CyanoDetect

Molekularbiologische Charakterisierung von Oberflächengewässern zur Bestimmung der Cyanobakterienkomposition

Ziel

Ziel des Projektes war die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zur Analyse der Cyanobakterienlast in Umweltgewässern. Cyanobakterien (ugs. Blaualgen) stellen Bakterien dar, welche gesundheitsschädliche Toxine bilden und sich häufig in öffentlichen Badegewässern bei steigenden Temperaturen ansiedeln. Zur Prävention der Gewässerqualität sollten quantitative PCR-Analysen angewendet werden. Auf der Grundlage von spezifischen Nukleinsäure (eDNA und RNA) soll eine Identifikation der Cyanobakterien des Gewässers erfolgen. Die eDNA-Analyse erfolgte bei dem kooperierenden Start-Up IdentMe GmbH. Für das Projekt bestand eines der intermediären Ziele in der Etablierung eines Protokolls zur Isolation von RNA aus Reinkulturen und artifiziellen Mischkulturen. Nach der Entwicklung eines geeigneten Assays im Labormaßstab, sollte dieser für die Anwendung auf Umweltproben erweitert werden. Final sollte der RNA-basierte Assay mit der eDNA-basierten qPCR-Analytik verglichen und validiert werden.

Ergebnis

Im Rahmen des Projektes konnte erfolgreich ein qPCR-basierter Nachweis zur Detektion des Cyanobakterienanteils in Gewässern entwickelt werden. Im Vergleich zu herkömmlichen Gewässersichtungen durch Biologen kann mit dieser Methode zeitnah eine quantitative Bestimmung eines Teil des Mikrobioms des Gewässers erfolgen. Somit können präventive Maßnahmen eingesetzt werden, bevor eine starke Toxinbelastung des Gewässers zur Schließung dessen führt.
Für die RNA-Isolation wurden mit Hilfe einer geeigneten Filterkapsel mit spezifischer Porengröße ca. 500 mL Wasser je Probenahmestandort (2-3 pro Gewässer) filtriert. Zur Konservierung des Ist-Zustandes des Gewässers wurden verschiedene Lösungen ausgetestet. Final eignete sich eine herkömmliche Konservierungslösung. In den nachfolgenden Schritten wurden diverse Extraktionskits mit unterschiedlichen Vorgehensweisen ausgetestet, die effizienteste Methode stellte die Aufreinigung der RNA aus einem eDNA-Isolationsprotokoll dar. In den ersten Schritten wurde ein enzymatischer Verdau durchgeführt, aus welchem das Eluat als Target für die spezifische RNA-Isolation mit Hilfe eines standardisierten Protokolls diente.
Zusätzlich wurden Primer- und Sondensequenzen für fünf Organismen (*Synechocystis. species, Arthrospira platensis, Nodularia spaerocarpa, Calothrix sp., Anabaena cylindrica*) auf Grundlage des 16S rRNA- und rpoC1-Gens designt. In fortführenden Versuchen wurden Standardgeraden, Primereffizienzen und quantitative Berechnungen durchgeführt. Nach der erfolgreichen Durchführung der Methoden an Reinkulturen und artifiziellen Mischkulturen, wurden diverse Umweltproben getestet. Im Rahmen des Projektes wurden Badegewässer, Talsperren und wenig besuchte Seen analysiert. Die qPCR-basierten Nachweise wurden auf eDNA- und RNA-Basis durchgeführt und final miteinander verglichen. Anhand der Ergebnisse konnten in 2 von 10 Umweltproben Cyanobakterien (*Synechocystis sp.*) ermittelt werden. Gemäß der Erwartungen war die eDNA-Analyse sensitiver im Vgl. zum RNA-basierten Nachweis.

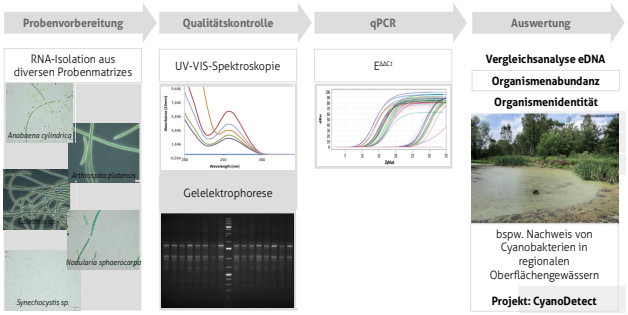

Bild: Workflow des RNA-basierten qPCR-Nachweises

Zusammenfassend konnte eine reproduzierbare, flexibel einsetzbare und zeitnahe Methode zur Untersuchung der Cyanobakterienlast im Umweltgewässern erarbeitet werden. Sowohl auf RNA- als auch auf eDNA-basierter Basis konnten erfolgreich Cyanobakterien in nachweislichen Positivkontrollen detektiert und quantifiziert werden.

Veröffentlichungen

Verband Innovativer Unternehmen e.V. (VIU)
Ausgabe Nr. 2/22-29. Jahrgang, Mai 2022

Förderung

IB-LSA
Europäischer Fonds für regionale Entwicklung (EFRE)
ZS/2022/04/165561
Laufzeit: 04/22 - 12/22