

# Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Methode in der Gewässerökologie

Richard Müller<sup>1</sup> und Jens Schelte<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>Ökologische Station in der JH Sorpensee, Am Sorpensee 7, 59846 Sundern

## ZUSAMMENFASSUNG

Die in der Entwicklungsbiologie und Medizin entwickelte Methode „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)“ wird heute standardmäßig in der Gewässer- und Abwasserbiologie sowie in der Meeresbiologie verwendet, um Bakterienpopulationen zu untersuchen. Sie beruht auf der Bindung von fluoreszenzmarkierten spezifischen Sonden an bakteriellen Ribosomen. Es werden der Arbeitsablauf, der auch in einem zugehörigen Film dokumentiert ist, beschrieben und Hinweise zur Einbindung in den Unterricht gegeben. Ein Arbeitsblatt ist beigelegt.

## EINLEITUNG

Bakterien sind ein wesentlicher Bestandteil von Ökosystemen. Jahrelang ist ihre Bestimmung nur über Kultivierungsverfahren möglich gewesen. Das bedeutete einen zeitraubenden und differenzierten Einsatz von oftmals mehreren unterschiedlichen Nährböden, die Anzucht der Bakterien darauf und die vielfach auf spezifischen Färbemethoden oder biochemischen Reaktionen beruhende Diagnose. Die für Badegewässer zur Ermittlung des Fäkalbakterien-Titers erlassene Richtlinie (UBA, 1995; EG, 2006) geht von Plattenguss- oder MPN-Verfahren mit Flüssigsubstraten aus. Hier wird zur Diagnose beispielsweise Fluorocult-Laurylsulfat-Bouillon verwendet. Das darin enthaltene 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid wird nur von den Fäkalcoliformen (*E. coli*) gespalten und das Spaltprodukt Methylumbelliferon entsteht. Diese Substanz erzeugt Fluoreszenz im UV-Licht bei 366 nm, was diagnostisch eingesetzt wird (Serani, 2006). Diese Methode ist aber nur für die Fäkalcoliformen brauchbar. Für die Gesamt-Coliformen muss wieder ein völlig anderes Verfahren genutzt werden. Alle die herkömmlichen Verfahren greifen an phänotypischen Merkmalen an (Farbe, Form, Enzymausstattung, pH-Optima usw.). So muss im Grunde für jede zu untersuchende Bakterienart oder -gruppe ein eigenes Verfahren entwickelt werden, was eine generalisierende Untersuchung sehr aufwendig macht. Ein am Genotyp angreifendes Vorgehen würde diese Klippen umschiffen, da die genetischen Prinzipien bei allen Bakterien gleich sind. Es bietet sich also an, die DNA oder RNA der Organismen zu untersuchen. Bei Eukaryoten existiert im DNA-Barcoding (Brede et al., 2006) eine moderne Methode, die bei Bakterien auf Grund des Fehlens von Mitochondrien nicht anwendbar ist. Eine der Methoden der Wahl bei Bakterien ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

\*eMail j.schelte@oeko-sorpe.de

## FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH)

Die In-situ-Hybridisierung wurde bereits 1969 unabhängig von drei Arbeitsgruppen entwickelt (Weber, 1975, S. 102). Ursprünglich wurden radioaktiv markierte RNA-Sonden zur Untersuchung der Oogenese von *Xenopus* verwendet (Gall und Pardue, 1969), die Auflösung auf dem Röntgenfilm war jedoch relativ schlecht und das Verfahren noch recht aufwendig. Es dauerte bis 1989, bis Fluoreszenz-Farbstoffe statt der radioaktiven Markierung verwendet werden konnten (DeLongh et al., 1989). Heute wird dieses Verfahren, das über die Jahre optimiert und weiterentwickelt wurde, in großem Umfang zur Identifikation von limnischen und marinen Bakterien verwendet. Zielsequenz ist allerdings nicht mehr die DNA, sondern ribosomale RNA. Die rRNA kommt zahlreich in jeder Zelle vor und besitzt konservative, aber auch variierende Domänen, was zur Identifikation hilfreich ist. Durch die öffentliche Zugänglichkeit von Sequenz-Datenbanken, z.B. dem National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), können spezifische und preiswerte Sonden entwickelt werden, so dass für fast jede Aufgabenstellung eine Sonde existiert oder hergestellt werden kann.

## Methodik

Prinzipiell reichen für die Identifikation von Bakterien neben normalem Laborgerät ein Wasserbad oder Wärmeschrank und ein Fluoreszenzmikroskop. Die Sonden werden kommerziell individualisiert hergestellt und mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Man kann auch in einem Ansatz mehrere Sonden, die unterschiedlich markiert sind, verwenden. So lassen sich in einem Arbeitsgang mehrere Arten gleichzeitig identifizieren.

- Die Proben werden mit herkömmlichem (sterilem) limnologischem Probenahmegerät genommen und (steril) abgefüllt. Die weitere Verarbeitung soll zügig erfolgen. Gegebenenfalls werden die Proben gekühlt.
- Die Proben werden in sterilem Gerät durch ein steriles Membranfilter filtriert. Die Porenweite des Filters ist so bemessen, dass Bakterien zurückgehalten werden (0,45  $\mu$ m).
- Der Niederschlag auf dem Filter wird in Puffer resuspendiert und abzentrifugiert.
- Die abzentrifugierten Zellen werden in Paraformaldehyd für 1 h in der Kälte (4 °C) fixiert.
- Es folgt ein weiterer Zentrifugations- und Resuspendierungsschritt zum Waschen der Zellen in Puffer.

- Zur Vorbereitung der Hybridisierung wird die Zellsuspension auf Objektträger mit abgegrenzten Vertiefungen (8-well-Objektträger) tropfenweise gegeben. Diese Objektträger müssen nun trocknen.
- Zum Entfernen der letzten Wasserreste werden die Objektträger in einer Ethanolreihe, wie sie aus der Histologie bekannt ist, entwässert. Jetzt wird erneut getrocknet.
- Es erfolgt der Hybridisierungsschritt. Die Art der Sonde richtet sich nach dem Untersuchungsziel. Sie besteht aus einer kurzen RNA-Sequenz, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. Cy3 (Indigocarbocyanin), gekoppelt ist. Zur Hybridisierung wird die Sondensuspension tropfenweise zu den getrockneten Zellsuspensions-Tropfen gegeben und 1,5 h bei 46 °C hybridisiert.
- Die Objektträger werden erneut gewaschen und getrocknet.
- Um alle Zellen von anderen Partikeln auf dem Objektträgern unterscheiden zu können, wird mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt. Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an AT-reiche Regionen der DNA bindet. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliches Anregungslicht benötigen, lässt sich durch Einlegen spezifischer Farbfilter in die Mikroskopbeleuchtung die Anwesenheit der verschiedenen fluoreszenzmarkierten Moleküle sichtbar machen.
- Es wird erneut gewaschen und getrocknet. Die Proben werden in ein schnell trocknendes Einschlussmittel eingebettet (Citifluor), das die Fluoreszenz nicht behindert. Gleichzeitig schützt es vor dem Abbau der Farbstoffe durch Licht, dem sogenannten Ausbleichen. Mikroskopiert wird bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion.
- Bei Anregung mit UV-Licht (365 nm) leuchtet DAPI bläulich, d.h. hier sind alle DNA-haltigen Partikel erkennbar.
- Schaltet man auf grünes Anregungslicht (546 nm), leuchten nur noch die an die spezifische rRNA des untersuchten Organismus gebundenen Farbstoffe.

Um diese Methode kennen zu lernen, haben wir das Vorkommen des Bakteriums *Aeromonas hydrophila* in der Sorpetalsperre untersucht. Dass die Wahl auf *Aeromonas* fiel, lag nur an der zufälligen Verfügbarkeit einer entsprechenden Sonde. Bei unserer Untersuchung wurde auch zum Vergleich eine Reinkultur dieses Bakteriums verwendet, so dass man die Bindung der verwendeten Sonde an diesen Organismus belegen kann.

Die verwendete Sonde war „AERBOMO“ mit der für *Aeromonas hydrophila* spezifischen Sequenz 5'-CTA CTT TCC CGC TGC CGC C-3' (Bomo et al., 2004).

Die Sonde „EUB“ (spezifisch für alle Bakterien, EUB = Eubacteria, Sequenz: 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3' (Amann et al., 1990)) wurde auf Parallelproben eingesetzt, allerdings unterblieb hier die Auswertung.

Leider werden auch Zelltrümmer und andere Partikel manchmal von den Farbstoffen angefärbt. Es macht also Sinn, bei der mikroskopischen Untersuchung auch die bakterientypischen Formen der Objekte zu berücksichtigen.

Die Arbeitsabläufe sind in einem Film zusammengefasst, der über unsere Homepage zugänglich ist (<http://www.oeko-sorpe.de/fish.html>).

## EINSATZ DES MATERIALS IM UNTERRICHT

Laut Kernlehrplan Biologie für die Sekundarstufe II (NRW) sollen die Schülerinnen und Schüler der Qualifikationsphase im Inhaltsfeld Genetik folgende Kompetenz erwerben: „Die Schülerinnen und Schüler erläutern molekulargenetische Verfahren (u. a. PCR, Gelelektrophorese) und ihre Einsatzgebiete (E4, E2, UF1).“ (MSW, 2014, S. 40)

Neben den grundlegenden Verfahren (PCR, Gelelektrophorese) bieten die Herstellung transgener Organismen oder der genetische Fingerabdruck hier Möglichkeiten und haben Eingang in die entsprechenden Schulbücher und Materialien gefunden. Im Rahmen von vergleichenden Genomanalysen lassen sich zudem Aspekte der Inhaltsfelder Genetik und Evolution miteinander verknüpfen.

Die im schulischen Kontext eher wenig bekannte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung soll hier als weitere Möglichkeit zur Erarbeitung molekulargenetischer Verfahren vorgestellt werden. Dabei ist insbesondere die Anwendung des Verfahrens in der Ökologie interessant: FISH wird von Ökologen dazu genutzt, Bakterien nachzuweisen oder deren Populationsdichten im Gewässer zu ermitteln. Also bietet sich hier die Möglichkeit, Genetik und Ökologie im Unterricht miteinander zu verknüpfen. Denkbar wären sowohl die Behandlung im Genetikunterricht, als auch die Behandlung im Ökologieunterricht. In der Ökologie kann der Schwerpunkt auf den Aspekt der Bestimmung von Populationsdichten gelegt werden. Gleichzeitig können Inhalte und Kompetenzen des vorausgegangenen Genetikunterrichts wieder aufgegriffen und vertieft werden.

## Arbeitsblätter

Der Film stellt das Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von der Probennahme bis zur Auswertung epifluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen vor. Wesentliche Aspekte des Verfahrens können anhand der Arbeitsblätter erarbeitet werden. Im Zentrum steht dabei das für die Molekulargenetik so bedeutsame Prinzip der Hybridisierung.

Mit dem vorliegenden Material werden insbesondere Kompetenzen zu folgenden allgemeinen Kompetenzerwartungen geschult (MSW, 2014):

- UF1 (Wiedergabe): biologische Phänomene und Sachverhalte beschreiben und erläutern,
- E2 (Wahrnehmung und Messung): Beobachtungen und Messungen, auch mithilfe komplexer Apparaturen, sachgerecht erläutern,
- E4 (Untersuchungen und Experimente): Experimente mit komplexen Versuchsplänen und -aufbauten mit Bezug auf ihre Zielsetzungen erläutern und unter Beachtung fachlicher Qualitätskriterien (Sicherheit, Messvorschriften, Variablenkontrolle, Fehleranalyse) durchführen,
- E5 (Auswertung): Daten und Messwerte qualitativ und quantitativ im Hinblick auf Zusammenhänge, Regeln oder Gesetzmäßigkeiten analysieren und Ergebnisse verallgemeinern,
- K1 (Dokumentation): bei der Dokumentation von Untersuchungen, Experimenten, theoretischen Überlegungen und Problemlösungen eine korrekte Fachsprache und fachübliche Darstellungsweisen verwenden,

- K2 (Recherche) zu biologischen Fragestellungen relevante Informationen und Daten in verschiedenen Quellen, auch in ausgewählten wissenschaftlichen Publikationen, recherchieren, auswerten und vergleichend beurteilen.

Die **Aufgabe 1** der Arbeitsblätter dient der strukturierten Betrachtung des Films. Die Antworten zu den Leerfeldern ergeben sich aus den Filmabschnitten.

Nr.	Schritt
1	Probenahme
2	Gewinnung der Bakterien durch Filtration
3	Fixierung
4	Erneutes Abtrennen der Bakterien
5	Vorbereitung der Hybridisierung
6	Hybridisierung
7	Gegenfärben
8	Fluoreszenzmikroskopie

**Aufgabe 2:** Zum Nachweis, dass die Sonde AERBOMO wirklich an die Ribosomen von *Aeromonas hydrophila* bindet, wird eine Reinkultur dieses Bakteriums parallel untersucht (a). So würde auffallen, wenn die Methode fehlerhaft durchgeführt wird oder die Sonde ihre Haltbarkeitsdauer überschritten hat. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (c) leuchten im Fluoreszenzmikroskop alle DNA-haltigen Objekte bläulich auf, da der Farbstoff DAPI generell an DNA bindet. Alle Lebewesen (Pro- und Eukaryoten) leuchten hierbei auf (b). Wird auf Grünlicht umgeschaltet (c), leuchten Objekte, an welche die Sonde AERBOMO gebunden hat, rötlich auf. Da die Sonde komplementär zu einer rRNA-Sequenz von *A. hydrophila* ist, leuchten diese Bakterien hierbei auf. Objekte, die im UV-Licht bläulich aufleuchten, im Grünlicht rötlich aufleuchten und eine Stäbchengestalt besitzen, lassen sich so als *Aeromonas hydrophila* identifizieren.

**Aufgabe 3a:** 3'-GAU GAA AGG GCG ACG GCG G-5'

**Aufgabe 3b:** Je höher die Temperatur ist, umso stärker ist die thermische Bewegung der Atome und Moleküle. Steigt die Temperatur auf oder über die sogenannte Schmelztemperatur, lösen sich die relativ schwachen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den hybridisierten Strängen und die Einzelstränge trennen sich voneinander. Damit die Sonden an die Zielsequenz binden, darf die Temperatur also nicht zu hoch sein. Die Schmelztemperatur hängt von der Anzahl der Wasserstoffbrücken zwischen den Basen ab. Bei der Paarung A-T (bzw. A-U) werden 2 Wasserstoffbrücken ausgebildet, während es bei der Paarung G-C 3 sind. G-C-reiche Abschnitte haben also eine höhere Schmelztemperatur. Die Temperatur darf nicht zu niedrig sein, da die Sonden sonst an rRNA-Sequenzen binden würden, die nur zum Teil (also nicht vollständig) zur Sonde passen. Dann wäre es möglich, dass die Sonden auch an rRNA-Sequenzen anderer Bakterienarten binden.

**Aufgabe 3c:** Soll ein zweites Bakterium nachgewiesen werden, so wird dafür eine Sonde benötigt, deren Sequenz spezifisch für die zweite Bakterienart ist. Wenn diese Sonde mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wird, der z.B. gelb leuchtet, wäre eine gleichzeitige Analyse einer zweiten Art möglich.

**Aufgabe 3d:** Die Intensität der Färbung ist von der Anzahl der Ribosomen abhängig. Bakterien, die stoffwechsellinaktiv sind, sind also z.B. in der Diapause (Ruhephase) befinden, werden demnach schwächer (bis gar nicht mehr erkennbar) angefärbt. Die Methode eignet sich also weniger für inaktive Bakterien.

**Aufgabe 4:** Falls die verschiedenen Wasch-, Verdünnungs- und Fixierungsschritte mit definierten Volumina durchgeführt werden, könnte man durch Auszählen mehrerer Felder auf die Anzahl der *Aeromonas*-Bakterien in der Probe zurückrechnen.

**Aufgabe 5:** Schulbücher enthalten wenig Informationen über die FISH-Technik. Bei Eingabe der Stichwörter „Fluoreszenz in situ Hybridisierung“ in eine populäre Suchmaschine wurden Webseiten gefunden, die die Technik erklären oder Informationen zur Verwendung angeben. Die gefundenen wissenschaftlichen Artikel behandeln allerdings eher medizinische und cytogenetische Themen. Es empfiehlt sich also, die Suche durch Eingabe weiterer Begriffe einzuengen.

## DANKSAGUNG

Wir bedanken uns bei Prof. Dr. R. Meckenstock für die freundliche Erlaubnis und den Arbeitsplatz sowie bei Frau A. Dannehl (beide Biofilm-Centre der Universität Duisburg-Essen) für die hervorragende technische Unterstützung und Einführung in die spezielle Labortechnik.

## LITERATUR

- AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925
- BOMO, A.M. et al. (2004): Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. *Journal of Water and Health* **2**, 83-96
- BREDE, N.; STEINKE, D. (2006): DNA-Barcoding. *Taxonomie des 21. Jahrhunderts. Biologie in unserer Zeit* **36**, 40-46
- DELONGH, E.F. et al. (1989): Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360-1363
- EG (Europäisches Parlament) (2006): Richtlinie 2006/7/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. Februar 2006 über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung und zur Aufhebung der Richtlinie 76/160/EWG
- GALL, J.; PARDUE, M.: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *PNAS* **63**, 378-383
- MSW (Ministerium für Schule und Weiterbildung des Landes Nordrhein-Westfalen) (2014): Kernlehrplan für die Sekundarstufe II Gymnasium / Gesamtschule in Nordrhein-Westfalen - Biologie. Heft 4722. Düsseldorf <https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/lehrplannavigator-s-ii/gymnasiale-oberstufe/biologie/index.html>
- SERANI, D. S. (2006): Experimentelle Prüfung verschiedener Methoden der quantitativen Bestimmung gesamtcoliformer und fäkalcoliformer Bakterien (*E. coli*) für die qualitative Bewertung von Wasserproben. (Diplomarbeit) Hamburg
- UBA (Umweltbundesamt) (1995): Mikrobiologische Untersuchungsverfahren von Badegewässern nach Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG
- WEBER, R. (ed.) (1975): *Molecular Aspects of Animal Development*. Amsterdam

(Rechtshinweis zu den Arbeitsblättern: Das Material der Arbeitsblätter kann nichtkommerziell zur Ausarbeitung eigener Arbeitsblätter verwendet werden, wenn Autorennennung erfolgt und die abgeleiteten Arbeitsblätter unter der gleichen Lizenz veröffentlicht werden (Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0)).

# Nachweis des Bakteriums *Aeromonas hydrophila* mit der FISH-Methode

1. Aufgabe: Gib im Versuchsplan die durchgeführten Arbeitsschritte an.

Schritt	Durchführung
1	Probenahme Wasserprobe mit dem Wasserschöpfer aus dem Vorbecken der Sorpetalsperre (9,40 m Tiefe) entnehmen
2	Filtriervorrichtung sterilisieren 1l Wasser (Sorpe) filtrieren (Porenweite 0,45 µm) Filtrat (Sorpe) in 20 ml Pufferlösung in Suspension bringen Suspension (Sorpe) zentrifugieren (10 min, 6000 x g, 4°C) Kolonie einer Reinkultur von <i>Aeromonas hydrophila</i> in 1 ml Pufferlösung suspendieren Suspension (Reinkultur) zentrifugieren (10 min, 6000 x g, 4°C)
3	Sedimente (Sorpe und Reinkultur) in je 2 ml Paraformaldehyd-Puffer-Gemisch suspendieren (1h, 4°C)
4	Suspensionen (Sorpe und Reinkultur) zentrifugieren (10 min, 6000 x g, 4°C) Pellets (Sorpe und Reinkultur) in je 2 ml Ethanol-Puffer-Gemisch resuspendieren
5	je 10 µl der Zellsuspensionen auf Vertiefungen der 8-well-Objektträger bringen Zellsuspensionen bei 46°C trocknen Objektträger mit Zellen nacheinander für je 3 min in 50%iges, 80%iges und 96%iges Ethanol geben Objektträger mit Zellen trocknen
6	Sondensuspension (AERBOMO) vorbereiten je 10 µl Sondensuspension zu Zellen auf Objektträger geben Wanne der Hybridisierungskammer mit Hybridisierungspuffer befüllen Kammern mit Objektträgern für 1,5 h in den Hybridisierungsöfen (46°C) stellen Objektträger für 15 min in 50 ml Waschpuffer (46°C) waschen und dann mit Wasser abspülen Objektträger mit Druckluft trocknen
7	je 10 µl Farbstofflösung DAPI auf die Vertiefungen der Objektträger (mit Zellen) geben (20 min) Objektträger waschen und trocknen
8	Proben in AF2 Citifluor einbetten bei 1000facher Vergrößerung mit Ölimmersion mikroskopieren am Epifluoreszenzmikroskop nacheinander grünes Licht (546 nm) und UV-Licht (365 nm) einstrahlen

2. Aufgabe: Erkläre anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 1 und 2), wie der Nachweis des Bakteriums *Aeromonas hydrophila* gelingt. Berücksichtige auch folgende Aspekte.

- Warum wird auch eine Reinkultur des Bakteriums untersucht?
- Wozu dient das Anfärben mit DAPI?
- Warum werden die Präparate mit grünem Licht (546 nm) und UV-Licht (365 nm) angestrahlt?

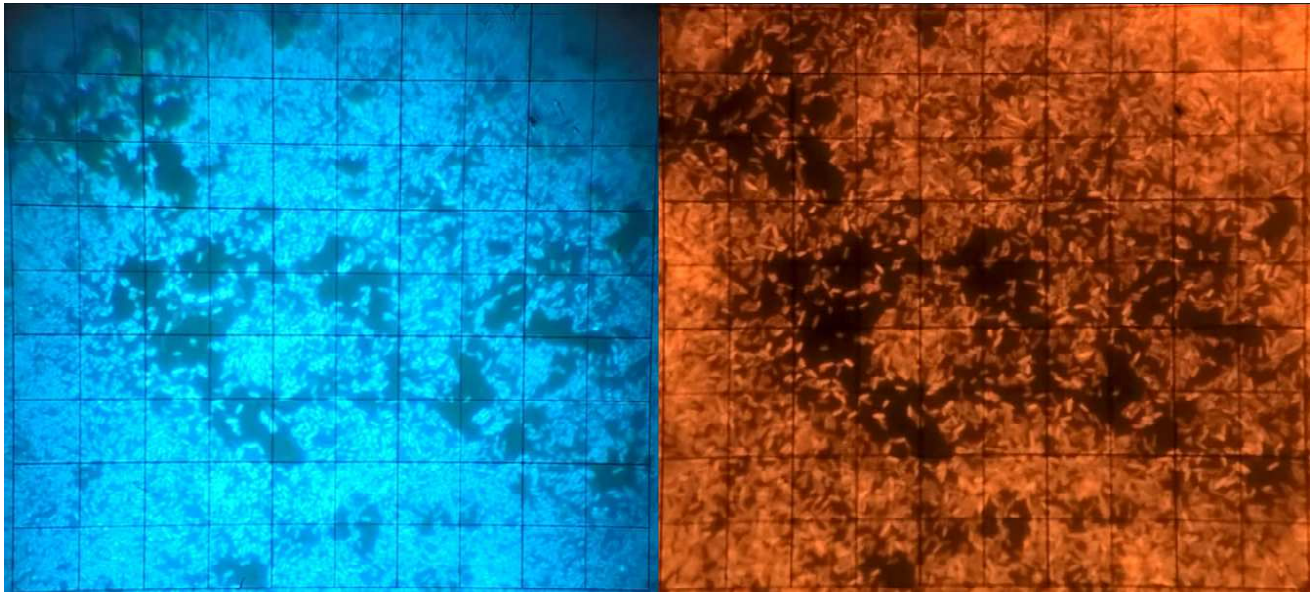


Abb. 1: **Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop** (1 Kästchen hat die Kantenlänge 10  $\mu\text{m}$ )

a) Reinkultur *Aeromonas hydrophila* bei Bestrahlung mit 365 nm: DAPI leuchtet bläulich (397 nm)

b) Reinkultur *Aeromonas hydrophila* bei Bestrahlung mit 546 nm: Sondenfarbstoff Cy leuchtet rötlich (575-640 nm)

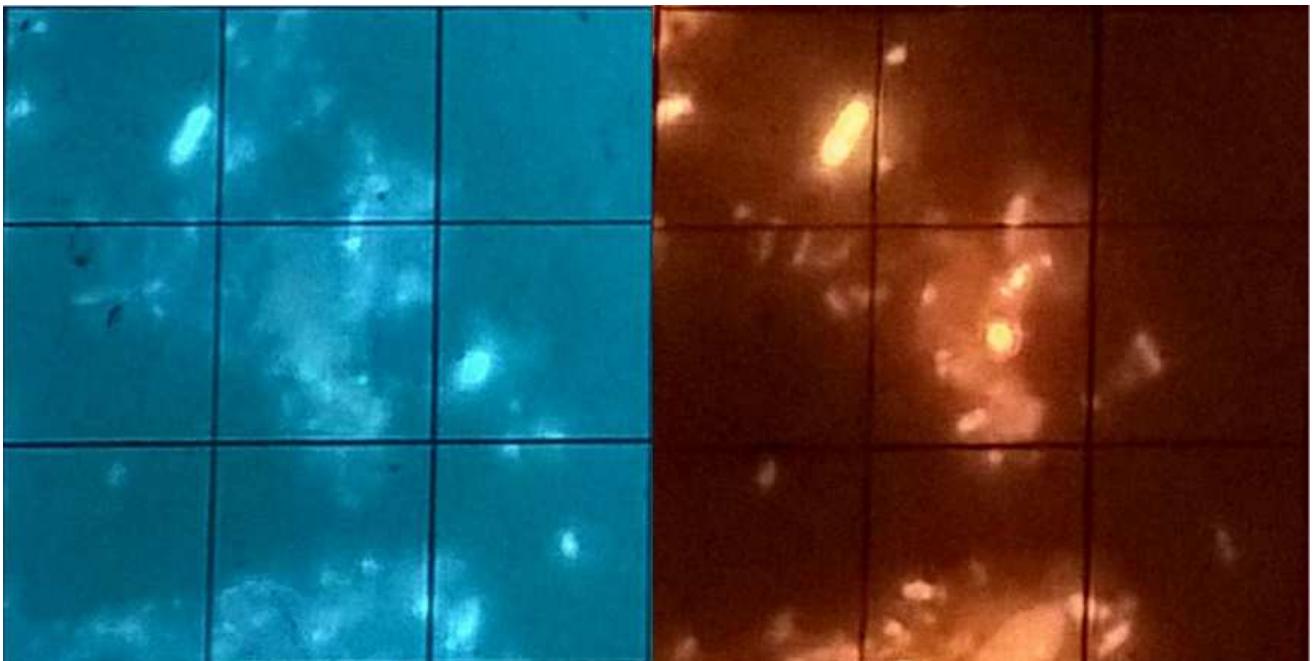


Abb. 2: **Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop** (1 Kästchen hat die Kantenlänge 10  $\mu\text{m}$ )

a) Probe aus dem Vorbecken der Sorpetalsperre bei Bestrahlung mit 365 nm: DAPI leuchtet bläulich (397 nm)

b) Probe aus dem Vorbecken der Sorpetalsperre bei Bestrahlung mit 546 nm: Sondenfarbstoff Cy leuchtet rötlich (575-640 nm)

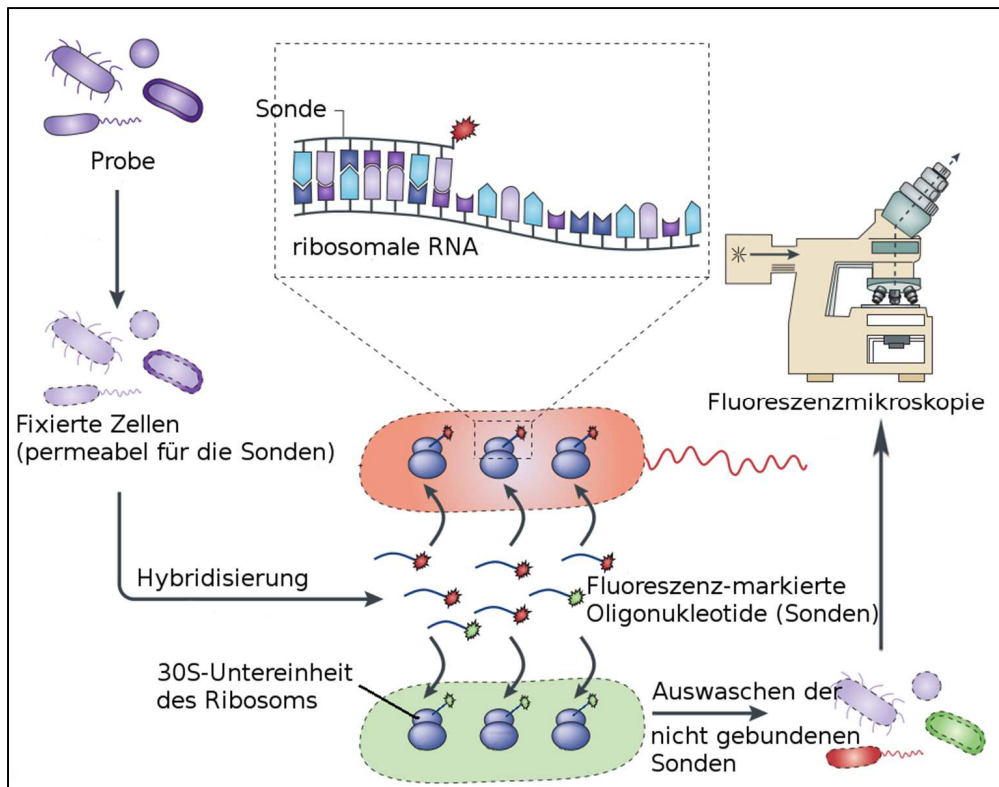


Abb. 3: Einzelschritte der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden. Zwei verschiedene (und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte) Sonden binden an rRNA-Moleküle von Bakterien (verändert nach AMANN, R./FUCHS, B. (2008): Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. Nature Rev. Microbiol. 6, 340. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. PD Dr. R. Amann, MPI for Marine Microbiology Bremen)

5' – CTA CTT TCC CGC TGC CGC C – 3'

Abb. 4: Sequenz der Oligonukleotidsonde AERBOMO

(nach BOMO, A.M. et al. (2004): Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. Journal of Water and Health 2, 86)

3. Aufgabe:

- Die Sonde AERBOMO (Abb. 4) wurde so synthetisiert, dass sie genau zu einer Zielsequenz eines rRNA-Moleküls im Ribosom der meisten Bakterien der Gattung *Aeromonas* (u.a. *Aeromonas hydrophila*) passt. Ermittle diese Zielsequenz.
- Die Hybridisierungstemperatur beim Nachweis von *Aeromonas hydrophila* muss 46°C betragen. Beurteile aufgrund deiner Kenntnisse zur Hybridisierung von Nucleinsäuren, wie sich Abweichungen von dieser Temperatur auswirken würden.
- Erläutere, wie es im in Abb. 3 gezeigten Beispiel gelingt, zwei unterschiedliche Bakterien gleichzeitig nachzuweisen.
- Schnell wachsende Bakterienzellen besitzen mehrere zehntausend Ribosomen, langsam wachsende Zellen deutlich weniger. Leite ab, inwiefern dies den Nachweis mittels FISH-Technik beeinflussen könnte.

4. Aufgabe: Leite ab, wie man mittels der FISH-Technik die Populationsdichte einer Bakterienart in einem See bestimmen kann.

5. Aufgabe: Recherchiere, bei welchen Fragestellungen die FISH-Technik heute Anwendung findet.