomarbeit an der Technischen Universität München.
- Thelen K., Beimfohr C., and Snaidr J. (2004):** VIT-Bier: The Rapid and Easy Detection Method for Beer-Spoiling Bacteria. *MBAA TQ.* **41**: 115-119.
- Thelen K., Beimfohr C., and Snaidr J. (2006):** Evaluation Study of the Frequency of Different Beer-Spoiling Bacteria Using the VIT Analysis. *MBAA TQ.* **43**: 31-35.
- Trebesius K., Amann R., Ludwig W., Mühlegger K., and Schleifer K. H. (1994):** Identification of Whole Fixed Cells with Nonradioactive ²³S rRNA-Targeted Polynucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3228-3235.

F. Literaturverzeichnis

- Tyagi S., and Kramer F. R. (1996):** Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*. **14**: 303-308.
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA (2006):** Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>. Stand: 29 Mai 2006.
- Wadovsky R. and Yee R. (1981):** Glycine containing selective medium for isolation of legionellaceae from environmental specimens. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 768-772.
- Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H.-P., and Schleifer K.-H. (1995):** In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 251-264.
- Wagner M., Amann R., Lemmer H., and Schleifer K.-H. (1993):** Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1520-1525.
- Wahl G. M., Berger S. L., and Kimmel A. R. (1987):** Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods in Enzymology*, **152**: 399-407.
- Wallner G., Amann R., and Beisker W. (1993):** Optimizing fluorescent *in situ* hybridization of suspended cells with rRNA targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136-143.
- Wallner G., Erhart R., and Amann R. (1995):** Flow Cytometric Analysis of Activated Sludge with rRNA-Targeted Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1859-1866.
- Woese C. R., Weisburg W. G., Hahn C. M., Paster B. J., Zablen L. B., Lewis B. J., Macke T. J., Ludwig W., and Stackebrandt E. (1985):** The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 25-33.
- Woese C. R. (1987):** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* **51**: 221-271.
- Woese C. R., Kandler O., and Wheelis M. L., (1990):** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.
- Woese C., R. (2004):** A New Biology for a New Century. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June 2004, 173-186.
- Xi C., Balberg M., Boppart S. A., and Raskin L. (2003):** Use of DNA and Peptide Nucleic Acid Molecular Beacons for Detection and Quantification of rRNA in Solution and in Whole Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5673-5678.
- Zhang S., Liu G., Liu X., Yin D., Dou S., He J., Ruschkowski M., and Hnatowich D. J. (2007):** Comparison of several linear fluorophore- and quencher conjugated oligomer duplexes for stability, fluorescence quenching and kinetics in vitro and in vivo in mice: Fluorescent DNA duplexes for imaging applications. *Bioconjug. Chem.* **18**: 1170-1175.

F. Literaturverzeichnis

Zwirgmaier K., Ludwig W., and Schleifer K.-H. (2003): Improved fluorescence *in situ* hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 327-37.

Zwirgmaier K., Ludwig W., and Schleifer K.-H. (2004): Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence *in situ* hybridization – RING-FISH. *Mol. Microbiol.* **51**: 89-96.

Zwirgmaier K., Fichtl K., and Ludwig W. (2005): *In Situ* Functional Gene Analysis: Recognition of Individual Genes by Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Methods in Enzymology* **397**: 338-351.

G. Anhang

G.1 Überprüfung der Spezifität des entwickelten FISH-Protokolls zum Nachweis von *Legionella*-Mikrokolonien

Ergebnis der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach Protokoll C.1.2.3 (Seite 62) mit den Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3 (beide jeweils 150 ng/μl) bei 20% FA auf einer Auswahl von Zielorganismen (ZO) und Nichtzielorganismen (NZO).

Tabelle G.1: Spezifitätstests der Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3

Organismus	Stammbezeichnung		FISH-Signal Sonde Leg705	FISH-Signal Sonde Legpne1
<i>Legionella anisa</i> *	ATCC	35290	+	-
<i>Legionella birminghamensis</i> *	ATCC	43702	+	-
<i>Legionella bozemanii</i> *	ATCC	33217	+	-
<i>Legionella brunensis</i> *	ATCC	43878	+	-
<i>Legionella cherrii</i> *	ATCC	35252	+	-
<i>Legionella cincinnatiensis</i> *	ATCC	43753	+	-
<i>Legionella drozanskii</i> *	ATCC	497990	+	-
<i>Legionella dumoffii</i> *	ATCC	33279	+	-
<i>Legionella erythra</i> *	ATCC	35303	+	-
<i>Legionella fairfieldensis</i> *	ATCC	49588	+	-
<i>Legionella fallonii</i> *	ATCC	497992	+	-
<i>Legionella feeleeii</i> *	ATCC	35072	+	-
<i>Legionella geestiana</i> *	ATCC	49504	+	-
<i>Legionella gormanii</i> *	ATCC	33297	+	-
<i>Legionella gratiana</i> *	ATCC	49413	+	-
<i>Legionella gresilensis</i> *	ATCC	700509	+	-
<i>Legionella hackeliae</i> *	ATCC	35999	+	-
<i>Legionella israelensis</i> *	ATCC	43199	+	-
<i>Legionella jamestowniensis</i> *	ATCC	35298	+	-
<i>Legionella jordanis</i> *	ATCC	33623	+	-
<i>Legionella lansingensis</i> *	ATCC	49751	+	-
<i>Legionella londiniensis</i> *	ATCC	49505	+	-
<i>Legionella longbeachae</i> *	ATCC	33462	+	-
<i>Legionella maceachernii</i> *	ATCC	35300	+	-
<i>Legionella micdadei</i> *	ATCC	33204	+	-
<i>Legionella moravica</i> *	ATCC	43877	+	-
<i>Legionella nautarum</i> *	ATCC	49506	+	-
<i>Legionella oakridgensis</i> *	ATCC	33761	+	-
<i>Legionella parisiensis</i> *	ATCC	35299	+	-
<i>Legionella pneumophila</i>	VER	144	+	+
<i>Legionella pneumophila</i>	VER	449	+	+
<i>Legionella pneumophila</i>	VER	450	+	+
<i>Legionella pneumophila ssp. fraseri</i> , Sg4	ATCC	33156	+	+
<i>Legionella pneumophila ssp. fraseri</i> , Sg5	ATCC	33216	+	+
<i>Legionella pneumophila ssp. pascullei</i>	ATCC	33735	+	+
<i>Legionella pneumophila ssp. pneumophila</i> , Sg5	ATCC	33733	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp. bellingham</i> , Sg1	ATCC	33153	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp. bellingham</i> , Sg10	ATCC	33154	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp. bellingham</i> , Sg11	ATCC	33155	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp. bellingham</i> , Sg12	ATCC	33155	+	+

G. Anhang

Fortsetzung **Tabelle G.1**

Organismus	Stammbezeichnung		FISH-Signal Sonde Leg705	FISH-Signal Sonde Legpne1
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg13</i>	ATCC	33216	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg14</i>	ATCC	33215	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg2</i>	ATCC	33823	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg3</i>	ATCC	43283	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg4</i>	ATCC	43130	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg5</i>	ATCC	43290	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg6</i>	ATCC	43736	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.bellingham, Sg7</i>	ATCC	33153	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.knoxville, Sg1</i>	ATCC	33152	+	+
<i>Legionella pneumophila, ssp.philadelphia, Sg1</i>	ATCC	43703	+	+
<i>Legionella quateirensis*</i>	ATCC	49507	+	-
<i>Legionella quinlivanii*</i>	ATCC	43830	+	-
<i>Legionella rowbothamii*</i>	ATCC	497991	+	-
<i>Legionella rubrilucens*</i>	ATCC	35304	+	-
<i>Legionella sainthelensi*</i>	ATCC	35248	+	-
<i>Legionella santicrucis*</i>	ATCC	35301	+	-
<i>Legionella shak espearei*</i>	ATCC	49655	+	-
<i>Legionella spiritensis*</i>	ATCC	35249	+	-
<i>Legionella steigerwaltii*</i>	ATCC	35302	+	-
<i>Legionella taurinensis*</i>	ATCC	700508	+	-
<i>Legionella tucsonensis*</i>	ATCC	49810	+	-
<i>Legionella wadsworthii*</i>	ATCC	33877	+	-
<i>Legionella worsleiensis*</i>	ATCC	49508	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa**</i>	DSM	50071 ^T	-	-
<i>Aeromonas trota**</i>	DSM	7312 ^T	-	-
<i>Citrobacter freundii**</i>	DSM	30039	-	-
<i>Edwardsiella ictaluri **</i>	DSM	13697	-	-
<i>Erwinia cypripedii**</i>	DSM	3873	-	-
<i>Escherichia coli**</i>	DSM	30083 ^T	-	-
<i>Klebsiella oxytoca**</i>	DSM	5175	-	-
<i>Enterobacter aerogenes**</i>	DSM	30053 ^T	-	-
<i>Shigella flexneri**</i>	DSM	4782 ^T	-	-
<i>Vibrio vulnificus**</i>	DSM	11507 ^T	-	-

Legende: + = spezifisches FISH-Sondensignal, - = kein FISH-Sondensignal vorhanden, ** = NZOs für Sonde Leg705, */** = NZOs für Sonde Legpne1

G.2 Vergleichende Legionellen-Analyse von Trinkwasserproben

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach Protokoll C.1.2.3 (Seite 62) mit den Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3 (beide jeweils 150 ng/μl) bei 20% FA. Klassische Legionellen-Untersuchung nach UBA-Empfehlung (B.3.4) durch LGA Oberschleißheim.

Tabelle G.2: Vergleichende Analyse von Trinkwasserproben

Nr.	Untersuchung nach UBA-Empfehlung			Untersuchung mittels FISH-Analyse		
	Ergebnis	Organismus	KBE/l	Ergebnis	Organismus	KBE/l
1	negativ	-	0	negativ	-	0
2	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1050	positiv	<i>L. pneumophila</i>	540
3	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2100
4	negativ	-	0	negativ	-	0
5	negativ	-	0	negativ	-	0
6	negativ	-	0	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	20
7	positiv	<i>L. pneumophila</i>	7100	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2300
8	positiv	<i>L. pneumophila</i>	550	positiv	<i>L. pneumophila</i>	240
9	positiv	<i>L. pneumophila</i>	3550	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1270
10	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1050
11	positiv	<i>L. pneumophila</i>	8000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	3500
12	negativ	-	0	negativ	-	0
13	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	80
14	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	50	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	100
15	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	6000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	3500
16	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	200	positiv	<i>L. pneumophila</i>	100
17	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	70000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	> 10000
18	negativ	-	0	negativ	-	0
19	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1200
20	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1600
21	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	20
22	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	750	positiv	<i>L. pneumophila</i>	180
23	negativ	-	0	negativ	-	0
24	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	300	positiv	<i>L. pneumophila</i>	120
25	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	40
26	negativ	-	0	negativ	-	0
27	negativ	-	0	negativ	-	0
28	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	32000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	> 10000
29	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	6000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2700
30	negativ	-	0	negativ	-	0
31	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	750	positiv	<i>L. pneumophila</i>	550
32	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	40
33	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	4000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2530
34	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	8000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	4430
35	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	5600	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2390
36	positiv	<i>Legionella ssp.</i>	2000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	900

G. Anhang

Fortsetzung **Tabelle G.2**

Nr.	Untersuchung nach UBA-Empfehlung		KBE/l	Untersuchung mittels FISH-Analyse		Ergebnis
	Ergebnis	Organismus		Ergebnis		
37	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	8000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	3200
38	negativ	-	0	negativ	-	0
39	negativ	-	0	negativ	-	0
40	positiv	<i>L. pneumophila</i>	148000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	> 10000
41	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	6000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2330
42	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	40
43	negativ	-	0	negativ	-	0
44	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	1750	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1100
45	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	20
46	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	600	positiv	<i>L. pneumophila</i>	540
47	negativ	-	0	negativ	-	0
48	negativ	-	0	negativ	-	0
49	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1100
50	positiv	<i>L. pneumophila</i>	2000	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1020
51	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	20
52	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	60
53	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	350	positiv	<i>L. pneumophila</i>	1530
54	negativ	-	0	negativ	-	0
55	negativ	-	0	negativ	-	0
56	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	50	positiv	<i>L. pneumophila</i>	20
57	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	40
58	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	20
59	negativ	-	0	negativ	-	0
60	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	50	positiv	<i>L. pneumophila</i>	20
61	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	150	positiv	<i>L. pneumophila</i>	100
62	positiv	<i>Legionella</i> ssp.	50	positiv	<i>L. pneumophila</i>	580
63	negativ	-	0	positiv	<i>L. pneumophila</i>	80
64	negativ	-	0	negativ	-	0
65	negativ	-	0	negativ	-	0
66	negativ	-	0	negativ	-	0
67	negativ	-	0	negativ	-	0
68	negativ	-	0	negativ	-	0
69	negativ	-	0	negativ	-	0

G.3 Validierung der manuellen Auswertung

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach Protokoll C.1.2.3 (Seite 62) mit den Sonden Leg705-FAM und Legpne1-CY3 (beide jeweils 150 ng/μl) bei 20% FA.

Von jeder Probe wurde die Anzahl der *Legionella*-Mikrokolonien (KBE) jeweils pro 3 Reihen, pro halber Filter sowie pro gesamter Filter manuell quantifiziert (C.1.4.1, Seite 67). Die pro 3 Reihen und pro halber Filter quantifizierten *Legionella* sp. KBE, wurden entsprechend der Vorgaben unter C.1.4.1, auf die Gesamtanzahl KBE *Legionella* sp. pro gesamter Filter hochgerechnet.

Tabelle G.3: Übersicht Validierung der manuellen Auswertung

	KBE <i>Legionella</i> sp. manuell gezählt in 3 Reihen	KBE <i>Legionella</i> sp. gezählt pro 3 Reihen hochgerechnet auf KBE <i>Legionella</i> sp. gesamter Filter	KBE <i>Legionella</i> sp. manuell gezählt pro halber Filter	KBE <i>Legionella</i> sp. gezählt pro halber Filter hochgerechnet auf KBE <i>Legionella</i> sp. gesamter Filter	KBE <i>Legionella</i> sp. manuell gezählt pro gesamter Filter
Probe 1	1	3	1	1,7	1
Probe 2	10	30,3	16	26,4	30
Probe 3	267	808,4	473	781,2	790
Probe 4	0	0	0	0	1
Probe 5	1	3	6	9,9	11
Probe 6	31	93,9	43	71	83
Probe 7	31	93,9	61	100,7	96
Probe 8	1	3	1	1,7	1
Probe 9	11	33,3	16	26,4	26
Probe 10	22	66,6	40	66,1	66

G.4 Untersuchung von verschiedenen Farbstoffen zur Maskierung bierspezifischer Autofluoreszenzen

Die folgenden Farbstoffe (B.10.1) wurden generell auf Ihre Eignung zur Maskierung der störenden Partikel überprüft (C.2.3, Seite 75). Dazu wurde Bier, welches die Partikel aufwies, hybridisiert (C.2.2, Seite 72) und im Anschluss mit den aufgeführten Farbstoffen gegengefärbt (siehe Tabelle G.4).

Tabelle G.4: Untersuchung von verschiedenen Farbstoffen zur Maskierung bierspezifischer Autofluoreszenzen

Farbstoff/ Färbelösung	Verwendete Konzentration	Lösungsmittel	Färbung der Partikel im Bier	Einfluss auf die FISH-Analyse
Giemsa Stammlösung	als gebrauchsfertige Stammlösung eingesetzt	-	-	kein Einfluss
Hämatoxylinlösung	als gebrauchsfertige Lösung eingesetzt	-	+	kein Einfluss
Alcianblau	1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	+	kein Einfluss
Methylenblau	0,1 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	-	kein Einfluss
Eosin Methylenblau	0,1 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	-	kein Einfluss
Chlorazol-Schwarz	0,5 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	++	kein Einfluss
Lactophenolblau	als gebrauchsfertige Lösung eingesetzt	-	-	kein Einfluss
Nuclear Fast Red	0,05 % und 0,1 %	H ₂ O _{bdest.}	-	kein Einfluss
Fluorescent Brightener 28	0,05 % und 0,1 %	1 x PBS Puffer	+	starke Autofluoreszenz
Bromphenolblau	0,05 % und 0,1 %	1 x PBS Puffer	-	kein Einfluss
Xylencyanol	0,05 % und 0,1 %	1 x PBS Puffer	-	kein Einfluss
Indigo carmine	0,1 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	+	kein Einfluss
Resazurin	0,1 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	-	kein Einfluss
Acid Black	0,1 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	+	kein Einfluss
Acid Violet	0,1 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	++	kein Einfluss
Evan's Blue	0,1 %, 0,5 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	+++	kein Einfluss
Calcofluor White M2R	0,1 % und 1,0 %	H ₂ O _{bdest.}	-	kein Einfluss
Preußisch-Blau	0,1 % und 1,0 %	1 x PBS Puffer	+	kein Einfluss
Brillantblau	0,1 % und 1,0 %	1 x PBS Puffer	+	kein Einfluss

Legende: - = keine Gegenfärbung der Partikel, + = schwache Gegenfärbung der Partikel, ++ = gute Gegenfärbung der Partikel, +++ = vollständige Gegenfärbung der Partikel

G.5 Spezifitätsprüfung der Sonde Pela761

Ergebnis der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach Protokoll C.2.2 (Seite 71) mit der Sonde Pela761-FAM (200 ng/μl) bei 35% FA auf einer Auswahl von Zielorganismen (ZO) und Nichtzielorganismen (NZO).

Tabelle G.5: Spezifitätsprüfung der Sonde Pela761 bei einer Konzentration von 200 ng/μl

Organismus	Stammbezeichnung		FISH-Signal Sonde Pela761
<i>Lactobacillus brevis</i>	WSB	L32	+
<i>Lactobacillus brevisimilis</i>	WSB	L43	+
<i>Lactobacillus buchneri</i>	TMW	1.75	+
<i>Lactobacillus casei</i>	TMW	1.14	+
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>coryniformis</i>	DSM	20001 ^T	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	TMW	1187	+
<i>Lactobacillus frigidus</i>	TMW	1119	+
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	TMW	1.59	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DSM	20075 ^T	+
<i>Lactobacillus lindneri</i>	WSB	L2	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	DSM	20006	+
<i>Lactobacillus perolens</i>	TMW	1223	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	TMW	1.64	+
<i>Lactobacillus spec.</i>	WSB	00369/1	+
<i>Pediococcus damnosus</i>	WSB	SaE	+
<i>Pediococcus inopinatus</i>	WSB	P99	+
<i>Lactococcus lactis</i> *	DSM	20481 ^T	-
<i>Acetobacter aceti</i> *	DSM	3508 ^T	-
<i>Bacillus cereus</i> *	DSM	31 ^T	-
<i>Bacillus subtilis</i> *	DSM	7 ^T	-
<i>Citrobacter freundii</i> *	DSM	30039	-
<i>Enterococcus faecium</i> *	DSM	20477 ^T	-
<i>Gluconobacter oxydans</i> *	DSM	3503 ^T	-
<i>Leuconostoc gelidum</i> *	DSM	5578 ^T	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	TMW	2.3	-
<i>Megasphaera cerevisiae</i> *	DSM	20462 ^T	-
<i>Megasphaera elsdenii</i> *	DSM	20460 ^T	-
<i>Micrococcus luteus</i> *	WSB	MK14-1	-
<i>Pantoea agglomerans</i> *	DSM	3493	-
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> *	DSM	20467 ^T	-
<i>Pectinatus frisingensis</i> *	DSM	6306 ^T	-
<i>Selenomonas lacticifex</i> *	DSM	20757 ^T	-
<i>Weissella confusa</i> *	DSM	20194 ^T	-
<i>Zymophilus raffinovorans</i> *	DSM	20765 ^T	-

Legende: + = spezifisches FISH-Sondensignal, - = kein FISH-Sondensignal vorhanden, * = NZOs für Sonde Pela761

G.6 Software Parameter zur automatischen Auswertung von Bierproben mittels ChemScan RDI Laserscanner

Nachfolgende Parameter wurde in der Software „ChemScan“ (B.9.2.2) zur automatischen Auswertung von Bierproben nach FISH-Analyse (C.2.2, Seite 71) mittels ChemScan RDI Laserscanner optimiert.

Tabelle G.6: Übersicht Parameter zur automatischen Diskriminierung der FISH-Sondensignale von Partikeln

Parameter	Wert
NewDiscrim	0
MinAreaRatio	0.2
MaxAreaRatio	0.8
MinTPAreaRatio	0
MaxTPAreaRatio	0.9
MinXDimSingle	500
MinXDim	1
MaxXDim	10
MinYDim	1
MaxYDim	6
MinPeak	150
MaxPeak	800
MaxPeaksPerLine	2
MaxWigglesPerLine	6
MaxHalfWidth	15
MinSampleSpecInt	6
MinHalfWidthSpecInt	20
Max2DGaussian	1000
MaxPeak2DGaussian	4000

G.7 Vergleichende Analyse von Bierproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 60 Bierproben aus dem laufenden Betrieb verschiedener deutscher Brauereien untersucht. Dabei wurden jeweils 100 ml Bier-Probe direkt mittels FISH-Analyse (C.2.2 und C.2.3) und ChemChrome V6 Vitalitätsfärbung (B.9.2.4) sowie nach NBB-Anreicherung (B.3.5) untersucht. Tabelle G.7 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle G.7: Übersicht Ergebnisse vergleichende Analyse von Bierproben

Nr.	Biersorte	Ergebnis FISH-Analyse	Ergebnis ChemChrome V6 Vitalitätsfärbung	Ergebnis NBB-Anreicherung
1	Helles Bier	positiv	positiv	positiv
2	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
3	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
4	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
5	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
6	Pilsner Bier	negativ	positiv	negativ
7	Pilsner Bier	negativ	positiv	negativ
8	Festbier	negativ	positiv	negativ
9	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
10	Helles Bier	positiv	positiv	positiv
11	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
12	Exportbier	negativ	negativ	negativ
13	Exportbier	negativ	positiv	negativ
14	Exportbier	negativ	positiv	negativ

G. Anhang

Fortsetzung **Tabelle G.7**

Nr.	Biersorte	Ergebnis FISH-Analyse	Ergebnis ChemChrome V6 Vitalitätsfärbung	Ergebnis NBB-Anreicherung
15	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
16	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
17	Dunkles Bier	negativ	negativ	negativ
18	Festbier	negativ	negativ	negativ
19	Dunkles Bier	positiv	positiv	positiv
20	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
21	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
22	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
23	Pilsner Bier	negativ	negativ	negativ
24	Pilsner Bier	negativ	negativ	negativ
25	Pilsner Bier	negativ	positiv	negativ
26	Pilsner Bier	negativ	positiv	negativ
27	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
28	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
29	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
30	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
31	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
32	Helles Bier	positiv	positiv	positiv
33	Radler	negativ	positiv	negativ
34	Helles Bier	positiv	positiv	positiv
35	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
36	Dunkles Bier	positiv	positiv	negativ
37	Pilsner Bier	positiv	positiv	negativ
38	Pilsner Bier	positiv	positiv	positiv
39	Pilsner Bier	negativ	negativ	negativ
40	Pilsner Bier	negativ	positiv	negativ
41	Exportbier	negativ	negativ	negativ
42	Exportbier	positiv	positiv	positiv
43	Exportbier	negativ	negativ	negativ
44	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
45	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
46	Radler	positiv	positiv	positiv
47	Radler	positiv	positiv	positiv
48	Exportbier	negativ	positiv	negativ
49	Dunkles Bier	negativ	negativ	negativ
50	Dunkles Bier	negativ	positiv	negativ
51	Pilsner Bier	negativ	negativ	negativ
52	Pilsner Bier	positiv	positiv	positiv
53	Pilsner Bier	negativ	negativ	negativ
54	Pilsner Bier	negativ	positiv	negativ
55	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
56	Helles Bier	negativ	negativ	negativ
57	Helles Bier	negativ	positiv	negativ
58	Helles Bier	positiv	positiv	positiv
59	Helles Bier	positiv	positiv	negativ
60	Helles Bier	negativ	positiv	negativ

Legende: **positiv** = positiver Befund für bierschädliche Bakterien, negativ = kein Befund

G.8 *In silico* Überprüfung der Spezifität der Sonde Esak997

Tabelle G.8: ARB-Sondenmatch der Sonde Esak997

name	fullname	Miss- matches	E. coli position	'CCAGAGAAUCCUGCAGAGAU'
JviDub1	Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis	0	997	UCUUGACAU-----GCGGGAGUG
JviDub2	Cronobacter dublinensis subsp. lactaridi	0	997	UCUUGACAU-----GCGGGAGUG
JviDub4	Cronobacter dublinensis subsp. lausannensis	0	997	UCUUGACAU-----GCGGGAGUG
EnbSak23	Enterobacter sakazakii	0	997	UCUUGACAU-----GCGGGAGUG
JviDub3	Cronobacter dublinensis	0	997	UCUUGACAU-----GCGGGAGUG
JviMuyt2	Cronobacter muytjensii	0	997	UCUUGACAU-----GCGGGAGUG
JviTuri3	Cronobacter turicensis	0	997	UCUUGACAU-----GCGGGAGUG
ErwChr19	Erwinia chrysanthemi	1	997	UCUUGACAU-----g-----GCGGGUGUG
EdwTard5	Edwardsiella tarda	2	997	UCUUGACAU-----C-----u-----ACGGGAGUG
EdwIct12	Edwardsiella ictaluri	2	997	UCUUGACAU-----C-----u-----ACGGGAGUG
ErwCaro5	Erwinia carotovora subsp. atroseptica	3	997	UCUUGACAU-----uuu-----GCCUUAGUG
Pn0Ag145	Pantoea agglomerans	3	997	UCUUGACAU-----C-----u-----GCCUUAGUG
HafAlv11	Hafnia alvei	3	997	UCUUGACAU-----uuA-----GCUUUGUG
KluInte3	Kluyvera intermedia	3	997	UCUUGACAU-----uuA-----GCUUUGUG
KlbOxy55	Klebsiella oxytoca	3	997	UCUUGACAU-----uuA-----GCUUUGUG
BreRubri	Brenneria rubrifaciens	3	997	UCUUGACAU-----ga=U-----GGGUUGUG
FruPowd7	Enterobacter helveticus	3	997	CCUUGACAU-----Cuu=N-----GCUUUGUG
FruPowd6	Enterobacter turicensis	3	997	CCUUGACAU-----Cg=====GCCUUAGUG
KluAsc12	Kluyvera ascorbata	3	997	UCUUGACAU-----N=====GCUUUGUG
SeaMar82	Serratia marcescens subsp. marcescens	3	997	UCUUGACAU-----CuuN=====GCUUUGUG
EnbAmn16	Enterobacter amnigenus	4	997	UCUUGACAU-----g=====uuA-----GCUUUGUG
Ci7Fre26	Citrobacter freundii	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbAer21	Enterobacter aerogenes	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbAmn15	Enterobacter amnigenus	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbAsb15	Enterobacter asburiae	4	997	UCUUGACAU-----Cuu=C=====GCUUUGUG
EnbCanc8	Enterobacter cancerogenus	4	997	UCUUGACAU-----Cuu=C=====GCUUUGUG
EnbCl112	Enterobacter cloacae subsp. cloacae	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbGergo	Enterobacter gergoviae	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
FruPowd2	Enterobacter helveticus	4	997	CCUUGACAU-----Cuu=C=====GGUUGUG
EnbHor10	Enterobacter hormaechei	4	997	UCUUGACAU-----Cuu=C=====GCUUUGUG
EnbLudw5	Enterobacter ludwigii	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbNicke	Enterobacter nickellidurans	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbNimip	Enterobacter nimipressuralis	4	997	UCUUGACAU-----C=====uuN=====GCUUUGUG
EnbPulve	Enterobacter pulveris	4	997	CCUUGACAU-----Cuu=C=====GCUUUGUG
EnbPyri4	Enterobacter pyrinus	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbRadic	Enterobacter radicincitans	4	997	UCUUGACAU-----C=====C=ug=====GCCGGGUG
FruPowd3	Enterobacter turicensis	4	997	CCUUGACAU-----Cg=====uuN=====GCCUUAGUG
EschC379	Escherichia coli	4	997	UCUUGACAU-----C=====C=u=====ACGAGGGUG
KlbOxy21	Klebsiella oxytoca	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
KluAsco8	Kluyvera ascorbata	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
KluCryo2	Kluyvera cryocrescens	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
KluCryo6	Kluyvera cryocrescens	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
KluCryo5	Kluyvera cryocrescens	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
KluGeor2	Kluyvera georgiana	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
KluInter	Kluyvera intermedia	4	997	UCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
VibVul17	Vibrio vulnificus	4	997	UCUUGACAU-----Cuu=C=====GCUUUGUG
PbiCypr4	Pectobacterium cypripedii	4	997	CCUUGACAU-----CuuA=====GCUUUGUG
EnbClo80	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens	5	997	UCUUGACAU-----C=====CuuA=====GCUUUGUG
EnbCowan	Enterobacter cowanii	5	997	UCUUGACAU-----C=====Cuu=C=====GGANNNGUG
KlbPn113	Klebsiella pneumoniae	5	997	UCUUGACAU-----C=====CuuA=====GGUUGUG
SeaLiqu6	Serratia liquefaciens	5	997	UCUUGACAU-----C=====Cuu=C=====GCUUUGUG
EnbKobei	Enterobacter kobei	6	997	UCUUGACAU-----Cg=====Cuu=C=====GCCUUUGUG
PsmAe442	Pseudomonas aeruginosa	6	997	CCUUGACAU-G=U=====Cuu=C=====GCUUUGUG

Legende: Gelb-markierte Nichtzielorganismen zeigten je nach gewählten Quick-FISH-Reaktionsbedingungen zum Teil erhöhte Fluoreszenzintensitäten (RFU).

Die Basenunterschiede von *Er. chrysanthemii* (DSM 4610), *En. helveticus* (UZH 513/05), *En. pulveris* (UZH 601/105), *En. turicensis* (UZH 3032), *En. cloacae* (UZH 30054) wurden zusätzlich über eine 16S-rDNS-Sequenzanalyse (B.6 und B.7) bestätigt (Daten nicht gezeigt).

G.9 Überprüfung der Quencheffizienz

Die Sonden EUB338-TAMRA und Esak977-3-TAMRA wurden in der Endkonzentrationen 5 ng/µl jeweils mit den korrespondierenden Quencher-sonden Quen-EUB338-BHQ2 und Quen3-Esak997-3-BHQ2 in den Endkonzentrationen 5 ng/µl, 7,5 ng/µl, 10 ng/µl, 12,5 ng/µl sowie 15 ng/µl in den Puffern HP 0% und modifiziertem PCR-Puffer kombiniert (C.3.3.3, Seite 86). Nachfolgende Tabelle H.9 fasst die am Mikrotiterplatten-Fluorometer bestimmten Fluoreszenzintensitäten (RFU) zusammen.

Tabelle G.9: Quencheffizienz der Sonden/ Quencher-sonden Paare EUB338-TAMRA/ Quen-EUB338-BHQ2 und Esak977-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2

Endkonzentration der korrespondierenden Quencher-sonde:	0 ng/µl	2,5 ng/µl	5 ng/µl	7,5 ng/µl	10 ng/µl	12,5 ng/µl	15 ng/µl
Puffer: HP 0%							
Sonde: EUB-338-TAMRA [5 ng/µl]	35721 RFU	13762 RFU	1052 RFU	863 RFU	538 RFU	489 RFU	421 RFU
Puffer: mod. 1-fach PCR-Puffer							
Sonde: EUB-338-TAMRA [5 ng/µl]	28120 RFU	12987 RFU	982 RFU	796 RFU	482 RFU	439 RFU	351 RFU
Puffer: HP 0%							
Sonde: Esak997-3-TAMRA [5 ng/µl]	71567 RFU	36943 RFU	1362 RFU	912 RFU	615 RFU	602 RFU	583 RFU
Puffer: mod. 1-fach PCR-Puffer							
Sonde: Esak-997-TAMRA [5 ng/µl]	53481 RFU	23764 RFU	1186 RFU	925 RFU	887 RFU	817 RFU	761 RFU

Legende: RFU = Fluoreszenzintensität

G.10 Überprüfung des Einflusses von Hybridisierungstemperatur und Salzgehalt auf die Spezifität der Quick-FISH-Reaktion

Zur Untersuchung des Einflusses der Hybridisierungstemperatur wurden alle Versuchsansätze parallel bei 30 °C, 45 °C, 60 °C und 70 °C inkubiert.

Der Salzgehalt des modifizierten PCR-Puffers wurde über eine variable Na⁺-Konzentration (0 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 600 mM und 800 mM) beeinflusst. Als Zielorganismus wurde eine EtOH-Fixierung (B.8.1) von *C. sakazakii* LMG 2760 verwendet. Zur Verifizierung der Spezifität der Reaktion wurden Fixierungen von *Ci. freundii* DSM 30039, *En. cloacae* DSM 30054, *Er. chrysanthemii* DSM 4610 und *Ed. tarda* DSM 30052 als Nichtzielorganismen eingesetzt (C.3.4, Seite 99).

Die Hybridisierung erfolgte mit dem Sonden/ Quencher-sonden-Paar Esak997-3-TAMRA/ Quen3-Esak997-3-BHQ2 unter den standardisierten Versuchs- und Messbedingungen (C.3.3). Nachfolgenden Tabellen G.10.1 bis G.10.4 fassen die am Mikrotiterplatten-Fluorometer bestimmten Fluoreszenzintensitäten (RFU) zusammen.

Tabelle G.10.1: Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 30 °C

Messpunkt: 0 h

	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
0 mM NaCl	1359	1519	1399	1302	1503	7821
50 mM NaCl	686	636	634	634	695	623
100 mM NaCl	531	536	540	547	595	516
200 mM NaCl	466	483	480	497	484	456
400 mM NaCl	416	421	417	433	409	398
600 mM NaCl	394	410	392	404	398	376
800 mM NaCl	368	380	379	375	377	359

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:

G. Anhang

Messpunkt: 0,5 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	6127	1379	1278	1295	2064	2998
50 mM NaCl	5624	791	680	946	1179	660	
100 mM NaCl	2530	600	567	749	1084	525	
200 mM NaCl	564	503	496	775	624	457	
400 mM NaCl	410	431	412	704	416	405	
600 mM NaCl	391	393	383	443	388	393	
800 mM NaCl	364	376	368	370	363	365	

Messpunkt: 1 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	10881	1440	1266	1336	3156	2749
50 mM NaCl	10071	889	707	1129	1483	654	
100 mM NaCl	4387	652	579	927	1362	530	
200 mM NaCl	635	525	491	1011	706	464	
400 mM NaCl	422	434	428	882	415	405	
600 mM NaCl	390	395	392	452	389	394	
800 mM NaCl	365	365	372	370	369	379	

Messpunkt: 1,5 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	16235	1530	1296	1398	5911	2714
50 mM NaCl	15228	984	731	1358	1838	663	
100 mM NaCl	6282	694	606	1079	1676	529	
200 mM NaCl	689	551	524	1276	794	471	
400 mM NaCl	438	445	431	1078	417	410	
600 mM NaCl	385	403	388	482	383	409	
800 mM NaCl	362	368	372	364	371	380	

Messpunkt: 2 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	21511	1635	1312	1481	10827	2671
50 mM NaCl	20123	1078	755	1588	2168	667	
100 mM NaCl	7934	794	624	1229	1971	537	
200 mM NaCl	746	590	537	1558	874	464	
400 mM NaCl	439	471	443	1265	423	414	
600 mM NaCl	390	396	387	506	390	412	
800 mM NaCl	362	372	363	377	356	388	

Messpunkt: 3 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	32575	1873	1346	1561	26653	2546
50 mM NaCl	29785	1310	842	2061	2879	682	
100 mM NaCl	10943	1709	688	1522	2509	566	
200 mM NaCl	846	728	610	2123	1024	494	
400 mM NaCl	460	500	464	1610	445	438	
600 mM NaCl	395	409	400	559	390	427	
800 mM NaCl	367	364	371	385	363	431	

G. Anhang

Messpunkt: 4 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	42971	2211	1424	1665	44556
50 mM NaCl	38158	1672	914	2622	3616	690
100 mM NaCl	13440	6999	752	1889	3025	588
200 mM NaCl	948	1135	725	2700	1143	516
400 mM NaCl	489	545	507	1989	452	462
600 mM NaCl	406	422	396	597	388	444
800 mM NaCl	367	364	371	385	363	431

Tabelle G.10.2: Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 45 °C

Messpunkt: 0 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	1219	1230	1296	1214	1387
50 mM NaCl	745	641	632	631	708	629
100 mM NaCl	561	533	537	547	617	532
200 mM NaCl	485	487	479	495	487	460
400 mM NaCl	414	418	420	427	416	398
600 mM NaCl	391	398	387	402	397	380
800 mM NaCl	376	378	388	379	381	362

Messpunkt: 0,5 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	13413	2692	2811	3118	12157
50 mM NaCl	9366	1580	1215	1850	1668	967
100 mM NaCl	413	2279	930	1173	1177	670
200 mM NaCl	734	707	664	980	661	489
400 mM NaCl	468	476	462	878	436	400
600 mM NaCl	400	407	397	473	394	382
800 mM NaCl	379	377	377	383	370	361

Messpunkt: 1 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	27375	2932	3057	3857	34319
50 mM NaCl	18730	4495	1541	2681	2500	979
100 mM NaCl	5953	15118	1440	1583	1442	687
200 mM NaCl	885	1726	1750	1419	748	492
400 mM NaCl	498	553	517	1315	444	394
600 mM NaCl	406	411	404	533	387	378
800 mM NaCl	364	376	375	389	370	357

Messpunkt: 1,5 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	41109	3383	3572	5039	46416
50 mM NaCl	28263	11642	2050	3730	5105	1040
100 mM NaCl	6917	32049	2921	2062	1864	738
200 mM NaCl	1068	5845	5203	1953	883	506
400 mM NaCl	545	653	601	1829	451	403
600 mM NaCl	416	427	419	598	390	380
800 mM NaCl	377	375	386	395	363	354

G. Anhang

Messpunkt: 2 h

		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	0 mM NaCl	49067	3347	3446	5702	50033	17940
	50 mM NaCl	36501	21297	2525	4739	9884	1002
	100 mM NaCl	7902	43140	6138	2491	2403	710
	200 mM NaCl	1213	11865	9232	2552	989	489
	400 mM NaCl	570	738	690	2356	452	399
	600 mM NaCl	413	440	422	666	384	374
	800 mM NaCl	373	377	378	404	361	355

Messpunkt: 3 h

		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	0 mM NaCl	50051	3866	3808	8172	51233	21758
	50 mM NaCl	47479	41736	4189	7160	34245	1010
	100 mM NaCl	10599	48432	19188	3479	4828	743
	200 mM NaCl	1572	21499	15811	4106	1346	493
	400 mM NaCl	641	962	880	3554	468	408
	600 mM NaCl	434	466	439	799	393	368
	800 mM NaCl	372	387	384	429	366	346

Messpunkt: 4 h

		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	0 mM NaCl	48785	4417	3881	10913	52036	20455
	50 mM NaCl	51705	49938	7394	10113	49096	968
	100 mM NaCl	14257	49531	34955	4625	10496	741
	200 mM NaCl	1981	28319	21518	6222	1800	480
	400 mM NaCl	706	1204	1106	4965	496	396
	600 mM NaCl	440	502	458	941	391	369
	800 mM NaCl	369	385	382	439	359	348

Tabelle H.10.3: Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C

Messpunkt: 0 h

		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	0 mM NaCl	1272	1198	1285	1161	1394	6531
	50 mM NaCl	751	634	617	634	712	608
	100 mM NaCl	561	534	523	533	641	520
	200 mM NaCl	472	473	467	498	495	463
	400 mM NaCl	420	419	418	445	407	390
	600 mM NaCl	397	395	396	396	401	387
	800 mM NaCl	385	377	374	374	372	347

Messpunkt: 0,5 h

		C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	0 mM NaCl	18317	6705	8004	9231	22269	39692
	50 mM NaCl	8038	3299	2548	3031	5562	1943
	100 mM NaCl	3340	3023	1978	1588	2241	1011
	200 mM NaCl	993	1132	1065	1126	1114	663
	400 mM NaCl	586	577	568	1167	535	472
	600 mM NaCl	466	469	472	603	481	430
	800 mM NaCl	417	425	424	435	415	380

G. Anhang

Messpunkt: 1 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	30488	15952	21192	24694	37054
50 mM NaCl	11595	4839	4597	5642	23710	3710
100 mM NaCl	4915	3827	3233	2803	5441	1707
200 mM NaCl	1553	1684	1855	1820	1949	868
400 mM NaCl	772	772	765	2256	695	606
600 mM NaCl	593	588	594	907	575	524
800 mM NaCl	507	511	515	546	502	461

Messpunkt: 1,5 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	28095	11945	16511	21834	40843
50 mM NaCl	14608	4429	4120	6380	40814	2824
100 mM NaCl	6017	3710	3153	3221	12116	1522
200 mM NaCl	1858	1721	1963	2268	257	785
400 mM NaCl	757	772	766	3284	692	596
600 mM NaCl	577	579	569	1036	550	481
800 mM NaCl	482	494	504	556	485	451

Messpunkt: 2 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	29490	12640	16219	22555	41348
50 mM NaCl	16677	4225	3825	7266	41660	2648
100 mM NaCl	6922	3700	3132	3714	19928	1464
200 mM NaCl	2115	1703	2025	2718	3054	738
400 mM NaCl	754	775	764	4162	674	563
600 mM NaCl	550	537	544	1104	523	463
800 mM NaCl	478	480	488	554	456	423

Messpunkt: 3 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	33089	19791	23097	31888	39511
50 mM NaCl	20656	5102	4753	10797	40135	3169
100 mM NaCl	9150	4272	3734	5581	32110	2214
200 mM NaCl	2841	1999	2345	4035	4793	823
400 mM NaCl	862	919	909	6365	835	669
600 mM NaCl	658	648	646	1471	600	503
800 mM NaCl	515	554	558	663	532	496

Messpunkt: 4 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	31052	17588	20558	31618	19603
50 mM NaCl	21882	4802	4398	13760	40520	2458
100 mM NaCl	9836	4184	3619	6797	35738	2147
200 mM NaCl	2912	1965	2323	5224	6030	765
400 mM NaCl	839	908	916	7717	870	662
600 mM NaCl	657	657	644	1622	587	477
800 mM NaCl	495	533	555	687	523	476

G. Anhang

Tabelle G.10.4: Erhaltene Fluoreszenzintensitäten (RFU) bei einer Hybridisierungstemperatur von 70 °C

Messpunkt: 0 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	1295	1287	1260	1161	1369
50 mM NaCl	807	655	635	657	731	649
100 mM NaCl	557	545	544	553	653	514
200 mM NaCl	482	481	490	508	504	475
400 mM NaCl	424	445	431	454	414	400
600 mM NaCl	397	405	400	403	406	398
800 mM NaCl	373	395	380	387	382	375

Messpunkt: 0,5 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	28757	29495	29767	29542	29509
50 mM NaCl	28308	2826	28714	28728	28699	28839
100 mM NaCl	24225	24963	24321	23762	23448	22273
200 mM NaCl	8763	8975	8828	8725	7647	4466
400 mM NaCl	2852	3054	3287	3632	3373	2901
600 mM NaCl	2359	2400	2403	2725	2560	2005
800 mM NaCl	2014	2272	2312	2180	1872	1829

Messpunkt: 1 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	30941	31301	31128	31090	30847
50 mM NaCl	17578	20200	20569	1871	15720	10106
100 mM NaCl	8018	7784	6657	6236	6603	7365
200 mM NaCl	3582	3958	3779	3588	3224	2184
400 mM NaCl	1728	1778	1828	2150	1966	1927
600 mM NaCl	1653	1714	1704	1736	1545	1179
800 mM NaCl	1243	1338	1239	1207	1237	1150

Messpunkt: 1,5 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	30786	31404	31249	3098	29519
50 mM NaCl	4571	3556	3375	3881	4332	2993
100 mM NaCl	8540	8489	6972	5732	4887	3865
200 mM NaCl	2052	2050	1897	1982	2039	1300
400 mM NaCl	1711	1847	1782	1903	1523	1291
600 mM NaCl	1009	1001	1000	1069	1012	845
800 mM NaCl	1054	1134	1097	1048	320	791

Messpunkt: 2 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	2281	17409	13530	10921	8263
50 mM NaCl	2562	1568	1296	1649	2041	880
100 mM NaCl	3181	2881	2592	2537	2762	2180
200 mM NaCl	1204	1196	1109	1184	1269	805
400 mM NaCl	938	960	932	1161	901	838
600 mM NaCl	734	727	733	783	731	643
800 mM NaCl	745	661	655	733	701	646

G. Anhang

Messpunkt: 3 h

NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	5611	5487	4273	2941	2383
50 mM NaCl	1317	606	466	625	827	8449
100 mM NaCl	1536	1538	1362	1290	1482	913
200 mM NaCl	636	702	630	680	765	360
400 mM NaCl	508	575	559	760	558	508
600 mM NaCl	402	415	398	451	411	448
800 mM NaCl	457	449	429	425	399	362

Messpunkt: 4 h

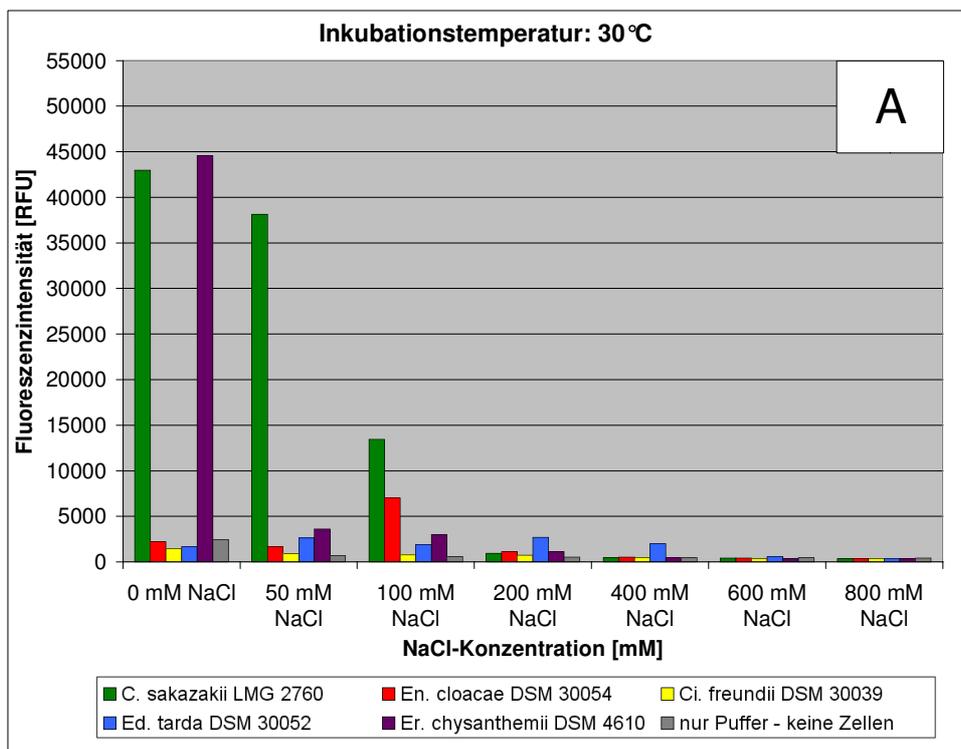
NaCl-Konzentration im modifizierten PCR-Puffer:	C. sakazakii LMG 2760	En. cloacae DSM 30054	Ci. freundii DSM 30039	Ed. tarda DSM 30052	Er. chysanthemii DSM 4610	nur Puffer
	0 mM NaCl	7654	9881	10772	5825	8362
50 mM NaCl	10422	13655	15688	10817	14198	11668
100 mM NaCl	527	580	509	453	554	5639
200 mM NaCl	8261	10796	15635	9986	8082	16793
400 mM NaCl	7120	377	367	514	379	10061
600 mM NaCl	7695	11143	18227	11399	8261	19549
800 mM NaCl	8421	23158	17786	15762	13772	13620

G.11 Vergrößerte Darstellung der Abbildungen C.19 A, B, C und D

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quenchersonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) bei 30°C (Abb. C.19, A), 45°C (Abb. C.19, B), 60°C (Abb. C.19, C), 70°C (Abb. C.19, D) in modifiziertem PCR-Puffer mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration.

Abbildung C.19/ Bild A: Effekt der Temperatur und der Salzkonzentration (Messpunkt: 4 h), Seite 99

Hybridisierungstemperatur: 30°C



G. Anhang

Abbildung C.19/ Bild B: Effekt der Temperatur und der Salzkonzentration (Messpunkt: 4 h), Seite 99

Hybridisierungstemperatur: 45 °C

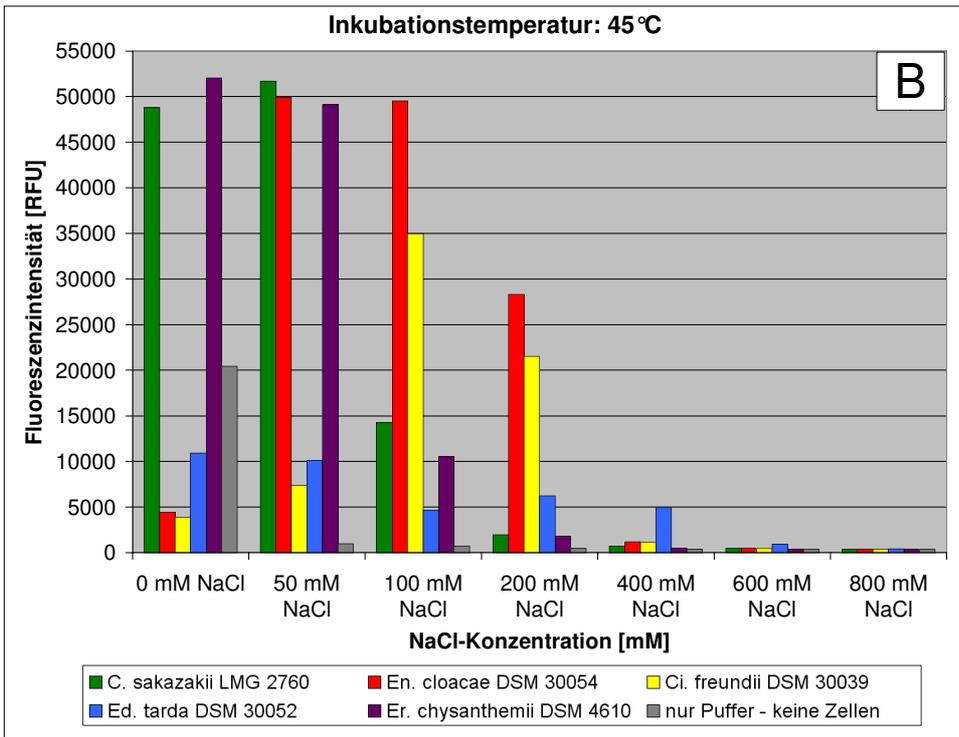
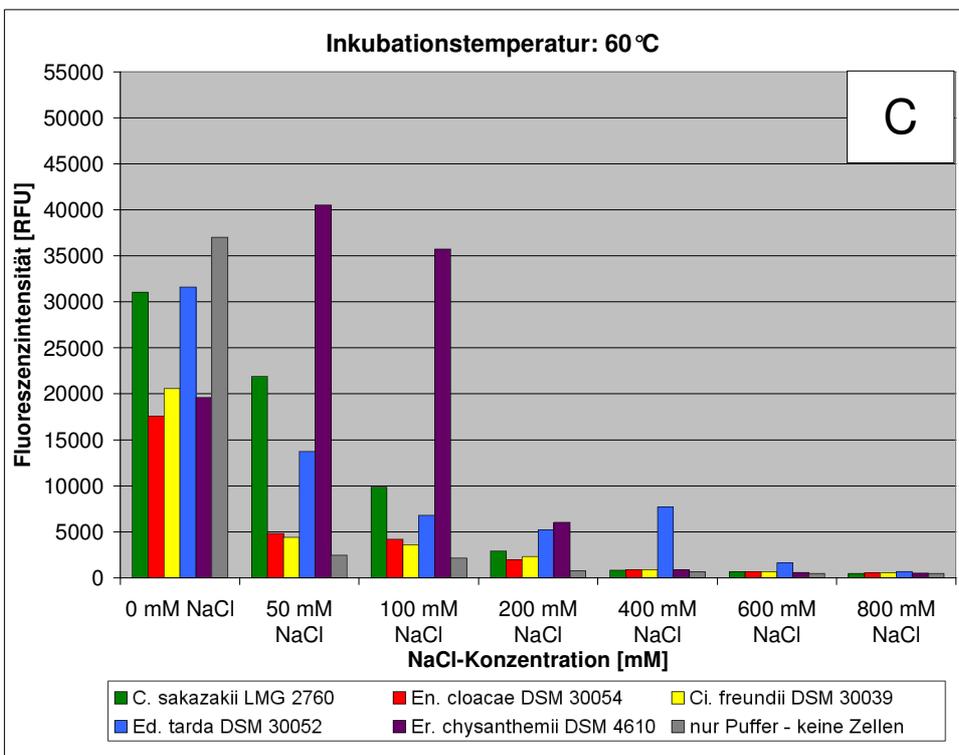


Abbildung C.19/ Bild C: Effekt der Temperatur und der Salzkonzentration (Messpunkt: 4 h), Seite 99

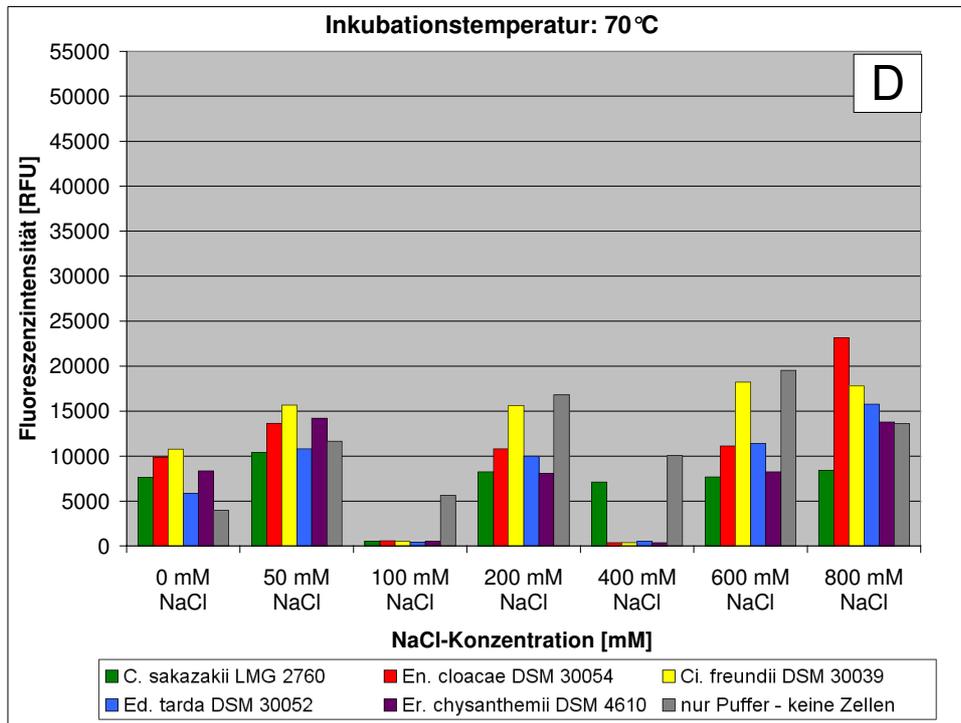
Hybridisierungstemperatur: 60 °C



G. Anhang

Abbildung C.19/ Bild C: Effekt der Temperatur und der Salzkonzentration (Messpunkt: 4 h), Seite 99

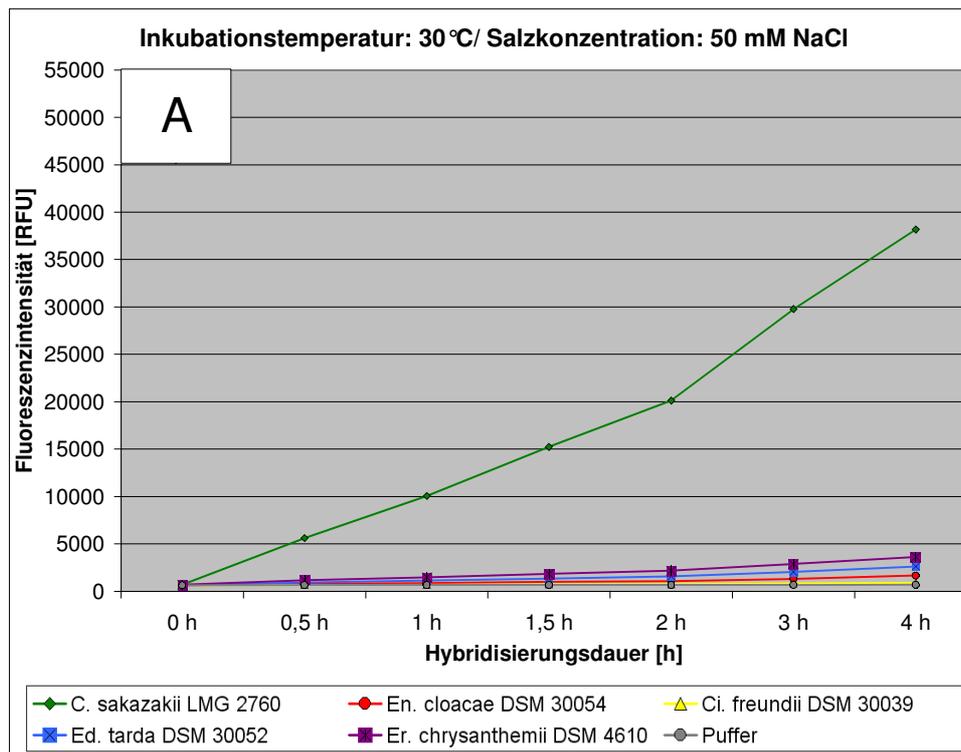
Hybridisierungstemperatur: 70 °C



G.12 Vergrößerte Darstellung der Abbildungen C.20 A und B

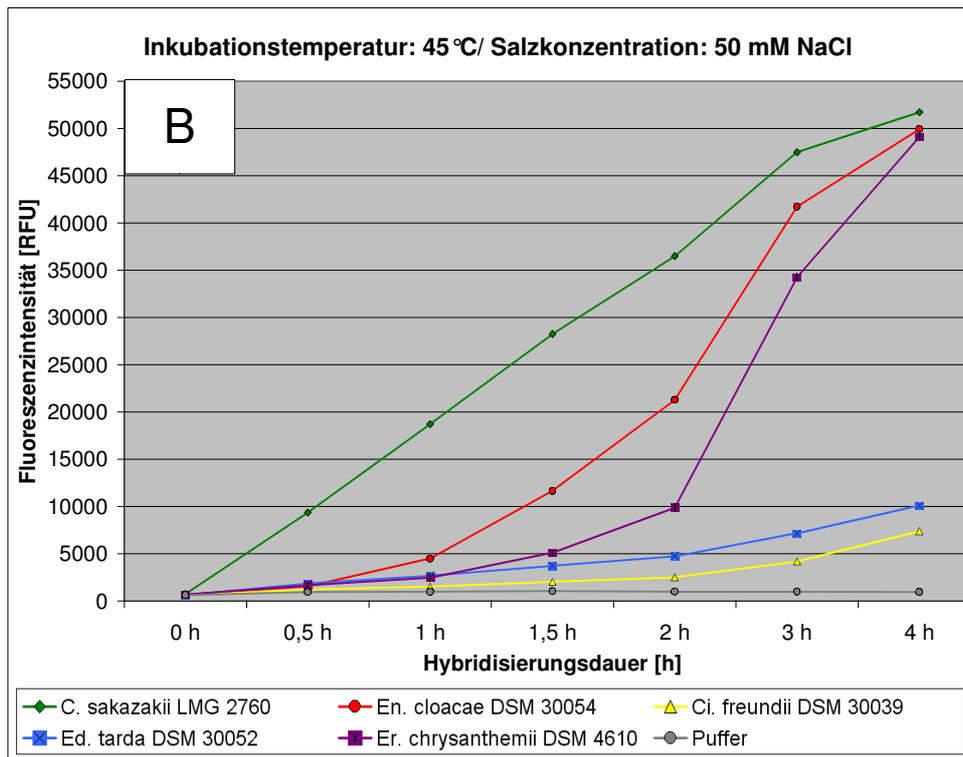
Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quenchersonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) bei 30 °C (Abb. C.20, A) und 45 °C (Abb. C.20, B) in modifiziertem PCR-Puffer (50 mM NaCl).

Abbildung C.20/ Bild A: Reaktionskinetik bei 30 °C sowie einem Salzgehalt von 50 mM NaCl, Seite 100



G. Anhang

Abbildung C.20/ Bild B: Reaktionskinetik bei 45°C sowie einem Salzgehalt von 50 mM NaCl, Seite 100



G.13 Vergrößerte Darstellung der Abbildungen C.21 A und B

Quick-FISH-Hybridisierung mit dem Sonden/ Quenchersonden Paar Esak997-3-TAMRA (5 ng/μl) und Quen3-Esak997-3-BHQ2 (10 ng/μl) sowie dem Kompetitor Esak997C2 (5 ng/μl) bei 45°C in modifiziertem PCR-Puffer (50 mM NaCl). Zeitgleiche (Abb. C.21, A) und um 30 min verzögerte Zugabe des Kompetitors (Abb. C.21, B).

Abbildung C.21/ Bild A: Einfluss von Kompetitoren auf die Spezifität der Hybridisierung in Lösung, Seite 101

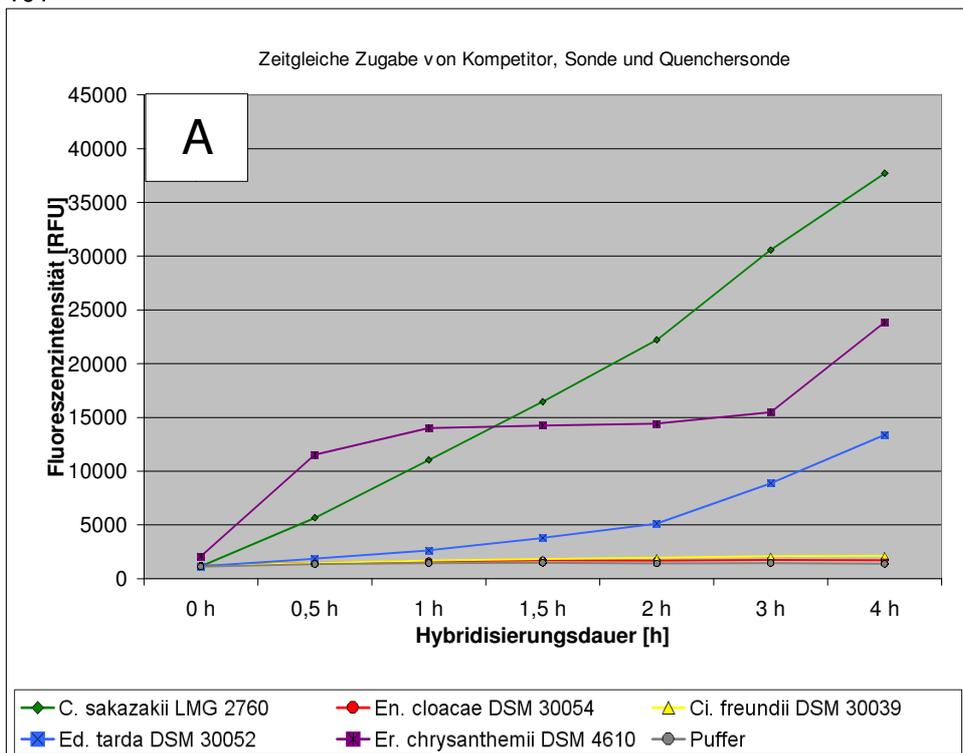
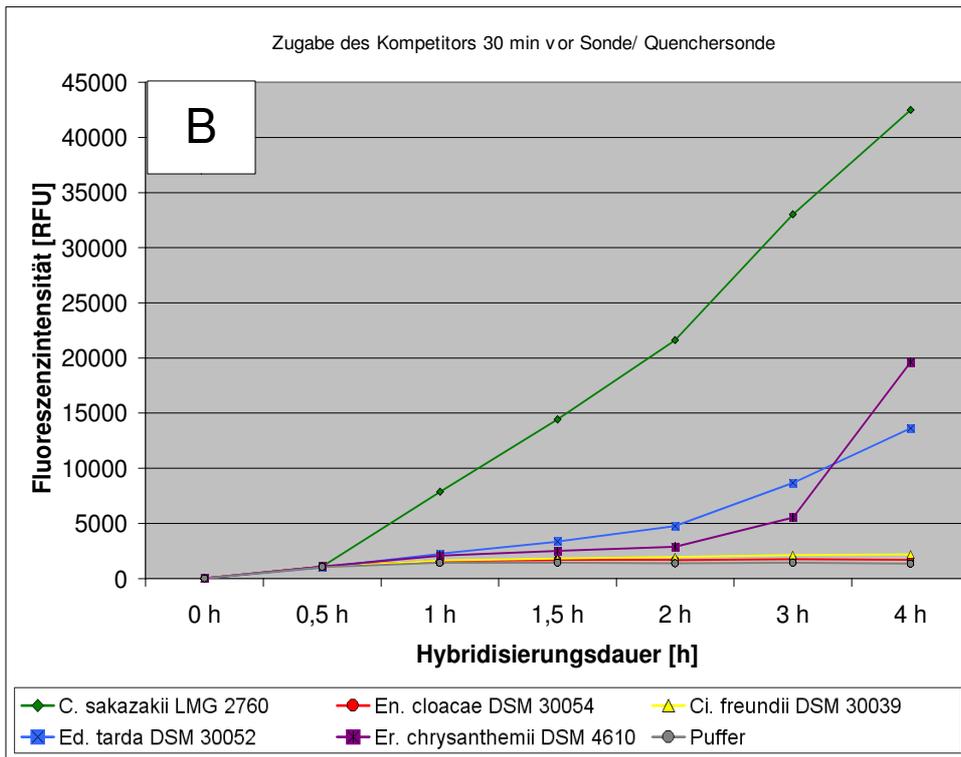


Abbildung C.21/ Bild B: Einfluss von Kompetitoren auf die Spezifität der Hybridisierung in Lösung, Seite 101



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Forschung und Entwicklung der vermicon AG unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer angefertigt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit an seinem Lehrstuhl, für sein Interesse an dieser Arbeit sowie für seine hervorragende Unterstützung und Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Claudia Beimfohr und Herrn Dr. Jiri Snaidr, für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in den Laboren der vermicon AG, für die hervorragende Betreuung, die unerschöpfliche Unterstützung, die inspirierenden Diskussionen sowie für ihre langjährige Freundschaft.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Übernahme des zweiten Gutachten bedanken.

Jacqueline Gruber, Christian Kreuzer und Jan Strauß möchte ich für die hervorragende technische Assistenz und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Dr. Peter Mühlhahn danke ich sehr für die fruchtbaren Diskussionen und Anregungen sowie für seine langjährige und vielseitige Unterstützung.

Bei Dr. Nina Springer möchte ich mich für ihre Unterstützung und ihre Anregungen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der vermicon AG bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

PD Dr. Angelika Lehner danke ich für die Bereitstellung der neuesten *Cronobacter*- und *Enterobacter*-Isolate sowie für den Austausch der neuesten Erkenntnisse bzgl. der *Cronobacter*-Forschung.

Danksagung

Bei Frau Dr. Barbara Pohl bedanke ich mich für die Bereitstellung der strukturellen Informationen zu den verwendeten Fluoreszenz- und Quenchingfarbstoffen.

Bei Frau Edith Benker möchte ich mich für die biologische Weichenstellung und für die sehr weise Worte zum Thema „Frustrationspotential in der wissenschaftlichen Forschung“ bedanken. Nach der Quick-FISH Entwicklung, weiß ich was sie bedeuten.

Meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie mich auch während meiner arbeitsintensiven letzten Monate immer unterstützt haben und mir zur Seite standen.

Sabine Katzorke (geb. Arnsperger) danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Quick-FISH Grafiken sowie für ihre langjährige und felsenfeste Freundschaft.

Christina Tatarczyk danke ich sehr herzlich für das hervorragende Korrektur lesen dieser Arbeit und dafür, dass sie mir in all den Jahren mit ihrer Freundschaft zur Seite gestanden ist und mit mir durch dick und dünn gegangen ist.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Dagmar und Manfred Thelen sowie meinem Bruder Peter, die mich in allen Entscheidungen bestärkt haben und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben. Ich bin meiner Familie zu tiefst verbunden und möchte mich für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt in jeder Lebenslage von ganzem Herzen bedanken.