

# Detektion hygienerelevanter Keime mittels qPCR und Durchflusszytometrie

## Bachelor-Thesis



Annika Reichmuth

20.02.2023-31.07.2023

Fachhochschule Nordwestschweiz Muttenz  
Hochschule für Life Sciences  
Institut für Ecopreneurship  
Fachrichtung Bioanalytik und Zellbiologie

**Auftraggeber**

Stephan Neumayer, Evonik Operations GmbH

**Betreuer**

Dr. Boris Kolvenbach, FHNW

**Experte**

Dr. Robin Wünsch, Evonik Operations GmbH

**Vertraulichkeitsstatus**

Der Inhalt dieser Arbeit ist nicht vertraulich.

**Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst habe, dass ich die verwendeten Quellen, Internet-Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe und dass ich die Stellen der Arbeit, einschliesslich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken oder dem Internet im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, auf jeden Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht hab

## Zusammenfassung

Die durch das Bodenbakterium *Rhizobium rhizogenes* ausgelöste Haarwurzelkrankheit von zweikeimblättrigen Pflanzen hat erhebliche Folgen. Die daraus resultierende Überwucherung des Wurzelsystems verringert die Erträge, kann Bewässerungssysteme verstopfen und eine Biofilmbildung hervorrufen.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde eine Detektionsmethode mittels SYBR Green basierter quantitativer PCR entwickelt, um das Bakterium in Wasserproben nachzuweisen. Mit dem Online-Durchflusszytometer BactoSense wurden erste Fingerabdrücke des Keimes erfasst, um eine zukünftige Programmierung auf dieses Pflanzenpathogen zu ermöglichen. Die quantitative PCR Methodik erwies sich über das *virD2* Zielgen als spezifisch und sensitiv im Nachweis von pathogenen Agrobakterium Stämmen. Über Vakuum Filtration von Wasserproben, anschließender DNA Extraktion und quantitativer PCR konnten bis zu 10 Bakterien pro mL Wasser detektiert werden. Bei der ebenfalls SYBR Green basierten Durchflusszytometrie zeigten sich charakteristische Merkmale des *Rhizobium rhizogenes* in den erstellten Diagrammen. Wenn das kontinuierlich angeschlossene BactoSense in der Landwirtschaft einen Alarm auslöst, kann es als Frühwarnsystem eingesetzt werden. Für eine Kontrolle der Detektion könnte eine Wasserprobe zusätzlich im Labor mittels der quantitativen PCR Methode spezifischer überprüft werden.

## Abstract

Hairy root disease of dicotyledonous plants, caused by the soil bacterium *Rhizobium rhizogenes*, has significant consequences. The resulting overgrowth of the root system reduces yields, can clog irrigation systems and cause biofilm formation.

In this bachelor thesis, a detection method using SYBR Green-based quantitative PCR was developed to detect the bacterium in water samples. Initial fingerprints of the bacterium were captured using the BactoSense online flow cytometer to allow future programming for this plant pathogen. The quantitative PCR methodology proved to be specific and sensitive in detecting pathogenic Agrobacterium strains via the *virD2* target gene. By vacuum filtration of water samples, following DNA extraction and quantitative PCR, up to 10 bacteria per mL of water could be detected. Flow cytometry, also SYBR Green based, revealed characteristic features of *Rhizobium rhizogenes* in the generated diagrams. If the continuously connected BactoSense raises an alarm in agriculture, it can be used as an early warning system. For a control of the detection, a water sample could additionally be checked more specifically in the laboratory using the quantitative PCR method.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Bachelorarbeit unterstützt und motiviert haben.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Dr. Boris Kolvenbach. Er hat meine Bachelorarbeit betreut und begutachtet. Ich möchte mich bei ihm für die Vermittlung zu diesem Projekt und die daraus entstandene spannende Zusammenarbeit bedanken. Ohne seine Hilfe und steti-ge Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die gemeinsame Planung des weiteren Vorgehens der Experimente und die Zwischengespräche waren stets sehr ange-nehm. Seine kompetente und hilfsbereite Art begleitete mich durchgehend in den letzten Monaten.

Auch geht mein Dank an Herrn Dr. Robin Wunsch, der als Experte meiner Bachelorarbeit fungiert. Die Gespräche und die Kommunikation im Allgemeinen verliefen immer positiv. Für seine hilfreichen Anregungen und die investierte Zeit möchte ich mich bedanken. Nicht nur ihm, auch Stephan Neumayer und Dr. Achim Marx der Firma Evonik Operations GmbH gilt mein Dank. Durch das Engagement, der zur Verfügung gestellten finanziellen Mittel und der Zusammenarbeit mit der FHNW entstand dieses Projekt.

Ich danke Vivian Hauss der Firma bNovate Technologies SA, der bei Fragen jederzeit zur Verfügung stand. Seine umfassende Einführung in der Handhabung des BactoSense und aktive Unterstützung bei der Datenauswertung schätzte ich sehr.

Ausserdem möchte ich mich herzlich bei der ganzen Forschungsgruppe des Institut für Eco-preneurship für die Unterstützung und Begleitung durch meine Bachelorarbeit bedanken. Die Hilfe und stets positive Stimmung im Labor haben mich jeden Tag begleitet und motiviert.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Motivation.....	6
1.2	Stand der Forschung.....	6
1.3	Bakterium <i>Rhizobium rhizogenes</i> .....	7
1.4	Gegenstand der Arbeit .....	11
2	Materialien und Methoden .....	12
2.1	Material .....	12
2.1.1	Geräte .....	12
2.1.2	Materialien.....	12
2.2	Methoden .....	12
2.2.1	Kultivierung des Bakteriums <i>Rhizobium rhizogenes</i> .....	12
2.2.2	Quantitative PCR (qPCR).....	12
2.2.2.1	Primer für qPCR .....	12
2.2.2.2	qPCR Bedingungen.....	14
2.2.2.3	Standardreihe für die qPCR .....	15
2.2.2.4	Spezifität Primer .....	16
2.2.2.5	Sensitivität der qPCR Methode .....	16
2.2.2.6	Durchführung der Detektion mit Wasserproben .....	17
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	17
3	Ergebnisse und Diskussion .....	19
3.1.1	Quantitative PCR (qPCR).....	19
3.1.1.1	Primer .....	19
3.1.1.2	qPCR Bedingungen.....	20
3.1.1.3	Standardreihe für die qPCR .....	22
3.1.1.4	Spezifität Primer .....	24
3.1.1.5	Sensitivität der qPCR Methode .....	26
3.1.1.6	Durchführung der Detektion mit Wasserproben .....	26
3.2	Durchflusszytometrie.....	27
3.2.1	Erste Messungen <i>Rhizobium rhizogenes</i> .....	27
3.2.2	Verdünnungsreihen .....	29
3.2.3	BactoSense Spezifität .....	33
4	Zusammenfassende Schlussfolgerung.....	37
5	Anhang .....	39
5.1	Material und Methoden .....	39
5.2	Ergebnisse und Diskussion.....	42
5.2.1	Ablauf der Detektionsmethode mittels qPCR.....	44
6	Abbildungsverzeichnis .....	46
7	Tabellenverzeichnis .....	50
8	Glossar .....	52
9	Literaturverzeichnis.....	53

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde eine Detektionsmethode für das Bodenbakterium *Rhizobium rhizogenes* entwickelt. Es handelt sich dabei um ein gramnegatives Bakterium, welches ein Pflanzenpathogen ist. Die dafür verwendeten Methoden waren die quantitative PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Polymerase-Kettenreaktion), auch real-time PCR genannt, und die Durchflussszytometrie. Das Ziel war es, in einer schlussendlichen Wasserprobe dieses Bakterium detektieren zu können.

## 1.2 Stand der Forschung

Die landwirtschaftliche Produktion ist massgeblich für die Ernährungssicherheit des Menschen (Savary et al., 2019). Die menschliche Bevölkerung nimmt stetig zu, wodurch auch die Nachfrage nach Lebensmittel steigt. Dadurch sollte die weltweite Nahrungsmittelversorgung effizient sein und wachsen, um das Wachstum abzudecken (Buttimer et al., 2017). Folge dessen müssen die landwirtschaftlichen Erträge gesteigert werden.

Ein grosses Problem sind die Auswirkungen von Pflanzenkrankheiten. Schätzungsweise gehen 10% der weltweiten Nahrungsmittelproduktion aufgrund solcher Krankheiten verloren. Eine der wichtigsten Krankheitserreger von Pflanzen sind Bakterien, von welchen über 200 pflanzenpathogene Arten existieren (Buttimer et al., 2017). Der Ertrag und die Qualität der Produktion werden durch bakterielle Krankheiten vermindert.

Bereits in den 1970er Jahren wurde eine unbekannte Krankheit der Gurken beobachtet. Sie befiel bei den Pflanzen die Wurzeln, welche in einer dichten Matte nach oben wuchsen. 1993 trat diese Krankheit erstmals wieder in hydroponischen Kulturen auf (Bosmans et al., 2016). In der Hydroponik werden Pflanzen nicht in Erde, sondern in einer mineralischen Nährlösung angebaut. Häufig wird diese Methode bei Gemüse wie Tomaten, Gurken, Salat und Zierpflanzen angewandt. Viel Gemüse, unter anderem Tomatenkulturen, sind seitdem von dieser Wurzelerkrankung betroffen, die als "*hairy root disease*" (auch als "*hairy roots*", "*crazy roots*" oder "*root mat*" bekannt) bezeichnet wird. Die Haarwurzelkrankheit löst durch die starke Wurzelverbreitung eine Überwucherung des ganzen Wurzelsystems bei zweikeimblättrigen Pflanzen aus. Das starke vegetative Wachstum und die verminderten Fruchtbildung führten zu erheblichen wirtschaftlichen Einbussen. Zudem sind die betroffenen Wurzelregionen häufig anfällig für Sekundärinfektionen und somit weiteren Krankheiten und Folgen (Bosmans et al., 2016).

In der Tomatenproduktion ist der Ertrag um mehr als 10% reduziert (Bosmans et al., 2016). Die Haarwurzelkrankheit ist bereits weit verbreitet und zeigte sich als hartnäckig. Sie wurde in mehreren europäischen Ländern gemeldet, darunter Österreich, Belgien, Dänemark, Frankreich, Griechenland, die Niederlande, Polen, die Schweiz und das Vereinigte Königreich (Ludeking et al., 2013).

Neben dem Verlust des Ertrages hat die Haarwurzelkrankheit noch weitere Auswirkungen. Wie bereits erwähnt können Sekundärinfektionen auftreten. Die Haarwurzelkrankheit ist eine bakterielle Infektion gewisser Pathogene. Eine Folge des bakteriellen Befalls kann die Bildung eines Biofilms sein. Biofilme können eine erhöhte Resistenz gegenüber bestimmten Umweltbelastungen sowie eine antimikrobielle Toleranz begünstigen (Danhorn and Fuqua, 2007). Durch die Biofilmbildung können sich Bakterien vor chemischen Desinfektionsmitteln schützen oder teilweise verschiedene Antibiotika vertragen (Lien Bosmans et al., 2017). Es ist daher notwendig die hartnäckigen Infektionen unter anderem durch Entfernung der Biofilme zu bekämpfen.

Durch die hydroponische Methode des landwirtschaftlichen Anbaus besteht eine dritte Folge der Haarwurzelkrankheit. Die Überwucherung des Wurzelsystems kann ganze Bewässerungssysteme von hydroponischen Anlagen blockieren. Da die Pflanzen in einer mineralischen Nährlösung angebaut werden, sind erhöhte Vorrichtungen in Verwendung. Es benötigt kontinuierlichen Zufluss, welcher die Pflanzen miteinander verbindet. Die Leitungen, insbe-

sondere die Tropfer, werden durch die übermässig produzierten Wurzeln verstopft. Es wurde auch eine Verdickung einzelner Wurzeln beobachtet (Weller et al., 2000a).

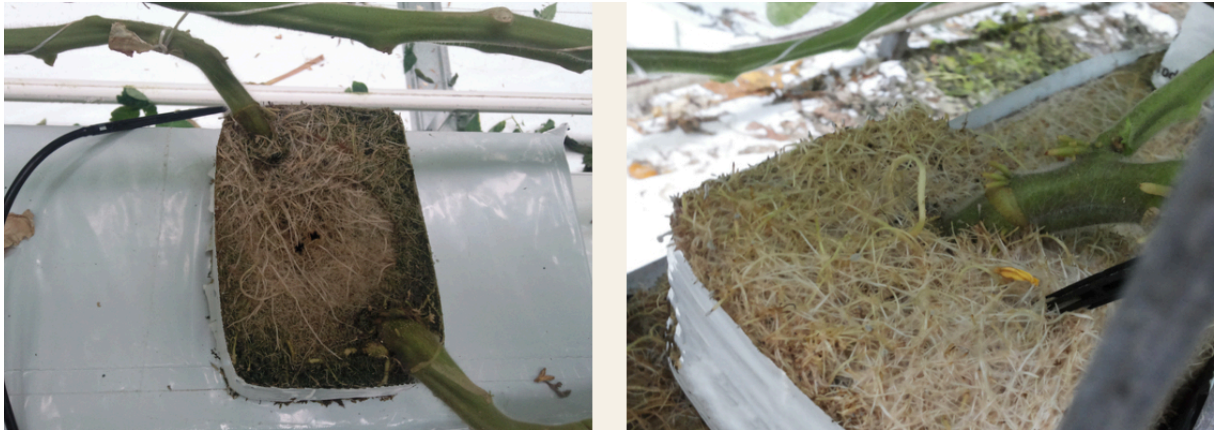


Abbildung 1: Substrat von Gewächshausgemüse überwuchert mit Wurzeln. Zu sehen ist das übermässige vegetative Wachstum, was bis zum Verstopfen von Tropfer führen konnte. Auswirkungen einer Infektion mit dem Pflanzenpathogen, dem Bakterium *Rhizobium rhizogenes*. Bild: ("Crazy roots, hairy roots, crown gall | Koppert Canada," n.d.)

### 1.3 Bakterium *Rhizobium rhizogenes*

Die Haarwurzelkrankheit war im Allgemeinen mit pathogenen *Rhizobium rhizogenes* Stämmen in Verbindung zu bringen. Die Gattung dieses Bakteriums hatte früher den Namen *Agrobacterium* und wurde in die Gattung *Rhizobium* umbenannt. Entstandene Unklarheiten in taxonomischen Veröffentlichungen hielten bis heute an. Es wurde die am entferntesten verwandte Art, die sogenannte Biovar 2 von *Agrobacterium*, in die Gattung *Rhizobium* zu übertragen. Allgemein kann die geänderte Gattung *Agrobacterium* beibehalten werden, weswegen Einträge zum *Rhizobium rhizogenes* oder zu verwandten Bakterien noch unter diesem Namen zu finden sind (Lindström and Young, 2011).

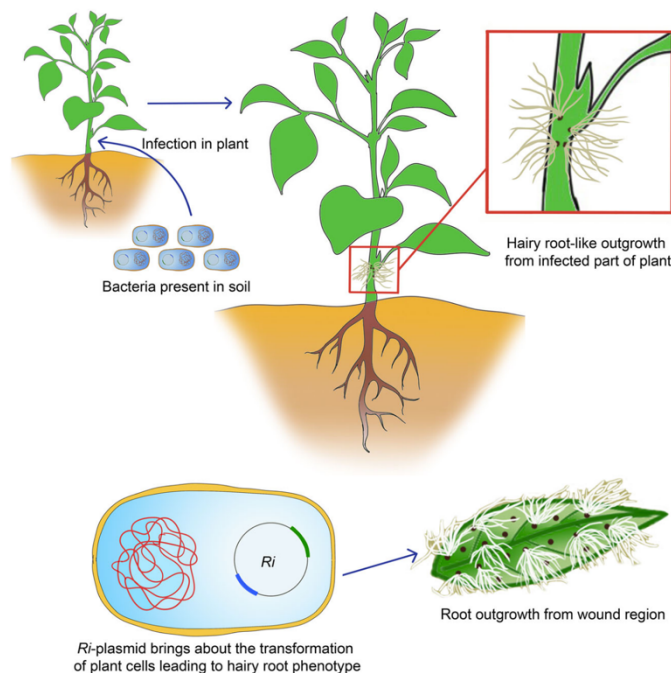


Abbildung 2: Schematische Darstellung der durch *Agrobacterium rhizogenes* vermittelten Induktion von Haarwurzeln in Pflanzen unter natürlichen Bedingungen (*in vivo*). Das Bakterium ist im unteren Bereich dargestellt mit dem enthaltenem Ri-Plasmid. Bild: Gantait and Mukherjee, 2021

Das Bakterium *Rhizobium rhizogenes* ist gramnegativ und besitzt neben der chromosomalen DNA ein Ri-Plasmid (*root-inducing plasmid*). Dieses ist etwa 200 kbp (kilo Basenpaar) gross (Hooykaas and Hooykaas, 2021). Der Besitz dieses Plasmids macht das Bakterium pathogen, denn es enthält die Virulenzfaktoren. Bei einer Infektion werden Gene aus der T-Region des Plasmids in die Pflanzenzellen übertragen und in das Pflanzengenom integriert. Diese werden auch Transfer-DNA (T-DNA) genannt (Hooykaas and Hooykaas, 2021).

Die Symptome der Krankheit werden ausgelöst durch die Expression dieser Gene in der Pflanze. Die T-DNA enthält *root-locus (rol)* Gene, welche zu einer starken Vermehrung der Wurzeln führen. Zusätzlich veranlassen die neu integrierten Gene die Pflanze zur Produktion von Opinen. Das sind Kohlenhydratderivate, die als Nährstoffquelle für die Agrobakterien dienen (L. Bosmans et al., 2017). Die Ri-Plasmide lassen sich anhand der produzierenden Opinen klassifizieren.

Durch die Eigenschaft der Transformation, wird das Bakterium *Rhizobium rhizogenes* auch als Hilfsmittel verwendet. Sie können den Gehalt an Sekundärmetaboliten, produziert von Pflanzen, steigern und dadurch in der pharmazeutischen Forschung und Produktentwicklung zum Einsatz kommen. Das Bakterium kann auch als binäres Vektorsystem eingesetzt werden, bei denen die gewünschten Gene auf einem anderen Plasmid in die Zelle gebracht werden können (Gantait and Mukherjee, 2021).

Den Einbau der Gene und somit die Transformation wird durch Mithilfe von Proteinen vermittelt. Diese werden von Genen kodiert, welche sich ebenfalls auf dem Ri-Plasmid befinden. Sie werden als Virulenz-Region bezeichnet und enthalten die *vir*-Gene (L. Bosmans et al., 2017).

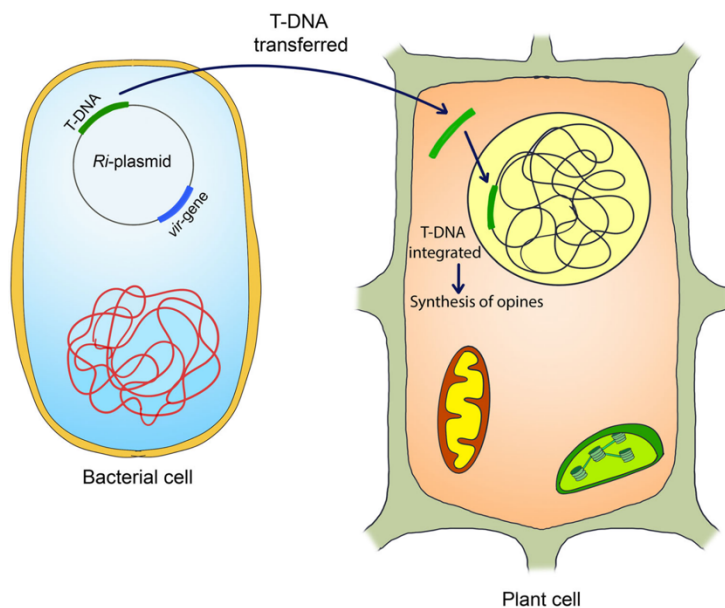


Abbildung 3: Schematische Darstellung des zellulären Mechanismus der *Agrobacterium rhizogenes* vermittelten Transformation der Wirtszelle (Pflanze). Zu sehen sind die Gene der T-DNA in grüner Farbe dargestellt, welche in das pflanzliche Genom eingebaut und integriert werden. Bild: Gantait and Mukherjee, 2021

Die Virulenz des Bakteriums ist abhängig von der T-DNA und den *vir*-Genen auf dem Ri-Plasmid des Bakteriums. Die *vir*-Gene der meisten Ti- und Ri-Plasmide (ti, *tumor-inducing plasmid*) gleichen sich sehr (Gelvin, 1990). Die Bakterien *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium radiobacter* enthalten die Ti-Plasmide. Die Gene auf diesem Plasmid verursachen die Kronengallen-Krankheit (*crown gall disease*), welche zu Bildungen von Gallen und Tumoren bei den Pflanzen führen.

Durch die hoch konservierten Sequenzen eignen sich die *vir*-Gene gut als Zielsequenzen zur Detektion. Studien zufolge kann die Sequenz je nach Opin-Typ der Ti- und Ri-Plasmide variieren. Aus diesem Grund wurde teilweise die T-DNA als Zielsequenz ausgewählt, um die

verschiedenen Agrobakterium Stämme erfassen zu können. Es wurde vermutet, dass die T-DNA-Grenzwiederholungen am stärksten konserviert sind und mit einer Virulenz des Bakteriums im Zusammenhang stehen (Haas et al., 1995).

Das *virD2* Gen kodiert ein wichtiges Protein, die Endonuklease. Dieses Enzym spaltet die Grenzsequenzen der T-DNA und ist massgeblich für den Einbau der T-DNA in das Pflanzengenom. Darum sind auch die *virD2* Gene hoch konserviert, was sie wiederum spezifisch für die pathogenen Stämme dieser Bakterien macht (Haas et al., 1995).

Durch die verheerenden Folgen des Bakteriums *Rhizobium rhizogenes* in der Landwirtschaft ist die frühzeitige Detektion dessen sehr wichtig. Bei der Untersuchung von Wasserproben kommt die Durchflusszytometrie häufig zum Einsatz. Als leistungsfähige Methode zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl von Bakterien liefert sie innert wenigen Minuten eine Analyse der Wasserprobe (Ho et al., 2020). Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist der Nachweis und die Zählung von vorhandenen Schwebeteilchen, indem diese einzeln durch einen Laserstrahl geleitet werden. Die Proben werden dabei durch eine Kapillare geschickt. Vor der Analyse werden die Zellen mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen, wie dem Nucleinsäure-Farbstoff SYBR Green I beispielsweise, angefärbt. Die Lichtstreuung wird von optischen Detektoren erfasst und die Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Verteilung der Lichtstreuung und die gemessene Fluoreszenz ist proportional zu der Menge an Zellen oder Zellbestandteilen gebundene Fluoreszenz. Die zwei Arten der Lichtstreuung sind die Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreuung (*side scatters*, SSC). Die Grösse der Zelle und ihre innere Komplexität beeinflusst die Art der Streuung. Die Vorwärtsstreuung ist proportional zur Zelloberfläche und die Seitenstreuung ist proportional zur Granularität oder internen Komplexität der Zellen (Adan et al., 2017). Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Arten der Durchflusszytometrie, die als Nichtsortierung und Sortierung bezeichnet werden. Der Sortier-Typ hat zusätzlich die Fähigkeit, Partikel zu sortieren. Sie heissen Fluoreszenzaktivierte Zellsortierer (FACS) und sortieren, wie der Name bereits beschreibt, fluoreszenzmarkierte Zellen aus einer gemischten Zellpopulation (Adan et al., 2017).

Vermeehrt wird versucht, neue mikrobiologische Schnellmethoden zu entwickeln. Besonders im Bereich von Trinkwasser Analysen wurden online-Durchflusszytometrie Methoden etabliert. Ein Beispiel ist das BactoSense, welches auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Es ist ein industrielles, vollautomatisches Durchflusszytometer. Beim BactoSense wird die Probennahme, die mikrobiologische Markierung, die Inkubation, die Analyse und die Reinigung automatisiert durchgeführt. Durch diese Automatisierung bietet das Gerät mögliche Anwendungen in der Landwirtschaft. Es braucht kein Fachpersonal für die Durchführung der Messungen und kann sogar direkt an Wasserversorgungssysteme angeschlossen werden. Das simple Kartuschen-System liefert einen minimalen Wartungsaufwand sowie eine maximale Wiederholbarkeit der Messqualität (Hauret et al., 2021).

Neben der Quantifizierung bietet die Durchflusszytometrie auch die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen (Hauret et al., 2021). Lebende Zellen werden mit einem einzigen Farbstoff (SYBR Green I) markiert, der eine grüne Fluoreszenz erzeugt, sobald er an die DNA gebunden ist. Die beschädigten oder toten Zellen nehmen durch die nicht mehr intakte Zellwand zusätzlich einen zweiten Farbstoff (Propidiumiodid) auf, welcher ebenfalls an die DNA gebunden wird und rot fluoresziert. Als Resultat wird aus den beiden Fluoreszenzsignalen und der Seitenstreuung eine Reihe von Grafiken erstellt, sowie die intakte Zellzahl (ICC) pro Milliliter angegeben (Hauret et al., 2021).

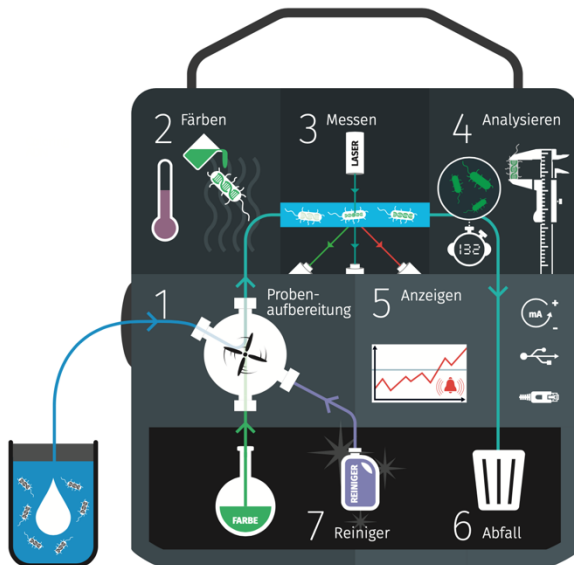


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Online-Durchflusszytometers BactoSense. Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der automatisierten Messung: Probenaufbereitung, Färben, Messen, Analysieren, Anzeigen, Abfall und Reiniger. Bild: bNovate Technologies SA

Die Messungen zeigen auch Muster von Bakteriengemeinschaften auf, die durch so genannte zytometrische Fingerabdrücke beschrieben werden. Dies kann als Werkzeug benutzt werden, um Veränderungen in den Bakteriengemeinschaften zu erkennen. Wenn durch die Online-Anwendung Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft bemerkt werden können, bietet das Gerät durch Programmierung eine Art von Alarmsystem. Im Bereich des Pflanzenschutzes hat diese Applikation grosses Potenzial.

Der momentane Standard zur Detektion von Bakterien ist die qPCR. Diese molekulare Methode ermöglicht, wie der Name bereits sagt, eine Quantifizierung der Menge an Ziel-DNA, die wiederum mit der Anzahl der in der Probe enthaltenen Zellen in Verbindung gebracht werden kann (Bosmans et al., 2016). Die qPCR ist empfindlicher und schneller im Nachweis von Krankheitserregern als die konventionelle Endpunkt PCR. Sie ist weniger zeitaufwändig, da keine weiteren Analysen wie beispielsweise eine Gelelektrophorese erforderlich sind (Johnson et al., 2013). Anhand der Überwachung der DNA-Amplifikation in Echtzeit durch die Überwachung der Fluoreszenz kann eine Quantifizierung gemacht werden. Dabei wird die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen. Durch die Intensität des Fluoreszenzsignals wird die momentane Menge an DNA-Amplikonen in der Probe berechnet (Kralik and Ricchi, 2017). An dem Punkt, wo die DNA Amplifizierung exponentiell wird, wird ein Schwellenwert (*threshold*) gesetzt. Die Schwellenwertlinie setzt die Grenze, wo die Reaktion eine fluoreszierende Intensität über dem Hintergrund erreicht. Dieser Punkt wird als Quantifizierungszyklus bezeichnet und liefert den Ct Wert (*threshold cycle*). Über eine Kalibrierungskurve mit bekannter Menge an DNA oder Kopienzahlen kann eine schlussendliche Bestimmung der absoluten Ziel-DNA ermöglicht werden. Eine der zwei Arten von qPCR ist die unspezifische Variante mit den fluoreszierenden DNA-Farbstoffen wie das erwähnte SYBR Green. Die andere Variante funktioniert über fluoreszierend markierte Oligonukleotid-Sonden. Diese ist spezifischer, da eine geringere Anfälligkeit für die Sichtbarmachung unspezifischer PCR-Produkte besteht (Kralik and Ricchi, 2017).

Wie bereits erwähnt, sind Zielsequenzen zur Detektion eines Keims sehr wichtig. Bei der PCR im Allgemeinen ist die Voraussetzung eine solche auszuwählen. Dafür muss die Sequenz bekannt sein, um die passenden Primer dafür verwenden zu können. Diese binden bei einer optimalen Spezifität nur an der richtigen Stelle der DNA. Es wird die Sequenz zwischen dem Forward und Reverse Primer amplifiziert. Die Primerwahl zeigte sich als sehr

wichtig für den Nachweis von Zielsequenzen. Das hoch konservierte *virD2* Gen erwies sich geeignet zur spezifischen Detektion von pathogenen Agrobakterien (Haas et al., 1995).

Diese gegebene Spezifität ist ein grosser Vorteil der qPCR. Auch die hohe Sensitivität im Nachweis von kleinsten DNA Konzentration bringt diese molekulare Methode mit sich. Jedoch ist sie deutlich aufwändiger in der Anwendung verglichen mit der Durchflusszytometrie, besonders im Vergleich zum automatisierten BactoSense. Die Durchflusszytometrie ist eine schnelle und gut etablierte Methode für den quantitativen Nachweis von Keimen in einer Wasserprobe. Um die Spezifität dabei zu erhöhen, gäbe es als Möglichkeit noch eine andere Methode der DNA Anfärbung. Sie heisst *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) und kann auch zwischen lebensfähigen Organismen und totem Material unterscheiden. Dabei sind grundlegende Elemente die fluoreszenzmarkierten, synthetisch hergestellten Nukleotid-Sonden und ihre komplementäre DNA/RNA-Sequenzen in der Zielzelle (Dias and Rathnayaka, 2018).

#### **1.4 Gegenstand der Arbeit**

In dieser Thesis wurde im Auftrag der Firma Evonik eine Detektionsmethode für das Bodenbakterium und Pflanzenpathogen *Rhizobium rhizogenes* entwickelt und optimiert. Als Methode wurde die quantitative PCR und die Durchflusszytometrie verwendet. Das Bestreben ist, mit dieser Detektionsmethode Wasserproben aus der Landwirtschaft zu analysieren. Bei einer Kontamination ist der frühe Nachweis essenziell. Durch die unkomplizierte Anwendung des BactoSense Durchflusszytometer ist das Ziel, diese Methode für die Entwicklung eines Frühwarnsystems zu etablieren. Mittels Künstlicher Intelligenz soll das Gerät schlussendlich beim Erkennen des charakteristischen Fingerabdruckes des Bakteriums einen Alarm ausgelöst werden. Für eine Zweitkontrolle kann die Wasserprobe ins Labor geschickt werden und anhand der qPCR Methodik spezifisch das Pathogen nachweisen. So kann frühzeitig eine mögliche Gegenmassnahme, wie das Desinfizieren des Brauchwassers, getroffen werden.

## 2 Materialien und Methoden

Die in dieser Arbeit benötigten Reagenzien und Geräte sowie die verwendeten Materialien dieses Kapitels sind im Anhang beschrieben. Das methodische Vorgehen mit dem theoretischen Hintergrund der Methode ist in diesem Abschnitt erklärt.

### 2.1 Material

Das für diese Arbeit genutzte Material ist nachfolgend in Geräte und Materialien unterteilt.

#### 2.1.1 Geräte

Alle für die Arbeit verwendeten Geräte sind im Kapitel 5.1 des Anhangs in der Tabelle 11 aufgelistet, gegliedert in Name, Model, Firma, Seriennummer, Inventarnummer der Fachhochschule und Software-Version.

#### 2.1.2 Materialien

Alle verwendeten Materialien und Reagenzien sind im Kapitel 5.1 des Anhangs in den Tabellen 12 und 13 aufgelistet, gegliedert in Material, Materialnummer und Hersteller, sowie Reagenz, CAS-Nummer und Hersteller.

### 2.2 Methoden

In den folgenden Abschnitten wird das methodische Vorgehen der Entwicklung der Detektionsmethode für das Bakterium *Rhizobium rhizogenes* beschrieben.

#### 2.2.1 Kultivierung des Bakteriums *Rhizobium rhizogenes*

Das Bakterium wurde vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in gefriergetrockneter Pulverform bestellt. Die angegebenen Kultivierungsbedingungen wurden umgesetzt. Es wurde das Medium 1 der DSMZ hergestellt, in welchem 5 g Pepton (hier aus Sojabohnenmehl) und 3 g Fleischextrakt in 1 Liter destilliertem Wasser aufgelöst und danach autoklaviert wurden. Für die Kultivierung des Bakteriums auf Nährstoffagarplatten wurde zusätzlich vor dem Autoklavieren noch 15 g Agar zugefügt. Laut DSMZ liegt das Wachstumsoptimum bei 26°C Inkubation für drei bis sieben Tage. Die Flüssigkulturen des Bakteriums wurden jeweils mit einem Ansatz von 20 mL Medium und 20-500 µL Suspension aus einem Aliquot für 2-3 Tage auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Der Inkubator war auf 25°C und 120 RPM (Rotationsgeschwindigkeit) eingestellt. Die Kultur auf den Agarplatten wuchs bei Raumtemperatur und auch in einem 30°C Inkubator. Die gebildeten Kolonien auf dem Agar konnten nach drei bis sieben Tagen beobachtet werden. Nachfolgend wurden die Agarplatten jeweils immer bei 30°C inkubiert, was das Wachstum noch ein wenig beschleunigte.

Für die Aufbewahrung des Bakteriums wurden aus einer angesetzten Kultur Aliquots entnommen und bei -80°C eingefroren. Dafür wurde 25% Glycerol als Gefrierschutz zu den Bakterien zugefügt.

#### 2.2.2 Quantitative PCR (qPCR)

##### 2.2.2.1 Primer für qPCR

Um die qPCR als Detektionsmethode für das Bakterium *Rhizobium rhizogenes* zu verwenden, musste wie für alle PCR Varianten eine Zielsequenz ausgewählt werden. Diese sollte amplifiziert werden und möglichst spezifisch für das Bakterium sein. Aufgrund Literaturrecherche wurde ein Gen, welches auf dem Ri-Plasmid lokalisiert ist, ausgewählt. Es handelt sich um das *virD2* Gen, das eine Endonuklease kodiert und spezifisch für diese *Rhizobium*

Stämme ist. Es ist somit essenziell für den T-DNA Einbau in das pflanzliche Genom (Haas et al., 1995).

Mit der Website PearlPrimer wurden verschiedene Primer mit einer Produktlänge zwischen 200 und 300 Basenpaaren für das *virD2* Gen designt und bestellt. Um die Primer in einer Endpunkt PCR zu testen, wurde eine DNA Extraktion von der Bakteriensuspension durchgeführt. Dafür wurde 1.5 mL Zellsuspension für fünf Minuten bei 10'000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde die Extraktion mit dem Kit von Axonlab (extrAXON DNA TISSUE KIT) nach Protokoll durchgeführt. Am Ende wurde die Konzentration der extrahierten DNA mit dem Qubit Fluorometer gemessen. Die zu testenden Primerpaare wurden mit Nuklease freiem Wasser in der Konzentration von 10 µM hergestellt und mit dem BioReady rTaq Kit von BioFlux angesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Zusammensetzung für einen 50 µL Endpunkt PCR Ansatz mit Volumenangabe in µL des BioReady rTaq Kit von BioFlux.

PCR-Ansatz:	Volumen [µL]
Reaction Buffer	5
dNTP Mix	4
Primer forward	1
Primer reverse	1
Taq Polymerase	0.4
Nuklease freies Wasser	37.6
DNA-Template	1

Das Programm für die Endpunkt PCR ist der Tabelle 2 zu entnehmen. Zu sehen sind die verschiedenen Schritte mit den Zyklus Wiederholungen, angegeben mit der Temperatur und Dauer der Schritte. Angepasst wurde beim Testen der Primer die Annealing Temperatur, um ausfindig zu machen, welche Temperatur optimal für das Binden der Primer an die DNA ist.

Tabelle 2: Programm der Endpunkt PCR mit Temperatur in °C, Dauer und Erklärung des jeweiligen Schrittes und Wiederholung des Zyklus. Anpassen war die Annealing Temperatur der Primer.

95 °C, 5 Minuten	1. Denaturierung	35x
95 °C, 30 Sekunden	Denaturierung	
x °C, 30 Sekunden	Annealing	
72 °C, 30 Sekunden	Extension	
72 °C, 5 Minuten	Finale Extension	
4 °C, ∞	Kühlen	

Als erster Schritt wurde eine PCR bei 55°C Annealing durchgeführt, um das Funktionieren der Primerpaare zu überprüfen. Zur Kontrolle der entstandenen PCR Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Da die entstandenen Produkte zwischen 200-250 bp gross waren, wurden die DNA Produkte in einem 1.5-2% Agarosegel aus 1x TAE Puffer mit 0.01% Midori Green, als DNA Färbemittel, bei 120 V für 45 Minuten laufen gelassen. Durch das Anfärben der DNA konnte unter UV Licht im laufengelassenen Gel die DNA Banden erkannt werden. Es wurde ebenfalls ein Marker, auch als DNA Ladder gekennzeichnet, mit laufengelassen, um die entstandenen PCR Produkte auf ihre Grösse zu überprüfen.

Mit den funktionierenden Primerpaaren wurde nochmals mit der DNA eine Gradienten PCR durchgeführt, um die optimale Annealing Temperatur ausfindig zu machen. Getestet wurden die Annealing Temperaturen 51°C, 53°C, 55°C, 57°C und 59°C.

### 2.2.2.2 qPCR Bedingungen

Mit den optimalen Bedingungen für die Primer aus der Endpunkt PCR konnte eine qPCR angesetzt werden. Ziel war schlussendlich eine Standardreihe zu generieren. Dafür wurde als Erstes ausgerechnet, wie viele Moleküle des *virD2* Gens in der extrahierten DNA sind anhand der Länge des Genoms, in der Annahme von einem Gen pro Bakterium. Mit der zuvor fluorimetrisch gemessenen Konzentration, der Sequenzlänge in Anzahl Basenpaar (bp) und der untenstehenden Formel konnte die Kopienzahl pro  $\mu\text{L}$  berechnet werden.

*Formel 1: Formel zur Berechnung der Kopienzahl pro  $\mu\text{L}$ . Die Einheit der DNA Konzentration ist  $\text{ng}/\mu\text{L}$  und bei der Sequenzlänge in Basenpaar (bp).*

$$\text{Anzahl Kopien pro } \mu\text{L} = \frac{\text{DNA Konzentration } \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right]}{\text{Sequenzlänge [bp]} * 660} * 6.022 * 10^{14}$$

Es wurde eine Verdünnungsreihe der DNA mit dem Verdünnungsfaktor 10 gemacht. Die Zusammensetzung eines qPCR Ansatzes von insgesamt 25  $\mu\text{L}$  sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

*Tabelle 3: Zusammensetzung eines 25  $\mu\text{L}$  qPCR Ansatzes mit Volumenangabe in  $\mu\text{L}$  des GoTaq qPCR Master Mix Kit von Promega.*

qPCR-Ansatz:	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Mastermix	12.5
Primer forward	2.5
Primer reverse	2.5
Nuklease freies Wasser	2.5
DNA-Template	5

Das Zusammenmischen des qPCR Ansatzes wurde in einer Sterilbank durchgeführt, in der nur mit DNA gearbeitet wurde. Vor Beginn wurde die Sterilbank und die sich darin befindenden Pipetten mit einer Reinigungslösung ( $\text{CuSO}_4$  [2mM] +  $\text{H}_2\text{O}_2$  [0.3%]) desinfiziert. Anschliessend wurden alle benötigten Materialien wie Eppendorf Rack mit Tubes, die qPCR 96-well Platte, die Klebefolie und das Nuklease freie Wasser in die Kapelle gestellt und für eine weitere Desinfektion für 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

Es wurden auch bei der qPCR verschiedene Annealing Temperaturen getestet und die Primer Konzentrationen. Das Programm wurde für das qPCR Gerät (CFX96 Real-Time System) mittels der Software Bio-Rad CFX Manager 3.1 erstellt. Das Programm ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Programm für qPCR unterteilt in Schritte, Temperatur in °C, Dauer in Minuten: Sekunden und Anzahl Zyklen. Nach jedem Zyklus wurde die entstandene Fluoreszenz gemessen und am Ende eine einmalige Schmelzkurve der Proben erstellt. Anpassen war die Annealing Temperatur der Primer in Schritt 3.

Schritte	Temperatur [C°]	Dauer [Minuten: Sekunden]	Anzahl Zyklen
1	95.0	5:00	1x
2	95.0	0:30	40x
3	59.0	0:30	
4	72.0	0:30	
+ Plate Read			
5 Melt Curve	65.0 bis 95.0 Erhöhung: 0.5	Erhöhung alle: 0:05	1x
+ Plate Read			1x

### 2.2.2.3 Standardreihe für die qPCR

Die Standardreihe war ausschlaggebend für die schlussendlich absolute Quantifizierung des Bakteriums. Dafür wurde als Erstes wieder eine DNA Extraktion von einer *Rhizobium rhizogenes* Kultur durchgeführt. Mit neuen Primern, welche ein längeres PCR Produkt vom *virD2* Gen ergeben, wurde das gleiche Vorgehen, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Da die in der Endpunkt PCR entstandenen Produkte zwischen 765 und 830 bp lang waren, wurde die PCR bei 50 Sekunden Extension eingestellt und ebenfalls bei 55°C Annealing erstmalig getestet. Die Produkte wurden in der Gelelektrophorese aufgrund ihrer Sequenzlänge in einem 1.5% Agarose Gel bei 110 Volt für 40 Minuten laufen gelassen. Nach der Überprüfung mittels Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt des optimalen Primerpaares mit dem Kit von QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit) aufgereinigt, sodass es als Standard-Template für die qPCR benutzt werden konnte. Am Ende wurde erneut die Konzentration der extrahierten und aufgereinigten DNA mit dem Qubit Fluorometer gemessen. Anhand der gemessenen Konzentration und der Formel 1 in Kapitel 2.2.2.2, wurde die Kopienzahl berechnet. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit Verdünnungsfaktor 10 erstellt. Diese wurde in einer Lösung mit 10 µg/mL Hefe RNA in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 hergestellt. Die Hefe RNA diente als Puffer, da sich DNA an den Gefäßwänden und Pipettenspitzen adsorbierte und die Verdünnungsreihe damit als genauer erwies. Mit den ermittelten optimalen Bedingungen wurde die Verdünnungsreihe in einer qPCR in Triplikaten angesetzt. Aus den Mittelwerten der ermittelten Ct Werten (y-Achse) und den logarithmischen Kopienzahlen (x-Achse) wurde ein Diagramm erstellt. Darin wurde eine Trendlinie hinzugefügt und die Regressionsgleichung und der R<sup>2</sup> Wert davon anzeigen gelassen. Die Formel der Regressionsgleichung ist unter Formel 2 zu sehen.

Formel 2: Formel der Regressionsgleichung. *y* steht für den Ct-Wert, *m* für die Steigung, *x* für die logarithmische Kopienzahl und *b* ist der y-Achsenabschnitt.

$$y = m * x + b$$

Anhand der Regressionsgleichung konnte die Effizienz der qPCR berechnet werden. Dafür wurde die Steigung (in der Formel als *m* gekennzeichnet) benötigt und die Formel 3.

Formel 3: Formel zur Berechnung der Effizienz einer qPCR. *m* steht für die Steigung aus der Regressionsgleichung.

$$\text{Effizienz} = 10^{\left(-\frac{1}{m}\right)} - 1$$

#### 2.2.2.4 Spezifität Primer

Um die Spezifität der *virD2* Primer zu testen, wurde die qPCR mit drei anderen Bakterien durchgeführt. Dazu wurde das gramnegative Bakterium *Rhizobium radiobacter* (ATCC 51350) verwendet, welchem das Plasmid mit dem sich darauf befindenden *virD2* Zielgen fehlte und es somit apathogen war. Auch wurde ein häufig vorkommendes gramnegatives Bakterium, das *Pseudomonas putida* (DSMZ 291), und ein grampositives Bakterium, der *Bacillus subtilis* (DSMZ 402), verwendet. Alle drei Bakterienkulturen wurden in 20 mL Nutrient Broth Medium auf einem Schüttelinkubator bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Für die DNA Extraktion der beiden gramnegativen Bakterien wurde das Kit von Axonlab (extraXON DNA TISSUE KIT) eingesetzt und für den grampositiven *Bacillus subtilis* wurde das Kit von ZymoResearch (ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit) nach Protokoll verwendet. Dieses Kit wurde für die DNA Extraktion verwendet, da die Lyse der Zellen mit Lyse-Puffer und mechanischer Zellaufschliessung mittels Beads erfolgte. Das gewährleistete die Zelllyse von gramnegativen sowie auch grampositiven Bakterien, welche eine dickere Zellwand besitzen. Es wurde die Konzentration der extrahierten DNA mit dem Qubit Fluorometer gemessen. Damit die Proben sicher in einem sensitiven Bereich lagen, wurden sie 1:100 und 1:1000 verdünnt und so in Duplikaten mit den optimalen Bedingungen für die *virD2* Primer in einer qPCR gemessen. Ebenfalls mit pipettiert wurde auf die 96-well Platte ein Duplikat als Positivkontrolle, extrahierte DNA des *Rhizobium rhizogenes* Bakterium, und ein Duplikat als Negativkontrolle, bei welcher die 5 µL DNA Template mit Nuklease freiem Wasser ersetzt wurden.

Die Spezifität der Primer wurde zusätzlich noch mit einem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) in den Datenbanken von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) überprüft. Durch das Einfügen der Primer Sequenzen und der Sucheinschränkung auf Bakterien wurde geschaut, welche Bakterien die gleiche DNA Sequenz besitzen und somit potenziell die Primer binden könnten.

#### 2.2.2.5 Sensitivität der qPCR Methode

Die Sensitivität der Primer wurden bei der Erstellung der Standardkurve überprüft. Anhand der Ct Werte der pipettierten Proben und dem Vergleich der Ct Werte der Negativkontrollen konnte eine Aussage über das Detektionslimit getroffen werden. Dies war möglich, durch das Wissen der Kopienzahl in den 5 µL pipettierten DNA.

Um die qPCR als Detektionsmethode einsetzen zu können, sollte die Sensitivität der ganzen Methode überprüft werden. Dafür wurde die Anzahl an Bakterien benötigt, mit welcher begonnen wurde im Experiment, damit sie mit der Anzahl der in der qPCR detektierten Kopienzahl verglichen werden konnte. Für eine Quantifizierung der Bakterien wurde die optische Dichte (OD) mittels Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Anhaltspunkt wurde von  $10^8$  Zellen bei einem OD Wert von 1 ausgegangen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Verdünnungen der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Über das Zählen der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) konnte hochgerechnet werden, wie viel Bakterien pro mL vorhanden waren. Schlussendlich konnte für das weitere Vorgehen die Zellzahl pro mL über die Formel 4 berechnet werden.

Formel 4: Formel zur Berechnung der Zellzahl pro µL mittels Messung optischer Dichte (OD).

$$\text{Zellzahl pro mL} = \text{OD} * 10^8 * 29.405$$

Mittels der Zugabe einer berechneten Konzentration an Bakterien, wurde die Effizienz der DNA-Extraktion überprüft. Durch die schlussendlich erhaltenen Ct Werte aus der qPCR, konnte über die Regressionsgleichung der Standardkurve die extrahierte Menge DNA mit der zu Beginn zugefügten Bakterien verglichen werden. Um die Effizienz der Extraktion zu vergrößern, wurde ein zusätzlicher Schritt in das Protokoll des ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit eingebaut. Nach der Lysierung der Zellen wurde 5 µg Lachsspermien DNA, gelöst in Tris-HCl (10 mM pH 8.0), zugefügt. Diese zusätzliche DNA diente der Verhinderung von Adsorption bakterieller DNA an die Membranen der Filterschritte. Dadurch wurde der Verlust von der Ziel-DNA durch die Extraktionsschritte verkleinert.

### 2.2.2.6 Durchführung der Detektion mit Wasserproben

Die schlussendliche Anwendung dieser qPCR Methode soll für Wasserproben angewendet werden können. Darum war ein zusätzlicher Schritt am Anfang von Nöten, um die Bakterien aus einer Wasserprobe bis in die qPCR zu bringen. Es wurde eine Vakuum Filtration durchgeführt. Dafür wurde die zuvor mittels optischer Dichte berechnete Menge Bakterien in 100 mL Leitungswasser gemischt. Die Vakuum Filtration wurde mit einem 47 mm Filter (Nitrocellulose Membran, 0.22  $\mu\text{m}$  Triton-free MCE), aus dem 25 mm Durchmesser Filter gestanzt wurden, durchgeführt. Der Filter mit den sich darauf befindenden Bakterien wurde vorsichtig in die Lysis Tubes des ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kits mit der oberen Seite nach innen überführt. Dies ist auf der Abbildung 5 zu sehen. Das genaue Vorgehen des angepassten Protokolls der DNA Extraktion aus dem ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit ist im Anhang unter Kapitel 5.2.1 zu sehen.



Abbildung 5: 25 mm Nitrocellulose Membran Filter (0.22  $\mu\text{m}$  Triton-free MCE) nach Vakuum Filtration in die ZR BashingBead Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm) mit oberen Seite nach innen platziert.

Mit der filtrierte, extrahierten DNA konnte eine qPCR durchgeführt werden, um die zugefügte Menge Bakterien mit der detektierten Kopienzahl aus der qPCR zu vergleichen. Ebenfalls wurden die Verdünnungen zur Kontrolle wieder ausplattiert und die KBE gezählt.

### 2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchfluss Zytometrie wurde mit dem Gerät BactoSense der Firma bNovate Technologies SA durchgeführt. Um charakteristische Bilder des Bakteriums *Rhizobium rhizogenes* zu erhalten, wurden Messungen von der Reinkultur gemacht. Da das Gerät automatisiert und sehr einfach zu bedienen ist, brauchte es keine Probenaufbereitung. Der sensitive Messbereich lag ungefähr zwischen zwei Millionen und 1000 Bakterien pro  $\mu\text{L}$ . Da das Medium der Bakterien eine gelbliche Farbe und allenfalls nicht gelöste Partikel enthielt, war dies eher ungeeignet für die Durchflusszytometrie. Die Verdünnungen der zu messenden Proben wurden daher in durchsichtigen Flüssigkeiten vorgenommen.

Um ein möglichst klares Bild eines *Rhizobium rhizogenes* Clusters zu bekommen, wurde als Erstes die Verdünnung in ultrareinem Wasser gemacht. Um den Hintergrund der Messungen von den gewollten Bildern unterscheiden zu können, wurde jeweils immer eine Negativprobe in Form von dem gewähltem Lösungsmittel gemessen. Für einen ersten Anhaltspunkt der Zellkonzentration wurde, wie im Kapitel 2.2.2.5 beschrieben, die optische Dichte gemessen und die Zellzahl pro mL ausgerechnet. Die Verdünnungsreihe erfolgte mit dem Verdünnungsfaktor 10. Da reines Wasser aufgrund des osmotischen Verhältnis keine optimale Flüssigkeit für Bakterien ist, wurde eine weitere Verdünnungsreihe in einem Puffer gemacht. Dazu wurde PBS (*Phosphate Buffered Saline*) verwendet.

Die Messungen erfolgten in den dafür vorhergesehenen 5 mL Tubes, in welche jeweils 4 mL Probe gegeben wurde. Es wurde das Wasseranalyse Standard-Protokoll verwendet, bei welchem die Voreinstellungen für das Gate gegeben waren. Angepasst wurde nur der Schwellenwert des hohen Anteil an Nukleinsäure in Prozent (HNAP, *High Nucleic Acid Percentage*) auf 5.0. Da mit einer ICC-Kartusche (*intact cell count*) gearbeitet wurde, zeigte es nach einer Messung die intakte Zellzahl pro mL an, welche innerhalb des Gates detektiert wurde.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend sind die Ergebnisse mit der Diskussion zusammen unterteilt in die Unterkapitel der quantitativen PCR und der Durchflusszytometrie.

#### 3.1.1 Quantitative PCR (qPCR)

##### 3.1.1.1 Primer

Um spezifische Primer für das *virD2* Gen zu designen, wurde die annotierte Sequenz des Genoms, oder zumindest dieses Gens, benötigt. In der NCBI Nucleotide Datenbank war das sequenzierte Genom des verwendeten *Rhizobium rhizogenes* Stamms auffindbar. Der dazugehörige GenBank Eintrag hatte die Accession Nummer BAYX01000012.1. Die annotierte Sequenz des *virD2* Gens wurde bei Primer3 eingegeben zusammen mit den Suchkriterien von 200-300 bp langen PCR Produkten und ungefähr 20 bp langen Primersequenzen. Es wurden die fünf bestellten Primerpaare in einer Endpunkt PCR überprüft. Die dafür verwendete DNA als Template wurde mit dem extrAXON DNA TISSUE KIT aus einer Reinkultur des *Rhizobium rhizogenes* extrahiert und zeigte durch die Messung mit dem Qubit Fluorometer eine Konzentration von 20 ng/ $\mu$ L. Nach der Gelelektrophorese waren auf dem Agarosegel drei PCR Produkte der fünf getesteten Primerpaare deutlich heller (siehe Abbildung 30 im Anhang). Diese drei Primerpaare 1af + 1ar, 1af + 1br und 2f + 2r wurden weiter in einer Gradienten PCR getestet, um die optimale Annealing Temperatur ausfindig zu machen. Das Primerpaar 1af + 1ar sollte ein PCR Produkt von 226 bp ergeben, das Primerpaar 1af + 1br ein Produkt von 225 bp und das Produkt von 2f + 2r 246 bp.

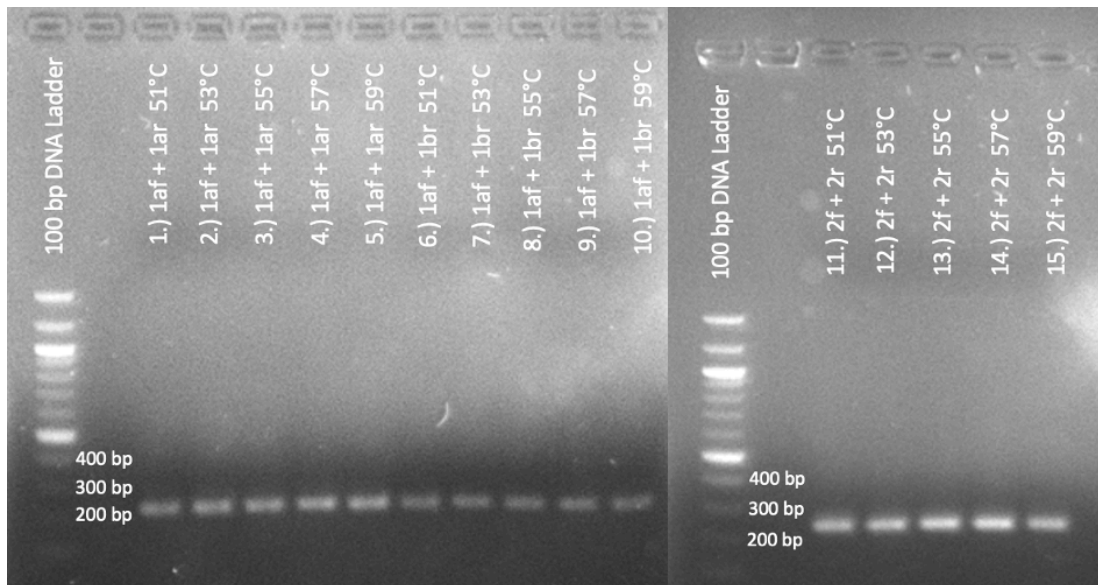


Abbildung 6: 1.5% Agarosegel (2 Gele an je 50 mL) nach einer Gelelektrophorese bei 120 V für 40 Minuten. Zu sehen ist die dunklere Farbe im unteren Bereich der Gele, welche auf das Auslaufen vom Midori Green zurückzuführen ist. Links ist jeweils die 100 bp grosse DNA Leiter zu sehen, welche alle 100 bp eine Bande produziert. Alle drei Primerpaare wurden je bei fünf verschiedenen Annealing Temperaturen in der PCR getestet. In die Laschen der Gele wurde 5  $\mu$ L DNA Leiter und jeweils 10  $\mu$ L Probe, welche 1x Loading Dye enthielten, pipettiert. Zu sehen sind die helleren Banden in den Spalten 1-5 und 11-15. Alle Banden haben ein Produkt der richtigen Grösse von 220-240 bp ergeben. Die Annealing Temperaturen bei 57°C und 59°C ergaben die hellsten Banden bei dem Primerpaar 1af + 1ar und beim Primerpaar 2f + 2r schien die Temperatur von 57°C optimal zu sein.

Wie auf Abbildung 6 zu sehen ist, wurden die parallel laufen gelassenen Gele nicht einheitlich gefärbt. Zu vermuten war, dass das den Gelen zugegebene Midori Green im unteren Bereich bereits anfang auszulaufen. Im oberen Bereich der Gele sind darum die entstandenen Banden der DNA Leiter auch klarer und heller ersichtlicher. Als Verbesserung eines Gelbildes könnte man die Gellaufzeit verkürzen oder anstelle des Zugabens von Midori Green in die noch flüssigen 50 mL Gel, ein Färbbad nach der Gelelektrophorese machen.

Die Banden der PCR Produkte lagen alle auf der richtigen Höhe und entsprachen somit ihren richtigen Grössen. Das Primerpaar 1af + 1br schien am wenigsten helle Banden zu ergeben, weswegen es für die weitere Optimierung der qPCR Bedingungen ausgeschlossen wurde. Beim Primerpaar 1af + 1ar ergaben die Annealing Temperaturen 57°C und 59°C die hellsten Banden. Beim Primerpaar 2f + 2r schien die Annealing Temperatur 57°C optimal zu sein

### 3.1.1.2 qPCR Bedingungen

In der Annahme, das Bakterium besitzt eine Kopie des *virD2* Gens und dem Wissen der gesamten Genomgröße von 7'044'473 bp, wurde mittels der Formel 1 in Kapitel 2.2.2.2 ausgerechnet, dass in der extrahierten DNA mit der Konzentration 20 ng/μL 2'590'468 Kopien pro μL des Gens sind. Die Verdünnungsreihe wurde angefertigt, sodass in den 5 μL Template der tiefsten Konzentration etwa 10 Kopien vorhanden waren. Die Daten dieser beiden qPCR Läufe sind dem Anhang in der Tabelle 14 und 15 zu entnehmen. Die beiden Primerpaare 1af + 1ar und 2f + 2r wurden mit einer Annealing Temperatur von 57°C in einer qPCR getestet. Das Diagramm des Primerpaares 1af + 1ar ist in der Abbildung 7 zu sehen.

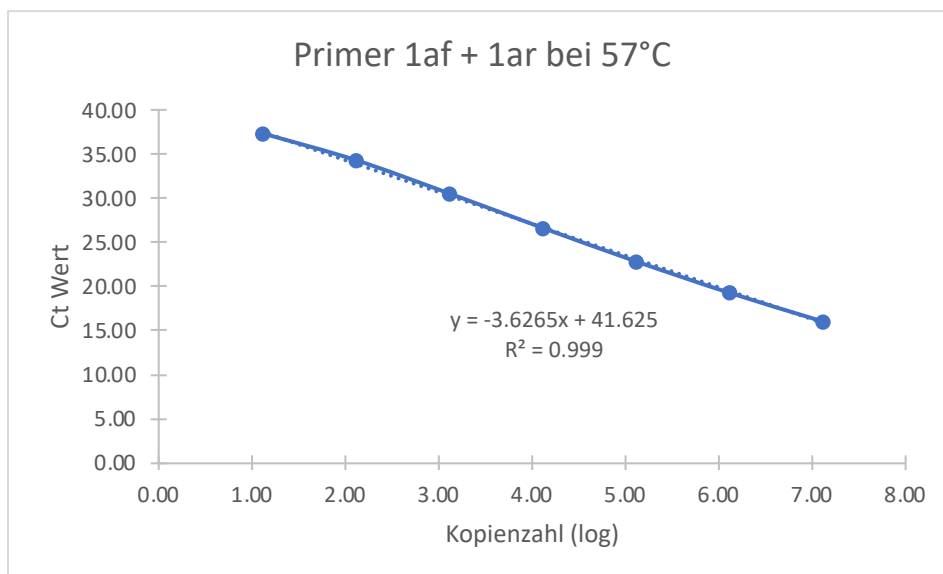


Abbildung 7: Diagramm des qPCR Laufs mit einer Annealing Temperatur von 57°C mit dem Primerpaar 1af + 1ar. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5 μL Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.6265x + 41.625$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.999. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.89.

Die Regressionsgleichung lautete  $y = -3.6265x + 41.625$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.999. Die anhand der Steigung berechnete Effizienz der Primer 1af und 1ar lag bei 0.89. Die tiefste noch signifikante Kopienzahl lag bei diesem Primerpaar bei 13 Kopien. Als Vergleich ist das Diagramm des Primerpaares 2f + 2r in der Abbildung 8 zu sehen. Die Regressionsgleichung dieses Diagrammes lautete  $y = -3.789x + 42.992$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9989. Die anhand der Steigung berechnete Effizienz der Primer 2f und 2r lag bei 0.84. Bei diesem Primerpaar waren die Mittelwerte der Ct Werte überall ein wenig höher und auch die Steigung war steiler. Dementsprechend war die Effizienz des Primerpaares 2f + 2r tiefer.

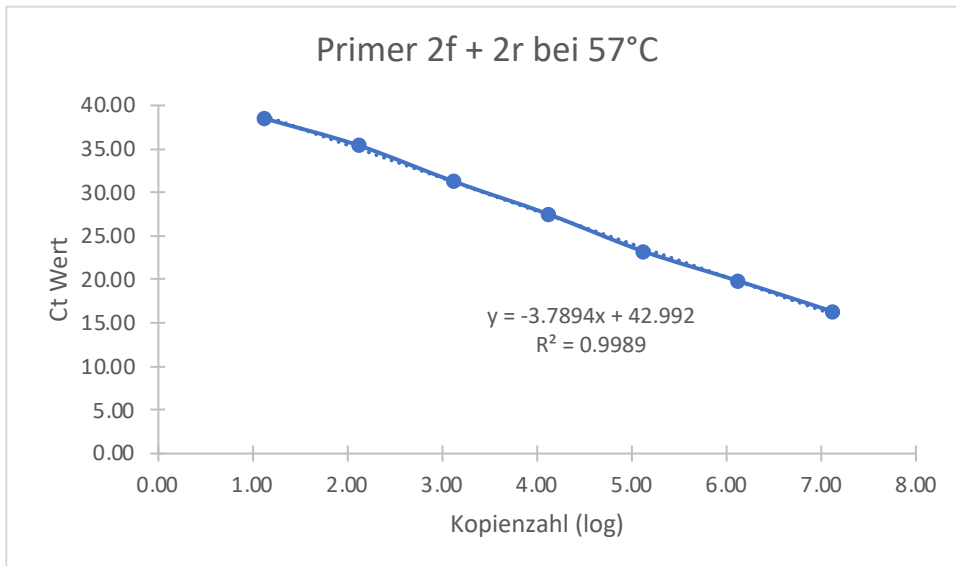


Abbildung 8: Diagramm des qPCR Laues mit einer Annealing Temperatur von 57°C mit dem Primerpaar 2f + 2r. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5 µL Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.789x + 42.992$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9989. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.84.

Anhand dieses Ergebnis war anzunehmen, dass das Primerpaar 1af + 1ar mit der besseren Effizienz optimaler geeignet sind für die qPCR. Da die Endpunkt PCR auch bei einer Annealing Temperatur von 59°C gut funktioniert hat, wurde die gleiche qPCR nochmals bei 59°C Annealing durchgeführt. Das Diagramm des Primerpaares 1af + 1ar ist in der Abbildung 9 zu sehen.

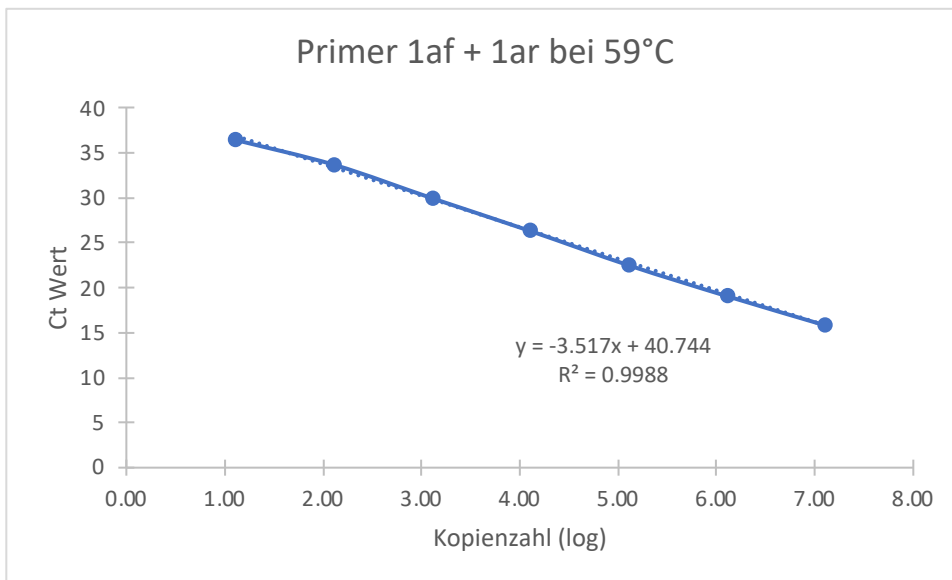


Abbildung 9: Diagramm des qPCR Laues mit einer Annealing Temperatur von 59°C mit dem Primerpaar 1af + 1ar. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5 µL Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.517x + 40.744$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9988. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.92.

Die Regressionsgleichung lautete  $y = -3.517x + 40.744$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9988. Die anhand der Steigung berechnete Effizienz der Primer 1af und 1ar lag bei 0.92. Die tiefste noch signifikante Kopienzahl war bei dieser Kombination von Bedingungen auch bei 13 Kopien, jedoch waren die Mittelwerte der Ct Werte etwas tiefer als bei 57°C. Als Vergleich ist das Diagramm des Primerpaares 2f + 2r bei 59°C in der Abbildung 10 zu sehen.

Die Regressionsgleichung lautete  $y = -3.6676x + 42.003$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9988. Die anhand der Steigung berechnete Effizienz der Primer 2f und 2r lag bei 0.87.

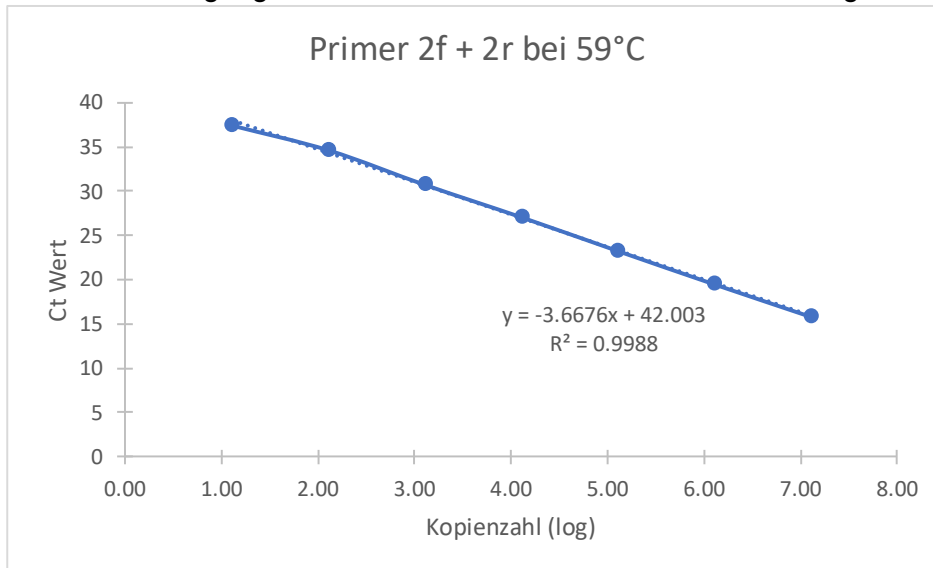


Abbildung 10: Diagramm des qPCR Laufs mit einer Annealing Temperatur von 59°C mit dem Primerpaar 2f + 2r. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5 µL Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.6676x + 42.003$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9988. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.87.

Da bei beiden qPCR Durchgängen das Primerpaar 1af + 1ar die bessere Effizienz verglichen mit dem Primerpaar 2f + 2r ergab, erwiesen sich diese Primer als optimaler für die qPCR. Die Effizienz war zudem mit 0.92 höher bei einer Annealing Temperatur von 59°C. Daher wurde mit diesen Bedingungen weiter für die Standardreihe gearbeitet. Die Sequenz des Primers 1af ist 5'-CTGTTGCCTTTCCTCGTCTG-3' und die Sequenz des Primers 1ar ist 5'-GTCTCAAGTCATCATCCGCATC-3'.

### 3.1.1.3 Standardreihe für die qPCR

Für die Standardreihe wurden die zwei Primerpaare getestet, welche ein grösseres Stück Sequenz als die zuvor verwendeten Primerprodukte ergaben. Das eine Primerpaar std-1\_F + std-1\_R sollte ein Produkt von 829 bp ergeben, während das andere Primerpaar std-2\_F + std-1\_R ein Produkt von 765 bp ergeben sollte. Es wurden für die Endpunkt PCR Duplikate angesetzt, sodass schlussendlich eine grösseres Volumen der DNA für das Experiment zur Verfügung stand. In der Überprüfung mittels Gelelektrophorese wurden beide Duplikate der Primerpaare pipettiert. Dies ist in der Abbildung 11 zu sehen.

Da die Banden des zweiten Primerpaares std-2\_F + std-1\_R sichtlich hellere und dickere Banden ergaben, schienen diese Primer noch effizienter zu sein. Die Banden sind fast schon ein wenig überladen im Gel, was die Banden dick und ein wenig verlaufen liess. Die Grössen der Produkte schienen jedoch im richtigen Bereich zu sein. Es wurde aufgrund dieses Ergebnis entschieden, mit dem zweiten Primerpaar weiterzuarbeiten. Die Sequenz des Standard Primers std-2\_F ist 5'-CGAAACGAATTTGATTGGCCT-3' und die Sequenz des Standard Primers std-1\_R ist 5'-GGTAAATCGTTCGCTGACCT-3'. Die Duplikate dieser Endpunkt PCR wurden daher zusammengemischt, um eine grössere Menge an DNA zu erhalten. Mit dem QIAquick PCR Purification Kit wurde die DNA aufgereinigt und danach mittels Qubit Fluorometer überprüft. Es wurde eine Konzentration von 42.4 ng/µL gemessen. Es wurde ausgerechnet, dass pro µL der extrahierten und aufgereinigten DNA 50'570'964'547 Kopien vorhanden waren.

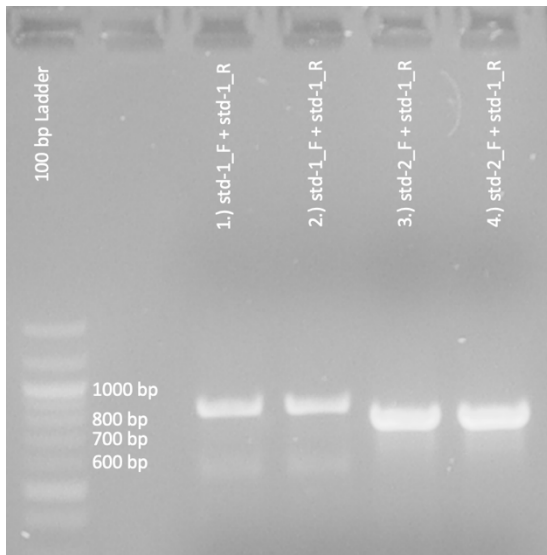


Abbildung 11: 1.5% Agarosegel an 50 mL nach einer Gelelektrophorese bei 110 V für 40 Minuten. Links ist die 100 bp grosse DNA Leiter zu sehen, welche alle 100 bp eine Bande produziert. Beide Primerpaare wurden bei einer Annealing Temperaturen von 55°C in der PCR getestet. In die Laschen der Gele wurde 5  $\mu$ L DNA Leiter und jeweils 10  $\mu$ L Probe, welche 1x Loading Dye enthielten, pipettiert. Zu sehen sind die helleren und dickeren Banden in den Spalten 3 und 4. Alle Banden haben ein Produkt der richtigen Grösse von 829 bp und 765 bp ergeben.

Die Verdünnungsreihe wurde angelegt, sodass in den 5  $\mu$ L der tiefsten Konzentration noch 25 Kopien vorhanden waren. Die qPCR wurde mit einer Annealing Temperatur von 59°C und den Primern 1af und 1ar angesetzt. In der Tabelle 5 sind die Mittelwerte der gemessenen Ct Werte mit den Kopienzahlen zu sehen.

Tabelle 5: Übersicht der Daten aus der qPCR für die Standardkurve unterteilt in Kopienzahl in 5 $\mu$ L, Kopienzahl logarithmisch und Mittelwert Ct Werte. Die ersten beiden Konzentrationen waren zu hoch und konnten in der qPCR mit dem automatisch auf 1'461.04 gesetzten Threshold (Schwellenwert) nicht detektiert werden.

Kopienzahl in 5 $\mu$ L	Kopienzahl logarithmisch	Mittelwert Ct Werte
252'854'822'737	11.4	-
25'285'482'274	10.4	-
2'528'548'227	9.4	6.01
252'854'823	8.4	9.87
25'285'482	7.4	13.68
2'528'548	6.4	17.31
252'855	5.4	20.96
25'285	4.4	24.76
2'529	3.4	28.63
253	2.4	32.18
25	1.4	36.15

Eine der drei pipettierten Negativkontrollen detektierte einen Ct Wert von 37.95. Der bei den 25 Kopien erhaltene Ct Wert von 36.15 lag somit immer noch unter dem Wert der Negativkontrolle mit fast zwei Zyklen. Der bei der qPCR automatisch gesetzte Threshold (Schwellenwert) lag bei 1'461.04. Anhand dessen wurden die Ct Werte berechnet. Die ersten beiden Konzentrationen konnten keinen Ct Wert ermitteln, da sie übersättigt waren. Es wurde aus den anderen neun Messpunkten ein Diagramm erstellt. Dabei wurde die logarithmische Kopienzahl auf der x-Achse mit dem Mittelwert aus den Ct Triplikaten auf der y-Achse geplottet. Das Diagramm ist in der Abbildung 12 zu sehen. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.7468x + 41.305$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9999. Daraus wurde die Effizienz von 0.85 berechnet. Je näher die Effizienz bei 1 liegt, desto besser und effizienter wäre die Amplifikation in der qPCR. Dies würde sich bei einer Steigung von -3.32 in der linearen Regressionsgleichung ergeben, bei Auftragung mit ansteigender Konzentration (Kralik and Ricchi, 2017). Als Optimierung für die Zukunft wäre eine Wiederholung der Standardkurve sinnvoll, um die Amplifikationseffizienz und somit eine aussagekräftigere Quantifizierung zu erreichen (Bosmans et al., 2016).

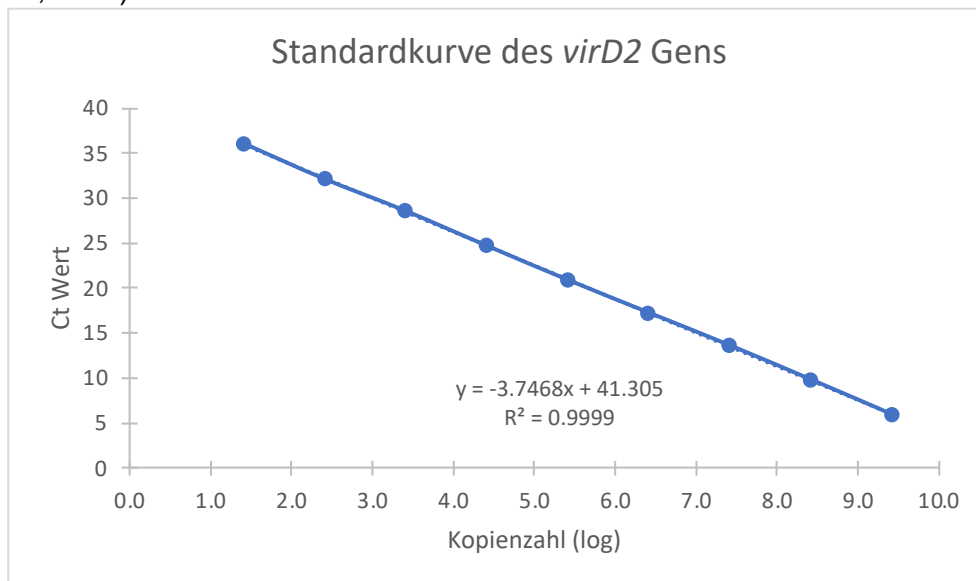


Abbildung 12: Diagramm der Standardkurve des *virD2* Gens mit den Primern 1af und 1ar bei einer qPCR Annealing Temperatur von 59°C. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5  $\mu$ L Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die neun Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Triplikate. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.7468x + 41.305$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9999. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.85.

#### 3.1.1.4 Spezifität Primer

Die DNA Extraktion mit dem Kit von Axonlab basiert auf einer enzymatischen Zelllyse mittels dem Enzym Proteinase K. Bei den gramnegativen Bakterien war die Extraktion erfolgreich und ergab eine Konzentration von 17.5 ng/ $\mu$ L beim *Rhizobium radiobacter* und beim *Pseudomonas putida* eine Konzentration von 131 ng/ $\mu$ L. Das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* ergab keine erfolgreich extrahierte DNA Konzentration, weswegen die DNA Extraktion mit dem Kit von ZymoResearch wiederholt wurde. Die darin angewandte mechanische Zelllyse ist auch für grampositive Bakterien mit der dickeren Zellwand gut geeignet. Sie ergab für den *Bacillus subtilis* eine Konzentration von 28.6 ng/ $\mu$ L.

Die pipettierten *Rhizobium rhizogenes* Proben haben Ct Werte ergeben, wie sie auch sollten mit den *virD2* Primern. Die *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* und *Rhizobium radiobacter* haben keine signifikanten Ct Werte ergeben. Somit entstand kein unspezifisches Produkt durch das Primerpaar 1af und 1ar, welche auf der Sequenz des Gens *virD2* des *Rhizobium rhizogenes* binden und eine 226 bp lange Sequenz erzeugen.

Ausserdem wurde bei den Negativkontrollen in die Wells der qPCR Platte das Hefe RNA Wasser pipettiert, um sicherzustellen, dass die Primer nicht unspezifisch mit der RNA interagieren. Es beeinflusste das Ergebnis nicht. Somit konnte bestätigt werden, dass die Verdün-

nungsreihe mit der zugefügten Hefe RNA weiter auf diese Weise hergestellt werden konnte und nicht das Resultat beeinträchtigt. Die Mittelwerte der gemessenen Verdünnungen der pipettierten Proben sind in der Tabelle 6 zu sehen. Die Negativkontrolle ergab einen Mittelwert von 37.72 und war somit der Anhaltspunkt des Vergleiches der Ct Werte. Wie zu sehen ist ergaben die zwei Verdünnungen der Positivkontrolle mit *Rhizobium rhizogenes* DNA die zu erwartenden Werte. Das Ergebnis von *Rhizobium radiobacter* und *Bacillus subtilis* lagen im Bereich der Negativkontrolle. Bei den beiden Werten des *Pseudomonas putida* ergab die 1:100 Verdünnung einen etwas tieferen Ct Wert von 35.65. Jedoch war die Ausgangskonzentration der DNA auch fast um das Zehnfache höher als die anderen pipettierten Proben. Um sicher zu gehen, wurde die Genomgrösse des *Pseudomonas putida* Strangs ausfindig gemacht und die Anzahl der Bakterien in der Verdünnung ausgerechnet. In den pipettierten 5  $\mu\text{L}$  der 1:100 Verdünnung lagen 970'711 Bakterien vor. Da diese Anzahl sehr hoch war, konnten die daraus etwas höher resultierenden Ct Werte vernachlässigt werden.

Tabelle 6: Übersicht der qPCR Resultate der Spezifitätsüberprüfung gegliedert in Probe, ursprüngliche DNA Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , Ct Wert der 1:100 Verdünnung und Ct Wert der 1:1'000 Verdünnung. Die ersichtlichen Ct Werte sind Mittelwerte der pipettierten Duplikaten. *Rhizobium rhizogenes* diente als Positivkontrolle mit den verwendeten *virD2* Primern 1af und 1ar. *Rhizobium radiobacter*, *Pseudomonas putida* und *Bacillus subtilis* waren die drei zu testenden Bakterien. In der Negativkontrolle wurde die Lösung mit der Hefe RNA pipettiert und der Mittelwert der daraus resultierenden Ct Werte betrug 37.72.

Probe	Ursprüngliche DNA Konzentration [ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]	Ct Wert 1:100 Verdünnung	Ct Wert 1:1000 Verdünnung
<i>Rhizobium rhizogenes</i>	16.2	22.81	29.39
<i>Rhizobium radiobacter</i>	17.5	36.60	37.12
<i>Pseudomonas putida</i>	131.0	35.65	36.98
<i>Bacillus subtilis</i>	28.6	37.32	38.77

Insgesamt zeigten sich die *virD2* Primer somit sehr spezifisch mit den drei anderen Bakterien. Um herauszufinden, ob die Primer auch noch spezifisch binden, wenn andere Bakterien als diese drei vorhanden sind, wurde ein Vergleich in den Datenbanken von NCBI vorgenommen. Mit der Sequenz des Forward Primers 1af waren Übereinstimmungen mit einigen bakteriellen Sequenzen zu sehen. Diese Primersequenz hat eine 100% Übereinstimmung mit Einträgen des Bakterium *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium deltaense*, *Agrobacterium fabrum* und noch weiteren Stämmen des Agrobakteriums, oder auch neu bekannt als Rhizobium. Alle Suchergebnisse waren Einträge mit der Plasmid DNA, welche die virulenten *virD* Gene enthielten (Hooykaas and Hooykaas, 2021; Suzaki et al., 2004). Mit der Sequenz des Reverse Primers 1ar waren ebenfalls Übereinstimmungen mit anderen bakteriellen Sequenzen zu finden. Jedoch stimmten die Sequenzen nur bei einem einzigen Eintrag, über das *Agrobacterium rhizogenes*, zu 100% mit allen 22 Nukleotiden überein. Weitere Suchresultate zeigten, dass beispielsweise 20 von 22 Nukleotiden übereinstimmten, wobei die abweichenden Stellen in der Mitte der Primersequenz vorzufinden waren. Da diese Spezifitätsüberprüfung rein theoretisch war, lässt sich keine definitive Aussage über das eventuelle Binden des Primerpaares an andere DNA Sequenzen treffen. Die Wahrscheinlichkeit, dass andere Rhizobium Stämme ebenfalls mit diesen Primern detektiert werden können, ist vorhanden. Ein definitives Ergebnis wäre mit experimentellen Durchführungen der jeweiligen bakteriellen Reinkulturen zu erhalten.

Durch die ähnlichen Auswirkungen und ausgelösten Krankheiten der verschiedenen Rhizobien Stämme, wäre das Detektieren von mehreren Rhizobium Bakterien von Vorteil. Auch wenn das Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* in einer Probe vorhanden wäre, sollten Gegenmassnahmen wie eine Desinfektion des Wassers getroffen werden. Dies könnte über das Testen der jeweiligen Probe mit mehreren Stamm-spezifischen Primern gemacht wer-

den. Eine weitere Möglichkeit wären die fluoreszierend markierten Oligonukleotid-Sonden anstelle von SYBR Green in der qPCR (Kralik and Ricchi, 2017).

### 3.1.1.5 Sensitivität der qPCR Methode

Wie in Tabelle 5 des Kapitels 3.1.1.3 zu sehen ist, wurde in der Verdünnungsreihe für die Standardkurve in der tiefsten Konzentration 25 Kopien nachgewiesen. Dies wurde somit als Detektionslimit festgelegt, da noch ein signifikanten Unterschied in den Ct Werten zu der Negativkontrolle vorlag.

Bei der Überprüfung von der Effizienz der DNA Extraktion, wurde ein signifikanter Verlust der bakteriellen DNA festgestellt. Dies ergab Sinn, da die Extraktion über einige Filtrationsschritte lief, wobei die DNA mehrere Membranen passierte. Um diesen Verlust zu verringern, wurde mit Zugabe einer weiteren DNA überprüft, ob diese als eine Art Puffer agieren konnte. Die zugefügte Lachsspermien DNA zeigte sich als erfolgreich. Die erhaltenen Resultate sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

*Tabelle 7: Übersicht der Effizienz der DNA Extraktion, gegliedert in Theoretisch berechnete Zellzahl, Mittelwert Ct Werte, Berechnete Kopienzahl aus der qPCR und KBE (Kolonie bildende Einheiten). Die theoretisch berechnete Zellzahl wurde mittels der Formel 4 anhand der optischen Dichte berechnet. Der Mittelwert der Ct Werte wurde anhand von je zwei Mal pipettierten Duplikaten erstellt. Die Kopienzahl aus der qPCR wurde über die Regressionsgleichung der Standardkurve berechnet.*

Theoretisch berechnete Zellzahl	Mittelwert Ct Werte	Berechnete Kopienzahl aus der qPCR	KBE
998	33.11	2'309	2'400
9'977	30.03	15'294	24'000
99'773	27.05	95'912	240'000

Um die mit der Formel 4 theoretisch berechnete Zellzahl zu überprüfen, wurden die Verdünnungen ausplattiert. Die daraus hochgerechneten Kolonie bildenden Einheiten (KBE) zeigten sich mit einer Abweichung um den Faktor zwei. Im Vergleich mit der detektierten Kopienzahl aus der qPCR stimmte die Grössenordnung der KBE Zahl jedoch überein. Die Kopienzahl wurde hierbei anhand der Regressionsgleichung aus der Standardkurve mit der Formel 5 hochgerechnet.

*Formel 5: Formel zur Berechnung der absoluten Kopienzahl aus der qPCR. Der erhaltene Ct Wert der gemessenen Probe kann unter «Ct Wert» in die Formel eingefügt werden. Dabei wird anhand der Regressionsgleichung aus der Standardkurve hochgerechnet, wie viel Kopien in den pipettierten 5 µL DNA enthalten sind. Über die schlussendliche Multiplizierung mit 15 wird die absolute Kopienzahl berechnet, da am Ende in der DNA Extraktion mit 75 µL Wasser eluiert wurde.*

$$\text{Absolute Kopienzahl} = (10^{((\text{Ct Wert} - 41.305) \cdot (-3.7468))}) * 15$$

Durch diese Methode konnte der Verlust der bakteriellen DNA verhindert werden und die Effizienz der DNA Extraktion signifikant gesteigert.

### 3.1.1.6 Durchführung der Detektion mit Wasserproben

Um die zu detektierenden Bakterien aus einer Wasserprobe bis in die qPCR zu bringen, wurde eine Vakuum Filtration angewendet. Durch diese Aufkonzentrierung der Zellen zu Beginn der Methode konnte mit dem Filter und den darauf enthaltenen Bakterien die DNA Extraktion durchgeführt werden (Bosmans et al., 2016). Um zu überprüfen, ob die Vakuum Filtration funktioniert, wurde wie bei dem Test zur DNA Extraktions Effizienz eine zuvor berechnete Menge Bakterien in die 100 mL Leitungswasser zugefügt. Zur Kontrolle dieser berechneten Zellzahl wurden die Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und die Kolonie bildenden Einheiten gezählt. Der Vergleich der Resultate ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Übersicht der Vakuum Filtration Ergebnisse gegliedert in Bakterien pro 100 mL Leitungswasser, Kopienzahl aus der qPCR und KBE (Kolonie bildende Einheiten). Die zugefügten Bakterien sind wie in Tabelle 7 auch die theoretisch berechneten Zellzahlen über die Formel 4. Die Kopienzahl aus der qPCR sind Ct Mittelwerte und wurden über die Regressionsgleichung der Standardkurve berechnet.

Bakterien / 100 mL Leitungswasser	Kopienzahl aus der qPCR	KBE
1'000	1'261	1'776
10'000	12'417	17'761
100'000	182'775	177'605

Die in der Tabelle ersichtlichen Resultate der Kopienzahl aus der qPCR und der KBE sind die Mittelwerte aus drei durchgeführten Versuchen. Pro Versuch wurde jeweils auch der Mittelwert aus den filtrierten und pipettierten Duplikaten verwendet. Wie zu sehen ist, stimmen die Zahlen in der Grössenordnung überein. Die berechnete Zellzahl war um den Faktor 1.77 kleiner als die durchschnittlichen Kolonie bildenden Einheiten. Das Verfahren des Ausplattierens lieferte einen genaueren Einblick in die tatsächlich verwendete Konzentration. Die Kopienzahlen aus der qPCR lagen noch näher bei den KBE Werten. Durch diesen Vergleich liess sich feststellen, dass trotz Vakuum Filtration und der darauffolgenden DNA Extraktion kein signifikanter Verlust an Bakterien während der Methodendurchführung auftrat. Durch die zugefügten 1'000 Bakterien in den 100 mL Leitungswasser und dem Ergebnis aus der qPCR konnte schlussendlich gesagt werden, dass 10 Bakterien pro mL Wasser detektierbar sind mittels dieser Methodik. Das gesamte Protokoll zur Durchführung ab der Vakuum Filtration bis nach der DNA Extraktion ist in dem Kapitel 5.2.1 des Anhangs zu entnehmen.

10 Zellen pro mL ist eine eher tiefe Konzentration. Es ist zu vermuten, dass bei einer bakteriellen Kontamination des Wassers in der Landwirtschaft diese Konzentration realistisch oder noch höher auftreten kann. Falls die Konzentration des Bakteriums *Rhizobium rhizogenes* in der Wasserprobe kleiner ist, könnte die Zellzahl durch Anpassung des zu filtrierenden Volumens angepasst werden (Bosmans et al., 2016). Beispielsweise könnten anstelle von 100 mL Wasser auch 500 mL Probe über den Filter laufen gelassen werden, wodurch sich schlussendlich wieder die gleiche Anzahl Bakterien darauf befinden würden. Diese Erhöhung der Sensitivität ist eine einfach umsetzbare Anpassung der Methode.

## 3.2 Durchflussszytometrie

### 3.2.1 Erste Messungen *Rhizobium rhizogenes*

Um ein erstes Bild vom Bakterium *Rhizobium rhizogenes* im Durchflussszytometer generiert zu erhalten, wurde eine 1:22'500 Verdünnung der Reinkultur gemessen. Da die Verdünnung in ultrareinem Wasser gemacht wurde, diente dies als Negativkontrolle. In der Abbildung 13 ist die gemessene ultrareine Wasserprobe zu sehen. Die Zusammenfassung der analysierten Probe zeigt jeweils drei Diagramme, die intakte Zellzahl pro mL (ICC) und den hohen Anteil an Nukleinsäure in Prozent (HNAP), welcher innerhalb des Gates anhand des Schwellenwertes, sichtbar mit roter Linie, gemessen wird. Die Zellzahl wird ebenfalls anhand der detektierten Punkte innerhalb des rot markierten Gates auf einen mL berechnet. Dieses Gate ist das Standard-Gate aus dem Wasseranalyse Protokoll des BactoSense Gerätes. Wie auf der Abbildung 9 zu sehen ist, ist das ultrareine Wasser mit 20 detektierten Zellen pro mL sehr rein. Die blauen Punkte links vom Gate zeigen den Hintergrund mit dem Geräterauschen.

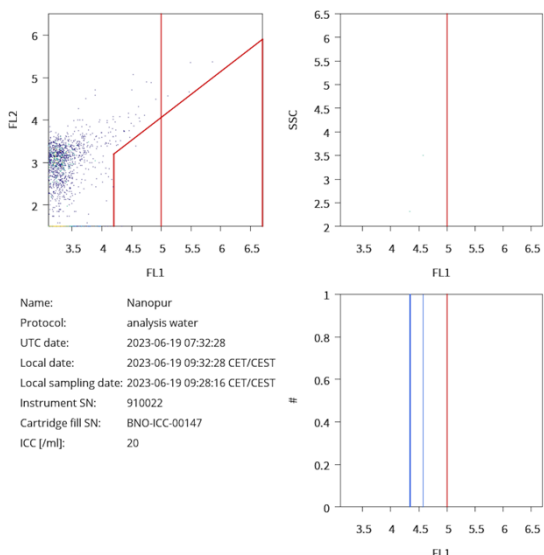


Abbildung 13: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von ultrareinem Wasser. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen.

Das Ergebnis der 1:22'500 Verdünnung aus der Reinkultur ist in Abbildung 14 zu sehen. Zu erkennen ist ein deutliches Cluster in blau, grün und gelber Farben. Die farbliche Darstellung zeigt die Konzentration oder Menge der detektierten Punkte an dem jeweiligen Ort. Die ICC Zahl erklärt die hohe Menge an Bakterien mit 299'810 Zellen pro mL. Im ersten Dotplot ist ein Doppelcluster zu sehen. Die Anhäufungen zeigen sich eher lang gezogen nebeneinander am oberen Rande des Gates. Auch die Seitenstreuung spiegelt dieses Doppelcluster wider, wobei durch diese Achsen die beiden Cluster übereinander entstanden. Das Histogramm zeigt mit den Doppelpeaks die beiden Cluster deutlich erkennbar. Die HNAP ist mit 98.06% hoch.

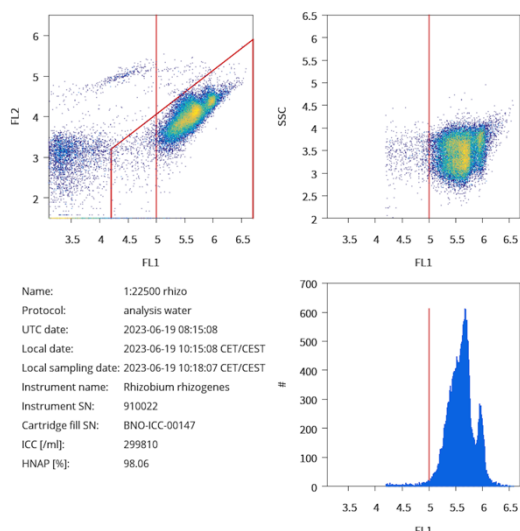


Abbildung 14: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des Rhizobium rhizogenes. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 299'810. Die HNAP lag bei 98.06%.

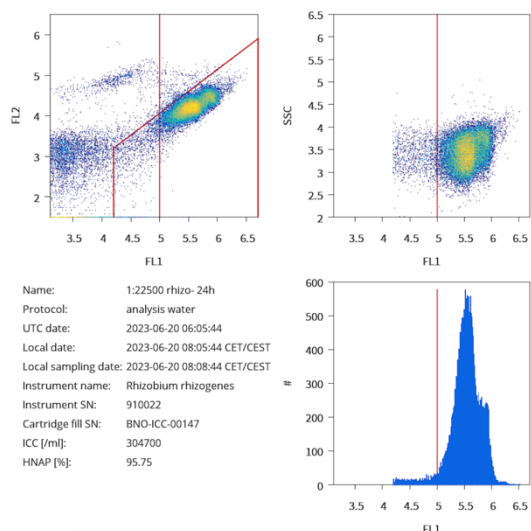


Abbildung 15: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des Rhizobium rhizogenes nach 24 Stunden. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 304'700. Die HNAP lag bei 95.75%.

Im rot fluoreszierenden Bereich oberhalb und ausserhalb des Gates sind ebenfalls einige detektierte Punkte zu sehen. Dies können Partikel in der Lösung sein oder tote Zellen, welche durch die nicht mehr intakte Zellwand das Färbemittel Propidiumiodid aufgenommen haben. In Abbildung 15 ist dieselbe *Rhizobium rhizogenes* Verdünnung zu sehen, jedoch nach 24 Stunden. Man sah durch diesen Vergleich der Messungen den Unterschied von einer etwas älteren Kultur der gleichen Suspension. Die ICC Zellzahl war mit 304'700 etwas höher und die HNAP mit 95.75% etwas tiefer. Im ersten Dotplot ist zu sehen, dass mehr detektierte Punkte im linken Bereich des Gates vorhanden waren. Dies liess die Frage aufkommen, ob das bereits andere im Wasser gewachsene Bakterien sind. Das *Rhizobium* Cluster war etwas nach oben gerutscht und hatte auch eine leicht veränderte Form. Jedoch war immer noch ein Doppelcluster in beiden Dotplots zu sehen. Das Histogramm zeigte immer noch die beiden Peaks. Aber die Peaks waren nicht ganz so hoch wie die in der Abbildung 14 und zudem waren sie minim nach links verschoben. Die gemessenen Punkte im rot fluoreszierenden Bereich hatten zugenommen, was auf mehr abgestorbene Zellen hindeutete (Hauret et al., 2021).

Das Ergebnis dieses Vergleiches zeigte den Einfluss des Alters der Bakterien. Das charakteristische Muster des Bakteriums war auch bei der älteren Kultur noch zu erkennen. Dennoch waren klare Unterschiede zu sehen. Ob dieser Einfluss bei einer deutlich kleineren Konzentration noch wahrzunehmen ist, wäre eine interessante Frage für weiterführende Versuche. Auch spielte hierbei das Lösungsmittel wohl eine massgebliche Rolle für das Verhalten der Bakterien. In einer hydroponischen Nährlösung verhalten sich die Zellen eventuell anders als in diesem Beispiel mit ultrareinem Wasser.

### 3.2.2 Verdünnungsreihen

Die erste Verdünnungsreihe wurde mit dem ultrareinem Wasser gemacht. Es wurde darauf geachtet, dass die Duplikate der Verdünnungen möglichst unverzüglich gemessen wurden. Wie gesehen im vorherigen Kapitel, hat die Zeit und somit das Alter der Verdünnungen einen Einfluss auf das Ergebnis der Messungen. Für einen Anhaltspunkt der Konzentration wurde die theoretische Zellzahl mittels optischer Dichte berechnet. Anhand dieser Zahl wurden die zu analysierenden Proben ausgewählt. Zudem wurden die Verdünnungen als Kontrolle ausplattiert, um die daraus entstehenden Kolonie bildenden Einheiten zu zählen. Auf Abbildung 16 ist die höchste Konzentration aus der Verdünnungsreihe zu sehen.

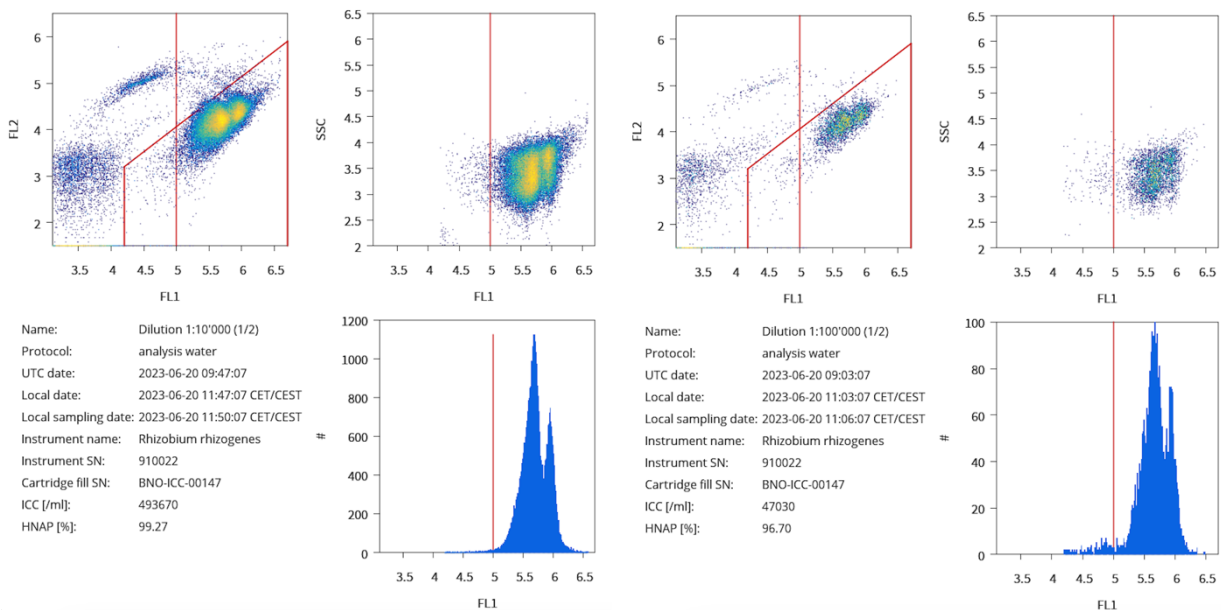


Abbildung 16: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:10'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 493'670. Die HNAP lag bei 99.27%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

Abbildung 17: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:100'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 47'030. Die HNAP lag bei 96.7%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

Die 1:10'000 Verdünnung ergab einen ICC Wert von 493'670 und die HNAP lag bei 99.27%. Das Diagramm mit dem Gate zeigte die Doppelcluster deutlich in mehrfarbiger Darstellung. Das side scatter wies ebenfalls das Doppelcluster auf, wobei zwei Cluster nebeneinander und auch untereinander zu liegen kamen. Im Histogramm waren die sehr gleichmässigen Peaks zu erkennen. Der grössere Peak lag bei ungefähr 5.7 und der kleinere Schulterpeak bei 6. Zur nächsten Konzentration war bereits ein deutlicher Unterschied festzustellen. Die 1:100'000 Verdünnung in Abbildung 17 ergab einen ICC Wert von 47'030 und die HNAP lag bei 96.7%. Durch die erhaltene ICC Zahl war die 1:10 Verdünnung der beiden Proben erkennbar. Das Doppelcluster war immer noch im Gate des Diagrammes sichtbar. Im side scatter war die typische Verteilung der Messpunkte von Auge schon weniger gut ersichtlich. Jedoch war durch die Darstellung im Histogramm das Muster vorhanden mit den Doppelpeaks. Was auffällig war, ist das kleinere Hintergrundrauschen in der höheren Verdünnung. Die rot fluoreszierenden Partikel haben durch die kleinere Konzentration auch abgenommen.

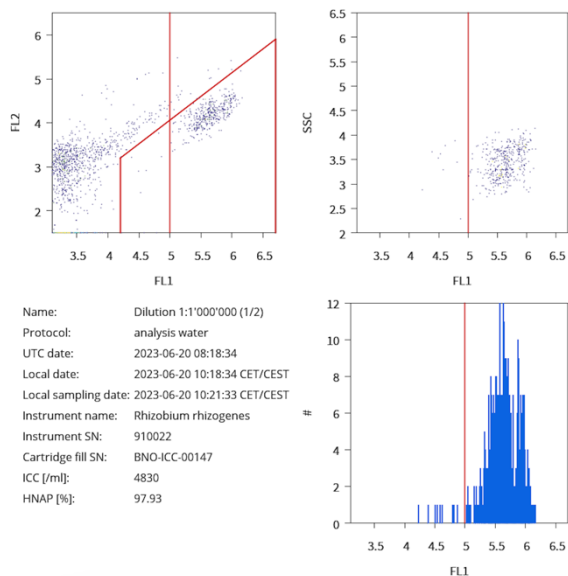


Abbildung 18: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:1'000'000 Verdünnung der Rhizobium rhizogenes Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 4'830. Die HNAP lag bei 97.93%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

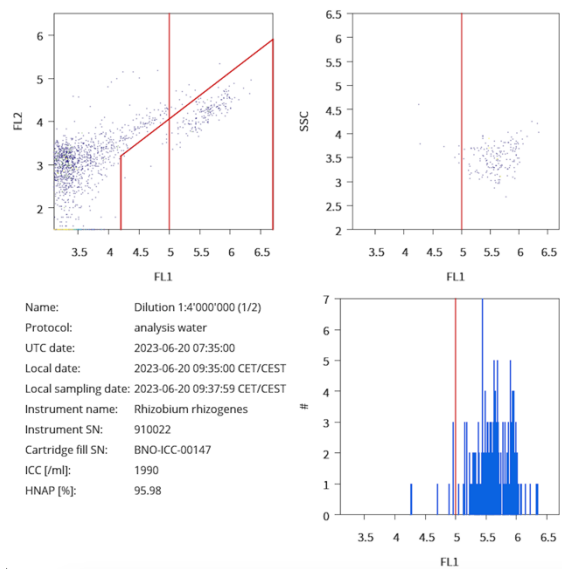


Abbildung 19: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:4'000'000 Verdünnung der Rhizobium rhizogenes Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 1'990. Die HNAP lag bei 95.98%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

In den Abbildungen 18 und 19 sind die Verdünnungen 1:1'000'000 und 1:4'000'000 abgebildet. Die 1:1'000'000 Verdünnung ergab einen ICC Wert von 4'830 und die HNAP lag bei 97.93%. Die 1:4'000'000 Verdünnung ergab einen ICC Wert von 1'990 und die HNAP lag bei 95.98%. Die ICC Werte entsprachen der Grössenordnung anhand der Verdünnungen. In den Dotplots waren bei beiden Verdünnungen noch Cluster zu sehen, welche am gleichen Ort auftraten. Das Cluster war jeweils von Auge als einzelnes erkennbar. Das Histogramm der Proben zeigte bis zur tiefsten gemessenen Probe den typischen Doppelpeak. Die Partikel und toten Zellen im oberen Bereich des Diagrammes nahmen mit der Konzentration der Proben ab.

In der Tabelle 9 sind die Resultate von den ersten Proben der Duplikate zu sehen. Die gemessenen Zellzahlen erwiesen sich als das Doppelte der theoretisch berechneten Zellzahlen pro mL. Da die Bakteriensuspensionen nicht immer homogen sind, sind Unterschiede je nach pipettierter Probe realistisch. Die Kolonie bildenden Einheiten lieferten ein zuverlässigeres Resultat der Bakterienkonzentration. Die intakte Zellzahl aus dem BactoSense stimmt mit der KBE Zahl überein.

Tabelle 9: Übersicht der Messresultate aus dem Durchflusszytometer BactoSense der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe mit ultrareinem Wasser gegliedert in Theoretisch berechnete Zellzahl pro mL, Intakte Zellzahl pro mL des BactoSense und Kolonie bildende Einheiten (KBE) pro mL.

Theoretisch berechnete Zellzahl / mL	Intakte Zellzahl / mL BactoSense	KBE / mL
235'387	493'670	393'000
23'539	47'030	39'300
2'354	4'830	3'930
588	1'990	1'920

Es wurde eine zweite Verdünnungsreihe mit einer anderen Verdünnungslösung angesetzt. Da Wasser aufgrund osmotischer Verhältnisse keine optimale Umgebung für Zellen bietet, wurde ein Puffer verwendet. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) sollte die Bakterien stabil halten und wurde daher für die zweite Verdünnungsreihe verwendet. Da PBS im BactoSense einen anderen Hintergrund generiert, wurde auch hier eine Negativkontrolle gemessen. Das Resultat der Negativkontrolle ist in Abbildung 20 zu sehen.

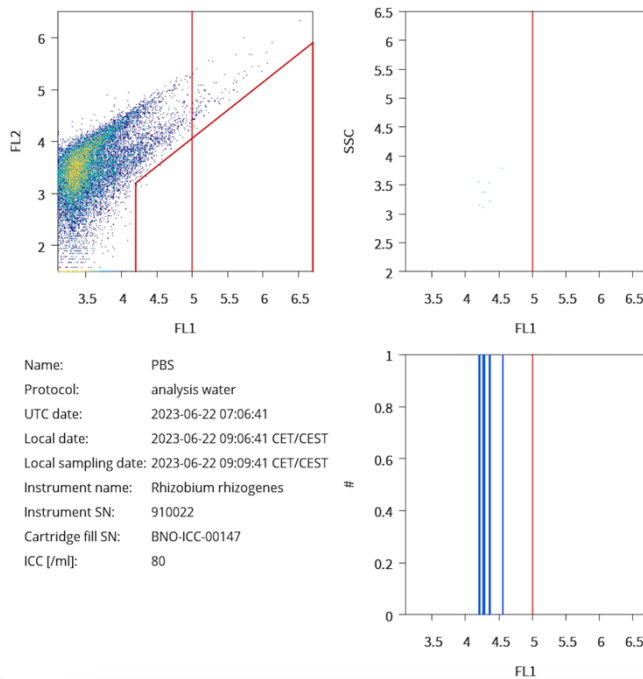


Abbildung 20: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS). Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen.

Es war ein deutlich erkennbarer Unterschied zum ultrareinen Wasser zu sehen. Das Hintergrundrauschen ist durch den Puffer grösser geworden. Es sind viele Partikel im Diagramm zu sehen, welche fluoreszierten. Das Cluster von PBS heilt sich jedoch mehrheitlich ausserhalb des Gates auf. Dadurch sollten die Bilder der Verdünnungsreihe nicht signifikant beeinträchtigt werden. Die intakte Zellzahl pro mL lag bei der Negativkontrolle bei 80. Die Ergebnisse der analysierten Verdünnungsreihe in PBS sind den Abbildungen 21-24 zu entnehmen.

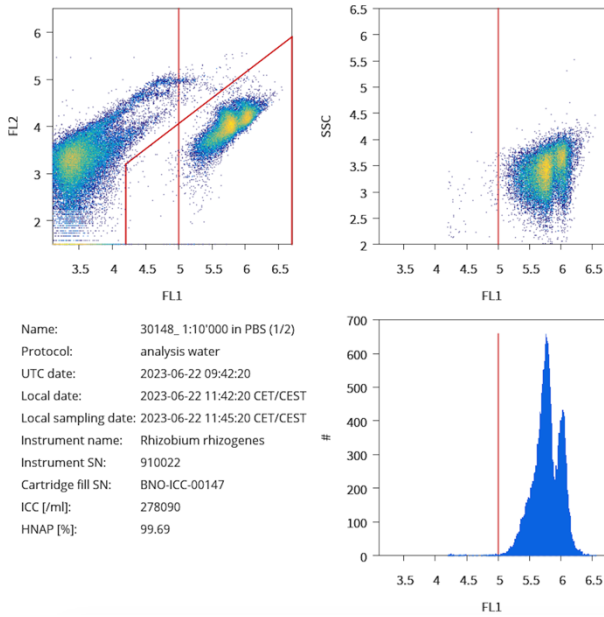


Abbildung 21: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:10'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 278'090. Die HNAP lag bei 99.69%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

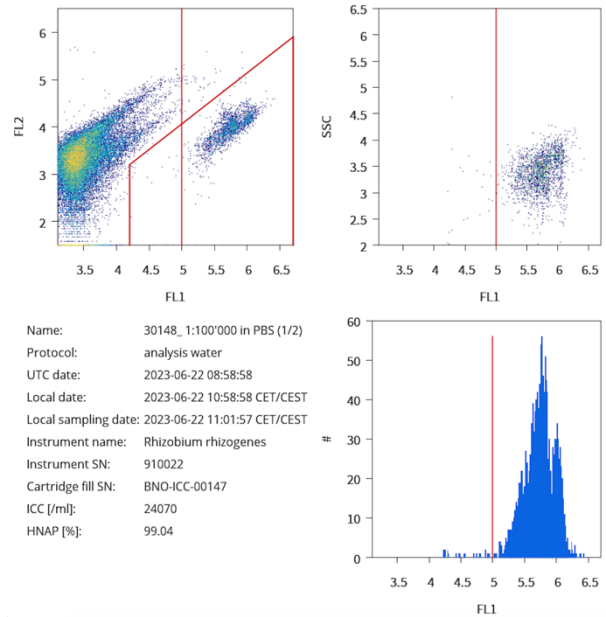


Abbildung 22: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:100'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 24'070. Die HNAP lag bei 99.04%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

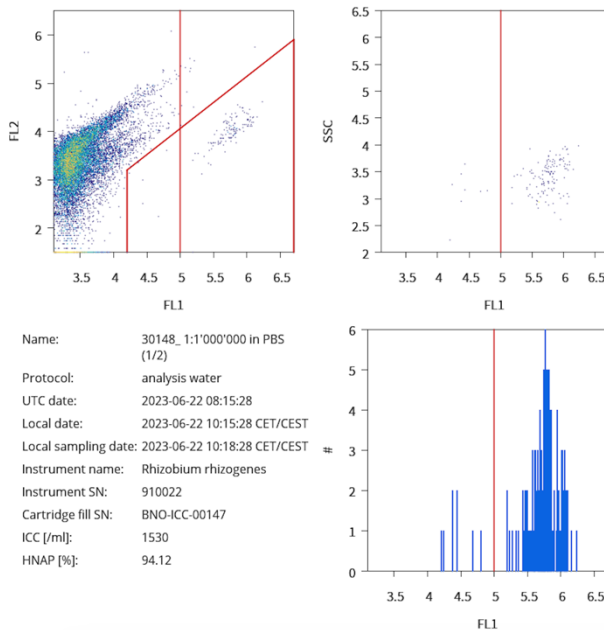


Abbildung 23: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:1'000'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 1'530. Die HNAP lag bei 94.12%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

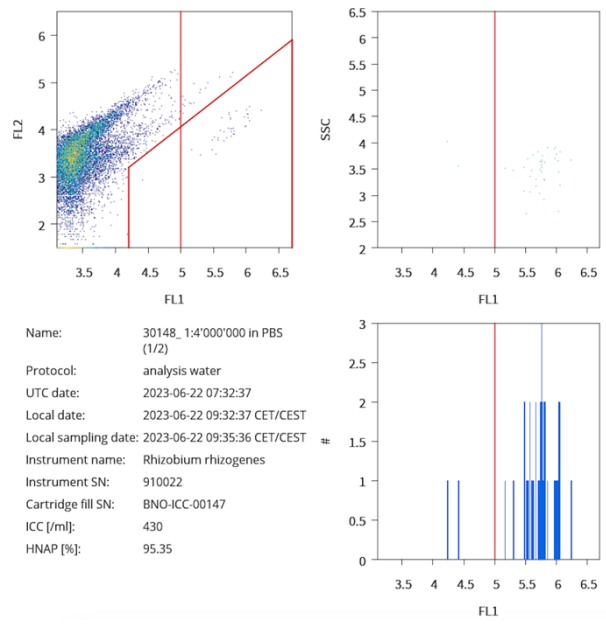


Abbildung 24: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:4'000'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 430. Die HNAP lag bei 95.35%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

Das Ergebnis der Verdünnungsreihe, zeigt die absteigende Konzentration des Bakteriums anhand der intakten Zellzahl und durch die optischen sichtbaren Cluster der Diagramme. Was auffällig war, war der PBS Hintergrund, welcher durch die Verdünnungen ebenfalls kleiner geworden ist. Ab der Verdünnung 1:1'000'000 sah man das kleiner gewordene Rauschen durch die farbliche Darstellung. Das Doppelcluster war ab dieser Verdünnung ebenfalls stark verkleinert, sodass eher nur noch ein einzelnes Cluster wahrzunehmen war. Im Histogramm war der vermeintliche Doppelpeak des *Rhizobium rhizogenes* noch zu erkennen. Die Zellzahl war mit 1'530 schon sehr klein. Die nächste Verdünnung ergab mit 1:4'000'000 schon eine Zellzahl von 430. Dies lag ausserhalb des sensitiven Messbereiches des BactoSense, welcher zwischen 2'000'000 und 1'000 Zellen pro mL gesetzt ist. Auch von dieser Verdünnungsreihe wurden die Konzentrationen ausplattiert, um einen Vergleich der ICC Zahl und den Kolonie bildenden Einheiten zu machen. Die Werte sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Übersicht der Messresultate aus dem Durchflusszytometer BactoSense der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe mit Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gegliedert in Theoretisch berechnete Zellzahl pro mL, Intakte Zellzahl pro mL des BactoSense und Kolonie bildende Einheiten (KBE) pro mL.

Theoretisch berechnete Zellzahl / mL	Intakte Zellzahl / mL BactoSense	KBE / mL
224'360	278'090	363'600
22'436	24'070	42'320
2'244	1'530	3'040
561	430	1'040

Auch hier wurden die Werte von jeweils einer Probe des BactoSense verwendet und die Mittelwerte der Kolonie bildenden Einheiten. Die mittels optischer Dichte theoretisch berechneten Zellzahlen stimmten mit den detektierten intakten Zellzahlen des BactoSense überein. Bei dieser Verdünnungsreihe fielen die KBE etwas höher als die gemessenen Zellzahlen aus. Die Grössenordnung der drei verglichenen Werte stimmte überein.

Um eine genaue Quantifizierung mittels BactoSense Durchflusszytometrie zu machen, wäre das weitere Analysieren der Resultate zu empfehlen. Das *Rhizobium* Cluster befindet sich sehr nahe am oberen Rand des Gates. Einige zum Bakterium gehörenden Messpunkte wurden nicht mit zur Zellzahl eingerechnet, da sie sich ausserhalb des Gates befanden. Ein neues Setzen des Gates, welches spezifisch für das *Rhizobium rhizogenes* Bakterium passt, würde die Spezifität der Analyse vergrössern. Diese ersten Bilder der beiden Verdünnungsreihen zeigten ein typisches Muster des Bakteriums durch dessen DNA Anfärbung. Durch das Verwenden der ICC Kartusche konnten tote und lebende Bakterien unterschieden werden. Dies ist durchaus sinnvoll bei einer zukünftigen Messung von Wasserproben. Durch das Verwenden von den zwei verschiedenen Färbemittel SYBR Green und Propidiumiodid konnten die Partikel oder toten Zellen von den noch intakten Bakterien bildlich unterschieden werden. SYBR Green bindet unspezifisch an die DNA und kann die Zellwand durchdringen. Propidiumiodid kann nur durch nicht intakte Zellwände gelangen und generiert einen rot fluoreszierenden Bereich (Hauret et al., 2021).

### 3.2.3 BactoSense Spezifität

Um das Bakterium *Rhizobium rhizogenes* zu detektieren und es als dieses erkennen zu können, muss das BactoSense Durchflusszytometer spezifisch genug sein. Daher wurden die drei im Kapitel 2.2.2.4 erwähnten Bakterien getestet. Das Ergebnis der Analyse des Bakteriums *Rhizobium radiobacter* ist in der Abbildung 25 zu sehen. Es wurde eine 1:22'500 Verdünnung in PBS getestet.

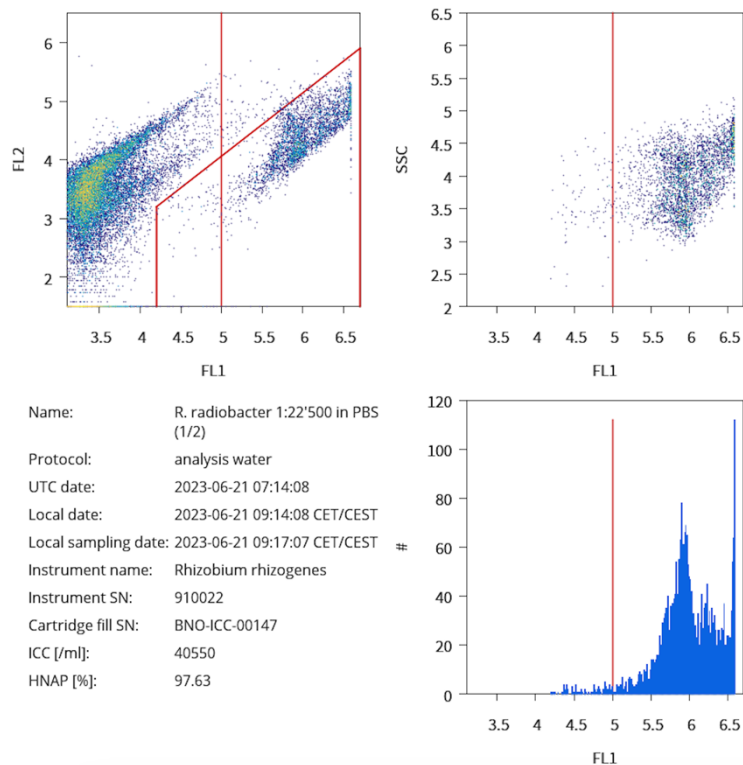


Abbildung 25: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Rhizobium radiobacter*. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 40'550. Die HNAP lag bei 97.63%.

Wie zu sehen war, ergab sich ein Cluster des Bakteriums im Gate. Dies war am oberen und rechten Rand des Gates lokalisiert. Es zeigte sich langgezogen und verteilt als das Cluster des *Rhizobium rhizogenes*. Es erreichte die Grenze des grünfluoreszierenden Bereiches. Dies war auch im side scatter und Histogramm ersichtlich. Der höchste Peak war an der äussersten Grenze entstanden. Dieses Ergebnis weicht sichtlich vom Ergebnis des *Rhizobium rhizogenes* ab, obwohl die beiden Bakterien nah verwandt sind. Es wäre zu vermuten gewesen, dass durch das ähnliche Aussehen und Genoms ein ähnliches Bild entsteht. Ein Unterschied der beiden Bakterien ist, dass dem *Rhizobium radiobacter* das Plasmid fehlt, welches das *Rhizobium rhizogenes* besitzt. Da aber eine ähnlich Genomgrösse vorhanden war, lässt sich die unterschiedliche Fluoreszenz mit einer anderen Ursache vermuten. Mögliche Gründe für eine stärkere Fluoreszenz könnte beispielsweise die höhere Permeabilität der Zellwand eines Bakteriums sein. SYBR Green hätte dadurch einen einfacheren Weg, die DNA im Zellinneren zu erreichen. Auch die Anordnung des Genoms ist ausschlaggebend, ob die DNA zirkulär oder linear vorliegt, für die Färbung der DNA. Das Verhältnis der Basen kann eine Variation der Anlagerung des Farbstoffes hervorrufen. Wenn mehrere Zellen aggregieren und als ein Messpunkt im Dotplot auftreten, kann dies den Anschein von stärkerer Fluoreszenz ergeben. Dabei spielt das side scatter eine wichtige Rolle. Durch die Form des darin gestreuten Lichts gibt es Rückschlüsse auf die Grösse und Oberfläche des Bakteriums (Adan et al., 2017 und bNovate Technologies SA).

Ebenfalls wurden noch die Bakterien *Pseudomonas putida* und *Bacillus subtilis* analysiert. Die erhaltenen Resultate sind den Abbildungen 26 und 27 zu entnehmen,

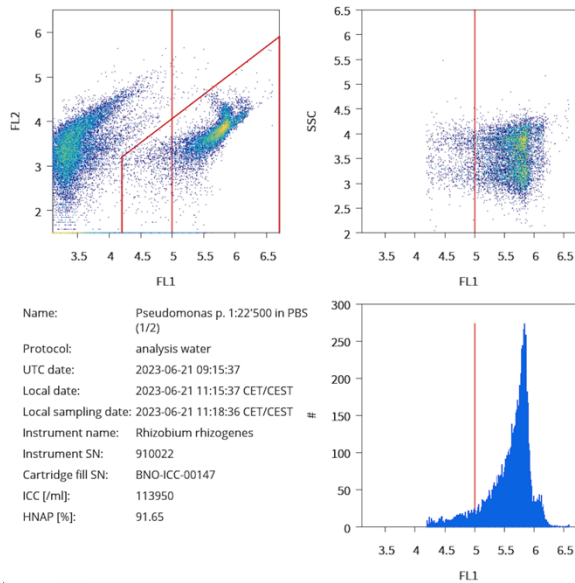


Abbildung 26: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Pseudomonas putida*. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 113'950. Die HNAP lag bei 91.65%.

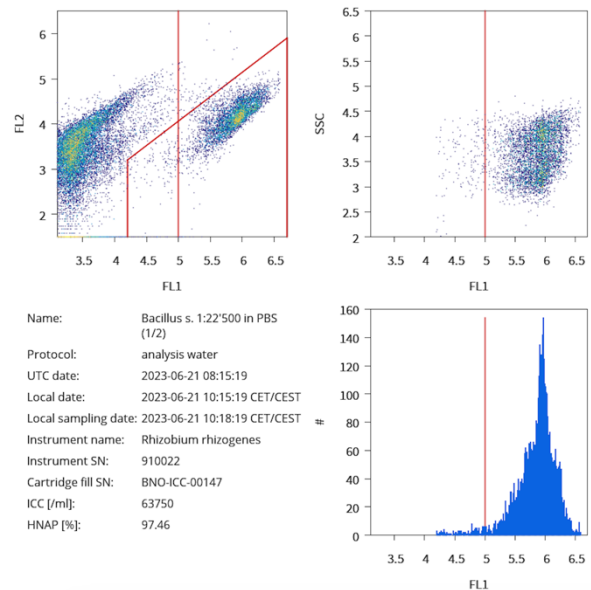


Abbildung 27: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Bacillus subtilis*. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 63'750. Die HNAP lag bei 97.46%.

Beide Bakterien ergaben ein gut sichtbares längliches Cluster im Gate. Es ist an einer ähnlichen Stelle lokalisiert wie das Cluster des *Rhizobium rhizogenes*. Als Unterschied war jedoch zu sehen, dass im Histogramm nicht ein so eindeutiger Schulterpeak entstand. Zudem sind die Doppelcluster im side scatter übereinander und nicht nebeneinander wie beim *Rhizobium rhizogenes*.

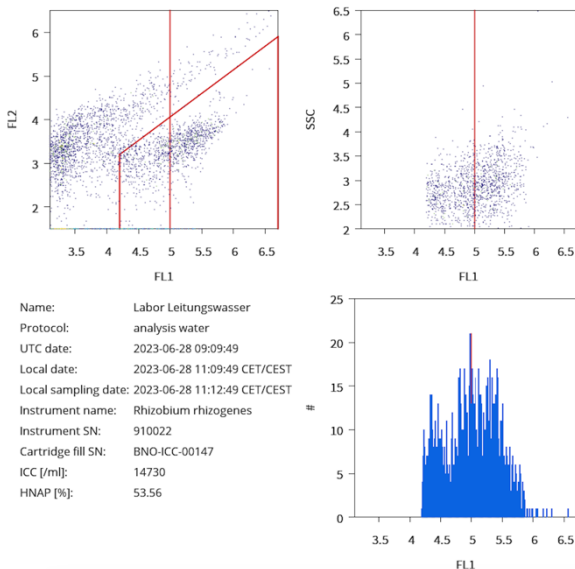


Abbildung 28: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von Labor Leitungswasser. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 14'730. Die HNAP lag bei 53.56%.

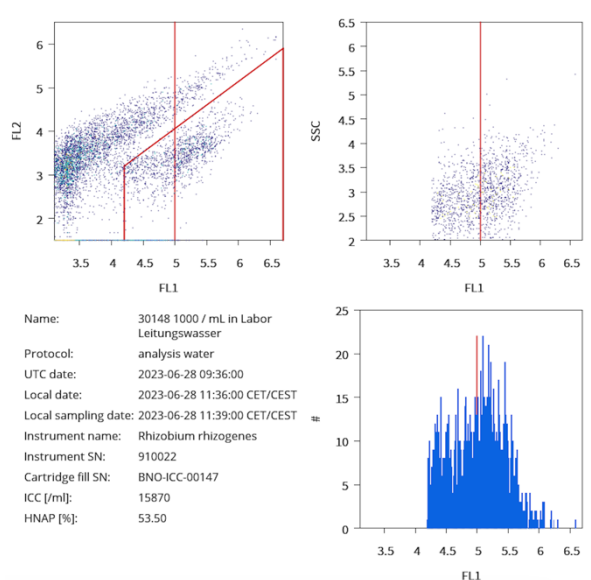


Abbildung 29: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von Labor Leitungswasser mit zugefügten 1000 *Rhizobium rhizogenes* pro mL. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 15'870. Die HNAP lag bei 53.50%.

Um nicht nur Reinkulturen zu testen, wurde auch das Labor Leitungswasser analysiert. Das Ergebnis ist in der Abbildung 28 zu sehen. Es war ein deutlicher Unterschied zu ultrareinem Wasser erkennbar. Es sind einige Zellen innerhalb des Gates verteilt. Die intakte Zellzahl lag bei 14'730 und die HNAP bei 53.56%. Für Leitungswasser lagen diese Werte im Rahmen (Ho et al., 2020). Jedoch stellte sich die Frage, ob mit diesem Hintergrund eine tiefe Konzentration des zu detektierenden Bakteriums noch erkennbar war. Dem Leitungswasser wurden 1'000 Bakterien des *Rhizobium rhizogenes* pro mL hinzugefügt und gemessen. Dieses Resultat ist in der Abbildung 29 zu sehen. Die intakte Zellzahl lag bei 15'870 und die HNAP bei 53.50%. Somit stimmte die Differenz der ICC von ungefähr 1'000 zugefügten Bakterien. In den Dotplots sieht man optisch den erhöhten Hintergrund und auch die Zunahme der Messpunkte. Im Histogramm der Abbildung 29 sieht man Peaks, welche im Histogramm des Leitungswasser nicht vorhanden waren. Ob diese vom zugefügten Bakterium stammen, war nicht eindeutig. Denn die Peaks sind eher klein, da die Konzentration tief war. Der Hintergrund bei dieser Messmethode ist entscheidend. Wenn in einem Gemisch durch die anderen Zellen nicht mehr erkennbar ist, ob oder wie sich das Bakterium zeigt, wäre diese Methode nicht dafür geeignet. Ein Frühwarnsystem zu entwickeln, um einen Alarm bei detektiertem Bakterium auszulösen, macht nur mit gewisser Spezifität Sinn. Daher braucht es weiterführende Messungen, die das Bakterium in verschiedenen Umgebungen zeigen. Um mittels künstlicher Intelligenz ein Programm möglichst genau zu trainieren, braucht es auch die Unterscheidung von den Zielbakterien und den restlichen Keimen. Somit sind weiterführende Experimente zur Untersuchung der spezifischen Erkennung eines bakteriellen Fingerabdruckes wichtig.

## 4 Zusammenfassende Schlussfolgerung

Das Pflanzenpathogen *Rhizobium rhizogenes* wurde als Ursache für die Haarwurzelkrankheit von zweikeimblättrigen Pflanzen ernannt. Die Folgen einer solchen Infektion zeigten sich besonders in der Tomatenzucht als grosses Problem. Die wirtschaftliche Folge des Ertragsverlustes zusammen mit dem akuten Erscheinungen wie das Verstopfen der Bewässerungssysteme und der Biofilmbildung fordern eine Lösung. Der schnellstmögliche Nachweis des Bakteriums ist gefragt. Die qPCR bietet sich als sensitive und spezifische Methodik an, um Wasserproben auf eine mögliche Kontamination zu untersuchen. Mit der Primerwahl und somit dem Festlegen der Zielsequenz wurde das Erstellen der Detektionsmethode begonnen. Das *virD2* Gen eignete sich dafür gut, da es spezifisch für die pathogenen Agrobakterien ist. Das Gen befindet sich auf dem Ri-Plasmid und kodiert für eine Endonuklease, welche wichtig für den Einbau der T-DNA in das pflanzliche Genom ist. Der qPCR Forward Primer 1af mit der Sequenz 5'-CTGTTGCCTTTCCTCGTCTG-3' und der qPCR Reverse Primer 1ar mit der Sequenz 5'-GTCTCAAGTCATCATCCGCATC-3' zeigten mit einer Annealing Temperatur von 59°C und einer Amplifikationseffizienz von 0.92 die besten Ergebnisse bei der Primertestung und Optimierung. Die beiden Standard Primer std-2\_F mit der Sequenz 5'-CGAAACGAATTTGATTGGCCT-3' als Forward Primer und std-1\_R mit der Sequenz 5'-GGTAAATCGTTCGCTGACCT-3' als Reverse Primer wurden verwendet, um ein PCR Template für die Standardkurve zu generieren. Mit den qPCR Primern 1af und 1ar wurde über eine bekannte Konzentration der DNA die Standardreihe generiert. Es zeigte sich in der Standardkurve eine Amplifikationseffizienz von 0.85. Bei einer zukünftigen Wiederholung dieser Standardkurve, wäre eine Effizienz möglichst nahe bei 1 gewünscht. Die aus der Kurve entstandene Regressionsgleichung lautete  $y = -3.7468x + 41.305$ . Die Methodik der qPCR begann mit einer 100 mL Wasserprobe, welche Vakuum filtriert wurde. Die drin enthaltenen Bakterien konnten dadurch aufkonzentriert werden und mit dem Filter in die mit Lachs DNA modifizierte DNA Extraktion eingebracht werden. Mit der extrahierten bakteriellen DNA konnte die qPCR durchgeführt werden. Anhand der Regressionsgleichung aus der Standardkurve konnte die absolute Quantifizierung des Bakteriums gemacht werden. Als Kontrolle wurden die verwendeten Konzentrationen des Bakteriums in der Wasserprobe ausplattiert und die daraus entstandene Kolonie bildenden Einheiten gezählt und verglichen. Die Größenordnung der enthaltenen Bakterien vor der Filtration und Extraktion stimmte überein mit der detektierten Kopienzahl aus der qPCR. Es liessen sich bis zu 10 Bakterien pro mL Wasser anhand dieser Methode nachweisen. Diese Konzentration ist tief. Um noch sensitiver zu werden, wären in weiteren Versuchen grössere Volumina an tieferen Konzentrationen zu filtrieren. Somit wäre als Ziel beispielsweise eine Konzentration von einem Bakterium pro mL detektierbar zu machen, um dieselbe Sensitivität wie in der Studie Bosmans et al., 2016 zu erhalten. Da die verwendeten qPCR mit grosser Wahrscheinlichkeit auch an die *virD2* Gene von verwandten pathogenen Agrobakterien binden, könnte man die DNA Färbemethode der qPCR anpassen. Anstelle unspezifischer Färbemittel wie das verwendete SYBR Green I wäre das Verwenden von fluoreszierend markierte Oligonukleotid-Sonden spezifischer.

Die zweite Methode der Durchflusszytometrie ist jedoch noch stärker auszuarbeiten als die qPCR. Das automatisierte Online-Durchflusszytometer BactoSense bietet einige Vorteile durch die unkomplizierte und zeitsparende Handhabung. Nach bereits 20 Minuten ist eine Wasseranalyse durchgeführt, bei welcher die gesamte Probenaufbereitung autonom durchgeführt wird. Ebenfalls funktioniert die Sichtbarmachung der Bakterien über die unspezifische DNA-Anfärbung mit SYBR Green I. Zusätzlich ist jedoch noch das rot fluoreszierende Propidiumiodid in der Kartusche. Da nur nicht intakte Zellmembranen diesen Farbstoff aufnehmen können, lässt sich eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen oder Partikel machen. Es wurden zwei Verdünnungsreihen mit dem Bakterium *Rhizobium rhizogenes* gemacht. Eine war in ultrareinem Wasser, welches einen sehr kleinen Hintergrund generiert und das Bakterium deutlich sichtbar machte. Die zweite Verdünnungsreihe wurde in Phosphat gepufferten Salzlösung gemacht, welches die Zellen stabiler hielt, jedoch einen etwas grösseren Hintergrund erzeugte. Durch das Messen der verschiedenen Konzentrationen zeigte sich in den erhaltenen Dotplot Diagrammen ein Muster. Das Bakterium zeigte in allen Messungen einen charakteristischen Fingerabdruck. Die Cluster erschienen am selben Ort im gesetzten Wasseranalyse Gate. Es war vor allem bei den höheren Konzentrationen ein Doppelcluster

erkennbar. Nicht nur im Diagramm mit den beiden Fluoreszenz-Achsen, auch im Dotplot mit der Seitenstreuung war ein Doppelcluster zu sehen. Dieser Hinweis auf die äusseren Begebenheiten oder der inneren genomischen Verteilung des Bakteriums zeigte sich in beiden Verdünnungsreihen. Durch das Messen von Labor Leitungswasser und dem Vergleich mit dem Leitungswasser und zusätzlichen 1000 Bakterien pro mL zeigte sich das allfällige Problem der Spezifität bei tiefen Konzentrationen des Bakteriums. Die Durchflusszytometrie ist eine gut etablierte Methode zur Analyse und Quantifizierung von Keimen in Wasserproben. Jedoch ist die Spezifität deutlich geringer und schwieriger als bei der qPCR. Um ein Bakterium zu detektieren und zuzuordnen, braucht es einen sehr spezifischen zytometrischen Fingerabdruck. Genauso wichtig ist dabei der Hintergrund der Probe. Wenn ein Gemisch und keine Reinkultur analysiert wird, geht das Zielbakterium schnell unter. Eine Variante zur Erhöhung der Spezifität wäre das Verwenden von fluoreszenzmarkierten, synthetisch hergestellten Nukleotid-Sonden und ihre komplementäre DNA/RNA-Sequenzen in der Zielzelle anstelle von SYBR Green I. Diese FISH Methode würde die Spezifität deutlich erhöhen. Um die jetzige Spezifität des BactoSense zu untersuchen, sind weitere Analysen und Experimente notwendig. Damit über künstliche Intelligenz ein Programm möglichst genau auf das Detektieren dieses Bakteriums trainiert werden kann, braucht es viele Daten. Sinnvoll wäre daher das Generieren von weiteren Diagrammen. Das Bakterium in allen möglichen Umgebungen zu erfassen, könnte hilfreich sein. Um dabei den Hintergrund von dem Zielkeim unterscheiden zu können, ist das Messen der Proben in Abwesenheit des Bakteriums massgeblich. Die schlussendlich zu analysierenden Proben variieren mit grosser Wahrscheinlichkeit stark im Ergebnis. Ein Brauchwasser, Seewasser, Leitungswasser oder stehendes Wasser aus einem Tank liefert unterschiedliche Zusammensetzungen von Keimen.

Durch die stark automatisierte Version der Durchflusszytometrie könnte der jetzige Standard der qPCR abgelöst werden. Wenn das BactoSense in den angeschlossenen Wasserleitungen einen Hinweis auf das Bakterium *Rhizobium rhizogenes* erhält, wird ein Alarm ausgelöst. Durch diese Art von Frühwarnsystem könnte ohne grossen Aufwand einen frühen Nachweis auf eine mögliche Kontamination gemacht werden. So liesse sich eine schnelle Gegenmassnahme, wie beispielsweise die Desinfektion des Wassers, treffen und die Infektion der Tomatenpflanzen eventuell sogar verhindern. Für eine Kontrolle der Detektion könnte eine Wasserprobe nach einem solchen Alarm in ein Labor geschickt und mittels der qPCR Methode spezifisch überprüft werden.

## 5 Anhang

### 5.1 Material und Methoden

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Geräte gegliedert in Name, Model, Firma, Seriennummer, Inventarnummer der Fachhochschule (FH) und Software-Version.

Name	Model	Firma	Seriennummer	Inventar- nummer (FH)	Software- Version
Qubit Fluorometer	4	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	233226190160 64	-	-
Analysenwaage	XSR105	Mettler Toledo	C016324834	2323360022	-
Inkubator	Heraeus	Kendro Laboratory Products	36117	3006562033	-
Inkubator Infors HAT, Multitron	Multitron Pro	Infors AG	S-000125455	-	-
Arium Water Purification System	Arium pro	Sartorius AG	-	2333966173	-
CFX96 Real-Time System	C1000 Touch	BIO-RAD	788BR07973	2002456884	Bio-Rad CFX Manager 3.1
Mini Plate Spinner	MPS 1000	Labnet	K2122344	2198467285	-
Vortex +Röhrchenaufsatz	VV 3	VWR	S43	-	-
Sterilbank: BioWizard Silver SL-130 Blue Series	Class II	Kojair Tech Oy	029409	2300268468	-
FastPrep -24 (Beater)	6004.3	MP Biomedicals	12021847	2052041543	-
pH Meter	Multi 9620 IDS	Xylem Analytics Germany GmbH	19260084	-	-
CertoClav Labor-Autoklav	CV-EL	Certoclav Sterilizer GmbH	-	-	-
Durchfluss Zytometer: Bactosense	BactoSense	bNovate Technologies	910022	-	-
Elektrophorese Apparatur	-	XCell Consort	-	-	-
FlexCycler <sup>2</sup> Base Unit	2	Biometra GmbH	4131173	2223940801	-
Microplate Reader	Synergy H1	BioTek	-	-	Gen5 3.03

Name	Model	Firma	Seriennummer	Inventar- nummer (FH)	Software- Version
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf	540FQ624961	2226966937	-
Nanodrop Spectro- photometer	ND-1000 UV/Vis	NanoDrop Techno- logies	7861	-	ND-100 V3.8.1

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Materialien gegliedert in Material, Materialnummer / Spezifikation und Hersteller.

Material	Materialnummer / Spezifikation	Hersteller
GoTaq qPCR Master Mix	0000526081	Promega
QIAquick PCR Purification Kit	166013254	Qiagen
extrAXON DNA TISSUE KIT	11003314	Axonlab
Kolbenhubpipetten	-	Eppendorf
Eppendorf Tubes	22110776	Eppendorf
Hard-Shell PCR Plates 96- well, thin wall	64257327	BIO-RAD
Klebefolie (Adhesive Sealing Sheets)	AB-0558	Thermo Scientific
ZymoBIOMICS DNA Mi- niprep Kit	D4300 216689	Zymo Research Corp.
Diverse Primer	-	Mycrosynth AG
Invitrogen Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit	Q33231	Thermo Fisher Scientific
47 mm Filter (Nitrocellulose Membran, 0.22 µm Triton- free MCE)	GSTF04700	Merck Millipore Ltd.
Petrischalen	633181	Greiner bi-one

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Reagenzien gegliedert in Reagenz, CAS-Nummer und Hersteller.

Reagenz	CAS-Nummer	Hersteller
Ethanol 70%	64-17-5	Alcosuisse AG
TAE-Puffer 50X	-	AppliChem GmbH
Standard Nutrient Broth No. 1, Granulated	-	HiMedia Laboratories
Agarose	9012-36-6	Carl Roth GmbH
CuSO <sub>4</sub> [2mM] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [0.3%]	-	FHNW
Agar-Agar, Kobe I	9002-18-0	Carl Roth GmbH
RNA from yeast	63231-63-0	Roche
Peptone from soybean meal	91079-46-8	Sigma-Aldrich
Fleischextrakt	68990-09-0	Carl Roth GmbH
Lachs-Sperma-DNA Natriumsalz	9007-49-2	Carl Roth GmbH
Phosphate Buffered Saline, pH 7.4 (PBS, 0,01 M)	-	Sigma

## 5.2 Ergebnisse und Diskussion

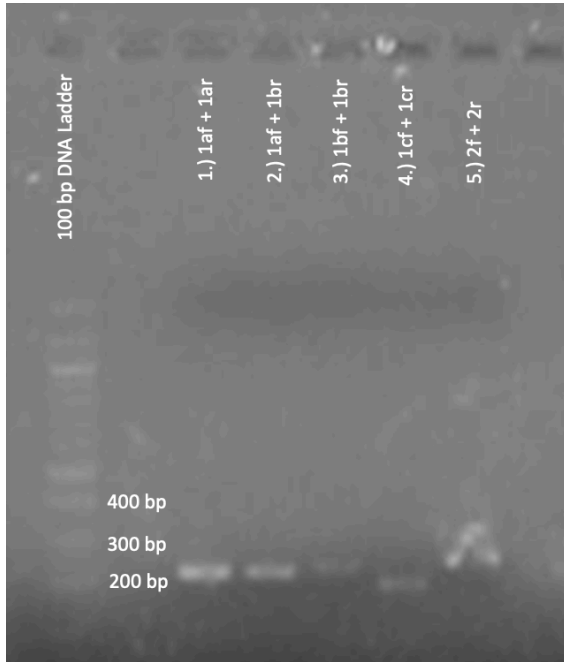


Abbildung 30: 2% Agarosegel an 50 mL nach einer Gelelektrophorese bei 120 V für 45 Minuten. Links ist jeweils die 100 bp grosse DNA Leiter zu sehen, welche alle 100 bp eine Bande produziert. Alle fünf Primerpaare wurden bei einer Annealing Temperaturen von 55°C in der PCR getestet. In die Laschen der Gele wurde 5  $\mu$ L DNA Leiter und jeweils 10  $\mu$ L Probe, welche 1x Loading Dye enthielten, pipettiert. Zu sehen sind die helleren Banden in den Spalten 1, 2 und 5. Alle Banden haben ein Produkt der richtigen Grösse von 200-250 bp ergeben. Die Agarose hatte sich im 2% Gel nicht komplett gelöst ohne Luftblasenbildung, wodurch ein unscharfes Bild entstand. Die Bande in Spalte 5 ist durch eine Luftblase gestört, es ist jedoch immer noch ersichtlich, dass eine helle Bande in der richtigen Produktgrösse entstand.

Tabelle 14: Übersicht der qPCR Resultate der Primertesting gegliedert in Theoretische Kopienzahl in 5  $\mu$ L, Ct Mittelwert der Primer 1af + 1ar und Ct Mittelwert der Primer 2f + 2r. Die Annealing Temperatur dieses qPCR Laufes betrug 57°C. Die theoretischen Kopienzahlen wurden mittels optischer Dichte anhand der Formel 4 berechnet.

Theoretische Kopienzahl in 5 $\mu$ L	Ct Mittelwert der Primer 1af + 1ar	Ct Mittelwert der Primer 2f + 2r
12952342	16.05	16.24
1295234	19.29	19.78
129523	22.85	23.20
12952	26.64	27.47
1295	30.53	31.25
129	34.30	35.39
13	37.33	38.52

Tabelle 15: Übersicht der qPCR Resultate der Primertesting gegliedert in Theoretische Kopienzahl in 5  $\mu$ L, Ct Mittelwert der Primer 1af + 1ar und Ct Mittelwert der Primer 2f + 2r. Die Annealing Temperatur dieses qPCR Laufes betrug 59°C. Die theoretischen Kopienzahlen wurden mittels optischer Dichte anhand der Formel 4 berechnet.

Theoretische Kopienzahl in 5 $\mu$ L	Ct Mittelwert der Primer 1af + 1ar	Ct Mittelwert der Primer 2f + 2r
12952342	15.86	15.82
1295234	19.10	19.49
129523	22.53	23.25
12952	26.34	27.07
1295	29.98	30.73
129	33.71	34.65
13	36.46	37.45

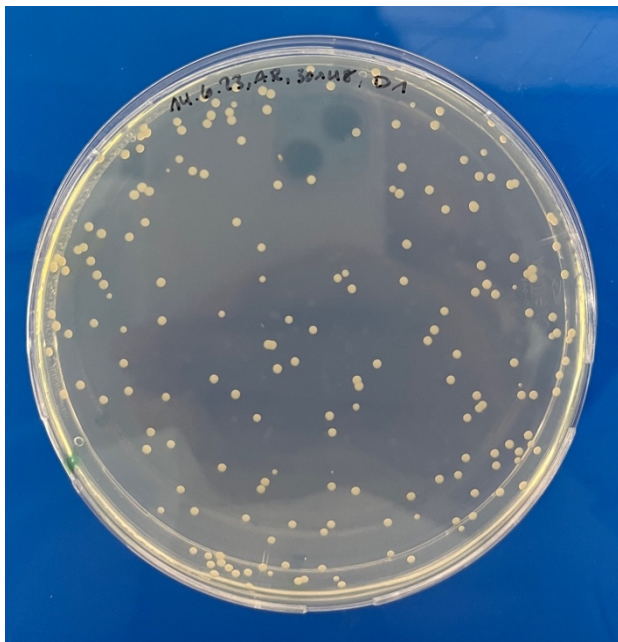


Abbildung 31: Beispiel einer Agarplatte mit ausplattierten Bakterien des *Rhizobium rhizogenes*. Zu sehen sind die gewachsenen Kolonie bildenden Einheiten (KBE) nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C. Die theoretisch berechnete Zellzahl in der ausplattierten Suspension betrug 103 und gezählt wurden 198 KBE. Die Kolonien wiesen konvexe, kreisförmige und glatte Merkmale auf, während die Farbe auf den Nährstoffagarplatten unpigmentiert bis hellbeige war.

## 5.2.1 Ablauf der Detektionsmethode mittels qPCR

### Vakuum Filtration:

- 100 mL Wasserprobe Vakuum filtrieren über 25mm Nitrocellulose Membran Filter (0.22 µm Triton-free MCE)

### DNA Extraktion:

*ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit: DNA for microbiome or metagenome analyses*

- Filter vorsichtig in *ZR BashingBead Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)* mit oberen Seite nach innen stellen
- 750 µL *ZymoBIOMICS Lysis Solution* dazupipettieren und mit dem Vortex Aufsatz 20 Minuten kontinuierlich vortexen (Stufe 4-5 von 6)
- Bei 13'000 g für 1 Minute zentrifugieren
- 400 µL Überstand in ein 1.5 mL Eppendorf Tube überführen
- 50 µL von Lachsspermien DNA [100 µg/mL] mit den 400 µL Überstand mischen
- Diese 450 µL auf die *Zymo-Spin III-F Filter (rot)*, in einem *Collection Tube* platziert, transferieren und bei 8000 g für 1 Minute zentrifugieren. *Säule* wegwerfen
- 1200 µL *ZymoBIOMICS DNA Binding Buffer* zum Filtrat dazu pipettieren und gut mischen
- Davon 825 µL auf eine *Zymo-Spin IICR Column*, in einem *Collection Tube* platziert, pipettieren und bei 10'000 g für 1 Minute zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen und die restlichen 825 µL erneut auf derselben Säule bei 10'000g für 1 Minute zentrifugieren. Durchfluss verwerfen
- 400 µL vom *ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 1* auf die *Zymo-Spin IICR Column*, in einem NEUEN *Collection Tube* platziert, geben und bei 10'000 g für 1 Minute zentrifugieren. Durchfluss verwerfen
- 700 µL vom *ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2* auf die *Zymo-Spin IICR Column* geben und bei 10'000 g für 1 Minute zentrifugieren. Durchfluss verwerfen
- 200 µL vom *ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2* auf die *Zymo-Spin IICR Column* geben und bei 10'000 g für 1 Minute zentrifugieren. Durchfluss verwerfen
- Die *Zymo-Spin IICR Column* in ein sauberes 1.5 mL Eppendorf Tube transferieren und 75 µL (mindestens 50 µL, max 100 µL) *ZymoBIOMICS DNase/RNase Free Water* direkt auf die Matrix der Säule pipettieren und 1 Minute inkubieren. Danach bei 10'000 g für 1 Minute zentrifugieren für das Eluieren

### qPCR:

- DNA Sterilbank reinigen und vorbereiten
- Master-Mastermix herstellen für Anzahl benötigte Wells (Zusammensetzung siehe Tabelle 3)
- Master-Mastermix gut mischen und 20 µL in alle benötigten Wells pipettieren
- 5 µL DNA Template nach Schema dazu pipettieren
- 96-Well Platte mit Klebefolie gut verschliessen (mit Schaber gut andrücken)
- 96-Well Platte kurz spinnen
- In qPCR Gerät stellen und Programm starten (Programm siehe Tabelle 4)
- Daten exportieren:
  - o Threshold auf den, der erstellten Standardreihe setzen
  - o Ct Werte exportieren

- Daten auswerten:
  - Anhand Regressionsgleichung aus der Standardreihe die Kopienzahl berechnen (Berechnung siehe Formel 5)

## 6 Abbildungsverzeichnis

- Titelbild: Eigene Fotografie von zwei Tomatenpflanzen Setzlingen. Die linke Pflanze ist eine Negativkontrolle und die rechte Pflanze wurde mit dem Bakterium *Rhizobium rhizogenes* infiziert. Zu sehen ist, dass die infizierte Pflanze grösser ist als die Negativkontrolle.
- Abbildung 1: Substrat von Gewächshausgemüse überwuchert mit Wurzeln. Zu sehen ist das übermässige vegetative Wachstum, was bis zum Verstopfen von Tropfer führen konnte. Auswirkungen einer Infektion mit dem Pflanzenpathogen, dem Bakterium *Rhizobium rhizogenes*. Bild: ("Crazy roots, hairy roots, crown gall | Koppert Canada," n.d.)
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der durch *Agrobacterium rhizogenes* vermittelten Induktion von Haarwurzeln in Pflanzen unter natürlichen Bedingungen (in vivo). Das Bakterium ist im unteren Bereich dargestellt mit dem enthaltenem Ri-Plasmid. Bild: Gantait and Mukherjee, 2021
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des zellulären Mechanismus der *Agrobacterium rhizogenes* vermittelten Transformation der Wirtszelle (Pflanze). Zu sehen sind die Gene der T-DNA in grüner Farbe dargestellt, welche in das pflanzliche Genom eingebaut und integriert werden. Bild: Gantait and Mukherjee, 2021
- Abbildung 4: Schematische Darstellung des Online-Durchflusszytometer BactoSense. Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der automatisierten Messung: Probenaufbereitung, Färben, Messen, Analysieren, Anzeigen, Abfall und Reinigen. Bild: bNovate Technologies SA
- Abbildung 5: 25 mm Nitrocellulose Membran Filter (0.22  $\mu\text{m}$  Triton-free MCE) nach Vakuum Filtration in die ZR BashingBead Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm) mit oberen Seite nach innen platziert.
- Abbildung 6: 1.5% Agarosegel (2 Gele an je 50 mL) nach einer Gelelektrophorese bei 120 V für 40 Minuten. Zu sehen ist die dunklere Farbe im unteren Bereich der Gele, welche auf das Auslaufen vom Midori Green zurückzuführen ist. Links ist jeweils die 100 bp grosse DNA Leiter zu sehen, welche alle 100 bp eine Bande produziert. Alle drei Primerpaare wurden je bei fünf verschiedenen Annealing Temperaturen in der PCR getestet. In die Laschen der Gele wurde 5  $\mu\text{L}$  DNA Leiter und jeweils 10  $\mu\text{L}$  Probe, welche 1x Loading Dye enthielten, pipetiert. Zu sehen sind die helleren Banden in den Spalten 1-5 und 11-15. Alle Banden haben ein Produkt der richtigen Grösse von 220-240 bp ergeben. Die Annealing Temperaturen bei 57°C und 59°C ergaben die hellsten Banden bei dem Primerpaar 1af + 1ar und beim Primerpaar 2f + 2r schien die Temperatur von 57°C optimal zu sein.
- Abbildung 7: Diagramm des qPCR Laufes mit einer Annealing Temperatur von 57°C mit dem Primerpaar 1af + 1ar. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5  $\mu\text{L}$  Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.6265x + 41.625$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.999. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.89.
- Abbildung 8: Diagramm des qPCR Laufes mit einer Annealing Temperatur von 57°C mit dem Primerpaar 2f + 2r. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5  $\mu\text{L}$  Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.789x + 42.992$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9989. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.84.

- Abbildung 9: Diagramm des qPCR Laufes mit einer Annealing Temperatur von 59°C mit dem Primerpaar 1af + 1ar. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5 µL Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.517x + 40.744$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9988. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.92.
- Abbildung 10: Diagramm des qPCR Laufes mit einer Annealing Temperatur von 59°C mit dem Primerpaar 2f + 2r. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5 µL Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die sieben Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Duplikaten. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.6676x + 42.003$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9988. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.87.
- Abbildung 11: 1.5% Agarosegel an 50 mL nach einer Gelelektrophorese bei 110 V für 40 Minuten. Links ist die 100 bp grosse DNA Leiter zu sehen, welche alle 100 bp eine Bande produziert. Beide Primerpaare wurden bei einer Annealing Temperaturen von 55°C in der PCR getestet. In die Laschen der Gele wurde 5 µL DNA Leiter und jeweils 10 µL Probe, welche 1x Loading Dye enthielten, pipetiert. Zu sehen sind die helleren und dickeren Banden in den Spalten 3 und 4. Alle Banden haben ein Produkt der richtigen Grösse von 829 bp und 765 bp ergeben.
- Abbildung 12: Diagramm der Standardkurve des *virD2* Gens mit den Primern 1af und 1ar bei einer qPCR Annealing Temperatur von 59°C. Auf der x-Achse ist die logarithmische Kopienzahl (pro 5 µL Template) und auf der y-Achse der Ct Wert zu sehen. Die neun Punkte zeigen die Mittelwerte der gemessenen Triplikate. Die gestrichelte Linie zeigt die hinzugefügte Trendlinie. Die Regressionsgleichung war  $y = -3.7468x + 41.305$  und der  $R^2$  Wert betrug 0.9999. Die daraus resultierend berechnete Effizienz betrug 0.85.
- Abbildung 13: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von ultrareinem Wasser. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen.
- Abbildung 14: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Rhizobium rhizogenes*. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 299'810. Die HNAP lag bei 98.06%.
- Abbildung 15: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Rhizobium rhizogenes* nach 24 Stunden. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 304'700. Die HNAP lag bei 95.75%.
- Abbildung 16: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:10'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 493'670. Die HNAP lag bei 99.27%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.

- Abbildung 17: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:100'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 47'030. Die HNAP lag bei 96.7%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak
- Abbildung 18: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:1'000'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 4'830. Die HNAP lag bei 97.93%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.
- Abbildung 19: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:4'000'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 1'990. Die HNAP lag bei 95.98%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.
- Abbildung 20: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS). Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen.
- Abbildung 21: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:10'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 278'090. Die HNAP lag bei 99.69%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.
- Abbildung 22: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:100'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 24'070. Die HNAP lag bei 99.04%. Die Dotplot Diagramme zeigen das Doppelcluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.
- Abbildung 23: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:1'000'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 1'530. Die HNAP lag bei 94.12%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.
- Abbildung 24: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:4'000'000 Verdünnung der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe in PBS. Die ICC Zahl zeigte die gemessene intakte Zellzahl pro mL mit 430. Die HNAP lag bei 95.35%. Die Dotplot Diagramme zeigen ein Cluster des Bakteriums und das Histogramm den dazugehörigen Doppelpeak.
- Abbildung 25: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Rhizobium radiobacter*. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 40'550. Die HNAP lag bei 97.63%.
- Abbildung 26: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Pseudomonas putida*. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 113'950. Die HNAP lag bei 91.65%.

- Abbildung 27: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von der 1:22'500 Verdünnung des *Bacillus subtilis*. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 63'750. Die HNAP lag bei 97.46%.
- Abbildung 28: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von Labor Leitungswasser. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 14'730. Die HNAP lag bei 53.56%.
- Abbildung 29: Zusammenfassung der Durchflusszytometrie Messresultate von Labor Leitungswasser mit zugefügten 1'000 *Rhizobium rhizogenes* pro mL. Zu sehen sind die Dotplot Diagramme mit dem Wasseranalyse Gate oben links und dem Diagramm des side scatter oben rechts. Das dritte Diagramm zeigt ein Histogramm der im Gate gemessenen Punkte. Die ICC Zahl zeigt die im Gate gemessene intakte Zellzahl pro mL Volumen, hier 15'870. Die HNAP lag bei 53.50%.
- Abbildung 30: 2% Agarosegel an 50 mL nach einer Gelelektrophorese bei 120 V für 45 Minuten. Links ist jeweils die 100 bp grosse DNA Leiter zu sehen, welche alle 100 bp eine Bande produziert. Alle fünf Primerpaare wurden bei einer Annealing Temperaturen von 55°C in der PCR getestet. In die Laschen der Gele wurde 5 µL DNA Leiter und jeweils 10 µL Probe, welche 1x Loading Dye enthielten, pipettiert. Zu sehen sind die helleren Banden in den Spalten 1, 2 und 5. Alle Banden haben ein Produkt der richtigen Grösse von 200-250 bp ergeben. Die Agarose hatte sich im 2% Gel nicht komplett gelöst ohne Luftblasenbildung, wodurch ein unscharfes Bild entstand. Die Bande in Spalte 5 ist durch eine Luftblase gestört, es ist jedoch immer noch ersichtlich, dass eine helle Bande in der richtigen Produktgrösse entstand.
- Abbildung 31: Beispiel einer Agarplatte mit ausplattierten Bakterien des *Rhizobium rhizogenes*. Zu sehen sind die gewachsenen Kolonie bildenden Einheiten (KBE) nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C. Die theoretisch berechnete Zellzahl in der ausplattierten Suspension betrug 103 und gezählt wurden 198 KBE. Die Kolonien wiesen konvexe, kreisförmige und glatte Merkmale auf, während die Farbe auf den Nährstoffagarplatten unpigmentiert bis hellbeige war.

## 7 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zusammensetzung für einen 50  $\mu\text{L}$  Endpunkt PCR Ansatz mit Volumenangabe in  $\mu\text{L}$  des BioReady rTaq Kit von BioFlux.
- Tabelle 2: Programm der Endpunkt PCR mit Temperatur in  $^{\circ}\text{C}$ , Dauer und Erklärung des jeweiligen Schrittes und Wiederholung des Zyklus. Anzupassen war die Annealing Temperatur der Primer.
- Tabelle 3: Zusammensetzung eines 25  $\mu\text{L}$  qPCR Ansatzes mit Volumenangabe in  $\mu\text{L}$  des GoTaq qPCR Master Mix Kit von Promega.
- Tabelle 4: Programm für qPCR unterteilt in Schritte, Temperatur in  $^{\circ}\text{C}$ , Dauer in Minuten: Sekunden und Anzahl Zyklen. Nach jedem Zyklus wurde die entstandene Fluoreszenz gemessen und am Ende eine einmalige Schmelzkurve der Proben erstellt. Anzupassen war die Annealing Temperatur der Primer in Schritt 3.
- Tabelle 5: Übersicht der Daten aus der qPCR für die Standardkurve unterteilt in Kopienzahl in  $5\mu\text{L}$ , Kopienzahl logarithmisch und Mittelwert Ct Werte. Die ersten beiden Konzentrationen waren zu hoch und konnten in der qPCR mit dem automatisch auf 1'461.04 gesetzten Threshold (Schwellenwert) nicht detektiert werden.
- Tabelle 6: Übersicht der qPCR Resultate der Spezifitätsüberprüfung gegliedert in Probe, ursprüngliche DNA Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , Ct Wert der 1:100 Verdünnung und Ct Wert der 1:1'000 Verdünnung. Die ersichtlichen Ct Werte sind Mittelwerte der pipettierten Duplikaten. *Rhizobium rhizogenes* diente als Positivkontrolle mit den verwendeten virD2 Primern 1af und 1ar. *Rhizobium radiobacter*, *Pseudomonas putida* und *Bacillus subtilis* waren die drei zu testenden Bakterien. In der Negativkontrolle wurde die Lösung mit der Hefe RNA pipettiert und der Mittelwert der daraus resultierenden Ct Werte betrug 37.72.
- Tabelle 7: Übersicht der Effizienz der DNA Extraktion, gegliedert in Theoretisch berechnete Zellzahl, Mittelwert Ct Werte, Berechnete Kopienzahl aus der qPCR und KBE (Kolonie bildende Einheiten). Die theoretisch berechnete Zellzahl wurde mittels der Formel 4 anhand der optischen Dichte berechnet. Der Mittelwert der Ct Werte wurde anhand von je zwei Mal pipettierten Duplikaten erstellt. Die Kopienzahl aus der qPCR wurde über die Regressionsgleichung der Standardkurve berechnet.
- Tabelle 8: Übersicht der Vakuum Filtration Ergebnisse gegliedert in Bakterien pro 100 mL Leitungswasser, Kopienzahl aus der qPCR und KBE (Kolonie bildende Einheiten). Die zugefügten Bakterien sind wie in Tabelle 7 auch die theoretisch berechneten Zellzahlen über die Formel 4. Die Kopienzahl aus der qPCR sind Ct Mittelwerte und wurden über die Regressionsgleichung der Standardkurve berechnet.
- Tabelle 9: Übersicht der Messresultate aus dem Durchflusszytometer BactoSense der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe mit ultrareinem Wasser gegliedert in Theoretisch berechnete Zellzahl pro mL, Intakte Zellzahl pro mL des BactoSense und Kolonie bildende Einheiten (KBE) pro mL.
- Tabelle 10: Übersicht der Messresultate aus dem Durchflusszytometer BactoSense der *Rhizobium rhizogenes* Verdünnungsreihe mit Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gegliedert in Theoretisch berechnete Zellzahl pro mL, Intakte Zellzahl pro mL des BactoSense und Kolonie bildende Einheiten (KBE) pro mL.
- Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Geräte gegliedert in Name, Model, Firma, Seriennummer, Inventarnummer der Fachhochschule (FH) und Software-Version.
- Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Materialien gegliedert in Material, Materialnummer / Spezifikation und Hersteller.
- Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Reagenzien gegliedert in Reagenz, CAS-Nummer und Hersteller.

- Tabelle 14: Übersicht der qPCR Resultate der Primertesting gegliedert in Theoretische Kopienzahl in 5  $\mu$ L, Ct Mittelwert der Primer 1af + 1ar und Ct Mittelwert der Primer 2f + 2r. Die Annealing Temperatur dieses qPCR Laufes betrug 57°C. Die theoretischen Kopienzahlen wurden mittels optischer Dichte anhand der Formel 4 berechnet.
- Tabelle 15: Übersicht der qPCR Resultate der Primertesting gegliedert in Theoretische Kopienzahl in 5  $\mu$ L, Ct Mittelwert der Primer 1af + 1ar und Ct Mittelwert der Primer 2f + 2r. Die Annealing Temperatur dieses qPCR Laufes betrug 59°C. Die theoretischen Kopienzahlen wurden mittels optischer Dichte anhand der Formel 4 berechnet.

## 8 Glossar

FHNW	Fachhochschule Nordwestschweiz
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ri-Plasmid	<i>root-inducing</i> Plasmid
T-DNA	Transfer DNA
<i>rol</i>	<i>root-locus</i>
<i>vir</i> Gene	<i>virulent genes</i>
Ti-Plasmid	<i>tumor-inducing</i> Plasmid
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
ICC	<i>intact cell count</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
RNA	Ribonukleinsäure
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
RPM	Rotationsgeschwindigkeit
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
OD	Optische Dichte
KBE	Kolonie bildende Einheiten
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
bp	Basenpaar
HNAP	<i>High Nucleic Acid Percentage</i>

## 9 Literaturverzeichnis

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A., 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 37, 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Bosmans, Lien, De Bruijn, I., Gerards, S., Moerkens, R., Van Looveren, L., Wittemans, L., Van Calenberge, B., Paeleman, A., Van Kerckhove, S., De Mot, R., Rozenski, J., Rediers, H., Raaijmakers, J.M., Lievens, B., 2017. Potential for Biocontrol of Hairy Root Disease by a *Paenibacillus* Clade. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Bosmans, L., Moerkens, R., Wittemans, L., De Mot, R., Rediers, H., Lievens, B., 2017. Rhizogenic agrobacteria in hydroponic crops: epidemics, diagnostics and control. *Plant Pathology* 66, 1043–1053. <https://doi.org/10.1111/ppa.12687>
- Bosmans, L., Paeleman, A., Moerkens, R., Wittemans, L., Van Calenberge, B., Van Kerckhove, S., De Mot, R., Rediers, H., Lievens, B., 2016. Development of a qPCR assay for detection and quantification of rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 strains. *Eur J Plant Pathol* 145, 719–730. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0861-6>
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., O'Mahony, J., Coffey, A., 2017. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Danhorn, T., Fuqua, C., 2007. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61, 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- Dias, Rathnayaka, 2018. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in food pathogen detection. *MedCrave, International Journal of Molecular Biology Volume 3*. <https://doi.org/10.15406/ijmboa.2018.03.00066>
- Gantait, S., Mukherjee, E., 2021. Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 35–53. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11017-9>
- Gelvin, S.B., 1990. Crown Gall Disease and Hairy Root Disease 1: A Sledgehammer and a Tackhammer. *Plant Physiology* 92, 281–285. <https://doi.org/10.1104/pp.92.2.281>
- Haas, J.H., Moore, L.W., Ream, W., Manulis, S., 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2879–2884. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2879-2884.1995>
- Hauret, A., Mechouk, C., Khajehnouri, F., Chandramohan Elangko, A., Senouillet, J., Künzi, S., Grasso, L., 2021. Intérêt de la cytométrie en flux en ligne pour le suivi de l'efficacité de la désinfection sur diverses filières de potabilisation – Cas de Lausanne: Interest of online flow cytometry for monitoring the effectiveness of disinfection in various potabilization processes – Case of Lausanne. *TSM* 27–39. <https://doi.org/10.36904/tsm/202101027>
- Ho, J., Nocker, A., Bendinger, B., West, S., Tiehm, A., 2020. TZW-Schriftenreihe-94.pdf.
- Hooykaas, M.J.G., Hooykaas, P.J.J., 2021. The genome sequence of hairy root *Rhizobium* rhizogenes strain LBA9402: Bioinformatics analysis suggests the presence of a new opine system in the agropine Ri plasmid. *MicrobiologyOpen* 10, e1180. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1180>
- Johnson, K.L., Zheng, D., Kaewnum, S., Reid, C.L., Burr, T., 2013. Development of a Magnetic Capture Hybridization Real-Time PCR Assay for Detection of Tumorigenic *Agrobacterium vitis* in Grapevines. *Phytopathology* 103, 633–640. <https://doi.org/10.1094/PHTO-10-12-0267-R>
- Kralik, P., Ricchi, M., 2017. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Lindström, K., Young, J.P.W., 2011. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 3089–3093. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.036913-0>
- Ludeking, D.J.W., Hamelink, R., Wubben, J.P., Wubben, J., Schenk, M.F., 2013. Aanpak van overmatige wortelgroei in vruchtgroentegewassen.

- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A., 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol* 3, 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Suzaki, K., Yoshida, K., Sawada, H., 2004. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *J Gen Plant Pathol* 70, 342–347. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0133-8>
- Weller, Stead, O’neill, Hargreaves, McPherson, 2000a. Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathology* 49, 43–50. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00428.x>