

Lehrstuhl für Bodenökologie

**UNTERSUCHUNGEN ZUM PLASMIDTRANSFER
ZWISCHEN MIKROORGANISMEN
IM DARM VON AUSGEWÄHLTEN BODENTIEREN**

Andrea Hoffmann

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 (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. rer. nat. Bertold Hock

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. - Prof. Dr. sc. agr., Dr. rer. nat. habil. Jean Charles Munch

2. Univ. - Prof. Dr. rer. nat. habil. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 30.11.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 07.05.2002 angenommen.

VORABVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Publikationen

- THIMM, T., A. HOFFMANN, H. BORKOTT, J.C. MUNCH, AND C.C. TEBBE. 1998. The Gut of the Soil Microarthropod *Folsomia candida* (Collembola) Is a Frequently Changeable but Selective Habitat and a Vector for Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (7): 2660-2669.
- HOFFMANN, A., T. THIMM, M. DRÖGE, E.R.B. MOORE, J.C. MUNCH, AND C.C. TEBBE. 1998. Intergeneric Transfer of Conjugative and Mobilizable Plasmids Harbored by *Escherichia coli* in the Gut of the Soil Microarthropod *Folsomia candida* (Collembola). *Applied and Environmental Microbiology* **64** (7): 2652-2659.
- HOFFMANN, A., T. THIMM, AND C.C. TEBBE. 1999. Fate of plasmid-bearing, luciferase marker-gene tagged bacteria in feeding experiments with the soil microarthropod *Onychiurus fimatus* (Collembola). *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 125-135.
- THIMM, T., A. HOFFMANN, I. FRITZ, C.C. TEBBE. 2001. Contribution of the Earthworm *Lumbricus rubellus* (Annelida, Oligochaeta) to the Establishment of Plasmids in Soil Bacterial Communities. *Microbial Ecology* **41**: 341-351.

Tagungsbeiträge

- HOFFMANN, A., T. THIMM, C. WAHRENBURG, W. SELBITSCHKA, G. JÜTTNER UND C.C. TEBBE. Bacterial conjugation between *Escherichia coli* S17-1 and the gut bacteria of the soil insect *Folsomia candida*. (Vortrag). VAAM-Tagung, Bayreuth, 1996.
- THIMM, T., A. HOFFMANN, E.R.B. MOORE UND C.C. TEBBE. Diversität von Mikroorganismen im Darm des Bodenarthropoden *Folsomia candida*. (Poster). Biologische Vielfalt in Ökosystemen – Konflikt zwischen Nutzung und Erhaltung, Braunschweig, 22. – 24.04.1997.
- HOFFMANN, A., T. THIMM UND C.C. TEBBE. Einfluss des Bodentiers *Folsomia candida* (Collembola) auf die Ausbreitung von Plasmiden. (Poster). Kolloquium zur Ökotoxikologie von Streptomycin unter besonderer Berücksichtigung des Antibiotika-Einsatzes zur Feuerbrandbekämpfung, Dossenheim, 22. – 23.10.1997.
- HOFFMANN, A., T. THIMM, E.R.B. MOORE, J.C. MUNCH AND C.C. TEBBE. Use Of Firefly Luciferase Reporter Gene *luc* To Detect Conjugative Gene Transfer In The Gut Of The Soil Insect *Folsomia candida* (Collembola). (Poster). MAREP International Conference on Marker/Reporter Genes in Microbial Ecology, Stockholm, 14. – 17.06.1997.
- HOFFMANN, A., T. THIMM, E.R.B. MOORE, J.C. MUNCH AND C.C. TEBBE. Conjugative gene transfer in the gut of the soil insect *Folsomia candida* (Collembola). (Poster). VAAM-Tagung, Hamburg, 1997.

INHALTSVERZEICHNIS

VORABVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION	2
INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGEN	6
A. EINLEITUNG	8
1. Einführung	8
2. Stand der Forschung	8
2.1 Transfermechanismen der Plasmide	10
2.2 Entstehung rekombinanter Darmbakterien durch Plasmidtransfer	11
2.3 Bodentiere als "Hot spot" für horizontalen Plasmidtransfer	12
2.4 Verbreitung rekombinanter Plasmide durch Bodentiere	13
3. Zielsetzungen dieser Arbeit	14
B. MATERIAL UND METHODEN	16
1. Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte	16
1.1 Chemikalien, Biochemikalien und weitere spezielle Reagenzien	16
1.2 Verbrauchsmaterial	16
1.3 Geräte	17
2. Boden und Organismen	17
2.1 Boden	17
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	17
2.3 Bodentiere	19
3. Mikrobiologische Methoden	20
3.1 Kulturmedien	20
3.2 Zusätze	21
3.3 Anzucht von Bakterien	22
4. Molekularbiologische Methoden	22
4.1 Isolierung von DNA	22
4.1.1 Präparative Plasmid-Isolierung	22
4.1.2 Präparation von genomischer DNA aus Bakterienzellen	23
4.2 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	24
4.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	24
4.5 Ligation von Vektor und Genkassette	25
4.6 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	25
4.7 Charakterisierung von Darmbakterien aus Bodentieren	26
4.7.1 Biolumineszenz-Nachweis	26
4.7.2 Quantifizierung der Luziferase-Aktivität	27
4.7.3 ARDRA	27
4.7.4 Biolog-Identifizierungssystem	28
4.7.5 DNA-Sequenzierung des 16S rRNA-Gens	29
4.8 Southern-Analyse	31
4.8.1 Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembran	32
4.8.2 Markierung von DNA	32
4.8.3 DNA-DNA-Hybridisierung	34
4.8.4 Detektion mit Antikörpern	34
5. Versuche mit Bodentieren	35
5.1 Prinzip der Modellversuche	35
5.1.1 Futterherstellung	35

5.1.2 Bakterienkreuzungen auf Filtermembranen	35
5.1.3 Fütterungsexperimente	37
5.1.4 Analyse des Kots aus den Modellversuchen	38
5.2 Plasmidtransfer in <i>F. candida</i> (Isotomidae, Collembola).....	38
5.3 Plasmidtransfer in <i>O. fimatus</i> (Onychiuridae, Collembola).....	40
5.4 Plasmidtransfer in <i>L. rubellus</i> (Lumbricidae, Oligochaeta, Annelida).....	42
6. Statistische Analysen.....	42
C. ERGEBNISSE	43
1. Konstruktion biolumineszenter Plasmide.....	43
2. Plasmidtransfer Versuche mit Bodentieren.....	45
2.1 Isolierung von Transkonjuganten aus dem Darm von <i>F. candida</i> (Isotomidae, Collembola).....	45
2.1.1 Transfer von Plasmiden in einer Mischung aus <i>E. coli</i> -Donorstämmen und Kotbakterien aus <i>F. candida</i> auf Nylonfilter	45
2.1.2 Lokalisierung des Plasmidtransferortes durch den Nährbodenzusatz Nalidixinsäure	47
2.1.3 Plasmidtransfer auf im Darm von <i>F. candida</i> lebende Bakterien durch Fütterungsexperimente.....	48
2.1.4 Nachweis von biolumineszenten Transkonjuganten in <i>F. candida</i> -Individuen aus Fütterungsexperimenten.....	51
2.1.5 Plasmidtransferrate in Abhängigkeit der Individuengröße in Fütterungsexperimenten.....	52
2.1.6 Fehlender Plasmidtransfer mit nicht-mobilisierbaren, nicht-konjugativen Klonierungsvektoren.....	53
2.2 Nachweis des Plasmidtransfers Luziferase-markierter Bakterien nach Fütterung an <i>O. fimatus</i> (Onychiuridae, Collembola) und Mischung mit Kotbakterien aus <i>O. fimatus</i> auf Nylonmembranen.....	54
2.2.1 Plasmidtransfer in bakteriellen Kreuzungen aus Luziferase-markierten Donorbakterien und Kotbakterien aus <i>O. fimatus</i> auf Nylonmembranen.....	55
2.2.2 Zeitliche Abhängigkeit der Bildung von Transkonjuganten in Fütterungsexperimenten mit <i>E. coli</i> S17-1/pRP4 <i>luc</i>	56
2.3 Beteiligung von <i>L. rubellus</i> (Oligochaeta, Annelida) an der Aufnahme Luziferase-markierter Plasmide aus <i>E. coli</i> Donorstämmen im Boden	57
2.3.1 Population kultivierbarer Bakterien im Kot	57
2.3.2 Transfer von Plasmiden von <i>E. coli</i> nach Bakterien aus dem Kot von <i>L. rubellus</i> auf Nylonmembranen.....	58
2.3.3 Plasmidtransfer in Boden-Mikrokosmen mit <i>L. rubellus</i>	59
3 Taxonomische Einordnung der isolierten Transkonjuganten und Transformanten	61
3.1 Phylogenetische Diversität der aus Plasmidtransferversuchen isolierten Darmbakterien dreier Bodentiere.....	62
3.2 Taxonomische Einordnung biolumineszenter Isolate durch 16S rDNA-Sequenzierung.....	65
D. Diskussion	68
1. Einfluß von Marker- und Transfergenen der Plasmide auf den horizontalen Plasmidtransfer in Bodentieren	68
2. Wichtige Faktoren zur Entstehung rekombinanter Darmbakterien während der Darmpassage von Plasmid-DNA.....	70
2.1 Aufnahme von rekombinanten Donorzellen.....	70
2.2 Überleben aufgenommener Donorstämme	71
3. Modellsystem Bodentier als Ort horizontalen Plasmidtransfers	73
3.1 Plasmidtransfer im Darm von <i>Folsomia candida</i>	73

3.2	Plasmidtransfer im Darm von <i>Onychiurus fimatus</i>	76
3.3	Plasmidtransfer im Darm von <i>Lumbricus rubellus</i>	77
4.	Abschließende Betrachtungen zur Verbreitung gentechnisch veränderter Mikroorganismen in Bezug auf biologische Sicherheitsforschung.....	80
E.	ZUSAMMENFASSUNG.....	82
	LITERATURVERZEICHNIS	85

ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
ARDRA	amplifizierte ribosomale DNA Restriktionsanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
cfu	Kolonie-formende Einheiten
Cm	Chloramphenicol
d	day/s (Tag/e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
gvO	gentechnisch veränderter Organismus
h	hour/s (Stunde/n)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Km	Kanamycin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
<i>luc</i>	Luziferase-Gen
min	minute/s (Minute/n)
<i>mob</i>	Gen für Mobilisierung
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
o. D.	optische Dichte
ori	origin (Replikationsstart)
PCA	"Plate count agar"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>p_{nptII}</i>	Promotor des Neomycinphosphotransferasegens II
16S-rDNA	16S-ribosomale DNA
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
SD-Medium	Sorbitol-Dextrose-Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA (Laufpuffer für Agarose-Gelelektrophorese)
Tc	Tetracyclinhydrochlorid
<i>tra</i>	transfer-Gen
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
U	Unit (Enzymeinheit)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YTP	Yeast-Trypton-Pepton
z. B.	zum Beispiel

A. EINLEITUNG

1. EINFÜHRUNG

Die Gentechnik hat viele praktische Anwendungsgebiete der Biologie stark verändert. Nachdem Anfang der 70er Jahre erste gentechnische Manipulationen an Bakterien durchgeführt wurden, finden gentechnisch veränderte Bakterien in der Medizin und Lebensmitteltechnik ein breites Einsatzgebiet. In der Landwirtschaft dagegen werden bislang nur natürlich selektierte Hochleistungsstämme genutzt. Die zukünftige Hauptaufgabe gentechnischer Veränderungen für landwirtschaftlich interessante Bakterienstämme könnte die Ertragssteigerung sein, wie z. B. bei manipulierten Rhizobien eine verbesserte symbiotische Stickstofffixierung. Besonders bei Bakterien ist die Freisetzung in die Umwelt aber problematisch, da sie als nicht rückholbar gelten. Daher besteht in der biologischen Sicherheitsforschung momentan ein großes Interesse an den Vorgängen von Genübertragungen, die sich nach dem Entlassen eines gentechnisch veränderten Organismus in ökologischen Systemen anschließen. Plasmidübertragungen sind neben chromosomalem Transfer ein bedeutender Teil dieser Übertragungsprozesse. Beide Arten der Genübertragungen sind Bestandteil des horizontalen Gentransfers, wobei die "Natürlichkeit" dieser Phänomene noch umstritten ist. Auf diesem Gebiet besteht noch Wissensbedarf, der in dieser Arbeit ergänzt werden sollte.

2. STAND DER FORSCHUNG

Heutzutage werden große Mengen rekombinanter Plasmide in *E. coli* Stämmen eingesetzt. In der Fermentation werden dabei tausende Liter mit bis zu $1 \cdot 10^{10}$ Zellen pro ml hergestellt. Die Möglichkeit, dass hiervon ein bestimmter Bakterienanteil unbeabsichtigt in die Umwelt gelangen könnte, ist von ökologischer und gesundheitlicher Bedeutung (BOGOSIAN et al., 1993). Das Schicksal gentechnisch veränderter Mikroorganismen und damit auch rekombinanter Plasmide hängt im Wesentlichen von der Überlebensfähigkeit in der Umwelt ab. Dabei sind zwei Phänomene für die Bewertung des Überlebens von Bakterienstämmen mit rekombinanten Genkonstrukten von Bedeutung, erstens die räumliche Ausbreitung transgener Bakterienstämme in der Umwelt und zweitens der horizontale Plasmidtransfer.

Im ersten Fall könnten freigesetzte gentechnisch veränderte Mikroorganismen durch Bodentiere, wie z. B. Collembolen oder Anneliden, aufgenommen werden. Wenn sie fähig wären, sich im Darm zu etablieren, könnte eine verstärkte Verbreitung in der Umwelt nicht

ausgeschlossen werden. Bisher wurden mit gentechnisch veränderten Bakterienstämmen nur wenig Freilandexperimente durchgeführt, und diese auch nur mit besonders gut charakterisierten Gattungen, wie *Rhizobium* und *Pseudomonas* (WILSON AND LINDOW, 1993). Ähnliche Freisetzungsexperimente folgten 1988 in Frankreich mit *Rhizobium leguminosarum* (AMARGER AND DELGUTTE, 1990) und 1987 mit *Pseudomonas fluorescens* in den USA (CLEWELL AND FLANNAGAN, 1993). Die Tatsache, dass der Darm von Bodentieren eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterienarten enthält, wurde durch eine Reihe von Untersuchungen belegt. Die ersten umfassenden Studien zur Bestimmung der Mikroorganismen im Darm von 30 Insektenarten wurden Anfang der 40er Jahre durchgeführt (E.A. STEINHAUS, 1941). Er konnte 83 verschiedene Bakterienstämme isolieren. Aufgrund der engen Verbindung zwischen Boden und ihren Bewohnern ist das Mikroorganismen-Artspektrum der beiden ähnlich, wie z. B. bei der Wurmart *Lumbricus terrestris* L. (FISCHER et al., 1995). Ein in den Boden entlassenes gentechnisch verändertes Bakterium könnte im Darm von Bodentieren eine Nische finden. Für die Etablierung im Darm sind nicht nur die Bedingungen im Darm und die Artenvielfalt ausschlaggebend, sondern auch die Anzahl der Bakterienzellen.

Das Bodeninsekt *F. candida* (Collembola) z. B. enthält äußerst hohe Zellkonzentrationen von Bakterien im Darm (10^{10} pro g Darminhalt). In Kotablagen wurden noch 10^9 Zellen pro g nachgewiesen, darunter Bakterien der Gattungen *Xanthomonas*, *Curtobacterium* und *Pseudomonas* gefunden (BORKOTT AND INSAM, 1990). Auch in anderen Bodentieren, wie der Wurmart *Eisenia foetida*, wurden relativ hohe Bakterienzellzahlen von 10^9 Bakterien pro g in Kokons festgestellt (ZACHMANN AND MOLINA, 1993). Die meisten kultivierbaren Bakterien der Darmflora sind fakultativ anaerob oder aerob. Obligat anaerobe Bakterien wurden kaum gefunden (MEAD et al., 1988). Welche Arten gentechnisch veränderter Bakterien sich in der Darmflora von Bodentieren etablieren könnten, ist bislang nicht untersucht.

Im zweiten Fall könnten rekombinante Plasmide mit neuartigen Eigenschaften zwischen Mikroorganismen einer oder unterschiedlicher Spezies durch verschiedene Mechanismen übertragen werden. In England wurde 1987 erstmals eine Studie zum Plasmidtransfer zwischen eingebrachten und endogenen Mikroorganismen im Freiland initiiert (HIRSCH AND SPOKES, 1993). Die Schwierigkeit des Nachweises von horizontalem Gentransfer von Donorstämmen zu endogenen Bodenbakterien lag bisher in der Replikation der eingebrachten Plasmide in die Rezipienten, die dann durch die Zellteilung verloren gingen (SCHÄFER, 1996).

2.1 Transfermechanismen der Plasmide

Der Gentransfer zwischen Mikroorganismen einer oder verschiedener Spezies wird in der Natur durch Konjugation, Mobilisierung und Transformation ermöglicht. Bei der Konjugation findet ein Transfer der Plasmide von einer Donor- in eine Rezipientenzelle durch Zellkontakt über eine Konjugationsbrücke statt. Dabei gibt es bei Gram-positiven im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien eine Vielzahl verschiedener Konjugationssysteme, weshalb ihr ein hohes Potential zugeordnet werden muss (SCHÄFER, 1996). So wurde z. B. konjugativer Plasmidtransfer des Plasmids pR68.45 von *Pseudomonas aeruginosa* Donorstämmen (auxotroph für Arginin und Leucin) auf endogene Bodenbakterien nachgewiesen. Methodisch wurde dabei das Problem der Wachstumshemmung potentieller Rezipienten aufgrund der Gegenselektion des Donorstammes durch die Auxotrophie umgangen (GLEW et al., 1993). Unter Laborbedingungen konnte das konjugative Plasmid pRP4 mit weitem Wirtsbereich aus *Pseudomonas fluoreszens* im Bereich von 10^{-4} Transkonjuganten zu Rezipienten übertragen werden.

Ein grundlegendes Merkmal der Mobilisierung ist die Anwesenheit der oriT-Region, die für den Transfer des Plasmids wichtig ist. Diese Region ist der Start des Prozesses, in der ein strangspezifischer Bruch stattfindet, um die Übertragung der DNA zu initiieren. Zur Übertragung auf andere Bakterienstämme wird ein Helfer benötigt, der zur Ausbildung der Konjugationsbrücke fähig ist. In sterilem Boden lag z. B. der Transfer des mobilisierbaren Plasmids pSKTG (mit Replikationsfunktion und mob-Gen aus pSUP104) 100fach niedriger als auf Nylonmembranen, wo zur Übertragung auf Rezipientenzellen unbedingt ein konjugatives Plasmid anwesend sein musste (SMIT et al., 1993).

Unter natürlicher Transformation versteht man die aktive Aufnahme freier DNA aus dem umgebenden Milieu und deren Etablierung als integraler Bestandteil des Bakteriengenoms. Nur bestimmte Bodenbakterien, wie z. B. *Acinetobacter*, können unter definierten physiologischen Bedingungen, wie in vitro beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase, DNA unspezifisch an die Zelloberfläche binden. Neue Befunde zeigen, dass freie DNA an Tonmineralen über mehrere Monate im Boden nachzuweisen sind (LORENZ AND WACKERNAGEL, 1993). Dabei ist aber zu beachten, aus welchen Bodentiefen der Ton stammt. Ton aus tieferen Bodenbereichen besitzt eine größere Anzahl freier Ionenaustauscherplätze und kann somit auch mehr freie DNA binden, als Ton, der aus oberen Bodenbereichen stammt, wo an die Ionenaustauscherplätze bereits organisches Material gebunden ist und somit weniger freie DNA gebunden werden kann (BARTSCH, pers. Mitteilung). Im Einzelfall muss außerdem besonders die potentielle Auswirkung eines Gens

auf die Wirtsbakterien in Bezug zu den am Freisetzungsort herrschenden Bedingungen gesehen werden (SCHÄFER, 1996).

2.2 Entstehung rekombinanter Darmbakterien durch Plasmidtransfer

Als Transkonjuganten bezeichnet man Bakterien, die gentechnisch veränderte Plasmide aus den Donorstämmen aufnehmen konnten und somit neue Eigenschaften, wie Antibiotikaresistenzen oder Lumineszenz, erhalten haben. Die Förderung von Gentransfer durch die Darmpassage von Bodentieren wurde nur in wenigen Fällen beschrieben (ARMSTRONG et al., 1990). Andere Genübertragungen, wie aus Donorbakterien über transduzierende Phagen in Vertreter endogener Mikroorganismen oder Transformation in unsterilem Boden wurden mit Bodentieren noch nicht untersucht. Dabei verdienen gerade im Hinblick auf die Sicherheitsforschung Orte mit möglichem vermehrtem Genaustausch ein besonderes Augenmerk. Bislang konzentrierten sich Untersuchungen vorwiegend auf Konjugation. Es wurden verschiedene Mikrokosmosexperimente mit Boden, Rhizosphäre (WALTER et al., 1991) oder Meerwasser beschrieben. Die Entwicklung eines solchen Systems ist schwierig, da der eingesetzte Donorstamm zur Selektion von Transkonjuganten im Wachstum unterdrückt werden muss. Eine Möglichkeit der Gegenselektion stellt die Lysis der Donorzellen durch Phagen dar (SMIT et al., 1991). JARRETT UND STEPHENSON (1990) konnten erstmals hohe Plasmidtransferraten, bis zu $2 \cdot 10^{-2}$ pro Rezipient, zwischen *Bacillus thuringiensis* Stämmen in infizierten Insektenlarven von *Galleria mellonella* und *Spodoptera littoralis* detektieren. Im Darm von Larven des Nachtfalters *Peridroma saucia* wurde das konjugierbare, eine Transposon-Insertion tragende Plasmid R388::Tn1721 von *E. cloacae* Donor- zu Rezipientenstämmen übertragen, wenn sie zuerst mit Donoren- und dann mit Rezipientenzellen gefüttert wurden. Einige Untersuchungen beschäftigten sich mit der Zellkonzentration und phylogenetischer Diversität von Darmbakterien in Bodentieren. So wurden in Asseln und Ameisen 10^5 Zellen pro g Darminhalt festgestellt (REYES UND TIEDJE, 1976; YURMAN UND DOMINGUEZ-BELLO, 1993). Die Hauptmasse der Darmbewohner waren meist aerob oder fakultativ anaerobe Bakterienarten. Dominante Gattungen waren *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* und *Enterococcus*. Im Darm der Heuschrecken fand man $4 \cdot 10^8$ Zellen pro g Darm in einem leicht sauren Darmmilieu. Eine zusätzliche elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte keinerlei Bakterien im Mitteldarm (MEAD et al., 1988). Durch den hohen Anteil unkultivierbarer Darmbakterien konnten nur 37 % der Bakterien in taxonomische Gruppen eingeordnet werden (KARSTEN UND DRAKE, 1995; FISCHER et al., 1995). Auch im umgekehrten Fall, also zuerst die Fütterung mit Rezipientenstämmen und dann mit Donorstämmen, konnten Transkonjuganten nachgewiesen

werden. Dabei musste jedoch ein sehr hoher Titer der Bakterienstämme eingesetzt werden (mehr als 10^6 cfu/ml). Die Anzahl der isolierten Transkonjuganten aus den Rhizosphäre-Mikrokosmen reduzierten sich um zwei Zehnerpotenzen, wenn Nalidixinsäure ins Selektionsmedium gegeben wurde. Daraus wurde geschlossen, dass viele Transkonjuganten durch den „Platemating-Effekt“ entstanden (WALTER et al., 1991). Das bedeutet, dass rekombinante Rezipienten auch durch lange Inkubationen der Untersuchungsarenen und Selektionsplatten entstehen können.

2.3 Bodentiere als "Hot spot" für horizontalen Plasmidtransfer

Viele Plasmide sind als Vektoren für Fremd-DNA nicht geeignet, da sie hohe Transferraten zeigen. Zu solchen Plasmiden zählen sogenannte "shuttle"-Vektoren und konjugative Plasmide. "Shuttle"-Vektoren enthalten zwei Replikationsorte, so dass sie fähig sind, sich in zwei verschiedenen Bakterienarten zu vermehren. Dadurch wird die potentielle Frequenz des horizontalen Gentransfers zwischen Bakterienspezies erhöht. Das größte Risiko für Gentransfer innerhalb einer endogenen Population von Mikroorganismen stellen konjugative Plasmide dar. Sie besitzen die Fähigkeit, mobile genetische Elemente zu übertragen und andere Plasmide zu mobilisieren. Außerdem besitzen sie einen weiten Wirtsbereich. Nicht nur im Labor, sondern auch in sterilen und unsterilen Boden-Mikrokosmen ist ein intra- und interspezifischer sowie intergenerischer Transfer plasmidgebundener oder chromosomaler Marker möglich. Weitere Sicherheit kann man durch Eliminierung der transposablen Funktionen erreichen. Ein transposonhaltiges konjugatives pRP4-Plasmid konnte aus *Enterobacter agglomerans* nach endogenen Bakterien in Biphenyl belastetem Sand übertragen werden, obwohl der Donorstamm nur 3 Tage überleben konnte. Die entstandenen Transkonjuganten erhöhten den biologischen Abbau von chlorierten Biphenyl-Analoga im Boden (DE RORE et al., 1994).

Mobilisierbare Plasmide sollten ebenfalls nicht als Träger fremder DNA verwendet werden, da sie von Bakterien mit konjugativen Plasmiden mobilisiert werden können. Außerdem können sowohl konjugative als auch mobilisierbare Plasmide in einer Bakterienzelle vorkommen. Zur Minimierung der Verbreitung rekombinanter Plasmide wurden unter anderem gezielt Plasmide entwickelt, die die Rezipientenbakterien durch Bildung einer Chemikalie abtöten und so eine Verbreitung gentechnisch veränderter Bakterien verhindert wird (BEJ et al., 1986). Eine starke Barriere für den horizontalen Gentransfer stellt die homologe Rekombination artfremder DNA in der Wirtszelle dar, da nur wenige Falschpaarungen toleriert werden. Weiterhin ist die Akzeptanz der artfremden DNA von Inkompatibilitätsgruppen der potentiellen Rezipienten abhängig. Außerdem besitzen

Bakterien ein Restriktions-Modifikationssystem zum Abbau von artfremder DNA, das aber unter Stressbedingungen weniger wirksam wird (SCHÄFER, 1996).

Die Wahrscheinlichkeit eines Gentransfers von einer Donorzelle zu endogenen Mikroorganismen in einem gegebenen Habitat kommt an Stellen mit hohen Zellkonzentrationen vermehrt vor (SENGELØV et al., 2000). Bedingungen, die das Wachstum der Testorganismen fördern, führen zu einer Stimulierung des Gentransfers. Unter gleichen Bedingungen sind Transferfrequenzen zwischen eingepflichten Organismen in unsterilen Böden niedriger als in sterilen. Die Beimpfung des Bodens geht mit einer Titerabnahme des Testorganismus einher, wodurch die Konkurrenz mit endogenen Mikroorganismen an Bedeutung gewinnt. Mehrere Studien konnten Transferereignisse nicht detektieren. Daraus wurde geschlossen, dass geringe Konzentrationen der Rezipientenzellen wie auch das Fehlen von Nährstoffen einen effektiven Plasmidtransfer zu Bakterien in freiem Boden verhinderten (KLINGMÜLLER, 1993; NAIK et al., 1994; PUKALL et al., 1996). Der Gentransfer wird durch physikochemische Bedingungen, wie Temperatur, Wasserpotential und Nährstoffangebot stark beeinflusst. Manche Bodentiere der kühleregemäßigten Zonen, wie Regenwürmer, Engerlinge der Käfer, sowie Ameisen, besitzen eine nur geringe Kälteresistenz. Die Kälteresistenz ist mit einem starken Absinken des Sauerstoffverbrauchs verbunden und abhängig von Jahreszeit, physiologischem Zustand des Individuums, dem Entwicklungsstadium, der Körpergröße und Geschlecht. Regenwürmer werden nach einem starken Regenfall aus dem Boden getrieben und erleiden einen Lichttod, wenn sie sich nicht schnell genug wieder eingraben können (TISCHLER, 1979). Regenwürmer vermögen lange untergetaucht zu leben; sie erhalten den notwendigen Sauerstoff aus dem Wasser durch Hautatmung (SCHAERFFENBERG 1949). Tiere der Bodenoberfläche, wie z. B. die Entomobryiden unter den Springschwänzen, werden schon durch 1 - 2 % Kohlendioxidgehalt der Luft geschädigt. Tiere tieferer Schichten, wie Onychiuriden ertragen ohne Schaden noch Konzentrationen bis 35 % Kohlendioxid (RUPPEL, 1953). Letztendlich wirkt auch das Habitat eines Bodentiers auf eine Plasmidverbreitung ein, wie z. B. die Rhizosphäre, die auf konjugativem Gentransfer im Vergleich zum freien Boden stimulierend wirkt (VAN ELSAS et al., 1990).

2.4 Verbreitung rekombinanter Plasmide durch Bodentiere

Die organische Streuschicht auf dem Boden wurde auch als einen Ort zum Austausch genetischer Information erkannt, da hier Pilze, Bakterien und Bodentiere gemeinschaftlich zum Abbau organischer Stoffe beitragen. Die Ausbreitung gentechnisch veränderter Bakterien wurde bisher nur in wenigen Modelluntersuchungen behandelt. Die Persistenz von

Pseudomonas fluorescens mit dem rekombinanten Plasmid pFL 105 wurde in Bodensäulen mit Regenwürmern untersucht. Der rekombinante Donorstamm konnte bis zu 44 Tage nach Verfütterung mit abnehmendem Titer in den Kothäufchen der Regenwürmer nachgewiesen werden. Ein Gentransfer wurde bisher nicht nachgewiesen (HENSCHKE et al., 1989). Immerhin wurde durch diese Ergebnisse gezeigt, dass ein Transport von gvO` s durch Bodentiere über einen längeren Zeitraum möglich wäre. In einer anderen Untersuchung wurden drei verschiedene Bakterienarten mit dem Plasmid pBR 322 an Bodentiere verfüttert. *Enterobacter cloacae* konnte sich im Darm etablieren, nicht aber *Klebsiella planticola* oder *Erwinia herbicola* (ARMSTRONG et al., 1989). In Mikrokosmosstudien wurde *E. cloacae* durch die Tiere auf nicht beimpfte Blätter transportiert und so verbreitet (ARMSTRONG et al., 1989). Die mehr oberflächlich lebenden Regenwürmer verarbeiten die Kotkrümel der Streufresser weiter. Die größeren in der Erde befindlichen Regenwurm-Arten ziehen auch erweichte Blätter in den Boden und fressen sie, nachdem diese genügend vermodert sind, mitsamt den anhaftenden Mikroben und Erdpartikeln. Da die Oligochaeten-Würmer der tieferen Horizonte sich zugleich organische Stoffe und Mineralteilchen einverleiben, ist in ihrem Darm die Bildung von Ton-Humus-Komplexen möglich. In jeder Phase des Zersetzungs Vorgangs sind Mikroflora und Bodentiere gemeinsam beteiligt. Alle Gruppen beeinflussen sich direkt oder indirekt, auch können die abgebauten Stoffe mehrmals durch den Tierdarm gehen. Collembolen werden auch von räuberischen Käfern gefressen. Bodentiere aller Art werden von Spitzmäusen, Dachs, Vögeln und anderen Wirbeltieren gefressen. Nach ihrer Biomasse spielen in Wäldern der gemäßigten Zonen die Regenwürmer eine sehr wichtige Rolle (TISCHLER, 1979). Regenwürmer helfen beim Transport gentechnisch veränderter Bakterien im Boden und erhöhen den Plasmidtransfer von zugefügten Donor- auf endogene Rezipientenzellen im Darm (DAANE et al., 1996, 1997). Für den Energiefluss in einer solchen Nahrungskette haben aber wegen ihrer schnelleren Stoffwechsel- und Vermehrungsrate die Pilze und Bakterien die größte Bedeutung, nebst den Mikroarthropoden und Nematoden. Mikroarthropoden, wie Collembolen und Milben, sind die zahlenmäßig am stärksten verbreitete Gruppe der Mesofauna im Boden (SENICZAK UND STEFANIAK, 1978; BORKOTT UND INSAM, 1990) und könnten zur Ausbreitung rekombinanter Plasmide im Boden beitragen.

3. ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT

Die vorliegenden Untersuchungen befassen sich mit synergistischen Studien. Zu den Mechanismen des horizontalen Gentransfers, repräsentiert durch verschiedene Plasmidgruppen, und zum Überleben und der Ausbreitung eingesetzter Donorstämme im

Darm, wurden drei Bodentiere ausgewählt. Die noch wenig untersuchten Mikrohabitate der Bodentiere weisen einen hohen Anteil an unkultivierbaren Mikroorganismen auf. Würde eine rekombinante DNA in ein unkultivierbares Bakterium transferiert und etabliert werden, wäre es nicht detektierbar, da die Kulturbedingungen dieser mikrobiellen Gemeinschaft unbekannt sind. Damit wäre eine Abschätzung der Folgen für Ökosysteme erschwert (SAUNDERS et al., 1990). Folgende Fragen sollen daher in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- 1) Welchen Einfluss haben verschiedene Transfermechanismen der Plasmide auf die Übertragung von *E. coli* nach endogenen Darmbakterien?
- 2) Können rekombinante Darmbakterien bei der Darmpassage von Plasmid-DNA entstehen?
- 3) Sind Collembolen und Anneliden als Modellsysteme für horizontalen Plasmidtransfer geeignet?
- 4) Können Bodentiere transgene Sequenzen im Boden verbreiten?

Für Untersuchungen des Plasmidtransfers in zwei Collembolenarten und einer Annelidenart waren Modellsysteme zu entwickeln. Unter den Bodenarthropoden sind Collembolen die am häufigsten vorkommende Gruppe. Die Darmwände der Collembolen sind dicht mit stäbchenförmigen Bakterien besetzt. Anneliden kommen ebenfalls in hoher Zahl im Boden vor und interagieren aufgrund ihres Grabens und Fressens mit der im Boden lebenden mikrobiellen Gemeinschaft sehr intensiv. Diese Mikrohabitate bzw. der Darm der Tiere könnten damit zur Verbreitung gentechnisch veränderter Mikroorganismen und vermehrtem Genfluss in der Umwelt beitragen. Daher wurden sie als Modellorganismen erprobt. Es wurden verschiedene *E. coli* Donorstämme mit konjugierbaren, mobilisierbaren und nicht-mobilisierbaren Plasmiden verschiedener Wirtsbereiche für die Untersuchungen hergestellt, und damit das Vermögen des Plasmidtransfers in endogenen Darmmikrohabitaten oder Mischungen auf Nylonmembranen zu untersuchen. Das Interesse dieser Untersuchungen galt auch der Bildung und Diversität biolumineszenter Transkonjuganten.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMATERIAL UND GERÄTE

1.1 Chemikalien, Biochemikalien und weitere spezielle Reagenzien

Alle Chemikalien wurden in den Qualitäten „zur Analyse“, „reinst“ (für organische Lösungsmittel) oder „für die Molekularbiologie“ verwendet. Agarose wurde von der Firma GibcoBRL, Eggenstein, bezogen. Sämtliche Chemikalien ohne besondere Angaben und organische Lösungsmittel wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bestellt; EDTA von Riedel-de Haen, Seelze, Borsäure und Roti-Phenol/Chloroform 25:24:1 von Roth, Karlsruhe. Agar Agar und Hefeextrakt wurden von SERVA, Heidelberg, erworben. Von der Firma Sigma, Deisenhofen, stammten Natriumbenzoesäure, Bromphenolblau, Cycloheximid, Decanal, Ethidiumbromid, Glycerol, Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat, D+-Luziferin, Lysozym, Maleinsäure, Magnesiumchlorid, Hexahydrat-Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, n-Laurylsarcosine, Natriumpolyphosphat, Triton-X-100, Xylencyanol, Pararosaniline (Basic Fuchsin).

Alle Restriktionsendonucleasen (*CfoI*, *HaeIII*, *AluI*, *HindIII*) wurden mit den dazugehörigen 10x konzentrierten Reaktionspuffern von der Firma New England Biolabs, Beverly, Mass., bezogen. DNA-Größenmarker, T4-DNA-Ligase und RNase A stammten von Boehringer, Mannheim.

Weitere spezielle Reagenzien, die in dieser Arbeit zur Verwendung kamen, waren:

Biolog Universal Growth Medium (BUGM, Biolog Inc., Haywarth), *Taq* DNA Polymerase (Pharmacia, Cambridge), Qiaex Agarose-Gelextraktionssystem (Qiagen, Hilden), Lösungen und Glasmilch zur Isolierung von Plasmiden (Qiagen), Reagenziensätze zur nicht-radioaktiven Markierung und Farbdetektion von Nukleinsäuren (Boehringer), Gramfärbesystem (Becton Dickinson, Cockeysville), Desoxyribonukleotide [40µM] (Promega, Mannheim), Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg).

1.2 Verbrauchsmaterial

Biolog GN Mikrotiterplatten (Biolog) für den Substratverwertungstest; Filterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel) und HybondN-Nylonmembranen (Amersham, Buckinghamshire) für den Biolumineszenztest und die Southern-Analyse; mit Filtern gestopfte Spitzen für Pipetten, speziell für die PCR (Biozym, Hameln); Film Polaroid Typ

667 (Polaroid, Offenbach) zur Fotodokumentation; Röntgenfilm T-Mat Plus DG für Biolumineszenztests und X-OMAT™ (Kodak-Pathé, Paris) für Southern-Analysen; Sterilfilter 0,2µm für Antibiotika (Sartorius, Göttingen).

1.3 Geräte

Die folgende Zusammenstellung umfasst Geräte, die einen Einfluss auf die Darstellung der Ergebnisse haben könnten.

MP4 Land Camera (Polaroid); Sofortbildkamera zur Geldokumentation.

Mikrotiterplatten-Spectrophotometer Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Zentrifugen Typ 5415C, 5403, 5417C (Eppendorf, vertreten durch Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) und Typ 3K20, 6K10 (Sigma).

Thermocycler Hybaid OmniGene Typ TR3CM 220 (MWG Biotech) zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch PCR.

DU-64 Spektralphotometer (Beckman, Fullaton, CA) zur photometrischen Messung der DNA-Konzentration.

Elektroporationsgerät Gene-Pulser®II (BioRad Laboratories, Richmond, CA) zur Transformation von *E. coli*.

Metallsiebe (Retsch GmbH Co. KG, Haan) mit der Maschenweite 0,01; 0,2 und 0,8 mm zum Sieben von Boden und Collembolen.

2. BODEN UND ORGANISMEN

2.1 Boden

Für die Untersuchungen mit *L. rubellus* (Lumbricidae, Oligochaeta, Annelida) wurde ein Gartenboden aus Lafferde, Kreis Peine, verwendet. Es handelte sich um einen schluffigen Lehm. Der pH-Wert betrug 7,8 in destilliertem Wasser, 7,1 in 0,1 mol·L⁻¹ KCl. Das Versuchsbodenmaterial wurde getrocknet, in Plastiktüten gefüllt, mit einem Metallstab die groben Lehmbrocken klein gewalzt und auf 1 mm gesiebt, um Steine und Wurzeln zu entfernen. Für die Trockengewichtsbestimmungen wurde der Boden in vorher gewogene Gefäße eingefüllt, bei 105 °C über Nacht getrocknet und bis zum erneuten Auswiegen in einem Exsikkator aufbewahrt.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Für diese Studie wurden drei verschiedene *E. coli*-Stämme und ein Hefestamm (Tabelle 1) ausgewählt. *Sinorhizobium meliloti* L33 diente im Biolumineszenztest als Positivkontrolle.

Die im Laufe dieser Arbeit isolierten und identifizierten Stämme werden an entsprechenden Stellen beschrieben.

Es wurden verschiedene Plasmide, die sich im Wirtsbereich und in Gentransfermechanismen unterscheiden, verwendet. Die für gentechnische Konstruktionen verwendeten Plasmide sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und Plasmide.

Stamm	Eigenschaften	Quelle
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>RecA</i> Derivat von <i>E. coli</i> 294 (<i>F</i> ⁻ , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i>), chromosomal integriertes RP4-Derivat, Tc ^r	SIMON et al. (1983)
<i>E. coli</i> HB101	<i>F</i> ⁻ , <i>hsdS20</i> (<i>rB</i> ⁻ , <i>mB</i> ⁻), <i>thi</i> , <i>leu</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>ara-14</i> , <i>xyl5</i> , <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , Sm ^r	BOYER & ROULAND-DUSSOIX (1969)
<i>E. coli</i> NM522	<i>hsdR</i> Stamm mit <i>F'</i> Plasmid	Promega
<i>E. coli</i> S17-1 (<i>λ pir</i>)	<i>λ</i> lysogener S17-1-Derivat, der das <i>π</i> -Protein produziert zur Replikation von <i>oriR6K</i> -Plasmiden	DE LORENZO et al. (1990)
<i>E. coli</i> CC118 (<i>λ pir</i>)	Haltungsstamm für <i>π</i> -Protein abhängige Plasmide	HERRERO et al. (1990)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> L33	Sm ^r , <i>RecA</i> ⁻ , <i>Luc</i> ⁻ , Derivat von <i>S. m.</i> 2011 mit chromosomaler Integration der <i>p_{nptII}-luc</i> Kassette im <i>recA</i>	SELBITSCHKA et al. (1995)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> WHL292	Wildtypstamm	H. WEHLMANN, Wuppertal

Plasmide	Größe	Eigenschaften	Quelle
pUC18 <i>luc</i>	5,0 kb	Amp ^r , <i>tra</i> ⁻ , <i>mob</i> ⁻ , <i>ori colE1</i>	diese Arbeit
pSUP102 <i>lacZ</i> :: Tn5-B20	14,0 kb	Derivat von pACYC184, Km ^r , Nm ^r , Tc ^r , <i>tra</i> ⁻ , <i>mob</i> ⁺	SIMON et al. (1989)
pSUP202 <i>luc</i>	9,6 kb	Derivat von pBR325, Amp ^r , Cm ^r , <i>tra</i> ⁻ , <i>mob</i> ⁻	J. SCHIEMANN, Braunschweig
pSUP104 <i>luc</i>	11,8 kb	Derivat von pACYC184, Cm ^r , <i>tra</i> ⁻ , <i>mob</i> ⁻	diese Arbeit
pUT <i>luxAB</i>	11,0 kb	Derivat von pUT mit mini-Tn5 und promotorlosem <i>luxAB</i> , Km ^r , <i>tra</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁻	DE LORENZO et al. (1990)
pUT <i>luxCDABE</i>	16,1 kb	<i>oriT</i> , <i>oriR6K</i> , <i>luxCDABE</i> , Km ^r , <i>tra</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁻	C.B. FORDE et al. (1999)
pRP4 <i>luc</i>	62,0 kb	IncP _α -Plasmid, Amp ^r , Tc ^r , <i>tra</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁺	THOMAS AND SMITH (1987)
p707 <i>luc</i>	10,7 kb	Amp ^r , Hefe/ <i>E. coli</i> -Fusionsvektor	diese Arbeit

2.3 Bodentiere

Die Plasmidtransfer-Untersuchungen wurden mit insgesamt 2 Collembolenarten und 1 Annelidenart durchgeführt.

Die verwendeten Collembolen der Art *F. candida* (Isotomidae, Collembola) stammen aus einer Sammlung von Prof. Dr. O. Larink, Technische Universität Braunschweig. Die andere, phytopathogene Collembolenart *Onychiurus fimatus* (Onychiuridae, Collembola) wurde von B. Ulber, Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt. Die Collembolen wurden für die Arbeit im eigenen Labor zur Vermehrung in Zucht genommen. Dafür wurden sie in geschlossenen Plastiktöpfen mit einem Gips/Kohle-Gemisch bei 15°C gehalten (siehe Abbildung 1) und in Abständen von 3 – 4 Wochen auf einem Deckglas mit einer Messerspitze autoklavierter Bierhefe gefüttert und mit ca. 2 mL Leitungswasser befeuchtet.



Abbildung 1

Darstellung eines Zuchtgefäßes der Collembolen (Volumen: 500 mL)

Die horizontal grabende Wurmart *L. rubellus* (Oligochaeta, Annelida) wurde von der Mosella-Angelköder GmbH, Platten, bezogen. Die von der Firma gelieferten Plastikgefäße, die mit Humus und 20 Würmern befüllt waren, wurden in 10 l Plastiktonnen mit Deckel, die zu 1/3 mit Versuchsbodenmaterial (siehe 2.1) befüllt waren, umgesetzt. Die Oberfläche wurde mit zerkrümelten trockenen Birkenblättern als Futter bedeckt und die Tonnen bei 12°C gehalten. Die Würmer mussten sich einige Tage an den Versuchsboden adaptieren, wobei 10 % der Individuen starben. Für Untersuchungen wurden nur erwachsene Exemplare mit ausgebildetem Klitellum verwendet.

3. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.1 Kulturmedien

Komplexe Nährmedien wurden mit deionisiertem, M9 Medien, Wasseragar und YTP-Agarblock mit bidestilliertem Wasser zubereitet.

LB-Medium (SAMBROOK et al., 1989), zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen.

Zusammensetzung in g/L:

10,0 Bacto-Trypton, 5,0 Hefeextrakt und 10,0 NaCl

M9 Minimalmedium (SAMBROOK et al., 1989), zur Selektion der Transkonjuganten wurden 880 mL A. bidest. autoklaviert, auf 60°C abgekühlt und 100 mL 10x M9-Salze zugegeben.

Zusammensetzung der 10x M9-Stammlösung in g/L:

60,0 Na₂HPO₄, 30,0 KH₂PO₄, 5,0 NaCl, 10,0 NH₄Cl; der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

SOC-Medium (Bio-Rad User Manual, 1989), zur Regeneration der *E. coli* Zellen nach der Elektroporation. Dafür wurden die Magnesiumsalze separat autoklaviert und anschließend steril zugefügt.

Zusammensetzung:

20,0 g/L Trypton, 5,0 g/L Hefeextrakt, 10 mmol NaCl, 2,5 mmol KCl, 10 mmol MgCl₂, 10 mmol MgSO₄, 20 mmol Glucose.

YM (Hefe-Malz)-Medium, zur Anzucht von *S. cerevisiae*.

Zusammensetzung in g/L:

3,0 Hefeextrakt, 3,0 Malzextrakt, 5,0 Pepton, 10,0 Glucose; pH 6,0.

ENDO-Agar, zur Selektion der Transformanten für *E. coli* in den Versuchen zur Transformation (5.1.6) im Darm von *F. candida*.

Zusammensetzung in g/L:

10,0 Pepton, 10,0 Laktose, 3,5 Dikaliumhydrogenphosphat, 2,5 Natriumsulfit, 10,0 Agar.

SD-Medium, zur Selektion der Transformanten aus *F. candida* nach Fütterung von *S. cerevisiae/p707huc*.

Zusammensetzung in g/L:

10,0 Hefeextrakt, 20,0 Pepton, 20,0 Dextrose und zusätzlich 1 mol Sorbitol; pH 6,5.

PCA („Plate Count Agar“-Nährboden, wurde nach Anleitung der Firma Difco Laboratories, Detroit, Michigan, für die Untersuchungen mit *L. rubellus* verwendet.

Wasseragar in Petrischalen zum Sammeln des Kotes und für Fütterungsexperimente mit Collembolen. Destilliertes Wasser wurde mit 1,5 % Agar Agar versetzt, autoklaviert und zu ca. 25 mL in Petrischalen gegossen.

YTP-Agarblock, als Futterersatz in Kontrollen ohne Donorstamm und zur Unterlage für die Donorstämme in Fütterungsexperimenten mit Collembolen. Dafür wurde der Nährboden gerade bodendeckend in Petrischalen gegossen und nach Erkalten mit einem Skalpell in 1,3 x 1,3 x 0,5 cm große Quadrate geschnitten.

Zusammensetzung in g/L:

2,0 Hefeextrakt, 2,0 Trypton, 2,0 Soja-Pepton; pH 7,2.

3.2 Zusätze

Zur Herstellung von Agarnährböden wurden zu den Kulturmedien 15 g·L⁻¹ Agar Agar (SERVA, Heidelberg) zugesetzt. Für plasmidhaltige Bakterienzellen wurden sterilfiltrierte Antibiotika-Stammlösungen zu den autoklavierten und auf 60 °C abgekühlten Medien in folgenden Endkonzentrationen hinzugefügt:

Plasmid	Antibiotikum
pUC18 <i>luc</i>	0,1 g·L ⁻¹ Ampicillin
p707 <i>luc</i>	0,1 g·L ⁻¹ Ampicillin
pSUP202 <i>luc</i>	0,1 g·L ⁻¹ Ampicillin und 0,05 g·L ⁻¹ Chloramphenicol
pSUP104 <i>luc</i>	0,05 g·L ⁻¹ Chloramphenicol
pUT <i>lux</i> AB	0,05 g·L ⁻¹ Kanamycinsäuresulfat
pUT <i>lux</i> CDABE	0,05 g·L ⁻¹ Kanamycinsäuresulfat
pRP4 <i>luc</i>	0,01 g·L ⁻¹ Tetracyclin-HCl

Zur Unterdrückung des Pilzwachstums wurden in Experimenten mit Bodentieren noch 0,1 g·L⁻¹ Cycloheximid zugegeben. Transkonjuganten wurden auf M9 Medien mit 2,5 mmol·L⁻¹ Benzoesäure selektiert; diese C-Quelle konnte vom Donororganismus *E. coli* nicht verwendet werden.

Für Experimente zur Inhibierung der Konjugation wurden die Medien mit 0,1 g·L⁻¹ Nalidixinsäure ergänzt. Zur Selektion von Bakterienstämmen mit *lacZ*-haltigen Plasmiden wurden 40 mg·L⁻¹ X-Gal in N,N-Dimethylformamid und 30 mg·L⁻¹ IPTG in *A. bidest.* zugesetzt.

3.3 Anzucht von Bakterien

E. coli wurde bei 37 °C, Bakterien aus dem Kot von Bodentieren bei 30 °C inkubiert. Donorstämme wurden routinemäßig durch fraktioniertes Ausstreichen auf LB mit entsprechenden Antibiotika kultiviert und mittels Biolumineszenz-Nachweis (4.7.1) auf Markergenexpression überprüft. Flüssigkulturen – gegebenenfalls selektiv durch Zugabe entsprechender Antibiotika - wurden bei 120 rpm auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Für Volumina ab 10 mL wurde eine Vorkultur in 2 mL Medium angeimpft, über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei 120 upm inkubiert und dann als Startmaterial für die große Kultur verwendet.

Zur Herstellung von Dauerkulturen von *E. coli*-Stämmen wurden zu 600 µL einer stationären, frischen Kultur 1 mL steriles 87 % Glycerol gegeben, vermischt und bei –70 °C gelagert. Isolate aus dem Darm der Bodentiere wurden bei –70 °C in einem Kryogefäß nach Anleitung der Firma Mast Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld, konserviert.

Zur Koloniezahlbestimmung nach den Plasmidtransferexperimenten, wurden Verdünnungsreihen in Dezimalschritten angelegt und von vier Verdünnungsstufen jeweils 3x 20 µL Tropfen auf entsprechende Selektivnährböden gesetzt. Nach der Bebrütung der LB Nährböden von 2 d und der Mineralsalznährböden von 4 d bei 30 °C wurden Einzelkolonien gezählt und für die Auswertung mit dem Faktor 50 und der entsprechenden Verdünnungsstufe multipliziert. Die Koloniezahl wurde als Logarithmus zur Basis 10 (log₁₀ cfu) angegeben.

4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.1 Isolierung von DNA

4.1.1 Präparative Plasmid-Isolierung

(nach BIRNBOIM AND DOLY, 1979, modifiziert)

Nach diesem Protokoll wurde Plasmid-DNA in größeren Mengen für molekulares Klonen und Transformationen gewonnen.

Lösungen:

P1: 100 µL RNase A [100 mg·L⁻¹] in 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8,0

P2: 0,2 mmol·L⁻¹ NaOH, 1 % SDS

P3: 2,55 mmol·L⁻¹ K-Acetat, pH 4,8

QBT: 750 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ MOPS, 15 Vol % Ethanol, 0,15 Vol % Triton X-100, pH 7,0

QC: 1 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ MOPS, 15 Vol% Ethanol, pH 7,0

QF: 1,25 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ MOPS, 15 Vol% Ethanol, pH 8,2

Mit dem Plasmid-Reinigungssystem „tip100“ (Qiagen) nach Anleitung des Handbuchs Qiagen Plasmidreinigung (01/97) wurde nach einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen die Plasmid-DNA an das Anionenaustauscher-Säulenmaterial adsorbiert. Reste von Proteinen und RNA wurden mit dem Waschpuffer QC ausgewaschen und anschließend die DNA mit dem Elutionspuffer QF von der Säule gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde durch Messung der Adsorption bei 260 und 280 nm im DU-64 Spektralphotometer (Beckman) bestimmt.

4.1.2 Präparation von genomischer DNA aus Bakterienzellen

(nach WILSON et al., 1987, modifiziert)

Diese Methode diente zur Extraktion von Plasmid- und genomischer DNA aus Transkonjuganten, die aus Versuchen mit *E. coli* S17-1(λ pir)/pUTlux und Kotbakterien von *L. rubellus* stammten. Es sollte in einem Arbeitsgang geklärt werden, ob das Plasmid frei in der Zelle vorlag, oder sich durch das vorhandene mini-Transposon chromosomal integriert hatte.

Lösungen:

Lysispuffer: pro Probe 567 μ L TE, 30 μ L 10 % SDS, 3 μ L Proteinase K [20 mg/mL]

Salzlösung: 5 mol·L⁻¹ NaCl

CTAB/NaCl: 10 % CTAB, 0,7 mol·L⁻¹ NaCl

Chloroform: Chloroform/Isoamylalkohol 24:1

Phenol: Roti-Phenol/Chloroform 25:24:1

Bakterien aus 1,5 mL Flüssigkultur wurden 3 min bei 8000x g in einer Tischzentrifuge getrennt. Das Sediment wurde im Lysispuffer resuspendiert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 100 μ L Salzlösung und 80 μ L CTAB/NaCl-Lösung Proteine und Polysaccharide gefällt, während die Nukleinsäuren in Lösung blieben. Die weißflockige Mischung wurde 10 min bei 60 °C erhitzt und durch Extraktion mit Chloroform und Phenol gereinigt. Durch Zugabe von 280 μ L Isopropanol wurde die DNA gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 100 μ L A. bidest. resuspendiert.

4.2 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(nach SAMBROOK et al., 1989)

Die Restriktion von DNA diente zur Herstellung von Vektor und Fragment für die Konstruktion biolumineszenter Plasmide und zur Vorbereitung genomischer DNA für die Southern-Analyse. Plasmid-DNA (pro Ansatz 2 μ g) wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß

mit 2 μL 10x konzentriertem Puffer und 1 μL Restriktionsenzym (6 - 12 U) vermischt und mit sterilem A. bidest. auf das Endvolumen von 20 μL aufgefüllt. Für Gesamt-DNA wurde die 5-fache Menge an Reagenzien eingesetzt. Nach der Inkubation für 1,5 h bei 37 °C wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (4.3) zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe durchgeführt.

4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

(nach SAMBROOK et al., 1989)

Agarose-Gelelektrophoresen dienen zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten und zur Kontrolle restringierter DNA.

Lösungen:

TBE-Laufpuffer: 90 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, 90 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Borat, 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8,6

Probenpuffer: 10 mL 86 Vol % Glycerin, 10 mL 1-fach TBE-Puffer, 0,1 g Bromphenolblau

Färbelösung: 1 Tropfen einer [$1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$] Ethidiumbromid-Stammlösung in 150 mL Wasser

Je nach Anzahl der Proben wurden Kammern verschiedener Größe (BioRad) verwendet. Für DNA-Fragmente von 1 - 25 Kb wurde eine Gelstärke von 1 % Agarose in TBE hergestellt. Agarose und Laufpuffer wurden in einer Mikrowelle bei 600 W für 1 min geschmolzen, etwas abgekühlt und luftblasenfrei in den passenden Gelträger gegossen. Nach 30 min bei RT war das Gel erstarrt und konnte beladen werden. Vor dem Auftragen wurden den Proben zur Beschwerung und Farbmarkierung 1/5 Volumen Probenpuffer zugesetzt. Zur Bestimmung der Fragmentlängen wurden zusätzlich DNA-Längenstandards von Boehringer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde je nach Kammergröße bei 60 - 100 V für etwa 2 - 3 h durchgeführt. Danach wurden die Gele 10 min in Leitungswasser mit $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Ethidiumbromid gefärbt. Zur Dokumentation konnte die DNA in den gefärbten Gelen anschließend auf dem UV-Transilluminator (366 nm) sichtbar gemacht und mit der Polaroid-MP4 Kamera unter Verwendung eines Rotfilters photographiert werden. Als Filmmaterial wurde der Polaroidfilm Typ 667 verwendet.

4.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

(nach Qiagen Agarose Gel Extraktions Protokoll, 1992)

Für Klonierungen ist es notwendig, durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigte Vektor- oder Fragment-DNA aus der Agarose wieder zu eluieren.

Lösungen:

QX1: 3 M NaCl, 4 M NaClO₄, 10 mM Tris, 10 mM Natriumthiosulfat, pH 7,8

Glasmilch: eine von der Firma mitgelieferte milchige Lösung mit Glaskugeln, an denen DNA haftet

PE: 70 % Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, pH 7,5

Das DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht möglichst knapp aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Anleitung der Firma Qiagen mit Hilfe des DNA-Fragment-Isolierungssystems herausgelöst. Das Prinzip besteht darin, die Vernetzung der 100 mg Agarosestücke mit 2 Vol QX1-Puffer bei 50 °C aufzulösen, die DNA unter hochmolarer Salzlösung an Glasmilch zu binden und nach mehrmaligem Waschen mit Puffer QX1 und PE in niedermolaren Salzlösungen wieder von der Glasmilch zu lösen. Die so gewonnene DNA kann für Ligationen oder als Sonden-DNA für nicht-radioaktive Markierungen eingesetzt werden.

4.5 Ligation von Vektor und Genkassette

(nach SAMBROOK et al., 1989, optimiert nach KING und BLAKESLEY, 1986)

Die Ligation ist zur Konstruktion biolumineszenter Plasmide notwendig.

Lösung:

10x Ligasepuffer: 0,6 M Tris-HCl, 0,05 M MgCl₂, 0,01 M ATP, 0,01 M Dithiothreitol,
50 % PEG 8000, pH 7,6

Je 50 ng Vektor wurde mit 150 ng Fragment und T4-DNA-Ligase (1 U) in 10 µL vermischt und über Nacht in einmal konzentriertem Ligationspuffer bei 12 °C inkubiert. Zur Erhöhung der Ausbeute an Ligationsprodukten wurde 5 % Polyethylenglycol (PEG 6000) zugesetzt. Zur Vorbereitung auf die Elektroporation wurde der Ansatz für 30 min bei RT in einer Petrischale gegen 15 % Glycerin auf einem Membranfilter "V" (Porengröße 0,025 µm, Durchmesser 25 mm, Firma Millipore) dialysiert. Danach war der Ligationsansatz salzfrei.

4.6 Transformation von *Escherichia coli*

(nach DOWER et al., 1988)

Mittels Elektroporation sollten die mit dem Luziferase-Gen markierten Plasmide in verschiedene *E. coli*-Stämme gebracht werden.

Eine *E. coli* Einzelkolonie wurde in LB Flüssigmedium angeimpft und bei 37 °C bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde anschließend durch Inkubation für 10 min auf Eis gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden 1x in gleichem Volumen eiskaltem A. bidest. gewaschen und 2x in 10 %

Glycerin. Die Zentrifugation erfolgte jeweils 5 min bei 5.000x g. Dann wurden die salzfrei gewaschenen Zellen in 200 μL 10 % Glycerin resuspendiert und mit der zu transformierenden DNA vermischt. Anschließend wurde das DNA-Zell-Gemisch in eine vorgekühlte Küvette transferiert (Elektrodenabstand 0,2 cm) und die Elektroporation mit dem Gene-Pulser (Firma Bio-Rad) durchgeführt. Die Elektroporation erfolgte bei folgenden Einstellungen: 25 μF , 200 Ω und 2,1 kV. Die Dauer des Stromimpulses betrug 0,6 ms. In der Küvette wurde eine Feldstärke von 1,25 $\text{MV}\cdot\text{m}^{-1}$ erreicht. Nach dem Stromimpuls wurde sofort 1 mL SOC-Medium (SAMBROOK et al., 1989) zugegeben und 45 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden transformierte *E. coli*-Klone auf Nährböden mit entsprechenden Antibiotika selektiert.

4.7 Charakterisierung von Darmbakterien aus Bodentieren

4.7.1 Biolumineszenz-Nachweis

(nach WOOD und DELUCA, 1987, modifiziert)

Der Nachweis der Luziferase in Bakterienkolonien diene einerseits zur Kontrolle der Plasmidstabilität, andererseits zur Selektion von Transformanten nach Elektroporation. Weiterhin wurden die erhaltenen Einzelkolonien auf den Selektionsnährböden aus den Experimenten mit Bodentieren auf Expression des *luc*- oder *lux*-Gens hin untersucht.

Lösung:

Luziferinlösung: 1 mM Luziferin in 100 mM Natriumcitrat, pH 5,0

Auf Nährböden, die mit durchschnittlich 50 Kolonien bewachsen waren, wurden trockene HybondN-Nylonfilter (Amersham) aufgelegt. Nach Kennzeichnung der Filterposition wurde der Filter mit einer Pinzette abgenommen und mit den Kolonien nach oben auf eine Schablone gelegt, die mit 180 μL Luziferinlösung benetzt wurde. Als Positivkontrolle diene *Sinorhizobium meliloti* L33, ein Bodenbakterium mit chromosomal integriertem *luc*-Gen (SELBITSCHKA et al., 1992). Auf die Schablone wurde im Dunkeln der Röntgenfilm T-MAT Plus DG und zum Andrücken des Films eine Plexiglasscheibe aufgelegt. Die Filmkassette wurde je nach der zu erwartenden Lichtintensität für 4 bis 10 h bei 30 °C inkubiert. Der Röntgenfilm wurde 4 min entwickelt, mit Leitungswasser gespült und 5 - 15 min im Fixiererbad inkubiert. Nach anschließendem Spülen mit Wasser wurde der Film bei 60 °C getrocknet und ausgewertet.

Für Bakterienstämme mit pUT*lux*AB wurde statt Luziferin das Substrat Decanal eingesetzt. Bakterienstämme mit pUT*lux*CDABE waren autolumineszent und brauchten daher keine Substratzugabe.

4.7.2 *Quantifizierung der Luziferase-Aktivität*

(nach WOOD UND DELUCA, 1987, modifiziert)

Bei den aus Plasmidtransferversuchen stammenden biolumineszenten Transkonjuganten aus Kot von *F. candida* wurde die Luziferase-Aktivität quantifiziert. Nach der Spaltung von Luziferin in Gegenwart von ATP, Sauerstoff und Magnesiumionen durch Luziferase, entsteht Kohlendioxid, Pyrophosphat, Licht und ein Luziferase-Luziferin-Produkt.

Lösungen:

Nachweispuffer für Bakterienzellen: 25 mmol·L⁻¹ Glycylglycin, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, pH 7,8.

ATP-Lösung: 30 mg ATP in Nachweispuffer gelöst, mit HCL auf pH 7,8 eingestellt und auf 10 mL mit Nachweispuffer aufgefüllt.

Luziferinlösung: 1 mg D⁺-Luziferin (Sigma) in 350 µL Nachweispuffer lösen, zu je 40 µL aliquotieren und dunkel bei -20 °C lagern.

Das Luminometer (LUMAT LB 9501, Firma Berthold) wurde mehrmals mit Nachweispuffer gespült. In einer Küvette wurden zu 350 µL ATP-Lösung 50 µL einer frisch gewachsenen Über-Nacht-Kultur gegeben und ins Gerät gestellt. Das Gerät pipettierte automatisch 100 µL Luziferinlösung (40 µL tiefgefrorenes Luziferin-Aliquot mit 2 mL Nachweispuffer verdünnt) dazu und startete so die Reaktion. Die entstandene Lichtemission wurde 10 sec bei 455 nm gemessen. Es wurden pro Probe zwei Messungen durchgeführt. Die Über-Nacht-Kulturen wurden verdünnt und auf Selektionsmedien ausplattiert, um die Zellzahlen pro mL bestimmen zu können. Die Messwerte wurden am Luminometer in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Er muss mit dem Faktor 2 multipliziert werden, so dass man die Konzentration des gebildeten Produkts in 100 µL Reaktionsansatz erhält. Die Enzymaktivität wurde auf 1 · 10⁸ cfu · mL⁻¹ bezogen.

4.7.3 *ARDRA*

(nach VANNEECHOUTTE et al., 1992)

Diese Methode wurde zur ersten Charakterisierung von *luc*-positiven Transkonjuganten verwendet.

Lösung:

Lysispuffer: 0,05 mol·L⁻¹ NaOH, 0,25 % SDS

Eine mittelgroße Einzelkolonie wurde in 50 µL Lysispuffer 15 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach Zugabe von 450 µL A. bidest. wurden Zellreste in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Amplifikation der 16S rDNA durch PCR

Pro Probe wurde in einem 0,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt:

5,0 μL 10x *Taq* DNA Polymerase Puffer

1,0 μL forward Primer R1n [5'-gctcagattgaacgctggcg-3'], [10 pmol·L⁻¹]

1,0 μL backward Primer U2 [5'-acatttcacaacacagagctg-3'], [10 pmol·L⁻¹]

0,2 μL *Taq* DNA Polymerase [5 u·L⁻¹], Pharmacia

1,0 μL 10 mmol·L⁻¹ dNTP-Mix, Promega

39,8 μL A. bidest.

2 μL Gesamt-DNA wurden zugegeben, gemischt, kurz abzentrifugiert und mit 2 Tropfen Flüssigwachs überschichtet. Als Positivkontrolle diente der verwendete Donorstamm, als Negativkontrolle wurde statt Gesamt-DNA 2 μL A. bidest. zugesetzt. Danach wurden die Proben im Thermocycler nach der Denaturierung von 2 min bei 95 °C für 30 Zyklen von 1 min/95°C, 1 min/50°C und 1 min/72 °C inkubiert. Die Elongation erfolgte für 5 min bei 72°C. Anschließend wurden die Proben 5 min bei -20 °C gelagert, der Wachspfropf mittels Zahnstocher entfernt und 2,5 μL auf einem 1 %igen Agarosegel in TBE-Laufpuffer zur Überprüfung der PCR aufgetragen.

Restriktionsanalyse

Pro Probe wurde in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

1 μL 10x A Puffer, Boehringer

1 μL *Cfo*I, *Alu*I oder *Hae*III, Boehringer

3 μL A. bidest.

5 μL PCR-Produkt

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die gespaltenen 16S rDNA-Fragmente wurden mit 2 μL Ladepuffer für Agarosegele beschwert und zur besseren Trennung auf einem 2 % LMP ("low melting point")-Agarosegel in TBE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde 10 min in Ethidiumbromid angefärbt und mit der Polaroidkamera fotografiert.

4.7.4 Biolog-Identifizierungssystem

Die Methode nach BOCHNER (1989) diente zur Klassifizierung der aus dem Darm der Bodentiere isolierten biolumineszenten Bakterien. Dabei wird in vorgefertigten Mikrotiterplatten die Verwertung von 95 verschiedenen C-Quellen als einzige Energiequelle durch die Reduktion des Tetrazoliumvioletts zum Formazan bzw. eine mehr oder weniger starke blauviolette Färbung getestet. Die in den Mikrotiterplatten entstandenen Stoffwechsellmuster wurden photometrisch erfasst und mit einer Datenbank verglichen. Dafür

wurden biolumineszente Mischkulturen aus dem Kot der Bodentiere durch fraktioniertes Ausstreichen auf Nährböden vereinzelt und die Stabilität der Plasmide durch einen weiteren Biolumineszenztest überprüft. Einzelkolonien wurden nach der Gebrauchsanweisung für GN Mikrotiterplatten der Firma Biolog, Hayward, in BUGM-Medium bis zur stationären Phase bei 30 °C angezogen und auf ihr Gram-Verhalten nach Anleitung der Firma Becton Dickinson, Cockeysville, untersucht. Hierzu wurde die Zelldichte mit dem Turbidimeter oder der Thomakammer auf $3 \cdot 10^8$ Zellen·mL⁻¹ eingestellt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte befüllt, wobei als interne Kontrolle eine Vertiefung der Mikrotiterplatte (A1) keine Kohlenstoffquelle enthielt. Nach der Inkubation bei 30 °C für 24, 48 und 72 h, wurden die Reaktionsmuster im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Vmax, Molecular Devices, Menlo Park) erfasst. Die erhaltenen Daten konnten im angeschlossenen Computer als ASCII-Dateien auf Diskette abgespeichert und mit der Datenbank (MicroLog[®] GN 3.50; 8/93) durch Verwendung der Microlog2 Software (Firma Biolog) verglichen werden.

4.7.5 DNA-Sequenzierung des 16S rRNA-Gens

Ausgewählte ARDRA-Typen wurden durch 16S rDNA Sequenzierung charakterisiert. In der anschließenden zweiten PCR-Reaktion wurden die DNA-Fragmente für die Sequenzierung am 5'-Ende mit Fluorescein markiert ("ABI PRISM™Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction System", Perkin Elmer). Die mit dem automatischen Laser Fluoreszenz DNA-Sequenzierer (A.L.F.) aufgenommenen Sequenzdaten wurden mit dem software Programm Chromas korrigiert und in eine Textdatei konvertiert. Die Nukleinsäuresequenzen wurden über das Internet mit Hilfe der BLASTN Algorithmen (ALTSCHUL et al., 1990) verglichen.

Lysis von Bakterien

Eine *luc*-positive Einzelkolonie wurde in 100 µL TE, pH 8,0 in ein Reaktionsgefäß übertragen. Die Proben wurden bei 95 °C im Heizblock 5 min inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min bei 13000x g in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand von 95 µL wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C aufbewahrt.

Amplifizierung der 16S-rDNA

Es wurde pro Probe zusammenpipettiert:

16 µL dNTP-Mix (jedes 1,25 mmol·L⁻¹)

10 µL 10x *Taq*-DNA Polymerase Puffer, Perkin Elmer

5 µL 12 µM forward Primer [5'-aga gtt tga tca/c tgg ctc ag-3']
 (Position 8 - 27 des *E. coli* 16S rRNA-Gens); KARLSON et al. (1993)
 5 µL 12 µM backward Primer [5'-ttc tgc agt cta gaa gga ggt ga/tt cca
 gcc-3'] (Position 1525 - 1541 des *E. coli* 16S rRNA-Gens), KARLSON et
 al. (1993)
 62,5 µL A. bidest.

In ein 0,2 mL dünnwandiges Eppendorfgefäß wurden 98,5 µL des Großansatzes vorgelegt und 1 µL Gesamt-DNA zupipettiert. Anschließend wurde im Wasserbad 5 min bei 95 °C denaturiert und 2 min auf Eis abgekühlt, bevor 0,5 µL *Taq*-DNA-Polymerase ([5U·µL⁻¹], Perkin Elmer) zugegeben wurde. Die DNA wurde 2 min bei 95 °C inkubiert und durch 30 Zyklen von 1 min/94 °C, 1 min/55 °C und 2 min/72 °C amplifiziert. Anschließend folgte ein Zyklus von 10 min 72 °C zur Verlängerung der DNA-Fragmente. Nach Programmende wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt.

Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wurden 3 µL in einem 1 % Agarosegel für 1,5 h bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Pro Probe wurden dafür noch 5 µL A. bidest. und 2 µL Ladebuffer zugegeben. Als Größenmarker diente der DNA-Längenmarker der Firma Gibco BRL (0,1 - 1,0 Kb Größe).

Fluoreszenzmarkierung der amplifizierten 16S-rDNA

Die PCR-Produkte der amplifizierten 16S rDNA mussten von nicht eingebauten dNTP's, Primern und Puffer gereinigt werden. Dafür wurden Chromatographiesäulen (Microcon S100, Amicon) verwendet. In die Säule wurde 400 µL A. bidest. vorgelegt und das gesamte PCR-Produkt dazupipettiert. Es wurde bei 3000 g 8 min abzentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µL A. bidest. und Zentrifugation bei 3000 g jeweils 8 und 10 min. Dann wurde die Säule umgedreht in ein frisches Eppendorfgefäß eingesetzt und für 3 min bei 3000 g abzentrifugiert. Im Eppendorfgefäß sollte ein Tropfen von 3 - 4 µL zu sehen sein. Dann wurden 100 µL A. bidest. zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei +4 °C.

Für die Sequenzierungs-PCR wurden in 0,2 mL dünnwandigen Eppendorfgefäßen zu 4 - 7 µL A. bidest. 3 - 6 µL DNA pipettiert. Dann wurden 2 µL 5 µM „forward Primer“ und 8 µL Enzymmischung der Firma Perkin Elmer zugegeben. Die DNA wurde 15 sec bei 96 °C denaturiert und durch 25 Zyklen von 15 sec bei 60 °C amplifiziert. Die Verlängerungsreaktion dauerte 4 min bei 60 °C. Die Proben wurden automatisch auf 4 °C heruntergekühlt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt der Sequenzierungs-PCR mit 2 μL 3 M Natriumacetat, pH 4,6 und 50 μL absolutem Ethanol bei RT gefällt. Die Proben wurden invertiert und 30 min in einer Tischzentrifuge bei 14.000 upm abzentrifugiert. Ethanol wurde abpipettiert, die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut 10 min abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde 3 min im Vakuum getrocknet. Die Proben wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

In der Zwischenzeit wurde das Sequenziergel vorbereitet. Die Glasplatten wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen, abgetrocknet und mit einem fusselreichen Isopropanol - getränkten Tuch abgerieben. Rezeptur für das verwendete Polyacrylamidgel:

25,0 g Harnstoff

18,3 mL deionisiertes Wasser

5,0 mL 10x TBE-Puffer

8,3 mL Acrylamidlösung 30 %ig (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)
auf 50,0 mL mit A. bidest. auffüllen.

12,5 μL TEMED

292 μL 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung zugeben und das Gel gießen.

Das Gel wurde anschließend für 2 h zum Auspolymerisieren bei RT gehalten. Die Proben wurden in 3 μL Ladepuffer-Gemisch (5 Teile Formamid mit Ionenaustauscher deionisiert/ 1 Teil 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8,0) resuspendiert, 2 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und anschließend auf Eiswasser gehalten. Die Gelplatten wurden nach dem Auspolymerisieren noch einmal unter dem Wasserhahn abgespült, damit an den Stellen, an denen der Laser später die Sequenzen liest, keine Unebenheiten entstehen. Das Gel wurde in die Apparatur eingespannt und die Kammern mit 1x TBE-Puffer bestückt. Zur Reinigung des Gels wurde ein einstündiger Vorlauf gestartet. Danach wurden die Proben aufgetragen und für 17 h elektrophoretisch aufgetrennt. Die fluoreszierenden DNA-Fragmente wurden nach Anregung durch einen LASER detektiert und aufgezeichnet.

4.8 Southern-Analyse

Die Methode wurde zum Nachweis des Einbaus des mini Tn5 in das Chromosom von Darmbakterien verwendet. Die gespaltene genomische DNA der zu untersuchenden Bakterien wurde elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde auf eine Nylonmembran durch Kapillarkräfte übertragen. Durch die nicht-radioaktive Markierung des *lux*-Gens konnten die DNA-Fragmente auf der Nylonmembran durch Hybridisierung nachgewiesen werden. Nach der Hybridisierung wurde die immunologische Detektion durchgeführt.

4.8.1 Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembran

(nach SOUTHERN, 1975)

Lösungen:

Depurinierung: 0,25 mol·L⁻¹ HCl

Denaturierung: 1,5 mol·L⁻¹ NaCl, 0,5 mol·L⁻¹ NaOH

Neutralisierung: 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 2 mol·L⁻¹ NaCl, pH 8,0

Transferpuffer: 20x SSC (3 mol·L⁻¹ NaCl, 0,3 mmol·L⁻¹ Na₃-Citrat, pH 7,4)

Der Transfer von DNA-Bandenmustern aus 0,7 % Agarosegelen auf eine Nylonmembran geschah durch Kapillarkräfte. Nach der Elektrophorese von genomischer DNA wurde das Agarosegel zum besseren Transfer von großen DNA-Fragmenten 10 min in 0,5 mol·L⁻¹ HCl, dann 30 min in Denaturierungslösung zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge und anschließend 30 min in Neutralisierungslösung bei RT inkubiert. Für den Transfer wurden zwei Lagen mit 20x SSC getränktes Filterpapier auf eine Glasplatte gelegt, dessen Enden in Transferpuffer lagen. Darauf wurde das Agarosegel gelegt, in Gelgröße eine Nylonmembran (Qiagen), zwei Lagen passendes Filterpapier und ca. 10 cm saugfähiges Küchentuch. Der Aufbau wurde mit 500 g Gewicht beschwert und über Nacht inkubiert. Der Erfolg des Transfers wurde durch eine erneute Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels überprüft. Die Nylonmembran wurde in Frischhaltefolie gelegt und die DNA 5 min auf einem Tansilluminator fixiert.

4.8.2 Markierung von DNA

Lösungen:

- (1): dig-11-dUTP [25 mM], Boehringer
- (2): dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je [100 mM], Promega
- (3): *Taq*-DNA-Polymerase [5 u/μL], Boehringer (inclusiv 10x Reaktionspuffer und 25 mM MgCl₂)

Die Markierung von DNA mit dig-11-dUTP durch PCR wurde nach Anleitung der Firma Boehringer durchgeführt. Sie diente zur Herstellung von Gensonden (*luc*, *lux*) für DNA-DNA-Hybridisierungen.

Dabei wurden zu hitzedenaturierter, einzelsträngiger Plasmid-DNA synthetisierte kurze DNA-Oligonukleotide (Primer) gegeben, damit die DNA-Polymerase in Gegenwart von Nukleotiden und dig-11-dUTP die Neusynthese der DNA katalysieren konnte. Nach anschließender Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide durch Gelelektrophorese und Isolierung der Sonde aus der Agarose, wurde sie für Hybridisierungen eingesetzt.

Reaktionsbedingungen in einem 0,5 mL Reaktionsgefäß:

10 µL	10x <i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer
6 µL	25 mM MgCl ₂
1,25 µL	<i>Taq</i> -Polymerase
1,0 µL	dATP, dGTP, dCTP [je 10 mmol·L ⁻¹]
5,0 µL	dig11-dUTP [2,5 mmol·L ⁻¹]
1,0 µL	5'-3' Primer [100 pmol·L ⁻¹]
1,0 µL	3'-5' Primer [100 pmol·L ⁻¹]
1,0 µL	1 ng Plasmid-DNA (pUT <i>lux</i> CDABE, pSUP202 <i>luc</i>)
71,8 µL	A. bidest.

Der Ansatz wurde anschließend mit 100 µL flüssigem Wachs überschichtet. Die Reaktionsansätze wurden 2 min bei 94 °C denaturiert und für 35 Zyklen von 25 sec/94 °C, 40 sec/54 °C, 40 sec/72 °C inkubiert, wobei nach dem letzten Zyklus 5 min bei 72 °C angehängt wurden. Die PCR-Reaktionsprodukte wurden bei -20°C für 5 min inkubiert. Das Wachs wurde dadurch hart und konnte so leicht entfernt werden. Weiterhin wurde die Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden durch Gelelektrophorese oder Microcon 100 Säulen (Amicon GmbH, Witten) gereinigt und der Einbau der dig dUTP-Nukleotide überprüft. Die Primersequenzen wurden nach GC-Gehalt, Abwesenheit von Sekundärstrukturen, Komplementarität und Größe des zu erwartenden Amplifikationsproduktes anhand der vorliegenden Sequenzinformationen mit Primer3-Software (ROZEN AND SKALETZKY, 2000) ausgewählt. Sie wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und nach Anweisung verdünnt. Folgende Oligonukleotide (in Klammern Ziel-DNA und Region der Hybridisierung) wurden verwendet:

Luc3b	5'-gaattcctctggatctactgggtt-3' (Luziferase-Gen aus <i>Photinus pyralis</i> , 775 - 799)
Luc2	3'-tgcaatcagagtgcctttggcga-3' (Luziferase-Gen aus <i>Photinus pyralis</i> , 1094 - 1070)
Lux X ₁ B1	5'-tcattacaactcatcatcctgtcc-3' (Luziferase-Gen B aus <i>Xenorhabdus lumineszens</i> , 5103 - 5127)
Lux X ₁ B2	5'-cccattaaagattagaggaatgc-3' (Luziferase-Gen B aus <i>Xenorhabdus lumineszens</i> , 5505 - 5481)

4.8.3 DNA-DNA-Hybridisierung

Lösungen:

Hybridisierungslösung: 5x SSC, 2 % Blockierungsreagenz, 0,1 Vol % N-Laurylsarkosin,
0,02 % SDS

Waschpuffer 1: 2x SSC, 0,1 % SDS

Waschpuffer 2: 0,1x SSC, 0,1 % SDS

Nylonmembranen mit fixierter DNA wurden direkt bei 68 °C in 20 mL Hybridisierungslösung eine h in einer Glasröhre vorhybridisiert. Alle weiteren Angaben beziehen sich auf 100 cm² Nylonmembran.

Nach 1 h wurde 2,5 mL Hybridisierungslösung mit zuvor hitzedenaturierter Sonden-DNA [10 ng/ 2,5mL] zugesetzt. Es wurde über Nacht bei 68 °C inkubiert. Die Hybridisierungslösung mit der nicht-radioaktiv markierten Sonden-DNA wurde bis zu fünf mal verwendet. Zum erneuten Denaturieren wurde die gesamte Lösung 10 min gekocht und 5 min auf Eis abgekühlt. Nach der Hybridisierung wurde unspezifisch gebundene DNA-Sonde abgewaschen und die Membran für zwei mal 5 min bei RT mit je 50 mL Waschpuffer 1 gewaschen, dann zwei mal 15 min bei 68 °C mit je 50 mL Waschpuffer 2. Anschließend erfolgte die Detektion mit Antikörpern.

4.8.4 Detektion mit Antikörpern

Lösungen:

Waschpuffer: 0,3 Vol% TWEEN20 in Nachweispuffer 1

Nachweispuffer 1: 0,1 mol·L⁻¹ Maleinsäure, 0,15 mol·L⁻¹ NaCl, pH 7,5

Nachweispuffer 2: 1 % Blockierungsreagenz in Nachweispuffer 1 bei 70 °C lösen

Nachweispuffer 3: 0,1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0,1 mol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ MgCl₂,
pH 9,5

Konjugat: 100 µL polyklonale Schaf-Anti-Digoxygenin-F_{ab}-Fragmente,
konjugiert an alkalische Phosphatase (750 U·mL⁻¹), 1:10 000
verdünnen (5 mL pro 100 cm² Nylonmembran)

Farbnachweis: 45 µL Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (NBT) und 35 µL 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-Toluidin-Salz (X-Phosphat) in 10 mL Puffer 3 lösen, immer frisch zubereitet.

Chemilumineszens-Nachweis: [25mM] CSPD 1:100 in Nachweispuffer 3 verdünnen.

Zur Detektion der markierten DNA wurde die Membran kurz in Waschpuffer geschwenkt und 30 min bei RT in 10 mL Nachweispuffer 2 leicht geschüttelt. Weiterhin wurde der Southern-Blot in 20 mL Puffer 2 mit 2 μ L Anti-dig-AP-Konjugat inkubiert und zwei mal 15 min mit Waschpuffer von nicht gebundenen Antikörpern abgewaschen. Anschließend wurde die Membran kurz in Nachweispuffer 3 äquilibriert. Nach Zugabe von 10 mL Nachweispuffer 3 mit 45 μ L NBT und 35 μ L X-Phosphat wurde mindestens 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion kann durch Zugabe von Wasser gestoppt werden. Dann wurde die Membran getrocknet und fotografiert. Bei der Verwendung von CSPD als Substrat, wurde die Nylonmembran in Frischhaltefolie 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend ein Röntgenfilm X-OMAT von Kodak aufgelegt.

5. VERSUCHE MIT BODENTIEREN

5.1 Prinzip der Modellversuche

5.1.1 Futterherstellung

Die Donorsuspensionen wurden in 75 ml LB mit dem für das Plasmid entsprechendem Antibiotikum (siehe 3.2) über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 2700x g bei 4 °C konzentriert und nach einmaligem Waschen in 2 mL 0,85 % NaCl Lösung resuspendiert und bis zum Versuchsansatz bei 4°C gelagert. Für Bakterienkreuzungen wurden 200 μ L dieser Donorsuspension mit extrahierten Kotbakterien im Reaktionsgefäß vermischt oder zur Verwendung in Fütterungsexperimenten auf einen YTP-Agarblock pipettiert. In *L. rubellus* - Fütterungsexperimenten wurde 200 μ L Donorsuspension für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, mit dem gleichen Volumen 0,1 % Hexametaphosphat gewaschen und in 33 mL resuspendiert. Diese mediumfreie Zellsuspension wurde für Mikrokosmosexperimente eingesetzt.

5.1.2 Bakterienkreuzungen auf Filtermembranen

Für Untersuchungen mit Collembolen wurde in einer Petrischale mit Wasseragar in der Mitte ein YTP-Agarblock als Nährstoffquelle ohne Donorstamm plaziert. Die so vorbereitete Petrischale wurde mit 100 (*F. candida*) oder 50 (*O. fimatus*) adulten Individuen bei 18 °C für 10 bzw. 14 d im Dunkeln inkubiert. Der YTP-Agarblock wurde anschließend zusammen mit den Individuen entnommen und der auf der Wasseragaroberfläche liegende Kot mit 1 mL 0,85 % NaCl resuspendiert. Der Vorgang wurde einmal wiederholt, und die vereinigten Extrakte in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2700x g wurde

der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Präzipitat mit 200 µl Donorzellen-haltiger Suspension vermischt. Die Mischung aus Kot und Donorzellen wurde auf eine LB-Agarplatte mit einem HybondN-Nylonfilter (8,2 cm Durchmesser, Amersham) überführt und 24 h bei 28 °C inkubiert. Es wurde für jede Collembolenart zwei Parallelen angesetzt.

Der Kot von *L. rubellus* musste in einer anderen Weise gesammelt werden. Das vorbereitete Versuchsbodenmaterial (siehe 2.1) wurde in eine Glasküvette (10 x 10 cm) gefüllt (siehe Abbildung 2) und mit Leitungswasser befeuchtet. Ein Wurm und ein zerkleinertes, trockenes Birkenblatt wurden in die Glasküvette gegeben und diese aufrecht bei 18 °C bis zu einer Woche inkubiert. Der auf der Bodenoberfläche abgelegte Kot wurde aus der Glasküvette in ein Plastikschraubgefäß überführt.

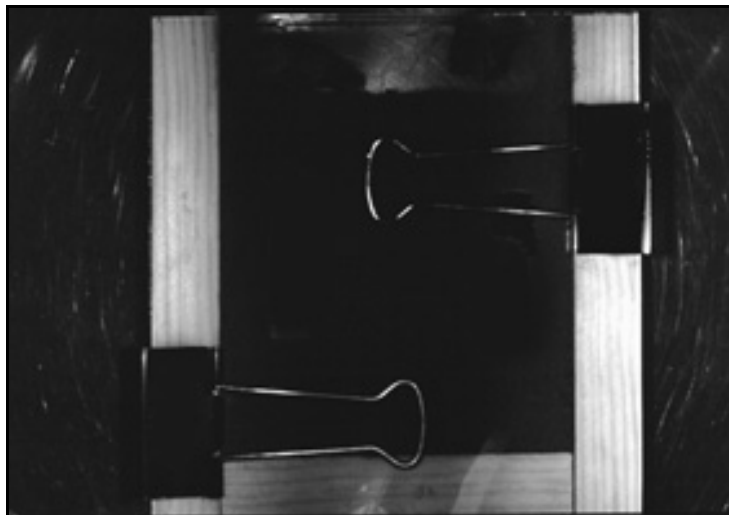


Abbildung 2

Glasküvette nach SCHRADER UND JOSCHKO (1991) zur Sammlung des Kots aus *L. rubellus* für bakterielle Kreuzungen auf Nylonmembranen

Jeweils 2 g gesammelter Kot wurden mit 20 mL 0,1 % Hexametaphosphat 2 min auf höchster Stufe vermischt und anschließend 10 min stehen gelassen. Aus dem Überstand wurden Verdünnungsreihen bis 10^{-8} angelegt und vier verschiedene Verdünnungsstufen zur Bestimmung der Anzahl kultivierbarer Bakterien auf zwei verschiedenen Komplexnährböden (LB und PCA) und einem Minimalnährboden mit $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Benzoesäure plattiert. Für Bakterienkreuzungen wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Das Sediment wurde mit 200 µl Donorzellensuspension vermischt und in die Mitte einer Nylonmembran pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C. Die Ansätze erfolgten für jedes Bodentier in zwei Parallelen.

5.1.3 Fütterungsexperimente

Auf einem YTP-Agarblock wurden 200 μl *E. coli* S17-1/pRP4*luc* als Donorstamm pipettiert und zur Verdunstung der Salzlösung unter einer Sterilbank 30 min stehen gelassen. Nach der mittigen Plazierung in einer Wasseragar-Petrischale wurden 100 Individuen von *F. candida* oder 50 Individuen von *O. fimatus*, die zuvor aus der Zucht genommen und für 24 h ausgehungert wurden, in die Wasseragar-Petrischalen gesetzt (siehe Abbildung 3). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 18 °C für bis zu 14 d. Am 7. d wurde der alte Futterblock durch einen neuen ersetzt, um die abgeweideten Donorzellen zu ersetzen. Für die tägliche Probenahme des Kotes zur Detektion biolumineszenter Darmbakterien wurde der Futterblock steril auf eine frische Wasseragar-Petrischale überführt und die Individuen umgesetzt. Als Negativkontrolle diente ein YTP-Block mit 200 μL steriler 0,85 % NaCl. Alle Versuche wurden in 2 – 3 Parallelen angesetzt.

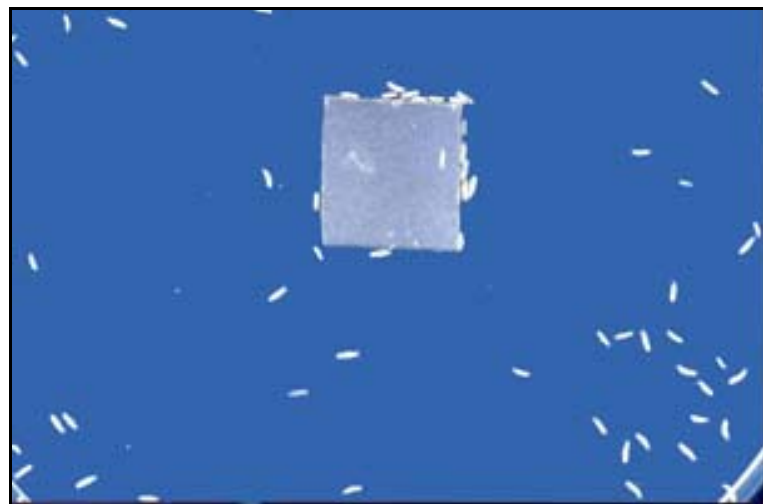


Abbildung 3

Darstellung der Wasseragar-Petrischale für Fütterungsexperimente mit Collembolen

Für Untersuchungen mit *L. rubellus* wurde die Donorstamm-Suspension zu 200 g des trockenen, gesiebten Versuchsbodens gegeben und mit einem Spatel vermischt. Die Oberfläche wurde anschließend geglättet und ein Zellstofftuch aufgelegt, um später den abgelegten Kot ohne Kontamination durch den Donorboden absammeln zu können. Ein zerkleinertes, trockenes Birkenblatt diente dem Wurm als Futter. Die Inkubation der Kulturgefäße erfolgte zwei Wochen bei 12°C. Täglich wurde von der Bodenoberfläche der abgelegte Kot in 12 mL Plastik-Schraubgefäße gesammelt. Das Gewicht des feuchten Kots wurde bestimmt und pro g Feuchtgewicht 10 mL 0,1 % Hexametaphosphat zur Analyse des Kots zugesetzt.

Weitere Fütterungsversuche mit anderen Donorstämmen, die mobilisierbare oder nicht-konjugative und nicht-mobilisierbare Plasmide enthielten, wurden in gleicher Weise angesetzt. Der abgelegte Kot auf der Wasseragar-Oberfläche und auf der Versuchsboden-Oberfläche wurde erst nach 7 und 14 Tagen analysiert.

5.1.4 Analyse des Kots aus den Modellversuchen

Die aus den Bakterienkreuzungen erhaltenen Nylonmembranen wurden nach der Inkubation mit zwei Pinzetten steril in 50 mL Falcon-Plastikschraubgefäße überführt. Die Mischung aus Kotbakterien und Donorzellen wurde mit 2 mL 0,85 % NaCl für Collembolen und 2 mL 0,1 % Hexametaphosphat für *L. rubellus* durch kräftiges Mischen von der Nylonmembran abgeschwemmt. Anschließend wurden Verdünnungsreihen bis 10^{-8} angelegt.

Der Kot aus den Fütterungsversuchen mit Collembolen wurde nach Entfernung der Individuen und des YTP-Agarblocks mit 2x 1 mL 0,85 % NaCl auf der Wasseragar-Oberfläche resuspendiert und in einem 2 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Die Extraktion der Kotbakterien aus Fütterungsexperimenten mit *L. rubellus* erfolgte durch zweiminütiges Mischen der 12 mL Plastik-Schraubgefäße und zehnminütiges dekantieren. Aus den Kotbakterien-Suspensionen wurden Verdünnungsreihen bis 10^{-6} hergestellt.

Vier verschiedene Verdünnungsstufen wurden zur Bestimmung der Zellzahlen auf Voll- und Minimalnährböden plattiert. Zur Bestimmung der Gesamtzell- und Donorzellzahl wurde LB für 2 d und der Rezipienten- und Transkonjugantenzahlen auf Minimalmedien für 4 d bei 28 °C inkubiert. Mit Donor- und Transkonjugantennährböden wurde ein Biolumineszenztest (siehe 4.7.1) durchgeführt. Transkonjuganten aus Bakterienstämmen mit *lacZ*-haltigen Plasmiden wurden auf X-Gal/IPTG-haltigen Nährböden an der Blaufärbung identifiziert. Lumineszente oder blaue Transkonjuganten wurden weiterhin durch ARDRA (4.7.3), Biolog Identifizierungssystem (4.7.4) und 16S rDNA-Sequenzierung (4.7.5) näher charakterisiert.

5.2 Plasmidtransfer in *F. candida* (Isotomidae, Collembola)

Anhand des Fütterungsexperiments mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* und täglicher Probenahme über 14 d oder einer Bakterienkreuzung wurde der Einfluss verschiedener Parameter getestet. Dafür mussten die oben erwähnten Experimentansätze etwas variiert werden. Die für die jeweiligen Versuchsvarianten wichtigen Änderungen sind nachfolgend stichwortartig erklärt.

Inhibierung des konjugativen Transfers

Bei Plasmiden mit hohem Transferpotential, wie z.B. pRP4*luc*, ist bei langen Inkubationszeiten aufgrund des „Plate Mating“-Effekts eine zusätzliche Kontrolle nötig, um

den Ort des Gentransfers (Darm oder Selektionsnährboden) zu ermitteln. Dafür wurde zu einem Teil der Nährböden Nalidixinsäure gegeben. Dieses Antibiotikum hemmt die Zellteilung und verhindert die Konjugation (SMIT AND VAN ELSAS, 1995).

In einem Vorversuch wurden für den Donorstamm S17-1/pRP4*luc* und 8 verschiedene Transkonjuganten die Konzentration an Nalidixinsäure bestimmt, bei der gerade noch ein Wachstum nachzuweisen war. Dafür wurden Reagenzgläser mit 5 mL LB-Medium und unterschiedlichen Konzentrationen an Nalidixinsäure versetzt (von 0 bis 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Diese wurden mit einer stationären Kultur des Donorstammes 1:100 verdünnt angeimpft und bei 30°C inkubiert. War die Wachstumskontrolle ohne Nalidixinsäure bis zu einer o.D._{600nm} von 1,0 gewachsen, wurde bei allen Reagenzgläsern die optische Dichte im Photometer gemessen. Anschließend wurden die Werte graphisch dargestellt und der Wert extrapoliert, bei dem das Wachstum gerade inhibiert wurde (Minimale Hemmkonzentration).

Zur Untersuchung des „Plate Mating“ - Effekts wurde in Bakterienkreuzungen auf Filtermembranen mit S17-1/ pRP4*luc* und Kot aus *F. candida* folgende Versuche angesetzt: 1. Donor- und Rezipientenzellen gemischt; 2. Donorzellen alleine; 3. Rezipientenzellen alleine und 4. Donor- und Rezipientenzellen auf einer LB-Agarplatte mit [10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] Nalidixinsäure.

Untersuchung der ganzen *F. candida* Individuen

Vor der Analyse der Transkonjuganten im abgelegten Kot auf der Oberfläche der Wasseragar-Petrischalen am Ende des zweiwöchigen Fütterungsexperiments mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* wurden die *F. candida* Individuen mit CO₂-Gas betäubt, gezählt und für weitere Analysen bei -20 °C aufbewahrt. Die Reaktionsgefäße wurden kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und die Individuen mit einem Mikropistill zermörsert. Das Mikropistill wurde mit 1 mL 0,85 % NaCl abgespült und Verdünnungsreihen angelegt. Zur Analyse der Bakteriensuspensionen wurde weiterhin der Beschreibung unter 5.1.4 gefolgt.

Einfluss der Tiergröße auf die Plasmidtransferrate

Die unterschiedlichen Tiergrößen und damit verschiedene Entwicklungsstadien wurden durch Siebe unterschiedlicher Maschenweite (0,06; 0,2 und 0,8 mm) getrennt. Jeweils 60 statt 100 Individuen wurden in 2 Parallelen angesetzt. Die Inkubation erfolgte 6 d bei 18 °C. Nach Beendigung des Versuchs wurden dieselben Individuen 24 h auf einer frischen Wasseragar-Petrischale ohne YTP-Agarblock bei 18 °C gehalten, um den innerhalb eines Tages abgelegten Kot auf biolumineszente Bakterien zu untersuchen.

Tabelle 2

Übersicht der Experimente mit *F. candida*.

Test	Inkubation	<i>E. coli</i> -Donorstämme	Auswertung nach
Bakterienkreuzung	24 h/ 28 °C	S17-1/pUC18 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pSUP102 <i>lacZ</i> Tn5:B20	1 d
		S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pSUP104 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pRP4 <i>luc</i>	1 d
		HB101/pSUP104 <i>luc</i>	1 d
		NM522/pSUP104 <i>luc</i>	1 d
		NM522/pSUP104 <i>luc</i> +S17-1	1 d
		S17-1 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxAB</i>	1 d
		CC118 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxAB</i>	1 d
		CC118 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxAB</i> +S17-1	1 d
Mit Nalidixinsäure	24 h/ 28 °C	S17-1/pRP4 <i>luc</i>	1 d
Fütterung	14 d/ 18 °C	S17-1/pUC18 <i>luc</i>	7 d + 14 d
		S17-1/pSUP102 <i>lacZ</i> Tn5:B20	7 d + 14 d
		S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	7 d + 14 d
		S17-1/pSUP104 <i>luc</i>	7 d + 14 d
		S17-1/pRP4 <i>luc</i>	7 d + 14 d
		HB101/pSUP104 <i>luc</i>	7 d + 14 d
		NM522/pSUP104 <i>luc</i>	7 d + 14 d
		NM522/pSUP104 <i>luc</i> +S17-1	7 d + 14 d
		S17-1 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxAB</i>	7 d + 14 d
		CC118 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxAB</i>	7 d + 14 d
		CC118 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxAB</i> +S17-1	7 d + 14 d
Fütterung	14 d/ 18 °C	S17-1/pRP4 <i>luc</i>	Jedem Tag
Individuen	14 d/ 18 °C	S17-1/pRP4 <i>luc</i>	14 d
Versch. Tiergrößen	14 d/ 18 °C	S17-1/pRP4 <i>luc</i>	14 d
Fütterung	7 d/ 18 °C	<i>S. cerevisiae</i> /p707 <i>luc</i>	7 d
		S17-1/ p707 <i>luc</i>	7 d
		NM522/p707 <i>luc</i>	7 d
		HB101/p707 <i>luc</i>	7 d

Fütterungsexperiment mit dem nicht-konjugativem und nicht-mobilisierbaren Plasmid p707*luc*

Je eine biolumineszente Kolonie von *E. coli* NM 522, HB101 bzw. S17-1/p707*luc* in jeweils 75 mL LB mit Ampicillin ($100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) überführt. *Saccharomyces cerevisiae*/p707*luc* wurde in SD-Medium angezogen. Die Donorstämme wurden von Medium frei gewaschen und in 2 mL 0,85 % NaCl konzentriert. Je 100 adulte Individuen *F. candida* wurden in zwei

Parallelen mit YTP-Futterblöcken und je 200 µl der konzentrierten Donorstämme gefüttert. Die Inkubationsdauer bei 18 °C betrug 14 d. Es wurde wie unter 5.1.1 beschrieben auf biolumineszente Transformanten getestet. Statt LB-Agar wurde jedoch für dieses Experiment ENDO-Agar als Selektionsmedium verwendet. So war eine bessere Unterscheidung von *E. coli* zu den anderen Bakterien möglich. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Tests.

5.3 Plasmidtransfer in *O. fimatus* (Onychiuridae, Collembola)

Tabelle 3

Überblick der Versuche mit *O. fimatus*.

Test	Inkubation	<i>E. coli</i> -Donorstämme	Auswertung nach
Bakterienkreuzung	24 h/ 28°C	S17-1/pUC18 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pSUP104 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pRP4 <i>luc</i>	1 d
		HB101/pSUP104 <i>luc</i>	1 d
		S17-1 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxCDABE</i>	1 d
Fütterung	14 d/ 12°C	S17-1/pUC18 <i>luc</i>	14 d
		S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	14 d
		S17-1/pSUP104 <i>luc</i>	14 d
		HB101/pRP4 <i>luc</i>	14 d
		HB101/pSUP104 <i>luc</i>	14 d
		S17-1 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxCDABE</i>	14 d
Fütterung	14 d/ 12°C	S17-1/pRP4 <i>luc</i>	Jedem Tag

5.4 Plasmidtransfer in *L. rubellus* (Lumbricidae, Oligochaeta, Annelida)

Tabelle 4

Übersicht der durchgeführten Modellversuche mit *L. rubellus*.

Test	Inkubation	<i>E. coli</i> -Donorstämme	Auswertung nach
Bakterienkreuzung	24 h/ 28°C	S17-1/pUC18 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pSUP104 <i>luc</i>	1 d
		S17-1/pRP4 <i>luc</i>	1 d
		HB101/pSUP104 <i>luc</i>	1 d
		S17-1 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxCDABE</i>	1 d
Fütterung	14 d/ 12°C	S17-1/pUC18 <i>luc</i>	14 d
		S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	14 d
		S17-1/pSUP104 <i>luc</i>	14 d
		HB101/pRP4 <i>luc</i>	14 d
		HB101/pSUP104 <i>luc</i>	14 d
		S17-1 λ <i>pir</i> /pUT <i>luxCDABE</i>	14 d
Fütterung	14 d/ 12°C	S17-1/pRP4 <i>luc</i>	Jedem Tag

6. STATISTISCHE ANALYSEN

Die statistische Analyse ermittelter Werte aus Bakterienkreuzungen auf Filtermembranen und Fütterungsexperimente mit Probenahme am 7. und 14. d wurde durch arithmetische Mittelwerte auf Grundlage von 2 Ansätzen mit Hilfe Microsoft Excel 97 gebildet. Bei den ermittelten Werten aus Fütterungsexperimenten mit zeitlicher Abfolge (n=14) wurden arithmetische Mittelwerte auf Grundlage von 3 Ansätzen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Zusätzlich wurden Signifikanzunterschiede durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) durchgeführt, da die Werte nicht einer Normalverteilung folgen und die Wertemenge $n < 30$ ist (FELIX BÄRLOCHER, 1999).

C. ERGEBNISSE

1. KONSTRUKTION BIOLUMINESZENTER PLASMIDE

Darmbakterien in Bodentieren sind gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent. Daher wurde zur Erkennung von Transkonjuganten neben selektierbaren, plasmidkodierten Antibiotikaresistenzen auch kernkodierte Markergene verwendet. Die Plasmide in den Donorstämmen enthielten entweder das *lacZ*-, *luxAB*-, *luxCDABE*- oder das *luc*-Gen. Einige Plasmide standen bereits zu Beginn der Untersuchungen zur Verfügung, andere wurden hergestellt. Dafür wurde aus pSUP202*luc* die *nptII* Promotor-*luc*-Genkassette mit *Hind*III als 2,3 Kb großes Fragment herausgespalten und in die ebenfalls *Hind*III gespaltenen Plasmide pUC18, pSUP104 und p707 ligiert. In Abbildung 4 sind die entstandenen Plasmide dargestellt.

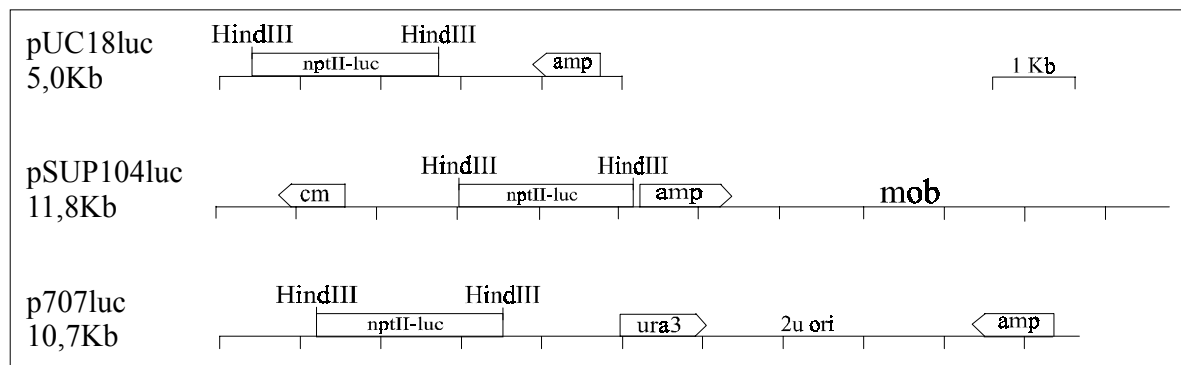


Abbildung 4

Kartierung der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide (*NptII-luc* - Konstitutiver Promotor der Neomycinphosphotransferase des Transposons Tn5; *amp* - Ampicillin; *cm* - Chloramphenicol; *mob* - Gen für die Mobilisierung des Plasmids)

Die Plasmide wurden durch Elektroporation in verschiedene *E. coli* Stämme gebracht. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Elektroporationen dargestellt.

Nicht alle putativen Transformanten waren im Biolumineszenztest positiv, wuchsen aber auf den Selektionsnährböden. Eine mit diesen Kolonien durchgeführte Miniplasmidpräparation und anschließender Restriktionsanalyse ergab eindeutig, dass sie die transformierten Plasmide enthielten. Lediglich eine Biolumineszenz konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Bakterienkolonien wurden für weitere Experimente nicht mehr berücksichtigt. Die Plasmide von *luc*⁺ Transformanten (Tabelle 5) wurden isoliert und durch Restriktionsanalyse mit *Hind*III überprüft. Das Einfügen der Genkassette konnte so bestätigt werden. Die Orientierung der Genkassette wurde dabei außer Acht gelassen, da die Expression des Gens in beiden Orientierungen erfolgte.

Tabelle 5

Ergebnisse der erhaltenen Bakterienzellzahlen nach Transformationen der Plasmide in *E. coli*-Stämme (Mittelwerte aus 2 - 6 Agarnährböden)

Erhaltene <i>E. coli</i> -Donorstämme	Rezipienten	Putative Transformanten ¹	Luc ⁺ -Transformanten	Ausbeute luc ⁺ /Rezipient
		[cfu·mL ⁻¹]		[%]
S17-1/pUC18 <i>luc</i>	$2,8 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^{-3}$
S17-1/pSUP104 <i>luc</i>	$4,9 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^1$	$0,6 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^{-5}$
S17-1/p707 <i>luc</i>	$5,6 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^3$	$0,7 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^{-4}$
HB101/pUC18 <i>luc</i>	$8,4 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^{-4}$
HB101/pSUP104 <i>luc</i>	$1,1 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-4}$
NM522/pSUP104 <i>luc</i>	$2,7 \cdot 10^8$	$6,7 \cdot 10^2$	$6,7 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^{-4}$
S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	$7,2 \cdot 10^7$	$4,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^{-2}$
HB101/p707 <i>luc</i>	$1,4 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^{-4}$

¹ Alle auf Selektionsnährböden gewachsenen Kolonien

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis eines Biolumineszenztests mit selektierten Transformanten aus der Transformation von pSUP104*luc* in *E. coli* S17-1, die auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend mit dem Substrat Luziferin und einem Röntgenfilm inkubiert wurden. Der Röntgenfilm zeigt nach der Entwicklung mehr oder weniger schwarz gefärbte Punkte.

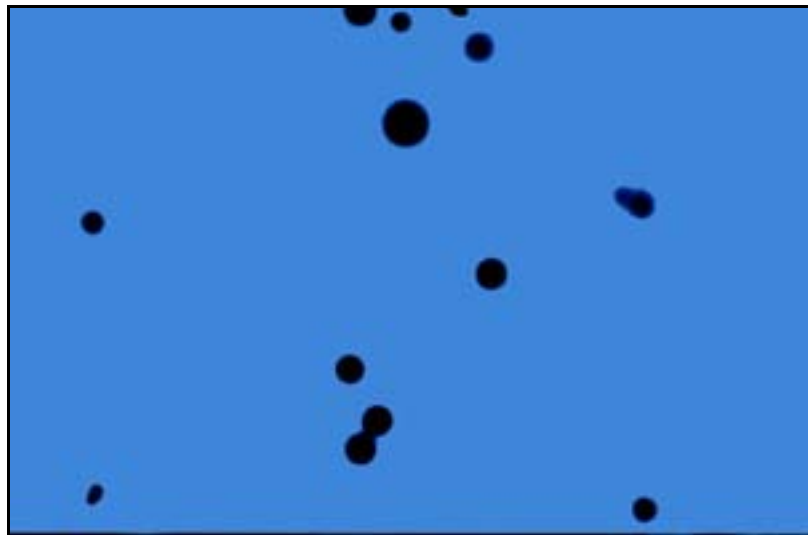


Abbildung 5

Röntgenfilm mit luc⁺-Transformanten aus der Transformation von pSUP104*luc* in *E. coli* S17-1

Das mobilisierbare Plasmid pSUP104*luc* wurde in zwei weitere *E. coli*-Stämme, einem mobilisierenden (*E. coli* S17-1) und einem nicht-mobilisierenden (*E. coli* HB101),

transformiert. Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, dass weitere Transformationen mit pUC18*luc* in *E. coli* HB101, pSUP202*luc* in *E. coli* S17-1 und p707*luc* in *E. coli* HB101 erfolgreich durchgeführt wurden. Biolumineszente Einzelkolonien wurden in flüssigem LB-Medium unter Selektionsdruck vermehrt und nach Auswaschen des Mediums und Konzentrierung als Futter (Donorstamm) für die Bodentiere verwendet.

2. PLASMIDTRANSFERVERSUCHE MIT BODENTIEREN

Für Plasmidtransferexperimente sind geeignete Versuchsbedingungen, die Probenahme und die Verarbeitung des Kotes wesentliche Voraussetzungen. Die Anzucht der Collembolen unter sterilen Bedingungen und Reduzierung der Darmbakterien mit Antibiotika erwies sich als ungeeignet. Solche Versuchsbedingungen entsprechen auch nicht den natürlichen Gegebenheiten. Die herangezogenen Collembolen beweideten Hefen und Pilzhyphen lieber als Bakterien. Daher erwies sich eine 24 h Hungerperiode vor jedem Experiment als vorteilhaft. So wurden die Donorbakterien als Futter angenommen. Kreuzungs- sowie Fütterungsexperimente wurden zuerst mit *F. candida* etabliert und dann auf *O. fimatus* und *L. rubellus* übertragen.

2.1 Isolierung von Transkonjuganten aus dem Darm von *F. candida* (Isotomidae, Collembola)

2.1.1 Transfer von Plasmiden in einer Mischung aus *E. coli*-Donorstämmen und Kotbakterien aus *F. candida* auf Nylonfilter

Kreuzungsexperimente mit *E. coli* Donorstämmen und Bakterienextrakten aus gesammeltem Kot von *F. candida* sollten Daten zum Transferpotential der verschiedenen Plasmide unter optimalen Laborbedingungen liefern. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Die Gegenselektion der Donorbakterien wurde auf Minimalmedium durch Zugabe von 2,5 mmol·L⁻¹ Benzoesäure erreicht. Diese alleinige C-Quelle kann *E. coli* nicht nutzen. Tabelle 6 zeigt, dass fast alle potentiellen Rezipienten (93,3 ± 6,8 %) auf benzoessäurehaltigem Minimalmedium im Vergleich zu den kultivierbaren Kotbakterien (Gesamtzellzahl auf Vollmedium) wachsen können. Insgesamt wurden sechs verschiedene Plasmide auf ihr Transferpotential getestet. Dabei befand sich pSUP104*luc* in drei verschiedenen *E. coli* Stämmen, einem nicht-mobilisierenden (*E. coli* HB101), einem mobilisierenden mit einem chromosomal integrierten IncP-Plasmid (*E. coli* S17-1) und einem mobilisierenden mit einem IncQ-Plasmid (*E. coli* NM522). Das Plasmid pUT*lux*AB wurde in den mobilisierenden

E. coli Stamm S17-1 λ Pir und den nicht-mobilisierenden Stamm CC118 λ Pir transformiert (Tabelle 6).

Tabelle 6

Plasmidtransfer in Bakterienkreuzungen mit Kot aus *F. candida* und *E. coli* Donorstämmen und auf Nylonmembranen nach einer Inkubation von 24 h bei 28 °C (Mittelwerte aus 3 Agarnährböden)

<i>E. coli</i> Donorstamm	Plasmid	Bakterienzellzahlen [Log10 cfu · Filter ⁻¹]				Plasmidtransferrate	
		Gesamtzell- zahl	Rezipienten	Donoren	Trans- konjuganten	Transkonjuganten pro Rezipienten	Donoren
S17-1	pUC18 <i>luc</i> (n=2)	9,2 ± 0,10	8,7 ± 0,04	8,8 ± 0,04	n.d.	<1,0 · 10 ⁻⁹	<1,0 · 10 ⁻⁹
	pSUP102 <i>lacTn5</i> :B20	10,3	10,2	7,8	5,0	6,4 · 10 ⁻⁶	1,6 · 10 ⁻³
	pSUP202 <i>luc</i> (n=2)	10,3 ± 0,05	10,2 ± 0,10	8,4 ± 0,09	n.d.	<6,3 · 10 ⁻¹¹	<4,0 · 10 ⁻⁹
	pSUP104 <i>luc</i> (n=2)	10,4 ± 0,01	9,7 ± 0,10	6,5 ± 0,02	6,6 ± 0,08	7,9 · 10 ⁻⁴	1,3
	pRP4 <i>luc</i> (n=3)	9,4 ± 0,3	9,4 ± 1,32	8,2 ± 0,62	7,6 ± 1,23	1,6 · 10 ⁻²	2,5 · 10 ⁻¹
HB101	pSUP104 <i>luc</i>	9,4	8,4	8,6	n.d.	<3,0 · 10 ⁻⁹	<2,0 · 10 ⁻⁹
NM522	pSUP104 <i>luc</i>	9,7	9,1	9,2	6,9	6,2 · 10 ⁻³	5,6 · 10 ⁻³
NM522 + S17-1	pSUP104 <i>luc</i>	9,8	9,1	8,8	6,9	6,4 · 10 ⁻³	1,2 · 10 ⁻²
S17-1 λ Pir	pUT <i>luxAB</i>	8,6	8,4	4,7	n.d.	<3,0 · 10 ⁻⁹	<1,8 · 10 ⁻⁵
CC118 λ Pir	pUT <i>luxAB</i>	10,4	9,4	9,2	n.d.	<4,5 · 10 ⁻¹⁰	<7,1 · 10 ⁻¹⁰
CC118 λ Pir + S17-1	pUT <i>luxAB</i>	9,3	7,1	7,3	n.d.	<7,5 · 10 ⁻⁸	<5,0 · 10 ⁻⁸

n.d. - nicht detektiert; n - bezeichnet die mehrfache Wiederholung der Bakterienkreuzungen

Die Transferraten wurden aus Divisionen von cfu der Transkonjuganten zu Donorzellen bzw. Transkonjuganten zu Rezipientenzellen errechnet. Hohe Transferraten von $2 \cdot 10^{-2}$ Transkonjuganten pro Rezipienten konnten mit dem konjugierbaren Plasmid pRP4*luc* und $8 \cdot 10^{-4}$ Transkonjuganten pro Rezipienten mit dem mobilisierbaren Plasmid pSUP104*luc* aus *E. coli* S17-1 verzeichnet werden. Beide Plasmide können sich in einem weiten Wirtsbereich replizieren. Das Plasmid pSUP104*luc* wurde aus *E. coli* S17-1, einem Stamm mit chromosomal integriertem Transfergen (*tra*) des IncP Plasmids pRP4, mobilisiert. Es konnte aber auch aus dem F⁺ Plasmid enthaltenen Stamm *E. coli* NM522 auf Darmbakterien übertragen werden, wobei die Transferrate weniger effizient war. Aus dem nicht-mobilisierenden *E. coli* HB101 konnten keine Transkonjuganten mit pSUP104*luc* detektiert werden. In einer Kreuzung mit einem schwach mobilisierendem *E. coli* NM522/pSUP104*luc* als Donor und dem mobilisierendem Stamm *E. coli* S17-1 als Helfer und den Kotbakterien aus *F. candida* als Rezipienten („triparentales Mating“) konnten im Vergleich zu *E. coli* NM522/pSUP104*luc* alleine eine signifikant höhere Transferrate ($p < 0,01$) festgestellt werden. Vergleicht man in Tabelle 6 den Plasmidtransfer von *E. coli* S17-1/pSUP104*luc* und

NM522/pSUP104*luc*, liegen die Übertragungsraten beim letzteren *E. coli* Stamm um eine Zehnerpotenz höher. Ein Derivat des Plasmids pBR325, pSUP202, der einen engen Wirtsbereich für *E. coli* und Verwandte besitzt, konnte nicht auf Darmbakterien übertragen werden. Auch mit dem Klonierungsvektor pUC18*luc* (enger Wirtsbereich, *mob*⁻, *tra*⁻) konnte kein Transfer auf Darmbakterien nachgewiesen werden. In den Kreuzungsversuchen mit dem mobilisierenden Stamm S17-1λPir, dem nicht mobilisierenden Stamm CC118λPir und dem miniTn5 enthaltenen pUT*luxAB* (weiter Wirtsbereich) erfolgen keine Transkonjugationen (in Tabelle 6 mit n.d., das bedeutet nicht detektiert, bezeichnet). Hier sollten nach Übertragung des Plasmids in den Transkonjuganten Transpositionereignisse ins Genom der Darmbakterien stattfinden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Transkonjuganten auch deshalb detektierbar waren, weil sie sich bei einer frühen Entstehung im Zuge der 24 h Inkubation vermehren konnten. Die Transferrate über 1 in der Kreuzung von Kotbakterien mit *E. coli* S17-1/pSUP104*luc* (Tabelle 6) können auf solch eine Vermehrung von früh entstandenen Transkonjuganten zurückzuführen sein.

2.1.2 Lokalisierung des Plasmidtransferortes durch den Nährbodenzusatz Nalidixinsäure

In den verwendeten Methoden zur Untersuchung des Plasmidtransfers ist die Inkubation von Donor-Rezipientensuspensionen auf komplexen Nährböden unabdingbar. Um den Ort des Plasmidtransfers zu lokalisieren, wurde eine Filterkreuzung durchgeführt, in der *E. coli* S17-1/pRP4*luc* und Kotbakterien 24 h getrennt inkubiert und erst vor dem Plattieren gemischt wurden. Hier konnten keine biolumineszenten Transkonjuganten nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass durch die mehrtägige Inkubation auf Selektionsnährböden keine Konjugation stattgefunden hatte.

Um die Entstehung von Transkonjuganten im Darm oder dem abgelegten Kot nachzuweisen, wurde ein anderes Experiment mit der Verfütterung von *E. coli* S17-1/pRP4*luc* an *F. candida* Individuen über einen Zeitraum von 7 d durchgeführt. Dabei wurde in einer Wasseragar-Petrischale Nalidixinsäure zugesetzt. Die gewählte Nalidixinsäure-Konzentration (10 µg·mL⁻¹) inhibiert das Wachstum von *E. coli* S17-1/pRP4*luc*. Die minimale Hemmkonzentration von acht verschiedenen Transkonjuganten, die aus verschiedenen Experimenten gesammelt wurden, lag zwischen 1 - 50 µg·mL⁻¹ Nalidixinsäure. Die Hälfte der getesteten Transkonjuganten konnte auf 10 µg·mL⁻¹ Nalidixinsäure wachsen.

Tabelle 7

Effekt von Nalidixinsäure (Nal) [$10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] auf die Extraktion der Kotbakterien von der Wasseragar-Oberfläche aus 2 Fütterungsexperimenten mit *F. candida* Individuen am 14. Tag (Mittelwerte aus 3 Agarnährböden)

<i>E. coli</i> Donorstamm	Plasmid	Nal	Bakterienzellzahlen [$\log_{10} \text{cfu} \cdot \text{Individuum}^{-1}$]				Plasmidtransferrate Transkonjuganten pro Rezipienten
			Gesamtzellzahl	Rezipienten	Donoren	Transkonjuganten	
S17-1	pRP4/luc	Ohne	$6,4 \pm 0,00$	$6,0 \pm 0,14$	$0,1 \pm 1,88$	$0,2 \pm 1,90$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
S17-1	pRP4/luc	Mit	$6,1 \pm 0,07$	$5,6 \pm 0,07$	n.d.	$-0,4 \pm 0,50$	$1,0 \cdot 10^{-6}$

n.d. - nicht detektierbar

Tabelle 7 zeigt, dass im Ansatz mit Nalidixinsäure die Zahl der gesamten kultivierbaren Bakterien und Rezipienten um 0,5 Zehnerpotenzen signifikant reduziert wurden. Das Ergebnis deckt sich mit dem der minimalen Hemmkonzentration der acht auf Nalidixinsäure getesteten Transkonjuganten. Es konnten keine biolumineszenten Donorzellen mehr nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Nalidixinsäure das Wachstum der Donorzellen vollständig unterdrückt hatte. Luc-positive Transkonjuganten wurden in Ansätzen mit und ohne Nalidixinsäure detektiert, wobei ohne Nalidixinsäure wesentlich mehr biolumineszente Transkonjuganten isoliert werden konnten. Im Darm der Bodentiere entstehen Transkonjuganten, die sich nach dem Ausscheiden auf der Agaroberfläche noch geringfügig vermehren können.

2.1.3 Plasmidtransfer auf im Darm von *F. candida* lebende Bakterien durch Fütterungsexperimente

Alle *E. coli* Donorstämme, die in den Filterkreuzungen (2.1.1) aufgezählt sind, wurden an *F. candida* Individuen verfüttert. Die Bakterien im Kot wurden nach 7 bzw. 14 d Inkubation auf biolumineszente Transkonjuganten untersucht. Im Verlauf der Fütterungsexperimente, die mit 100 Individuen pro Wasseragar-Petrischale gestartet wurden, starben täglich 1 - 2 Individuen. Nach 7 d waren noch 91 ± 8 (n=12) Individuen in den Fütterungsarenen am Leben, nach 14 d nur noch 72 ± 21 . Aufgrund der steigenden Verluste der *F. candida* Individuen wurde ein Experiment nie länger als 2 Wochen inkubiert. Bei den lebenden Individuen konnten zwei Gruppen unterschieden werden. Ein Teil befand sich gerade in der Häutungsphase und stoppte die Beweidung, während der andere Teil fraß. Tabelle 8 zeigt, dass nach 7 und 14 d etwa gleich viel Bakterienzellen auf LB-Nährböden (Gesamtzellzahl) detektiert wurden. Dagegen waren die nachgewiesenen luc-positiven Donorzellen in viel geringerer Zahl nachzuweisen und einer großen Schwankungsbreite unterworfen.

Tabelle 8

Plasmidtransferraten der Fütterungsversuche von *E. coli* Donorstämme auf Kotbakterien (Transkonjuganten pro Rezipienten bzw. Donoren) im Darm von *F. candida* (Mittelwerte aus 3 bzw. 6 Agarnährböden)

Fütterungsexperiment (7 Tage inkubiert)							
<i>E. coli</i> Donorstämme	Plasmide	Kotbakterien aus Fütterungsarenen [log cfu · Individuum ⁻¹]				Plasmidtransferrate Transkonjuganten pro	
		Gesamtzellzahl	Rezipienten	Donoren	Transkonjuganten	Rezipienten	Donoren
S17-1	pUC18 <i>luc</i>	7,1	6,8	n.d.	n.d.	<1,8 · 10 ⁻⁷	n.d.
	pSUP102 <i>lacTn5</i> :B20	6,1	5,9	4,9	0,6	5,2 · 10 ⁻⁶	5,5 · 10 ⁻⁵
	pSUP202 <i>luc</i>	6,9	7,4	n.d.	-0,2	2,8 · 10 ⁻⁸	0
	pSUP104 <i>luc</i>	6,3	6,0	0,9	0,8	5,7 · 10 ⁻⁶	7,9 · 10 ⁻¹
	pRP4 <i>luc</i>	6,3	5,9	3,8	0,4	3,1 · 10 ⁻⁶	4,2 · 10 ⁻⁴
HB101	pSUP104 <i>luc</i>	6,0	5,9	2,1	n.d.	<1,0 · 10 ⁻⁶	<8,4 · 10 ⁻³
NM522	pSUP104 <i>luc</i>	6,2	6,2	3,2	n.d.	<6,9 · 10 ⁻⁷	<6,2 · 10 ⁻⁴
NM522 + S17-1	pSUP104 <i>luc</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S17-1 λPir	pUT <i>luxAB</i>	6,2	6,1	n.d.	n.d.	<8,4 · 10 ⁻⁷	n.d.
CC118 λPir	pUT <i>luxAB</i>	6,0	4,3	1,4	n.d.	<5,3 · 10 ⁻⁵	3,9 · 10 ⁻²
CC118 λPir + S17-1	pUT <i>luxAB</i>	7,2	5,4	1,5	n.d.	<3,8 · 10 ⁻⁶	3,1 · 10 ⁻²

Fütterungsexperiment (14 Tage inkubiert)							
<i>E. coli</i> Donorstämme	Plasmide	Kotbakterien aus Fütterungsarenen [log cfu · Individuum ⁻¹]				Plasmidtransferrate Transkonjuganten pro	
		Gesamtzellzahl	Rezipienten	Donoren	Transkonjuganten	Rezipienten	Donoren
S17-1	pUC18 <i>luc</i>	6,5	6,0	1,9	n.d.	<1,1 · 10 ⁻⁶	<1,4 · 10 ⁻²
	pSUP102 <i>lacTn5</i> :B20	5,9	5,6	5,2	3,9	1,9 · 10 ⁻²	5,5 · 10 ⁻²
	pSUP202 <i>luc</i>	6,3	5,5	1,6	-1,0	3,8 · 10 ⁻⁷	2,9 · 10 ⁻³
	pSUP104 <i>luc</i>	6,7	6,0	2,7	2,8	4,7 · 10 ⁻⁴	3,8 · 10 ⁻¹
	pRP4 <i>luc</i>	6,4	5,5	4,7	1,6	1,4 · 10 ⁻⁴	7,5 · 10 ⁻⁴
HB101	pSUP104 <i>luc</i>	7,0	4,2	n.d.	n.d.	<7,1 · 10 ⁻⁵	n.d.
NM522	pSUP104 <i>luc</i>	6,9	6,2	3,8	n.d.	<6,2 · 10 ⁻⁷	<1,8 · 10 ⁻⁴
NM522 + S17-1	pSUP104 <i>luc</i>	6,5	6,2	1,9	n.d.	<7,0 · 10 ⁻⁷	<1,3 · 10 ⁻²
S17-1 λPir	pUT <i>luxAB</i>	6,6	4,6	n.d.	n.d.	<2,5 · 10 ⁻⁵	n.d.
CC118 λPir	pUT <i>luxAB</i>	6,2	6,1	2,5	n.d.	<7,4 · 10 ⁻⁷	<3,1 · 10 ⁻³
CC118 λPir + S17-1	pUT <i>luxAB</i>	6,4	6,6	2,3	n.d.	<2,4 · 10 ⁻⁷	<4,6 · 10 ⁻³

n.d. - nicht detektiert

Dieses Ergebnis belegt, dass die Donorzellen in Abhängigkeit der Häutungszyklen mehr oder weniger stark verdaut wurden. Transkonjuganten konnten in den Arenen mit S17-1 und pRP4*luc*, pSUP104*luc*, pSUP202*luc* und pSUP102 *lacTn5*:B20 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Bakterienkreuzungen konnten Transkonjuganten mit S17-1/pSUP202*luc* detektiert werden, die aber nach dreiwöchiger Haltung auf Minimalmedium mit 100 µg·mL⁻¹

Cycloheximid, $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ Benzoesäure und $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Chloramphenicol und erneutem Durchführen eines *luc*-Tests keine Biolumineszenz mehr zeigten. Nach weiteren drei Wochen war auch das *luc*-Gen nicht mehr durch PCR nachweisbar. Bis auf pSUP202*luc* wurde nach 14 d eine höhere Anzahl von Transkonjuganten isoliert als nach 7 d. In Fütterungsexperimenten mit *F. candida* konnte weder pSUP104*luc* durch NM522 mobilisiert, noch in einer diparentalen Kreuzung ein Gentransfer nachgewiesen werden. Außerdem wurden auch keine Transkonjuganten mit pUT*luxAB* gefunden, zu dessen Nachweis das Substrat Decanal verwendet werden musste.

Zur genaueren Analyse des zeitabhängigen Auftretens von Transkonjuganten im Kot von *F. candida* wurde *E. coli* S17-1/pRP4*luc* 14 Tage an *F. candida* Individuen verfüttert und jeden Tag auf frische Wasseragar-Petrischalen umgesetzt. Die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse zeigen die Zellzahlen der isolierten Darmbakterien über einen Zeitraum von 24 h.

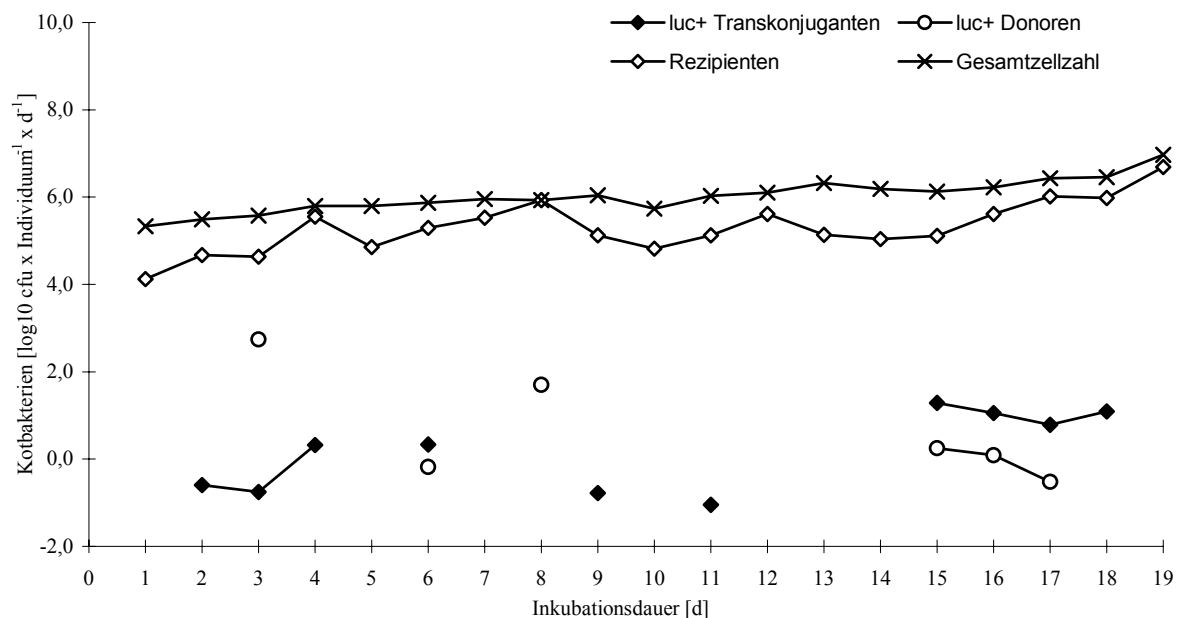


Abbildung 6

Verlauf der vorhandenen Zellzahlen im Kot von *F. candida* nach Fütterung von *E. coli*/pRP4*luc* in Wasseragar-Petrischalen mit täglicher Probenahme über 19 d (Mittelwerte aus 3 bzw. 6 Agarnährböden).

Am 3. und 8. d konnten hohe Zahlen an *luc*-positiven Donorzellen nachgewiesen werden. Vermutlich verteilten die Bodentiere das Bakterienfutter mit ihren Füßen vom YTP-Agarblock über die Arena. Die Zellzahlen der Rezipienten zeigen eine regelmäßige Erhöhung alle 4 d auf. Dies deutet darauf hin, dass die Rezipientenanzahl mit den Häutungszyklen der Bodeninsekten in Zusammenhang steht. Allerdings ist dieses Phänomen bei der Gesamtzellzahl nicht so stark ausgeprägt, sondern nur angedeutet zu beobachten. Transkonjuganten traten erstmals innerhalb des 2. Tages nach Experimentbeginn auf.

Während der vierzehntägigen Versuchsdauer konnten sie nur sehr unregelmäßig detektiert werden. Die Anzahl der nachgewiesenen Transkonjuganten war in der zweiten Woche höher als in der ersten. Die Anzahl der Donorzellen lag dagegen in der zweiten Woche deutlich unter der Anzahl der Transkonjuganten.

Zur Quantifizierung der Biolumineszenz wurde von 8 aus Kot isolierten Transkonjuganten, die das Plasmid pRP4*luc* im Fütterungsexperiment über einen Zeitraum von 14 d aufgenommen hatten, die Luziferase-Aktivität im Luminometer gemessen. Dabei zeigte jedes Isolat eine typische Lichtemission. Die relativen Lichteinheiten (RLU) schwankten zwischen 733 und 530985 bezogen auf $1 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9

Luziferase-Aktivität ausgewählter Transkonjuganten aus dem Fütterungsversuch mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* an *F. candida*

Isolat ^a	16S rDNA-Identifizierung	Luziferase-Aktivität [RLU/ $1 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$]
FcFE133	<i>Pseudomonas maculicola</i>	63 338
FcFE134	<i>Pseudomonas diminuta</i>	733
FcFE135	<i>Aquaspirillum dispar</i>	14 943
FcFE136	<i>Alcaligenes faecalis</i>	119 551
FcFE137	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> ssp. DEN/PIE	184 886
FcFE138	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> ssp. <i>xylosoxydans</i>	530 985
FcFE139	<i>Comamonas testosteroni</i>	30 529
FcFE149	<i>Enterobacter cloacae</i> A	4 087

a - Isolat stammt aus bezeichnetem Bodentier (Fc- *Folsomia candida*) und Experiment (FE- Fütterungsexperiment)

2.1.4 Nachweis von biolumineszenten Transkonjuganten in *F. candida* - Individuen aus Fütterungsexperimenten

F. candida Individuen aus Fütterungsexperimenten mit den *E. coli* Donorstämmen S17-1/pUC18*luc* (1 Experiment), S17-1/pSUP202*luc* (1 Experiment) und S17-1/pRP4*luc* (4 Experimente) wurden auf das Vorhandensein biolumineszenter Darmbakterien untersucht. Tabelle 10 fasst die aus den ganzen Individuen nach Homogenisierung erhaltenen Bakterienzellzahlen auf Komplexnährböden (Gesamtkoloniezahlen) und Minimalnährböden (Rezipienten), eventuell mit den für die Plasmide entsprechenden Antibiotika (Donoren und Transkonjuganten), zusammen.

Aus den untersuchten Individuen der oben genannten Fütterungsexperimente konnten auf Komplex- und Minimalnährböden mit Benzoesäure als alleinige C-Quelle Bakterien isoliert werden.

Tabelle 10

Nachweis biolumineszenter Transkonjuganten aus zermörserten ganzen *F. candida* Individuen aus Fütterungsexperimenten mit *E. coli* Donorstämmen S17-1/pUC18*luc*, S17-1/pSUP202*luc* und S17-1/pRP4*luc* (Mittelwerte aus 3 oder 6 Agarnährböden)

Donorstamm	Individuen	Inkubationsdauer	Gesamtzellzahl	Rezipienten	Donoren	Transkonjuganten
	[n]	[d]	[[log10 cfu · mL ⁻¹ · Individuum ⁻¹]			
S17-1/pUC18 <i>luc</i>	43	21	6,8	3,7		
S17-1/pSUP202 <i>luc</i>	46	21	7,0	4,8		
S17-1/pRP4 <i>luc</i>	96	1	2,1	2,1		
	78	5	3,1	2,9		
	74	10	4,3	3,5	0,5	0,2
	74	11	3,8	3,9		
	91	18	3,8	3,8		
	179	19	2,5	2,3		
	40	23	4,4	3,0	3,8	
	33	26	4,4	4,3		

Dabei wurden nach einer längeren Inkubationsdauer mehr Bakterienkolonien gezählt als nach einem Tag Inkubation. Die Anzahl der Bakterienzellen auf Komplexnährböden und Rezipientenzellen waren fast gleich, ausgenommen am Tag 5, 10 und 21 divergierten sie stark. Luc-positive Donorzellen konnten nur aus Individuen aus 2 der 4 Fütterungsexperimenten mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* als Donorstamm nachgewiesen werden. In einem dieser Fütterungsexperimente (3 parallele Ansätze) mit 10 Tagen Inkubation konnten in 2 der 3 Ansätze im Bereich von einer Zehnerpotenz auch biolumineszente Transkonjuganten isoliert werden. Die Anzahl der *F. candida* Individuen nahm bis zum 26. Tag um 20 % ab.

2.1.5 Plasmidtransferrate in Abhängigkeit der Individuengröße in Fütterungsexperimenten

Tabelle 11 zeigt Plasmidübertragungen, die mit drei verschiedenen Tiergrößen, die aus den Zuchtgefäßen mittels Metallsieben verschiedener Maschengröße voneinander getrennt wurden, erfolgten.

Mit den kleinsten, weniger als 1 mm großen Individuen, also der jüngsten Entwicklungsstufe, wurden keine Gentransferereignisse beobachtet. Die mittelgroßen Tiere (Größe ca. 1 - 2 mm) erzielten über einen Zeitraum von 14 d eine höhere Gentransferrate als die in den beschriebenen Versuchen eingesetzten größten bzw. adulten Tiere (2 mm). Inkubiert man die Individuen noch 24 h weiter auf einer frischen Wasseragar-Petrischale ohne Futter, wurden

bei den mittelgroßen Tieren eine Abnahme des Plasmidtransfers beobachtet und bei den größten Exemplaren eine Erhöhung des Plasmidtransfers um eine Zehnerpotenz.

Tabelle 11

Einfluss auf die Übertragung des Plasmids pRP4*luc* aus *E. coli* S17-1 auf die Darmmikroorganismen in Abhängigkeit der Größe bzw. des Alters der Individuen von *F. candida* (Mittelwerte aus 12 Agarnährböden)

Individuen	Gesamtzellzahl	Rezipienten	Donoren	Transkonjuganten	Plasmidtransferrate
	Bakterienzellzahlen [\log_{10} cfu · Individuum ⁻¹]				Transkonjuganten pro Rezipienten
	14 d inkubiert mit Donor				
Klein	6,6 ± 0,10	5,6 ± 0,07	0	0	0
Mittel	5,6 ± 0,14	5,2 ± 0,35	1,8 ± 0,21	0,8 ± 0,28	1,0 · 10 ⁻¹
Groß	6,4 ± 0,07	6,1 ± 0,00	0	1,1 ± 0,21	1,0 · 10 ⁻⁵
	24 h inkubiert ohne Donor				
Klein	4,0 ± 0,00	3,0 ± 0,21	0	0	0
Mittel	4,5 ± 0,07	3,4 ± 0,07	-0,2 ± 0,21	-0,8 ± 1,13	8,9 · 10 ⁻⁶
Groß	4,5 ± 0,21	3,8 ± 0,50	0,4 ± 0,50	0,2 ± 0,21	3,3 · 10 ⁻⁴

2.1.6 Fehlender Plasmidtransfer mit nicht-mobilisierbaren, nicht-konjugativen Klonierungsvektoren

Es konnte kein Plasmidtransfer in Filterkreuzungen und Fütterungsexperimenten mit dem nicht-mobilisierbaren und nicht-konjugativem Plasmid pUC18*luc* nachgewiesen werden. Deshalb wurden weitere Untersuchungen mit dem Hefe/Bakterien-Fusionsvektor p707 (8,4 kb) durchgeführt. Es trägt Replikationsstartpunkte aus pBR322 (colE1-Derivat) und des 2 μ Plasmids (REP1) aus *S. cerevisiae*. In dieses Plasmid wurde die nptII-*luc*-Genkassette in die einzig vorhandene *Hind*III Schnittstelle kloniert. Das Plasmid wurde in *Saccharomyces cerevisiae* und den *E. coli*-Stämmen S17-1, HB101 und NM522 durch Elektroporation transformiert. Die Expression des *luc*-Gens erfolgte in Bakterien, konnte aber nicht in Hefe nachgewiesen werden.

Tabelle 12 zeigt, dass der Anteil coliformer Bakterien an den gesamten kultivierbaren Bakterien mit 89 – 96 % sehr hoch lag. *E. coli* war von den *Enterobacteriaceae* zusätzlich durch einen grün metallisch glänzenden Schimmer auf der roten Kolonie zu unterscheiden. Es konnten keine Donorkolonien (rote Kolonien mit grün metallischem Glanz) nachgewiesen werden. Dagegen waren 10⁴ rote Kolonien auch biolumineszent. Der Anteil der *luc*-positiven *Enterobacteriaceae* an den gesamten kultivierbaren Bakterienzellen lag zwischen 57 und 80 %.

Tabelle 12

Fehlender Nachweis des Plasmidtransfers des nicht-mobilisierenden und nicht-konjugativem Plasmids p707*luc* aus drei verschiedenen *E. coli* Donorstämmen und einem Hefe-Donorstamm in Fütterungsversuchen mit *F. candida* - Individuen (Mittelwerte aus 6 Agarnährböden)

Donorstämme	Gesamtzellzahl Rezipienten Donorzellen Transformanten				Plasmidtransferrate
	Bakterienzellzahlen [log10 cfu · Individuum ⁻¹]				Transformanten pro Rezipienten
<i>S. cerevisiae</i> / p707 <i>luc</i>	7,0	6,7	0	5,6	$7,9 \cdot 10^{-2}$
<i>E. coli</i> S17-1/ p707 <i>luc</i>	6,3	5,8	0	4,3	$2,7 \cdot 10^{-2}$
<i>E. coli</i> NM522/ p707 <i>luc</i>	6,3	5,6	0	3,6	$9,4 \cdot 10^{-3}$
<i>E. coli</i> HB101/ p707 <i>luc</i>	6,7	6,3	0	4,4	$1,2 \cdot 10^{-2}$

Mit *E. coli* NM522 als Donorstamm wurden die wenigsten Plasmide übertragen, mit *S. cerevisiae* am meisten. Die biolumineszenten rot gefärbten Kolonien der *Enterobacteriaceae* erwiesen sich in hohem Maße instabil. So waren direkt nach der Inkubation der Selektionsnährböden biolumineszente Kolonien nachweisbar. Schon nach einmaligem Verdünnungsausstrich konnte meist keine Aktivität des Markergens mehr festgestellt werden. Eine anschließende PCR mit spezifischen Primern für das Luziferasegen ergab noch eine Amplifikation, die nach dem Transfer auf eine Nylonmembran mit der luc-Sonde hybridisierten. Die weitere Analyse biolumineszenter roter Kolonien (Transformanten) mittels ARDRA zeigte zwei verschiedene DNA-Bandenmuster, die nicht wie *E. coli* aussahen. Die Gramfärbung bestätigte, dass es sich um Gram-negative Bakterien handelte. Nach der Biolog-Analyse wurden sie mit der MicroLog software als *Serratia marcescens* und *Ochrobactrum anthropi* identifiziert. Es wurden somit zwei verschiedene Transformanten, die das Plasmid p707*luc* im Darm von *F. candida* nach Verfütterung der Donorstämme aufgenommen hatten, nachgewiesen. Die biolumineszenten Transformanten verloren schon durch eine einmalige Weiterkultivierung ihre aufgenommenen Plasmide und waren daher in hohem Maße instabil.

2.2 Nachweis des Plasmidtransfers Luziferase-markierter Bakterien nach Fütterung an *O. fimatus* (Onychiuridae, Collembola) und Mischung mit Kotbakterien aus *O. fimatus* auf Nylonmembranen

Bei der Collembolenart *O. fimatus* fanden die Häutungen alle 3 - 5 d statt (eigene Beobachtungen). In einem Vorversuch wurde die Zahl der Benzoesäure verwertenden Darmbakterien ermittelt. Sie lag durchschnittlich bei 10^8 cfu·mL⁻¹. Das waren 97,8 % der in dem Versuch ermittelten gesamten kultivierbaren Bakterienzellen auf Komplexnährböden.

2.2.1 Plasmidtransfer in bakteriellen Kreuzungen aus Luziferase-markierten

Donorbakterien und Kotbakterien aus *O. fimatus* auf Nylonmembranen

Die Fähigkeit von *E. coli* Donorstämmen, ihre in Transfermechanismus und Wirtsspezifität unterschiedlichen Plasmide auf Darmbakterien aus *O. fimatus* zu übertragen, wurde unter Laborbedingungen getestet, die eine Konjugation ermöglichen. Die ausgewählten Donorstämme waren nicht in der Lage auf Minimalmedium mit Benzoesäure als alleinige C-Quelle zu wachsen. Dagegen konnten 98 ± 2 % der kultivierbaren Darmbakterien aus *O. fimatus* auf benzoensäurehaltigen Minimalnährboden wachsen.

Tabelle 13

Transfer ausgewählter Plasmide von *E. coli* Donorstämmen nach extrahierten Kotbakterien aus *O. fimatus* in bakteriellen Kreuzungen auf Nylonmembranen auf LB mit $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Nalidixinsäure nach einer Inkubation von 24 h (Mittelwerte aus 2 Experimenten und jeweils 3 Agarnährböden mit einer Standardabweichung von 0,04 bis 2,02)

<i>E. coli</i> Donorstamm	Plasmid	Bakterienzellzahlen [$\log_{10} \text{ cfu} \cdot \text{Filter}^{-1}$]				Plasmidtransferraten Transkonjugant pro Rezipienten
		Gesamtzellzahl	Rezipienten	Donoren	Trans- konjuganten	
S17-1	pUC18 <i>luc</i>	9,1	8,9	8,2	0	0
	pSUP202 <i>luc</i>	9,8	8,5	7,3	0	0
	pSUP104 <i>luc</i>	9,2	9,0	8,1	5,0	$1,0 \cdot 10^{-4}$
HB101	pRP4 <i>luc</i>	9,3	9,1	7,7	3,5	$2,5 \cdot 10^{-6}$
	pSUP104 <i>luc</i>	9,3	8,9	7,5	0	0
S17-1 λ Pir	pUT <i>luxCDABE</i>	9,2	8,9	8,1	0	0

In Tabelle 13 ist beim Vergleich von Rezipienten zu Gesamtzellzahlen in 5 von 6 Fällen die Rezipientenzellzahl weniger als eine Zehnerpotenz unter der der gesamt kultivierbaren Zellen. Transkonjuganten wurden in Bakterienkreuzungen mit *E. coli* S17-1/pSUP104*luc* und *E. coli* HB101/pRP4*luc* isoliert. Das Plasmid pSUP104*luc* konnte nur im mobilisierenden Stamm S17-1, der das konjugative und mobilisierbare Plasmid pRP4 chromosomal integriert enthält, übertragen werden. Dagegen konnten mit dem nicht-mobilisierendem Stamm HB101 keine Transkonjuganten nachgewiesen werden. Mit S17-1 konnte kein Plasmidtransfer mit pSUP202*luc* (mobilisierbar, enger Wirtsbereich) und pUC18*luc* (nicht-mobilisierbar, enger Wirtsbereich) detektiert werden. Auch mit dem mini-Transposon tragenden Plasmid pUT*luxCDABE*, das einen weiten Wirtsbereich hat und autolumineszent ist, wurden keine Transkonjuganten nachgewiesen.

2.2.2 Zeitliche Abhängigkeit der Bildung von Transkonjuganten in Fütterungsexperimenten mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc*

O. fimatus Individuen wurden kontinuierlich mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* über eine Periode von 14 d gefüttert und täglich mit dem Futterblock auf frische Wasseragar-Petrischalen umgesetzt. Der verbleibende Kot eines Tages wurde auf die gesamt kultivierbaren, Donor-, Rezipienten- und Transkonjugantenzellzahlen untersucht. Abbildung 7 zeigt täglich erhaltene Zellzahlen.

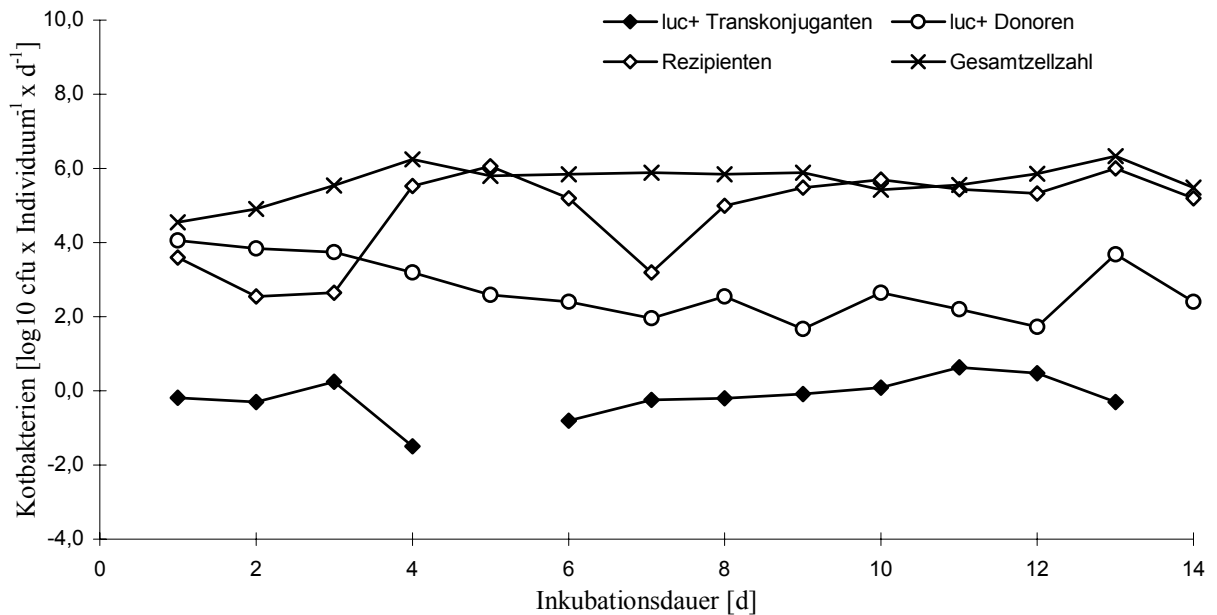


Abbildung 7

Transfer des mobilisierbaren und konjugativen Plasmids pRP4*luc* aus *E. coli* S17-1 auf Darmbakterien in *O. fimatus* in Fütterungsexperimenten (Mittelwerte aus 3 Fütterungsexperimenten und jeweils 3 oder 6 Agarnährböden; s = 0,1 - 1,9)

Die gesamten kultivierbaren Kotbakterien wiesen am Tag 4, 9 und 13 eine leichte Erhöhung auf. Die Zellzahl der Rezipienten ist ebenfalls starken Schwankungen unterworfen. Ein deutlicher Abfall ist am 2. und 7. d des Experiments zu beobachten. Der Titer der luc-positiven Donorzellen sinkt bis zum 12. d stetig ab, um am 13. d wieder fast den Ausgangswert zu erreichen. Die zu hohen Zellzahlen biolumineszenter Donorzellen am Ende des Experimentes enthalten nicht nur Kotbakterien, sondern auch die durch die *O. fimatus* Individuen verteilten Donorbakterien vom Futterblock über die Wasseragar-Petrischale. Die Schwankungen der Gesamt- und Rezipientenzellzahlen konnten nicht mit den Häutungszyklen (alle 3-5 d) in Verbindung gebracht werden. Nach einem Tag konnten biolumineszente Transkonjuganten im Kot aus allen drei Parallelen detektiert werden. Während der zweiwöchigen Untersuchungsperiode wurden entweder in einer Parallele, zwei oder in allen drei Parallelen Transkonjuganten nachgewiesen, ausgenommen am 5. und 14. Tag, in denen keine Transkonjuganten detektiert werden konnten. Abbildung 7 zeigt, dass in

der zweiten Woche eine deutlich höhere Anzahl biolumineszenter Transkonjuganten vorhanden war. Da die Collembolen in ihren Entwicklungsstadien nicht synchronisiert waren, traten Häutungszyklen sehr unregelmäßig auf, wodurch vermutlich zeitweise Lücken in der Detektion der Transkonjuganten auftraten.

Tabelle 14

Bakterienzellzahlen auf verschiedenen Selektionsnährböden aus dem auf der Wasseragar-Oberfläche abgelegten Kot nach Verfütterung Luziferase-markierter *E. coli* Donorstämme an *O. fimatus* Individuen über 7 d bei 28 °C (Mittelwerte aus 2 Fütterungsexperimenten und jeweils 6 Agarnährböden)

<i>E. coli</i> Donorstamm	Plasmid	Bakterienzellzahlen [log ₁₀ cfu · Individuum ⁻¹]				Plasmidtransferrate Transkonjuganten pro Rezipienten
		Gesamtzellzahl	Rezipienten	Donoren	Trans- konjuganten	
S17-1	pUC18 <i>luc</i>	6,2 ± 0,2	6,2 ± 0,2	5,0 ± 0,2	0	0
	pSUP202 <i>luc</i>	6,5 ± 0,1	6,3 ± 0,3	5,8 ± 0,4	0	0
	pSUP104 <i>luc</i>	6,4 ± 0,3	6,2 ± 0,0	2,2 ± 0,9	1,5 ± 2,2	2,0 · 10 ⁻⁵
HB101	pRP4 <i>luc</i>	6,7 ± 0,2	6,5 ± 0,1	4,2 ± 1,4	0	0
	pSUP104 <i>luc</i>	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,1	0,5 ± 0,5	0	0
S17-1λPir	pUT <i>luxCDABE</i>	6,5 ± 0,2	6,2 ± 0,3	4,6 ± 0,0	0	0

Die in Tabelle 14 aufgeführten Donorstämme wurden an *O. fimatus* Individuen kontinuierlich 7 Tage verfüttert. Nur das mobilisierbare Plasmid pSUP104*luc* im mobilisierenden *E. coli* Donorstamm S17-1 konnte auf Darmbakterien übertragen werden. Die erzielten Plasmidtransferraten in *O. fimatus* Versuchen lagen unter denen mit *F. candida*.

2.3 Beteiligung von *L. rubellus* (Oligochaeta, Annelida) an der Aufnahme Luziferase-markierter Plasmide aus *E. coli* Donorstämmen im Boden

2.3.1 Population kultivierbarer Bakterien im Kot

Der Kot aus 3 adulten Würmern (0,73 ± 0,42 g) wurde auf kultivierbare Bakterien auf zwei Komplexnährböden (LB und PCA) und einem benzoessäurehaltigem Minimalnährboden untersucht.

Tabelle 15 zeigt, dass auf LB durchschnittlich $0,9 \cdot 10^8$ und auf PCA $1,5 \cdot 10^8$ cfu · ml⁻¹ · g Kot Feuchtgewicht⁻¹ gezählt wurden. Die Zellzahlen lagen auf PCA deutlich höher als auf LB. Für weitere Experimente wurden deshalb die Kotbakterien aus *L. rubellus* auf PCA-Nährböden selektiert. Auf Minimalnährboden mit Benzoessäure als alleinige C-Quelle wuchsen durchschnittlich 14,2 ± 11,1 % (n=3) der auf PCA kultivierbaren Kotbakterien. Diese Anzahl der Bakterienzellen ist für die Detektion des Plasmidtransfers ausreichend.

Tabelle 15

Kultivierbare Bakterien im Kot von *L. rubellus* auf drei verschiedenen Agarnährböden (Mittelwerte aus 3 Agarnährböden). FG- Feuchtgewicht.

Wurm	Gewicht	LB	PCA	M9B
	[g]	[cfu·ml ⁻¹ ·g Kot FG ⁻¹]		
1	0,48	$3,1 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^6$
2	0,50	$1,1 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^7$
3	1,21	$1,7 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$

2.3.2 Transfer von Plasmiden von *E. coli* nach Bakterien aus dem Kot von *L. rubellus* auf Nylonmembranen

Plasmidtransfer wurde durch Bakterienkreuzungen mit *E. coli* Donorstämme und aus dem gesammelten Kot von *L. rubellus* extrahierten Bakterien auf Filtermembranen untersucht. Die Donorgegenselektion erfolgte auf Minimalnährboden (M9) mit $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Benzoesäure als alleinige C-Quelle. *E. coli* Donorstämme konnten nicht auf dieser Konzentration an Benzoesäure wachsen.

Tabelle 16

Transfer ausgewählter Plasmide aus *E. coli* Donorstämmen auf Kotbakterien von *L. rubellus* auf Nylonmembranen nach Inkubation für 24 h bei 28°C (Mittelwerte aus zwei Bakterienkreuzungen und jeweils 6 Agarnährböden)

<i>E. coli</i> Donorstamm	Plasmid	Bakterienzellzahlen [log ₁₀ cfu · Filter ⁻¹]				Plasmidtransferraten Transkonjuganten pro Rezipienten
		Gesamtzell- zahlen	Rezipienten	Donoren	Trans- konjuganten	
S17-1	pUC18 <i>luc</i>	$9,7 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,3$	$3,2 \pm 4,5$	0	0
	pSUP202 <i>luc</i>	$9,5 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,9$	0	0
	pSUP104 <i>luc</i>	$9,0 \pm 0,0$	$8,4 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	$1,0 \cdot 10^{-7}$
	pRP4 <i>luc</i>	$9,4 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 1,0$	$3,9 \cdot 10^{-8}$
HB101	pSUP104 <i>luc</i>	$9,6 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,6$	0	0
S17-1λPir	pUT <i>luxCDABE</i>	$9,0 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,8$	$0,2 \pm 0,2$	$5,0 \cdot 10^{-9}$

Tabelle 16 zeigt, dass ein hoher Anteil ($95,8 \pm 3,5 \%$) der kultivierbaren Kotbakterien auf Komplexnährboden in der Lage waren, auf dem benzoessäurehaltigen Minimalnährboden zu wachsen. Im Gegensatz zu den Collembolen lag die absolute Anzahl der benzoessäuretoleranten Kotbakterien um zwei Zehnerpotenzen höher, da aus den Würmern eine größere Menge an Kot gesammelt werden konnte.

Insgesamt wurden sechs verschiedene Donorstämme auf ihr Transferpotential getestet, wobei pSUP104*luc* in zwei verschiedenen Wirtstämmen vorlag, im mobilisierenden Stamm *E. coli* S17-1 und im nicht-mobilisierenden Stamm *E. coli* HB101. Transkonjuganten konnten in drei der sechs Bakterienkreuzungen detektiert werden. Plasmidtransfer wurde mit dem *mob*⁺ Plasmid pSUP104*luc* in *E. coli* S17-1 detektiert, aber nicht mit *E. coli* HB101. Aus *E. coli* S17-1 konnte auch das konjugier- und mobilisierbare Plasmid pRP4*luc* übertragen werden, allerdings nur mit einer Transferrate von 10⁻⁷. Aus der Bakterienkreuzung mit dem mobilisierenden *E. coli* S17-1(λPir) und dem miniTn5 enthaltenen Plasmid pUT*lux*CDABE mit einem weiten Wirtsbereich konnten stark autolumineszente Transkonjuganten isoliert werden. Die aus den Bakterienzellzahlen ermittelten Transferraten (Transkonjuganten pro Rezipienten) liegen mit 10⁻⁸ im Vergleich zu denen der Collembolen sehr niedrig und zeigen die Empfindlichkeit der Experimente. Mit dem mobilisierenden *E. coli* Stamm S17-1 konnte kein detektierbarer Plasmidtransfer mit pSUP202*luc* (enger Wirtsbereich, *mob*⁺) und pUC18*luc* (enger Wirtsbereich, *mob*⁻) auf Kotbakterien aus *L. rubellus* nachgewiesen werden.

2.3.3 Plasmidtransfer in Boden-Mikrokosmen mit *L. rubellus*

Die in Abbildung 8 ermittelten Werte stellen die täglich erhaltenen Zellzahlen dar. Der Titer der gesamten kultivierbaren Kotbakterien schwankte um 10⁷ cfu · g TG⁻¹. Die Anzahl der benzoessäuretoleranten Rezipienten variierte um eine Zehnerpotenz niedriger als die der Gesamtzellzahlen. Im Biolumineszenztest nachgewiesene *luc*⁺-Donorzellen nehmen im Verlauf der 14 Tage von 10⁶ auf 10⁴ cfu · g TG⁻¹ ab, fallen am 13. Tag auf 10² cfu · g TG⁻¹ und sind am 14. Tag nicht mehr nachweisbar. Biolumineszente Transkonjuganten konnten erstmals am 3. Tag detektiert werden und traten unregelmäßig zwischen 10 und 100 cfu · g TG⁻¹ auf. Am 5. und 7. Tag konnte in keinem der drei Ansätze Transkonjuganten nachgewiesen werden. Vereinzelt biolumineszente Transkonjuganten wurden durch Amplifizierung der 16S rDNA und anschließender Restriktionsanalyse (ARDRA) mit dem Donorstamm verglichen. Durch den Vergleich der DNA-Bandenmuster konnten zwei verschiedene Typen von Transkonjuganten zur weiteren Charakterisierung isoliert werden.

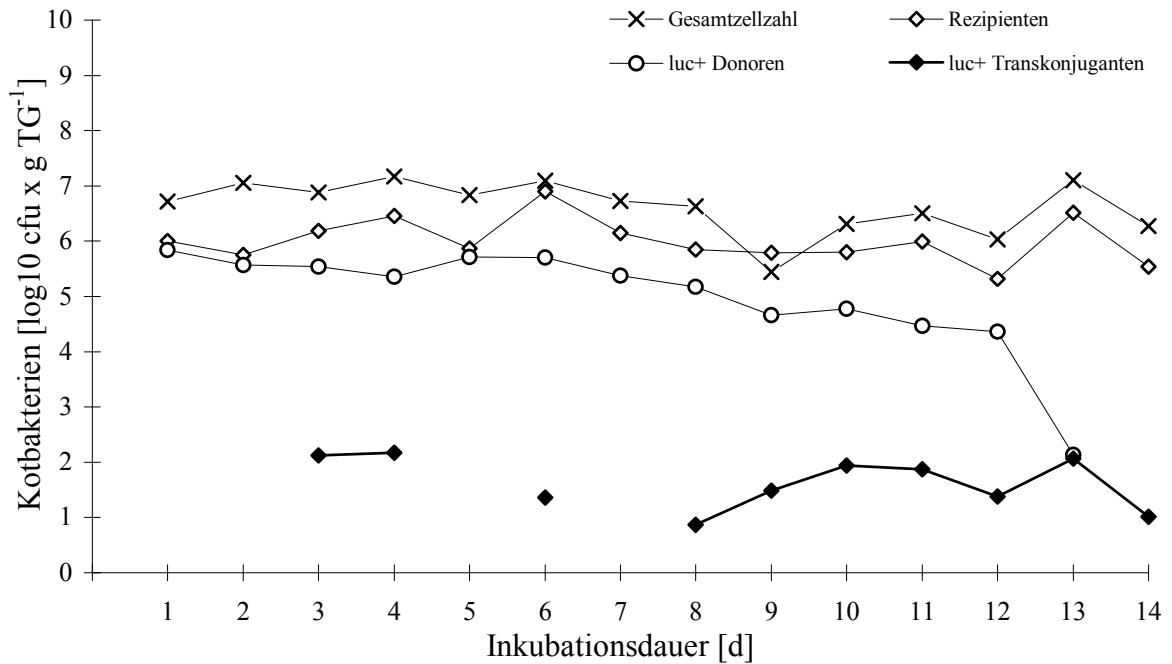


Abbildung 8

Transfer des konjugativen Plasmids pRP4*luc* aus *E. coli* S17-1 auf Darmbakterien von *L. rubellus* in Fütterungsexperimenten (Mittelwerte aus 3 Fütterungsexperimenten und jeweils 6 Agarnährböden). Fehlende Symbole bedeuten kein Koloniewachstum.

In weiteren Fütterungsexperimenten wurden die Transferpotentiale von sechs ausgewählten Plasmiden, eines davon in zwei verschiedenen *E. coli* Donorstämmen, getestet (Tabelle 17).

Tabelle 17

Ergebnisse des Plasmidtransfers von *E. coli* Donorstämme auf Kotbakterien aus *L. rubellus* in Fütterungsexperimenten (Mittelwerte aus 2 Fütterungsexperimenten und jeweils 6 Agarnährböden)

<i>E. coli</i> Donorstamm	Plasmid	Bakterienzellzahlen [log ₁₀ cfu · g Kot Trockengewicht ⁻¹]				Plasmidtransferraten Transkonjuganten pro Rezipienten
		Gesamtzellzahlen	Rezipienten	Donoren	Transkonjuganten	
S17-1	pUC18 <i>luc</i>	6,6 ± 2,5	5,4 ± 2,2	3,2 ± 1,5	0	0
	pSUP202 <i>luc</i>	4,1 ± 5,8	1,7 ± 2,4	0,7 ± 1,0	0	0
	pSUP104 <i>luc</i>	5,1 ± 0,2	4,1 ± 0,0	1,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0	2,0 · 10 ⁻⁴
HB101	pRP4 <i>luc</i>	5,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5	-0,1 ± 0,3	0	0
	pSUP104 <i>luc</i>	4,7 ± 0,1	4,1 ± 0,2	-0,2 ± 0,3	0	0
S17-1λPir	pUT <i>luxCDABE</i>	3,8 ± 0,4	2,0 ± 1,2	2,0 ± 0,2	0	0

Extrahierte Kotbakterien wurden nach 14 d analysiert. Im Gegensatz zu den Bakterienkreuzungen mit Kot von *L. rubellus* lagen die Zellzahlen der kultivierbaren gesamten Bakterien auf PCA-Nährböden um bis zu 50 % niedriger. Die Anzahl der Rezipienten schwankte zwischen 10² und 10⁵ cfu · g Kot Trockengewicht⁻¹. Ebenso wurden

die Donorzellzahlen in nur geringer Anzahl extrahiert. Das deutet auf ein Absterben der Bakterien im Versuchsboden hin. Transkonjuganten konnten nur mit dem mobilisierbaren Plasmid pSUP104*luc* in *E. coli* S17-1 isoliert werden. Der mobilisierende *E. coli* Donorstamm S17-1 konnte in diesem Experiment pSUP202*luc* und pUC18*luc* nicht auf Kotbakterien von *L. rubellus* transferieren. Weiterhin wurde kein Transfer von pSUP104*luc* und pRP4*luc* im *E. coli* HB101 und das miniTn5 enthaltende Plasmid pUT*lux*CDABE in *E. coli* S17-1(λ Pir) nachgewiesen werden.

3 TAXONOMISCHE EINORDNUNG DER ISOLIERTEN TRANSKONJUGANTEN UND TRANSFORMANTEN

Aus Bakterienkreuzungen und Fütterungsexperimenten isolierte biolumineszente Transkonjuganten und Transformanten wurden durch mehrere Verdünnungsausstriche vereinzelt und gereinigt. Nach Subkultivierungen wurde durch Biolumineszenztests unter nicht-selektiven Bedingungen ein hoher Plasmidverlust der Transkonjuganten-Stämme beobachtet. Es konnten unter selektiven Bedingungen einige Transkonjuganten mit stabil replizierenden Plasmiden isoliert werden. Nur Transkonjuganten mit pSUP202*luc* aus Fütterungsexperimenten mit *E. coli* S17-1 als Donorstamm und *F. candida* Individuen verloren alle das aufgenommene Plasmid. Nur in diesem Fall waren die Transkonjuganten nach drei Subkultivierungen nicht mehr biolumineszent. Die Detektion des *luc*-Markergens mittels PCR war bis zu fünf Subkultivierungen positiv.

Tabelle 18

Zellzahlen untersuchter biolumineszenter Transkonjuganten aus bakteriellen Kreuzungen und Fütterungsexperimenten von *F. candida*, *O. fimatus* und *L. rubellus* erhalten durch vier unterschiedliche Methoden.

	Biolumineszenztest	ARDRA	Biolog	16S-rDNA-Sequenzierung
Anzahl untersuchter biolumineszenter Isolate (cfu)				
Kreuzungen				
<i>F. candida</i>	$1,3 \cdot 10^8$	26	4	4
<i>O. fimatus</i>	$2,2 \cdot 10^5$	11	1	1
<i>L. rubellus</i>	$7,5 \cdot 10^1$	9	5	5
Fütterungsexperimente				
<i>F. candida</i>	$9,5 \cdot 10^2$	220	39	13
<i>O. fimatus</i>	$1,2 \cdot 10^3$	8	3	3
<i>L. rubellus</i>	$3,3 \cdot 10^3$	10	3	3

Tabelle 18 zeigt die Anzahl aller in dieser Studie untersuchten Isolate mit vier verschiedenen Methoden zur taxonomischen Einordnung. Insgesamt wurden $2,5 \cdot 10^{23}$ Bakterienkolonien einem Biolumineszenztest unterzogen. Danach wurden alle luc- bzw. lux-positiven Darmbakterien, die auf selektiven Agarnährböden gewachsen waren, durch Amplifikation der 16S rDNA aus isolierter chromosomaler DNA und anschließender Restriktionsanalyse (siehe auch 4.7.2 - ARDRA) weiter differenziert. Bakterienkolonien, deren DNA-Bandenmuster verschieden waren, wurden auf physiologischer Ebene durch einen Substratverwertungstest (Biolog) weiter charakterisiert. Insgesamt wurden für *F. candida* 43, *O. fimatus* 4 und *L. rubellus* 8 Isolate getestet. Auf phylogenetischer Ebene wurde mit 17 *F. candida*-, 4 *O. fimatus*- und 8 *L. rubellus* - Isolaten eine Sequenzierung des fast kompletten 16S rRNA-Gens durchgeführt.

3.1 Phylogenetische Diversität der aus Plasmidtransferversuchen isolierten Darmbakterien dreier Bodentiere

Auf selektiven Agarnährböden gewachsene Einzelkolonien wurden nach dem Biolumineszenztest durch Restriktionsanalysen mit *CfoI* und *AluI* ihrer amplifizierten 16S rRNA-Gene (ARDRA) differenziert. Dabei wurde z. B. das Isolat *Enterobacter cloacae* A aus Fütterungsexperimenten mit *F. candida* und der Donorstamm *E. coli* mit *CfoI* in drei gleiche Fragmente (530, 385 und 196 bp) gespalten. Mit *AluI* dagegen ergaben sich verschiedene DNA-Bandenmuster, und zwar für *E. cloacae* 520, 230, 134, 73 und 65 bp und für *E. coli* 312, 232, 71, 67 und 65 bp. Daher wurde die Unterscheidung der Transkonjuganten von den Donorstämmen vorwiegend mit *Alu I* vorgenommen. Die Bandenmuster wurden in einem 2 % LMP-Agarosegel verglichen und die DNA-Fragmentgrößen anhand des DNA-Längenmarkers bestimmt. Ein Vergleich der DNA-Bandenmuster auf 2 % LMP-Agarosegel und 5 % Polyacrylamidgel lieferte im Bereich unter 100 bp keine bessere Auftrennung der DNA-Fragmente und ergab keine weitere Differenzierung der Isolate. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel der Restriktionsanalyse mit *CfoI* und *AluI* der amplifizierten 16S rDNA von *F. candida* Transkonjuganten.

Eine Gesamtanzahl von 278 biolumineszenten Einzelkolonien aus Fütterungsexperimenten und Bakterienkreuzungen der drei untersuchten Bodentiere wurden mit ARDRA untersucht. Davon fielen auf *F. candida* 246 und auf *O. fimatus* und *L. rubellus* jeweils 19 untersuchte biolumineszente Transkonjuganten.

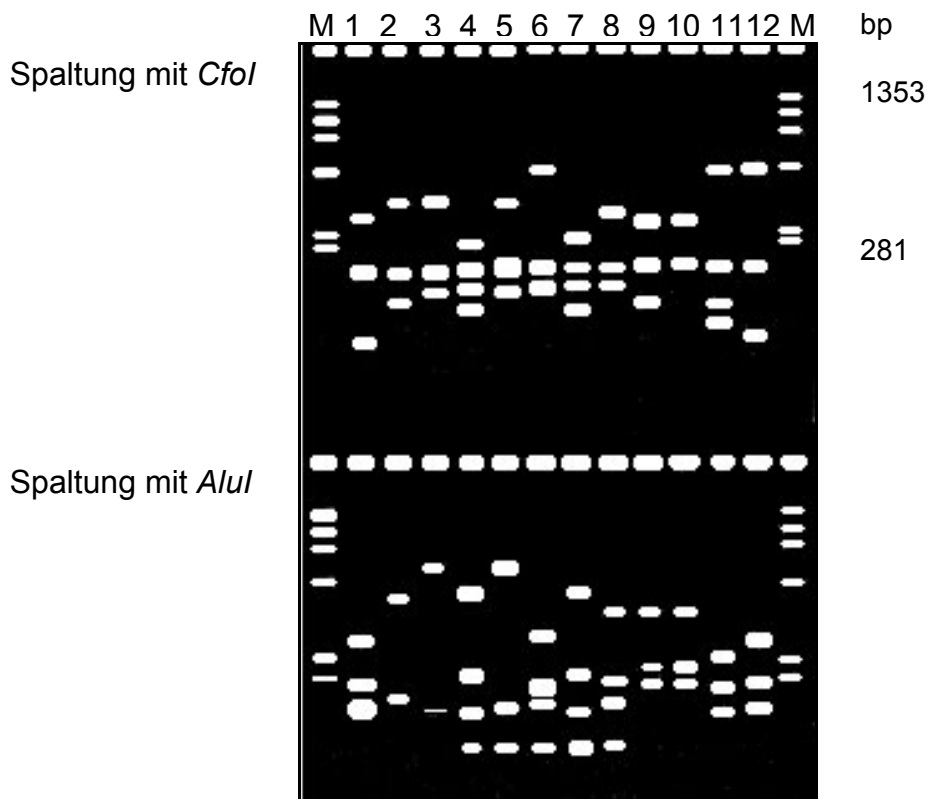


Abbildung 9

Ethidiumbromid gefärbtes "Low-Melting-Point"-Agarosegel (2 %) der PCR-Produkte des 16S rDNA-Gens verschiedener Transkonjuganten aus Experimenten mit *F. candida*, gespalten mit *CfoI* und *AluI*. Spuren zeigen mit M - DNA-Größenmarker IX, Boehringer; 1 und 1' - *E. coli* S17-1/pRP4*luc* als Positivkontrolle; 2 - 4 und 2' - 4' - Transkonjuganten aus Fütterungsversuch mit *E. coli* S17-1/pSUP202*luc*; 5 - 12 und 5' - 12' - Transkonjuganten aus Fütterungsversuch mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc*.

Die Spaltung mit *AluI* ergab mit *F. candida* Transkonjuganten 14 DNA-Bandenmuster, mit *O. fimatus* und *L. rubellus* jeweils 4 DNA-Bandenmuster. Einige der Muster zeigten dabei nur geringe Unterschiede (z. B. nur eine Bande mit geringem Größenunterschied), andere dagegen waren sehr verschieden. Die Reproduktivität der ARDRA-Muster war gut.

Alle dem Mikrotiterplatten - gebundenen Substratverwertungstest (Biolog) unterzogenen Isolaten wurden ebenfalls auf deren Gram Färbung untersucht. Aus dem Kot von *F. candida*, *O. fimatus* und *L. rubellus* stammenden Isolate waren Gram-negativ. Alle fünf getesteten Plasmide wurden von *E. coli* Donorstämmen auf verschiedene Bakterienarten im Kot der Bodentiere übertragen. Tabelle 19 zeigt die durch Biolog Software (MicroLog) identifizierten Isolate aus drei Bodentieren und zwei Experimenttypen. Die meisten gehörten der α -, β -, oder γ -Untergruppe der Proteobakterien an. Am häufigsten wurden Bakterien der Gattung *Pseudomonas* isoliert. Andere Spezies waren typische Bodenbakterien, aber auch phytopathogene Bakterien wurden isoliert. Die Spezies-Identität durch Vergleich der Verwertungsmuster mit der MicroLog Datenbank konnte für 10 Einzelisolate nicht bestimmt

werden, da der Homologie-Index $<0,5$ war und wurde für weitere Studien nicht mehr berücksichtigt. Bei mehr als 50 % Homologie wurden für *F. candida* 12, für *O. fimatus* 3 und *L. rubellus* 5 Spezies identifiziert.

Tabelle 19

Identifizierung der isolierten biolumineszenten Transkonjuganten aus Bakterienkreuzungen und Fütterungsversuchen dreier Bodentiere durch Biolog

Isolat ^a	Aufgenommenes Plasmid	Biolog Identifizierung	Homologie-Index ^b	Distanz ^c	Subklasse der Proteobakterien
FcFE133	pRP4 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas maculicola</i>	0,797	3,049	γ
FcFE134	pRP4 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>	0,654	5,308	γ
FcFE135	pRP4 <i>luc</i>	<i>Aquaspirillum dispar</i>	0,710	4,373	γ
FcFE136	pRP4 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1,000	0,000	β
FcFE137	pRP4 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	0,974	0,342	β
FcFE139	pRP4 <i>luc</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	0,818	2,406	β
FcFE149	pRP4 <i>luc</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,852	2,165	γ
FcFE140	pSUP202 <i>luc</i>	<i>Ochrobacterium anthropi</i>	0,932	1,010	α
FcFE141	pSUP202 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	0,507	7,451	γ
FcFE142	pSUP202 <i>luc</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	0,878	1,813	γ
FcFE150	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas fluoreszenz</i> Typ C	0,910	1,457	γ
FcFE151	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	0,860	1,180	β
FcBK158	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>	0,895	1,134	β
FcBK159	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	0,984	0,339	β
OfFE168	pRP4 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	0,726	4,158	γ
OfFE169	pRP4 <i>luc</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	0,886	1,693	γ
OfFE170	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Serratia marcescens</i>	0,898	1,130	γ
OfBK171	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Ochrobacterium anthropi</i>	0,799	3,024	α
LrFE172	pRP4 <i>luc</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>	0,901	1,471	γ
LrFE174	pSUP104 <i>luc</i>	CDC-Gruppe B-1/B-3	0,563	6,855	CDC
LrBK176	pUT <i>lux</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	0,773	3,286	γ

a - Isolat stammt aus bezeichnetem Bodentier (Fc- *Folsomia candida*; Of- *Onychiurus fimatus*; Lr- *Lumbricus rubellus*) und Experiment (FE- Fütterungsexperiment; BK- Bakterienkreuzung);

b - Homologie-Index bezeichnet % Homologie dividiert durch 100 (z.B. 1,0 bedeutet komplette Homologie mit der Datenbank);

c - Distanz bezeichnet phylogenetischen Abstand zur Bakterienart der Datenbank.

Auf physiologischer Ebene war nur ein Isolat aus einem Fütterungsexperiment mit *F. candida* (FcFE136 - *Alcaligenes faecalis*) komplett identisch mit dem beschriebenen Stamm in der MicroLog Datenbank (Homologie-Index 1,000). Alle anderen Isolate lagen zwischen 56,3 bis 98,0 % Homologie zu den Bakterienstämmen in der Datenbank.

3.2 Taxonomische Einordnung biolumineszenter Isolate durch 16S rDNA-Sequenzierung

Von biolumineszenten Darmbakterien aus dem Kot von *F. candida*, *O. fimatus* und *L. rubellus*, die nach der Restriktionsanalyse ihrer amplifizierten 16S rDNA verschiedene DNA-Bandenmuster zeigten und auf physiologischer Ebene mittels Substratverwertungstest (Biolog) identifiziert werden konnten, wurden auf genetischer Ebene durch Sequenzierung in beiden Richtungen und Vergleich des fast kompletten PCR - amplifizierten 16S rRNA-Gens weiter charakterisiert.

Tabelle 20

Identifizierung der biolumineszenten Transkonjuganten durch 16S rDNA Sequenzierung und Datenbankvergleiche

Isolat ^a	Aufgenommenes Plasmid	16S rDNA-Identifizierung	Datenbank	Homologie ^b	Position ^c
FcFE133	pRP4 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	EMBL	99,1	28 - 1524
FcFE134	pRP4 <i>luc</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EMBL	97,6	28 - 1524
FcFE135	pRP4 <i>luc</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EMBL	97,6	28 - 1524
FcFE136	pRP4 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	EMBL	98,7	28 - 1524
FcFE137	pRP4 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	EMBL	98,5	28 - 1524
FcFE139	pRP4 <i>luc</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>	EMBL	96,1	28 - 1524
FcFE149	pRP4 <i>luc</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	EMBL	99,4	28 - 1524
FcFE140	pSUP202 <i>luc</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	EMBL	99,8	28 - 1524
FcFE141	pSUP202 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas agarici</i>	EMBL	98,0	28 - 1524
FcFE142	pSUP202 <i>luc</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EMBL	99,5	28 - 1524
FcFE150	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Typ C	EMBL	99,1	28 - 1524
FcFE151	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	EMBL	98,6	28 - 1524
FcBK158	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>	EMBL	99,4	28 - 1524
FcBK159	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	EMBL	97,9	28 - 1524
OfFE168	pRP4 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	DDBJ	98,5	4 - 1146
OfFE170	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Serratia marcescens</i>	GenBank	94,6	225 - 962
OfBK171	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	EMBL	98,4	1 - 1366
LrFE172	pRP4 <i>luc</i>	<i>Rahnella sp.</i>	GenBank	97,4	80 - 1011
LrFE173	pRP4 <i>luc</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	DDBJ	99,5	4 - 850
LrFE174	pSUP104 <i>luc</i>	Unidentifiziertes γ -Proteobakterium	DDBJ	86,6	93 - 1063
LrBK176	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	EMBL	99,1	1 - 1360
LrBK177	pUT <i>lux</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EMBL	99,6	1 - 1378
LrBK178	pUT <i>lux</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EMBL	92,3	17 - 1035
LrBK179	pUT <i>lux</i>	Unidentifiziertes γ -Proteobakterium	DDBJ	96,7	4 - 1231
LrBK175	pSUP104 <i>luc</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	EMBL	99,0	5 - 1326

a - Isolat stammt aus bezeichnetem Bodentier (Fc- *Folsomia candida*; Of- *Onychiurus fimatus*; Lr- *Lumbricus rubellus*) und Experiment (FE- Fütterungsexperiment; BK- Bakterienkreuzung);

b - Homologie bezeichnet Übereinstimmung der Nukleinsäuresequenz mit der Datenbank in %;

c - Position zeigt den Anfang und das Ende der mit der 16S rDNA des Referenzstammes verglichenen Nukleotidsequenz.

Dabei wurden von insgesamt 25 aus verschiedenen ARDRA-Gruppen ausgewählten Isolaten aus *F. candida* 14 Transkonjuganten in Zusammenarbeit mit Dr. Edward R. B. Moore, Braunschweig, charakterisiert. Aus Experimenten mit *O. fimatus* konnten 3 Isolate und mit *L. rubellus* 8 Isolate ausgewählt werden, die durch die Firma IIT Bioservice GmbH, Bielefeld, sequenziert wurden. Die *.html Dateien der per e-mail zugeschickten Sequenzen wurden mit CHROMAS korrigiert und in der MS-Dos Eingabeaufforderung zusammengefügt. Die Datenbankvergleiche wurden mit dem BLAST 2.0 Programm durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Die Homologie der verglichenen Nukleinsäuresequenzen lag zwischen 95 und 99,8 %. Die sequenzierten 16S rRNA-Gene zweier biolumineszenter Darmisolate zeigten eine fast hundertprozentige Übereinstimmung mit den in den Datenbanken vorhandenen 16S rDNA-Sequenzen. Im Vergleich zur Biolog-Analyse stimmten meistens nur die Gattungsnamen, nicht aber die Artnamen überein.

Im Gegensatz zu den Bakterienkreuzungen des Donorstammes *E. coli* S17-1(λ Pir) mit dem miniTn5 enthaltenen Plasmid pUT*lux*CDABE und Kot von *F. candida* und *O. fimatus*, war es mit Kot von *L. rubellus* gelungen, das *lux*-Gen chromosomal in Kotbakterien zu integrieren. Die entstandenen Transkonjuganten waren stark autolumineszent. Aus ihnen wurde chromosomale DNA isoliert, mit *Eco*RI gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis der anschließenden Southern-Analyse ist in Abbildung 10 dargestellt.

Zum Nachweis des *lux*-Gens diente ein Teil des durch eine PCR-Reaktion mit dig dUTP markiertes *luxB*-Gen aus *Xenorhabdus lumineszens* als Gensonde. Die für diese Reaktion verwendeten Oligonukleotide (24mer) wurden mit Primer3 Output Software ausgewählt. Sie lieferten eine Sondengröße von 354 bp. Diese in der Southern-Analyse eingesetzte nicht-radioaktiv markierte Gensonde hybridisierte mit dem ungespaltenen Plasmid pUT*lux*CDABE, sowie mit dem mit *Eco*RI gespaltenen Plasmid. Hier war das stärkste Signal bei 5,1 Kb (*lux*-Operon) und etwas schwächere Signale bei den nicht vollständig gespaltenen DNA-Fragmenten 7,2 und 13,8 Kb zu sehen (siehe Abbildung 10 links). Die *lux*-positiven Transkonjuganten aus Kot von *L. rubellus* zeigen Hybridisierungssignale bei 6,3, 5,9, 6,5 und 6,4 Kb. Sie unterscheiden sich damit deutlich von der Plasmidkontrolle, so dass gefolgert werden kann, dass das aufgenommene Plasmid nicht frei in der Bakterienzelle vorlag. Die leichten DNA-Längenunterschiede der Signale der *L. rubellus* Kotbakterien-DNA deuten auf verschieden große anhängende chromosomale DNA am integrierten miniTn5, das das *lux*-Operon beinhaltet, hin. Das bedeutet, dass das *lux*-Gen an unterschiedlichen Stellen im Chromosom der Rezipientenbakterien integrierte. Es konnte kein Signal mit der

Negativkontrolle und einem schwach leuchtenden Isolat aus der Bakterienkreuzung mit dem Donorstamm *E. coli* S17-1 λ Pir/pUT*lux*CDABE und Kot von *L. rubellus* nachgewiesen werden.

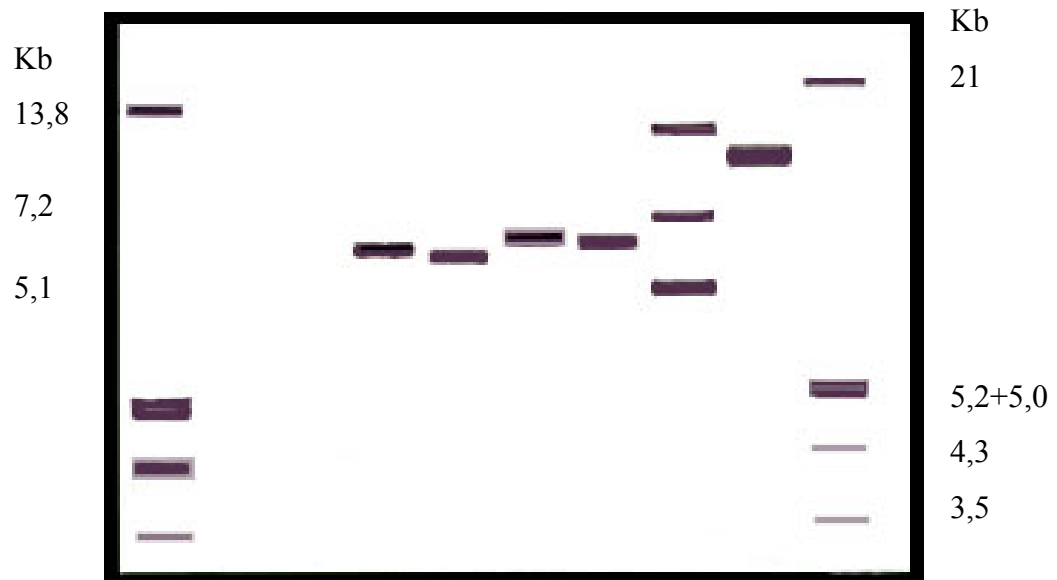


Abbildung 10

Detektion der miniTn5-Insertion des *lux*CDABE-Gens durch Southern-Analyse. *Eco*RI gespaltene chromosomale DNA der *lux*⁺ Transkonjuganten aus der Bakterienkreuzung von *E. coli* S17-1(λ Pir)/pUT*lux* mit aus Kot von *L. rubellus* extrahierten Bakterien. M- digdUTP markierter DNA Längenstandard III (Boehringer); 1- Negativkontrolle (*Eco*RI gespaltene Gesamt-DNA aus *E. coli* S17-1/pRP4*lux*); 2- *lux*⁻ Transkonjugant; 3 - 6- *lux*⁺ Transkonjuganten; 7- pUT*lux*, *Eco*RI; 8- pUT*lux*, ungespalten.

D. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen sollten Informationen zum Plasmidtransfer von gentechnisch veränderten *E. coli* Donorstämmen auf Darmbakterien im Kot zweier Collembolenarten (*F. candida*, *O. fimatus*) und einer Annelidenart (*L. rubellus*) liefern. Die verwendeten Testsysteme waren hauptsächlich vom Fraßverhalten der Bodentiere, von den Eigenschaften der Donorstämme und von den ausgewählten Selektionsmethoden abhängig. Die vorliegenden Ergebnisse sollten eine bessere Einschätzung ökologischer Risiken im Hinblick auf einer möglichen Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen ermöglichen.

1. EIGNUNG VON MARKERGENEN DER PLASMIDE AUF DEN HORIZONTAL EN PLASMIDTRANSFER IN BODENTIEREN

Beim Plattieren bakterieller Extrakte aus Boden auf Selektionsnährböden, wachsen normalerweise viele Kolonien. Für die Donorgegenselektion werden Antibiotika als Resistenzmarker eingesetzt. Sie reichten alleine in den meisten Fällen nicht aus. Dabei selektieren einige Antibiotika wie Tetracyclin stärker als andere, wie z. B. Ampicillin oder Chloramphenicol (SMIT AND VAN ELSAS, 1995). Ähnliche Ergebnisse wurden in eigenen Voruntersuchungen erhalten. Dazu wurden aus Kot von *F. candida* Bakterien extrahiert und die minimale InhibitorKonzentration (MIC) für verschiedene Antibiotika bestimmt. Es zeigte sich, dass die Darmbakterien auf Ampicillin-, Streptomycin- und Kanamycin - haltigen Medien bis $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ wachsen konnten, dagegen auf Tetracyclin- und Chloramphenicol-haltigen Medien nicht. Nicht alle Plasmide enthielten den stark selektierenden Tetracyclin-Resistenzmarker (Tabelle 1, Seite 18), sondern statt dessen Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenzmarker.

Darum wurde als zusätzliche Markierung der Plasmide in erster Linie die aus Glühwürmchen stammende konstitutiv exprimierende *luc* Genkassette ausgesucht. Die Expression des *luc* Gens hat in Bezug auf die Sensitivität und metabolische Last keinen Einfluss auf die Fitness der ausgewählten Donorstämme. Durch die sensitive Detektion der Luziferase-Aktivität konnten auch Transkonjuganten isoliert werden, z. B. im Fall der pSUP202*luc*-Transkonjuganten aus *F. candida*, die ihr Plasmid nicht stabil replizierten. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass sich dieses Gen durch lichtempfindliche Filme einfach detektieren lässt und sich gut von anderen gewachsenen Kolonien, z. B. aus Bodensuspensionen, auf Selektionsnährböden unterscheiden lässt (SELBITSCHKA et al., 1992). Es hat sich auch als ein geeignetes Werkzeug herausgestellt, um das Schicksal von Bakterien

in der Umwelt zu studieren (CRESSWELL et al., 1994; SCHWIEGER AND TEBBE, 2000). Für Untersuchungen zum Verbleib Luziferase-markierter Bakterien im Darm und Kot von Bodentieren konnten ebenfalls luc-positive Kotbakterien von anderen gewachsenen Kolonien gut unterschieden werden. Wenn autolumineszente Bakterien vorhanden waren, konnte man sie durch eine bräunliche Verfärbung des Films von luc-positiven Bakterien, die eine schwarze Färbung des lichtempfindlichen Films zeigten, unterscheiden.

Für Plasmidtransferstudien mit *F. candida* wurden zwei weitere Plasmide mit anderen Markergenen erprobt, die Plasmide pUTluxAB und pSUP102lacTn5:B20. Das Vorhandensein der luxAB - Genkassette wurde durch das Substrat Decanal nachgewiesen. Da Decanal auf Bakterien toxisch wirkte, konnten jedoch selbst die biolumineszenten Donorbakterien nicht immer zuverlässig nachgewiesen werden. Deshalb gelang es auch wahrscheinlich nicht, aus Bakterienkreuzungen und Fütterungsexperimenten mit drei verschiedenen Donorbakterien Transkonjuganten zu isolieren (siehe Tabelle 6, Seite 46, und Tabelle 8, Seite 49). Für weitere Transferuntersuchungen wurde dieses Plasmid daher nicht mehr berücksichtigt. Bei der Verwendung des lacZ-haltigen Plasmids pSUP102lacTn5:B20 erschwerte der Hintergrund an Laktoseabbauern, die auch blaue Kolonien bilden, die Auswertung der Transkonjuganten auf X-Gluc/IPTG-haltigen Selektionsnährböden. In Bakterienkreuzungen und Fütterungsexperimenten mit Kot von *F. candida* zeigten in Kontrollen ohne Donorzellen bis zu 10^7 Kolonien pro ml Bakteriensuspension und pro Tier auf Selektionsnährböden mit X-Gluc/IPTG eine Blaufärbung. Die Transferraten konnten deshalb nicht exakt bestimmt werden. Als Konsequenz wurde der Donorstamm *E. coli* S17-1/ pSUP102lacTn5:B20 für Studien in den weiteren Bodentiersystemen nicht mehr eingesetzt.

In den Mikrokosmos Studien mit *L. rubellus* wurde der Transfer Luziferase markierter Plasmide von *E. coli* Donorstämmen auf Kotbakterien nur im Kot und nie im Donor durchsetzten Boden nachgewiesen. Das Plasmid pUTluxCDABE konnte im Donorstamm ohne Verwendung eines Substrates leicht durch lichtempfindliche Filme nachgewiesen werden. Die isolierten, stabilen Transkonjuganten waren stark autolumineszent und zeigten eine intensive Schwarzfärbung des Films.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zum Studium des Schicksals rekombinanter Plasmide im Darm von Bodentieren Antibiotika-Resistenzgene und das lacZ Markergen sich aufgrund des natürlichen Vorkommens vieler Resistenzen bzw. Laktoseabbauer nicht eignen. Dagegen ist das Luziferase-Markergen (*luc*, *lux*) zur Detektion von Transkonjuganten in

Bakteriensuspensionen aus Kot von Bodentieren durchaus zu verwenden, da das System eine hohe Empfindlichkeit aufweist und die Wirtsbakterien durch die Expression der Luziferase keine Fitnessseinbußen aufweisen.

2. WICHTIGE FAKTOREN ZUR ENTSTEHUNG REKOMBINANTER DARMBAKTERIEN WÄHREND DER DARMPASSAGE VON PLASMID-DNA

2.1 Aufnahme von rekombinanten Donorstämmen

Das bevorzugte Futter des in der Streuschicht lebenden Bodencollembolen *Folsomia candida* scheint in Pilzhyphen zu bestehen. Unter feuchteren Lebensbedingungen werden jedoch Nematoden gegenüber Pilzhyphen bevorzugt (LEE AND WIDDEN, 1996). Andere Studien bewiesen, dass verschiedene Collembolenarten Endomykorrhizen selektiv beweiden (THIMM and LARINK, 1995). Unter natürlichen Bedingungen leben Collembolen auch von Bakterienzellen, die sich auf verrottenden Pflanzenteilen vermehren (LUSSENHOP, 1992). Die Aufnahme der markierten *E. coli* Donorstämme wurde in dieser Studie durch ein mehrstündiges Aushungern der *F. candida* Individuen gewährleistet. Die Fressaktivität war so gut, dass die Bakterien vom Futterblock nach etwa einer Woche aufgenommen waren, so dass am 8. Tag jedes Fütterungsexperimentes ein neuer Futterblock eingesetzt werden musste. Dieser Austausch der Futterblöcke war auch in den Ergebnissen der Fütterungsexperimente durch eine Detektion höherer biolumineszenter Donorzellzahlen zu erkennen, und dies, obwohl die Anzahl der *F. candida* Individuen rückläufig war. Da die Inkubation bei 28°C stattfand, könnten die höheren Donorzellzahlen in der zweiten Woche auch auf ein leichtes Wachstum der Donorzellen im Kot zurückzuführen sein.

Mit der Verwendung der Collembolenart *Onychiurus fimatus*, der im Gegensatz zu *F. candida* bevorzugt in der Streuschicht lebt und dadurch auch andere Futterpräferenzen zeigt, sollten die mit *F. candida* gewonnenen Ergebnisse für Collembolen allgemein erweitert werden. In land- und forstwirtschaftlich genutzten Böden können 10⁴ oder mehr Individuen pro Quadratmeter von Collembolen vorkommen (LAGERLØV AND ANDRÉN, 1991). Die in den Mikroarthropoden lebenden Darmbakterien sind abhängig vom aufgenommenen Futter. Könnten sich aufgenommene Bakterienzellen an deren Darmmilieu adaptieren, müssten sie einen selektiven Vorteil haben (LUSSENHOP, 1992). *E. coli* wird weltweit in Laboratorien für molekulares Klonen eingesetzt. Die ökologischen Auswirkungen nach ihrer Freisetzung in der

Umwelt sind bisher unzureichend untersucht (BRETTAR AND HÖFLE, 1992; BOGOSIAN et al., 1993).

Insgesamt betrachtet, ist für die Entstehung rekombinanter Darmbakterien die Aufnahme einer ausreichenden Zellzahl der Donorstämme unerlässlich. Ein Aushungern kann die Aufnahme des gewünschten Testfutters, das nicht immer dem natürlichen Futter entspricht, erhöhen.

2.2 Überleben von aufgenommenen rekombinanten Donorstämmen

Vergleicht man die eingesetzten biolumineszenten *E. coli* Donorzellzahlen (10^6 cfu·mL⁻¹) mit den überlebenden Zellen im Kot am ersten und letzten Tag der Fütterungsexperimente mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc*, so stellt man fest, dass *E. coli* im Darm von *F. candida* zu 99,86 % reduziert wurde, im Darm von *O. fimatus* zu 98,1 % (das entspricht einer Reduktion von 10^4 auf 10^1 cfu mL⁻¹ Tier⁻¹) und im Darm von *L. rubellus* zu 100 %. Diese signifikanten Unterschiede zeigen, dass *E. coli* im Darm von Würmern stärker reduziert werden kann als im Darm von Collembolen. Die meisten *E. coli* Donorzellen wurden durch die Darmpassage verdaut. Nur in einzelnen Fällen, wie z. B. im Fütterungsexperiment mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* und *F. candida* Individuen ist eine relative Überlebensrate von 2,4 % zu verzeichnen. Die hohe Verdaulichkeit von *E. coli* konnten auch in einer anderen Studie mit einer Pulsfütterung bestätigt werden: Hier waren *E. coli* Zellen schon innerhalb 2 Tagen verdaut bzw. ausgeschieden (THIMM et al., 1998). Trotzdem war eine Donorgegenselektion notwendig, da immer einige Donorzellen die Darmpassage überlebten und durch das Laufen der Collembolen eine Verbreitung der Donorzellen vom Futterblock über die Agarschale nicht verhindert werden konnte. Die Gegenselektion wurde durch die Verwendung von Nährböden mit Benzoesäure als alleinige C-Quelle erreicht. Etwa die Hälfte aller kultivierbarer Darmbakterien kann auf benzoessäurehaltigen Nährböden wachsen, *E. coli* jedoch nicht. Durch die Unterdrückung einiger endogener Darmbakterien im Wachstum wurden wahrscheinlich niedrigere Plasmidtransferraten gemessen als in der Realität auftraten. In einem anderen Labor konnte kein Plasmidtransfer zwischen Bodenbakterien auf Agarplatten nachgewiesen werden, wenn die Donorzellzahlen zu niedrig waren. Für *E. coli* konnte im Vergleich der aufgenommenen zu abgegebenen Zellzahlen eine 60.000fache Reduktion durch die Darmpassage gemessen werden (SMIT UND VAN ELSAS, 1990). Dies könnte ein Grund für die relativ niedrigen Donor/Rezipientenraten im Kot von *F. candida* sein. Man kann sich vorstellen, dass direkt nach der Aufnahme der Donorzellen die Donor/Rezipientenraten viel höher sind und daher viel bessere Bedingungen für konjugativen Plasmidtransfer herrschen

als im Kot. Umgekehrt kann durch die Inkubation der Selektionsplatten von bis zu 4 Tagen Wachstum und klonale Ausbreitung von Transkonjuganten eine höhere Transferrate vortäuschen. Dies wurde auch von DE RORE et al. (1994) festgestellt. Allerdings zeigte die Anzahl und Diversität der isolierten Transkonjuganten der täglichen Analysen in Fütterungsexperimenten, dass der Plasmidtransfer im Darm der hier verwendeten Bodentiere nicht selten war.

In der eigenen Arbeit wurde in einem 14 Tage dauernden Fütterungsversuch mit täglicher Untersuchung des an der Bodenoberfläche abgelegten Kots von *L. rubellus* nur 12 Tage lang der Donorstamm im Kot nachgewiesen. Im Boden dagegen konnte *E. coli* erstaunlich lange überleben, was sehr wahrscheinlich mit der niedrigen Inkubationstemperatur von 12°C zusammenhängt. Eine Vermehrung der Donorstämme erfolgt bei niedrigen Temperaturen nur sehr langsam. Das aber trotz der Inkubationstemperatur von 12°C Plasmidtransfer stattfand, muss an der Aktivität von *L. rubellus* gelegen haben. Im Kot von *L. rubellus* wurden unter den gewählten Bedingungen nur 10^5 cfu pro g Kot Feuchtgewicht an Donorzellen nachgewiesen, obwohl der Boden im Mikrokosmos mit einer stationären Kultur durchsetzt war

(10^{11} cfu·mL⁻¹). Ähnliche Beobachtungen konnten HEIJNEN AND MARINISSEN (1995) in ihren Untersuchungen machen: Zellkonzentrationen von vier inokulierten Bakterienstämmen (*Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia* und *Flavobacterium* sp.) im Darm und Kot lagen bis zu 3 Zehnerpotenzen unter denen im inokulierten Boden. Andere Studien dokumentierten eine geringe Überlebenschance von *E. coli* im freien Boden (RECORBET et al., 1992 und 1993; VASSEUR et al., 1996). Würden *E. coli*-Stämme aus Laborzuchten in landwirtschaftlich genutzte Böden gelangen, würde man demnach ein schnelles Absterben erwarten und für diesen Fall ein ökologisches Risiko ausschließen können.

Es kann geschlussfolgert werden, dass zur Detektion rekombinanter Darmbakterien eine Donorgegenselektion notwendig ist, da einige Donorbakterien die Darmpassage überleben und so die Gefahr des Nachweises der Ausgangsstämme vermieden wird. Zur Sicherheit wurde eine Aussonderung der Donorstämme durch eine molekularbiologische Methode (ARDRA) zusätzlich vorgenommen. Rekombinante Darmbakterien waren sehr wohl in der Lage, sich länger im Darm der Collembolen zu etablieren, wodurch eine Gefahr der Verbreitung im Boden entsteht. Der Kot von Anneliden scheint für die inokulierten Bakterien

kein schützendes Mikrohabitat für das Überleben zu sein, da hier immer niedrigere Zellzahlen nachgewiesen wurden als im freien Boden.

3. MODELLSYSTEM BODENTIER ALS ORT HORIZONTALER PLASMIDTRANSFERS

3.1 Plasmidtransfer im Darm von *Folsomia candida*

Bei *F. candida* wurden in Kotablagen bis zu 10^{10} Bakterienzellen pro mL pro Individuum gefunden. In ähnlichen Untersuchungen von anderen Autoren wurden in Kotablagen nur 10^9 Bakterienzellen pro g Darminhalt nachgewiesen (BORKOTT AND INSAM, 1990). Durch Mischen solcher Kotablagen mit den verschiedenen Donorstämmen konnten in den eigenen Arbeiten unter definierten Laborbedingungen Transkonjuganten mit pRP4*luc* nachgewiesen werden. Dabei wurde für dieses konjugative Plasmid eine Transferrate von 10^{-2} Transkonjuganten pro Rezipienten erreicht. SMIT et al. (1993) beschrieben für eine Kreuzung mit *Pseudomonas fluorescens* als Donor und einem pRP4 enthaltenen Bakterienstamm ebenfalls Transferfrequenzen von 10^{-2} . Die in diesen Untersuchungen erhaltenen Plasmidtransferraten sind also mit denen in der Literatur beschriebenen vergleichbar. Mit einem pSUP104-Derivat wurden sogar bei den eigenen Arbeiten zwei Zehnerpotenzen höhere Transferfrequenzen gemessen. Da für diese Studien *E. coli* S17-1 als Donorstamm eingesetzt wurde, könnte man sich eine Verstärkung des Plasmidtransfers durch den im *E. coli* Genom integrierten pRP4 bzw. dessen Transfergene vorstellen. Fütterungsexperimente mit *E. coli* Donorstämmen wurden über eine Periode von 7 und 14 Tagen inkubiert, um einen intensiven Kontakt der Insekten mit den Donorstämmen zu erlauben und auch niedrige Transferraten nachweisen zu können. Die Entwicklung der Individuen war in den eigenen Versuchen nicht synchronisiert, was die schwankenden Bakterienzellzahlen erklären könnte. Zudem war der Kot, bedingt durch die Dauer der Versuche, zum Teil vor der Analyse schon einige Tage alt. Daher kann spekuliert werden, dass Konjugationsereignisse auch auf der Wasseragar-Oberfläche stattfinden konnten und nicht nur während der Darmpassage.

Im Experiment mit dem mobilisierbaren Plasmid pSUP202*luc* induzierte eine Verfütterung eine Übertragung des Plasmids, die in Mischungen von Kot- und Donorbakterien nicht nachgewiesen werden konnte. Das IncQ mobilisierbare Plasmid pSUP104*luc* konnte auf endogene Bakterien der Collembolen *F. candida* in Kreuzungen und Fütterungsexperimenten aus *E. coli* S17-1 übertragen werden. *E. coli* S17-1 ist ein Stamm mit chromosomal integriertem pRP4, das zur Gruppe der IncP-Plasmide, die einen weiten Wirtsbereich haben,

gehört (SIMON AND PÜHLER, 1983). In Bakterienkreuzungen war *E. coli* NM522 mit einem F⁺ Plasmid (IncF1, enger Wirtsbereich) auch zur Mobilisierung von pSUP104*luc* fähig. Die Effizienz der Mobilisierung von IncF1 war einige Zehnerpotenzen unter der von IncP. Dieses Ergebnis wird durch Ergebnisse aus einer Studie von WILLETTS AND CROWTHER (1981) bestätigt. Andere Studien mit Reinkulturen konnten allerdings keine IncQ Mobilisierung mit F-Plasmiden feststellen (HUGHES AND DATTA, 1983). In Fütterungsexperimenten mit *E. coli* NM522/pSUP104*luc* konnte keine Mobilisierung nachgewiesen werden. Möglicherweise reichte der Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzellen im Darm der *F. candida* Individuen nicht aus. Dagegen war der Kontakt in Bakterienkreuzungen auf den Filtermembranen sehr eng und 24 Stunden dauernd. Die Plasmide konnten unter den gewählten Bedingungen nur mobilisiert werden, wenn in Donorzellen das chromosomal integrierte pRP4 mit mobilisierenden und selbst-übertragbaren Funktionen vorhanden war. In einer anderen Studie konnte die Übertragung eines IncQ Plasmids in Filterkreuzungen und sterilem Boden auch von einem nicht-mobilisierenden Stamm nachgewiesen werden (SMIT et al., 1993). Außerdem konnte auch in einem Feldexperiment nach Zugabe von Gülle IncQ Mobilisierung in endogene Bodenbakterien detektiert werden (GÖTZ AND SMALLA, 1997). Verbreitung mobilisierbarer Plasmide in einer Bakterienzelle ist also möglich bei gleichzeitigem Vorhandensein des konjugativen Plasmids pRP4 im Genom integriert oder als zweites Plasmid vorliegend, oder außerhalb der Zelle durch Kontakt mit einer pRP4-haltigen zweiten Bakterienzelle. Außerdem zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass auch andere konjugative Plasmide, wie F-Plasmide, zur Mobilisierung fähig sind.

In allen Experimenten erfolgte die Anzucht der Tiere unter gleichen Bedingungen. In den Zuchtgefäßen befanden sich alle Zwischenstadien von gerade geschlüpften Individuen bis zu ausgewachsenen Individuen. Um die Unterschiede zu minimieren, wurden mit entsprechenden Sieben die großen von den kleineren Tieren getrennt. So wurde ein Fütterungsexperiment mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* mit drei verschiedenen Tiergrößen, die jeweils unterschiedliche Entwicklungsstadien repräsentierten, durchgeführt. Die mittelgroßen Individuen erzielten eine deutlich höhere Gentransferrate als die in den Versuchen eingesetzten ausgewachsenen Individuen. Möglicherweise ist dies mit der größeren Fraßaktivität der jüngeren Entwicklungsstufe zu erklären. Für Gentransfer-Experimente mit Collembolen sollte daher ein mittleres Entwicklungsstadium gewählt werden.

Zur Ergänzung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Nalidixinsäure, in denen der Ort des Plasmidtransfers ermittelt werden sollte, wurden die anhaftenden und im Darm der Individuen vorhandenen Bakterien am Ende der Fütterungsexperimente untersucht. In dieser Studie konnten in 2 von 10 Versuchen Donorzellen in den Individuen detektiert werden. Diese könnten von den Füßen der Insekten stammen, oder aus Individuen, die gerade erst Futter bzw. Donorzellen, aufgenommen hatten. Aus einem von 10 Fütterungsexperimente ließen sich in den Suspensionen der 74 zerkleinerten Tiere auch biolumineszente Transkonjuganten nachweisen. Sie konnten nur im Darm der Individuen entstanden sein. Die Untersuchung der in Fütterungsexperimenten eingesetzten ganzen Individuen zeigte, dass Konjugation im Darm der Collembolen stattfand, obwohl die Donorzellen im Kot nur in geringer Zellzahl (siehe Tabelle 10, Seite 52) nachgewiesen wurden.

Durch die Verdauung der aufgenommenen *E. coli* Donorzellen sollten die markierten Plasmide auch außerhalb von Bakterienzellen frei im Darm vorliegen und somit für eine Transformation zur Verfügung stehen. Die vielfältigen Bakterienarten im Darm von *F. candida* bieten ausreichend Rezipienten. In dieser Arbeit sollte Transformation als ein Prozess des Plasmidtransfers durch das nicht mobilisierbare, nicht konjugative Plasmid pUC18*luc* nachgewiesen werden. Dieser Klonierungsvektor lässt sich zwar im Labor durch künstliche Transformation übertragen (SAMBROOK et al., 1989), kann aber nur in *Enterobacteriaceae* repliziert werden. Da pUC18*luc* nicht auf endogene Darmbakterien von *F. candida* übertragen wurde, könnte der enge Wirtsbereich eine Detektion der Transformation verhindert haben. Die Ergebnisse zeigten nicht eindeutig, ob die Transformation durch DNA-Abbau (Nukleasen), fehlende DNA-Aufnahme oder falsche Wirtsbereiche der Darmbakterien verhindert wurde. Zusätzliche Experimente mit transformierbaren Plasmiden mit weitem Wirtsbereich, wie RSF1010 (DERBYSHIRE AND WILLETTS, 1987) könnten hier möglicherweise eine Antwort liefern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass auch bei einer Aufnahme von großen Mengen an freier rekombinanter DNA die Möglichkeit einer Transformation im Darm von Bodentieren nicht auszuschließen ist. Wie aus den Ergebnissen der bakteriellen Kreuzungen abgeleitet werden kann, befinden sich im Kot der Collembolen *F. candida* hohe Bakterienzellzahlen. Konjugative Plasmide werden in Bakterienmischungen wie auch im Darm mit hoher Transferrate übertragen. Dagegen brauchen mobilisierende Plasmide

Wirtsbakterien, die zusätzlich mobilisierend auf die Plasmide einwirken können. Der Plasmidtransfer ist auch stark abhängig vom Entwicklungsstadium der Individuen.

3.2 Plasmidtransfer im Darm von *Onychiurus fimatus*

In Plasmidtransferexperimenten mit dem Donorstamm *E. coli* HB101/pRP4*luc* und Kot aus *O. fimatus* wurden niedrigere Raten erzielt ($3,2 \cdot 10^{-5}$ Transkonjuganten pro Rezipienten) als mit *E. coli* S17-1/pSUP104*luc* ($4,0 \cdot 10^{-6}$ Transkonjuganten pro Rezipienten). In täglichen Analysen in einem Fütterungsexperiment über zwei Wochen mit dem selbst übertragbaren Plasmid pRP4*luc* im mobilisierenden Stamm *E. coli* S17-1 konnten Transkonjuganten isoliert werden, wobei die Plasmidtransferraten von $6,0 \cdot 10^{-2}$ bis $5,0 \cdot 10^{-8}$ Transkonjuganten pro Rezipienten ähnlich wie bei *F. candida* schwankten. Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Transferfrequenzen in beiden Tiersystemen, lag der Plasmidtransfer im Darm von *O. fimatus* um eine Zehnerpotenz höher als bei *F. candida*. Konjugative Plasmide wurden aus nicht-mobilisierenden Bakterienstämmen schlechter transferiert als aus dem mobilisierenden Donorstamm *E. coli* S17-1. Der Einfluss der Häutungszyklen war während der Verfütterung von *E. coli* S17-1/pRP4*luc* über zwei Wochen an *O. fimatus* Individuen nicht so deutlich zu erkennen wie bei *F. candida*.

Aus Mischungen von *E. coli* HB101/pSUP104*luc* und extrahierten Kotbakterien konnten keine Transkonjuganten isoliert werden. Der mobilisierende *E. coli* Donorstamm S17-1 ermöglichte demnach erst den Transfer von mobilisierbaren Plasmiden. Andere Studien belegen, dass mobilisierbare Plasmide im Boden vorhanden sind und auch exogen, also mittels eines Helferstammes, übertragen werden können (TOP et al., 1994). Die Übertragung des mobilisierbaren Plasmids pSUP104*luc* im *E. coli* S17-1 in Fütterungsexperimenten verlief mit $2,0 \cdot 10^{-5}$ Transkonjuganten pro Rezipienten im Vergleich zu den Mischungsexperimenten auf Filtermembranen ($3,2 \cdot 10^{-5}$ Transkonjuganten/Rezipienten) etwas besser. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Darm von *O. fimatus* den Transfer von Plasmiden mit weitem Wirtsbereich erhöhen könnte. Da nur in Versuchen mit Plasmiden, die sich in einem weiten Wirtsbereich replizieren können, Transkonjuganten isoliert werden konnten, scheinen solche Plasmide bevorzugt auf endogene Darmbakterien übertragen zu werden.

Es wurden keine Transkonjuganten aus Experimenten mit dem für *Enterobacteriaceae* beschränkten Wirtsbereich von pSUP202*luc* detektiert. Da aber verwandte Stämme dieser Gruppe aus dem Kot von Fütterungsexperimenten mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* isoliert werden

konnten, lässt sich mutmaßen, dass dieses Ereignis an der Detektionsgrenze liegen könnte und somit nicht nachzuweisen ist.

Die Daten dieser Studie zeigten, dass *E. coli* auch im Darm von *O. fimatus* verdaut wird. Die DNA würde, wie schon zuvor für *F. candida* beschrieben, aus solchen Donorzellen freigesetzt werden und könnte von natürlich kompetenten Bakterienstämmen im Darm von *O. fimatus* aufgenommen werden. Es konnte jedoch kein Transfer von pUC18*luc*, also keine Transformation nachgewiesen werden. Generell kann man die Möglichkeit einer Transformation jedoch nicht ausschließen, da in dieser Studie ein Plasmid mit engem Wirtsbereich verwendet wurde, eventuell ungeeignete Selektionsbedingungen durch die verwendete Benzoesäure in den Nährböden vorlagen oder zufällig keine natürlich transformierbaren Rezipienten vorhanden waren.

Aus Transferstudien mit *O. fimatus* wurden weniger unterschiedliche Bakterienarten isoliert als aus *F. candida*. Nach der Sequenzierung der PCR - amplifizierten 16S rDNA Gene wurden sie als *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.* und *Serratia marcescens* identifiziert, die zur γ -Untergruppe der *Proteobacteria* zählen. In Experimenten mit in einem weiten Wirtsbereich replizierenden Plasmiden und Kot von *O. fimatus* wurde ein mit *P. putida* verwandtes Isolat als dominanter Transkonjugant isoliert. Da *P. putida* verwandte Isolate in *F. candida*- und *O. fimatus* - Untersuchungen vorkamen, wurden die 16S rDNA Gene verglichen. Bei 1356 verglichenen Nukleotiden gab es 99,4 % Homologie. Die Sequenzierung ergab also fast identische Sequenzen. *P. putida* ist offenbar fähig, den Darm zweier unterschiedlicher Collembolen zu besiedeln.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen mit *O. fimatus* könnte zusammenfassend bemerkt werden, dass es Bakterienarten geben muss, die speziell an Collembolen oder andere Bodentiere angepasst sind, und möglicherweise den Darm der Bodentiere zum Wachstum, zur Verbreitung und/oder Austausch genetischer Information nutzen. *O. fimatus* lebt zwar in denselben Bodenkompartmenten wie *F. candida*, scheint aber andere Bakterienarten aufzunehmen, wie z. B. Wurzel kolonisierende oder epiphytische Bakterien.

3.3 Plasmidtransfer im Darm von *Lumbricus rubellus*

Die Plasmidtransferraten der täglichen Losunguntersuchungen aus Fütterungsexperimenten mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* schwankten von $7,5 \cdot 10^{-7}$ bis $1,0 \cdot 10^{-4}$ und lagen durchschnittlich bei $5,2 \cdot 10^{-5}$ Transkonjuganten pro Rezipienten pro Tag. In Filterkreuzungen mit dem gleichen

Donorstamm und extrahierten Bakterien aus Losungen lagen die Transferfrequenzen niedriger ($7,2 \cdot 10^{-7}$ Transkonjuganten pro Rezipienten pro Tag). In einer ähnlichen Studie eines anderen Autors wurde ein Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von Würmern auf den Plasmidtransfer des konjugativen Plasmids pJP4 aus *P. fluorescens* auf endogene Bodenbakterien entwickelt. Dabei wurden drei verschiedene Wurmart (*L. terrestris*, *L. rubellus* und *A. trapezoides*) zwei Wochen lang in sterilisierten Bodensäulen gesetzt, dessen Böden mit 10^8 Zellen pro g Boden mit *P. fluorescens* inokuliert waren. In Bodensäulen mit Würmern wurde eine höhere Anzahl an Transkonjuganten detektiert. Ein anderes Experiment wurde in unsterilen Bodensäulen durchgeführt, wobei die Würmer mit räumlich getrennten Donor- und Rezipientenstämmen in Berührung kamen. In Bodensäulen mit Würmern war die Zahl der Donoren und Rezipienten erhöht und auch nur hier konnten Transkonjuganten mit einer Frequenz von 10^2 Zellen pro g Boden detektiert werden (DAANE et al., 1996; 1997). Dagegen zeigten diese Studien, dass der Darm von *L. rubellus* bessere Bedingungen für Konjugation bietet als es der enge Kontakt von Donor- und Rezipientenzellen auf Nylonmembranen bieten kann. Allerdings wurden die Transferfrequenzen generell unterschätzt, da alle Rezipienten, die nicht fähig waren, auf Benzoat als alleinige C-Quelle zu wachsen, ausgeschlossen wurden. Andererseits wäre eine klonale Vermehrung in Filterkreuzungen aufgrund der höheren Inkubationstemperatur von 28 °C möglich gewesen, was man in den Versuchen mit Boden-Mikrokosmen durch die niedrige Inkubationstemperatur von 12 °C ausschließen kann. In den Bodenmikrokosmen konnte man eine Reduktion der *E. coli* Donorstämme um zwei Zehnerpotenzen feststellen. Am 13. und 14. Tag wurden keine biolumineszenten Donorzellen mehr detektiert, aber trotzdem noch Transkonjuganten isoliert. Das bedeutet, dass die Transkonjuganten besser überlebten als die Donorzellen.

Weiterhin wurde in dieser Studie das miniTn5 enthaltene Plasmid pUTluxCDABE, das Transfergene aus pRP4 enthält, verwendet (DE LORENZO et al., 1990). Transkonjuganten konnten nur in bakteriellen Kreuzungen auf Nylonmembranen detektiert werden, und dies nur mit einer sehr geringen Transferrate von $1 \cdot 10^{-9}$ Transkonjuganten pro Rezipienten. Durch Southern-Analysen wurde bewiesen, dass einige Rezipienten das miniTn5 mit dem luxCDABE-Gen chromosomal integriert hatten, was eine starke Autolumineszenz bei den Rezipientenzellen bewirkte. Da mit diesem Plasmid durch die Darmpassage keine Transkonjuganten isoliert werden konnten, lässt sich vermuten, dass durch die Größe des Plasmids von 16,1 Kb für die vollständige Übertragung eine längere Zeit und ein intensiverer

Kontakt der Donor- und Rezipientenzellen notwendig ist. Diese Bedingungen waren auf den Nylonmembranen gegeben.

Das mobilisierbare IncQ Plasmid pSUP104*luc* mit einem weitem Wirtsbereich konnte aus dem mobilisierenden Stamm *E. coli* S17-1 auf endogene Bakterien aus *L. rubellus* übertragen werden. Die Transferrate lag bei $2 \cdot 10^{-4}$ Transkonjuganten pro Rezipientenzellen pro g Kot Trockengewicht. In Filterkreuzungen war die Übertragungsrate ein bis drei Zehnerpotenzen niedriger als in Fütterungsexperimenten. Der Transfer von pSUP104*luc* aus dem nicht-mobilisierenden Stamm *E. coli* HB101 würde ein IncP Helferplasmid benötigen, sei es aus dem gleichen Donorstamm oder aus der bakteriellen Gemeinschaft im Darm von *L. rubellus*. In Bodenhabitaten wurde das Vorkommen von IncP Plasmiden zwar dokumentiert (GÖTZ et al., 1996; POWELL et al., 1993), aber unter diesen experimentellen Bedingungen konnte der Plasmidtransferort nicht bestimmt werden. Auch ein anderes mobilisierbares Plasmid mit einem engen Wirtsbereich, pSUP202*luc*, konnte nicht auf endogene Bakterien übertragen werden, obwohl es aus einem mobilisierbaren *E. coli* Stamm zur Verfügung gestellt wurde. Der nicht-konjugative nicht-mobilisierbare Klonierungsvektor pUC18*luc* mit engem Wirtsbereich konnte ebenfalls nicht auf Darmbakterien übertragen werden. Wahrscheinlich gab es keine geeigneten Rezipienten, in denen die beiden Plasmide repliziert werden konnten. Diese Vermutung wurde dadurch unterstützt, dass alle isolierten Transkonjuganten aus *L. rubellus* nicht zu den *Enterobacteriaceae* Gruppe gehörten.

In der Studie von FISCHER et al. (1995) wurden von *Lumbricus terrestris* L. bis zu 3 % der im Darm lebenden Bakterien der α -, β - oder γ -Subgruppe der *Proteobacteria* zugeordnet, im Kot 10,4 %. Frühere Studien zeigten, dass *Enterobacter cloacae* effektiv den Darm und Kot eines Nachtfalters kolonisieren konnte (ARMSTRONG et al., 1989). Aus den täglichen Kotuntersuchungen dieser Studie konnten aus Boden-Mikrokosmen mit *E. coli* S17-1/pRP4*luc* und *L. rubellus* 2 Wochen lang (bis auf 4 Tage) Transkonjuganten isoliert werden. Auch aus Fütterungsversuchen und bakteriellen Kreuzungen auf Nylonmembranen mit dem Donorstamm *E. coli* S17-1/pSUP104*luc* ließen sich lumineszente Rezipienten isolieren. Die Diversität der isolierten Transkonjuganten aus dem Kot von *L. rubellus* stimmten mit den Wirtsbereichen der IncP und IncQ Plasmiden überein. Zwei der acht sequenzierten Isolate der PCR amplifizierten 16S rDNA Gene aus dem Kot von *L. rubellus* ergaben mit 86,6 % und 96,7 % Homologie eine Zugehörigkeit zur γ -Untergruppe der *Proteobacteria*, wobei der Artnamen allerdings nicht zugeordnet werden konnte. Alle Isolate, die Bakterienarten

zugeordnet werden konnten, zeigten eine mindestens 92 %ige Homologie zu den in den Datenbanken gespeicherten Bakterienarten. Sie konnten Gattungen zugeordnet werden, die typischerweise im Boden gefunden werden (SØRENSEN et al., 1999).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen mit *L. rubellus*, dass Luziferase markierte IncP und IncQ Plasmide aus mit *E. coli* Donorstämmen durchsetzten Versuchsboden auf Kotbakterien von *L. rubellus* im Darm übertragen wurden. Im Versuchsboden selbst konnten keine Transkonjuganten isoliert werden. Dadurch wurde die verstärkende Einwirkung von *L. rubellus* auf den Plasmidtransfer im Darm bestätigt.

4. ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN ZUR VERBREITUNG GENTECHNISCH VERÄNDERTER MIKROORGANISMEN IN BEZUG AUF BIOLOGISCHE SICHERHEITSFORSCHUNG

Die biologische Sicherheitsforschung befasst sich mit der Ableitung von möglichen Risiken für die Umwelt und den Menschen, die von freigesetzten gentechnisch veränderten Organismen ausgehen könnten. In dieser Arbeit wurden ausschließlich gentechnisch veränderte Bakterien für die Untersuchungen verwendet. Dabei sollten aus den Ergebnissen im wesentlichen mögliche Risiken für die Umwelt betrachtet werden. Generell ist Schaden in der Umwelt schwer von Gentransfers aus zu definieren, weil eine räumliche und zeitliche Begrenzung fehlt und oftmals Wertvorstellungen in die Beurteilung mit einfließen. Ein potentiell Risiko für die Umwelt kann definiert werden als das Produkt von Schadenswahrscheinlichkeit und Schadenshöhe. Letztere ist wiederum abhängig vom phänotypischen Verhalten des transgenen Organismus.

Die Schadenswahrscheinlichkeit der verwendeten transgenen Sequenzen ist im Fall des Luziferase-Markergens als gering einzustufen, da für das gentechnisch veränderte Bakterium keinerlei Beeinträchtigungen der Fitness oder der Stoffwechselwege bekannt sind. Allerdings wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass nach der Übertragung der transgenen Sequenz eine unterschiedlich starke Expression der Luziferase in den verschiedenen Rezipientenbakterienarten stattfand (Tabelle 9, Seite 51). Als gesundheitlich bedenklich werden meist die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen als Markergene bei der Herstellung gentechnisch veränderter Organismen hinterfragt. Hier befürchtet man eine unkontrollierte Verbreitung der Antibiotikaresistenzgene über horizontalen Gentransfer auch z. B. in Nutzpflanzen, aber besonders in human pathogenen Keimen, die häufig im Boden vorkommen. Antibiotika, die in der Humantherapie verwendet werden, könnten durch

Resistenzentwicklungen ihre Wirkung verlieren. Die Empfehlung lautet hier, nur Antibiotikaresistenzgene zu verwenden, die in der Humantherapie keine Bedeutung haben, wie z. B. Hygromycin oder Kanamycin (PÜHLER, 1998). Zukünftig wäre es aber besser, aufgrund der weiten Verbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen und zur Vermeidung weiterer Risiken, auf deren Verwendung in rekombinanten Organismen gänzlich zu verzichten.

Der in dieser Arbeit untersuchte Plasmidtransfer in Bodentieren behandelt das Risiko der Schadenswahrscheinlichkeit, also ob ein Plasmid übertragen wird oder nicht, nicht aber die Schadenshöhe, bei der noch die Untersuchung beispielsweise von Fitnesseffekten notwendig gewesen wäre. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass transgene Sequenzen durch Konjugation mit großer Wahrscheinlichkeit zwischen verschiedenen Bakterienspezies weitergegeben werden, wobei die für den Mechanismus verantwortlichen Gene auf Plasmide kodiert vorliegen. Die Risikoabschätzung muss sich demnach verstärkt mit den transgen kodierten phänotypischen Eigenschaften befassen. Zweck von Modellökosystemen ist die komplexen Eigenschaften von natürlichen Ökosystemen in vereinfachter Form manipulierbar und damit untersuchbar zu machen. Dabei soll die Komplexität des Systems zumindest teilweise erhalten, die Variabilität der Ergebnisse im Vergleich zu Freilanduntersuchungen gesenkt und die Kontrolle über einwirkende äußere Faktoren erhöht werden (LUOTOLA, 1986). Die Ergebnisse aus Mikrokosmosexperimenten können nicht direkt auf Feldbedingungen übertragen werden, da Unterschiede in den biotischen und abiotischen Faktoren, die das Überleben der getesteten Donorstämme beeinflussen können, unvermeidbar sind. In den hier beschriebenen modellhaften Versuchen mit *Lumbricus rubellus* kann eine unbeabsichtigte Freisetzung eher mit einer geringen Schadenswahrscheinlichkeit eingestuft werden, da die Donorstämme im Boden nicht länger als 10 Tage überlebt haben. Dieses Ergebnis wird auch in einer anderen Untersuchung bestätigt, wo ein anderer *E. coli* - Stamm nicht länger als 7 Tage im Boden überlebte (DOYLE AND STOTZKY, 1993).

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass rekombinante Darmbakterien sich in Bodentieren etablieren können und im Zuge der Nahrungskette auch in andere Tiere verbreitet werden. Zukünftig wird es nötig sein, die Wissenslücken in ökologischen Zusammenhängen zu schließen, um die Verbreitung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen in Bezug auf die biologische Sicherheitsforschung beurteilen zu können.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der Sicherheitsforschung bei freigesetzten gentechnisch veränderten Organismen in Böden das Schicksal von Plasmiden mit verschiedenen Markergenen, Übertragungseigenschaften und Wirtsbereichen in Bodentieren untersucht. Dazu wurden Testsysteme entwickelt, die den Einfluss unterschiedlicher Übertragungsmechanismen der getesteten Plasmide beim Transfer vom Donorstamm zur Darmmikroflora aufzeigen sollten.

Prinzipiell wurden zur Beantwortung der Fragestellungen zwei methodische Ansätze verfolgt. Zum einen wurden die aus gesammeltem Kot extrahierten Darmbakterien mit den verschiedenen Donorstämmen vermischt und auf einem Nylonfilter unter Laborbedingungen relativ kurze Zeit inkubiert. Zum anderen wurden die verschiedenen Donorstämme zwei Collembolenarten als Futter auf einem Agarblock angeboten, oder im Experiment mit dem Wurm *L. rubellus* mit Boden vermischt, und über einen Zeitraum von zwei Wochen inkubiert. Das Monitoring der entstandenen rekombinanten Darmbakterien erfolgte zuerst durch Selektionsmedien, denen neben Antibiotika auch Benzoesäure zur Donor-Gegenselektion zugesetzt wurden. Die Detektion der Transkonjuganten erfolgte durch Biolumineszenztests. Anschließend wurden rekombinante und biolumineszente Darmbakterien durch ARDRA, Substratverwertungstests (Biolog), 16S rDNA-Sequenzierung und Datenbankvergleichen näher charakterisiert.

Welchen Einfluss haben verschiedene Transfermechanismen der Plasmide auf die Übertragung von *E. coli* nach endogenen Darmbakterien?

Plasmidtransfer war mit dem in einem weiten Wirtsbereich replizierenden konjugativem Plasmid pRP4*luc* und dem mobilisierbaren Plasmid pSUP104*luc* nachweisbar. Dabei wurde pSUP104*luc* nur aus dem mobilisierenden *E. coli* Stamm S17-1 auf Darmbakterien übertragen, pRP4*luc* zudem auch aus dem nicht-mobilisierenden *E. coli* Stamm HB101. Die Verfütterung der Donorstämme *E. coli* S17-1/pSUP202*luc* an *F. candida* Individuen, einem mobilisierbaren Plasmid mit engem Wirtsbereich, erzielte wenige Transkonjuganten, die das aufgenommene Plasmid nicht stabil replizieren konnten. Dieses Ergebnis bestätigt die Sensitivität des Luziferase-Biolumineszenztests. In *L. rubellus* Fütterungsexperimenten wurde ein Transfer des mini Tn5 enthaltenen mobilisierbaren Plasmids pUT*lux*CDABE mit weitem Wirtsbereich in wenigen Fällen mit chromosomaler Integration festgestellt. In keinem der ausgewählten Bodentiere wurde ein Transfer des nicht mobilisierbaren Plasmids pUC18*luc*

mit engem Wirtsbereich detektiert. Experimente zur Inhibierung der Konjugation mit Nalidixinsäure deuteten eher auf einen Transfer des Plasmids pRP4*luc* im Darm als im Kot hin. Die Verfütterung von *E. coli* S17-1/pRP4*luc* erzielte bei mittelgroßen Individuen höhere Übertragungsraten als bei adulten Individuen.

Der Plasmidtransfer im Darm von Bodentieren ist also abhängig von den auf den Plasmiden vorhandenen Transfergenen. Enthält das Rezipientenbakterium zusätzlich mobilisierbare Plasmide oder *tra*⁺-Gene im Chromosom, wird der Plasmidtransfer zusätzlich gefördert. Weiterhin können jüngere Entwicklungsstadien einen Plasmidtransfer begünstigen.

Können rekombinante Darmbakterien bei der Darmpassage von Plasmid-DNA entstehen?

Biolumineszente rekombinante Darmbakterien (Transkonjuganten) wurden bei Collembolen innerhalb eines Tages nach Beginn der Fütterungsexperimente und bei *L. rubellus* ab dem 3. Tag und dann während der Inkubationsperiode von zwei Wochen gefunden. Am 5. Tag konnten in allen drei untersuchten Bodentiere keine Transkonjuganten detektiert werden. Bei Collembolen wird der Plasmidtransfer durch regelmäßig auftretende Häutungszyklen unterbrochen, da die Darminnenwände mit gehäutet werden. Im Verlauf der Experimente wurde eine bemerkenswerte Diversität von Transkonjuganten isoliert, die mittels dem Substratverwertungstest (Biolog) und 16S-rDNA Sequenzierung meistens zur α -, β -, oder γ -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet werden konnten. Je nach Bakterienart, überlebten Transkonjuganten im Darm der beiden Collembolenarten und *L. rubellus* 8 Tage bis mehrere Wochen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine hohe Vielfalt der endogenen Darmbakterien in Bodentieren, was die Wichtigkeit des Darms von Bodentieren als potentiellen Ort für vermehrten Gentransfer im Vergleich zum freien Boden unterstreicht.

Sind Collembolen und Anneliden als Modellsysteme für horizontalen Plasmidtransfer geeignet?

Die hier verwendeten Arten zeichnen sich durch eine hohe Individuenzahl in den oberen Bodenbereichen aus und können unter Laborbedingungen leicht gezüchtet und gehalten werden. Da aus allen Versuchsanordnungen Transkonjuganten isoliert werden konnten, eignen sich Collembolen und Anneliden als Modellsysteme zum Studium des horizontalen Plasmidtransfers.

Können Bodentiere transgene Sequenzen im Boden verbreiten?

Die Arbeit hat insgesamt deutlich gemacht, dass biologische "Hot Spots" im Boden, wie der Darm von Bodentieren oder Kot bzw. Losungen, eine hohe Bedeutung für den Transfer von Genen auf bodenadaptierte Mikroorganismen haben. Kennt man die Mobilität bzw. den Aktionsradius der Tiere und deren Stellung in Nahrungsnetzen, lässt sich deren Bedeutung für die Verbreitung der transgenen Darmbakterien abschätzen. Die Aufklärung des Schicksals von Informationen auf eingebrachten Genen muss die gesamte biotische Komponente der Böden berücksichtigen. Experimente mit tierfreien Bodenproben sind nicht aussagekräftig für den Lebensraum Boden.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALTSCHUL, S.F., W. GISH, W. MILLER, E.W. MYERS, AND D.J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- AMARGER, N., AND D. DELGUTTE. 1990. Monitoring genetically manipulated *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* released in the field. In: International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms: 221-225. Kiawah Islands, South Carolina, Tagungsband.
- ANGLES, M.L., K.C. MARSHALL, AND A.E. GOODMAN. 1993. Plasmid Transfer between Marine Bacteria in the Aqueous Phase and Biofilms in Reactor Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 843-850.
- ARMSTRONG, J.L., L.A. PORTEOUS, AND N.D. WOOD. 1989. The cutworm *Peridroma saucia* (Lepidoptera: Noctuidae) supports growth and transport of pBR322-bearing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2200-2205.
- ARMSTRONG, J.L., N.D. WOOD, AND L.A. PORTEOUS. 1990. Transconjugation between Bacteria in the Digestive Tract of the Cutworm *Peridroma saucia*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1492-1493.
- BALE, M.J., J.C. FRY AND M.J. DAY. 1987. Plasmid Transfer between Strains of *Pseudomonas aeruginosa* on Membrane Filters Attached to River Stones. *Journal of General Microbiology* **133**: 3099-3107.
- BÄRLOCHER, F. 1999. Vergleich zweier Kennwerte: t-Test und Alternativen, Kapitel 7, 68-81. In Felix Bärlocher (ed.), *Biostatistik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- BAUR, B., K. HANSELMANN, W. SCHLIMME, AND B. JENNI. 1996. Genetic Transformation in Freshwater: *Escherichia coli* is Able To Develop Natural Competence. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3673-3678.
- BEJ, A.K., PERLIN, M.H., AND R.M. ATLAS. 1988. Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2472-2477.
- BIRNBOIM, H.C., AND J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- BOCHNER, B. 1989. Breathprints at the microbial level. *ASM News* **55**: 536-539.
- BOGOSIAN, G., P.J.L. MORRIS, D.B. WEBER, AND J.F. KANE. 1993. Potential for gene transfer from recombinant *Escherichia coli* K-12 used in bovine somatotropin production to indigenous bacteria in river water. *Journal of Industrial Microbiology* **11**: 235-241.

- BORKOTT, H., AND H. INSAM. 1990. Symbiosis with bacteria enhances the use of chitin by the springtail *Folsomia candida* (Collembola). *Biology and Fertility of Soils* **9**: 126-129.
- BOYER, H.W., AND D. ROULLAND-DUSSOIX. 1969. A complementation analysis of restriction and modification in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **41**: 459-472.
- BRETTAR, I., AND M.G. HÖFLE. 1992. Influence of Ecosystematic Factors on Survival of *Escherichia coli* after Large-Scale Release into Lake Water Mesocosms. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2201-2210.
- CHAMIER, B., M.G. LORENZ, AND W. WACKERNAGEL. 1993. Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1662-1667.
- CLEWELL, D.B., AND S.E. FLANNAGAN. 1993. The conjugative transposons of Gram-positive bacteria: 369-393. *In*: Clewell, D.B. (ed.): *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York.
- COHEN, S.N., A.C.Y. CHANG, AND L. HSU. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **69**: 2110-2114.
- CRESSWELL, A., L. SKOT AND A.R. COOKSON. 1994. The construction, detection and use of bioluminescent *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* strains. *Journal of Applied Bacteriology* **77**: 656-665.
- DAANE, L.L., J.A. MOLINA, E.C. BERRY, AND M.J. SADOWSKY. 1996. Influence of Earthworm Activity on Gene Transfer from *Pseudomonas fluorescens* to Indigenous Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 515-521.
- DAANE, L.L., J.A.E. MOLINA, AND M.J. SADOWSKI. 1997. Plasmid Transfer between Spatially Separated Donor and Recipient Bacteria in Earthworm-Containing Soil Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 679-686.
- DAHLBERG, C., C. LINBERG, V.L. TORSVIK, AND M. HERMANSSON. 1997. Conjugative Plasmids Isolated from Bacteria in Marine Environments Show Various Degrees of Homology to Each Other and Are Not Closely Related to Well-Characterized Plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4692-4697.
- DE LORENZO, V., M. HERRERO, U. JAKUBZIK, AND K.N. TIMMIS. 1990. Mini-Tn5 Transposon Derivatives for Insertion Mutagenesis, Promotor Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria. *Journal of Bacteriology* **172**: 6568-6572.

- DERBYSHIRE, K.M., AND N.S. WILLETTS. 1987. Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: A genetic analysis of its origin of transfer. *Molecular and General Genetics* **206**: 154-160.
- DE RORE, H., E. TOP, F. HOUWEN, M. MERGEAY, AND W. VERSTRAETE. 1994a. Evolution of heavy metal resistant transconjugants in a soil environment with a concomitant selective pressure. *FEMS Microbiology Ecology* **14**: 263-274.
- DE RORE, H., K. DEMOLDER, K. DE WILDE, E. TOP, F. HOUWEN, AND W. VERSTRAETE. 1994b. Transfer of the catabolic plasmid RP4::Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown. *FEMS Microbiology Ecology* **15**: 71-78.
- DOWER, W.J., J.F. MILLER, AND C.W. RAGSDALE. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**: 6127-6145.
- DOYLE, J.D., AND G. STOTZKY. 1993. Methods for the detection of changes in the microbial ecology of soil caused by the introduction of microorganisms. *Microbial Releases* **2**: 63-72.
- FISCHER, K., D. HAHN, R.I. AMANN, O. DANIEL, AND J. ZEYER. 1995. In situ analysis of the bacterial community in the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. by whole-cell hybridization. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 666-673.
- FORDE, C.B., R. PARTON, AND J.G. COOTE. 1999. Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of *Bordetella bronchioseptica* in murine phagocytes. *Infection and Immunity* **66**: 3198-3207.
- FRISCHER, M.E., J.M. THURMOND, AND J.H. PAUL. 1990. Natural Plasmid Transformation in a High-Frequency-of-Transformation Marine *Vibrio* Strain. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3439-3444.
- GEALT, M.A., M.D. CHAI, K.B. ALPERT, AND J.C. BOYER. 1985. Transfer of plasmids pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 836-841.
- GLEW, J.G., J.S. ANGLE, AND M.J. SADOWSKY. 1993. *In vivo* transfer of pR68.45 from *Pseudomonas aeruginosa* into indigenous soil bacteria. *Microbial Releases* **1**: 237-241.
- GOODMAN, A.E., E. HILD, K.C. MARSHALL, AND M. HERMANSSON. 1993. Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1035-1040.

- GÖTZ, A., R. PUKALL, E. SMIT, E. TIETZE, R. PRAGER, H. TSCHÄPE, J. D. VAN ELSAS, AND K. SMALLA. 1996. Detection and Characterization of Broad-Host-Range Plasmids in Environmental Bacteria by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2621-2628.
- GÖTZ, A., AND K. SMALLA. 1997. Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1980-1986.
- HANAHAH, D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- HEIJNEN, C.E., AND J.C.Y. MARINISSEN. 1995. Survival of bacteria introduced into soil by means of transport by *Lumbricus rubellus*. *Biology and Fertility of Soils*. **20**: 63-69.
- HENSCHKE, R. B., AND SCHMIDT, F.R. J.. 1989. Survival, distribution, and gene transfer of bacteria in a compact soil microcosm system. *Biology and Fertility of Soils* **8**: 19-24.
- HERRERO, M., V. DE LORENZO, AND K.N. TIMMIS. 1990. Transposon Vectors Containing Non-Antibiotic Resistance Selection Markers for Cloning and Stable Chromosomal Insertion of Foreign Genes in Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* **172**: 6557-6567.
- HIRSCH, P.R., AND J.D. SPOKES. 1993. Survival and dispersion of genetically modified rhizobia in the field and genetic interactions with native strains. *FEMS Microbiology Ecology* **15**: 147-159.
- HUGHES, V.M., AND N. DATTA. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature* **302**: 725-726.
- JARRETT, P., AND M. STEPHENSON. 1990. Plasmid Transfer between Strains of *Bacillus thuringiensis* Infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1608-1614.
- KARLSON, U., D.F. DWYER, S.W. HOOPER, E.R.B. MOORE, K.N. TIMMIS, AND L.D. ELTIS. 1993. Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate. *Journal of Bacteriology* **175**: 1467-1474.
- KARSTEN, G.R., AND H.L. DRAKE. 1995. Comparative Assessment of the Aerobic and Anaerobic Microfloras of Earthworm Guts and Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1039-1044.
- KING, P.V. AND R.W. BLAKESLEY. 1986. Optimizing DNA Ligations for Transformation. *Focus* **8**: 1-3.

- KLINGMÜLLER, W. 1993. Plasmid transfer in natural soil, as stimulated by sucrose, wheat rhizosphere, and ground sugar beets: a study with nitrogen-fixing *Enterobacter*. *Microbial Releases* **1**: 229-235.
- LAGERLØV, J., AND O. ANDRÉN. 1991. Abundance and activity of Collembola, Protura and Diplura (Insecta, Apterygota) in four cropping systems. *Pedobiologia* **35**: 337-350.
- LEE, Q., AND P. WIDDEN. 1996. *Folsomia candida*, a "fungivorous" collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. *Soil Biology & Biochemistry* **28**: 689-690.
- LLOYD, R.G., J. HART, AND S. JOHNSON. 1980. Loss of Hfr DNA from *Escherichia coli* merozygotes during inhibition of conjugation by nalidixic acid. *Genetical Research in Combination* **36**: 69-79.
- LORENZ, M.G., AND W. WACKERNAGEL. 1993. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* **58**: 563-602.
- LUOTOLA, M. 1986. Use of Laboratory Model Ecosystems for the Evaluation of Environmental Contaminants. *In*: Hodgson, E. (ed.): *Reviews in Environmental Toxicology* 2, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 41-58.
- LUSSENHOP, J. 1992. Mechanisms of microarthropod-microbial interactions in soil. *Advances in Ecological Research* **23**: 1-33.
- MEAD, L.J., G.G. KHACHATOURIANS, AND G.A. JONES. 1988. Microbial Ecology of the Gut in Laboratory Stocks of the Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.) (Orthoptera: Acrididae). *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1174-1181.
- NAIK, G.A., L.N. BHAT, B.A. CHOPADE, AND J.M. LYNCH. 1994. Transfer of Broad-Host-Range Antibiotic Resistance Plasmids in Soil Microcosms. *Current Microbiology* **28**: 209-215.
- POWELL, B.J., K.J. PURDY, I.P. THOMPSON, AND M.J. BAILEY. 1993. Demonstration of *tra*⁺ plasmid activity in bacteria indigenous to the phyllosphere of sugar beet; gene transfer to a recombinant pseudomonad. *FEMS Microbiology Ecology* **12**: 195-206.
- PÜHLER, A. 1998. Einfluss von freigesetzten und inverkehrgebrachten, gentechnisch veränderten Organismen auf Mensch und Umwelt. *In*: *Der Rat von Dachverständigen für Umweltfragen (Hrsg.): Materialien zur Umweltforschung* **31**. Metzler-Poeschel Verlag Stuttgart. S. 18 und 25.
- PUKALL, R., H. TSCHÄPE, AND K. SMALLA. 1996. Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **20**: 53-66.

- RAVEL, J., M. ELIZABETH, H. WELLINGTON, AND R.T. HILL. 2000. Interspecific transfer of Streptomyces Giant Linear Plasmids in Sterile Amended Soil Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 529-534.
- RECORBET, G., C. STEINBERG, AND G. FAURIE. 1992. Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition. *FEMS Microbiology Ecology* **101**: 251-260.
- RECORBET, G., C. PICARD, P. NORMAND, AND P. SIMONET. 1993. Kinetics of the Persistence of Chromosomal DNA from Genetically Engineered *Escherichia coli* Introduced into Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 4289-4294.
- REYES, V.G., AND J.M. TIEDJE. 1976. Ecology of the gut microbiota of *Tracheoniscus rathkei* (Crustacea, Isopoda). *Pedobiologia* **16**: 67-74.
- RICHAUME, A., E. SMIT, G. FAURIE AND, AND J.D. VAN ELSAS. 1992. Influence of soil type on the transfer of plasmid pRP4 from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient and to indigenous bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **101**: 281-292.
- ROZEN, S. AND H. SKALETZKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**: 365-386.
- RUPPEL, H.. 1953. Physiologische Untersuchungen über die Bedeutung des Ventraltubus und die Atmung der Collembolen. *Zoologisches Jahrbuch Allgemein* **64**: 429-469.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, AND T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y..
- SAUNDERS, J.R., J.A.W. MORGAN, C. WINSTANLEY, F.C. RAITT, J.P. CARTER, R.W. PICKUP, J.G. JONES, AND V.A. SAUNDERS. 1990. Genetic approaches to the study of gene transfer in microbial communities. *Bacterial Genetics In Natural Environments*: 3-21.
- SCHÄFER, A.. 1996. Horizontaler Gentransfer-Mechanismen und biologische Sicherheit. *Biospektrum* **6**: 23-29.
- SCHAERFFENBERG, B.. 1949. Können Landtiere unter Wasser leben? *Österreichische Zoologische Zeitung* **2**:159-163.
- SCHRADER, S., AND M. JOSCHKO. 1991. A method for studying the morphology of earthworm burrows and their function in respect to water movement. *Pedobiologia* **35**: 185-190.
- SCHWIEGER, F., AND C.C. TEBBE. 2000. Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the Composition of Bacterial Communities in Rhizospheres of a Target Plant (*Medicago sativa*) and a Non-Target Plant (*Chenopodium album*)-Linking of 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Community Profiles to

- the Diversity of Cultivated Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3556-3565.
- SELBITSCHKA, W., A. PÜHLER, AND R. SIMON. 1992. The construction of *recA*-deficient *Rhizobium meliloti* and *R. leguminosarum* strains marked with *gusA* or *luc* cassettes for use in risk assessment studies. *Molecular Ecology* **1**: 9-19.
- SELBITSCHKA, W., U. DRESING, M. HAGEN, S. NIEMANN, AND A. PÜHLER. 1995. A biological containment system for *Rhizobium meliloti* based on the use of recombination-deficient (*recA*) strains. *FEMS Microbiology Ecology* **603**:1-10.
- SENGELØV, G., G.A. KOWALCHUK, AND S.J. SØRENSEN. 2000. Influence of fungal-bacterial interactions on bacterial conjugation in the residuesphere. *FEMS Microbiology Ecology* **31**: 39-45.
- SENICZAK, S., AND O. STEFANIAK. 1978. The microflora of the alimentary canal of *Oppia nitens* (Acarina, Orbatei). *Pedobiologia* **18**: 110-119.
- SIMON, R., U. PRIEFER, AND A. PÜHLER. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *BIOTEchnology*: 784-791.
- SIMON, R., J. QUANDT, AND W. KLIPP. 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* **80**: 161-169.
- SMIT, E., AND J.D. VAN ELSAS. 1990. Determination of Plasmid Transfer Frequency in Soil: Consequences of Bacterial Mating on Selective Agar Media. *Current Microbiology* **21**: 151-157.
- SMIT, E., J.D. VAN ELSAS, J.A. VAN VEEN, AND E.M. DE VOS. 1991. Detection of Plasmid Transfer from *Pseudomonas fluorescens* to Indigenous Bacteria in Soil by Using Bacteriophage ϕ R2f for Donor Counterselection. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 3482-3488.
- SMIT, E., D. VENNE, AND J.D. VAN ELSAS. 1993. Mobilization of a recombinant IncQ plasmid between bacteria on agar and in soil via cotransfer or retrotransfer. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2257-2263.
- SMIT, E., AND J.D. VAN ELSAS. 1995. Detection of gene transfer in the environment: conjugation in soil, section 5.2.3, 1-10. In A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- SØRENSEN, S.J., T. SCHYBERG, AND R. RØNN. 1999. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Applied Soil Ecology* **11**: 79-90.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- STEINHAUS, E. A.. 1941. A study of the bacteria associates with thirty species of insects. *Journal of Bacteriology* **42**: 757-790.
- THIMM, T., AND O. LARINK. 1995. Grazing preferences of some collembola for endomycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils*. **19**: 266-268.
- THOMAS, C.M., AND C.A. SMITH. 1987. Incompatibility Group P Plasmids: Genetics, Evolution, and Use in Genetic Manipulation. *Annual Reviews of Microbiology* **41**: 77-101.
- TISCHLER, W. 1979. Einführung in die Ökologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- TOP, E., M. MERGEAY, D. SPRINGAEL, AND W. VERSTRAETE. 1990. Gene Escape model: Transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 2471-2479.
- VAN ELSAS, J.D., M. NIKKEL, AND L.S. VAN OVERBEEK. 1989. Detection of Plasmid RP4 Transfer in Soil and rhizosphere, and the Occurrence of Homology to RP4 in Soil Bacteria. *Current Microbiology* **19**: 375-381.
- VANNEECHOUTTE, M., R. ROUSSAU, P. DE VOS, M. GILLIS, D. JANSSENS, N. PAEPE, A. DE ROUCK, T. FIERS, G. CLAEYS, AND K. KERSTERS. 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters* **93**: 227-234.
- VASSEUR, L., C. CLOUTIER, A. LABELLE, J.-N. DUFF, C. BEAULIEU, AND C. ANSSEAU. 1996. Responses of indicator bacteria to forest soil amended with municipal sewage sludge from aerated and non-aerated ponds. *Environmental Pollution* **92**: 67-72.
- VILAS-BOAS, L.A., F.L.T. GISLAYNE, H.O. VILAS-BOAS, M. VICTOR, F. SARIDAKIS, D. LEMOS, AND O.M.N. ARANTES LERECLUS. 2000. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *FEMS Microbiology Ecology* **31**: 255-259.
- WALTER, M.V., L.A. PORTEOUS, V.J. PRINCE, L. GANIO, AND R.J. SEIDLER. 1991. A Microcosm for Measuring Survival and Conjugation of Genetically Engineered Bacteria in Rhizosphere Environments. *Current Microbiology* **22**: 117-121.
- WILLETTS, N. AND C. CROWTHER. 1981. Mobilization of the non-conjugative IncQ plasmid RSF1010. *Genetical Research* **37**: 311-316.

- WILSON, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
- WILSON, M., AND S.E. LINDOW. 1993. Release of recombinant microorganisms. Annual Reviews of Microbiology **47**: 913-944.
- WOOD, K.V. AND M. DELUCA. 1987. Photographic Detection of Luminescence in *Escherichia coli* Containing the Gene for Firefly Luziferase. Analytical Biochemistry **92**: 501-507.
- YURMAN, D., AND M.G. DOMINGUEZ-BELLO. 1993. Bacteria Present in the Gut of Two Neotropical Cephalotini Ants, *Cephalotes atratus* and *Zacryptocerus cf. pusillus*. Folia Microbiology **38**: 515-518.
- ZACHMANN, JOSEPH E., AND J. A. E. MOLINA. 1993. Presence of Culturable Bacteria in Cocoons of the Earthworm *Eisenia fetida*. Applied and Environmental Microbiology **59**: 1904-1910.

♥LICHEN DANK

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Agrarökologie der Bundesforschungsanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig unter Anleitung von Herrn Dr. C.C. Tebbe in der Zeit von Oktober 1994 bis September 1997 angefertigt. Ihm danke ich für die Themenstellung und die Zuteilung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel. Herrn Prof. Dr. J.C. Munch danke ich für die Übernahme des Hauptgutachters und Erstprüfers.

Besonders möchte ich Herrn Dipl. Biol. T. Thimm für die gute Zusammenarbeit danken, der parallel zu dieser Arbeit seine Dissertation mit zoologischer Fragestellung zu dem vom BMBF geförderten Projekt bearbeitete. Frau T. A. C. Wahrenburg bin ich sehr dankbar für ihre engagierte und tatkräftige Unterstützung im Labor und für die gewissenhafte Assistenz bei einem Teil der Experimente. Den Mitarbeitern des Instituts für Agrarökologie danke ich für die freundliche Aufnahme und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Bei Frau T. A. Jüttner aus der Arbeitsgruppe Herr Dr. J. Schiemann am Institut für Biochemie und Pflanzenvirologie der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Plasmide pSUP1.8, pSUP4.0 und der Hilfe bei den Biolumineszenzmessungen bedanken. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern und Herrn Dr. E.R.B. Moore an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim, die mich bei der dreiwöchigen Sequenzierung der biolumineszenten Isolate aus *F. candida* anleiteten, einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellten und die Auswertung und Datenbankvergleiche der Sequenzen übernahmen. Ein Dankeschön geht auch an Frau Dr. W. Engelhardt in der IIT GmbH an der Universität Bielefeld.

Meinen ehemaligen Kollegen/innen und Frau Prof. Dr. U.B. Priefer am Lehrstuhl für Biologie I, Ökologie des Bodens, der RWTH Aachen danke ich für ihre Geduld und ihr Interesse an der Fertigstellung dieser Arbeit, aber hauptsächlich für die unermüdliche seelisch-moralische Unterstützung von T. A. Maria Krämer in schwierigen Phasen dieser Arbeit. Zuletzt möchte ich meinem jetzigen Chef am Lehrstuhl für Biologie V der RWTH Aachen danken, P.D. Dr. Detlef Bartsch, der mir trotz vieler Berichte, Anträge und der Betreuung der Diplomanden Ute und Marc mit Rat und Tat zur Seite stand und endlich die Fertigstellung dieser Arbeit miterleben durfte!