

Molekularbiologische Analyse mikrobieller Gemeinschaften in Talsperrensedimenten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Catrin Bleul

Datum der Verteidigung: 13.09.2004
eingereicht am: 13.02.2004
Gutachter: Prof. Dr. I. Röske
Prof. Dr. M. Göttfert
Prof. Dr. U. Szewzyk

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG	1
I. 1 Talsperresedimente als Untersuchungsobjekte	1
I. 2 Die mikrobiologische Diversität	3
I. 3 Molekulare Identifikation von Mikroorganismen durch vergleichende 16S rDNA Analyse.....	4
I. 4 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft mittels Fingerprinttechniken.....	5
I. 4. 1 Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)	6
I. 4. 2 Der Terminale Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP).....	7
I. 4. 3 Die Automatisierte Ribosomale Intergene Spacer Analyse (ARISA)	8
I. 5 Pathogene Mikroorganismen und Protozoen	9
I. 5. 1 Mykobakterien.....	9
I. 5. 1. 1 Atypische oder nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM).....	10
I. 5. 2 Enterobakterien.....	10
I. 5. 3 Legionellen.....	11
I. 5. 4 Toxoplasmen	12
I. 5. 5 Microsporidien.....	13
I. 5. 6 Giardien.....	14
I. 5. 7 Cryptosporidien	14
II ZIELSETZUNG.....	16
III MATERIAL UND METHODEN.....	17
III. 1 Die Charakteristika der untersuchten Talsperren.....	17
III. 1. 1 Die Talsperre Neunzehnhain I	18
III. 1. 2 Die Talsperre Muldenberg	18
III. 1. 3 Die Talsperre Saidenbach	19
III. 1. 4 Die Talsperre Quitzdorf.....	19
III. 2 Probenahmedaten, Probenahme und Transport.....	20
III. 3 Versuchsschema.....	20
III. 4 Verwendete Geräte, Kitsysteme, Lösungen, Puffer und Nährmedien	22
III. 4. 1 Geräte	22
III. 4. 2 Verwendete Kitsysteme und Fertiglösungen.....	22
III. 4. 3 Lösungen für die Mikroskopie von Protozoen.....	23

III. 4. 4 Puffer und sonstige Lösungen	24
III. 4. 5 Nährmedien	25
III. 5 Nachweismethoden.....	26
III. 5. 1 Kultivierung und Identifikation von Enterobakterien	26
III. 5. 2 Lichtmikroskopischer Nachweis von Cryptosporidien, Giardien und Microsporidien.....	26
III. 5. 2. 1 SAF-Fixierung.....	26
III. 5. 2. 2 Modifizierte Trichrom-Färbung nach Weber zum Nachweis von Microsporidien	27
III. 5. 2. 3 Modifizierte ZIEHL-NEELSEN-Färbung zum Nachweis von Cryptosporidien	27
III. 5. 2. 4 Färbung mit LUGOLscher Lösung zum Nachweis von Giardien.....	27
III. 5. 3 Nachweis von Giardien und Cryptosporidien mittels ELISA	28
III. 6 Molekularbiologische Analyse der Talsperrensedimente	28
III. 6. 1 Zellaufschluss und Extraktion von Nukleinsäuren	28
III. 6. 1. 1 Mechanischer Zellaufschluss und Extraktion von Nukleinsäuren	28
III. 6. 1. 2 DNA-Isolierung durch enzymatisch-mechanischen Aufschluss	28
III. 6. 2 Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR.....	29
III. 6. 2. 1 Primerdesign	30
III. 6. 2. 2 PCR-Protokolle.....	30
III. 6. 2. 3 Primer	33
III. 6. 2. 4 PCR Programme	34
III. 6. 2. 5 Aufreinigen des PCR-Mastermixes	34
III. 6. 2. 6 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese	35
III. 6. 3 Klonierung von PCR-Produkten.....	35
III. 6. 3. 1 Aufreinigung der PCR-Produkte	35
III. 6. 3. 2 Klonierung von PCR-Fragmenten	35
III. 6. 4 Sequenzierung von DNA.....	36
III. 6. 4. 1 Datenbankvergleich der Sequenzen.....	36
III. 6. 4. 2 Analyse der Sequenzhomologien	37
III. 6. 5 Analyse mittels Denaturierender Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)	37
III. 6. 5. 1 Silberfärbung des Polyacrylamidgeles.....	38
III. 6. 6 Analyse mittels Terminalem Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP) .	38
III. 6. 6. 1 Auswertung und graphische Darstellung der T-RFLP Ergebnisse	39
III. 6. 7 Analyse mittels Automatisierter Ribosomaler Intergener Spacer Analyse (ARISA).....	39

IV	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
IV. 1	Die vergleichende 16S rDNA Analyse	40
IV. 1. 1	Untersuchung des DNA-Gehaltes in den Sedimenten	41
IV. 1. 2	Einfluß verschiedener Primersets auf die 16S rDNA-Amplifikation.....	42
IV. 1. 3	Reproduzierbarkeit der Methode, Vergleichende Sequenzanalysen.....	42
IV. 1. 4	Verteilung der phylogenetischen Hauptgruppen von Prokaryoten in den Sedimenten ...	44
IV. 1. 4. 1	Planctomycetales	46
IV. 1. 4. 2	Spirochaetales.....	47
IV. 1. 4. 3	Firmicutes.....	48
IV. 1. 4. 4	Nitrospira	50
IV. 1. 4. 5	Grüne Nicht-Schwefelbakterien (Chloroflexi)	51
IV. 1. 4. 6	Grüne Schwefelbakterien (Chlorobiaceae)	52
IV. 1. 4. 7	Fibrobacter/Acidobacteria	53
IV. 1. 4. 8	CFB	55
IV. 1. 4. 9	Verrucomicrobia	58
IV. 1. 4. 10	Proteobacteria	59
IV. 1. 4. 10. 1	Vergleich zwischen 16S rDNA Analyse und FISH	64
IV. 1. 4. 11	Cyanobacteria	65
IV. 1. 4. 12	Unidentifizierte Bakterien	68
IV. 1. 5	Vergleich der Horizonte von Neunzehnhain und Quitzdorf.....	69
IV. 1. 6	Trophie der Talsperren und vorkommende Spezies	71
IV. 1. 7	Korrelation zwischen den Talsperren	72
IV. 2	Analyse mikrobieller Gemeinschaften mittels Fingerprinttechniken	78
IV. 2. 1	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)	78
IV. 2. 1. 1	Anpassung und Optimierung der DGGE.....	78
IV. 2. 1. 1. 1	Amplifikation von Nukleinsäuren.....	79
IV. 2. 1. 1. 2	Aufreinigung der PCR-Produkte zur Analyse mittels DGGE.....	79
IV. 2. 1. 1. 3	Optimierung der aufzutragenden DNA-Konzentration	79
IV. 2. 1. 1. 4	Optimierung der Acrylamidkonzentration.....	80
IV. 2. 1. 1. 5	Ermittlung der optimalen Konzentration an denaturierendem Reagenz	80
IV. 2. 1. 1. 5	Anpassung der Laufzeit	81
IV. 2. 1. 1. 6	Wahl der geeigneten Silberfärbemethode	81

IV. 2. 1. 2 16S rDNA Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE	82
IV. 2. 1. 2. 1 Herstellung eines Standards für die DGGE-Analyse	82
IV. 2. 1. 2. 2 Vergleichende Untersuchungen der Talsperrensedimente	83
IV. 2. 1. 3 Analyse der sulfatreduzierenden Bakterien auf Grundlage der DSR-Amplifikate ...	85
IV. 2. 1. 3. 1 Entwicklung eines spezifischen Primersystems	85
IV. 2. 1. 3. 2 Identifikation sulfatreduzierender Bakterien durch Sequenzanalyse	91
IV. 2. 2 Der Terminale Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP)	93
IV. 2. 2. 1 Entwicklung einer Software zur Auswertung von T-RFLP Daten (TOAST)	94
IV. 2. 2. 1. 1 Vergleich von RDP-2 und TOAST	95
IV. 2. 2. 2 Analyse der Talsperrensedimente mit der T-RFLP	95
IV. 2. 2. 3 Vergleich der Mikroorganismen in den Sedimenten	98
IV. 2. 2. 4 Die Analyse der sulfatreduzierenden Bakterien mittels T-RFLP	101
IV. 2. 2. 5 Überschätzung der T-RFLP Ergebnisse	103
IV. 2. 3 Die Automatisierte Ribosomale Intergene Spacer Analyse (ARISA)	111
IV. 2. 3. 1 ARISA mit Reinkulturen	105
IV. 2. 3. 2 ARISA mit Sedimentproben	108
IV. 2. 4 Vergleich von DGGE, T-RFLP UND ARISA	110
IV. 3 Funktionelle Gruppen in den Sedimenten	111
IV. 3. 1 Spezifische PCR zum Nachweis von Denitrifikanten und Nitrifikanten	111
IV. 4 Potentiell pathogene Mikroorganismen und Protozoen	115
IV. 4. 1 Der molekularbiologische Nachweis von Mykobakterien	115
IV. 4. 1. 1 Mykobakterien in der Talsperre Saidenbach	116
IV. 4. 1. 2 Mykobakterien in der Talsperre Muldenberg	117
IV. 4. 1. 3 Mykobakterien in der Talsperre Quitzdorf	117
IV. 4. 1. 4 Mykobakterien in der Talsperre Neunzehnhain	118
IV. 4. 1. 5 Mykobakterien im Vergleich der Talsperren	119
IV. 4. 2 Der Nachweis von Enterobakterien	121
IV. 4. 2. 1 Der molekularbiologische Nachweis von Enterobakterien	121
IV. 4. 2. 2 Die Kultivierung und Identifikation von Enterobakterien im Talsperrenvergleich ..	122
IV. 4. 3 Der molekularbiologische Nachweis von Legionellen	125
IV. 4. 4 Nachweis von Protozoen	125
IV. 4. 4. 1 Die Rolle der Protozoen bei der Abwasser- und Trinkwasseraufbereitung	127

IV. 4. 4. 2 Nachweismethoden für Protozoen	127
IV. 4. 4. 2. 1 Lichtmikroskopischer Nachweis.....	128
IV. 4. 4. 2. 2 Der Nachweis von Cryptosporidien und Giardien mittels ELISA	129
IV. 4. 4. 2. 3 Der molekularbiologische Nachweis von Protozoen.....	129
IV. 4. 4. 3 Talsperrensedimente als relevante Protozoen-Reservoirre	130
IV. 5 Abschlussdiskussion: Die molekularbiologische Analyse von Talsperrensedimenten	132
V ZUSAMMENFASSUNG	133
VI LITERATURVERZEICHNIS.....	138
VII ANHANG	157
VIII DANKSAGUNG	162

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Geographische Lage der Talsperren.....	17
Abbildung 2: Angewandte Methoden zur Analyse der Talsperrensedimente.....	21
Abbildung 3: DNA-Gehalt in den Sedimenthorizonten der Talsperren.....	41
Abbildung 4: Vergleich der Resultate zweier unabhängiger 16S rDNA Bibliotheken.....	43
Abbildung 5: Mikrobielle Diversität in den Sedimenten, 0-5 cm.....	45
Abbildung 6: Sequenzen innerhalb der <i>Planctomycetales</i> in den Genbibliotheken.....	46
Abbildung 7: Sequenzen innerhalb der <i>Spirochaetales</i> in den Genbibliotheken.....	48
Abbildung 8: Sequenzen innerhalb der <i>Firmicutes</i> in den Genbibliotheken.....	49
Abbildung 9: Sequenzen innerhalb der <i>Nitrospira</i> in den Genbibliotheken.....	50
Abbildung 10: Sequenzen innerhalb der Grünen Nicht-Schwefelbakterien in den Genbibliotheken.....	51
Abbildung 11: Sequenzen innerhalb der Grünen Schwefelbakterien in den Genbibliotheken.....	53
Abbildung 12: Sequenzen innerhalb der <i>Fibrobacter/Acidobacteria</i> in den Genbibliotheken.....	54
Abbildung 13: Sequenzen innerhalb der CFB in den Genbibliotheken.....	56
13.I Graphische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen.....	57
Abbildung 14: Sequenzen innerhalb der <i>Verrucomicrobia</i> in den Genbibliotheken.....	58
Abbildung 15: Sequenzen innerhalb der <i>Proteobacteria</i> in der Genbibliothek.....	60
15.I Sequenzen der detektierten Vertreter der alpha <i>Proteobacteria</i>	60
15.II Sequenzen der detektierten Vertreter der beta <i>Proteobacteria</i>	61
15.III Sequenzen der detektierten Vertreter der gamma <i>Proteobacteria</i>	62
15.IV Sequenzen der detektierten Vertreter der delta <i>Proteobacteria</i>	63
Abbildung 16: Vergleich der <i>Proteobacteria</i> (16S rDNA Analyse versus <i>in situ</i> Hybridisierung).....	65
Abbildung 17: Dendrogramm mit Vertretern der <i>Cyanobacteria</i> und eingefügte Sequenzen	66
Abbildung 18: Häufigkeit von <i>Microcystis</i> sp. in der 16S rDNA Bibliothek der Talsperre Quitzdorf.....	67
Abbildung 19: Unidentifizierte Bakterien in den Genbibliotheken.....	69
Abbildung 20: Phylogenetische Gruppen in den Horizonten.....	70
Abbildung 21: Zusammenfassung aller detektierter Spezies in den Talsperrensedimenten.....	73
Abbildung 22: Abschätzung der Biodiversität der Talsperrensedimente.....	74
Abbildung 23: Silbergefärbtes DGGE-Gel.....	80

Abbildung 24: Standard aus 16S rDNA-Fragmenten (7%iges Polyacrylamidgel, Gradient 43-60%).....	82
Abbildung 25: DGGE-Bandenmuster (Probenauftrag in Tabelle 6).....	83
Abbildung 26: Partielles Alignment von DSR Sequenzen.....	86
Abbildung 27 Alignment der Sequenzen von Klon Nr. 15 und F1SP-16	88
Abbildung 28 Alignment der Aminosäuresequenzen des Klon Nr. 15 und F1SP-16.....	88
Abbildung 29: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der gefundenen DSR-Sequenzen.....	90
Abbildung 30: PCR-Produkte der α -Untereinheit im DGGE (Probenauftrag in Tabelle 8).....	91
Abbildung 31: Chromatogramme der T-RFLP Analyse, Restriktion mit <i>MspI</i> (rot: Standard).....	95
Abbildung 32: Chromatogramm der T-RFLP Analyse, Restriktion mit <i>RsaI</i> (grau: Standard).....	97
Abbildung 33: Chromatogramm der T-RFLP Analyse, Restriktion mit <i>RsaI</i> (grau: Standard).....	97
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Ähnlichkeiten der mikrobiellen Zusammensetzung.....	100
Abbildung 35: Vergleich der Probenahmen, Horizont 0,5-1 cm.....	100
Abbildung 36: Vergleich der Probenahmen, Horizont 0,5-1 cm.....	101
Abbildung 37: Anstieg der ermittelten mikrobiellen Diversität.....	103
Abbildung 38: Darstellung der 16S-23S rRNA Spacer-Region.....	104
Abbildung 39: Anzahl an Operon-Kopien.....	105
Abbildung 40: Die Spacerlängen weiterer ausgewählter Spezies (grün), Standard (rot).....	107
Abbildung 41: Korrelation zwischen Genomgröße und rRNA-Operon Kopien.....	108
Abbildung 42: Spaceranalyse von Sedimentproben aus der Talsperre Quitzdorf (grün).....	109
Abbildung 43: Denitrifikanten anhand phylogenetischer Gruppen in den Sedimenten.....	113
Abbildung 44: Zusammensetzung der Mykobakterien-16S rDNA-Bibliothek von Neunzehnhain.....	119
Anhang; Abbildung A1 Spacerlängen von Vertretern der <i>Enterobacteriaceae</i>	158
Anhang; Abbildung A2 Cluster 1 bis 3 innerhalb der Familie der Enterobakterien	158
Anhang; Abbildung A3 Spacerlängenbestimmung von <i>Bacillus</i> -Spezies	159
Anhang; Abbildung A4 Spaceranalyse von Sedimentproben aus der Talsperre Saidenbach	161

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Charakteristika der untersuchten Talsperren	17
Tabelle 2: Daten der Probenahmen.....	20
Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer	33
Tabelle 4: Verwendete PCR-Programme	34
Tabelle 5 Anzahl der Sequenztypen und Diversitätsindices	77
Tabelle 6 Probenauftrag in dem Polyacrylamidgel in Abbildung 26.....	84
Tabelle 7 Ergebnis des Datenbankvergleichs	87
Tabelle 8 Probenauftrag im DGGE.....	92
Tabelle 9 Ausschnitt einer Liste aus insgesamt 3311 identifizierten Organismen (Mul 7; 0,5-1 cm) ...	98
Tabelle 10 Ausschnitt einer Liste aus insgesamt 4807 identifizierten Organismen (Neu 5; 0,5-1 cm)	98
Tabelle 11 Ausschnitt einer Liste aus insgesamt 3937 identifizierten Organismen (Sai 6; 0,5-1 cm) ..	99
Tabelle 12 Sulfatreduzierende Mikroorganismen in den Sedimenthorizonten	102
Tabelle 13 Die verwendeten Reinkulturen.....	106
Tabelle 14 Einteilung der Mykobakterien in Risikogruppen (BÖTTGER 1991).....	120
Tabelle 15 Ursachen für die trinkwasserbedingten Ausbrüche durch <i>Giardia lamblia</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> und <i>Toxoplasma gondii</i>	126
Anhang; Tabelle A1 Anzahl detektierter Spacerlängen und Anzahl rRNA-Operons	160

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
A	Adenin
A. bidest.	destilliertes, über Ionenaustauscher gereinigtes und destilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes Wasser
AA	Acrylamid
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Amo, AmoA	Gene der Ammonium Monooxygenase
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat, Ammoniumpersulfat
ARISA	Automatisierte Ribosomale Intergene Spacer Analyse
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
Bakt.	Bakterien
bp	Maßeinheit für Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CFB	<i>Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides</i>
cm	Maßeinheit für Zentimeter
CS	Sorenson Index
d.h.	das heißt
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleotid
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSR	Dissimilatorische Sulfid Reduktase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
etc	et cetera
EU	Europäische Union
e-Value	mathematischer Wert für die Zufälligkeit einer Übereinstimmung
evtl.	eventuell
EW	Einwohner
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
G	Guanin

g	Maßeinheit für Gramm, Erdbeschleunigung
GCG	Genetic Computer Group
GC-Gehalt	Guanin und Cytosin-Gehalt
ggf.	gegebenenfalls
GZZ	Gesamtzellzahl
h	Maßeinheit für Stunde
HGC	Hoch-GC Bakterien
HIV	Human Immunodeficiency Virus (menschliches Immunschwäche-Virus)
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kb	Maßeinheit für Kilobasen
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kJ	Maßeinheit für Kilojoule
km	Maßeinheit für Kilometer
l	Maßeinheit für Liter
LB	Luria-Bertani
μ l	Maßeinheit für Mikroliter
μ m	Maßeinheit für Mikrometer
M	Mol/molar
mA	Maßeinheit für Milliampere
MAIC	<i>M. avium-intracellulare</i> Komplex
MAIS	<i>M. avium-intracellulare-scrofulaceum</i> Komplex
max.	maximal
MCS	Multiple Cloning Site
MDS	Multi-Dimensional Scaling
MDS	Multi-Dimensional Scaling
mg	Maßeinheit für Milligramm
min	Minuten
mm	Maßeinheit für Millimeter
Mul; M	Muldenberg
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Neu; N	Neunzehnhain
ng	Maßeinheit für Nanogramm
Nir	Nitrit Reduktase (Gen)
NirK	Nitrit Reduktase (Gen), Enzym, welches Kupfer enthält
NirS	Nitrit Reduktase (Gen), Enzym, welches Cytochrom cd ₁ enthält
NTM	atypische oder nicht-tuberkulöse Mykobakterien
NY	New York
OTU	operational taxonomic unit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
QIA	Qiagen

Qui; Q	Quitzdorf
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	für RNA kodierende Desoxyribonukleinsäure
RDP-2	Ribosomal Database Project II
RIDOM	Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms
RISA	Ribosomale Intergene Spacer Analyse
ROX	Fluorophor
rRNA	ribosomale Nukleinsäure
rrn-Operone	koordiniert exprimierte Gene der RNA
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
SAF	Sodium acetate, Acetic acid, Formaldehyde
Sai; S	Saidenbach
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sog.	sogenannt
sp.	Spezies
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	1,1,1-Trichlorethan
Temp.	Temperatur
TET	Fluorophor
TM	Trockenmasse
TOAST	T-RFLP Operation Analysis Software Tool
T-RF's	terminale Restriktionsfragmente
T-RFLP	Terminaler Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TS	Talsperre
U	Units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Maßeinheit für Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen/Volumen
VBNC	viable but non culturable
w/v	Masse/Volumen
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

I EINLEITUNG

Die Anforderungen an die Wasserqualität, besonders des Trinkwassers, sind in den letzten Jahren stark angestiegen (WHO-Richtlinie). Die Verfügbarkeit von hygienisch einwandfreiem Trinkwasser ist jedoch für den Großteil der Erdbevölkerung nicht gegeben.

Bereits die Qualität von Rohwasser, welches für die Trinkwassergewinnung genutzt wird, sollte weitestgehend Trinkwasserbeschaffenheit aufweisen. In Sachsen wird Trinkwasser vorrangig aus Oberflächenwasser gewonnen, welches in Talsperren gesammelt wird (außer Nordsachsen einschließlich Riesa und Leipzig). Nach der EU-Wasserrahmenrichtlinie besteht für die Aufbereitung von Oberflächenwasser das Ziel, mindestens mesotrophe, besser oligotrophe Verhältnisse zu erreichen. Das Ziel der Sanierung der Einzugsgebiete besteht daher in der Eliminierung von Eisen und Mangan, Algen, Krankheitserregern und chlorzehrenden Substanzen. Die Verringerung der Laststofffracht in den Wasserkreislauf ist von herausragender Bedeutung. Phosphate können das Wachstum und die Vermehrung der im Wasser vorhandenen Organismen stark fördern und somit zu unerwünschten Massenentwicklungen führen. Durch weitergehende Abwasserbehandlung konnte die Belastung von Talsperren und Seen mit Phosphor- und Stickstoffverbindungen aus punktförmigen Quellen in den letzten Jahren deutlich reduziert werden (RÖSKE 2000).

Das Sediment spielt eine bedeutende Rolle in den biogeochemischen Stoffkreisläufen von Standgewässern. Die Konzentrationen an Nährstoffen, organischem Material und Mikroorganismen ist im Sediment wesentlich höher als im Wasserkörper. Aufgrund der engen und vielseitigen Wechselwirkung mit dem Freiwasser stellen Sedimente eine wesentliche Einflußgröße auf die Qualität des Freiwassers dar. Die Freisetzung gelöster Nährstoffe aus dem Sediment und der Eintrag bzw. die Resuspension von Krankheitserregern spielen eine große Rolle für die Qualität des Wassers für die Trinkwasser- und Badegewässernutzung. Eine wichtige Voraussetzung um den im Wasser enthaltenen potentiell pathogenen Organismen entgegenzuwirken, ist daher eine hinreichende Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft im Gewässersediment. Jedoch gestalten sich molekularbiologische Untersuchungen von Sedimenten aufgrund der aufwendigen Optimierung und Anwendung von mikrobiellen Nachweismethoden oft problematisch und die Anwendung von Kultivierungsmethoden erreicht nur einen geringen Teil der tatsächlich vorkommenden Mikroorganismen und begründen somit die bisher spärlichen Erkenntnisse in diesem Bereich.

I. 1 Talsperrensedimente als Untersuchungsobjekte

Sachsen verfügt über 25 Trinkwassertalsperren, wovon die Hälfte nicht die gewünschte Wasserqualität aufweisen. Fünf dieser Talsperren sind eu- bis hocheutroph, acht Talsperren sind versauert (ULRICH 1998). In dieser Arbeit wurde das Sediment von vier Talsperren unterschiedlicher Trophie untersucht, um vergleichende Analysen durchzuführen (Charakterisierung der Talsperren im Teil Material und Methoden). Die Talsperren unterscheiden sich vor allem in der Nutzung ihrer Einzugsgebiete und damit im pH-Wert, Phosphatgehalt, Sichttiefe und der Geologie. Eine hohe Besiedlungsdichte, eine landwirtschaftliche Nutzung der Einzugsgebiete sowie die Erosion durch starke Regenfälle und Zuflüsse können die Wassergüte beeinflussen. Die Versickerung und die Sedimentation, besonders im

Stauwurzelbereich, sollte gefördert werden. Neben der Struktur des Einzugsgebietes besitzt auch die Morphometrie des Gewässers einen Einfluß auf die Wassergüte. Die Wasserbeschaffenheit stehender Gewässer ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl physikalischer (u.a. Temperatur, Wind, Niederschlag), chemischer (u.a. pH-Wert, Redoxpotential, Phosphat, Nitrat, Metallionenkonzentration) und biologischer Komponenten.

Bei der Tiefenwasserentnahme wird im Wasserkörper der Talsperre eine Senkung des Hypolimnionvolumens bewirkt, wodurch das Sediment mit wärmeren Wassermassen aus dem Epilimnion in Wechselwirkung tritt. Aufgrund der Volumenverkleinerung des Hypolimnions wird das Sediment von internen stehenden Wellen sowie anderen Turbulenzen beeinflusst und die mikrobiellen Abbauprozesse wie auch die Rücklösung aus dem Sediment werden intensiviert (ULRICH 1998).

Der Stoffaustausch erfolgt zwischen Sediment und Wasserkörper über die gelöste Phase (Sonderfall: Sediment-Resuspension). Die Mobilisierung der partikulären Stoffe geschieht durch hydrodynamische Prozesse. Die eigentliche Freisetzung aus dem Porenwasser wird durch physikalische (Diffusion, Turbulenz) und biologische Transportmechanismen hervorgerufen (ULRICH 1998).

Hervorgerufen durch die Dichteanomalie des Wassers kommt es im Verlauf eines Jahres in den meisten Talsperren abwechselnd zu Stagnations- und Zirkulationsphasen. Für die Stagnationsphasen sind vertikale Konzentrationsgradienten typisch. In den Zirkulationsphasen erfolgt dagegen eine gleichmäßige Verteilung der gelösten Stoffe. In der Sommerstagnationsperiode findet in den oberen Gewässerschichten die photosynthetische Produktion von Biomasse aus anorganischen Stoffen wie Wasser, Kohlendioxid, Nitrat und Phosphat statt. Dies führt zu einer O₂-Anreicherung in den oberen Wasserschichten. Infolge der ausgeprägten Temperatursprungschicht gelangt der Sauerstoff aber nicht in die tiefer gelegenen Wasserschichten. In diesen überwiegen Mineralisierungsprozesse, bei denen unter Sauerstoffverbrauch ein Abbau organischer Stoffe erfolgt. Durch die stark behinderte O₂-Zufuhr kommt es im Sediment zur Ausbildung eines steilen Redoxgradienten und es lassen sich verstärkt reduzierende Verbindungen wie Ammonium, Schwefelwasserstoff oder Methan nachweisen.

Die mikrobielle Aktivität ist im Sediment um ein Vielfaches höher als im Freiwasser. Daher kommt dem Sediment eine besondere Bedeutung im Mineralisationsprozeß zu. Die Bakterienzahl, auch anaerober Bakterien, nimmt mit zunehmender Tiefe im Sediment rasch ab. Bei hohem Gehalt organischen Materials ist Sauerstoff nur an der Sedimentoberfläche verfügbar, nach unten schichten sich sequentiell Nitratreduktion, Eisenreduktion, Sulfatreduktion und Methanbildung. Viele Verbindungen (Lignin, Karotinoide, aliphatische und polyzyklische Kohlenwasserstoffe) werden unter Sauerstoffausschluss nur noch unvollständig oder gar nicht abgebaut (HOCH 1999).

Während eine verfeinerte chemische Analytik in den vergangenen Jahren eine Vielzahl neuer Erkenntnisse über Stofffluxe ermöglicht hat, ist die Zuordnung der Stoffwechseleinstellungen zu den vorhandenen Bakterienpopulationen in Sedimenten bislang in einem Anfangsstadium, gibt es kaum Kenntnisse der physiologischen Eigenschaften von Vertretern phylogenetischer Gruppen. Viele Bakterien aus Sedimenten wurden erst in den letzten Jahren kultiviert und damit einer Untersuchung zugänglich gemacht, jedoch besteht noch ein enormer Kultivierungsbedarf. Über ihre Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen und unbelebten Sedimentstrukturen (Oberflächen, kolloide Polymere etc.) sind nahezu keine Kenntnisse vorhanden (HOCH 1999).

Die Bedeutung der im Sediment vorkommenden Mikroorganismen beschränkt sich aber nicht nur auf ihre Beteiligung am Stoffhaushalt der Gewässer. Das Vorkommen obligat oder fakultativ pathogener Bakterien oder Protozoen im Sediment stellt aufgrund des Risikos einer Resuspension eine potentielle Gesundheitsgefährdung dar. Vor allem für immungeschwächte Personen kann der Konsum von kontaminiertem Trinkwasser oder die Nutzung von Badegewässern, die mit fakultativ pathogenen Erregern kontaminiert sind, ein Gesundheitsrisiko darstellen. Aus diesen Gründen ist die Untersuchung des Einflusses der Sedimente auf die mikrobielle Wasserbeschaffenheit für die Trinkwasser- und Badegewässernutzung von großer Bedeutung. Als mögliche in Sedimenten vorkommende Krankheitserreger spielen Enterobakterien, Legionellen und Mykobakterien sowie pathogene Protozoen wie Giardien, Cryptosporidien, Microsporidien oder Toxoplasmen eine große Rolle. Um das Infektionsrisiko für prädisponierte Risikogruppen abschätzen zu können, stellen Untersuchungen des Sedimentes im Hinblick auf das Vorkommen dieser pathogenen Mikroorganismen eine wichtige Voraussetzung dar.

Neben den autochthonen Gewässerbakterien werden viele im Sediment vorhandene Bakterien aus den entsprechenden Einzugsgebieten z.B. durch Zuflüsse oder durch Abspülung der umliegenden Flächen in die Talsperre eingetragen. Bakterien und Protozoen können absinken und sich im Sediment anreichern.

Das Talsperrensediment besitzt als „Sedimentationsfalle“ und Reservoir für zugeführte organische Substanzen größte Umweltrelevanz. Das Sediment stellt das „Gedächtnis“ des Gewässers dar, sodass noch Jahre nach Beendigung einer Einleitung von Schadstoffen das Risiko einer plötzlichen Belastung durch freigesetzte Schwebstoffe existiert, zum Beispiel bei Hochwasserereignissen.

Die Untersuchung der aeroben Sedimentoberfläche wie auch anaerober Bereiche ist umweltbiotechnologisch von größtem Interesse. Als Habitat für Organismen mit verschiedensten Degradationsfähigkeiten bietet das Sediment ein umfangreiches Depot für Isolate zur Anwendung im Bioreaktor oder bei *in situ* Maßnahmen der Altlastensanierung. Die Strukturanalyse des Sedimentes ist von allgemeinem Interesse, da es als „natürliches Modell“ eines offenen degradierenden Ökosystems einschließlich seinen Lebensgemeinschaften und Populationen angesehen werden kann.

I. 2 Die mikrobiologische Diversität

Derzeit sind nur ca. 5000 prokaryotische Spezies charakterisiert (SCHLEIFER 2000). Diese geringe Anzahl an Spezies wird dadurch begründet, dass die Beschreibung neuer Spezies fast ausschließlich auf Reinkulturen beruht, welche mit klassischen Kultivierungsverfahren isoliert wurden. Mit Hilfe der Isolierungsverfahren lässt sich aber nur ein Bruchteil der in der Natur vorhandenen Prokaryoten anzüchten, da Kultivierungsbedingungen selektiv bestimmte Gruppen bevorzugen oder diskriminieren. Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass bis heute nur ca. 1 bis 10% der tatsächlich in der Natur vorkommenden Bakterien durch Kultivierung erfasst wurden.

In den letzten achtzehn Jahren wurden molekularbiologische Methoden entwickelt, die eine kultivierungsunabhängige Identifizierung der Mikroorganismen erlauben (AMANN 1995). Durch die vergleichende Sequenzanalyse informativer Makromoleküle, hier vor allem des Gens der 16S rRNA können Stammbäume der Lebewesen rekonstruiert werden (LUDWIG und SCHLEIFER 1999).

Basierend auf den konservierten und variablen Sequenzabschnitten innerhalb des rRNA-Moleküls können Primersysteme und Sonden unterschiedlicher Spezifität zielgerecht entworfen werden. Untersuchungen in komplexen Umweltproben zeigten, dass der größte Teil der analysierten 16S rDNA-Sequenzen ausschließlich auf Sequenzen von bisher unkultivierten Bakterien basiert (HUGENHOLTZ 1998). Mit molekularbiologischen Methoden ist es möglich, die tatsächliche mikrobielle Vielfalt aufzuklären. Aussagen über die Funktion der nachgewiesenen Organismen im Ökosystem können allerdings nicht getroffen werden, da die phylogenetische Verwandtschaft nur selten einen Hinweis auf gemeinsame physiologische Eigenschaften zulässt (SCHLEIFER 2000). Die Isolierung, Klonierung und anschließende Sequenzierung sowie Expression größerer DNA-Bereiche oder gesamter Genome von heute noch nicht kultivierten Bakterien werden zukünftig die Kenntnisse über deren Funktion und physiologische Fähigkeiten erheblich erweitern.

Zur Analyse der mikrobiellen Diversität können verschiedene molekularbiologische Techniken eingesetzt werden. Die heute am häufigsten verwendeten Methoden sind die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH), die Erstellung von 16S rRNA Gen-Bibliotheken sowie Fingerprinttechniken, z.B. die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE), der Terminale Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP) oder die Automatisierte Ribosomale Intergene Spacer Analyse (ARISA). Zur Untersuchung der Talsperresedimente wurden diese Techniken und weiterhin klassische mikrobiologische Verfahren angewendet.

I. 3 Molekulare Identifikation von Mikroorganismen durch vergleichende 16S rDNA Analyse

Es ist bekannt, dass Bakterien unter subletalem Stress, z.B. bei Änderung des osmotischen Milieus, niedrigen Temperaturen oder Nährstoffmangel, in einen Zustand übergehen können, in welchem sie zwar lebensfähig, aber nicht mehr vermehrungsfähig sind (McKAY 1992). Dieser VBNC-Zustand (viable but non culturable) stellt eine Überlebensstrategie dar und ist die Antwort auf Stressfaktoren oder veränderte Umweltbedingungen. Der primäre Faktor scheint dabei die Nährstofflimitierung zu sein. Bekannt ist diese Anpassung z.B. für *Legionella pneumophila*, *Campylobacter spp.*, *Vibrio spp.*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis* und *Shigella spp.* Der Wechsel von einem Zustand in den anderen ist oft mit Veränderungen in Morphologie und Genexpression verbunden (McKAY 1992). Die Diskussion besteht darüber, ob es sich bei den unkultivierten Organismen um die im VBNC-Zustand vorliegenden Bakterien handelt. Das Wissen um diese Überlebensstrategien der Bakterien unterstreicht die Wichtigkeit von kulturunabhängigen Techniken zur mikrobiellen Analyse komplexer Ökosysteme.

Mit Hilfe der Analyse der ribosomalen RNA lassen sich Organismen auf molekularer Ebene identifizieren und phylogenetisch charakterisieren. Die ribosomale RNA bildet zusammen mit ribosomalen Proteinen die Ribosomen. Laut OLLAR (1999) repräsentiert die rRNA mehr als 98% der Gesamt-RNA. Die kleine Untereinheit der Ribosomen enthält die 16S rRNA, während die 23S rRNA und die 5S rRNA Bestandteile der großen Untereinheit in Prokaryoten darstellen. Die meisten phylogenetischen Untersuchungen konzentrieren sich auf die 16S rRNA (ca. 1540 Nukleotide) bzw. ihre kodierenden Gene, da die relativ kurze 5S rRNA zu wenig Informationen enthält und die 23S rRNA

experimentell schwerer zugänglich ist. Die ribosomale RNA ist ein phylogenetisch altes Molekül und in allen Zellen enthalten. Als Bestandteil der Ribosomen, die eine Schlüsselfunktion im Stoffwechsel einnehmen, besitzt die rRNA eine hohe evolutionäre Stabilität durch funktionelle Konservierung und eine hohe Kopienzahl (FRANZEN 1999). Die Eigenschaften der ribosomalen RNA erlauben die phylogenetische Analyse eines breiten Spektrums von Mikroorganismen von den großen Hauptdomänen bis zur Speziesebene. Die verschiedenen Sequenzbereiche der ribosomalen RNA erlauben die Ableitung von Amplifikationsprimern und Sonden unterschiedlichster phylogenetischer Spezifität, mit denen sich definierte Organismengruppen erfassen lassen. Über die in allen *Eubacteria* identischen, konservierten Sequenzbereiche lassen sich beispielsweise die 16S rRNA-Gene aller Bakterien amplifizieren, auch solche bisher unbekannter, nicht kultivierter Bakterienspezies (BÖTTGER 1995). Die Sequenzanalyse der variablen, speziesspezifischen Sequenzbereiche, welche zwischen den konservierten Bereichen lokalisiert sind, ermöglicht die Identifizierung und phylogenetische Charakterisierung von Spezies (NEEFS 1993).

Zunehmend wird die vergleichende 16S rDNA Analyse zur Untersuchung der Diversität und der phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb komplexer mikrobieller Ökosysteme verwendet (KUHLMANN 2000, MARCHESI 1998). Vermittelt durch die phylogenetische Spezifität der verwendeten Amplifikationsprimer wird in diesem Ansatz die 16S rDNA der entsprechenden phylogenetischen Gruppen amplifiziert und kloniert. Die so erhaltenen 16S rDNA-Bibliotheken repräsentieren das durch die Primer vorgegebene Spektrum an Bakterien im untersuchten Ökosystem. Die Methode der vergleichenden 16S rDNA Analyse ermöglicht damit eine sichere Identifizierung und phylogenetische Einordnung von Organismen und die taxonomische Charakterisierung neuer, bisher unbekannter Spezies.

I. 4 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft mittels Fingerprinttechniken

Molekulare Fingerprinttechniken erlauben einen Einblick in die mikrobielle Diversität und sind hervorragend geeignet zum Vergleich von verschiedenen Proben (z.B. Vergleich von Gewässern, Vergleich von Vertikalserien, Zeitreihen).

Fingerprinttechniken stellen Methoden zur Charakterisierung von Nukleinsäuren oder anderen Biomolekülen dar, bei denen chemische Hydrolysate oder enzymatische Restriktionsprodukte elektrophoretisch oder chromatographisch aufgetrennt werden. Daraus resultieren spezifische Muster, welche indikativ für die untersuchte Probe stehen.

Insbesondere bei der Untersuchung einer hohen Probenanzahl bietet sich die Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften über genetische Fingerabdrücke an. Das Screening vieler verschiedener Proben auf eine gleiche oder unterschiedliche strukturelle Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft kann durch Anwendung solcher Fingerprinttechniken erfolgen.

I. 4. 1 Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Die Technik der DGGE beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von PCR-Produkten gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz in einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit linearem Formamid/Harnstoff- Gradienten (HEUER 1997). Das unterschiedliche Schmelzverhalten doppelsträngiger DNA-Fragmente basiert auf differierenden GC-Gehalten, es ist direkt sequenzabhängig. Dadurch besitzen die Sequenzen in einem Gradienten eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Durch die Auftrennung können auch Fragmente sehr nahe verwandter Organismen, welche sich nur in einigen Basen unterscheiden, differenziert werden (MUYZER 1993). Mit der DGGE werden Fingerprint-Muster erzeugt, bei denen je nach Komplexität der Proben eine Vielzahl von Banden zu erkennen sind. Im Idealfall steht jede Bande für eine Spezies. Bei Verwendung von universellen 16S rDNA Primersystemen sollte es möglich sein, durch den Vergleich der entstehenden Bandenmuster im DGGE direkte Rückschlüsse auf die mikrobielle Diversität in Abhängigkeit von räumlichen und zeitlichen Varianzen zu ziehen (MUYZER 1999). Die Identifizierung der Organismen, welche sich hinter den Banden verbergen, erfordert in weiterführenden Analysen die Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Gel, die Reamplifikation und Sequenzierung, möglicherweise auch die Klonierung.

Für eine funktionelle Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft ist es möglich, die Gene katalysierender Schlüsselenzyme für Stoffwechsellösungen (Nitrifikation, Denitrifikation oder Sulfatreduktion) zu amplifizieren und in der DGGE aufzutrennen (WAWER 1995). In Verbindung mit ermittelten Stoffumsätzen können detaillierte Informationen zu den Stoffkreisläufen im Sediment erzielt werden.

Mit der DGGE wurden die Sedimente in dieser Arbeit neben der 16S rDNA Analyse vorwiegend auf sulfatreduzierende Mikroorganismen untersucht. Die Sulfatreduktion ist innerhalb verschiedener phylogenetischer Gruppen weit verbreitet und im Sediment von großer Bedeutung bei der Mineralisation organischer Materialien. Die Sulfatreduktion verläuft unter obligat anaeroben Bedingungen ausgehend von Sulfat, über aktiviertes Sulfat und Sulfit zu Schwefelwasserstoff als Endprodukt. An der Reduktion von Sulfat sind mehrere Enzyme beteiligt: die ATP Sulfurylase, APS Reduktase und Sulfit Reduktase. Entsprechend der Verbreitung der Sulfatreduktion im Reich der Bakterien ist zu vermuten, dass sowohl durch Gentransfer als auch durch Mutationen die Konservierung der Gene unterschiedlich ausgeprägt ist, bzw. sich viele Isoenzyme entwickelt haben könnten. Aufgrund der starken Konservierung ist die dissimilatorische Sulfitreduktase das am besten geeignete Gen zum Nachweis sulfatreduzierender Mikroorganismen (KLEIN 2001).

In einer umfassenden Charakterisierung von Sedimenten ist die Analyse von funktionellen Genen besonders wichtig und gleichzeitig Voraussetzung für Aussagen über die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft.

I. 4. 2 Der Terminale Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP)

Eine weitere Methode zur Analyse der mikrobiellen Diversität komplexer Ökosysteme stellt die T-RFLP dar (DUNBAR 2000). Nach universeller 16S rDNA-PCR (in dieser Arbeit), bei der ein Primer eine Fluoreszenzmarkierung trägt, werden in der T-RFLP durch das Einwirken häufig schneidender tetramerer Restriktionsenzyme Fragmente unterschiedlicher Länge erzeugt. Die Restriktionsenzyme schneiden selektiv, indem eine definierte Sequenz (meist ein Palindrom) im DNA-Doppelstrang erkannt wird. Die im Ansatz vorhandenen Sequenzen besitzen Schnittstellen an unterschiedlichen Positionen, demnach entstehen unterschiedlich lange Fragmente. Die Restriktionsfragmente werden in einer Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrer Länge separiert. Bei der Verwendung eines automatischen Sequenziergerätes werden ausschließlich die fluoreszenzmarkierten terminalen Restriktionsfragmente (T-RF's) detektiert. Eine Basenpaar-genaue Bestimmung der Fragmentlänge wird durch einen internen Längenstandard erreicht. Damit wird eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt und zahlreiche Proben können parallel bearbeitet und verglichen werden (MARSH 1999).

Die Auswertung der Fragmentmuster und Identifizierung der Mikroorganismen erfolgt durch kombinatorische Suche der ermittelten Fragmentlängen. Die Länge eines T-RF ist spezifisch für die Sequenz und somit für einzelne Spezies oder Gattungen. Allerdings ist es aufgrund der konservierten Bereiche der 16S rDNA meist nicht möglich, bei Anwendung von nur einem Restriktionsenzym einzelne Bakterienspezies zu unterscheiden. Meist weisen die Vertreter innerhalb phylogenetischer Gruppen für ein bestimmtes Restriktionsenzym eine identische Fragmentlänge auf, was die Auflösung dieser Methode stark limitiert. Durch Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme ist es möglich, auch von ähnlichen 16S rDNA Sequenzen unterschiedlich lange Fragmente zu erhalten und die Organismen zu identifizieren. Bei sehr eng verwandten Bakterienspezies, welche nahezu identische 16S rDNA Sequenzen aufweisen, ist jedoch auch beim Einsatz von mehreren Restriktionsenzymen eine Differenzierung der Spezies nicht in jedem Fall möglich (DUNBAR 2000, MARSH 1999).

Die T-RFLP Analyse kann neben der Aufklärung komplexer Lebensgemeinschaften in natürlichen Ökosystemen auch für zahlreiche weitere Fragestellungen angewendet werden. Insbesondere bei der Bearbeitung und dem Vergleich einer hohen Probenanzahl in Routineprozessen erweist sich die Methode als schnell und zuverlässig. Beispielsweise liegen weitere Anwendungsgebiete in der Produktkontrolle von Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie, im Monitoring des Abbaus bzw. der Oxidation von Abwässern, in der biologischen Bodensanierung oder in der Kontaminationsüberwachung verschiedenster Bioreaktoren (LÜDEMANN 2000).

I. 4. 3 Die Automatisierte Ribosomale Intergene Spacer Analyse (ARISA)

Die intergene Spacer-Region zwischen der 16S und 23S rRNA zeigt signifikante Heterogenitäten in Länge und Sequenz bei verschiedenen Spezies. Diese Eigenschaften werden genutzt, um auch sehr nahe verwandte Spezies zu differenzieren. Die Variationen beruhen auf dem Vorhandensein von verschiedenen funktionellen Einheiten innerhalb der Spacer-Region, z.B. tRNA Gene, welche in den meisten Organismen mit einer Anzahl von ein bis zwei pro Spacer vorkommen (GÜRTLER 1996). Andere funktionelle Einheiten in der Spacer-Region beinhalten Erkennungsstellen für Enzyme, z.B. Ribonuklease III (BRAM 1980), welche in die Prozessierung zum reifen Ribosom involviert ist. Aufgrund der geringeren evolutionären Stabilität der Spacer-Region wird mit dieser Methode eine Differenzierung auch sehr nahe verwandter Organismen erwartet.

Die ARISA erlaubt eine Abschätzung der mikrobiellen Diversität. Es ist eine automatisierte Methode, abgeleitet von der RISA (Ribosomale Intergene Spacer Analyse). Die RISA stellt eine Methode der kulturunabhängigen, mikrobiellen Gemeinschaftsanalyse dar und wurde ursprünglich zum Vergleich der Diversität in Böden (Rhizosphäre) und zur Darstellung der Diversität in marinen Habitaten genutzt (FISHER 1999). Basierend auf der extrahierten Gesamt-DNA erfolgt in der RISA die Amplifikation der intergenen Region zwischen der 16S und der 23S rRNA mittels Oligonukleotiden, welche an konservierte Bereiche der 16S bzw. der 23S rRNA binden. Durch die Längenheterogenitäten entstehen in der PCR verschieden lange Fragmente, welche elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt werden. Das Resultat ist ein komplexes Bandenmuster, welches ein spezifisches Profil der bakteriellen Gemeinschaft darstellt. Obwohl die RISA eine relativ schnelle Methode zur Abschätzung der mikrobiellen Gemeinschaft darstellt, ist die Anwendung von Polyacrylamidgelen mit anschließender Silberfärbung sehr zeitintensiv, weiterhin werden große Mengen an PCR-Produkt benötigt, um Banden im Gel zu erhalten. Diese Limitierungen bewirkten die Weiterentwicklung der Methode zu einer automatisierten, verbesserten Version, der ARISA. Im automatisierten Ansatz wird ein fluoreszenzmarkierter Primer (Reverse-Primer) eingesetzt, wodurch die erzeugten Fragmente am 3'-Ende eine Fluoreszenzmarkierung erhalten. Die Elektrophorese wird mit einem automatisierten System durchgeführt, wobei ein Laser die Fluoreszenzmarkierung der Fragmente detektiert und die Fragmentlängen eindeutig determiniert werden können (FISHER 1999).

In der vorliegenden Arbeit sollte die ARISA durch Differenzierung von Reinkulturen angepasst und optimiert werden und zur Analyse der mikrobiellen Diversität der Talsperrensedimente eingesetzt werden.

I. 5 Pathogene Mikroorganismen und Protozoen

Die geringe Versickerung, mögliche Siedlungsabwässer, das Vorhandensein von Stallanlagen und Viehweiden deuten stark auf das Vorkommen von Parasiten und anderen pathogenen Erregern in den Talsperren hin. Weiterhin spielt der Oberflächenabfluss in den Einzugsgebieten der Talsperren eine beherrschende Rolle. Das Sediment stellt ein Sammelbecken von Keimen und Parasiten dar und läßt Rückschlüsse auf Einleitungen der letzten Jahre zu. Aus diesen Gründen wurden die Talsperrensedimente auf das Vorkommen von potentiell pathogenen Erregern (Mykobakterien, Legionellen, Enterobakterien, Giardien, Cryptosporidien, Microsporidien und Toxoplasmen) untersucht. Mykobakterien und Legionellen sind an wässrige Habitate angepasst. Enterobakterien gelangen durch fäkale Verunreinigungen in die Gewässer. Diese Bakteriengruppen enthalten sowohl obligat als auch fakultativ pathogene Vertreter. Darüber hinaus stellen pathogene Protozoen wie Giardien, Cryptosporidien, Microsporidien oder Toxoplasmen im Wasser ein Gesundheitsrisiko besonders für abwehrgeschwächte Personen dar.

I. 5. 1 Mykobakterien

Die Familie der *Mycobacteriaceae* umfasst gram-positive, aerobe bis mikroaerophile, Katalase positive, säurefeste, unbewegliche Bakterien. Mykobakterien sind ubiquitär verbreitete und lange lebensfähige Stäbchen mit einer Größe von $0,2-0,6 \mu\text{m} \times 1,0-10 \mu\text{m}$ (WEBER 1997). Aufgrund der komplexen Zellwandstruktur lassen sich die Organismen nur schwer lysieren (BÖDDINGHAUS 1990). Das Genom der Mykobakterien hat eine Größe von $2,2 \times 10^9$ Da bis $4,5 \times 10^9$ Da, bzw. 4×10^6 bp (OLLAR 1999). Der GC-Gehalt beträgt zwischen 64% und 70%. Mykobakterien werden in die Gruppe der gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt eingeordnet.

Die Gattung *Mycobacterium* umfasst den *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex, Lepra-Bakterien und atypische Mykobakterien. Den größten Anteil der bekannten Mykobakterien stellen atypische, ubiquitär vorkommende, saprophytäre Umweltkeime dar (KAYSER 1998). Diese saprophytären Mykobakterien sind natürlicherweise in Mooren, feuchten Böden und im Wasser nachweisbar (JENKINS 1992). Als Teil der mikrobiellen Normalflora des Menschen sind Mykobakterien im oberen Respirationstrakt, dem Genitaltrakt und auf der Haut nachweisbar.

Klassische Nachweismethoden zur Identifikation von Mykobakterien sind Kulturmerkmale, Pigmentproduktion, O_2 -Ansprüche, biochemische Tests (Sulfatase-, Katalase-Aktivität, Tellurit-Reduktion, Tween 80-Hydrolyse) und Resistenztestung gegenüber verschiedenen Antibiotika (Pyrazinamide, Cycloserine) (JENKINS 1992). Weiterhin erfolgt die Identifikation vieler umweltrelevanter Mykobakterien mittels Dünnschichtchromatographie aufgrund ihres Lipidgehalts (JENKINS 1992). In jüngerer Zeit finden moderne molekularbiologische Techniken wie die 16S rDNA Analyse, Gensonden, RFLP sowie die gaschromatographische Gesamtzellfettsäureanalyse mehr und mehr Anwendung.

I. 5. 1. 1 Atypische oder nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM)

In die Gruppe der nicht-tuberkulösen oder atypischen Mykobakterien werden beispielsweise *Mycobacterium avium* oder *M. intracellulare* eingeordnet (MAIC = *M. avium-intracellulare* Komplex oder MAIS = *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* Komplex). Die meisten atypischen Mykobakterien sind apathogen. Fakultativ pathogene Spezies können chronische Mykobakteriosen beim Menschen verursachen, diese sind allerdings selten.

Die Übertragung atypischer Mykobakterien aus der Umwelt auf den Menschen kann durch verschiedene Quellen erfolgen: Wasser als natürliches Habitat vieler ubiquitär vorkommender Mykobakterien, Aerosole infizierter Patienten oder Tiere, Boden und Staubpartikel, Nahrungsmittel oder ungenügend sterilisierte Gegenstände. Die herkömmliche Desinfektion von Trinkwasser mit Chlor während des Aufbereitungsprozesses reduziert atypische Mykobakterien nur gering, so dass sie ein potentiell Gesundheitsrisiko darstellen (COVERT 1999). Durch UV-Bestrahlung können Mykobakterien wirkungsvoll eliminiert werden.

Das Krankheitsbild einer Mykobakteriose ist sehr variabel, abhängig von dem Erreger und dem Immunstatus des Wirtes. Menschen mit einem guten Immunstatus sind fakultativ pathogenen Umweltkeimen täglich ausgesetzt, ohne zu erkranken. Die Immunantwort jedes einzelnen Individuum variiert in Qualität und Quantität (GANGADHARAM 1997). Eine herabgesetzte Immunität des Menschen begünstigt das Entstehen einer opportunistischen Infektion. Mit dem Beginn der AIDS-Problematik häuften sich die klinischen Fälle von nicht-tuberkulösen Mykobakteriosen bei prädisponierten Patienten, die sich überwiegend aus ihrer Umwelt und nicht durch menschlichen Kontakt infizierten (BÖTTGER 1995, KIRSCHNER 1993, MENDUM 2000, ROTH 2000). Als Erreger wurden in über 80% der Fälle *M. avium/ intrazellulare* isoliert (KAYSER 1998).

Für eine eindeutige Diagnose wird die Kultivierung (auf Selektivnährböden wie in KAMALA 1994 beschrieben) sowie die anschließende exakte Identifizierung angestrebt. Diese Nachweise nehmen in der Regel mehrere Wochen in Anspruch. Viele Mykobakterien sind nur schwer oder nicht kultivierbar und bis auf wenige Informationen über regionale Unterschiede in der Verteilung von Mykobakterien (MENDUM 2000) gibt es bisher wenige Aussagen zu ihrer Verbreitung in der Umwelt. Um Kultivierungsprobleme zu umgehen, werden zunehmend molekularbiologische Techniken eingesetzt (ROGALL 1990, ROTH 2000). Zur Amplifikation mykobakterieller 16S rRNA-Gene werden genus-spezifische Oligonukleotidprimer verwendet (MENDUM 2000).

I. 5. 2 Enterobakterien

Die Familie der *Enterobacteriaceae* umfasst über 100 Spezies und wird gekennzeichnet durch gram-negative, meist bewegliche (peritrich begeißelte), fakultativ anaerobe Stäbchen mit einer Größe von 0,5-1,5 µm × 2-4 µm. Sie bilden keine Sporen und sind Oxidase negativ. Die Systematik beruht vor allem auf den unterschiedlichen Stoffwechselleistungen der einzelnen Gattungen. Laktose abbauende Bakterien werden zu den coliformen Bakterien gezählt, während die meisten pathogenen Vertreter, wie Salmonellen und Shigellen, Laktose negativ sind.

Das natürliche Habitat der Enterobakterien ist der menschliche und tierische Darmtrakt sowie Böden und Sedimente. Neben der fäkal-oralen Schmierinfektion stellt Wasser das wichtigste Übertragungsmedium dar. *E. coli* und coliforme Bakterien sind neben Enterokokken Indikatoren für fäkale Verunreinigungen und werden für die Überwachung der Wasserqualität genutzt (Trinkwasserverordnung 2001).

Zu den Enterobakterien gehören sowohl klinisch relevante Keime als auch viele Opportunisten, die oft nosokomiale Infektionen hervorrufen können (KAYSER 1998). Dabei handelt es sich vor allem um Harnwegsinfekte, Pneumonien, Wundinfekte und Sepsis. Intestinale Infektionen durch Enterobakterien sind weltweit die häufigsten Erkrankungen überhaupt. Besonders in Ländern der Dritten Welt sind Enterobakterien-Infektionen die häufigste Todesursache bei Kindern unter 5 Jahren. Die geschätzte Mortalität beträgt 50 Tote/1000/Jahr (KAYSER 1998).

Da die meisten Enterobakterien kurze Generationszeiten besitzen und sich gut auf einfachen Nährböden oder Selektivmedien kultivieren lassen, beruht der klassische Nachweis dieser Bakterien auf der Kultivierung. Ein wichtiges Selektiv-Indikator-Medium ist der Endoagar. Auf diesem Nährboden wachsen ausschließlich gram-negative Stäbchen. Die Fähigkeit des Laktose-Abbaus wird durch die Rotfärbung der gewachsenen Kolonien deutlich.

Weitere Möglichkeiten zur Differenzierung von Enterobakterien beruhen auf dem immunologischen Nachweis der O-Antigene oder biochemisch mittels der sogenannten „Bunten Reihe“ (HOLMES 1992, LIN 1996, SABAT 2000). Die Differenzierung der einzelnen Spezies kann weiterhin mittels kommerziell erhältlicher Teststreifen, wie z.B. API 20E, durchgeführt werden. Neue molekularbiologische Verfahren (PCR) erlauben einen kultivierungsunabhängigen Nachweis und ermöglichen eine Einordnung und Identifizierung von vielen neuen Spezies oder biochemischen Varianten (TSAI 1993).

I. 5. 3 Legionellen

Legionella ist die einzige Gattung innerhalb der Familie der *Legionellaceae* mit 42 Spezies mit 64 Serotypen. Charakteristisch sind aerobe, Oxidase negative und Katalase positive, gram-negative, keine Zucker verwertende Stäbchen. Legionellen benötigen Aminosäuren und sind nur auf Spezialnährböden (z.B. Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar) anzüchtbar (WEBER 1997, SCHLEGEL 1992). Die *Legionellaceae* bilden ein Endotoxin sowie verschiedene Hämolysine, Proteasen und Phosphatasen. Legionellen sind in der Umwelt nachweisbar, in Biofilmen oder als fakultativ intrazelluläre Bakterien, welche von Amöben oder nicht aktivierten Makrophagen phagozytiert werden. Die Legionellen vermehren sich innerhalb dieser Organismen und sind dadurch zu einem gewissen Grad gegen Chlorung, Erhitzung oder Umwelteinflüssen geschützt (KAYSER 1998, PALMER 1993).

Eine Infektion erfolgt durch Inhalation erregerrhaltiger Aerosole aus Warmwasserbereitern und Klimaanlageanlagen, besonders häufig in Krankenhäusern und Hotels (WEBER 1997).

Ein Großteil der Legionellen stellt Krankheitserreger dar (CLOUD 2000). Drei bis acht Prozent aller herkömmlichen Pneumonien in der Bevölkerung werden von *Legionella* spp. verursacht. Die durchschnittliche Mortalität beträgt 5-30% (CLOUD 2000), wobei sich eine Infektion bei älteren oder immungeschwächten Personen schneller manifestiert.

Klinisch wird zwischen dem Pontiac-Fieber und der Legionärskrankheit unterschieden, einer multifokalen, nekrotisierenden atypischen Pneumonie, hervorgerufen durch *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*. An einer Legionärskrankheit erkranken vor allem Personen mit kardiopulmonalem Grundleiden oder Immungeschwächte (KAYSER 1998). Bei immunsuppressiven Patienten liegt die Letalität dieser Krankheit bei über zwanzig Prozent.

Der Nachweis von Legionellen erfolgt herkömmlich über Kultivierung auf Spezialnährböden, biochemische Tests oder Latex-Agglutination sowie mikroskopisch mittels der direkten Immunfluoreszenz (DFA), immunologisch mit ELISA's oder über Harn-Antigen-Tests. Molekularbiologisch können Legionellen über rRNA-Gensonden identifiziert oder mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden (JONAS 1995, KAYSER 1998).

I. 5. 4 Toxoplasmen

Toxoplasma gondii ist der einzige bekannte Vertreter der Gattung *Toxoplasma*, die zur Familie der *Eimeriida* gehört (WEBER 1997). Der Erreger ist mit hoher Prävalenz in der Bevölkerung verbreitet. Die vom Erreger hervorgerufene Toxoplasmose ist eine Zoonose und kann zwischen Wirbeltieren und Menschen übertragen werden (WEBER 1997). Laut KAYSER (1998) ist etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit *T. gondii* infiziert. Das weltweite Vorkommen und die geringe Wirtsspezifität sorgen für ein breites Infektionsspektrum.

Eine Infektion des Menschen erfolgt meist durch die orale Aufnahme von Oozysten, die vom Endwirt Katze ausgeschieden werden, oder durch den Verzehr von zystenhaltigem Fleisch (KAYSER 1998). In Europa sind 1-6% der Katzen, 10-30% der Schafe und Schweine, seltener Pferde, Rinder und Hühner Ausscheider von Oozysten.

Die Pathogenese ist sehr vielgestaltig. Klinisch wird zwischen einer prä- und postnatalen Infektion unterschieden. Eine Infektion während der Schwangerschaft wirkt sich besonders auf den Fötus aus (Missbildungen, Gehirn- und Augenschäden) (KAYSER 1998). Im Rahmen der pränatalen Diagnostik kann das Fruchtwasser zum direkten Erregernachweis mittels PCR untersucht werden. Bei einer akuten Erstinfektion in der Schwangerschaft kann durch eine sofort eingeleitete Chemotherapie das Infektionsrisiko für das Kind unterbunden werden.

Bei der postnatalen Infektion werden aufgrund der verschiedenen *Toxoplasma*-Antigene humorale und zelluläre Immunantworten ausgelöst (je nach Antigen-Art), die zur Antikörper-Bildung und limitierten Vermehrung der Endozysten führen (KAYSER 1998). Mit der Bildung von Zysten entziehen sie sich der Immunabwehr und können in immunkompetenten Personen jahrelang im Körper persistieren. Der durch die Präsentation von Antigenen aufrechterhaltene Immunitätsstatus schützt vor einer erneuten Infektion. Bei immundefizienten Personen, vor allem AIDS-Patienten mit niedriger Anzahl von T-Zellen, zeigt sich eine zerebrale oder generalisierte symptomatische Toxoplasmose bis hin zur Letalität.

Die Diagnostik erfolgt üblicherweise über indirekte Immunfluoreszenz, ELISA-Test, Antikörpernachweis, verschiedene serologische Tests oder mittels PCR (KAYSER 1998).

I. 5. 5 Microsporidien

Microsporidien umfassen parasitische Protozoen wie *Enterocytozoon* sp., *Encephalitozoon* sp., *Nosema* sp., *Microsporidium* sp. oder *Vittaforma* sp. Sie sind einzellige Sporenbildner (im Gegensatz zu Giardien handelt es sich um Sporozoen) und obligat intrazellulär parasitisch bei Wirbellosen (vor allem bei Insekten), aber auch bei Vertebraten (Fische) (FRANZEN 1999, WEBER 1997). In der Evolution entwickelten sich die Microsporidien in einer frühen Phase von den Pro- zu den Eukaryoten und gingen als eigener Zweig hervor. Dadurch besitzen sie typische Merkmale von Pro- und Eukaryoten: 70S Ribosomen, keine Mitochondrien, Peroxisomen oder Golgi-Apparat aber einen Zellkern mit mitotischer Teilung (FRANZEN 1999, MEHLHORN 1998, KAYSER 1998, WEBER 1994). Das Genom der Microsporidien ist extrem klein und umfasst im haploiden Zustand zwischen 2,9 Mb (*E. cuniculi*) und 19,5 Mb (*Glugea atherinae*) (FRANZEN 1999). Zu den *Mikrospora* zählen heute rund 100 Gattungen und 1000 Arten, von denen sechs Spezies für Menschen pathogen sind (FRANZEN 1999).

Die Sporen haben eine Größe von 1-4 µm und sind sehr umweltresistent. Sie können in feuchter Umgebung bzw. im Wasser bis zu zehn Jahre lebensfähig bleiben (WEBER 1994).

1857 wurde der Parasit *Nosema bomycis* in Seidenwürmern entdeckt. Der erste Fall menschlicher Microsporidiose wurde 1959 beschrieben (FRANZEN 1999), heute sind über 400 Krankheitsfälle bekannt (MÜLLER 1999). Die Epidemiologie hängt wesentlich vom Immunstatus des Wirtes und der Microsporidienart ab, als HIV-assoziierte Infektion erlangt die Krankheit zunehmende Bedeutung. Mehr als 40% der an einer Diarrhoe erkrankten HIV-Patienten scheiden Microsporidien aus, wobei *Enterocytozoon bieneusi* am häufigsten nachgewiesen wurde (DOWD 1998). Neben Diarrhoe verursacht der Parasit Pneumonien, Augeninfektionen, Hirnabszesse oder systemische Infektionen. Bei immunkompetenten Menschen wurden bisher nur wenige Fälle einer Infektion beschrieben, verlaufend mit akuter intestinaler, selbst-limitierender Diarrhoe, oder manifestiert in einer Kornea-Infektion (FRANZEN 1999, WEBER 1994).

Die Entwicklung der Sporen findet im Wirt statt und dauert vier bis sieben Tage (MEHLHORN 1998). Die Übertragung von Sporen kann von Mensch zu Mensch durch fäkal-orale Schmierinfektion stattfinden. Die Möglichkeit der Inhalation von Aerosolen und eine mögliche sexuelle Übertragung müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden (WEBER 1994). Die epidemiologische Bedeutung von Tierreservoirs ist bis heute nicht ganz geklärt, doch gibt es Hinweise auf tierische Wirte (FRANZEN 1999, KAYSER 1998). Grundwasser, zur Trinkwassergewinnung genutztes Oberflächenwasser und unbehandeltes Abwasser sind weitere potentielle Infektionsquellen (DOWD 1998, FRANZEN 1999).

Zur Diagnostik bedient man sich traditionell der Mikroskopie nach modifizierter Trichromfärbung. Die Sensitivität dieser Verfahren ist jedoch gering (MÜLLER 1999, WEBER 1994). Ein serologischer Antikörperrnachweis wird für routinemäßige Untersuchungen evaluiert.

I. 5. 6 Giardien

Giardia lamblia (Syn. *Lamblia intestinalis*) gehört innerhalb der *Protozoa* zur Klasse der Zooflagellaten und Ordnung *Diplomonadida*. Giardien zeichnen sich dadurch aus, dass sie aufgrund einer unterbliebenen Zellteilung nach der Reduplikation alle Organelltypen mindestens zweifach besitzen. Giardien sind weltweit verbreitete, bewegliche Dünndarmparasiten des Menschen, die Enteritis verursachen können (KAYSER 1998). Die Parasiten sind aerotolerante Anaerobier und besitzen keine Mitochondrien oder Peroxisomen.

Zur Gattung *Giardia* zählen mehrere Arten, die sich morphologisch, molekularbiologisch und aufgrund ihrer Wirtsspezifität unterscheiden lassen. Der Wirt für *G. lamblia* ist der Mensch, *G. duodenalis* infiziert Kaninchen, *G. bovis* das Rind, *G. caprae* Ziegen und Schafe und Wirt für *G. canis* ist der Hund (MEHLHORN 1998). Einige Stämme sind von Wirbeltieren auf Menschen übertragbar (KAYSER 1998). Morphologisch werden begeißelte vegetative Formen (Trophoziten) und Zysten unterschieden (KAYSER 1998, WEBER 1997). Die Zysten enthalten stabilisierende chitinöse, filamentöse Elemente und erklären eine hohe Umweltresistenz (MEHLHORN 1998).

Durch die orale Aufnahme von Zysten kann es zu Infektionen kommen, die oft zu Entzündungserscheinungen im Dünndarm sowie Resorptionsstörungen führen, aber auch symptomlos bleiben können (KAYSER 1998). Auch Infektionen der Gallenblase sind möglich. Entweder wird der Erreger spontan vom Wirtsimmunsystem eliminiert oder er persistiert jahrelang. Besonders bei immunsupprimierten Patienten kann es zu einer starken Vermehrung des Parasiten kommen, die eine Chemotherapie notwendig macht. Prophylaktisch sollte für gefährdete Gruppen (Kinder, Immungeschwächte) bei Reisen in endemische Gebiete das Trinkwasser abgekocht oder filtriert werden. Es sollten keine Salate und nur geschältes Obst gegessen werden.

In der Diagnostik werden die Giardien mittels SAF-Technik fixiert, mit LUGOLscher Lösung gefärbt und mikroskopiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz (IFA) oder enzymatisch mit ELISA's können spezifische Antigene nachgewiesen werden (KAYSER 1998). Weitere Techniken zur Verbesserung des Nachweises befinden sich in der Erprobung (Durchflußzytometrie, UV-Spektroskopie, immunomagnetische Separation, PCR) (KAUCNER 1998, ROCHELLE 1997).

I. 5. 7 Cryptosporidien

Cryptosporidien gehören zu den *Sporozoa* der *Protozoa*. Ihr Generationswechsel besteht aus geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Fortpflanzung. Cryptosporidien sind nicht kultivierbar, hoch infektiös, kommen weltweit vor und sind sehr umweltresistent (LABERGE 1996, LENG 1996). Als Dünndarmparasiten infizieren sie Menschen (einzige humanpathogene Spezies ist *Cryptosporidium parvum*) und zahlreiche Arten von Säugern (*C. parvum*, *C. felis*, *C. muris*, *C. wrairi*), Vögeln (*C. baileyi*, *C. melaegridis*), Reptilien (*C. serpentis*) und Fischen (*C. nasorum*) (BORNAY-LLINARES 1999). Die am häufigsten vorkommende Spezies ist *C. parvum*, mit den Genotypen human und bovin (KUHLMANN 2000). Cryptosporidien werden nach ihrer Lokalisation im Wirt in zwei Gruppen eingeteilt. Die im Magen lokalisierten Spezies *C. muris* und *C. serpentis* bilden die eine Gruppe,

während *C. parvum*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. wrairi* und *C. meleagridis* die zweite Gruppe bilden (XIAO 1999).

Eine Übertragung der Oozysten geschieht fäkal-oral von Mensch zu Mensch, Tier zu Mensch, über kontaminierte Nahrungsmittel oder Trinkwasser (CHAMPLIAUD 1998). Die Prävalenz des Erregers beträgt in Europa bei immunkompetenten Personen zwei bis vier Prozent, bei HIV-Infizierten bis zu 20% (KAYSER 1998).

Das Krankheitsbild einer Cryptosporidiose ist je nach Immunstatus des Patienten sehr unterschiedlich. Bei immunkompetenten Personen äußert sich eine Infektion als selbst-limitierende Durchfallerkrankung mit verschiedenen Allgemeinsymptomen (z.B. Appetitlosigkeit, leichtes Fieber), die nach drei bis vier Wochen abklingen (LENG 1996, SRETER 2000). Bei immungeschwächten Personen führt ein Befall mit Cryptosporidien zu langanhaltenden, choleraähnlichen, wässrigen, lebensbedrohlichen Diarrhoen (CHAMPLIAUD 1998, LABERGE 1996). Besonders bei AIDS-Patienten werden die Erreger auch in anderen Organen und Geweben gefunden (KAYSER 1998). Die Infektionsdosis für Menschen ist sehr gering (30-100 Oozysten) (KAYSER 1998, MAYER 1996), jedoch genügt im ungünstigsten Fall bereits eine Oozyste (KUHLMANN 2000).

Der herkömmliche diagnostische Nachweis erfolgt mittels modifizierter ZIEHL-NEELSEN-Färbung, Immunfluoreszenz, Durchflußzytometrie oder im ELISA (LENG 1996). Trotz der Entwicklung neuer Methoden zur Detektion von Oozysten aus Umweltproben sind die Wiederfindungsraten nicht optimal (BLACK 1996). Neue molekularbiologische Verfahren ersetzen mehr und mehr die Lichtmikroskopie. Es gibt in der Literatur verschiedene PCR-Protokolle für einen sensitiven und relativ spezifischen Nachweis dieser Parasiten (SRETER 2000, XIAO 1999).

II ZIELSETZUNG

Im Sediment von Talsperren und Seen spielen mikrobielle Prozesse eine wichtige Rolle. Demgegenüber stehen nur unzureichende Erkenntnisse über die Zusammensetzung mikrobieller Biozöosen in Sedimenten sowie deren Aktivität zur Verfügung. Über der Funktion einiger Talsperren als Trinkwasserreservoirs stellen sie Ökosysteme dar, welche in enger Wechselwirkung mit den Prozessen und Milieueigenschaften im Sediment und im Freiwasserbereich stehen. Die Struktur und Diversität der Lebensgemeinschaften und ihre Aktivität im Sediment sind nach den Erkenntnissen der letzten Jahre wesentliche Größen, die den trophischen Zustand, die Redoxreaktionen und das Verhalten von organischen Spurenstoffen bestimmen (KUHLMANN 1998).

In den Untersuchungen wurden die Sedimente der Talsperren Saldenbach, Quitzdorf, Muldenberg und Neunzehnhain analysiert mit dem Ziel einer umfassenden Charakterisierung und dem Vergleich der mikrobiellen Lebensgemeinschaften von Sedimenten aus Talsperren unterschiedlicher Trophie. Molekularbiologische Methoden sollten an das Sediment angepasst und optimiert werden. Ein besonderer Schwerpunkt lag auf der molekularbiologischen Identifizierung von Sedimentmikroorganismen zur Aufklärung der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften und zur Abschätzung der mikrobiellen Diversität. Auf der Grundlage der 16S rDNA wurden vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt, phylogenetische Studien betrieben und die Artenvielfalt aufgedeckt.

Weiterhin wurde die mikrobielle Gemeinschaft mit molekularbiologischen Fingerprunttechniken analysiert. Dazu wurden die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE), der Terminale Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP) und die Automatisierte Ribosomale Intergene Spacer Analyse (ARISA) etabliert und evaluiert. Diese Methoden sollten ein Screening der mikrobiellen Zusammensetzung erlauben und eine Abschätzung ermöglichen, welche Proben mit aufwendigeren Methoden (z.B. Klonierung und Sequenzierung) weiterbearbeitet werden sollten. Für die T-RFLP war es nötig, besonders die Möglichkeiten der Auswertung zu optimieren.

In den Talsperrensedimenten waren Existenzmöglichkeiten von pathogenen Organismen in einem extrem bakterienreichen Umfeld zu erwarten und Risiken bei der Trinkwassergewinnung aus Oberflächengewässern können nicht ausgeschlossen werden. Das Sediment stellt ein Reservoir für Keime dar, welche gelegentlich einer Resuspension unterliegen und durch den tief gelegenen Ablauf ins Rohwasser gelangen können. Die Elimination pathogener Organismen wird nur durch aufwendige Desinfektionsmaßnahmen gewährleistet. Daher spielte der Nachweis und die Identifizierung pathogener Bakterien (Mykobakterien, Enterobakterien, Legionellen) und Protozoen (Microsporidien, Cryptosporidien, Giardien, Toxoplasmen) in den Talsperrensedimenten eine wesentliche Rolle. In diesem Ansatz wurden molekularbiologische Nachweismethoden durch Kulturmethode, Mikroskopie und ELISA ergänzt. Vor allem zum Nachweis der Protozoen wurden neue PCR-Systeme entwickelt. Es sollten Verteilungsmuster pathogener Organismen in den Sedimentschichten und Gewässertypen untersucht werden, um Aussagen über eine mögliche Resuspension von im Sediment befindlichen Krankheitserregern treffen zu können.

Zur Analyse von Stoffwechselleistungen wurden die funktionellen Gruppen der sulfatreduzierenden Bakterien, Denitrifikanten und Nitrifikanten auf der Basis von Genen, welche für Schlüsselenzyme kodieren, spezifisch amplifiziert und identifiziert.

III MATERIAL UND METHODEN

III. 1 Die Charakteristika der untersuchten Talsperren

Die geographische Lage der untersuchten Talsperren Neunzehnhain, Muldenberg, Saidenbach und Quitzdorf ist in Abbildung 1 dargestellt.

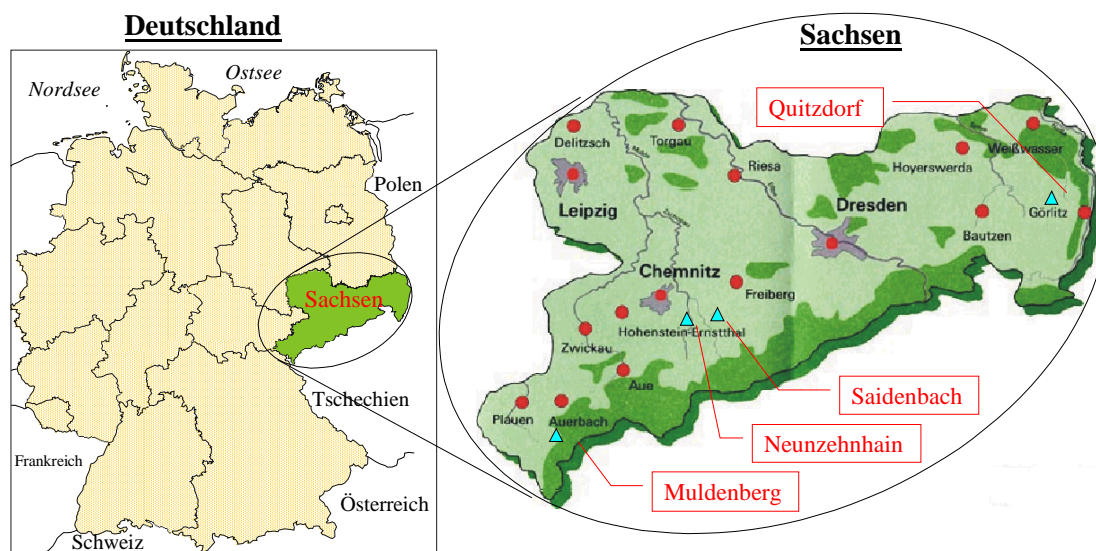


Abbildung 1: Geographische Lage der Talsperren

Es wurden 4 sächsische Talsperren untersucht: Quitzdorf, Saidenbach, Neunzehnhain und Muldenberg. Die Charakteristika der Talsperren sind in Tabelle 1 dargestellt (MAAßEN 2003).

Tabelle 1: Charakteristika der untersuchten Talsperren

Talsperre	Neunzehnhain I	Muldenberg	Saidenbach	Quitzdorf
Einzugsgebietsfläche	10,8 km ²	20,3 km ²	60,7 km ²	174,5 km ²
Anteil Landwirtschaft	18%	0%	64%	73%
Anteil Forstwirtschaft	80%	98%	28%	20%
Besiedlungsdichte	0 EW/km ²	12 EW/km ²	86 EW/km ²	80 EW/km ²
Maximale Tiefe	16,5 m	23,0 m	48,0 m	9,3 m
Oberfläche	8,5 ha	92,0 ha	146,0 ha	750,0 ha
Stauraum	0,5 Mio. m ³	5,8 Mio. m ³	22,4 Mio. m ³	24,0 Mio. m ³
SRP-Belastung/a	0,01-0,05 g P/m ²	0,22 g P/m ²	0,45-1,20 g P/m ²	0,28 g P/m ²
Sichttiefe	5,8-10,0 m	um 2,5 m (braun)	2,5-5,5 m	0,7-2,9 m
pH-Werte	6,6-7,3	4,7-5,5	6,7-8,2	7,3-9,8
Trophiegrad	oligotroph	oligotroph	mesotroph	eutroph
Hauptnutzung	Trinkwasser	Trinkwasser	Trinkwasser	Brauchwasser
Gestautes Gewässer	Lautenbach	Rote und Weiße Mulde, Saubach	Saidenbach	Schwarzer Schöps
Inbetriebnahme	1911	1925	1933	1974

III. 1. 1 Die Talsperre Neunzehnhain I

Die Talsperre Neunzehnhain I befindet sich in einem unbesiedelten, überwiegend forstwirtschaftlich genutzten Wassereinzugsgebiet und steht mit den Talsperren Neunzehnhain II, Saidenbach und Einsiedel im Verbund. Die Talsperre liegt im mittleren Erzgebirge, hat oligotrophen Charakter (Trophiestufe 1) und zeichnet sich durch geringe Phosphoreinträge aus. In den Sommermonaten kann es jedoch zur kurzzeitigen aber starken Entwicklung von Nano- und Ultraplankton kommen. Episodische Versauerungserscheinungen der Zuflüsse Lautenbach und Gänsebach konnten die Talsperren bis heute gut abpuffern (ULRICH 1998). Allerdings deutet sich eine Versauerung des Wasserkörpers an. Die Nitratkonzentration stieg zwischen 1976 und 1990 kontinuierlich an, bis heute sank die Konzentration auf Werte zwischen 5-10 mg/l. Zwei Kilometer unterhalb der Talsperre Neunzehnhain II befindet sich Neunzehnhain I.

III. 1. 2 Die Talsperre Muldenberg

Die Talsperre Muldenberg liegt im Vogtland. Das Einzugsgebiet wird vorwiegend forstwirtschaftlich genutzt und ist relativ gering besiedelt. Das Gebiet besteht zum größten Teil aus Hochmoor. Die Talsperre hat oligotrophen Charakter mit dystropher Beeinflussung. Die niedrigen pH-Werte (pH 4-5) sind größtenteils natürlichen Ursprungs (SIEBER 1992). Seit Anfang der 70er Jahre ist jedoch eine Zunahme der Versauerung des Wasserkörpers zu beobachten (pH 4,2 in den 60er Jahren, pH 3,7 in den 80er Jahren), welche auf die atmosphärische Belastung der Region zurückzuführen ist (SIEBER 1992). Diese Versauerung ist nun rückläufig, der pH-Wert steigt langsam wieder an (1990: pH 3,5; 2000: pH 5). Der Trend zu höheren pH-Werten könnte zu einer stärkeren Fällung von Aluminiumhydroxiden und damit zu einer Mitfällung von ortho-Phosphat führen. Dies würde eine geringere Trophie bedingen. Es besteht jedoch die Gefahr, dass eine anschließende Wiederversauerung zu einer Freisetzung von Nähr- und Laststoffen aus dem Sediment führt. Die Nitratwerte der Talsperre sind sehr gering, nehmen aber langsam zu. Sie lagen in den 60er und 70er Jahren bei 1-2 mg/l, in den 80er Jahren bei ca. 4-5 mg/l und sanken 1990 auf 2,6 mg/l Nitrat. Die Flächenbelastung durch Phosphat ist ebenfalls gering (ca. 0,2 g ortho-Phosphat /m² pro Jahr). Der geringe Phosphoreintrag über die Zuflüsse und die bremsende Wirkung des sauren Stauseewassers führen nur zu einer geringen bis mäßigen Planktonentwicklung (SIEBER 1992). Am Ende der Sommerstagnation werden jährlich Sauerstoffkonzentrationen im Tiefenwasser von unter 4 mg/l gemessen, dabei findet man auch Mangankonzentrationen von 0,8 mg/l und Eisenkonzentrationen von 0,7 mg/l (SIEBER 1992). Die Talsperre Muldenberg besitzt keine Vorsperren. Die in der Talsperre gestauten und somit vereinigten Bäche bilden unterhalb der Sperrstelle die Zwickauer Mulde (SIEBER 1992).

III. 1. 3 Die Talsperre Saidenbach

Die Talsperre Saidenbach liegt im mittleren Erzgebirge. Das Einzugsgebiet der Talsperre wird hauptsächlich landwirtschaftlich genutzt und ist durch Tierhaltung gekennzeichnet. Einen geringen Anteil nimmt die Forstwirtschaft ein. Aufgrund der relativ hohen Besiedlungsdichte und der intensiven Flächennutzung besitzt die Talsperre einen mesotrophen Charakter (Trophiestufe 2) mit einer Tendenz zum eutrophen Zustand. Die Folgen der in den 70er und 80er Jahren verwendeten phosphathaltigen Waschmittel zeigten sich in einem Anstieg der ortho-Phosphat-Flächenbelastung bis auf $1,20 \text{ g/m}^2$ pro Jahr. Verstärkt auftretende Algenentwicklungen waren die Folge. Seit 1990 sind die Werte durch die Einführung phosphatfreier Waschmittel wieder rückläufig ($0,88 \text{ g/m}^2$ pro Jahr). Die massive Tierhaltung führte zu einem Nitratanstieg bis auf Werte von $25,8 \text{ mg/l}$ (1975-1990). Danach sanken die Werte wieder, da die Viehhaltung eingeschränkt wurde. Der pH-Wert schwankt, Versauerungserscheinungen werden jedoch nicht beobachtet, da die Böden im Einzugsgebiet gut gepuffert sind und durch landwirtschaftliche Betriebe gekalkt werden (ULRICH 1998). Die Talsperre Saidenbach verfügt über eine eutrophe, oftmals stabil geschichtete Unterwasservorsperre Haselbach, die im Stauwurzel-Bereich liegt. Die übrigen Zuflüsse besitzen weitere sechs kleinere Vorbecken. Laut ULRICH (1998) gilt die Talsperre Saidenbach aufgrund kontinuierlicher Datenreihen als eine der am intensivsten untersuchten Talsperren Europas.

III. 1. 4 Die Talsperre Quitzdorf

Das Einzugsgebiet der Talsperre Quitzdorf liegt in der Oberlausitz und ist durch intensive Landwirtschaft mit Großviehhaltung sowie eine dichte Besiedlung und industrielle Nutzung charakterisiert. Die Talsperre wird als eutroph eingestuft (Trophiestufe 4). Der jahrelang gleichbleibende Phosphateintrag in die Talsperre führte zu einem hohen Phosphatgehalt (ca. $0,5 \text{ g ortho-Phosphat/m}^2$ pro Jahr in den 80er Jahren) und damit zu einer starken Eutrophierung des Flachspeichers (SIEBER 1992). Von Juni/Juli bis Oktober dominieren jährlich Cyanobakterien, die die Nutzung als Badegewässer sowie die Fischzucht unterhalb gelegener Teiche stark beeinträchtigen (SIEBER 1992). Die Nitratgehalte schwanken während des Jahres ($0,8 \text{ mg/l}$ bis 36 mg/l). Im Frühjahr werden aus den Zuflüssen große Mengen Nitrat aus der Landwirtschaft in die Talsperre eingespült. Davon wird im Laufe des Sommers durch Phytoplankter ein erheblicher Teil verbraucht und durch Nitratreduktion umgebaut (SIEBER 1992). Der Nitratgehalt sank von 12 mg/l Ende der 70er Jahre auf $4,8 \text{ mg/l}$ Anfang der 90er Jahre. Die pH-Werte schwanken. Die Sperre Quitzdorf besitzt keine Vorsperren, aber ein Vorbecken Reichendorf.

III. 2 Probenahmedaten, Probenahme und Transport

Genauere Probenahmedaten sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Die taxonomischen Studien beziehen sich auf die vergleichenden Klonierungen aus dem Jahr 2000.

Tabelle 2: Daten der Probenahmen

Muldenberg	Neunzehnhain I	Quitzdorf	Saidenbach
M1 14.06.2000	N1 26.04.2000	Q1 23.03.2000	S1 08.03.2000
M2 22.08.2000	N2 27.06.2000	Q2 30.05.2000	S2 09.05.2000
M3 17.10.2000	N3 08.08.2000	Q3 25.07.2000	S3 05.07.2000
M4 12.12.2000	N4 24.10.2000	Q4 05.10.2000	S4 27.09.2000
M5 29.05.2001	N5 12.06.2001	Q5 13.02.2001	S5 29.11.2000
M6 01.08.2001	N6 07.08.2001	Q6 18.04.2001	S6 09.05.2001
M7 25.09.2001	N7 10.10.2001	Q7 19.06.2001	S7 03.07.2001
M8 27.11.2001		Q8 28.08.2001	S8 05.09.2001
		Q9 23.10.2001	S9 14.11.2001

Die Sedimentkerne wurden mittels eines Kajak Samplers entnommen und in Horizonte aufgetrennt:

Horizonte: 0-0,5 cm, 0,5-1 cm, 1-1,5 cm, 1,5-2 cm, 2-3 cm, 3-4 cm, 4-5 cm

Gesamthorizont: 0-5 cm (Mischung aus den Einzelhorizonten)

Die Entnahmen wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren (2000 und 2001) in Abständen von 2 Monaten für jede Talsperre durchgeführt. Die Proben wurden in einer Kühlbox transportiert und die DNA noch am Tag der Probenahme extrahiert. Die biochemischen Untersuchungen wurden von Sebastian Maaßen durchgeführt.

III. 3 Versuchsschema

Die Analyse der Sedimente sollte durch eine Kombination molekularbiologischer Methoden erfolgen. Innerhalb der vergleichenden 16S rDNA Analyse sollten die vorkommenden Spezies identifiziert und phylogenetische eingeordnet werden. Mittels Fingerprinttechniken (T-RFLP, ARISA und DGGE) wurde die mikrobielle Zusammensetzung der Talsperren und deren Horizonte verglichen und saisonale Schwankungen untersucht. Die spezifische PCR zielte insbesondere auf funktionelle Gruppen ab (Denitrifikanten, Nitrifikanten und Sulfatreduzierer), wie auch auf potentiell pathogene Organismen (Mykoplasmen, Legionellen, Enterobakterien und Protozoen). Klassische Nachweisverfahren (z.B. Mikroskopie) sollten den Nachweis ergänzen.

Das folgende Schema (Abbildung 2) verdeutlicht die Vorgehensweise in der Arbeit.

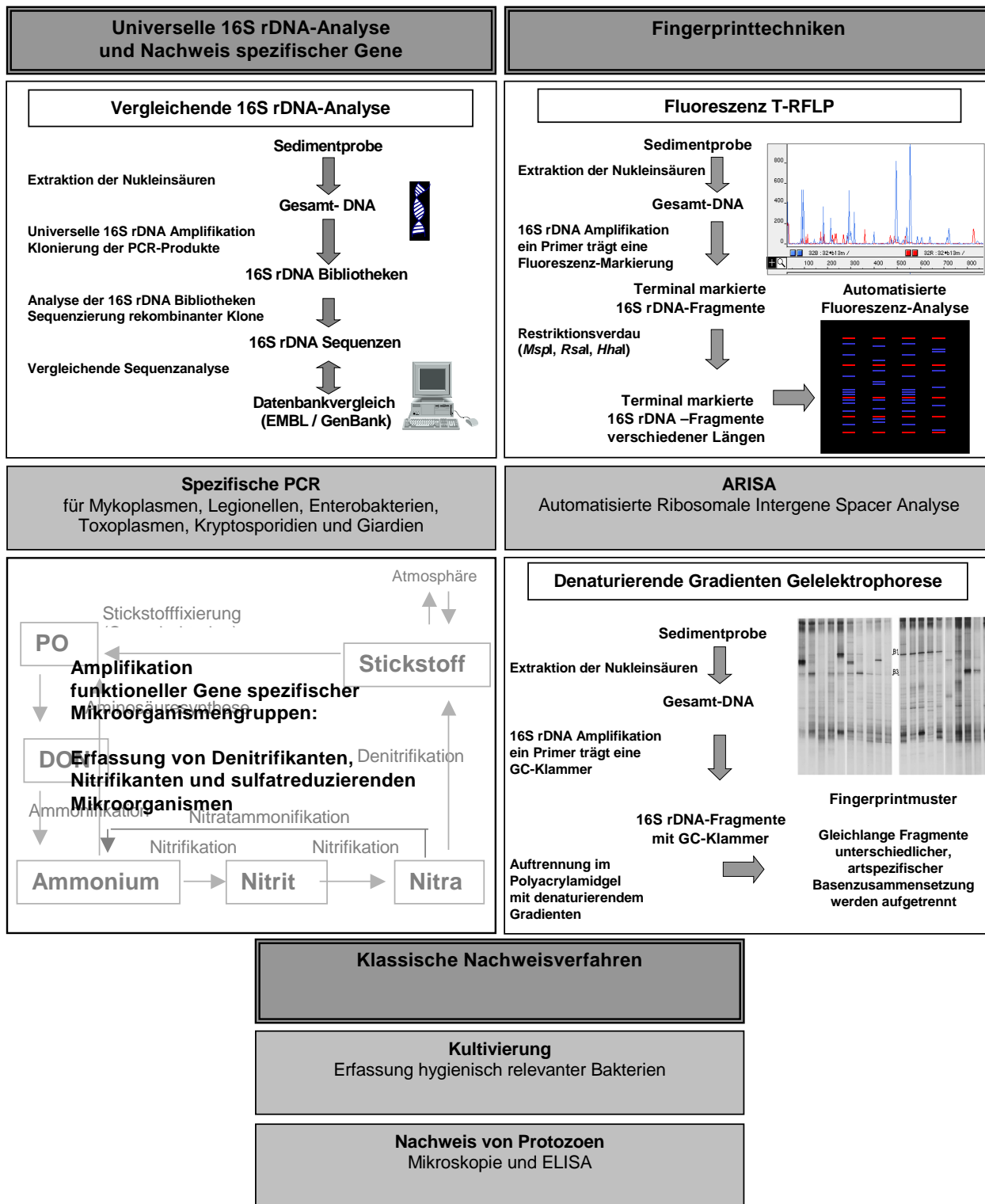


Abbildung 2 Angewandte Methoden zur Analyse der Talsperrensedimente

III. 4 Verwendete Geräte, Kitsysteme, Lösungen, Puffer und Nährmedien

III. 4. 1 Geräte

Brutschrank	Laborbrutschrank B12	Heraeus, Deutschland
DGGE	DCode Universal Mutation Detection System Gradient Delivery System Model 475	BioRad, Deutschland
DNA-Aufschluss	Schwingmühle MM 2000 FastPrep [®] -System	Kurt Retsch, Deutschland Qbiogene, USA
Elektrophorese- Systeme	ComPhor Midi ABI PRISM [®] 377 Genetic Analyzer Ready-To-Run Separation unit [™]	BIOzym, Deutschland PE Biosystems, Deutschland Amersham Pharmacia Biotech AB, USA
Netzgerät	Power Pac 200	BioRad, Deutschland
Photometer	Anthos reader 2001	anthos Microsysteme GmbH, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Referenz Pipetman	Eppendorf, Deutschland Gilson, USA
Probenahmegerät	Kajak Sampler	Uwitec, Österreich
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9600 GeneAmp PCR System 2400 GeneAmp PCR System 9700 Robocycler Gradient 96 mit Hot Top	PE Applied Biosystems, Deutschland Stratagene, Niederlande
Thermomixer	Thermomixer 5437	Eppendorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Deutschland
Transilluminator	Gel Doc 2000	BioRad, Deutschland
UV/VIS-Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Schweden
Vakuumpzentrifuge	Maxi dry lyo	Heto Lab Equipment, Dänemark
Vortex	MS1 Mini Shaker	IKA-Labortechnik, Staufen
Waage	Typ FA 3100-2i Sartorius Basic	Faust Laborbedarf, Schweiz Sartorius AG, Deutschland

III. 4. 2 Verwendete Kitsysteme und Fertiglösungen

Biochemische Identifikation	API 20E	bioMérieux, Frankreich
DNA-Extraktion	FastDNA [®] Spin Kit for soil QIAamp [™] Tissue Kit	Qbiogene, USA Qiagen GmbH
dNTP Mix	200 µM	Hybaid GmbH

ELISA	ProSpecT Giardia Microplate Assay ProSpecT Cryptosporidium Microplate Assay	Genzyme Virotech, Deutschland
Eukitt	Histomount	Life Sciences Int., Deutschland
Klonierung	TOPO TA Cloning [®] Kit TOP10F´One Shot [®] Competent Cells	Invitrogen, Niederlande
Mastermix-Aufreinigung	Microcon [®] Centrifugal FilterDevices YM-100	Millipore, Amicon
PCR-Produkt-Aufreinigung	QIAquick [™] PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
PCR-Puffer (10×)	PE Biosystems	Deutschland
Polymerase	AmpliTaQGold [™] DNA-Polymerase	PE Biosystems, Deutschland
Sequenzierung	BigDye [™] RR Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Deutschland
Silberfärbung	Biorad Silver Stain	BioRad, Deutschland
Xylol	Histoclear	National Diagnostics, USA

III. 4. 3 Lösungen für die Mikroskopie von Protozoen

SAF-Stammlösung

Natriumacetat	15,00 g
Eisessig	20,00 ml
Formalin (40%)	40,00 ml
Wasser	925,00 ml

Trichromlösung

Chromotrope 2R (Sigma C1343)	6,00 g
Anilin Blau (Riedel-de Haen 32703)	0,50 g
Wolframatophosphorsäure-Hydrat (Merck 583)	0,25 g

Zutaten in 3 ml Eisessig lösen, bei Raumtemperatur für 30 min inkubieren, danach mit 100 ml A. dest. versetzen und mit 1 M HCl auf pH 2,5 einstellen. Färbelösung vor Gebrauch auf 37 °C erwärmen.

Säure-Alkohol

Eisessig	4,5 ml
Ethanol 95%	995,5 ml

III. 4. 4 Puffer und sonstige Lösungen

Agarosegel-Elektrophoresepuffer (TBE 10×, pH 8,3)

Tris Base	1,00 M
Borsäure	8,30 M
EDTA	0,01 M

Agarosegel-Ladepuffer (6×)

Ficoll	15,00% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol-FF	0,25% (w/v)

Ethidiumbromid-Stammlösung (1%)

Ethidiumbromid	0,01 g
A. dest.	10,00 ml

Gebrauchsfertige Färbelösung: 0,5 ml Ethidiumbromid-Stammlösung in 500 ml A. dest. lösen

TAE-Puffer (50x) (DGGE)

Tris Base	242,00 g
Essigsäure, 100%	57,10 ml
EDTA	18,61 g
A. dest.	auf 1000 ml auffüllen

Ladepuffer (DGGE)

2% Bromphenolblau	0,25 ml
2% Xylencyanol	0,25 ml
100% Glycerin	7,00 ml
A. dest.	2,50 ml

Den pH-Wert mit HCl vor dem Auffüllen mit A. dest. auf einen Wert von 8,0 einstellen, danach autoklavieren.

Farbstofflösung für das Gel (DGGE)

Bromphenolblau	0,05 g
Xylencyanol	0,05 g
1x TAE Puffer	10,00 ml

III. 4. 5 Nährmedien

Folgende Nährmedien wurden nach Herstellerangaben zubereitet:

Blut-Agar (Columbia Agar), Nähragar Oxoid, Hampshire, England

Blutagar und Nähragar sind universell einsetzbare Medien zur Anzucht von Bakterien.

Endo-Agar Difco, Detroit, USA

Endoagar ist ein lichtempfindliches kombiniertes Selektiv-/Indikatormedium, das Fuchsin und Na₂SO₃ (Leukofuchsin) enthält. Es wachsen nur Enterobakterien, Pseudomonaden und andere gram-negative Stäbchen, während gram-positive Bakterien durch das vorhandene Leukofuchsin im Wachstum gehemmt werden. Die Fuchsinbildung (rot) wird durch die Aldehydproduktion Laktose-positiver Bakterien bewirkt. *E. coli* bildet auf diesem Agar dunkelrote Kolonien mit typischem Fuchsinglanz (KAYSER 1998).

LB-Agar (Luria Bertani-Agar) Oxoid, Hampshire, England

Diesem Agar wurden zur Selektion von Ampicillin-resistenten *E. coli* 50,0 µg/ml Ampicillin zugefügt.

Leifson-Agar Oxoid, Hampshire, England

Auf diesem Agar wird das Wachstum gram-positiver Bakterien durch das enthaltene Na-desoxycholat unterdrückt. Nicht darmpathogene, Laktose positive Enterobakterien erscheinen als rosa-rötliche Kolonien. Durch die Säurebildung infolge des Laktose-Abbaus kommt es zum Farbumschlag des im Agar enthaltenen Neutralrot. Salmonellen erscheinen als zarte Kolonien mit einer schwarzen Färbung aufgrund der FeS-Bildung.

Selenitbouillon Oxoid, Hampshire, England

Die Selenitbouillon dient der Anreicherung von Salmonellen, da das Wachstum apathogener Keime gehemmt wird. Das Vorhandensein von Salmonellen wird durch eine Trübung der Bouillon deutlich. Sie wird nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C mit einem Glasstab auf Winkle- und Leifson-Platten ausgestrichen. Danach verbleibt die Bouillon 4 Tage zur Kälteanreicherung im Kühlschrank (4 °C), bevor sie mit einem Glasstab auf Yersinien-Agar ausgestrichen und bebrütet wird.

Winkle-Agar Oxoid, Hampshire, England

Nicht darmpathogene Enterobakterien erscheinen weiß-gelblich auf dem Agar, Salmonellen erscheinen glasig in Farbe des Nährbodens, eventuell mit zentraler Schwärzung.

Yersinien-Agar Oxoid, Hampshire, England

Verdächtige Kolonien erscheinen als durchsichtige, glattrandige, stecknadelkopfgroße Kolonien mit himbeerfarbenem Zentrum („Kuhaugen“).

III. 5 Nachweismethoden

III. 5. 1 Kultivierung und Identifikation von Enterobakterien

Die Anzucht der Enterobakterien erfolgte auf Selektivnährböden (Endo-, Winkle-, Leifson-, Yersinien-Agar) und in einer Anreicherungsbouillon (Selenitbouillon). Von den Sedimenten wurden jeweils 100 µl einer 1:10 und 1:100 Verdünnung des Gesamthorizontes ausplattiert bzw. eine Impföse aus den Verdünnungen in die Bouillon gegeben. Zur Gewinnung von Reinkulturen wurden Kolonien auf Blutplatten überimpft. Diese Reinkulturen wurden anschließend in das API 20E-System nach Herstellerangaben eingesetzt. Zusätzlich wurde die Oxidase-Reaktion mit Kulturmaterial der Blutplatten durchgeführt.

Die Anwendung des speziell für Enterobakterien entwickelten, kommerziellen API 20E-Testsystems ermöglicht eine sichere Identifikation von kultivierten, gram-negativen Enterobakterien. Die Identifikation beruht auf chemischen Reaktionen („bunte Reihe“), welche die physiologischen Leistungen der Bakterien widerspiegeln. Die Identifizierung erfolgt über einen 7-Ziffern-Code mittels der API-Software bzw. API-Katalog.

III. 5. 2 Lichtmikroskopischer Nachweis von Cryptosporidien, Giardien und Microsporidien

Von jeder Talsperrenprobe wurden vier parallele Ansätze (jeweils 3-4 g Sediment) des Gesamthorizontes (0-5 cm) mikroskopisch auf pathogene Parasiten untersucht.

Die Positivproben wurden freundlicherweise vom Institut für klinische Prüfung Ludwigsburg GmbH, Veterinärmedizinisches Labor, bereitgestellt.

III. 5. 2. 1 SAF-Fixierung

Im ersten Schritt wurden die Sedimentproben mit SAF-Lösung (Sodium acetate, Acetic acid, Formaldehyde) fixiert. Diese Fixierung stellt eine sensitive Methode für pathogene Protozoen dar und ermöglicht einen präzisen und empfindlichen Zystennachweis (MARTI 1990). Spezialfärbungen wie Trichrom-Färbung oder modifizierte ZIEHL-NEELSEN-Färbung können dann direkt mit dem fixierten Material durchgeführt werden.

Die parallelen Ansätze wurden mit je 10 ml SAF-Lösung gut vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben durch Rühren homogenisiert und durch eine Metallgaze (Maschenweite 1 mm) in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, um grobe Partikel abzufiltrieren. Nach Zentrifugation (1 min, 500×g bei 4 °C) wurde der Überstand abgegossen und dem Sediment 7 ml physiologische NaCl-Lösung und 3 ml Äther hinzugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und zentrifugiert (5 min, 500×g bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die fixierten Proben in folgende Färbungen eingesetzt.

III. 5. 2. 2 Modifizierte Trichrom-Färbung nach Weber zum Nachweis von Microsporidien

Zum Nachweis von Sporen der Microsporidien wurde die modifizierte Trichromfärbung (oder Chromotrop-Färbung) durchgeführt (FRANZEN 1999, WEBER 1994).

Aus den SAF-fixierten Ansätzen wurden dünne Suspensionen auf Objektträger ausgestrichen, an der Luft getrocknet und 5 min in Methanol fixiert. Danach wurden die vier Objektträger für 30 min bei 37 °C mit Trichromlösung gefärbt. Anschließend wurde 10 sec mit Säure-Alkohol gespült. Danach erfolgte eine dehydrierende Behandlung (zweimal 5 min in 96%igem Ethanol und einmal 10 min in absolutem Ethanol). Im letzten Schritt wurden die Objektträger 5 min mit Xylol inkubiert und danach in Eukitt eingebettet.

Die 1-2,5 µm großen Sporen stellen sich bei 1000-facher Vergrößerung als pinkfarbene bis rote ovale Strukturen dar. Im Gegensatz dazu werden Bakterien blau-grün angefärbt. Da Microsporidien sporen sehr klein sind, ist eine Interpretation des lichtmikroskopischen Bildes oft schwierig und erfordert ein gewisses Maß an Erfahrung.

III. 5. 2. 3 Modifizierte ZIEHL-NEELSEN-Färbung zum Nachweis von Cryptosporidien

Oozysten der Cryptosporidien wurden mittels modifizierter ZIEHL-NEELSEN-Färbung nach HENRIKSON und PAHLENZ (1981), weiter modifiziert nach PILZ (1989), lichtmikroskopisch nachgewiesen (SOAVE 1996, BRETT 1986, SEITZ 2002, LENG 1996).

Es wurden dünne Suspensionen der SAF-fixierten Ansätze auf Objektträger ausgestrichen, an der Luft getrocknet und 5 min in Methanol fixiert. Nach Trocknung (an der Luft) wurde 20 min in Karbolfuchsin gefärbt. Nach Spülen mit Leitungswasser wurden die Proben in 3% HCl-Ethanol entfärbt, bis keine Farbwolken mehr sichtbar waren. Nach wiederholtem Spülen mit Leitungswasser wurden die Objektträger 1 min mit Löfflers Methyleneblau gegengefärbt. Im letzten Schritt wurde mit Leitungswasser abgespült und an der Luft getrocknet.

Cryptosporidien geben den Farbstoff Karbolfuchsin bei der HCl-Alkohol-Behandlung nicht wieder ab. Darin zeigt sich ihre Säurefestigkeit. Die 4-6 µm großen ovalen Oozysten erscheinen bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet, als rot gefärbte Strukturen. Andere Strukturen und Bakterien werden blau angefärbt.

III. 5. 2. 4 Färbung mit LUGOLscher Lösung zum Nachweis von Giardien

Dünne Suspensionen der SAF-fixierten Ansätze wurden mit einem Tropfen LUGOLscher Lösung angefärbt und bei einer 40× 10-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Im gelblich-ockerfarbenen Präparat sind die 8-14 µm großen ovalen Zysten gut erkennbar.

III. 5. 3 Nachweis von Giardien und Cryptosporidien mittels ELISA

Der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ist ein weit verbreiteter Antigen-/Antikörpernachweis. Nachweismethoden für Antigene und Antikörper haben eine sehr hohe Sensitivität und erfordern in der Durchführung einen geringen Zeitaufwand (JANEWAY 1997, KLEIN 1991). Für den serologischen Nachweis der Parasiten wurden 200 µl der 1:10 verdünnten Proben aus dem Gesamthorizont und je 200 µl von positiven und negativen Kontrollen (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene) in Festphasenimmunoassays eingesetzt. Der qualitative Nachweis von *Cryptosporidium* spezifischem Antigen (CSA) bzw. *Giardia* spezifischem Antigen (GSA 65) mittels monoklonaler Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben. GSA ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 65 kD. GSA und CSA werden bei der Vermehrung der Organismen gebildet und zeigen keine Kreuzreaktivität mit anderen Darmparasiten.

III. 6 Molekularbiologische Analyse der Talsperrensedimente

III. 6. 1 Zellaufschluss und Extraktion von Nukleinsäuren

III. 6. 1. 1 Mechanischer Zellaufschluss und Extraktion von Nukleinsäuren

Für den Aufschluss der Sedimentbakterien wurde ein speziell für Boden- und Sedimentproben entwickeltes System (FastDNA Spin Kit for Soil) nach Herstellerangaben verwendet. Es erlaubte die schnelle Extraktion genomischer DNA aus dem Sediment mittels zugehörigem FastPrep-Gerät.

Das System beruht auf der mechanischen Zerstörung der Zellen mittels Keramik- und Silikapartikeln in verschiedenen Größen und Formen. Nach Homogenisierung und Proteindenaturierung wurden in mehreren Zentrifugationsschritten Zelltrümmer und Sedimentpartikel entfernt. Anschließend erfolgte die Ausfällung der Proteine und die Bindung der DNA an eine Kieselerdematrix. Durch nachfolgende Waschschrte wurde die DNA aufgereinigt und danach die DNA von der Matrix eluiert. Das so erhaltene DNA-Eluat wurde bei -20°C gelagert und in Verdünnungen für verschiedene PCR-Protokolle eingesetzt. Von jeder Sedimentprobe wurde die DNA aus den sieben Horizonten extrahiert, und durch Mischen der extrahierten DNA eine Mischprobe des gesamten Sedimenthorizonts (0-5 cm) erstellt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Photometer Ultrospec 3000 nach Herstellerangaben.

III. 6. 1. 2 DNA-Isolierung durch enzymatisch-mechanischen Aufschluss

Zum molekularbiologischen Nachweis von Protozoen wurde eine Kombination aus enzymatischem und mechanischem Aufschluss gewählt. Hierzu wurde eine Proteinase K - Beadbeater-Behandlung in Kombination mit dem kommerziellen QIAamp™ Tissue Kit und einer Phenolisierung durchgeführt.

Zunächst wurden 300 µl Probenmaterial mit 180 µl Puffer ATL und 20 µl Proteinase K gemischt und bei 55 °C im Schüttler über Nacht inkubiert. Danach wurden 500 µl Beads (Zirkonium, 0,1 mm Durchmesser) und 500 µl Phenol mit 500 µl der so behandelten Probe gemischt und bei maximaler

Frequenz 12 min in einer Schwingmühle geschüttelt und anschließend 5 min bei 14.000×g abzentrifugiert. Dieser mechanische Schritt ergänzt den enzymatischen Schritt des Zellaufschlusses. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 400 µl Puffer AL gemischt und für 15 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 420 µl 96%iger Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde auf dem Vortexer gemischt und auf QIA-Säulchen gebracht. Diese Säulen wurden bei 8.000×g für 1 min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Mit zwei verschiedenen Waschlösungen (500 µl AW 1, 500 µl AW 2) wurde die DNA von störenden Substanzen gereinigt, abzentrifugiert (8.000×g 1 min, 8.000×g 3 min) und das jeweilige Filtrat verworfen. Durch Zugabe von 50 µl Puffer AE und Zentrifugation für 1 min bei 8.000×g wurde die aufgereinigte DNA von der Säule eluiert. Die aufgereinigte DNA wurde bei –20°C gelagert.

III. 6. 2 Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Methode zur *in vitro* Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäuren. Die Technik der PCR erlaubt die gezielte und spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mit hoher Effizienz (ALBERTS 1999, ATLAS 1993, BERTRAM 1991, GANTEN 1997).

Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes beruht auf der Wiederholung von drei Teilschritten, die einen Zyklus bilden. Der Schritt der Denaturierung trennt bei einer Temperatur von über 90 °C den DNA-Doppelstrang in Einzelstränge auf. Im nachfolgenden Schritt, dem Annealing, lagern sich die Startermoleküle (Oligonukleotide) durch Hybridisierung bei einer definierten Temperatur an die komplementären DNA-Stränge an und dienen damit der DNA-Polymerase als Startpunkte (Primer) für die Polymerisationsreaktion bei 72 °C. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl an DNA-Fragmenten aus dem vorhergehenden Zyklus, wobei theoretisch nach 20 Zyklen ein Anreicherungsfaktor von 10^6 erreicht wird.

Zur Durchführung einer PCR wird ein Mastermix erstellt, welcher alle für die Amplifikation benötigten Komponenten enthält. Die eingesetzten Primer sind Oligonukleotide mit einer typischen Länge von 15-25 bp, welche als Startermoleküle für die DNA-Polymerase dienen. Sie werden aus den flankierenden Bereichen des interessierenden DNA-Abschnittes abgeleitet, und in der PCR wird der zwischen den Primern liegende DNA-Bereich vervielfältigt. Die DNA-Polymerase fügt enzymatisch Nukleotide an das 3'-OH Ende einer vorhandenen DNA-Matrize (Primer) an. Die *Taq*-Polymerase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* ist hitzestabil und übersteht die während der Denaturierungsphasen herrschenden Temperaturen von über 90 °C ohne größere Aktivitätsverluste. Weiterhin enthält der Mastermix die vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), welche zur Extension der Primer (Verlängerung) benötigt werden.

Bei der nested und semi-nested PCR wird das erhaltene PCR-Produkt in einer zweiten Amplifikationsrunde unter Verwendung einer neuen, innerhalb des gebildeten PCR-Fragmentes liegenden Primerkombination nochmals amplifiziert (GASSEN 1994). Durch die Wahl von mindestens einem neuen (semi-nested PCR), intern gelegenen Primer wird gewährleistet, dass Produkte der ersten PCR-Reaktion als Matrize für die zweite PCR dienen können. Dadurch wird eine hohe Sensitivität erreicht (VOLOSSIOUK 1995).

Zum Nachweis der Mikroorganismen wurden Primersysteme mit unterschiedlichen Spezifitäten eingesetzt (Tabelle 3, Tabelle 4). Bei jeder PCR-Reaktion wurden eine Positiv- (um Reproduzierbarkeit und Sensitivität zu überprüfen) und eine Negativkontrolle (um evtl. Kontaminationen aufzudecken) mitgeführt. Die Positivkontrolle enthielt eine definierte Menge an Template-DNA. Die Negativkontrolle bestand aus einem kompletten Reaktionsansatz (Mastermix), der keine DNA enthielt.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Mastermix) (50 µl):

10× PCR-Puffer (enthält 15 mM MgCl ₂)	5,00 µl
dNTP Mix	5,00 µl
Strang-Primer (Forward) (10 pmol/µl)	1,00 µl
Gegenstrang-Primer (Reverse) (10 pmol/µl)	1,00 µl
AmpliTaqGold™ DNA-Polymerase (5 Unit/µl)	0,25 µl
A. bidest.	31,75-36,75 µl
Template-DNA	1,00- 5,00 µl

Zur Analyse sulfatreduzierender Mikroorganismen wurden zusätzlich MgCl₂ (25mM) (2,0 µl) und DMSO (100%) (2,0 µl) eingesetzt.

III. 6. 2. 1 Primerdesign

Die verwendeten Primer wurden entweder aus der Literatur übernommen oder mit Hilfe des Bioinformatikprogrammes ARB erstellt. Die Sequenz wurde spezifisch zur Zielsequenz gewählt und sollte möglichst nicht mit einem G oder C enden. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die verschiedenen Basen in einem ausgewogenen Verhältnis stehen, die Sequenzen weder inter- noch intramolekulare komplementäre Bereiche aufweisen und eine möglichst hohe Schmelztemperatur besitzen. Die Schmelztemperatur (T_m) bestimmt die Annealing-Temperatur (T_a). Schmelz- und Annealingtemperatur wurden nach folgenden Formeln errechnet (SUGGS 1981):

$$T_m = [(Anzahl\ von\ A+T) \times 2\ ^\circ C + (Anzahl\ von\ G+C) \times 4\ ^\circ C] \text{ und } T_a = T_m - 5\ ^\circ C.$$

Die errechneten Werte dienten als Anhaltspunkte und wurden in Folgeexperimenten optimiert.

III. 6. 2. 2 PCR-Protokolle

Soweit nicht anders beschrieben, wurden nachfolgende PCR-Reaktionen für den Gesamthorizont und die sieben Einzelhorizonte durchgeführt. In die PCR wurden jeweils Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 des DNA-Eluates eingesetzt.

PCR Nr. 1a und 1b: Mykobakterien-PCR-Protokoll (semi-nested PCR)

In dieser semi-nested PCR wurden mit Hilfe der Primer TPU1/R264 (SCHUPPLER 1995/ KIRSCHNER 1993) (1. Amplifikation) bzw. TPU1/R259 (2. Amplifikation) (SCHUPPLER 1995/ KIRSCHNER 1993) mykobakterielle 16S rRNA-Gensequenzen von ca. 240 bp amplifiziert.

PCR Nr. 2: Sequenzier-PCR für Mykobakterien

Zur Sequenzierreaktion wurde jeweils ein Primer der zweiten Amplifikation eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte parallel mit dem Strang- und dem Gegenstrangprimer.

PCR Nr. 3: Enterobakterien-PCR-Protokoll

Durch Verwendung der Primer TPU4 (SANDER 1998) und Enter1432 (SGHIR 2000) erfolgte die Amplifikation eines ca. 600 bp langen Fragments der 16S rDNA von Enterobakterien.

PCR Nr. 4a und 4b: Toxoplasmen-PCR-Protokoll (nested PCR)

Die in der nested PCR verwendeten Primer ToxB1694f/ToxB1887r (1. Amplifikation, Fragment von ca. 190 bp) bzw. ToxB1757f/ToxB1853r (STEUBER 1995) (2. Amplifikation, Fragment von ca. 130 bp) wurden zum spezifischen Nachweis des B1 Gens von Toxoplasmen eingesetzt.

PCR Nr. 5a und 5b: Legionellen-PCR-Protokoll (semi-nested PCR)

Von jeder Sedimentprobe wurde der Gesamthorizont sowie die oberste Horizontschicht von 0-0,5 cm auf das Vorhandensein von Legionellen getestet. Dabei wurden DNA-Verdünnungen von 1:10 und 1:100 sowie unverdünnte DNA eingesetzt. Zum spezifischen Nachweis der 16S rRNA-Gene von Legionellen wurden die Primer Leg-16S-858/Leg-16S-225 (1. Amplifikation, Fragment von ca. 650 bp) bzw. Leg-16S-858/Leg-16S-448 (CALVO-BADO) (2. Amplifikation, Fragment von ca. 430 bp) verwendet.

PCR Nr. 6: Cryptosporidien-PCR-Protokoll

Die Überprüfung des Gesamthorizontes auf das Vorkommen von Cryptosporidien erfolgte mit unverdünnter, 1:10 und 1:100 verdünnter DNA aus den Sedimentproben. Hierzu wurden die Primer CPF und CPR (LABERGE 1996) verwendet, um spezifisch ein 358 bp langes Fragment des Gens CpR1, welches für ein Oozysten-Protein-Gen der Cryptosporidien kodiert, zu amplifizieren.

PCR Nr. 7: Giardien-PCR-Protokoll

Mit dem Primersystem ABB 97F/ABB 220R (ROCHELLE 1997) wurde ein 163 bp langes Fragment des Giardia-spezifischen Hitzeschockproteins amplifiziert. GIA 1F (entwickelt innerhalb dieser Arbeit)/GGR (KAUCNER 1998) und GGL/GGR (KAUCNER 1998) amplifizieren Fragmente des Beta-Giardin Genes mit einer Länge von 207 bp und 171 bp.

PCR Nr. 8 bis 11: Universelle 16S rDNA-PCR-Protokolle

Das Ziel der universellen 16S rDNA-PCR ist es, möglichst alle in der Probe vorkommenden Bakterien zu erfassen. Daher befinden sich die Zielsequenzen der Primer in konservierten Bereichen des 16S rRNA-Gens.

- 8) TPU1/1387R (ca. 1360 bp langes Fragment) (SCHUPPLER 1995/MARCHESI 1998)
- 9) TPU1/1492R (ca. 1460 bp langes Fragment) (POLZ 1998)
- 10) TPU1/1525R (ca. 1500 bp langes Fragment) (COATES 1999)
- 11) TPU1/RTU4 (SANDER 1998)

PCR Nr. 12: Sequenzier-PCR-Protokoll für 16S rDNA

Zur Sequenzierung der 16S rDNA wurde der Primer TPU1 verwendet.

PCR Nr. 13: Amplifikation der Plasmid-Inserts

Die Plasmid-Inserts wurden ausgehend vom Koloniematerial mit den Primern M13f24 und M13r22 amplifiziert. Die Primer binden nahe des *lac*-Promotors bzw. im *lacZ* α -Fragment.

PCR Nr. 14: 16S rDNA-PCR für die DGGE

Es wurde von der extrahierten DNA aus den Horizonten die Verdünnung von 1:100 verwendet. Mit dem Primerpaar TPU1-GC und 515R (ZOETENDAL 1998) wurde ein ca. 500 bp langes Fragment der 16S rDNA inklusive GC-Klammer synthetisiert. Pro Reaktionsansatz wurde 2 μ l MgCl₂ als Zusatz verwendet.

PCR Nr. 15: Nitrifikanten-PCR

Die spezifische PCR für Ammoniak-oxidierende Bakterien basiert auf der Amplifikation eines 490 bp Abschnittes des Ammoniak-Monooxygenase Gens (*AmoA*) mit dem Primersystem *AmoA*-1F und *AmoA*-2R (ROTTHAUWE 1997). Als Positivkontrolle wurde DNA von *Nitrosomonas europaea* eingesetzt.

PCR Nr. 16: Denitrifikanten-PCR

Das verwendete Primersystem *NirS* (*NirS*1F/*NirS*6R) (BRAKER 1998) erreicht die spezifische Amplifikation von denitrifizierenden Bakterien. Das synthetisierte Fragment des Nitrit-Reduktase-Genes besitzt eine Länge von ca. 800 bp. Als Positivkontrolle wurde DNA von *Pseudomonas aeruginosa* verwendet.

PCR Nr. 17: Sulfatreduzierer-PCR

Für die Untersuchung der Horizonte auf das Vorhandensein von sulfatreduzierenden Bakterien wurden die Gene der alpha Untereinheit der Dissimilatorischen Sulfid Reduktase (DSR) amplifiziert. Es wurde die 1:100 Verdünnung der extrahierten DNA verwendet und als Positivkontrolle DNA von *Desulfotribrio desulfuricans* eingesetzt. Es wurden die Primerpaare DSR1F/DSR4R (gesamtes Gen der alpha Untereinheit der DSR) (WAGNER 1998) und DSR1F-GC/DSR FLR (DGGE-Analyse) (Primer DSR FLR entwickelt innerhalb dieser Arbeit) verwendet. Die Fragmente besaßen eine Länge von ca. 500 bp.

PCR Nr. 18: PCR für die ARISA

Mit den Primersystemen 16S 1406F/23S 115RT und 16S 1492F/ 23S 115RT (FISHER 1999) wurde die intergene Spacer-Region zwischen der 16S rDNA und der 23S rDNA amplifiziert. Die Spacer-Regionen sind in Sequenz und Länge bei verschiedenen Gattungen und Spezies hoch variabel. Die entstehenden Fragmentlängen können 400-1200 bp betragen (AMANN 1995).

III. 6. 2. 3 Primer

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer

Primer	Sequenz
R264 (Mykobakterien)	5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'
R259 (Mykobakterien)	5'-TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA-3'
Enter1432 (Enterobakterien)	5'-TCT TTT GCA ACC CAT TCC-3'
ToxB1694f (<i>Toxoplasma gondii</i>)	5'-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3'
ToxB1887r (<i>Toxoplasma gondii</i>)	5'-TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC-3'
ToxB1757f (<i>Toxoplasma gondii</i>)	5'-TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG-3'
ToxB1853r (<i>Toxoplasma gondii</i>)	5'-GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC-3'
Leg-16S-225 (Legionellen)	5'-AAG ATT AGC CTG CGT CCG AT-3'
Leg-16S-858 (Legionellen)	5'-GTC AAC TTA TCG CGT TTG CT-3'
Leg-16S-448 (Legionellen)	5'-GAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC-3'
CPF (<i>Cryptosporidium parvum</i>)	5'-GCC CAC CTG GAT ATA CAC TTT C-3'
CPR (<i>Cryptosporidium parvum</i>)	5'-TCC CCC TCT CTA GTA CCA ACA GGA-3'
ABB 97F (Giardien)	5'-AGG GCT CCG GCA TAA CTT TCC-3'
ABB 220R (Giardien)	5'-GTA TCT GTG ACC CGT CCG AG-3'
GGL (Giardien)	5'-AAG TGC GTC AAC GAG CAG CT-3'
GGR (Giardien)	5'-TTA GTG CTT TGT GAC CAT CGA-3'
GIA 1F (Giardien)	5'-ACG ACA GAA GCG CTC ACA A-3'
TPU1 (universell)	5'-AGA GTT TGA TC[C/A] TGG CTC AG-3'
TPU4 (universell)	5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C-3'
968F (universell)	5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'
RTU4 (universell)	5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC TGT T-3'
1387R (universell)	5'-GGG CGG [A/T]GT GTA CAA GGC -3'
1492R (universell)	5'-TAC GG[C/T] TAC GTT GTT ACG ACT T-3'
1525R (universell)	5'-AAG GAG GTG TTC CA[G/T] CC[A/G] CC-3'
515r (universell)	5'-GTA TTA CCG CGG C[G/T]G CTG GCA C-3'
M13f24 (Insert-Amplifikation)	5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'
M13r22 (Insert-Amplifikation)	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'
GC-Klammer	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG
AmoA-1F (Nitrifikanten)	5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3'
AmoA-2R (Nitrifikanten)	5'-CCC CTC [G/T]G[G/C] AAA GCC TTC TTC-3'
NirS1F (Denitrifikanten)	5'-CCT A[C/T]T GGC CGC C[A/G]C A[A/G]T-3'
NirS6R (Denitrifikanten)	5'-CGT TGA ACT T[A/G]C CGG T-3'
DSR1F (Sulfatreduzierer)	5'-AC[G/C] CA[C/T] TGG AA[A/G] CAC G-3'
DSR4R (Sulfatreduzierer)	5'-GTG TA[A/G] CAG TT[A/G/T] CC[A/G] CA-3'
DSR FLR (Sulfatreduzierer)	5'-A[A/G]C CGT C[A/G][A/G] ACT TGA A-3'
16S 1406F (ARISA)	5'-TG[C/T] ACA CAC CGC CCG T-3'
16S 1492F (ARISA)	5'-AAG TCG TAA CAA GGT A[A/G]C CG-3'
23S 115RTET (ARISA)	5'-GGG TT[C/G/T] CCC CAT TC[A/G] G-3'

Die Primer TPU1, 968F und DSR1F wurden parallel mit 5'-GC-Klammer für die DGGE-Analyse benutzt.

III. 6. 2. 4 PCR Programme

Tabelle 4: Verwendete PCR-Programme

PCR Nr.	Denaturierung (initial)		Zyklen							Extension (final)	
			Denaturierung		Annealing		Extension		Anzahl		
	Temp. [°C]	min	Temp. [°C]	min	Temp. [°C]	min	Temp. [°C]	min			Temp. [°C]
1a	95	10	95	1	64	1	72	1	35	72	10
1b	95	10	95	1	55	1	72	1,5	35	72	10
2			95	0,16	60	0,08	60	4	25		
3	95	10	95	1	57	1	72	1	35	72	10
4a	95	10	95	1	55	1	72	1,5	40	72	10
4b	95	10	95	1	55	1	72	1,5	40	72	10
5a	95	8	95	0,16	64	1	72	1	30	72	5
5b	95	8	95	0,5	66	1	72	1	20	72	5
6	95	10	95	1	45	1	72	1	40	72	2
7	94	10	94	2	50	2	72	2	40	72	5
8	95	10	95	1,5	50	1,5	72	2	35	72	10
9	95	10	95	1	50	1	72	1,5	35	72	10
10	94	9	94	2	55	2	72	2	35	72	7
11	95	10	95	1	50	1	72	1,5	35	72	10
12			96	0,16	60	0,08	60	4	25		
13	95	9	95	1	55	1	72	2	30	72	10
14	95	7	95	1	55	1,5	72	1,5	27	72	10
15	94	5	94	1	60	1,5	72	1,5	35	72	10
16	95	10	95	1	47	1,5	72	1,5	37	72	10
17	95	10	94	1	54	1,5	72	1,5	35	72	10
18	94	10	94	1	55	1	72	1,5	35	72	10

III. 6. 2. 5 Aufreinigen des PCR-Mastermixes

PCR-Reagenzien, z.B. die verwendeten DNA-Polymerasen, können geringe Mengen an DNA aufweisen. Oft enthalten sie DNA des *E. coli* Stammes, in dem sie exprimiert wurden oder DNA von Pseudomonaden, die bei der Aufreinigung des Proteins über kontaminierte Säulen in die Präparationen gelangen. Bei der anschließenden Aufreinigung des Enzyms wird kontaminierende DNA nicht vollständig entfernt, so dass die Taq-Polymerase noch Spuren von *E. coli* DNA enthalten kann. Vorrangig bei der universellen Amplifikation der 16S rDNA und bei der Enterobakterien-PCR wurde der Mastermix zur Entfernung von DNA-Kontaminationen durch Filtration aufgereinigt. Für die Filtration wurden Microcon YM-100 Säulen nach Herstellerangaben verwendet.

III. 6. 2. 6 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach der PCR wurden die Amplifikationsprodukte in einem 1,5%igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese analysiert. Es wurde ein Aliquot von 9 µl jeder PCR-Reaktion mit 2 µl Agarosegel-Ladepuffer gemischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Spannung und Laufzeit richteten sich nach der Fragmentlänge. DNA ist ein Polyanion, daher wandern die Fragmente zur Kathode. Durch die Vernetzung der Agarose bedingt, werden lange Fragmente stärker in der Wanderung durch das Gel zurückgehalten als kürzere Fragmente (ALBERTS 1999). Als interner Längenstandard wurde je nach erwarteter Länge des PCR-Produktes ein geeigneter DNA-Molekulargewichtsmarker (Smart Ladder, 0,2-10 kb oder Smart Ladder SF, 0,1-1 kb; Eurogentec Bel s.a., Belgien) mitgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in eine wässrige Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) überführt und für mindestens 20 min inkubiert.

Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen des DNA-Doppelstranges. Der Nachweis der DNA erfolgt durch Anregung mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm) (BERTRAM 1991). Die Dokumentation erfolgte mit einem digitalen Gel Dokumentations- System.

III. 6. 3 Klonierung von PCR-Produkten

III. 6. 3. 1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die amplifizierte DNA von den überschüssigen Komponenten der PCR-Reaktion (Nukleotide, Primer, DNA-Polymerase, Salze etc.) zu reinigen, wurde ein kommerziell erhältliches Kit auf Kieselerdebasis nach Herstellerangaben verwendet (QIAquick). Damit können DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 100 bp bis 10 kb aufgereinigt werden. Bei der Aufreinigung handelt es sich um eine Kombination von Mikrozentrifugationstechnologie und selektiver Bindungseigenschaft einer speziellen Silikamembran. In Gegenwart von hohen Konzentrationen an chaotropen Salzen, welche die Struktur von Wasser verändern, binden Nukleinsäuren an Silikageloberflächen. Nach einem Waschschrift wurde die gereinigte DNA eluiert. Das Eluat wurde bei -20 °C gelagert, bzw. in anschließende Klonierungen oder Sequenzierreaktionen eingesetzt.

III. 6. 3. 2 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die extrahierte DNA aus den Sedimenten enthält eine Vielzahl von Sequenzen. Die Sequenzierung ist erst nach dem Vereinzeln der Sequenzen durch Klonierung möglich. Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit nach Herstellerangaben verwendet. Durch kovalent an den linearisierten Vektor gebundene Topoisomerase ermöglicht dieses Kit eine schnelle und effiziente Klonierung von PCR-Produkten, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden. Aufgrund der terminalen Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase werden einzelne Desoxyadenosin-Nukleotide (dA) an das 3'-OH Ende aller DNA-Stränge während der PCR angefügt. Der im Kit enthaltene Plasmidvektor pCR[®] 2.1. bietet die dazu kompatiblen 3'-überhängenden Enden (dT) an. Die Transformation erfolgt auf chemischem Wege unter Verwendung der im Kit enthaltenen kompetenten *E. coli* Zellen (TOP10F'One Shot).

Das PCR-Produkt (Insert) wird in die Multiple Cloning Site (MCS) im lacZ-Gen integriert. Die Selektion auf positive Transformanten erfolgte auf IPTG und X-Gal supplementierten LB-Ampicillin-Platten. Auf diesem Medium können nur *E. coli* wachsen, welche den Vektor enthalten und damit das Ampicillin-Resistenzgen tragen. Klone mit einem Insert bilden weiße Kolonien, während sich die übrigen Kolonien blau anfärben. Diese Farbreaktion wird durch folgenden Mechanismus hervorgerufen: IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactosid) bindet an den lac-Repressor, ein zelluläres Protein, und aktiviert das lac-Operon. Dieser Vorgang aktiviert die enthaltenen Strukturgene lacZ (β -Galaktosidase), lacY (β -Galaktosidpermease) und lacA (Transacetylase) für die Lactose-Verwertung. Bei Rezirkularisierung des Vektors wird eine intakte β -Galaktosidase gebildet, welche X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid), ein farbloses Substrat, unter Mithilfe des Luftsauerstoffs zum blauen 5,5-Dibrom-4,4-Dichlorindigo umsetzt. Somit färben sich *E. coli* Kolonien ohne Insert blau.

Positive Transformanten wurden mittels sterilem Zahnstocher gepickt und vereinzelt. Ausgehend vom Koloniematerial wurden die Plasmid-Inserts mit den Primern M13 amplifiziert.

III. 6. 4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach SANGER (1977). Das Prinzip beruht auf der gezielten, statistisch verteilten Unterbrechung der Komplementärstrang-Synthese (KNIPPERS 1997) durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP's). Didesoxynukleotide besitzen keine 3'-OH-Gruppe. Dadurch kann der betreffende Strang nicht mehr verlängert werden und es kommt zum Kettenabbruch. Entscheidend für die Automatisierung der Methode ist die Markierung der ddNTP's durch Fluoreszenzfarbstoffe. Im verwendeten System sind die vier Didesoxynukleotide mit unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markiert („dye-labeled terminator“). Die Sequenzierung resultiert in einem Gemisch von DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Länge um jeweils eine Base unterscheiden. Dieses Gemisch wird elektrophoretisch aufgetrennt, die einzelnen Fragmente detektiert und daraus die Basenabfolge ermittelt.

Der Erfolg der Sequenzierung hängt wesentlich von der Reinheit der eingesetzten DNA ab. Die enzymatische Reaktion wird schon durch geringe Verunreinigungen empfindlich gestört (BERTRAM 1991). Die M13-PCR-Produkte wurden daher mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in die Sequenzierung eingesetzt. Zur Durchführung der Sequenzierung wurde das BigDye™ RR Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet. Als Sequenzierprimer dienten jeweils die Forward-Primer.

Die Sequenzierreaktion, die Aufreinigung der Sequenzierprodukte, Gelelektrophorese (ABI PRISM) und Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben.

III. 6. 4. 1 Datenbankvergleich der Sequenzen

Die vergleichende Analyse der 16S rRNA-Genbibliotheken erfolgte mit dem Computerprogramm HUSAR 3.0 (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, DKFZ Heidelberg), basierend auf GCG-Programmen (Genetic Computer Group, DEVEREUX 1984). Die phylogenetische Einordnung der 16S rDNA-Sequenzen erfolgte unter Verwendung des Bioinformatikprogrammes ARB der TU München und

des MPI Bremen. Datenbankvergleiche wurden weiterhin mit EMBL- (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) und RIDOM- (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms, Würzburg) Datenbanken durchgeführt (HARMSEN 1999). Die Analyse der DSR-Sequenzen erfolgte mit dem BLAST Algorithmus der NCBI Datenbank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

III. 6. 4. 2 Analyse der Sequenzhomologien

Zur Analyse der Sequenzhomologien wurden die Programmpakete MacMolly[®] Tetra, Version 3.10, 2000, Soft Gene GmbH als Freeware Edition und BioNumerics[™], Version 2.00, Applied Maths, Kortrijk, Belgien, genutzt.

III. 6. 5 Analyse mittels Denaturierender Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Mittels der DGGE-Technik können DNA-Moleküle gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz aufgetrennt werden. Die Technik basiert auf dem unterschiedlichen Laufverhalten der DNA-Moleküle in einem denaturierenden Gradienten. Eine Voraussetzung für die Analyse von DNA-Fragmenten mit der DGGE ist das Vorhandensein einer GC-reichen Sequenz von mindestens 40 Basenpaaren (GC-Klammer), welche während der PCR eingeführt wird. Diese GC-Klammer wird durch einen Primer eingebracht, welcher an seinem 5'-Ende die GC-reiche Region trägt. Diese Modifizierung der DNA verhindert im Gradientengel die vollständige Trennung der PCR-Produkte zu Einzelsträngen.

Die Konzentration an Acrylamid richtet sich nach der Länge der zu untersuchenden DNA-Moleküle. Der denaturierende Gradient wird durch Mischen von Gellösungen gleicher Konzentration an Acrylamid aber mit unterschiedlichen Konzentrationen von Harnstoff und Formamid erreicht. In der Anleitung des Herstellers sind die Mengen an Harnstoff und Formamid entsprechend der vollständigen Denaturierung in Prozent angegeben. Nach Einwanderung in das Gel wird der DNA-Doppelstrang durch die ansteigende Konzentration von Harnstoff und Formamid bis auf die GC-Klammer aufgeschmolzen. Basierend auf der unterschiedlichen Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin/Thymin und Guanin/Cytosin ist das Aufschmelzen der DNA direkt von der Sequenz abhängig. Dadurch wird der Doppelstrang in AT-reichen Bereichen früher aufgeschmolzen als in GC-reichen Regionen. Durch das partielle Öffnen der Doppelstränge verringert sich die Laufgeschwindigkeit des PCR-Produktes und das DNA-Fragment wird sterisch an der Wanderung im Gradientengel gehindert. Durch diesen Effekt entstehen bei optimaler Auftrennung des PCR-Produktes für verschiedene Sequenzen unterschiedliche Banden.

Für die DGGE wurde eine Ethanolfällung der PCR-Produkte durchgeführt und in 10 µl A. bidest. resuspendiert. Anschließend wurde 2,8 µl Ladepuffer zugegeben, gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Durchführung der DGGE erfolgte nach den Angaben des Herstellers (DCode System und Gradientenmischer). Es wurden DGGE-Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 7% und einem linearen Gradientenverlauf zwischen 43% und 60% Denaturierung verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 16 h bei einer konstanten Spannung von 75 V.

III. 6. 5. 1 Silberfärbung des Polyacrylamidgeles

Um auch geringe Mengen von DNA nachweisen zu können, wurde eine sensitive Silberfärbung durchgeführt. Diese Färbung arbeitet je nach verwendetem Protokoll mit der chemischen Umwandlung (Oxidierung) der DNA nach der elektrophoretischen Auftrennung unter Ausnutzung der Beschichtung und des Materials der Polybond-Folie, auf der das Gel gegossen wurde. Die aus der Oxidation der DNA hervorgehende OH-Gruppe kann selektiv Silberionen oxidieren und binden, womit bei Zugabe von Natriumkarbonat eine Braunfärbung der DNA-Banden ausgelöst wird. Eine wichtige Rolle spielt Natriumthiosulfat, es reduziert Silber und bringt das bei der Färbung unspezifisch ausgefallene Silber wieder in Lösung. Mit dieser Methode lassen sich noch 0,01 ng ds DNA/mm² Gel nachweisen.

Die Färbung erfolgte nach dem Silberfärbeprotokoll von BioRad nach Herstellerangaben. Die Dokumentation des gefärbten Gels erfolgte mittels eines digitalen Geldokumentationssystems (BioRad). Zur Identifizierung einzelner Banden wurde direkt im Anschluss an die Dokumentation des Gels entsprechende Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem wurden 100 µl A. dest. gegeben, für 20 min bei 95 °C und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Mit dem Überstand wurde am nächsten Tag eine Ethanol-fällung durchgeführt und das DNA-Pellet in 35 µl A. dest. resuspendiert. Für anschließende Reamplifikationen wurden 3 µl Template verwendet.

III. 6. 6 Analyse mittels Terminalem Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP)

Die T-RFLP erlaubt eine schnelle und effiziente Untersuchung von vielen Proben und stellt eine zuverlässige Methode zur Abschätzung der mikrobiellen Diversität dar. Mit dieser Technik werden molekulare Fingerprints erstellt, die Methode ist daher besonders geeignet für vergleichende Analysen (MARSH 1999). Im ersten Schritt wird das entsprechende Gen amplifiziert, wobei ein Primer eine 5'-Fluoreszenzmarkierung (FAM) trägt (TPU1-FAM/ 1387R). Die generierten Fragmente erhalten somit eine terminale Fluoreszenzmarkierung. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Amplifikate im Agarosegel und eine Aufreinigung (QIAquick). Der Restriktionsverdau mit den tetrameren Enzymen *MspI* und *RsaI* (New England BioLabs Inc., USA) wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Danach wurden 3,5 µl des Reaktionsansatzes mit 2,5 µl Formamid und 0,5 µl eines internen Längenstandards (GenScan 1000 Rox) gemischt, 3 min bei 94 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die resultierenden einzelsträngigen Fragmente wurden anschließend im automatischen Sequenziergerät ABI PRISM® 377 Genetic Analyzer aufgetrennt und detektiert. Die Analyse der T-RFLP Profile erfolgte unter Verwendung der GeneScan® Analysis Software.

III. 6. 6. 1 Auswertung und graphische Darstellung der T-RFLP Ergebnisse

Zur Auswertung der T-RFLP Fingerprints wurde das T-RFLP Operation Analysis Software Tool (TOAST) innerhalb dieser Arbeit in der Diplomarbeit von F. LUDWIG entwickelt. Dieses Programm wurde mit dem HyperCard System für Macintosh (Version 2.3.5) erstellt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels der Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research (PRIMER) v5 Software und Multi-Dimensionalem Scaling (MDS).

III. 6. 7 Analyse mittels Automatisierter Ribosomaler Intergener Spacer Analyse (ARISA)

Die Fingerprinttechnik ARISA beruht auf der Amplifikation der intergenen Spacer-Region zwischen der 16S und 23S rDNA. Die PCR wurde mit zwei Primerpaaren durchgeführt, wobei der Gegenstrang-Primer eine Fluoreszenzmarkierung (TET) trug (16S 1406F/23S 115RTET und 16S 1492F/23S 115RTET). Die Fluoreszenzmarkierung besteht aus dem Fluoreszenz-Amidit TET. Die Fragmentlängenbestimmung der 3'-markierten PCR-Produkte erfolgte nach Gelelektrophorese und Aufreinigung (QIAquick) mit dem automatischen Sequenziergerät ABI PRISM[®] 377 Genetic Analyzer und GeneScan[®] Analysis Software. Somit konnte eine Automatisierung der Methode erzielt werden.

Der Vorteil der ARISA liegt in einer schnellen Abschätzung der mikrobiellen Diversität und in einer Differenzierung sehr nahe verwandter Organismen. In der Spacer-Region (400-1200 bp Länge) (FISHER 1999) werden signifikante Sequenz-Heterogenitäten zwischen verschiedenen Spezies aber auch zwischen sehr nahe verwandten Spezies erwartet. Der Nachteil der ARISA besteht in einer möglichen Unterschätzung der vorhandenen Diversität, da verschiedene Organismen die gleichen Spacerlängen aufweisen können und in der ARISA somit nur als ein Peak repräsentiert werden (FISHER 1999).

IV ERGEBNISSE UND DISKUSSION

IV. 1 Die vergleichende 16S rDNA Analyse

Der große Vorteil molekularbiologischer Techniken gegenüber klassischen Analysen besteht in der Kultivierungsunabhängigkeit. Aber auch die vergleichende Sequenzanalyse unterliegt methodisch bedingten Limitierungen.

Die Lyse der Zellen und die Extraktion der Nukleinsäuren stellen erste kritische Schritte im PCR-vermittelten Ansatz zur Analyse des bakteriellen Spektrums einer Untersuchungsprobe dar. Ein selektiver bzw. unzureichender Zellaufschluss beeinflusst wesentlich das PCR-Ergebnis und verfälscht die Zusammensetzung einer Genbibliothek. Um einen realen Einblick in das Organismen-Spektrum in Umweltproben zu erhalten, ist es besonders wichtig, eine effiziente Extraktionsmethode anzuwenden.

In der Literatur werden verschiedene Methoden für die Lyse von Bakterien beschrieben, z.B. mechanisch mit Ultraschall oder Bead-Beater, enzymatisch mit Enzymen, Hitzebehandlung, Detergenzien oder Kombinationen (LEFF 1995, MORE 1994, SMALLA 1993, YEATES 1997). Die Extraktionsmethode hängt ab vom Zellwandaufbau der Bakterien (die Unterschiede im Zellwandaufbau bewirken eine unterschiedliche Lysierbarkeit der Mikroorganismen) (AMANN 1995) und vom Probenmaterial. Viele organische Verbindungen (z.B. Huminsäuren, bestehend aus komplexen Polyphenolen) aus Sedimenten oder Böden werden bei der Extraktion von DNA aufgrund ähnlicher Eigenschaften koextrahiert und wirken inhibierend auf die PCR (TSAI 1992). Die Inhibierung hat eine negative Beeinflussung der Polymeraseaktivität oder der Primerbindung zur Folge und führt so zu falsch-negativen Ergebnissen (TSAI 1992, ZHOU 1996). Aber auch verschiedene andere Substanzen wie Hämoglobin, Detergenzien, organische und phenolische Verbindungen, Fette, Polysaccharide, Proteine, Schwermetalle, Cellulose, Enzyme, Handschuhpulver oder zu hohe DNA-Konzentrationen im PCR-Ansatz können zu einer Inhibierung der PCR führen (WILSON 1997). Zur Entfernung der Kontaminationen sind meist zusätzliche Aufreinigungsschritte notwendig. Eine weitere Möglichkeit besteht im Verdünnen der in die PCR eingesetzten DNA, um eventuell inhibierende Substanzen auszuverdünnen (MANGIAPAN 1996). Durch die gleichzeitige Verringerung der DNA-Konzentration wird jedoch auch die Sensitivität der PCR herabgesetzt (CULLEN 1998, JACKSON 1997).

Neben falsch-negativen PCR-Signalen durch Inhibitoren können auch falsch-positive Ergebnisse durch die hohe Sensitivität der PCR das Resultat verfälschen. Bereits geringste Mengen kontaminierender DNA aus Luftaerosolen, verunreinigten Gefäßen oder Pipetten-Totvolumina können zu falsch-positiven Ergebnissen führen (BÖTTGER 1991). Eine weitere Problematik ergibt sich bei der Untersuchung von Umweltproben, die eine Vielzahl verschiedener Bakterienspezies enthalten. Dann besteht die Gefahr einer bevorzugten, selektiven Vervielfältigung von rRNA-Genen bestimmter Bakterien (KUHLMANN 2000). Einen direkten Einfluss auf die Amplifikation haben die Genomgröße und Kopienzahl der rRNA-Gene, die Auswahl der Primer und Amplifikationszyklen, sowie der GC-Gehalt der 16S rDNA (AMANN 1995, SUZUKI 1996).

IV. 1. 1 Untersuchung des DNA-Gehaltes in den Sedimenten

Um den möglichen Einfluss der Sedimenttiefe auf den DNA-Gehalt zu bestimmen, wurde nach der DNA-Extraktion der DNA-Gehalt der Sedimenthorizonte bestimmt.

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Böden oder Sedimenten birgt viele Problempunkte. Die Bodenstrukturen ermöglichen einen Schutz der Bakterienzellen vor Lyse (FROSTEGARD 1999). Weiterhin adsorbiert DNA an Bodenkolloide (z.B. Tonpartikel) was zu einer verminderten Ausbeute und damit Effizienz der Extraktion führen kann. Durch die in vorliegender Arbeit angewendete Methode zur DNA-Extraktion konnten diese Fehlerquellen weitestgehend ausgeschaltet und eine effiziente Abtrennung der Partikel wie auch Lyse der Zellen erreicht werden.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes verschiedener Sedimenthorizonte ergab eine Abnahme der Menge an DNA mit zunehmender Tiefe (Abbildung 3).

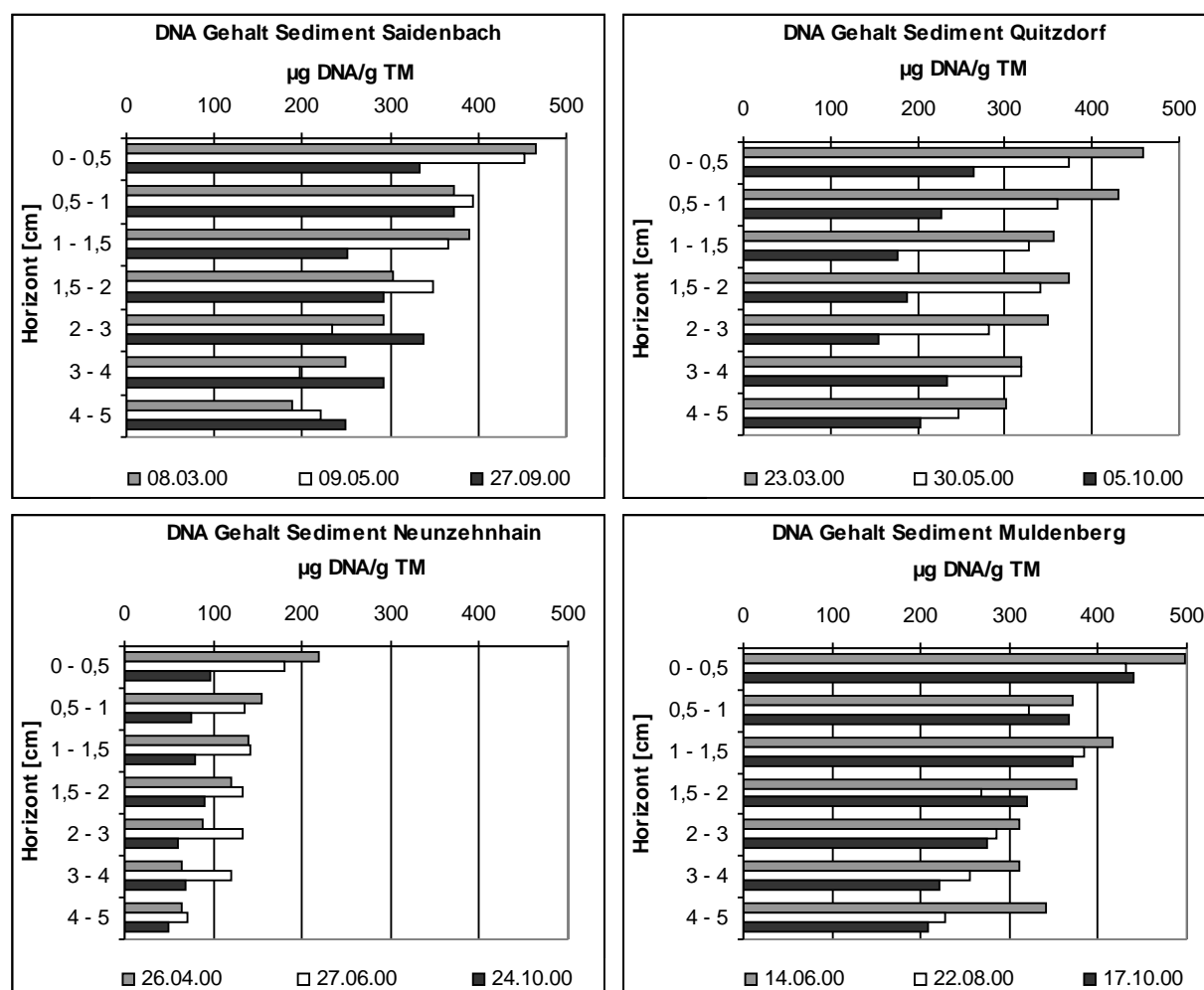


Abbildung 3 DNA-Gehalt in den Sedimenthorizonten der Talsperren

In der Abbildung 3 sind die DNA-Gehalte in $\mu\text{g DNA/g TM}$ des Sedimentes exemplarisch von drei ausgewählten Probenahmen der Talsperren dargestellt. Die Abnahme des DNA-Gehaltes in tieferen Horizonten konnte in allen Probenahmen festgestellt werden.

Diese Beobachtung korreliert mit Ergebnissen der Bestimmung der Gesamtzellzahlen in den untersuchten Sedimenthorizonten. In allen untersuchten Sedimenten wurde eine Abnahme der Gesamtzellzahlen in tieferen Sedimenthorizonten festgestellt (MAAßEN 2003). Die aus den Untersuchungen resultierende Abnahme der Gesamtzellzahl in der Tiefe spiegelt sich auch im DNA-Gehalt der Sedimenthorizonte wider (Abbildung 3).

Die Gesamtzellzahlen im Sediment der Talsperre Neunzehnhain betragen $1,3-4,5 \times 10^7$ Bakt./mg TM und in den eutrophen Talsperren Saidenbach und Quitzdorf $6-17 \times 10^7$ Bakt./mg TM (MAAßEN 2003). In den Sedimenten von Saidenbach und Quitzdorf wurden DNA-Gehalte von 200 µg/g TM und 450 µg/g TM ermittelt und im Sediment der Talsperre Neunzehnhain 50-200 µg/g TM. In Muldenberg wurden DNA-Gehalte von 150-250 µg/g TM nachgewiesen (Abbildung 3). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Trophie und der bakteriellen Gesamtzellzahl konnte jedoch nicht gezeigt werden (MAAßEN 2003).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen liegt in der geringeren Verfügbarkeit an organischem Substrat in tieferen Sedimentschichten (RAVENSCHLAG 2000).

IV. 1. 2 Einfluss verschiedener Primersets auf die 16S rDNA-Amplifikation

Um den potentiellen Einfluss verschiedener Primersysteme auf die Zusammensetzung der resultierenden 16S rDNA Bibliotheken (Amplifikation) zu testen, wurden die 16S rRNA-Gene der extrahierten Sediment-DNA mit den universellen Primerpaaren 27F/1387R und 27F/1525R unter Standardbedingungen amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden anschließend in *E. coli* kloniert und die Zusammensetzung der Genbibliotheken durch Sequenzierung analysiert. Diese Untersuchung ergab keine signifikanten Verschiebungen in der Zusammensetzung der analysierten 16S rDNA Bibliotheken. Bei der Amplifikation der 16S rDNA von Quitzdorf wurden mit den verwendeten Primersets 27F/1387R und 27F/1525R in 73% übereinstimmende Sequenztypen in den Genbibliotheken gefunden (kalkuliert nach MARTIN 2002). In weiteren Untersuchungen wurde das Primerpaar 27F/1387R eingesetzt.

IV. 1. 3 Reproduzierbarkeit der Methode, Vergleichende Sequenzanalysen

Um die Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit eingesetzten Technik zur Erstellung von 16S rDNA-Bibliotheken zu untersuchen, wurde die extrahierte DNA des Gesamthorizontes (0-5 cm) von zwei Probenahmen aller untersuchten Talsperrensedimente unabhängig voneinander mit dem gleichen Primersystem (27F/1387R) amplifiziert und unter gleichen Bedingungen kloniert. Die Analyse der resultierenden 16S rDNA Bibliotheken erfolgte durch Sequenzierung zufällig ausgewählter rekombinanter Klone.

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Analysen von Quitzdorf (Probenahmen 2 und 4) und Saidenbach (Probenahmen 2 und 4) dargestellt. Die mittels der 16S rDNA Analyse untersuchten Bibliotheken reflektierten reproduzierbar die mikrobielle Struktur der Sedimente. Spezielle Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft wurden in den erstellten Genbibliotheken auch quantitativ erkennbar, so z.B. die in den Sommermonaten beobachtete Cyanobakterienblüte. Diese

fürte in der 16S rDNA Bibliothek der eutrophen Talsperre Quitzdorf zu einem Anstieg entsprechender 16S rDNA-Sequenzen.

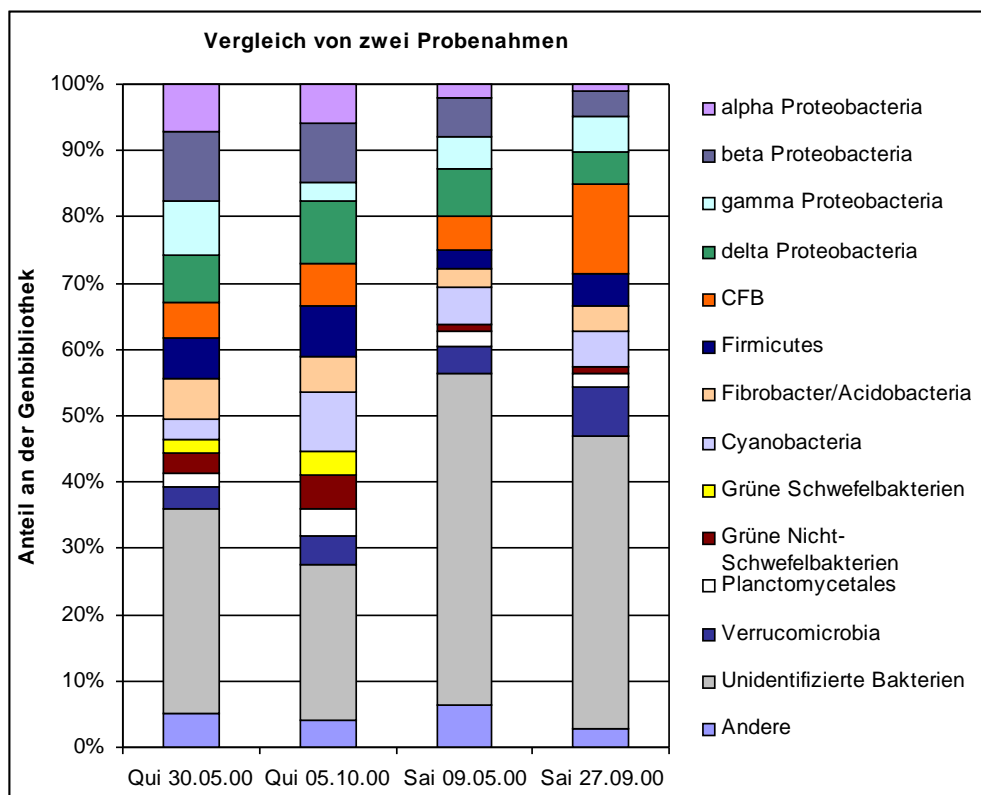


Abbildung 4 Vergleich der Resultate zweier unabhängiger 16S rDNA Bibliotheken

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen, wurde die extrahierte DNA aus zwei Probenahmen amplifiziert, kloniert und sequenziert. Es konnte eine stabile mikrobielle Zusammensetzung je Talsperrensediment festgestellt werden.

Die unabhängig voneinander erstellten Genbibliotheken eines Talsperrensedimentes wiesen insgesamt eine hohe Ähnlichkeit in ihrer mikrobiellen Zusammensetzung auf. Die mikrobiellen Biozönosen erwiesen sich als temporär weitgehend konstant in einem Sediment-Ökosystem. Dieses Resultat bekräftigt die Reproduzierbarkeit der hier angewendeten 16S rDNA Analyse. Die Untersuchung zweier Probenahmen eines Sedimentes verdeutlicht, dass die vorkommenden phylogenetischen Gruppen reproduzierbar dargestellt werden können. Die Konstanz der mikrobiellen Gemeinschaft ergibt sich aus der stabilen Schichtung des Sedimentes.

IV. 1. 4 Verteilung der phylogenetischen Hauptgruppen von Prokaryoten in den Sedimenten

Die untersuchten Talsperren unterscheiden sich in den chemischen Profilen wie auch in der Quantität und Qualität des sedimentierenden organischen Materials. Demzufolge waren Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung zu erwarten, verdeutlicht durch die Präsenz oder Abwesenheit verschiedener bakterieller Spezies oder phylogenetischer Gruppen. Das Ziel dieser Untersuchung war zunächst die Analyse der vorkommenden Bakterienspezies (Sequenztypen) und ihre Zuordnung zu den großen phylogenetischen Hauptgruppen von Prokaryoten, um so Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen den Talsperrensedimenten darstellen zu können. Von der Talsperre Saidenbach wurden insgesamt 4 Proben kloniert, welche den Gesamthorizont repräsentierten. Von Quitzdorf, Neunzehnhain und Muldenberg wurden jeweils zwei Probenahmen untersucht. Weiterhin wurden 16S rDNA Analysen des obersten und untersten Horizontes der Talsperren Quitzdorf und Neunzehnhain durchgeführt.

Insgesamt wurden 2541 rekombinante Klone der erstellten 16S rDNA Bibliotheken sequenziert und unter Verwendung des Programmpaketes HUSAR 3.0 und FASTA Algorithmus analysiert.

Um herauszufinden, ob es sich um ähnliche oder identische Sequenzen handelt, wurden diese Sequenzen aus der Klonierung der Gesamthorizonte in das Programm BioNumerics eingerechnet und ein Alignment erstellt. Mit Hilfe dieses Programmes konnten Ähnlichkeiten und Distanzen zwischen den einzelnen Sequenzen sicher festgestellt werden. Die Sequenzen wurden anschließend zu individuellen OTUs (operational taxonomic units) zusammengefasst. Ein OTU wurde basierend auf der phylogenetischen Einordnung und dem 97% Ähnlichkeitskriterium als Einheit definiert, für die sich eine Distanz oder Ähnlichkeit zu einer anderen Einheit messen lässt und beruht in dieser Untersuchung auf Sequenzen, die mehr als 97% an gemeinsamen Basen aufweisen. Da großes Interesse an der phylogenetischen Einordnung der Sequenzen bestand, wurden Vertreter dieser OTUs anschließend in bestehende phylogenetische Dendrogramme eingerechnet. Die phylogenetische Einordnung der OTUs erfolgte unter Verwendung des Bioinformatikprogrammes ARB (<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>) der TU München und des MPI Bremen.

Die 16S rDNA Bibliotheken der untersuchten Talsperrensedimente repräsentierten eine enorme mikrobielle Diversität (Abbildung 5). 1515 Sequenzen, d.h. über 60% aller Klone, wiesen Ähnlichkeiten von mehr als 97% zu 16S rDNA-Sequenzen kultivierter Organismen oder zu Sequenzen auf, welche in verschiedenen Diversitäts-Studien zur natürlichen bakteriellen Diversität gefunden wurden. Diese Sequenzen konnten in 14 bekannte phylogenetische Gruppen eingeordnet werden (einschließlich der alpha, beta, gamma und delta *Proteobacteria*).

Alle anderen Klone (und nicht in Abbildung 5 aufgeführte Gruppe) zeigten eine hohe Sequenzhomologie zu unidentifizierten, phylogenetisch bisher nicht eingeordneten Bakterien. Diese Sequenzen werden in Datenbanken unter dem Begriff „unidentified bacteria“ geführt. In den 16S rDNA Bibliotheken waren diese Bakterien mit Anteilen zwischen 19,8% (Sediment von Muldenberg) und 54,6% (Sediment von Saidenbach) repräsentiert.

Bei diesen Sequenzen handelt es sich vermutlich um neue, bisher nicht beschriebene Mikroorganismen. In den weiteren Ausführungen der vorliegenden Arbeit wird diese Gruppe als unidentifizierte Organismen bezeichnet.

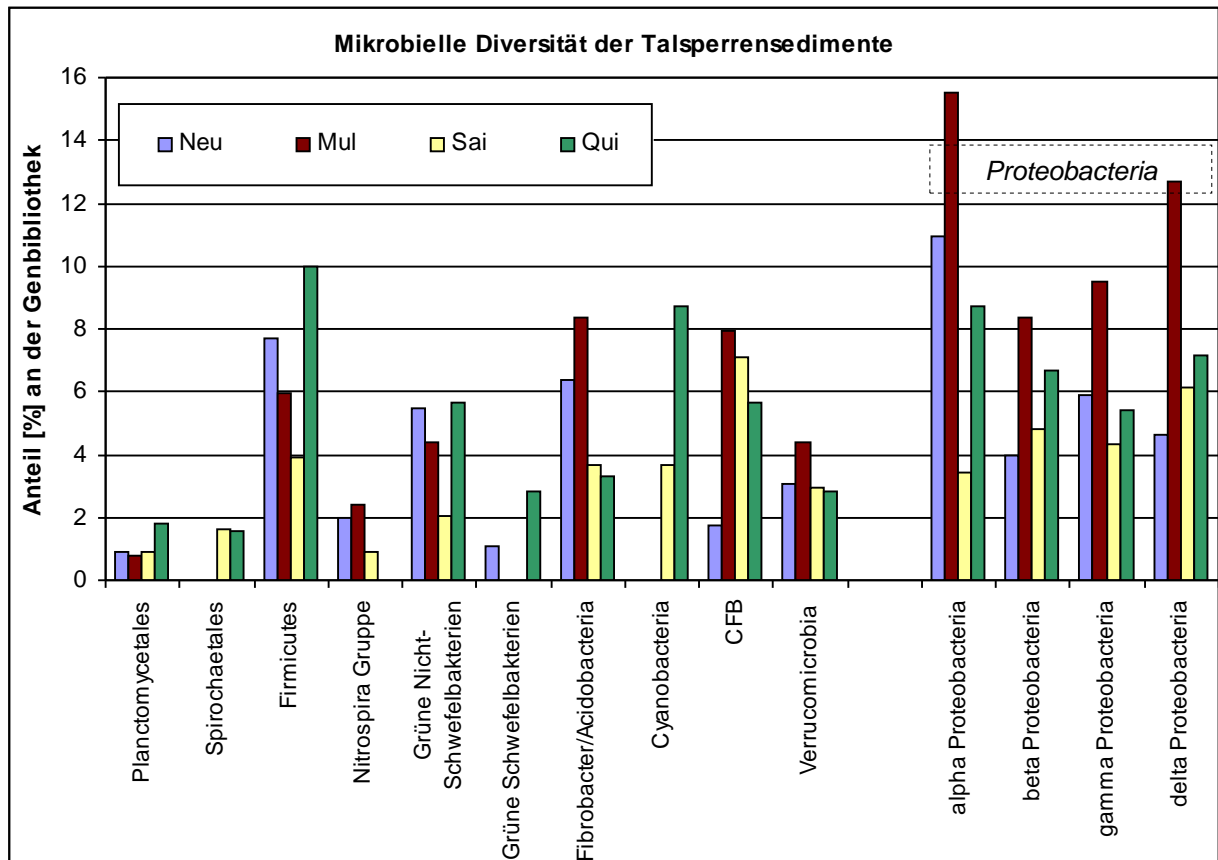


Abbildung 5 Mikrobielle Diversität in den Sedimenten, 0-5 cm

Dargestellt sind die detektierten phylogenetischen Hauptgruppen in den einzelnen Talsperren mit ihren Anteilen in den Genbibliotheken. Die *Proteobacteria* wurden in die alpha, beta, gamma und delta *Proteobacteria* unterteilt.

Bis auf Unterschiede innerhalb der Gruppen *Spirochaetales*, *Nitrospira*-Gruppe, Grüne Schwefelbakterien und Cyanobakterien waren in allen 16S rDNA-Bibliotheken Sequenzen der in Abbildung 5 aufgeführten phylogenetischen Hauptgruppen der Prokaryoten enthalten. Erst bei Betrachtung auf Spezies- und Gattungsebene wurden größere Unterschiede im Vergleich der einzelnen Talsperren deutlich. Deshalb wurde ein Vergleich der bakteriellen Zusammensetzung auf Spezies- und Gattungsebene durchgeführt.

IV. 1. 4. 1 Planctomycetales

Die *Planctomycetales* bilden ein eigenes Phylum innerhalb der Domäne *Bacteria*. Bisher sind nur wenige Informationen über dieses Phylum verfügbar. Die Ordnung der *Planctomycetales* mit der einzigen Familie der *Planctomycetaceae* umfasst die vier Gattungen *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* und *Isosphaera*. *Planctomyces* stellt die am besten untersuchte Gattung dar.

Physiologisch sind *Planctomyces*-Spezies typische fakultativ aerobe Chemoorganotrophe, die vor allem in aquatischen Habitaten vorkommen. Die Gattung *Isosphaera* ist ein filamentöses, gleitendes Bakterium, welches aus heißen Quellen isoliert wurde (MADIGAN 2001).

Der in dieser Arbeit bestimmte Anteil an Planctomyceten war bei allen untersuchten Talsperren im Vergleich zu anderen phylogenetischen Gruppen mit **unter 2%** eher gering (Abbildung 5). Dabei handelte es sich ausschließlich um unidentifizierte Bakterien, eindeutig phylogenetisch einzuordnende Vertreter wurden nicht gefunden (Abbildung 6).

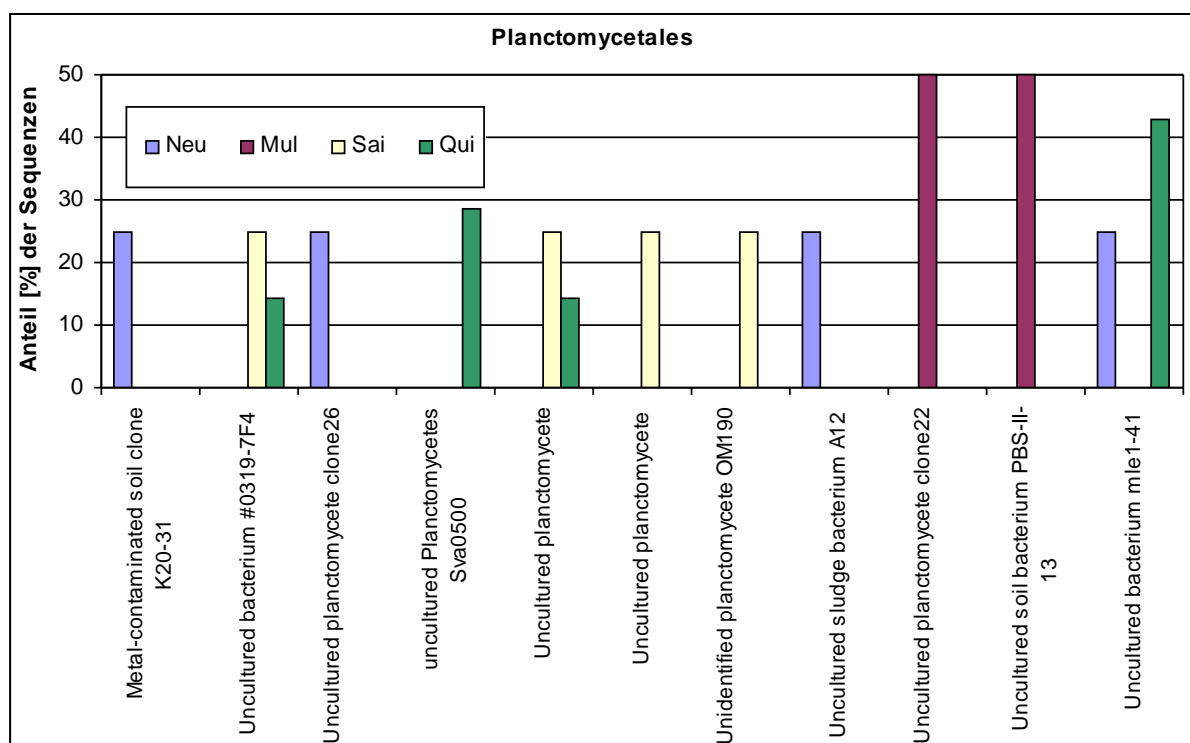


Abbildung 6 Sequenzen innerhalb der *Planctomycetales* in den Genbibliotheken

In der Abbildung sind die detektierten Sequenzen und ihre Anteile innerhalb der Planctomyceten dargestellt. Dabei konnten deutliche Unterschiede zwischen den Talsperren festgestellt werden.

Die Sequenz „Uncultured planctomycete clone22“ und „Uncultured planctomycete clone26“ wurden erstmals von CHATZINOTAS im Waldboden gefunden. Die beiden Sequenzen „Uncultured planctomycete“ besitzen die Accession-Nr. AJ290172 (Saidenbach, Quitzdorf) und AJ290180 (Saidenbach) und konnten von FELSKE dem Phylum der *Planctomycetales* zugeordnet werden. Innerhalb der detektierten Sequenzen wurden drei Sequenzen übereinstimmend in zwei Talsperren gefunden, alle anderen Sequenzen kamen nur in jeweils einer der Talsperren vor. Die Sequenzen von Uncultured bacterium #0319-7F4, und Uncultured planctomycete (Accession-Nr. AJ290172) wurden in

Quitzdorf und Saidenbach gefunden, während die Sequenz von Uncultured bacterium mle1-41 in Quitzdorf und Neunzehnhain vorkam. Dieses Bakterium wurde von LaPARA (2000) auch bei der Untersuchung der mikrobiellen Besiedlung von Bioreaktoren mit pharmazeutischem Abwasser gefunden und als ein dem Genus *Pirellula*-verwandtem Bakterium zugeordnet.

Signifikante Zellzahlen von Vertretern der *Planctomycetales* konnten von LLOBET-BROSSA im Wadden Sea Sediment (1998) in anoxischen Zonen nachgewiesen werden. RAVENSCHLAG (2000) beschrieb ein quantitativ bedeutendes Vorkommen von Planctomyceten im Smeerenburgfjorden Sediment in einer Größenordnung von 1,5 bis 3,7% an der GZZ.

Höchstwahrscheinlich handelt es sich um ubiquitär vorkommende Spezies, für die noch viel Forschungsbedarf besteht.

IV. 1. 4. 2 Spirochaetales

Die morphologisch einzigartigen Spirochaeten bilden eine weitere phylogenetische Hauptlinie der *Bacteria*. Sie sind in aquatischen Habitaten und bei Tieren weit verbreitet, leben saprophytisch oder als harmlose Schmarotzer. Einige Vertreter rufen Krankheiten hervor, darunter die bedeutende Geschlechtskrankheit Syphilis. Spirochaeten werden auf der Grundlage von Habitat, Pathogenität, rRNA-Sequenzen und morphologischen und physiologischen Merkmalen in acht Gattungen (*Cristispira*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Leptonema*, *Brachyspira* und *Brevinema*) eingeteilt. Die Lebensweise ist chemoorganotroph, anaerob bis aerob und es werden keine Sporen und nur selten Pigmente gebildet. Spirochaeten sind natürlicherweise resistent gegen Rifampicin (offenbar besitzen diese Organismen andere RNA-Polymerasen) und unter Laborbedingungen nur sehr schwer zu kultivieren (z. T. nur in Versuchstieren möglich).

Vertreter der *Spirochaetales* wurden nur in den 16S rDNA Bibliotheken der Sedimente Quitzdorf und Saidenbach gefunden. Innerhalb dieser Genbibliotheken wiesen die entsprechenden Sequenzen eine Abundanz von **1,5 bis 1,6%** (Abbildung 5) und ein völlig verschiedenes Muster auf Speziesebene auf (Abbildung 7).

In der Genbibliothek von Saidenbach konnten vier verschiedene Vertreter nachgewiesen werden: mit einem Anteil von 57,1% an der Population der *Spirochaeta* das Uncultured eubacterium WCHB1-40 (Accession-Nr. AF050549) und mit jeweils 14,3% das Uncultured eubacterium WCHB1-30 (Accession-Nr. AF050551), *Olavius loisae* endosymbiont 4 (Accession-Nr. AF104475) und *Spirochaeta aurantia* (Accession-Nr. M57740). Die Sequenzen der Uncultured eubacteria WCHB1-40 und WCHB1-30 wurden von DOJKA (1998) in einer 16S rDNA Bibliothek einer methanogenen Zone kohlenwasserstoffbelasteter Böden von Grundwasserleitungen gefunden und den *Spirochaetales* zugeordnet. *Spirochaeta aurantia* zeichnet sich durch eine orange Pigmentierung aus und stellt einen fakultativen Aerobier dar, welcher Zucker über die Glykolyse unter anaeroben Bedingungen vergärt und aerob zu Kohlendioxid und Acetat oxidiert (MADIGAN 2001).

In Quitzdorf wurden drei Vertreter der Spirochaetales gefunden: mit 16,7% Anteil an den *Spirochaetales* das Bakterium Uncultured Treponema clone HsDiSp319 (Accession-Nr. AB032009) und *Spirochaeta alkalica* (Accession-Nr. X93927) sowie mit 66,6% Anteil *Spirochaeta* sp. (Accession-Nr. X97096). Das Bakterium mit der Sequenz „Uncultured Treponema clone HsDiSp319“ stellt einen

metabolisch ungewöhnlichen Spirochaeten dar. Die Sequenz wurde erstmals von LIDA (2000) im Darm von Termiten nachgewiesen. Dieser Mikroorganismus kann möglicherweise das bei der Vergärung von Glukose freiwerdende H_2 und CO_2 zu Acetat umwandeln und ist somit homoacetogen. Diese Form des Energiestoffwechsels wurde bisher nur bei Clostridien beschrieben (MADIGAN 2001). Das Vorkommen von *Spirochaetales* ausschließlich in Saidenbach und Quitzdorf deutet auf Parallelen zwischen diesen Talsperren hin. Um Rückschlüsse auf die Funktion dieser gefundenen Organismen im Ökosystem zu ziehen, müssten diese Vertreter im Labor kultiviert und charakterisiert werden.

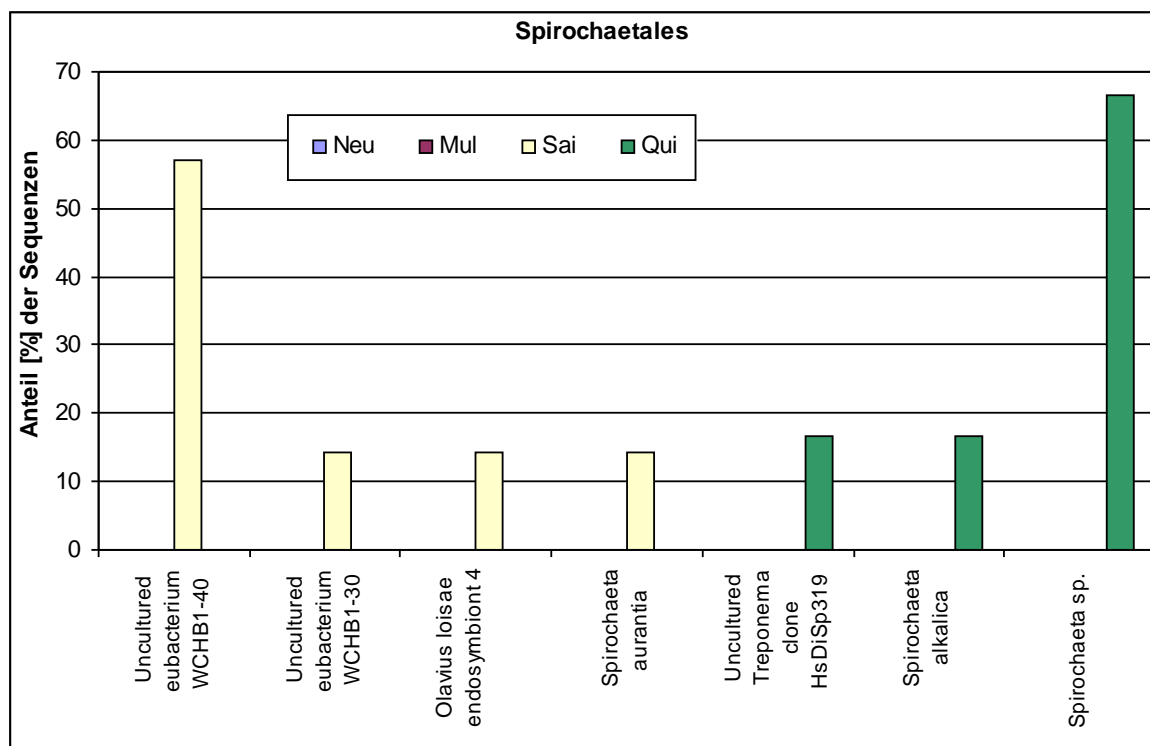


Abbildung 7 Sequenzen innerhalb der *Spirochaetales* in den Genbibliotheken

Die *Spirochaetales* konnten nur in Saidenbach und Quitzdorf nachgewiesen werden. Dabei ergab sich ein völlig unterschiedliches Muster auf Speziesebene.

IV. 1. 4. 3 Firmicutes

Die Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* beinhaltenden *Firmicutes* zeichnen sich durch die Fähigkeit der Endosporenbildung aus und sind in der Regel gram-positive Bakterien. Innerhalb der Endosporenbildner besteht eine beträchtliche Heterogenität, der GC-Gehalt von *Bacillus*-Spezies variiert über einen Bereich von 40%. Ökologisch sind die *Firmicutes* sehr nahe verwandt, sie kommen in der Natur vornehmlich im Boden vor. Die Sporen stellen eine hitze- und austrocknungsresistente Struktur dar, welche lange Zeit im Ruhezustand verbringen kann und in der Natur von beträchtlichem Wert für das Überleben ist. Innerhalb der aerob lebenden *Bacilli* produzieren viele Spezies extrazelluläre hydrolytische Enzyme, die komplexe Polymere (Polysaccharide, Nukleinsäuren und Lipide) abbauen, und es so den Mikroorganismen ermöglichen, diese Produkte als Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren zu verwenden. Viele *Bacillus* spp. produzieren Antibiotika, z.B. Bacitracin, Polymyxin, Tyrocidin oder Circulin.

Vertreter der *Firmicutes* wurden in allen untersuchten Talsperren mit einer hohen Diversität detektiert. Hohe Anzahlen von Sequenzen der *Firmicutes* wurden in den Genbibliotheken von Neunzehnhain und Quitzdorf gefunden, in Neunzehnhain betrug der Anteil der *Firmicutes* an der gesamten Genbibliothek ca. **10%**, die geringsten Anteile wurden in Saidenbach mit ca. **4%** ermittelt (Abbildung 5). Spezies der Gattung *Bacillus* und *Clostridium* konnten in allen Talsperren nachgewiesen werden, wobei die meisten verschiedenen Sequenzen in der Genbibliothek der Talsperre Saidenbach gefunden wurden (Abbildung 8).

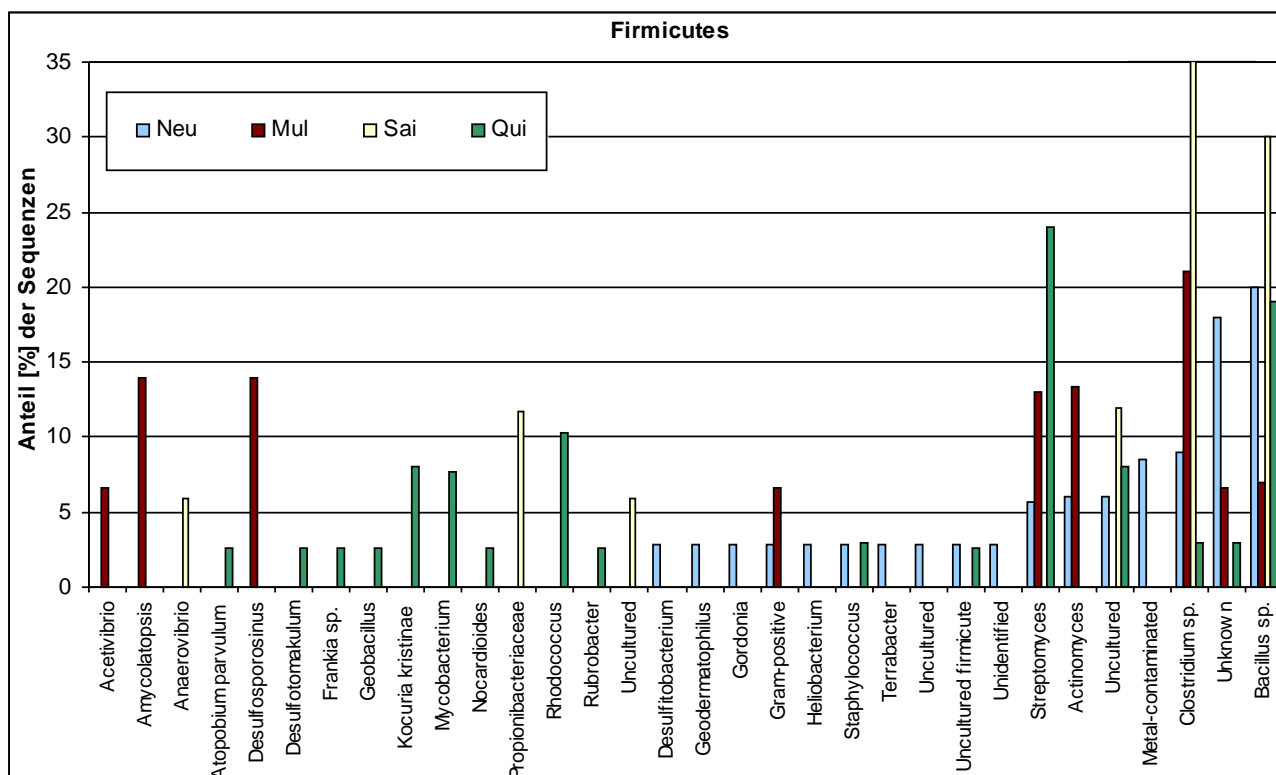


Abbildung 8 Sequenzen innerhalb der *Firmicutes* in den Genbibliotheken

Sequenzen von Vertretern der *Firmicutes* konnten in allen Talsperren detektiert werden, darunter Spezies der Gattung *Clostridium* und *Bacillus*.

Sulfatreduzierende Mikroorganismen innerhalb der *Firmicutes* wurden im Muldenberg-Sediment detektiert: *Desulfosporosinus* sp. S8 (Accession-Nr. AF076247) und *Desulfosporosinus* sp. 5apy (Accession-Nr. AF159120). *Desulfotomakulum kuznetsovii* (Accession-Nr. Y11569) war in der Genbibliothek von Quitzdorf enthalten. Ausschließlich in Saidenbach konnten *Propionibacteriaceae* (KoProp1) (Accession-Nr. X82875) gefunden werden.

Unidentifizierte Bakterien innerhalb der *Firmicutes* erwiesen sich hauptsächlich als die von LÜDEMANN (2000) beschriebenen Uncultured bacteria ARFS-2, ARFS-13, ARFS-21 und ARFS-32 und die Unknown Actinomycetes (MC 9), (MC 13), (MC 22), (MC 26), (MC 58) und (MC 64), welche in der Arbeit von STACKEBRANDT (1993) in australischen Sedimentproben nachgewiesen und phylogenetisch eingeordnet wurden. Da diese Sequenzen auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnten, handelt es sich hier höchstwahrscheinlich um ubiquitär vorkommende

Sequenzen. Die Talsperrensedimente stellen demnach potentielle Reservoirs für sporenbildende Mikroorganismen dar.

IV. 1. 4. 4 Nitrospira

Nitrifizierende Bakterien sind chemolithotrophe Organismen und werden aufgrund ihrer Morphologie und Umsetzung von Oxidationsreaktionen in verschiedene Gattungen unterteilt. Die Klasse der Nitrospira umfasst neben kultivierten Organismen (*Nitrospira*, *Leptospirillum*, *Thermodesulfovibrio*) auch viele Sequenzen unidentifizierter Bakterien. In allen Talsperrensedimenten konnten Vertreter der Gattung Nitrospira mit einer Abundanz von **1% bis 2,5%** nachgewiesen werden (Abbildung 5). Dabei konnten in den Genbibliotheken von Saidenbach und Neunzehnhain vier verschiedene Sequenzen gefunden werden, in Quitzdorf zwei und eine in Muldenberg (Abbildung 9). Bei der Sequenz von Muldenberg handelte es sich um das Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium MNF8 (Accession-Nr. AF293012), welches auch in Saidenbach und Neunzehnhain detektiert wurde. Diese Sequenz wurde von STEIN (2001) bei der Untersuchung von *Bacteria*- und *Archaea*-Populationen gefunden und phylogenetisch als *Nitrospira moscoviensis* eingeordnet. Alle anderen Sequenztypen kamen spezifisch in einer Talsperre vor. Dies deutet auf eine mögliche Relevanz als Indikatororganismen in den Talsperren hin. Um diese Aussage zu bestätigen, müssten weitere Talsperren untersucht werden.

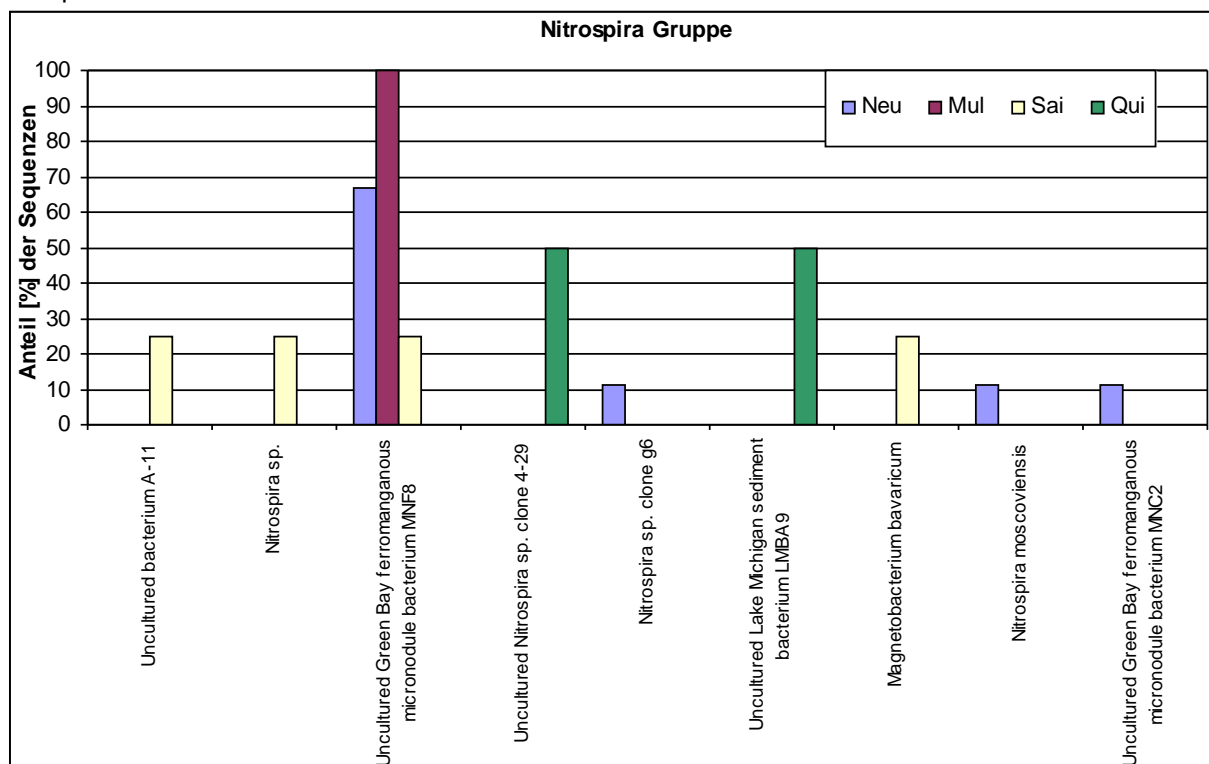


Abbildung 9 Sequenzen innerhalb der *Nitrospira* in den Genbibliotheken

Sequenzen von Vertretern der Nitrospira wurden in allen Talsperrensedimenten nachgewiesen. In Muldenberg wurde mit einem hohen Anteil an der Genbibliothek nur eine einzige Sequenz detektiert.

IV. 1. 4. 5 Grüne Nicht-Schwefelbakterien (*Chloroflexi*)

Dieses Phylum der *Bacteria* ist phylogenetisch eigenständig und enthält wenige Gattungen, von denen die am besten bekannte der anoxyphototrophe *Chloroflexus* ist. Alle bisher kultivierten Vertreter sind thermophil. *Thermomicrobium* ist ein chemotrophes Mitglied dieser Gruppe, das als strikt aerobes, gram negatives Stäbchen optimal in komplexen Medien bei 75 °C wächst. Die meisten Grünen Nicht-Schwefelbakterien sind filamentöse Prokaryoten, die in neutralen bis alkalischen heißen Quellen dicke mikrobielle Teppiche bilden. *Chloroflexus*-ähnliche Organismen wurden auch in nichtthermalen marinen mikrobiellen Teppichen gefunden. Die Grünen Nicht-Schwefelbakterien spielen eine bedeutende Rolle im Kohlenstoff- und Schwefelkreislauf der Erde, da sie an der Oxidation von Sulfid zu Schwefel und Sulfat in aquatischen Ökosystemen beteiligt sind, welche eine wichtige biogeochemische Aktivität in geschichteten Gewässern darstellt (ACHENBACH 2001).

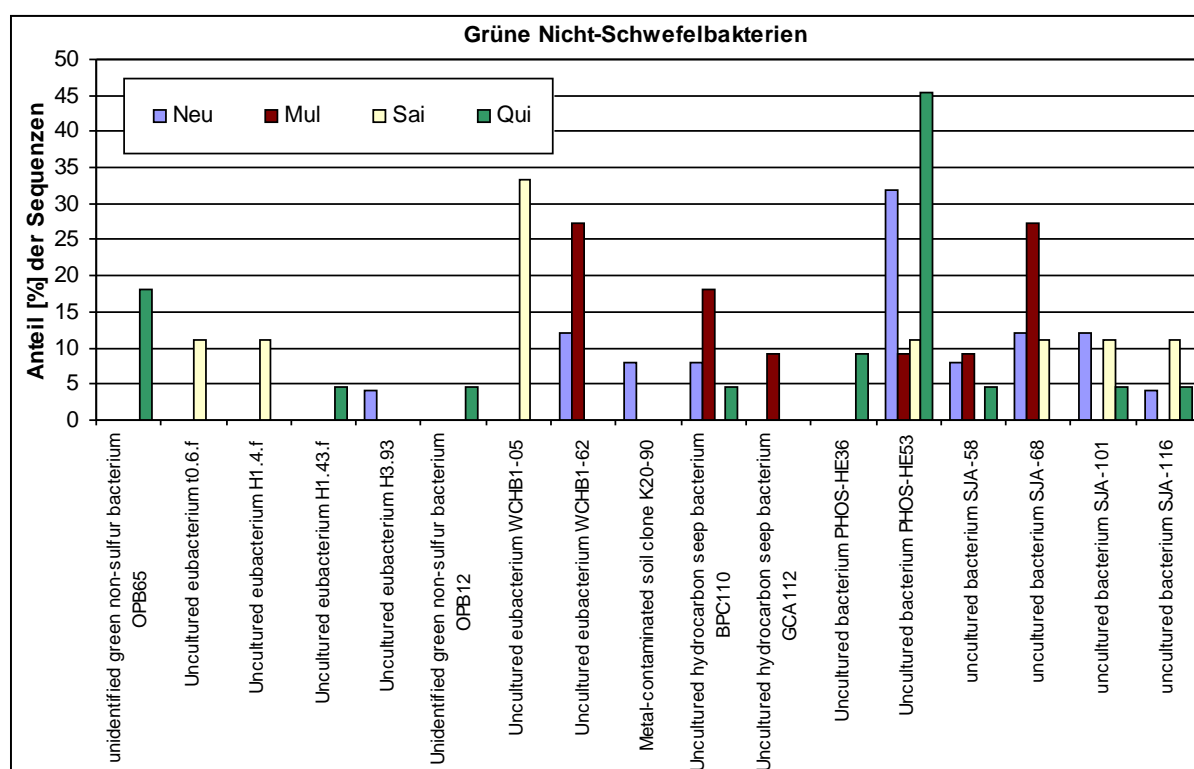


Abbildung 10 Sequenzen innerhalb der Grünen Nicht-Schwefelbakterien in den Genbibliotheken

Es wurden in allen Talsperrensedimenten ausschließlich unidentifizierte Vertreter detektiert.

In dieser Arbeit wurden in allen Talsperren ausschließlich bisher unidentifizierte Vertreter der Grünen Nicht-Schwefelbakterien mit einer Abundanz von **2% bis 5,5%** nachgewiesen (Abbildung 5). In allen Talsperren konnten Sequenzen des Uncultured bacterium SJA (Accession-Nr. AJ009468, AJ009475, AJ009480 und AJ009487) und des Uncultured bacterium PHOS-HE (Accession-Nr. AF314435 und AF314439) detektiert werden (Abbildung 10). Das Vorkommen dieser Organismen in allen Talsperren deutet auf eine potentielle ökologische Relevanz hin. Die Organismen sind in den Talsperren höchstwahrscheinlich an den mikrobiellen Stoffumsetzungen beteiligt. Die nicht in Muldenberg gefundenen Uncultured eubacteria H1.4.f, H1.43.f und H3.93 wurden erstmals von CHANDLER (1998)

bei der Untersuchung der mikrobiellen Diversität im Paleosol beschrieben und in die *Chloroflexaceae* eingeordnet. Das Unidentified green non-sulfur bacterium (Accession-Nr. AF027031, AF027036) wurde ausschließlich in Quitzdorf gefunden, das Uncultured eubacterium t0.6.f (Accession-Nr. AF005745) nur in Saidenbach und die Sequenz des Metal-contaminated soil clone K20-90 (Accession-Nr. AF145874) wurde nur im Sediment von Neunzehnhain detektiert. Das unterschiedliche Vorkommen dieser Sequenzen weist auf potentielle Indikatoren für Umweltbedingungen hin.

IV. 1. 4. 6 Grüne Schwefelbakterien (Chlorobiaceae)

Grüne Schwefelbakterien sind unbewegliche, strikt phototrophe Organismen, welche anaerobe Wachstumsbedingungen benötigen (anoxygene Photosynthese) und nur wenige organische Verbindungen assimilieren können. Bei der Entstehung anoxischer Bedingungen spielt H_2S , welches von sulfat- und schwefelreduzierenden Organismen produziert wird, eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zu den phototrophen Purpurbakterien lagern Grüne Schwefelbakterien den während der Photosynthese entstehenden elementaren Schwefel extrazellulär ab. Sulfatreduzierende Bakterien sind in der Lage, mehr als 50% der organischen Stoffe zu oxidieren (JÖRGENSEN 1974). In Seen, in denen die H_2S -enthaltenden anoxischen Schichten meist nur in Tiefen vorkommen, in die wenig Licht vordringt, haben die *Chlorobiaceae* gegenüber den phototrophen Purpurbakterien einen deutlichen Vorteil. Dieser Vorteil ergibt sich aus der Fähigkeit, bei geringen Lichtintensitäten wachsen zu können (Besitz von Chlorosomen). Erst durch die Einführung molekularbiologischer Untersuchungstechniken wurde erkannt, dass phototrophe Bakterien nicht einem einzigen Phylum angehören sondern in mehreren phylogenetischen Hauptlinien ihren Ursprung besitzen. Einige Spezies erschienen plötzlich isoliert von anderen Arten und bildeten eigene Gruppen (z.B. *Chlorobiaceae*), andere befinden sich unter den nicht-phototrophen Arten (z.B. innerhalb der *Proteobacteria*). Erst allmählich wurde klar, dass innerhalb der Hauptgruppen phototropher Bakterien (auf Gattungs- und Speziesebene) starke Diskrepanzen zwischen der taxonomischen Einordnung und der phylogenetischen Verwandtschaft bestehen (KAWASAKI 1993, IMHOFF 1998). Erste Erkenntnisse der Phylogenie innerhalb der Familie der Grünen Schwefelbakterien wurden auf der Basis von 16S rDNA-Sequenzen erlangt (OVERMANN und TUSCHAK 1997).

In der vorliegenden Untersuchung wurden Unterschiede zwischen den Talsperren innerhalb der Grünen Schwefelbakterien deutlich. Vertreter der Grünen Schwefelbakterien waren ausschließlich in den 16S rDNA Bibliotheken der Talsperren Quitzdorf (Abundanz von **3%**) und Neunzehnhain (Abundanz von **1%** an der gesamten Genbibliothek) repräsentiert (Abbildung 5). Die im Sediment von Quitzdorf und Neunzehnhain gefundenen Sequenzen des Uncultured bacterium PHOS-HE36 mit der Accession-Nr. AF314435 (Abbildung 11) wurden erstmals von DABERT (2001) bei der Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft eines konventionellen anaerob-aeroben Sequencing Batch Reaktor beschrieben. Dabei wurde vermutet, dass die vorkommenden Bakterien sowohl Sauerstoff wie auch Nitrat zu veratmen vermögen. Im Gegensatz zu Quitzdorf repräsentierte die 16S rDNA Bibliothek von Neunzehnhain weitere Grüne Schwefelbakterien-ähnliche Sequenzen. Die Sequenz Uncultured bacterium PHOS-HC15 (Accession-Nr. AF314426) wurde ebenfalls von DABERT beschrieben. Dieses Bakterium ist ein potentieller Indikator für das Vorkommen von Sulfiden in der oligotrophen Talsperre

Neunzehnhain. Das Uncultured green sulfur bacterium GR-296.II.73 (Accession-Nr. AJ301570) wurde bereits in Wasserproben aus dem Uranbergbau durch SELENSKA-POBELL (2002) nachgewiesen und in die Ordnung *Chlorobi* eingeordnet.

Eine mögliche Erklärung für das Vorkommen von Grünen Schwefelbakterien in der oligotrophen Talsperre Neunzehnhain könnte die enorme Sichttiefe sein. Licht kann bis zur Sedimentoberfläche gelangen und organisches Material *in situ* durch benthische Mikroalgen produziert werden und für Grüne Schwefelbakterien verfügbar werden. Weiterhin könnte allochthones organisches Material aus den umliegenden Wäldern den Mikroorganismen in der Talsperre als organische Kohlenstoffquelle dienen.

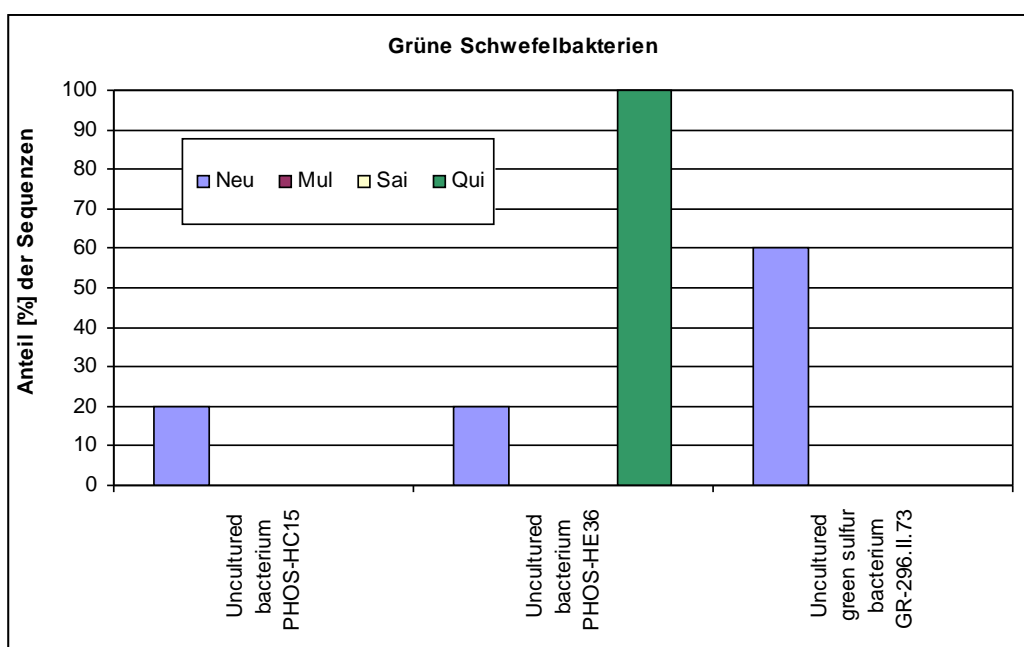


Abbildung 11 Sequenzen innerhalb der Grünen Schwefelbakterien in den Genbibliotheken

Die Grünen Schwefelbakterien kamen nur in Neunzehnhain und Quitzdorf vor, wobei es sich ausschließlich um unidentifizierte Vertreter handelt.

IV. 1. 4. 7 Fibrobacter/Acidobacteria

Sequenzen von Vertretern der Domäne *Fibrobacter/Acidobacteria* konnten nach Literaturangaben bisher aus 16S rDNA Bibliotheken aller Habitats auf der Welt nachgewiesen werden. Das Verhältnis von kultivierten Organismen zu lediglich als Sequenzen repräsentierten Vertretern ist in diesem Phylum besonders extrem: es sind bisher nur drei in Reinkultur vorliegende Arten vorhanden: *Holophaga foetida* (BAK 1992, LIESACK 1994), *Acidobacterium capsulatum* (HIRAISHI 1995, KISHIMOTO 1991) und *Geothrix fermentans* (COATES 1999, LONERGAN 1996). Demgegenüber stehen Hunderte von 16S rDNA-Sequenzen dieser phylogenetischen Gruppe (BARNES 1999, HUGENHOLTZ 1998, KUSKE 1997). Insgesamt zeigte die Hauptgruppe der *Fibrobacter/Acidobacteria* in den Genbibliotheken eine Abundanz von **3,5% bis 8,5%** (Abbildung 5).

Die Präsenz von Sequenzen läßt allerdings keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die wirkliche Häufigkeit und Bedeutung dieser Organismen in ihren Ökosystemen zu: es kann freie DNA vorliegen,

Zellen bestimmter Gruppen können in DNA-Extraktions- und Amplifikationsverfahren bevorzugt werden oder besonders viele *rrn*-Operone pro Genom enthalten. RT-PCR-gestützte Quantifikationen aktiver Ribosomen von *Acidobacteria* in Umweltproben deuten allerdings auf eine große Zahl und hohe metabolische Aktivität von Organismen dieser Gruppe hin, zumindest im untersuchten Lebensraum, z.B. im Grasland der Landwirtschaftlichen Forschungsstation Drentse A in den Niederlanden (FELSKE 2000, LUDWIG 1997). *H. foetida* verfügt über den Phloroglucinol-Abbauweg zur Demethylierung aromatischer Verbindungen (KREFT und SCHINK 1993) und *Geothrix fermentans* leistet mit der dissimilatorischen Reduktion von Eisen(III) einen elementaren Beitrag zum bedeutenden Prozess der anaeroben Oxidation organischer Stoffe zu CO₂ (COATES 1999). *Geothrix fermentans* gehörte in vorliegender Untersuchung neben zwei anderen Sequenztypen zu den in allen Talsperren vorkommenden Organismen. Bei den zwei weiteren Sequenztypen handelt es sich um den Metal-contaminated soil clone K20 OTU und den uncultured bacterium SJA OTU (Abbildung 12)

Die OTUs stellen eine Zusammenfassung folgender Sequenzen dar: Metal-contaminated soil clone K20 OTU: AF145822, AF145826, AF145833, AF145841, AF145843, AF145875, AF145877 und uncultured bacterium SJA OTU: AJ009461, AJ009478, AJ009495.

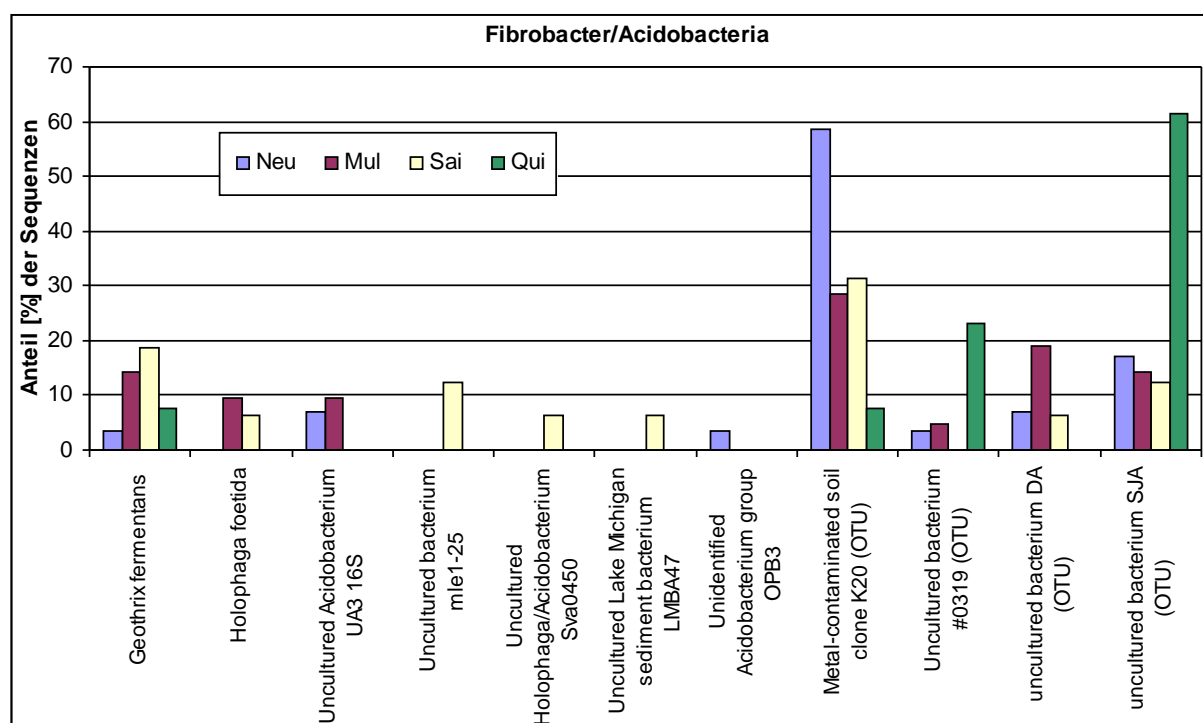


Abbildung 12 Sequenzen innerhalb der *Fibrobacter/Acidobacteria* in den Genbibliotheken

In allen Talsperren konnten Sequenzen der *Fibrobacter/Acidobacteria* nachgewiesen werden. Neben Sequenzen von *G. fermentans* und *H. foetida* wurden größtenteils unidentifizierte Organismen detektiert.

Obwohl *Fibrobacter/Acidobacteria* ubiquitär verbreitet zu sein scheinen, sind Kultivierungserfolge für diese Organismen selten. Durch sondengestützte Anreicherung konnten Vertreter der Unterklasse *a* zumindest in Gesellschaft von Organismen aus der *Bejerinckia*-Gruppe der alpha *Proteobacteria*

kultiviert werden (SPRING 2000). Die Isolierung zweier Isolate gelang von landwirtschaftlich genutzten Böden in Victoria, welche zur Subdivision 1 des Phylum gehören (JANSSEN 2002).

Die Sequenzen des Metal-contaminated soil clone K20 wurden erstmals von MARSH bei der Untersuchung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft von Metall-belasteten Böden beschrieben und das uncultured bacterium SJA konnte von von WINTZINGERODE (1999) innerhalb der phylogenetischen Analyse eines anaeroben, Trichlorbenzen umwandelnden mikrobiellen Konsortium in die Domäne *Acidobacteria* eingeordnet werden. Dabei repräsentierte die Klonfamilie SJA-36 (AJ009461) neben zwei anderen Klonfamilien mehr als ein Viertel aller SJA-Klone. Somit konnte gezeigt werden, dass dieser Organismus einen wesentlichen Anteil an der Umsetzung von Trichlorbenzen ausmacht oder diesen Abbauweg durchführt, um auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Sequenzen des uncultured bacterium DA OTU (Accession-Nr. Y12597, Y07586 und Y07646) wurden in vorliegenden Untersuchungen in den Talsperrensedimenten von Neunzehnhain, Muldenberg und Saidenbach gefunden.

Weiterhin wurde durch von WINTZINGERODE (1999) gezeigt, dass keiner der SJA-Klone identisch mit bereits kultivierten Organismen ist. Ähnlich zu SJA-87 (AJ009478) erwies sich im phylogenetischen Stammbaum *Geothrix fermentans*.

In den untersuchten Sedimenten dieser Arbeit gibt es keine Hinweise auf das Vorkommen von Trichlorbenzen. Allerdings ist von degradativen Bakterien bekannt, dass das Abbauvermögen oftmals nicht nur auf einen Stoff beschränkt ist. Möglicherweise erscheinen in den Talsperren Spezies SJA wie auch K20 als Beteiligte am Stoffumsatz des Gewässers und beim Abbau von Belastungen.

IV. 1. 4. 8 CFB

Das Phylum *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* enthält verschiedene physiologische Typen: von obligaten Anaerobiern bis hin zu obligaten Aerobiern, welche eine gemeinsame phylogenetische Verwandtschaft aufweisen und verschiedenste Lebensräume besiedeln. Die in allen Talsperren detektierten *Cytophaga* sind im Boden und Wasser weit verbreitete Organismen und viele Vertreter vermögen es, Polysaccharide (Zellulose, Chitin) abzubauen. *Cytophaga*- und *Sporocytophaga*-Spezies sind obligat aerob und machen wahrscheinlich einen großen Teil des natürlichen Zelluloseabbaus durch Prokaryoten in oxischen Umgebungen aus. Einige *Cytophaga*-Arten sind außerdem Fischpathogene und können in der Zuchtfischindustrie erhebliche Probleme bereiten.

Anaerobe Spezies des *Cytophaga-Flavobacterium* Cluster wurden von RAVENSCHLAG (2000) in anoxischen Zonen eines marinen arktischen Sedimentes (Svalbard) nachgewiesen. Die Zufuhr von komplexen organischen Substraten in anaerobe Sedimentschichten resultiert in einem starken Anstieg von Vertretern des CFB-Cluster. Diese Ergebnisse kennzeichnen die potentielle ökologische Relevanz dieser Bakterien als hydrolytisch fermentative Organismen in einem hauptsächlich anaeroben Habitat.

Zwischen den Talsperrensedimenten konnten Unterschiede innerhalb der Vertreter des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) Cluster festgestellt werden. Nach den *Proteobacteria* und *Firmicutes* beinhaltet das CFB Cluster die meisten Sequenzen (81 Klone) und in der gesamten Genbibliothek Abundanzen von **2% bis 8%** (Abbildung 5). Im Gegensatz zu den anderen Sedimenten wies die Genbibliothek von Neunzehnhain nur wenige Sequenzen des CFB Clusters auf (Abbildung 5). OTU 10,

ähnlich dem uncultured bacterium PHOS-HE62 wurde in jeder Genbibliothek gefunden (Abbildung 13). Die Sequenz des uncultured bacterium PHOS-HE62 wurde erstmals von DABERT (2001) in der Analyse der mikrobiellen Besiedlung eines konventionellen Sequencing Batch Reaktor beschrieben. Möglicherweise besitzt dieser bisher unkultivierte Mikroorganismus die Fähigkeit, sowohl aerob mit Sauerstoff als auch anaerob mit Nitrat zu wachsen und Phosphat zu akkumulieren. OTU 13, nächstähnlich dem uncultured eubacterium WCHB1-53 wurde in Quitzdorf, Saidenbach und Neunzehnhain nachgewiesen. Diese Sequenz wurde durch DOJKA (1998) in durch Kohlenwasserstoffe und Chlorverbindungen verschmutztem Grundwasser unter biologischer Sanierung nachgewiesen.

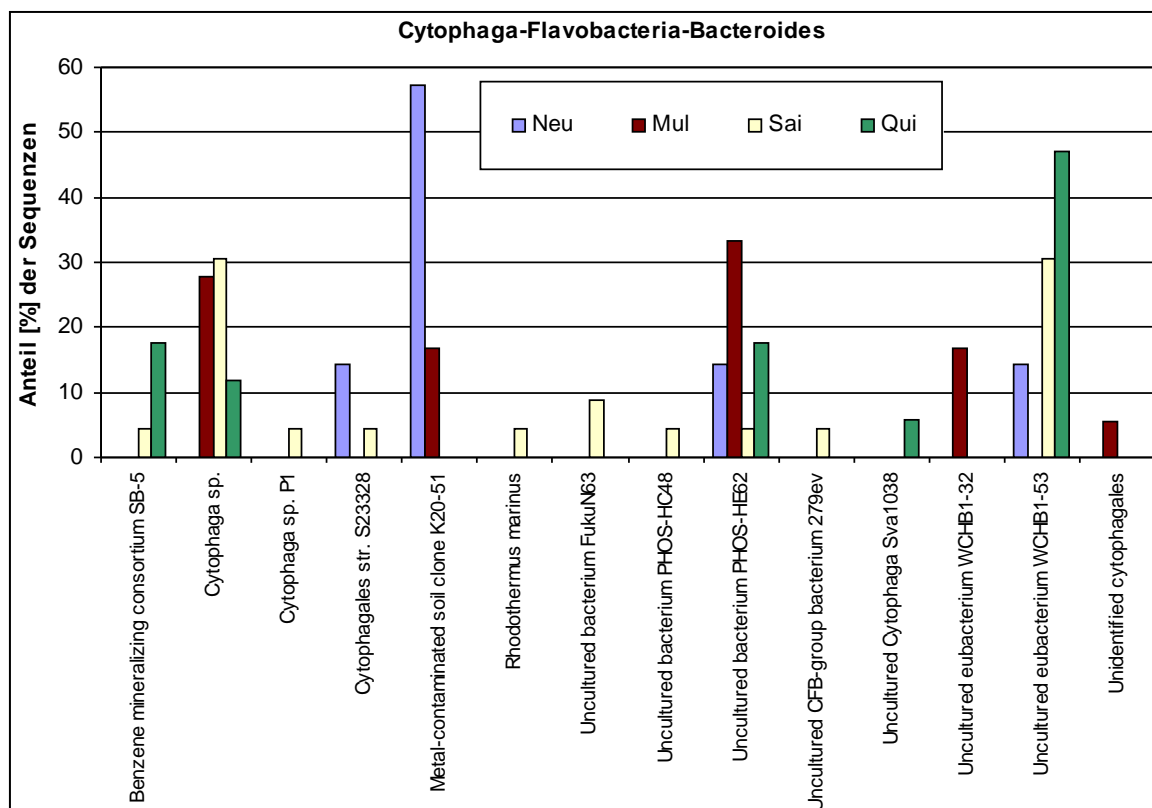


Abbildung 13 Sequenzen innerhalb der CFB in den Genbibliotheken

Mit differierenden Anteilen an der Genbibliothek wiesen alle Talsperresedimente Sequenzen von Vertretern der CFB auf.

Die OTUs 2 und 3 (ähnlich zu Sequenzen, welche aus einem Benzen-mineralisierenden Konsortium isoliert wurden [PHELPS 1998] und *Cytophaga sp.*) wurden in der Genbibliothek von Neunzehnhain nicht detektiert. Die vier OTUs beinhalteten über 70% aller Klone des CFB Cluster. Die Ähnlichkeit zwischen den Genbibliotheken von Muldenberg, Saidenbach und Quitzdorf in Bezug auf das CFB Cluster wurde mittels F_{ST} -Test berechnet und zeigte innerhalb der Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Genbibliotheken. Das Dendrogramm (Abbildung 13.I) demonstriert die phylogenetischen Beziehungen zwischen den detektierten Sequenzen.

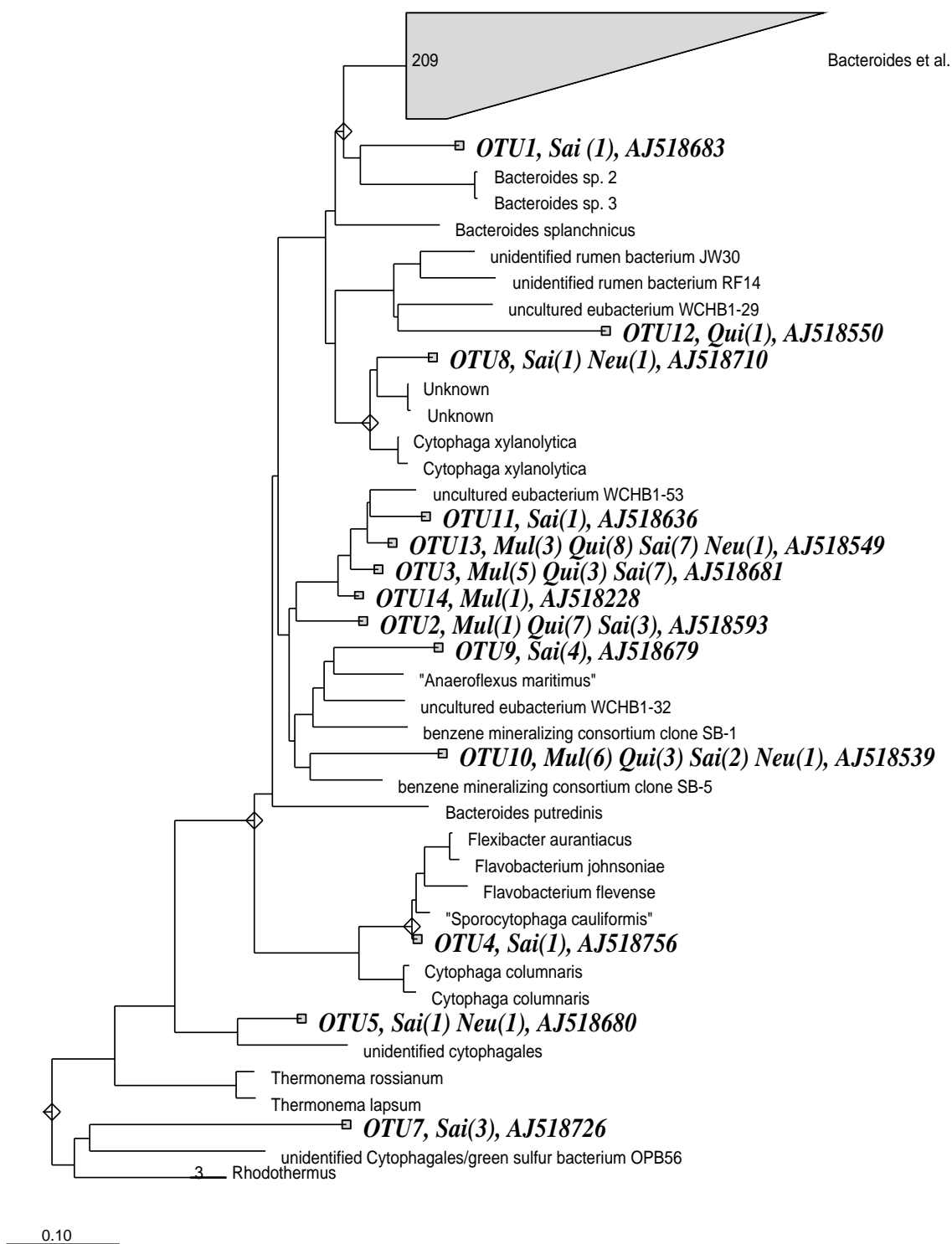


Abbildung 13.I Graphische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen

Dargestellt sind die bekannten Vertreter der CFB Hauptgruppe und den in dieser Arbeit bestimmten 16S rDNA-Sequenzen. Die Länge des Balkens repräsentiert 10% Sequenzunterschied. Der Unterschied zwischen zwei Sequenzen im Dendrogramm ist durch die Summe ihres horizontalen Abstandes definiert.

IV. 1. 4. 9 Verrucomicrobia

LIESACK und STACKEBRANDT berichteten 1992 von einer Gruppe klonierter bakterieller 16S rDNA-Fragmente, die bei der Untersuchung eines australischen Waldbodens gefunden wurden. Diese konnten damals keiner bekannten phylogenetischen Linie kultivierter Bakterien zugeordnet werden. Später zeigte RAINEY, dass die 16S rDNA des aeroben, aquatisch lebenden Bakteriums *Verrucomicrobium spinosum* eine große Homologie zu den Sequenzen dieser nicht-kultivierten Bodenbakterien aufweist. Weitere Kulturisolate konnten dieser bakteriellen Gruppe nach und nach zugeordnet werden, einschließlich vier Vertretern des Genus *Prostheco bacter* sowie viele noch unbenannte Stämme fermentativer *Ultramicr obacteria*, welche aus dem Boden von Reisfeldern isoliert wurden. Dieser Gruppe wurde die Bezeichnung *Verrucomicrobia* und der Status einer eigenen phylogenetischen Linie gegeben. Die Kulturisolate repräsentieren nur einen kleinen Anteil innerhalb dieser Gruppe. Basierend auf 16S rDNA Analysen und RT-PCR wurden Vertreter der *Verrucomicrobia* in vielen Habitaten detektiert und repräsentieren höchstwahrscheinlich einen bedeutenden Teil der Mikroflora des Sedimentes (JANSSEN 1999).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Talsperren wiesen 16S rDNA Sequenzen des Phylum *Verrucomicrobia* auf (Abbildung 14) mit Abundanzen in der gesamten Genbibliothek von **3% bis 4,5%** (Abbildung 5).

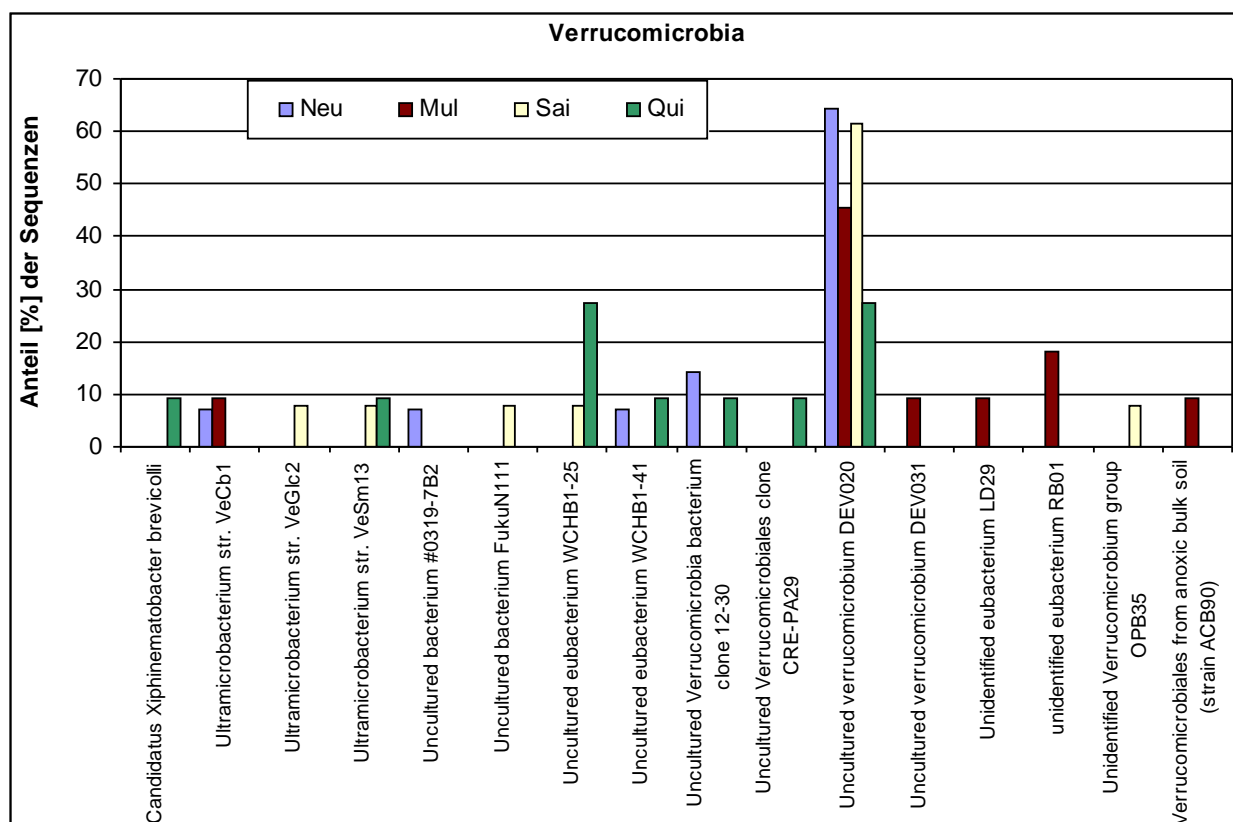


Abbildung 14 Sequenzen innerhalb der *Verrucomicrobia* in den Genbibliotheken

Nur eine Sequenz konnte in allen Talsperren nachgewiesen werden: das Uncultured *Verrucomicrobium* DEV020.

Mehr als 50% der Sequenzen repräsentierten einen einzigen OTU, welcher in allen vier Genbibliotheken vorkam. Es handelt sich dabei um ubiquitär vorkommende Sequenzen, nächstähnlich zu dem uncultured verrucomicrobium DEV020 (AJ401128). Diese Sequenz wurde von FELSKE in der Elbe detektiert. Das Ultramicrobacterium str. VeCb1 (Accession-Nr. X99391) konnte ausschließlich in den oligotrophen Talsperren Muldenberg und Neunzehnhain gefunden wurde. Das Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone 12-30 (Accession-Nr. AF351215) und das Uncultured eubacterium WCHB1-41 (Accession-Nr. AF050560) wurden von den Genbibliotheken von Quitzdorf und Neunzehnhain repräsentiert. Die Talsperren Quitzdorf und Saidenbach beinhalteten Sequenzen des Uncultured eubacterium WCHB1-25 (Accession-Nr. AF050559) und des Ultramicrobacterium str. VeSm13 (Accession-Nr. X99392). Die in den Talsperren gefundenen Sequenzen VeCb1, VeGlc2, VeSm13, WCHB1-25, WCHB1-41, LD29, RB 01 und OPB35 wurden von O´FARRELL (1999) bei einer 16S rDNA Analyse von Bodenproben von australischem Weideland detektiert und phylogenetisch den *Verrucomicrobia* zugeordnet. Somit konnten Literaturangaben bestätigt (JANSSEN 1999) und ein deutlicher Hinweis auf ein ubiquitäres Vorkommen dieser Mikroorganismen in der Umwelt gegeben werden. Die Sequenzen in den Talsperrensedimenten deuten weiterhin auf Organismen des Einzugsgebietes hin, da sie vom umgebenden Weideland oder Wald eingespült und in der Talsperre sedimentiert sein könnten.

IV. 1. 4. 10 Proteobacteria

Die Vertreter der *Proteobacteria* sind gram negativ, zeigen eine extreme Stoffwechselvielfalt und stellen die Mehrzahl der bekannten gram negativen Bakterien von medizinischer, industrieller und landwirtschaftlicher Bedeutung dar. In den untersuchten Talsperren konnten viele verschiedene Vertreter der *Proteobacteria* gefunden werden. Die untersuchten Talsperren zeigten dabei deutliche Unterschiede (Abbildung 15.I-IV). In der gesamten Genbibliothek wurden Abundanzen der *Proteobacteria* von **3,5% bis 15%** festgestellt (Abbildung 5).

In den Talsperren wurden insgesamt folgende Anzahlen an verschiedenen Sequenzen gefunden: alpha *Proteobacteria*: 55 verschiedene Sequenzen, beta: 52, gamma: 47 und delta: 54 Sequenzen. Dabei konnten nur wenige gemeinsame Gattungen in allen Talsperren nachgewiesen werden: innerhalb der alpha *Proteobacteria* kamen *Sphingomonas* spp, sowie Metal-contaminated soil clone spp und *Mesorhizobium loti* in allen Talsperren vor, innerhalb der beta *Proteobacteria* konnten keine gemeinsame Sequenz gefunden werden, *Pseudomonas aeruginosa* war der einzige gemeinsame Organismus innerhalb der gamma *Proteobacteria* und das Uncultured bacterium spp, *Syntrophus* spp und *Geobacter* spp konnten unter den delta *Proteobacteria* in allen Talsperren gefunden werden.

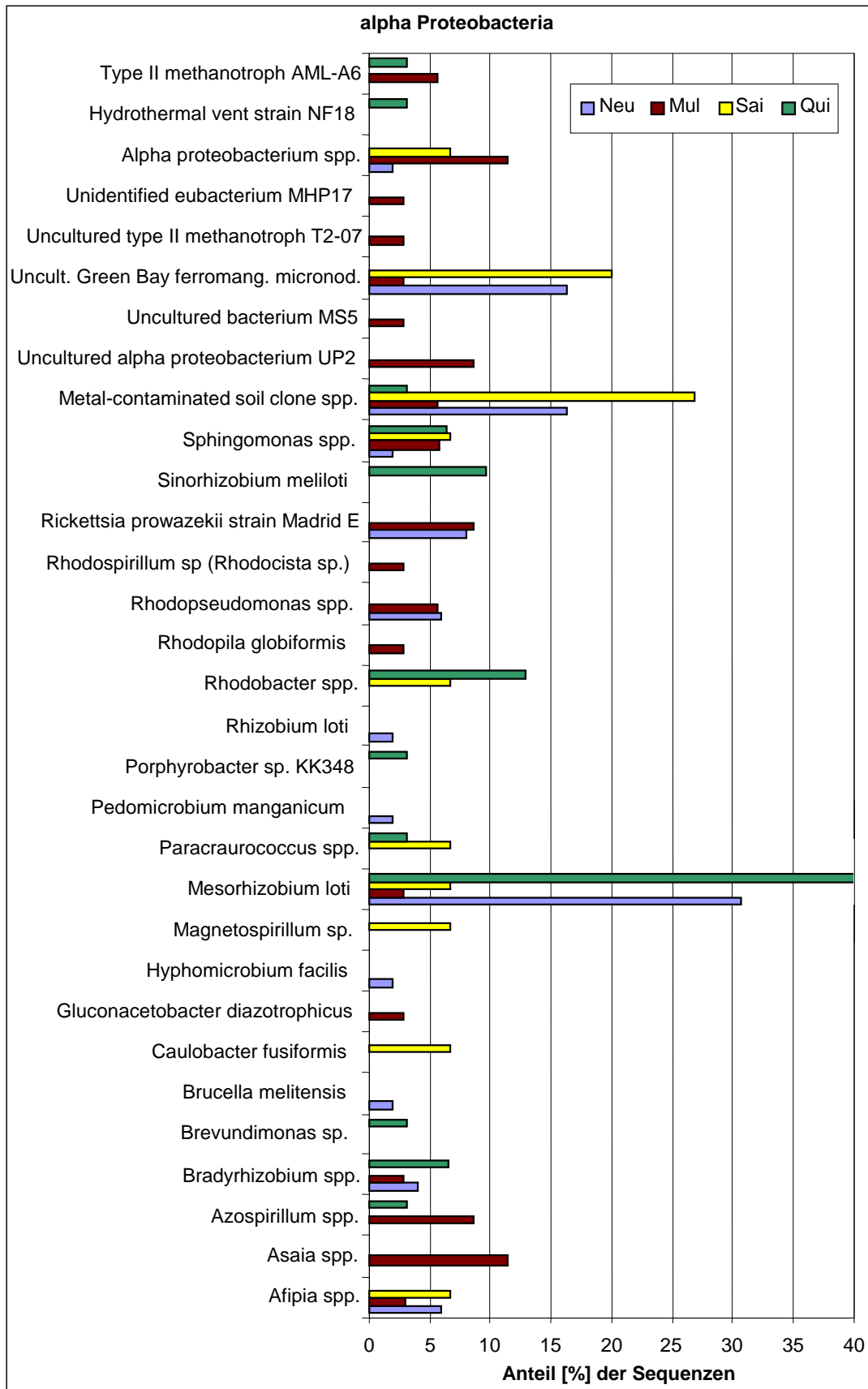


Abbildung 15 Sequenzen innerhalb der *Proteobacteria* in der Genbibliothek

15.I Sequenzen der detektierten Vertreter der alpha *Proteobacteria*.

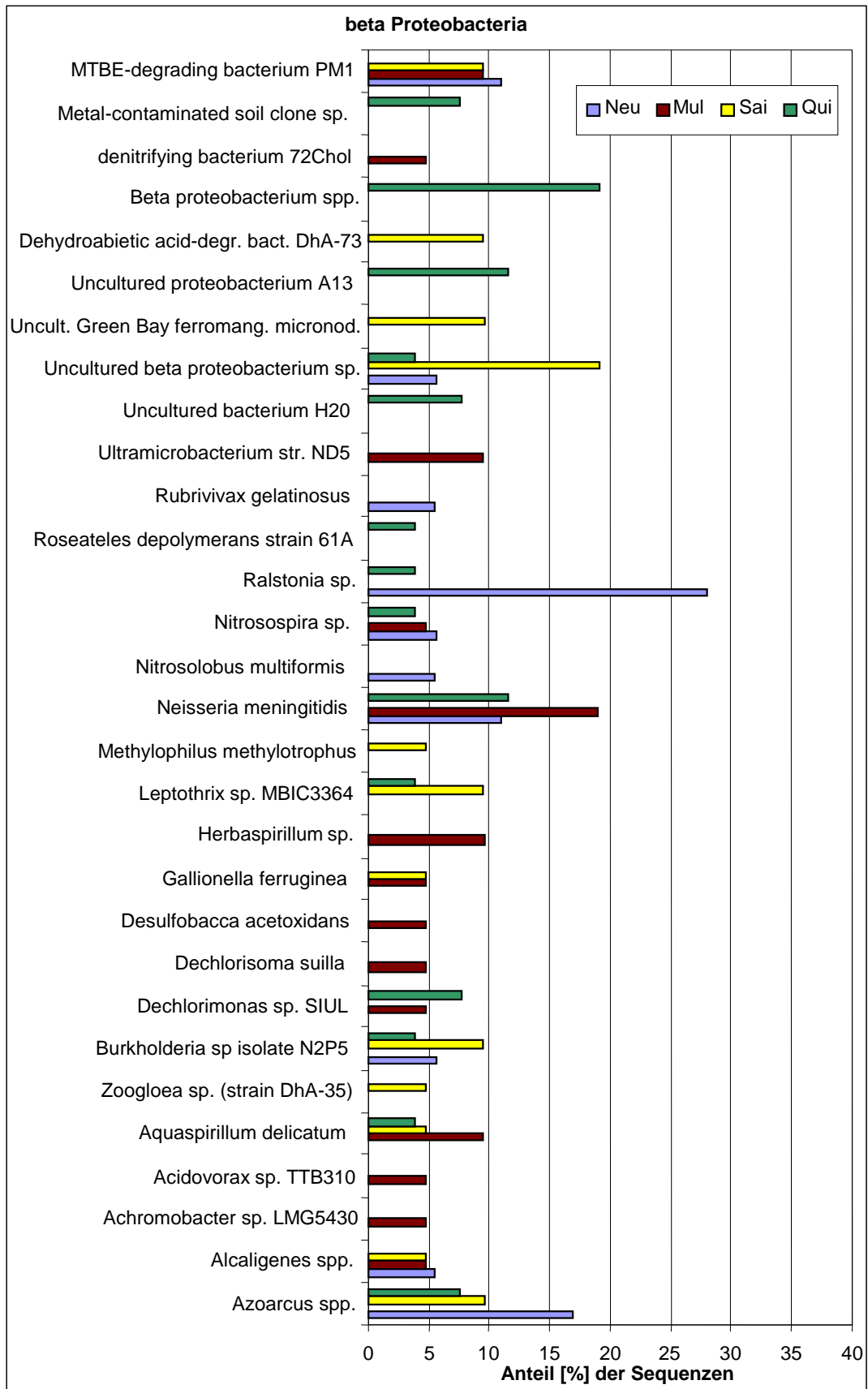


Abbildung 15 Sequenzen innerhalb der *Proteobacteria* in der Genbibliothek

15.II Sequenzen der detektierten Vertreter der beta *Proteobacteria*.

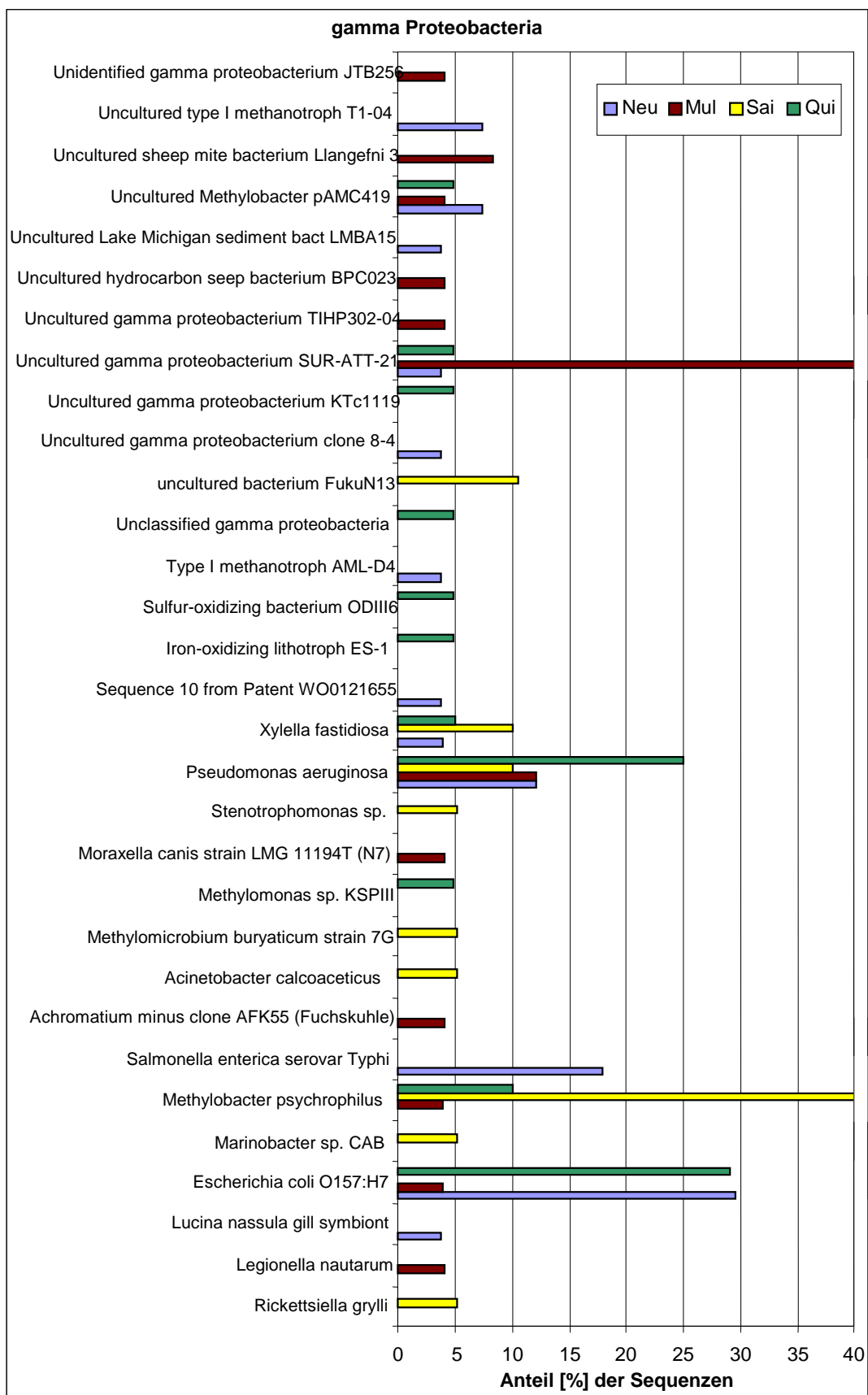


Abbildung 15 Sequenzen innerhalb der *Proteobacteria* in der Genbibliothek

15.III Sequenzen der detektierten Vertreter der gamma *Proteobacteria*.

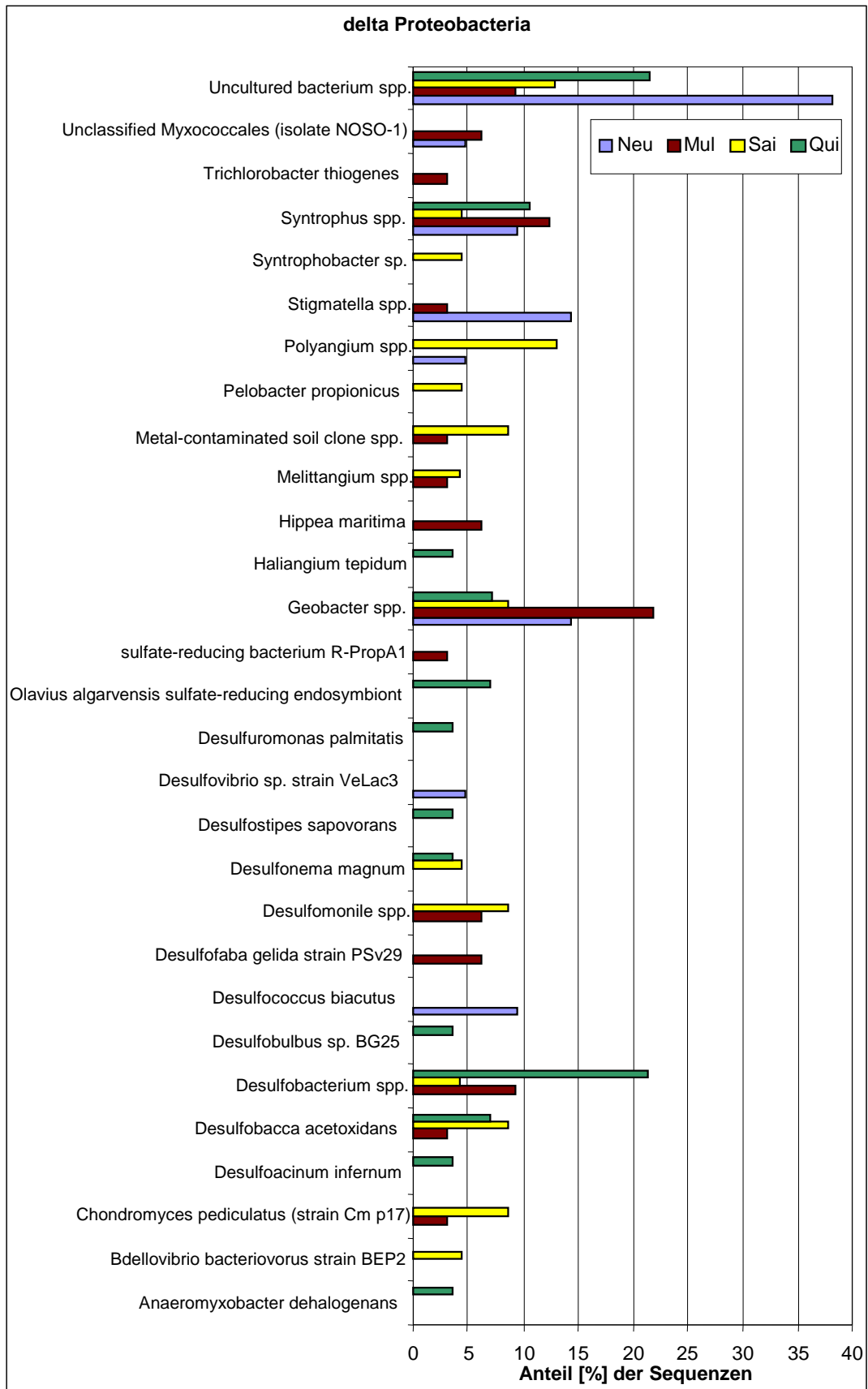


Abbildung 15 Sequenzen innerhalb der *Proteobacteria* in der Genbibliothek
 15.IV Sequenzen der detektierten Vertreter der delta *Proteobacteria*.

Innerhalb der alpha Proteobacteria wurde deutlich, dass in Saidenbach besonders das Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium (AF292996) und das Metal-contaminated soil clone K20-01 (AF145805) detektiert wurde (Abbildung 15.I). In Quitzdorf und Neunzehnhain wurde *Mesorhizobium loti* mit Abundanzen von 42 % (Qui) und 31% (Neu) nachgewiesen.

In den beta Proteobacteria (Abbildung 15.II) traten besonders in Saidenbach Abundanzen von *Leptothrix* sp. (AB015048), *Burkholderia* sp. (AY005039), Uncultured beta proteobacterium (AF204250) und Uncultured Green Bay ferromanganous micronodule bacterium (AF293007) auf. Ausschließlich in Quitzdorf wurde das Beta proteobacterium (AB022678) detektiert. Sequenzen von *Ralstonia* sp. (AF239160 und AJ011503) wurden besonders häufig in Neunzehnhain nachgewiesen.

Innerhalb der gamma Proteobacteria (Abbildung 15.III) wurden in Muldenberg besonders Sequenzen des Uncultured gamma proteobacterium SUR-ATT-21 (AF114621) gefunden. *Methylobacter psychrophilus* (AF152597) kam besonders häufig in der Genbibliothek von Saidenbach vor und *E. coli* (AP002567; BA000007) kam in höheren Abundanzen in den Sedimenten von Quitzdorf und Neunzehnhain vor.

Die Sequenzen der delta Proteobacteria (Abbildung 15.IV) zeigten Abundanzen des *Desulfobacterium* (AJ237607) besonders in Quitzdorf, *Geobacter* sp. (AF019929) in Muldenberg und Uncultured bacterium (AF234131) in Neunzehnhain.

Diese Organismen traten besonders häufig in den *Proteobacteria* auf und können höchstwahrscheinlich als typische Spezies für die Talsperre betrachtet werden.

Vertreter der epsilon *Proteobacteria* wurden nur vereinzelt in den Talsperren gefunden: in Quitzdorf und Saidenbach konnten Sequenzen von *Campylobacter jejuni* NCTC11168 (Accession-Nr. AL139076; AL111168) mit <85% Sequenzhomologie detektiert werden. Die geringe Übereinstimmung weist darauf hin, dass es sich nicht um die angegebene Spezies sondern um eine verwandte, evtl. noch nicht näher charakterisierte *Campylobacter* sp. handelt. In Muldenberg und Saidenbach wurde das Uncultured epsilon proteobacterium 1016 (Accession-Nr. AB030614) gefunden.

Innerhalb der delta *Proteobacteria* konnten verschiedene Sulfatreduzierer nachgewiesen werden, darunter *Desulfoacinum infernum*, *Desulfobacca acetoxidans*, *Desulfobacterium* spp, *Desulfobulbus* sp. BG25, *Desulfococcus biacutus*, *Desulfofaba gelida* strain PSv29, *Desulfomonile* spp, *Desulfonema magnum*, *Desulfostipes sapovorans*, *Desulfovibrio* sp. strain VeLac3, *Desulfuromonas palmitatis*, *Olavius algarvensis* sulfate-red. endosymbiont, Sulfate-reducing bact. R-PropA1 und *Geobacter* spp.

IV. 1. 4. 10. 1 Vergleich zwischen 16S rDNA Analyse und FISH

Parallel zur 16S rDNA Analyse wurden die entsprechenden Sedimente innerhalb der Dissertation von MAAßEN (2003) mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung untersucht. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht den Nachweis und die quantitative Analyse von Mikroorganismen direkt in ihrem natürlichen Habitat (*in situ*), ohne vorhergehende Kultur. Damit stellt die *in situ* Hybridisierung mit spezifischen rRNA-gerichteten, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden eine geeignete Methode zur quantitativen Analyse komplexer Mikroflora dar (AMANN 1995, GIOVANNONI 1988).

Die mittels 16S rDNA Analyse und FISH bestimmte quantitative bakterielle Zusammensetzung der *Proteobacteria* wies große Unterschiede auf (Abbildung 16). Die ermittelten unterschiedlichen Prozentwerte für spezifische Bakterienpopulationen in den 16S rDNA-Bibliotheken, verglichen mit den durch FISH bestimmten Zahlen, verdeutlichen das bekannte Problem, dass die 16S rDNA Analyse zur Quantifizierung von Bakterienpopulationen nicht geeignet ist. Beispielsweise dominierten in der 16S rDNA der Talsperre Saldenbach delta *Proteobacteria*, während in der FISH Analyse die beta *Proteobacteria* die dominierende Gruppe darstellte.

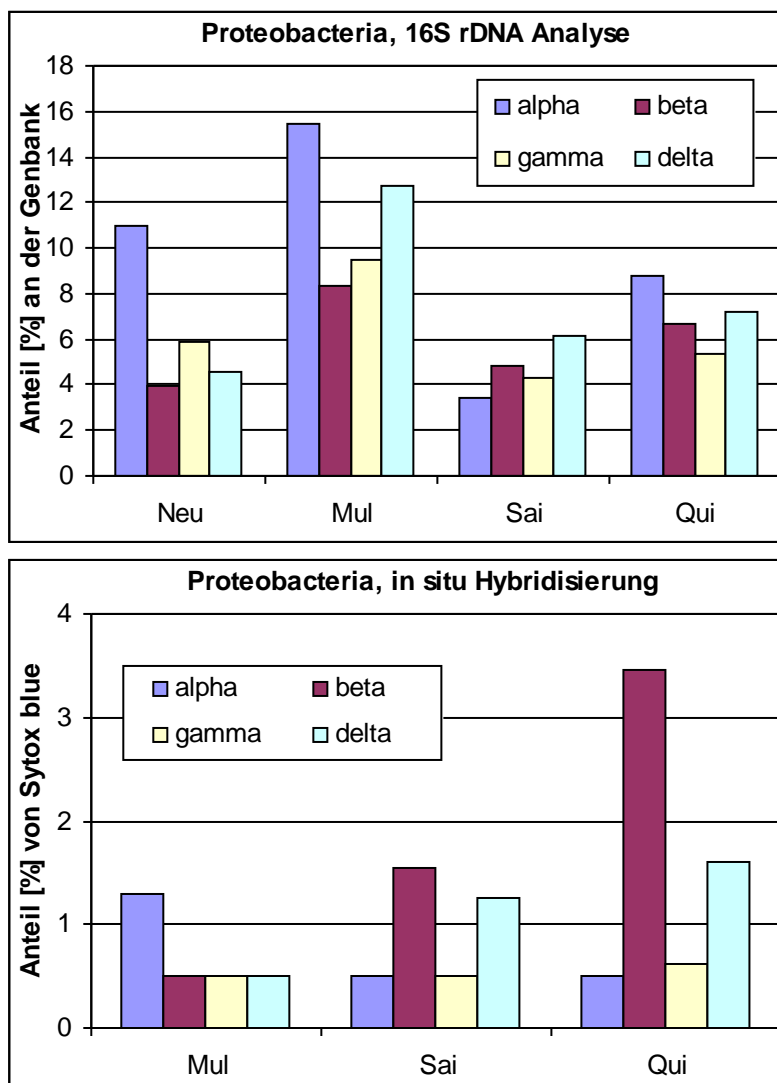


Abbildung 16 Vergleich der *Proteobacteria* (16S rDNA Analyse versus *in situ* Hybridisierung)

Die Quantifizierung von mikrobiellen Gemeinschaften unterscheidet sich stark zwischen der 16S rDNA Analyse und der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

IV. 1. 4. 11 Cyanobacteria

Cyanobakterien repräsentierten eine bedeutende Fraktion der mikrobiellen Gemeinschaft in den Sedimenten der Talsperren Quitzdorf (9%) und Saldenbach (4%) (Abbildung 5). Der Vergleich zweier verschiedener Probenahmedaten (Frühling und Sommer) zeigte, bedingt durch die beobachtete Spätsommer-Algenblüte von Cyanobakterien in Quitzdorf, einen Anstieg des Anteils an

cyanobakteriellen Sequenzen in der 16S rDNA Bibliothek von 2,8% auf 7,2% (Abbildung 4). Von *Microcystis* sp. ist bekannt, dass sie im Sediment der Talsperre Quitzdorf überwintern und aufgrund der geringen Tiefe der Talsperre in den Sommermonaten zu Massenentwicklungen führen. Ein ähnliches Verhalten anderer Vertreter der *Cyanobacteria* könnte die Abundanz dieser Mikroorganismen im Sediment von Saidenbach erklären. In der 16S rDNA Bibliothek der Talsperre Saidenbach waren neben *Synechocystis* spp. und *Oscillatoria* spp. Sequenzen von *Synechococcus* spp. (Saidenbach OTU8) vertreten, welche ausschließlich in der Genbibliothek von dieser Talsperre auftraten (Abbildung 17).

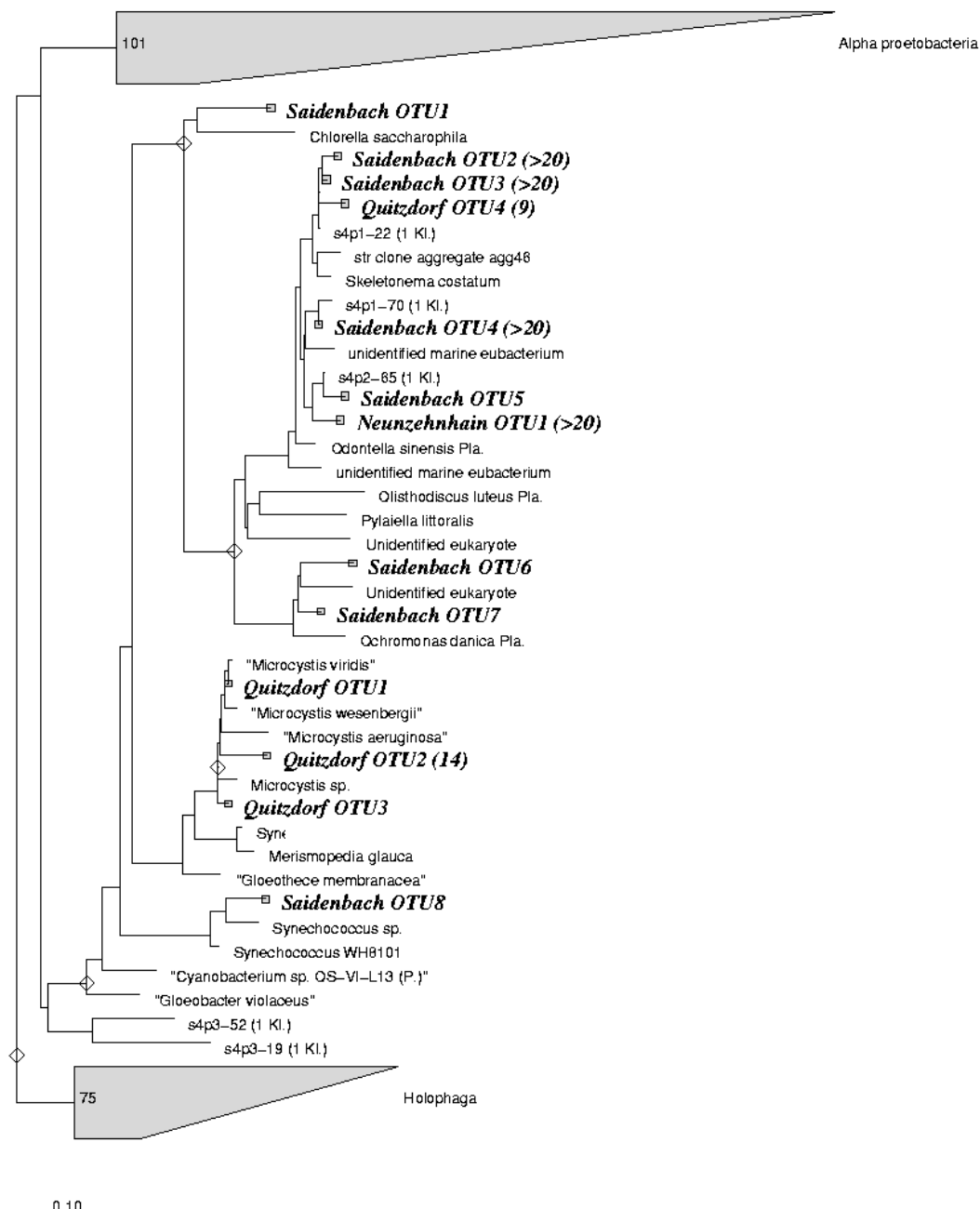


Abbildung 17 Dendrogramm mit Vertretern der *Cyanobacteria* und eingefügte Sequenzen aus der 16S rDNA Bibliothek

Die Länge des Balkens repräsentiert 10% Sequenzunterschied. Der Unterschied zwischen zwei Sequenzen im Dendrogramm ist durch die Summe ihres horizontalen Abstandes definiert.

In der Talsperre Neunzehnhain wurde mit 22 Sequenzen nur ein einziger cyanobakterieller Sequenztyp festgestellt. Dieser Sequenztyp wurde mit 97-100% Sequenzübereinstimmung Uncultured marine eubacterium HstpL29 (Accession-Nr. AF159634) zugeordnet und im Dendrogramm zu OTU1 zusammengefaßt (Abbildung 17). Diese Sequenz wurde von WEIDNER (1996) bei der Untersuchung der mit Blättern des Seegrases *Halophila sp.* assoziierten bakteriellen Gemeinschaften beschrieben. Die Sequenzen des Saidenbach OTU2 sind nächst verwandt zum Uncultured marine eubacterium HstpL35 (Accession-Nr. AF159636), welches ebenfalls von WEIDNER erstmalig beschrieben wurde. Bereits aus dem Dendrogramm in Abbildung 17 wird die hohe Diversität an Cyanobakterien in der Talsperre Quitzdorf ersichtlich.

Exklusiv in der 16S rDNA Bibliothek von Quitzdorf wurden Sequenzen von *Microcystis spp.* gefunden. Die analysierten Sequenzen zeigten eine Sequenzhomologie von 98-100% zu Datenbanksequenzen bekannter Spezies (Abbildung 18). Diese Talsperre zeigt bereits seit einigen Jahren ein Massenwachstum von *Microcystis*, welches sich in der Genbibliothek widerspiegelt.

Das Vorkommen von Vertretern der Gattung *Microcystis* ausschließlich in der eutrophen Talsperre Quitzdorf deutet auf eine indikative Bedeutung dieser Organismen als Anzeiger für die Trophie hin.

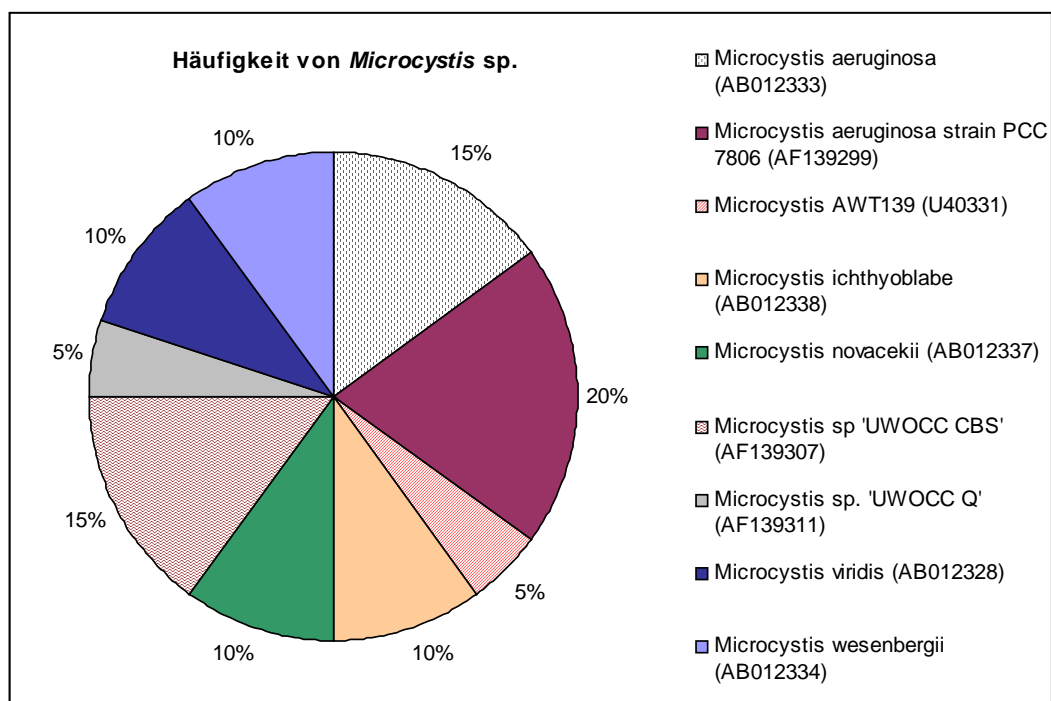


Abbildung 18 Häufigkeit von *Microcystis sp.* in der 16S rDNA Bibliothek der Talsperre Quitzdorf

In der Abbildung sind die detektierten Sequenzen dargestellt und ihre Häufigkeit. Sequenzen von *Microcystis* konnten ausschließlich in der Talsperre Quitzdorf gefunden werden.

IV. 1. 4. 12 Unidentifizierte Bakterien

Mikroorganismen sind aufgrund ihrer unvergleichlichen physiologischen Vielfalt und ihrer potentiellen industriellen Nutzbarkeit von besonderer Bedeutung in der Diskussion zur Biodiversität (HUNTER-CEVERA 1998). Im Gegensatz zu ihrem Stellenwert besteht jedoch der Nachteil, dass nur ein Bruchteil der Mikroorganismen mit klassischen mikrobiologischen Methoden kultiviert werden kann (FRY 2000), auch wenn in letzter Zeit durch die Simulation natürlicher Lebensbedingungen bemerkenswerte Fortschritte erzielt werden konnten (KAEBERLEIN 2002).

Über die Ursachen des Phänomens der unidentifizierten bzw. unkultivierten Mikroorganismen herrscht noch weitgehend Unklarheit. Mögliche Erklärungen reichen von der Annahme, dass es sich bei der großen Zahl nicht kultivierbarer Organismen letztendlich um Verwandte kultivierbarer Spezies handelt, die lediglich in einem Zustand der Nichtkultivierbarkeit übergegangen sind, bis hin zu der Möglichkeit, dass diese nichtkultivierbaren Mikroorganismen größtenteils völlig unbekannte Entwicklungslinien repräsentieren. Diese Linien können der phylogenetisch vergleichsweise kleinen Zahl bisher beschriebener mikrobieller Spezies nicht zugeordnet werden (RONDON 1999). Bereits 1987, einige Jahre bevor die vergleichende rRNA-Sequenzanalyse zur Verfügung stand, mutmaßte CARL WOESE „that many eubacterial phyla remain to be described, representing species yet to be discovered“. Für das Zutreffen letzterer Theorie spricht das mit hoher Geschwindigkeit wachsende Wissen über bakterielle Taxa, welche erst durch die Anwendung molekularer Techniken gefunden wurden. Von besonderer Bedeutung sind dabei 16S rDNA-Bibliotheken, die die Analyse mikrobieller Ökosysteme unter besonderer Berücksichtigung nichtkultivierbarer Mikroorganismen revolutionierten (GIOVANNONI 1990). Auch wenn methodische Einflüsse die Ergebnisse drastisch verzerren können, stellt diese Technik die am besten geeignete Methode zur Erfassung und Identifizierung auch bisher nichtkultivierbarer Bakterienspezies dar (STACKEBRANDT 1999, von WINTZINGERODE 1997). Organismen, von denen lediglich rRNA-Sequenzen bekannt sind, werden auch als Riboclones bezeichnet (HOLMES 2000). In vorliegender Studie werden diese Sequenzen als unidentifizierte Organismen bezeichnet.

Wie viel Bedarf an Untersuchungen zur bakteriellen Diversität noch besteht, zeigen Analysen der mikrobiellen Gesellschaften in thermalen Quellen des Yellowstone National Park. Sie förderten eine Vielzahl neuer, in ihrem phylogenetischen Status erst vorläufig charakterisierte bakterielle Gruppen zu Tage. Diese Gruppen wurden nach ihrem systematischen Rang als Phyla angesehen oder in diese eingeordnet. Organismen aus Phyla ohne bisher kultivierte Vertreter wurden als *candidate divisions* (HUGENHOLTZ 1998a) bezeichnet und außer in heißen Quellen auch in anderen Ökosystemen wie verseuchtem Grundwasser und Kläranlagen gefunden (DOJKA 1998, HUGENHOLTZ 1998). Ein Vergleich jeweils aktueller auf 16S rRNA-Sequenzinformationen basierender phylogenetischer Dendrogramme der *Bacteria* aus den Jahren 1987 und 2000 zeigt ein Anwachsen der Zahl bekannter Hauptlinien auf das Dreifache, von 12 auf 36 (DeLONG und PACE 2001).

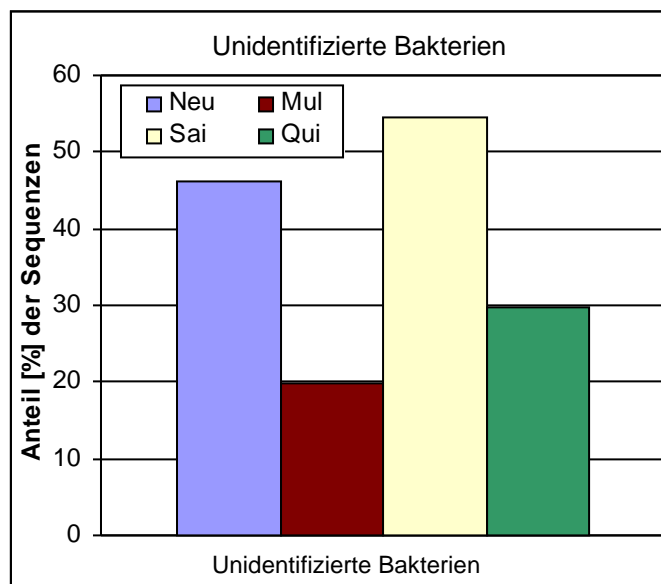


Abbildung 19 Unidentifizierte Bakterien in den Genbibliotheken

Der Anteil der unidentifizierten Bakterien betrug in den Genbibliotheken 20% bis über 50% der Sequenzen.

Auch in der vorliegenden Dissertation repräsentierte ein enormer Anteil der 16S rDNA Sequenzen (Anteile von 20% bis über 50%) bisher unidentifizierte Organismen, was deren große Bedeutung verdeutlicht. In Abbildung 19 sind die Anteile von unidentifizierten Bakterien an den erstellten Genbibliotheken dargestellt. Unter den unidentifizierten Bakterien in dieser Studie befinden sich ausschließlich Sequenzen, die keine Zugehörigkeit zu bestehenden Phyla aufweisen. Insgesamt wurden 136 unterschiedliche Sequenzen (25,8% der gesamten Sequenzen) der Gruppe der unidentifizierten Bakterien zugeordnet, einschließlich 108 Sequenzen, welche nur in einer Talsperre detektiert wurden.

Dieses Ergebnis bestätigt die Literaturangaben und weist auf die enorme Bedeutung von Studien im Umweltbereich hin. Der größte Teil der in Umweltproben vorkommenden Mikroorganismen ist heute noch nicht identifiziert. Umso wichtiger sind zukünftige Untersuchungen zur Aufklärung mikrobieller Zusammensetzungen und deren funktionelle Bedeutung.

IV. 1. 5 Vergleich der Horizonte von Neunzehnhain und Quitzdorf

Um potentielle Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Horizonten eines Sediments festzustellen, wurden die Horizonte 0-1 cm und 4-5 cm der Talsperren Neunzehnhain (Probenahme 5) und Quitzdorf (Probenahme 4) parallel analysiert (Abbildung 20). Dabei wurden nur geringe Schwankungen der vorkommenden phylogenetischen Gruppen sichtbar. In Neunzehnhain und Quitzdorf konnten innerhalb der *Firmicutes* Clostridien nur im Horizont von 4-5 cm nachgewiesen werden. Da in diesem Horizont anaerobe Verhältnisse herrschen, waren anaerobe Sporenbildner zu erwarten.

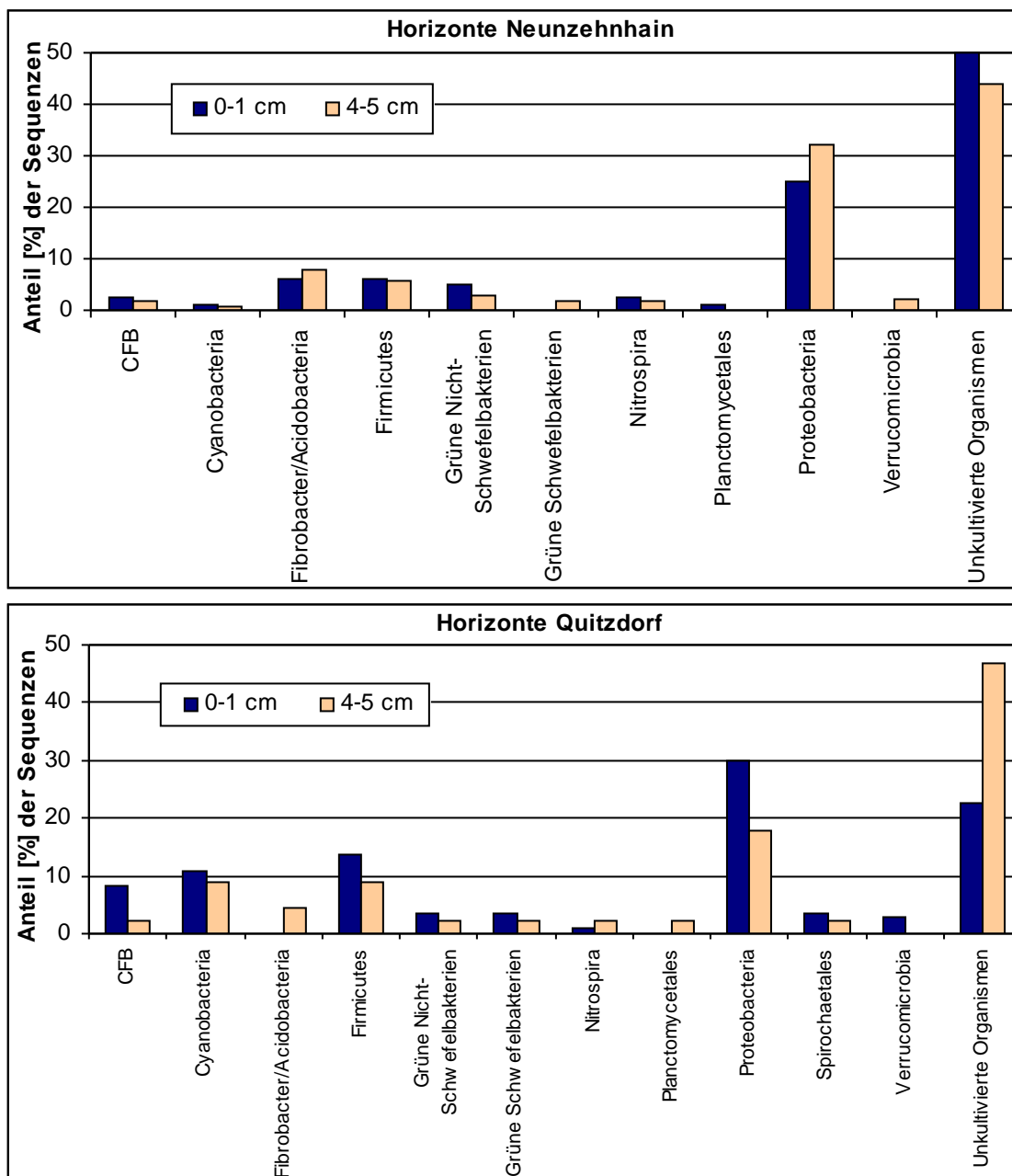


Abbildung 20 Phylogenetische Gruppen in den Horizonten

Die Sedimenthorizonte 0-1 cm und 4-5 cm der Talsperren Quitzdorf und Neunzehnhain wurden parallel analysiert. Es konnten kaum Unterschiede im Vorkommen der phylogenetischen Hauptlinien detektiert werden.

Im Gegensatz zu Neunzehnhain wurden *Planctomycetes* und *Fibrobacter/Acidobacteria* in Quitzdorf ausschließlich im unteren Horizont nachgewiesen (Abbildung 20). Möglicherweise deuten die Vertreter dieser phylogenetischen Gruppen auf wechselnde Umweltbedingungen oder Umwelteinflüsse hin. Neben den unidentifizierten Organismen, die auch in diesen Genbibliotheken die stärksten Gruppen bildeten, waren Vertreter der *Proteobacteria* die am Häufigsten repräsentierte phylogenetische Gruppe.

IV. 1. 6 Trophie der Talsperren und vorkommende Spezies

Trophie ist als Intensität der photoautotrophen Primärproduktion im Gewässer definiert. Eutrophierung ist die quantitative Zunahme und qualitative Verlagerung dieser Primärproduktion. Erstere zeigt sich in Seen vor allem im Wachstum (Biomassezunahme) von Phytoplankton, Phytobenthos und Makrophyten, letztere in einer Verschiebung des Artenspektrums dieser Produzenten. Oligotrophierung ist der umgekehrte Prozess. Man kann Trophie auch als Summe der Aufbauprozesse im Gewässer bezeichnen. In Seen oder Talsperren werden diese Aufbauprozesse besonders deutlich wirksam, da durch die langen Wasseraufenthaltszeiten eine enge Kopplung zwischen Nährstoffgehalt und Produktion besteht.

Um die Trophie zu ermitteln, ist eine hinreichend sichere d.h. häufige Untersuchung der Kriterien, welche die Trophie anzeigen notwendig (Phytoplankton, Phytobenthos, Makrophyten, Chlorophyll a, weitere Pigmente, Sichttiefe) sowie ferner der die Trophie bewirkenden Faktoren (v.a. Nährstoffe Phosphor, Stickstoff). Phosphor spielt dabei als limitierender Nährstoff für das Pflanzenwachstum eine besondere Rolle.

Der in Deutschland gebräuchlichste Ansatz zur Trophieklassifikation basiert auf der Grundlage der Kriterien Chlorophyll a, Sichttiefe, Phosphor-gesamt und Stickstoff-gesamt. Es werden folgende Trophiestufen unterschieden:

- oligotroph: geringe Nährstoffbelastung, geringe Algenproduktion, hohe Sichttiefe, ganzjährig hoher Sauerstoff-Sättigungsgrad bis zum Seegrund
- mesotroph: mäßige Nährstoffbelastung, mäßige Algenproduktion, zeitweise Algenblüten möglich, mittlere Sichttiefe, geringe Sauerstoffzehrung im Tiefenwasser und in der Sprungschicht
- eutroph: starke Nährstoffbelastung, hohe Algenproduktion, regelmäßige Algenblüten, geringe Sichttiefe, zeitweise anaerobe Zustände (totaler Sauerstoffschwund) im Tiefenwasser
- polytroph: übermäßig hohe Nährstoffbelastung, massive Algenentwicklung oft mit Blaualgendominanz, Sichttiefe nur noch im Zentimeterbereich, übermäßig hohe Sauerstoffzehrung, die den größten Teil des Wasserkörpers erfaßt.

In umfangreichen Untersuchungen der Makrophyten in Gewässern (Bayrisches Landesamt für Wasserwirtschaft) wurde deutlich, dass für die submersen Makrophyten keine ausreichenden Erkenntnisse zu indikativen Eigenschaften vorliegen. Durch weitere Entwicklungsvorhaben wird derzeit versucht, diese Lücke zu schließen.

Über den Zusammenhang von spezifischen Indikatorbakterien und der Trophie gibt es in der Literatur keine Angaben. In den vorliegenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Gesamtzellzahlen der Bakterien keine Rückschlüsse auf die Trophie zulassen.

Am Vorkommen von phylogenetischen Hauptgruppen wurde deutlich, dass

- *Spirochaetales* nur in Saidenbach (mesotroph) und Quitzdorf (eutroph) vorkamen,
- *Nitrospira* in den oligotrophen Talsperren Neunzehnhain und Muldenberg und der mesotrophen Talsperre Saidenbach detektiert wurden,
- Grüne Schwefelbakterien nur in Neunzehnhain und Quitzdorf und
- *Cyanobacteria* ausschließlich in Quitzdorf und Saidenbach repräsentiert waren.

Alle anderen phylogenetischen Gruppen kamen in allen Talsperren vor. So konnte anhand der Hauptlinien kein Muster festgestellt werden, welches auf die Trophie der Talsperren schließen läßt.

Bei der Untersuchung der Spezies innerhalb der Hauptgruppen wurden Unterschiede zwischen den Talsperren deutlich, die auf die Trophie zurückzuführen sein könnten, aber auch ihren Ursprung im Einzugsgebiet haben können.

Ein sehr deutlicher Anzeiger für die Trophie stellte eine Organismengruppe dar: innerhalb der *Cyanobacteria* Vertreter der Gattung *Microcystis*. Diese Mikroorganismen kamen ausschließlich in der eutrophen Talsperre Quitzdorf vor und erschienen auch makroskopisch sichtbar in Form von Algenblüten. In der Dissertation von MAAßEN konnte gezeigt werden, dass das Massenaufkommen von *Microcystis* stark beeinflusst wird von dem Stickstoff:Phosphor-Quotienten im Wasserkörper.

Somit ist die biochemische Charakterisierung von Gewässern derzeit noch die Methode der Wahl, um die Trophie zu bewerten. Um aus den identifizierten Spezies aus dieser Arbeit auf den trophischen Charakter zu schließen und sichere mikrobielle Indikatoren zu detektieren, sind weitere umfangreiche Untersuchungen der mikrobiellen Zusammensetzung von Gewässersedimenten nötig. Es sollten in nachfolgenden Studien mehrere trophisch eingeordnete Gewässer parallel untersucht und die bakteriellen Gemeinschaften aufgeklärt werden.

IV. 1. 7 Korrelation zwischen den Talsperren

Die Sedimente von Talsperren beherbergen eine komplexe und diverse mikrobielle Gemeinschaft. Die vergleichende 16S rDNA Analyse offenbarte 528 verschiedene Sequenztypen, welche zu 293 OTUs zusammengefaßt werden konnten. Über 59% dieser OTUs wurden in nur einer Talsperre gefunden. Die Anzahl der in mehreren Talsperren vorkommenden OTUs war in den vier Genbibliotheken der Sedimente ähnlich und bewegte sich zwischen 31,4% (Neunzehnhain) und 36,8% (Quitzdorf) an der Gesamtanzahl der OTUs. Nur 32 OTUs (über 11% aller OTUs) wurden in allen vier Sedimenten gefunden.

Die Ähnlichkeitsindices, die durch den paarweisen Vergleich der OTUs in den verschiedenen Genbibliotheken ermittelt wurden (nach DUNBAR 1999), differierten nicht signifikant zwischen den einzelnen Talsperren. Alle Kombinationen zweier Talsperren betrugten zwischen 54 und 64 OTUs, resultierend in Ähnlichkeitsindices zwischen 43,6% und 48,4%.

Die Anzahl der Sequenztypen erwies sich als unterschiedlich innerhalb der phylogenetischen Gruppen (Abbildung 21). In allen Talsperren wurde eine Häufung von Sequenzen der *Proteobacteria* und *Firmicutes* gefunden. Vertreter der *Proteobacteria* zeigten einen Anteil von 25,4% der Klone von Neunzehnhain, 46,0% der Klone von Muldenberg, 18,7% der Klone von Saidenbach und 28,0% der Klone von Quitzdorf. Innerhalb der *Proteobacteria* waren die Klone relativ gleichmäßig über die alpha-, beta-, gamma- und delta-Subgruppe verteilt. Im Gegensatz zu Muldenberg, Quitzdorf und Neunzehnhain, in denen die alpha-Subgruppe dominierte, wurde die höchste Anzahl der *Proteobacteria*-Sequenzen in der Genbibliothek von Saidenbach der delta-Subgruppe zugeordnet. Die 131 Sequenzen der alpha-Subgruppe wurden in 31 OTUs zusammengefaßt, wobei nur 3 OTUs in allen Sedimenten vorkamen und 18 OTUs spezifisch nur in einer Talsperre gefunden wurden (sog.

unique OTUs). Um die Divergenz in den vier Talsperren festzustellen, wurde der F_{ST} -Test für ausgewählte phylogenetische Hauptlinien angewendet (nach MARTIN 2002).

Innerhalb der alpha *Proteobacteria* wurde ein signifikanter genetischer Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Sediment-Gemeinschaften (ausgenommen Neunzehnhain und Saidenbach) deutlich. Diese zwei Genbibliotheken unterschieden sich nicht signifikant, z.B. bei den alpha *Proteobacteria* betrug $p = 0,207$. Beim Vergleich der gesamten 16S rDNA Bibliotheken der vier Talsperrensedimente wurde nur ein geringer Unterschied im Speziesreichtum der OTUs wie auch in der Gleichmäßigkeit der Verteilung der detektierten Sequenztypen innerhalb der phylogenetischen Gruppen ersichtlich. Jedoch weisen diese Unterschiede und speziell die Unterschiede auf Speziesebene darauf hin, dass jedes Sediment eine eigene, charakteristische mikrobielle Gemeinschaft besitzt.

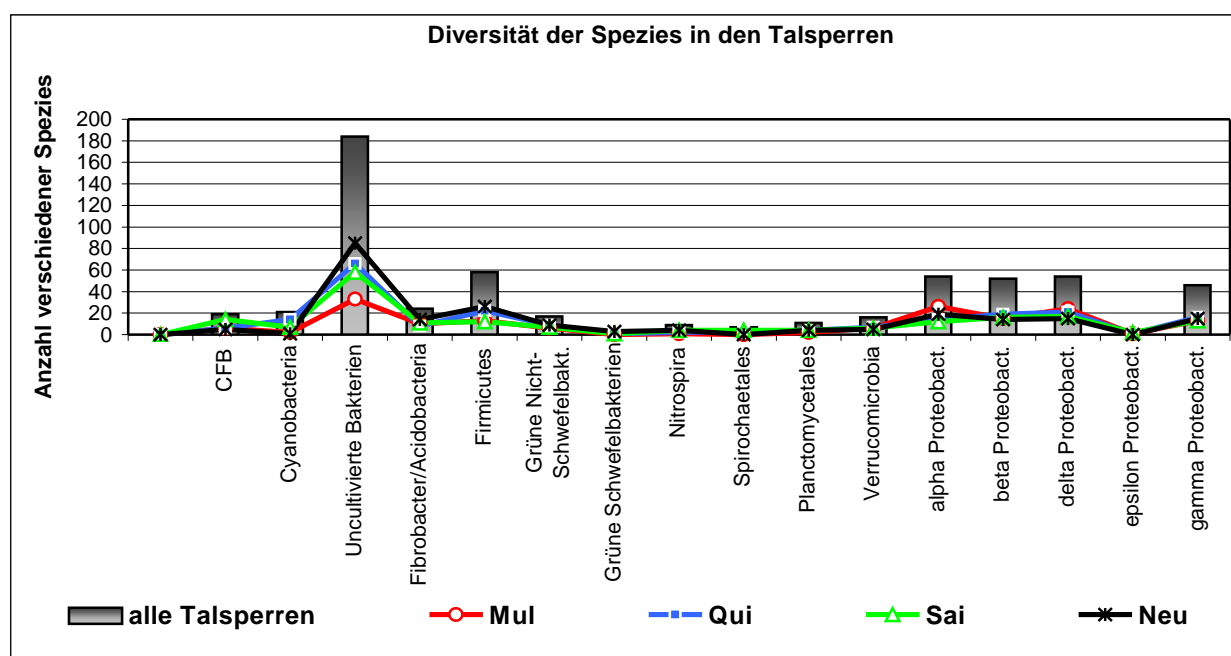


Abbildung 21 Zusammenfassung aller detektierte Spezies in den Talsperrensedimenten

Die Balken stellen die Zusammenfassung aller Talsperren für die entsprechende phylogenetische Hauptgruppe dar, die Linien verdeutlichen die Anteile der einzelnen Talsperren.

Die Unidentifizierten Bakterien repräsentieren Sequenzen in der Datenbank, die keiner bekannten phylogenetischen Gruppe zugeordnet wurden, sie bilden keine eigene phylogenetische Gruppe. Möglicherweise stellen Fraktionen dieser Organismen neue, bisher unbekannt phylogenetische Gruppen dar. Diese Sequenzen zeigten keine Sequenzhomologie, weder untereinander noch zu bekannten phylogenetischen Gruppen, daher suggerieren sie in der Abbildung 21 die höchste mikrobielle Diversität.

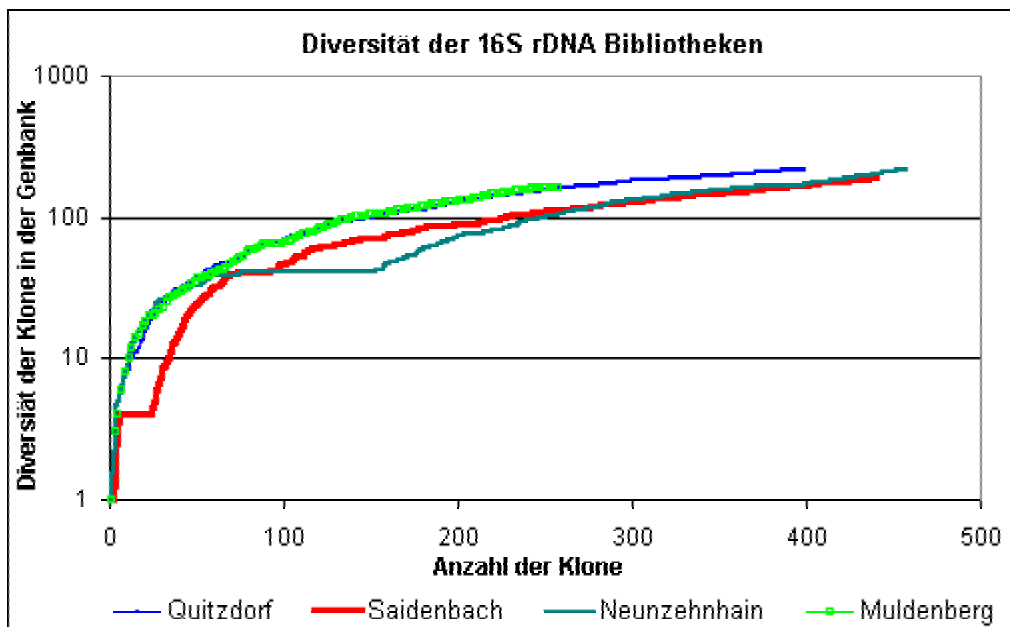


Abbildung 22 Abschätzung der Biodiversität der Talsperrensedimente

Die auf der Grundlage der 16S rDNA Bibliotheken gefundene Diversität konnte für die einzelnen Talsperrensediment anhand einer Sättigungskurve dargestellt werden.

Die Anwendbarkeit und der Nutzen der vergleichenden 16S rDNA Analyse zur Untersuchung der phylogenetischen Diversität komplexer mikrobieller Gemeinschaften wurde bereits in vielen Studien gezeigt (DUNBAR 1999, GLÖCKNER 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden 528 verschiedene Sequenztypen in den Talsperrensedimenten detektiert. Die hohe Anzahl verschiedener Sequenzen, welche in den Genbibliotheken gefunden wurde, bestätigt die Resultate in der Literatur. DUNBAR detektierte 498 verschiedene Sequenztypen bei der Untersuchung von trockenen Böden. Das Speziesspektrum in der hier vorliegenden Arbeit repräsentiert einen großen Teil der bekannten phylogenetischen Hauptlinien. Untersuchungen anderer mikrobieller Habitats, wie z.B. die bakterielle Gemeinschaft in Böden von Weizenfeldern durch SMIT (2001) zeigte eine gleichmäßige Verteilung auf fünf phylogenetische Gruppen: *Acidobacterium*, *Proteobacteria*, *Nitrospira*, *Cyanobacteria* und Grüne Schwefelbakterien.

In vorliegender Arbeit repräsentierten annähernd 60% der Sequenzen bekannte Bakterienspezies. Dieses Ergebnis korreliert gut mit Resultaten anderer molekularbiologischer Studien im Umweltbereich (DUNBAR 1999, HIORNS 1997). Seit der Einführung der vergleichenden rDNA Analyse in der mikrobiellen Ökologie wurden viele bisher unbekannte Sequenztypen gefunden. Die Häufung von Sequenzen spiegelt die Sicherheit der Ergebnisse wider. Literaturangaben beziehen sich oft auf das Vorkommen von nur einer Sequenz. In vorliegender Studie traten 80% aller Sequenzen mehr als einmal in der Genbibliothek auf.

Nach DUNBAR (1999) wird der generelle Diversitätsindex (Shannon Index) beeinflusst von den Parametern Richness (Reichtum) und Evenness (Gleichmäßigkeit der Verteilung). Vergleiche von bakteriellen Gemeinschaften aus verschiedenen Ökosystemen beziehen sich auf mehrere Elemente der Diversität: welche Bakterien sind vorhanden (Zusammensetzung), die Anzahl der Spezies

(Reichtum), die relative Verteilung der Spezies (Struktur) und die Gleichmäßigkeit in der Verteilung (DUNBAR 1999, HILL 2003).

Anhand der vorliegenden Daten konnte auch die Coverage, d.h. der Anteil der in der Arbeit detektierten Sequenztypen an der gesamten Artenvielfalt in den Sedimenten berechnet werden (JURETSCHKO 2002). Durch die Berechnung der Coverage nach McCaig (1999) und JURETSCHKO konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit detektierten Sequenztypen zwischen 75% (Muldenberg) und 85% (Neunzehnhain) der geschätzten Diversität abdecken. Dieses Ergebnis verdeutlicht zusammen mit den in Abbildung 22 dargestellten Daten die enorme Bedeutung von Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität in Sedimenten. Die minimale Anzahl der bakteriellen Spezies in den Sedimentgemeinschaften (abgeschätzt aus der Coverage und der Anzahl der detektierten verschiedenen OTUs) betrug zwischen 146 (Saidenbach) und 161 (Neunzehnhain und Quitzdorf). Dass die Sedimente real einen höheren OTU-Reichtum aufweisen wird durch die Chao-1 Schätzfunktion deutlich (Tabelle 5). Der geschätzte OTU-Reichtum für alle standardisierten Genbibliotheken mit einem Umfang von 248 Klonen (kalkuliert durch Rarefaction) legt nahe, dass die Genbibliothek von Saidenbach die geringste Zahl an OTUs und Muldenberg den höchsten OTU-Reichtum aufweist. Der kalkulierte OTU-Reichtum entspricht der Anzahl der OTUs einer Studie eines Zink-kontaminiertes Sedimentes (N=236) von HILL (2003). Auch der berechnete Shannon Index (H') der Sedimentgemeinschaften bewegte sich im gleichen Bereich wie in der vorgenannten Studie. Überraschenderweise war die durch den Shannon Index beschriebene Diversität in der mesotrophen Talsperre Saidenbach am niedrigsten. Obwohl die Diversität durch eine unvollständige Coverage (HILL 2003) unterschätzt werden kann, ist aus dem Vergleich von H' zu vermuten, dass die Sedimentgemeinschaften in Muldenberg und Quitzdorf eine höhere Diversität als in Neunzehnhain und Saidenbach besitzen.

Der Vergleich der Diversität der Genbibliotheken wird eingeschränkt durch die unsichere Definition der bakteriellen Spezies (ROSELLÓ-MORA 2001). Das derzeit von Systematikern genutzte Spezies-Konzept basiert auf einer Kombination von genomischen, phänotypischen und phylogenetischen Charakteristika. Die alleinige Analyse der 16S rDNA Sequenz ist für eine Beschreibung von Spezies nicht ausreichend (ROSELLÓ-MORA 2001). Allerdings ermöglicht die Sequenzinformation von einem oder von mehreren Genen, beispielsweise der 16S rDNA eine phylogenetische Klassifikation von Organismen (PACE 1996). Das Kriterium der 97% Sequenzhomologie wird genutzt zur Zuordnung von 16S rDNA Sequenzen zu individuellen Sequenztypen (Phylotypen) und zu bekannten Spezies. Dieses Kriterium basiert auf der empirischen Beobachtung, dass Bakterien mit weniger als 97% Sequenzähnlichkeit im phylogenetischen Spezieskonzept als verschiedene Spezies identifiziert werden können (STACKEBRANDT 1994). Nach ROSELLÓ-MORA (2001) müsste die Speziesdiversität höher sein, wenn Sequenzen mit einer genetischen Ähnlichkeit von $\geq 97\%$ verschiedenen bakteriellen Spezies angehören.

Die Verwendung molekularbiologischer Techniken wie die Extraktion der Gesamt-DNA aus dem Sediment, Amplifikation in der PCR und Klonierungsversuche resultieren in Genbibliotheken, welche keine quantitativen Aussagen über die mikrobielle Zusammensetzung zulassen. Dieses Vorgehen kann zu einer Fehleinschätzung der mikrobiellen Diversität führen (CHANDLER 1997, FARRELLY 1995, REYSENBACH 1992, SUZUKI 1996). Aus diesem Grund wurden in der Arbeit zwei universelle

16S rDNA Primersysteme getestet. Das Resultat unabhängig voneinander generierter 16S rDNA Bibliotheken mit den Primerpaaren zeigte keine signifikanten Abweichungen im Spektrum der Sequenztypen. Somit konnten die Untersuchungen reproduzierbar gestaltet werden.

Im Gegensatz zu Genbibliotheken aus der Literatur, welche von Sequenzen der alpha-*Proteobacteria* (McCAIG 1999) oder *Acidobacterium* Sequenzen (DUNBAR 1999) dominiert werden, zeigten die Genbibliotheken der untersuchten Talsperrensedimente die meisten Sequenztypen innerhalb der *Firmicutes* und der alpha-, beta-, gamma-, und delta *Proteobacteria*. Dieses Ergebnis korreliert mit der 16S rDNA Analyse des Bakterioplanktons (GLÖCKNER 2000, HIORNS 1997). In diesen Studien wurden die meisten Sequenzen innerhalb der *Proteobacteria* (alpha-, beta- und gamma-Subgruppe), der CFB Gruppe und den grampositiven Organismen mit einem hohen GC-Gehalt gefunden.

Obwohl die Gemeinschaften der verschiedenen Talsperren nur schwach auf der Ebene der phylogenetischen Gruppen differieren, konnte durch die Verwendung von Ähnlichkeitsindices zwischen 44% und 48% gezeigt werden, dass jede Talsperre eine spezifische mikrobielle Sedimentgemeinschaft aufweist. Das wird auch deutlich an dem hohen Anteil an OTUs (über 59%), welche nur in einer Talsperre gefunden wurden. Wie es anhand der alpha *Proteobacteria* gezeigt werden konnte, ist es möglich, die genetische Unterschiedlichkeit zwischen den Sedimentgemeinschaften mit dem F_{ST} -Test zu beschreiben (nach MARTIN 2002). Die OTUs, welche durch die 16S rDNA Analyse detektiert wurden, beinhalten hohe Anteile von Sequenzen vieler verschiedener unidentifizierter Bakterien mit unbekannter phylogenetischer Zuordnung. Weiterhin spielen Verzerrungen der mikrobiellen Gemeinschaft, basierend auf der Nukleinsäureextraktion, PCR und Klonierungsstrategien eine große Rolle und resultieren in Genbibliotheken, welche keine quantitative Aussage über Häufigkeiten bestimmter Spezies zulassen (CHANDLER 1997, FARRELLY 1995, REYSENBACH 1992, MARTIN-LAURENT 2001).

Aus diesem Grund sollte die Analyse bakterieller Gemeinschaften nicht nur auf der Amplifikation von 16S rRNA-Genen erfolgen, sondern mit der Kultivierung von Organismen oder der Abschätzung der dominierenden Strukturen mittels FISH kombiniert werden.

Tabelle 5 Anzahl der Sequenztypen und Diversitätsindices basierend auf den 16S rDNA-Bibliotheken von vier verschiedenen Talsperrensedimenten

Parameter	Genbibliotheken			
	Neu	Mul	Sai	Qui
Anzahl der Sequenztypen	457	248	424	386
Anzahl der OTUs	137	119	124	133
Anzahl der "unique" OTUs	43	38	43	49
Anzahl der nur einmal vorkomm. OTUs	67	62	67	68
Coverage [%]	85.3	75.4	84.7	82.6
OTU Reichtum *	98.8 (4.1)	119.0 (n.a.)	90.7 (3.9)	105.6 (3.7)
Chao-1 Reichtum*	220.1 (21.4)	192.9 (19.8)	210.3 (22.2)	239.9 (27.3)
Shannon index (H')	4.098	4.539	3.625	4.444
Shannon evenness index (E)	0.833	0.950	0.752	0.909

* OTU-Reichtum wurde kalkuliert durch Rarefaction (HILL 2003) mittels RAREFACT.FOR program (University of British Columbia [www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php]) für einen standardisierten Umfang von 248 Klonen. Das gleiche Programm wurde genutzt, um die Chao-1 Abschätzung vorzunehmen. Die Werte in Klammern sind die Standardabweichungen.

Die Schlussfolgerung aus dieser Untersuchung legt nahe, dass der trophische Charakter und die Unterschiede zwischen den Talsperren die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft beeinflussen. Dies wurde besonders deutlich in der Speziesdiversität. Die bakterielle Dichte der mikrobiellen Gemeinschaft hingegen wird nicht, oder nur zu einem geringen Teil, von der Trophie beeinflusst.

Die Detektion von Schlüssel-Spezies eines Sedimenttypes oder bakterielle Cluster, welche für bestimmte Funktionen eine wichtige Rolle spielen, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Der Einfluss allochthoner und autochthoner Bedingungen auf die mikrobielle Zusammensetzung ist heute noch weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spiegelt die mit Hilfe der 16S rDNA Analyse aufgedeckte mikrobielle Struktur spezifische Umweltparameter wider, welche typisch für den trophischen Charakter der untersuchten Talsperren sind. Die Resultate deuten darauf hin, dass bestimmte Indikatoren, welche die Unterschiede in der mikrobiellen Struktur darstellen, den trophischen Charakter der Talsperren reflektieren. Um diese Frage weiter aufzuklären, müssten weitere Talsperren mit ähnlichem Charakter untersucht werden. Damit könnte das bestehende Wissen um die Struktur und Funktion der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft in Talsperren wesentlich erweitert werden. Die große Anzahl der Sequenzen mit geringen Homologien zu bekannten Spezies weist auf die Bedeutung von Studien der mikrobiellen Gemeinschaft in Umweltproben hin. Vorliegende

Ergebnisse unterstützen Literaturangaben und verdeutlichen, dass die mikrobielle Diversität in Sedimenten wesentlich höher ist als bisher angenommen (TIEDJE 1999).

Die *in situ* Detektion von Organismen durch spezifische Oligonukleotidsonden, möglicherweise in Kombination mit Mikroaudiographie (LEE 1999), erscheint ein vielversprechender Ansatz zur Quantifizierung und Identifizierung von Vertretern der mikrobiellen Gemeinschaften, die für bestimmte Stoffumsätze verantwortlich sind. Weiterhin halten PCR-basierende Fingerprinttechniken, wie DGGE oder T-RFLP, immer mehr Einzug in die molekularbiologische Untersuchung von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften und ermöglichen die Analyse von zeitlichen Veränderungen oder räumlichen Variationen.

IV. 2 Analyse mikrobieller Gemeinschaften mittels Fingerprinttechniken

Zur Analyse der mikrobiellen Diversität der Talsperrensedimente wurden verschiedene Fingerprinttechniken zur Erzeugung komplexer Muster eingesetzt. Die auf diese Weise erhaltenen Muster basierten auf amplifizierten Bereichen der 16S rDNA (DGGE, T-RFLP), der Spacer-Region zwischen der 16S und der 23S rDNA (ARISA) oder auf spezifischen Genen für Schlüsselenzyme (sulfatreduzierende Bakterien in der DGGE). Ein besonderes Interesse bestand im Monitoring von jahreszeitlichen Schwankungen der mikrobiellen Populationen innerhalb einer Talsperre. Darüber hinaus sollte durch den Vergleich von Talsperrenhorizonten und die Detektion spezifischer Organismengruppen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen den verschiedenen Talsperren deutlicher hervortreten.

IV. 2. 1 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Auf der Grundlage der bakteriellen 16S rDNA sollte eine umfassende Analyse des mikrobiellen Spektrums mittels DGGE erfolgen. Darüber hinaus sollte auch das Vorkommen von sulfatreduzierenden Organismen durch die Amplifikation der Gene für das Schlüsselenzym DSR dargestellt werden. Die Technik der DGGE wurde im Rahmen dieser Dissertation erstmals zur Untersuchung von Talsperrensedimenten im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene eingesetzt, so dass zur Untersuchung von Sedimentproben umfangreiche Vorversuche und Optimierungsexperimente notwendig waren.

IV. 2. 1. 1 Anpassung und Optimierung der DGGE

Den ersten Schritt zur Analyse mittels DGGE stellte die effiziente Amplifikation der Zielnukleinsäuren dar. Weiterhin war es für eine effektive und deutliche Darstellung von Fragmenten im Gel wichtig, die jeweils geeigneten DNA-Konzentration zu ermitteln. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Polyacrylamidgelen ist von mehreren Faktoren abhängig. Entscheidende Parameter stellen die Konzentration an Acrylamid und denaturierendem Reagenz, die Länge der amplifizierten Fragmente sowie die Laufzeit dar.

IV. 2. 1. 1. 1 Amplifikation von Nukleinsäuren

Im Gegensatz zu den Talsperren Quitzdorf, Neunzehnhain und Saidenbach gestaltete sich die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Sedimentproben der Talsperre Muldenberg aufgrund hoher Konzentration an Huminstoffen sehr problematisch. Um eine erfolgreiche Vervielfältigung der DSR-Gene zu gewährleisten, musste die extrahierte DNA zusätzlich über eine Ethanol-fällung aufgereinigt werden. Dadurch konnte die Konzentration der inhibitorisch wirkenden Huminsäuren erheblich gesenkt werden.

IV. 2. 1. 1. 2 Aufreinigung der PCR-Produkte zur Analyse mittels DGGE

Nach der Durchführung der PCR war es notwendig, Puffersalze sowie überschüssige PCR-Komponenten (Primer etc.) aus dem Ansatz zu entfernen und ggf. die Konzentration der DNA zu erhöhen. Die Aufreinigung erfolgte mittels Affinitäts-Säule oder durch Ethanol-fällung. Im Gegensatz zur Säulenaufreinigung werden bei der Ethanol-fällung die Primer nicht abgetrennt. Daher wurde der Einfluss von enthaltenen Primern auf das DGGE-Ergebnis untersucht. Hierzu wurden 2 PCR-Produkte parallel mittels Affinitäts-säulen und Ethanol-fällung aufgereinigt und in der DGGE eingesetzt. Die resultierenden Bandenmuster ließen keine Unterschiede zwischen den parallel aufgereinigten Produkten erkennen. Nachfolgend wurden daher die PCR-Produkte mittels Ethanol-fällung für die DGGE-Analyse vorbereitet.

IV. 2. 1. 1. 3 Optimierung der aufzutragenden DNA-Konzentration

Der Nachweis des Bandenmusters ist maßgeblich von der eingesetzten DNA-Menge abhängig. Bei zu hohen DNA-Konzentrationen können dunkelgelbe Banden entstehen. Die Sensitivität wird dadurch nicht beeinflusst, jedoch wirkt sich bei der Färbung die Verwendung von stark unterschiedlichen DNA-Konzentrationen in nebeneinander liegenden Laufspuren negativ aus. Die Entwicklungszeit korreliert mit der Menge an DNA und bei differierenden Konzentrationen kommt es zu einer ungleichmäßigen Färbung. Es erwies sich als geeignet, Fragmente des gleichen Gens oder Amplifikate aus einem Untersuchungsobjekt in einem Gel zu analysieren. Diese Vorgehensweise empfiehlt sich aufgrund unterschiedlicher Bandenmuster und Amplifikationseffizienzen zwischen verschiedenen Proben.

Zur Bestimmung der optimalen DNA-Konzentration wurden verschiedene Konzentrationen (120 µg, 210 µg, 300 µg, 390 µg und 480 µg) der amplifizierten 16S rDNA Fragmente des Horizontes 0-0,5 cm der Talsperre Neunzehnhain (Probenahme 7) auf das DGGE-Gel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend gefärbt (Abbildung 23). Aufgrund der hohen Sensitivität der Silberfärbung erwies es sich als optimal, 150-200 µg PCR-Produkt auf das Polyacrylamidgel aufzutragen.

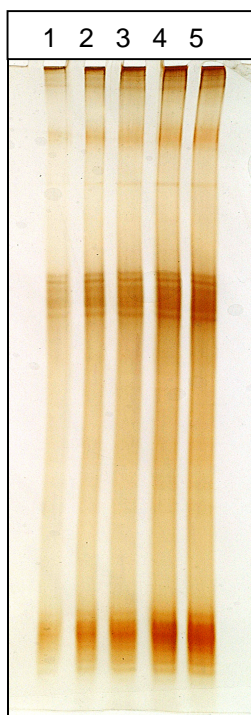


Abbildung 23 Silbergefärbtes DGGE-Gel

In diesem Gel sind unterschiedliche Mengen an PCR-Fragmenten dargestellt (Spur 1- 120 µg; Spur 2- 210 µg, Spur 3- 300 µg, Spur 4- 390 µg, Spur 5- 480 µg DNA) (LUDWIG 2002)

IV. 2. 1. 1. 4 Optimierung der Acrylamidkonzentration

Die Konzentration an Acrylamid im Gel ist direkt von der Länge der aufzutrennenden Fragmente abhängig. Je höher die Konzentration an Acrylamid, desto kürzere Fragmente können separiert werden. Diese Korrelation geht aus dem Vernetzungsgrad hervor, welcher proportional mit der Konzentration an Acrylamid steigt. Beim Vergleich der optimalen Bedingungen zur Analyse der Talsperrensedimente mit Literaturangaben sind starke Variationen feststellbar. Die verwendeten Acrylamid- und denaturierenden Konzentrationen einzelner Arbeitsgruppen im Überblick: DEPLANCKE (2000) linearer Gradient von 30-60% und 8% Acrylamid (AA); McCAIG (2001) 40-60% und 8% AA; TESKE (1996) 20-70% und 6% AA; VETRIANI (1999) 20-60% und 6% AA; FAVIER (2001) 40-50% und 8% AA. Der Auftrennungsbereich kann optimal an die zu analysierende Probe angepasst werden, indem der Verlauf des denaturierenden Gradienten variiert wird. Zur Auftrennung der ca. 500 bp langen PCR-Produkte wurde zunächst die vom Hersteller empfohlene Acrylamidkonzentration von 8% eingesetzt. Bei dieser Konzentration betrug jedoch die Laufstrecke der DNA-Fragmente nur etwa 8 cm der gesamten zur Verfügung stehenden Trennstrecke von 16 cm. Zur Verlängerung der Laufstrecke wurde deshalb die Acrylamidkonzentration auf 7% reduziert, wodurch die Laufweite auf die gesamte Länge des Gels ausgedehnt wurde.

IV. 2. 1. 1. 5 Ermittlung der optimalen Konzentration an denaturierendem Reagenz

Bei der Optimierung stellte der GC-Gehalt der DNA-Fragmente eine wesentliche Einflussgröße dar. Die Auftrennung der DNA-Fragmente im DGGE-Gel ist direkt abhängig von der Konzentration an denaturierend wirkenden Reagenzien wie Harnstoff und Formamid. Eine vollständige Denaturierung

(100% Denaturierung) der PCR-Produkte wird bei Konzentrationen von 7 M Harnstoff und 40% Formamid erreicht. Im DGGE-Gel wird durch Mischen einer Gellösung mit niederer und einer Gellösung mit hoher Konzentration an denaturierenden Reagenzien ein Gradient erzeugt, der durch eine Zunahme denaturierender Bedingungen charakterisiert ist. Zur Herstellung des Gradienten wurde anhand der experimentell bestimmten Laufstrecken der PCR-Produkte eine Konzentration von 43% der vollständigen Denaturierung als optimal für die niedere Konzentration bestimmt. Die hohe Konzentration wurde entsprechend des GC-Gehaltes der zu trennenden PCR-Produkte angepasst und optimiert. Für die Analyse der 16S rDNA wurde experimentell eine Konzentration von 58% der vollständigen Denaturierung ermittelt und für die α -Untereinheit der Dissimilatorischen Sulfid Reduktase eine Konzentration von 60% der vollständigen Denaturierung. Aufgrund der oben durchgeführten Analyse wurde die beste Auftrennung der Fragmente bei Verwendung eines Gels mit flachem Gradienten, d.h. geringem Unterschied zwischen niederer und hoher Konzentration an denaturierendem Reagenz erzielt.

IV. 2. 1. 1. 5 Anpassung der Laufzeit

Weitere Parameter mit starkem Einfluss auf die Auftrennung sind die Zeitdauer und die angelegte Spannung während der Elektrophorese. Die Spannung korreliert mit der Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente. Es wurden verschiedene Zeitintervalle als Laufzeit erprobt (3,5 h bei 200 V, 6 h bei 130 V, 14 h bei 60 V, 16 h bei 75 V und 18 h bei 60 V). Eine Laufzeit von 16 h bei einer Spannung von 75 V (35 mA) erwies sich als optimal zur Auftrennung der PCR-Produkte (McCAIG 2001).

IV. 2. 1. 1. 6 Wahl der geeigneten Silberfärbemethode

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von DNA in Polyacrylamidgelen. Es existieren verschiedene Protokolle, mit denen DNA oder RNA direkt im Gel angefärbt oder in einem auf einer Polybondfolie immobilisierten Gel sichtbar gemacht werden kann (BLUM 1987). Zunächst wurde die Silberfärbung nach BLUM eingesetzt. Diese Färbetechnik führte allerdings zu schwer interpretierbaren Ergebnissen. Die teilweise oder vollständige Ablösung des Gels vom Träger (Polybondfolie) führte zu einer sehr ungleichmäßigen Färbung. Darüber hinaus hatte die Verwendung der Polybondfolie den Nachteil, dass die wasserlösliche Beschichtung je nach Laufzeit die Anfärbbarkeit der DNA verschlechterte. Aufgrund der mäßigen Ergebnisse wurde eine Silberfärbung nach dem Protokoll der Fa. BioRad getestet. Diese Methode beruht auf der chemischen Umwandlung der DNA zu RNA und führte zu wesentlich besseren Resultate und wurde somit für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Die Optimierungsarbeiten verdeutlichen, dass die Einstellung der Parameter individuell auf das zu untersuchende Fragment und abhängig vom Untersuchungsmaterial erfolgen muss. Nur ein Zusammenwirken aller optimal eingestellten Bedingungen sichert ein optimales Auftrennungsverhalten. Die Optimierung der einzelnen Schritte ist sehr zeitaufwendig, da die Komplexität der miteinander verbundenen Faktoren der DGGE sehr groß ist.

IV. 2. 1. 2 16S rDNA Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE

Ausgehend von einer hohen mikrobiellen Diversität in den Talsperresedimenten sollte sich die mikrobielle Zusammensetzung in der DGGE-Analyse in einem komplexen Bandenmuster äußern. Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Talsperren, in den Horizonten einer Talsperre wie auch der evtl. Einfluss von Umweltbedingungen und Jahreszeiten auf die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften sollten mit dieser Technik deutlich werden.

IV. 2. 1. 2. 1 Herstellung eines Standards für die DGGE-Analyse

Zur Kontrolle der Laufbedingungen wie auch zum Vergleich der Bandenmuster war es notwendig, einen Standard mitzuführen. Dieser Standard sollte ein definiertes Bandenmuster liefern und Aussagen über die Vergleichbarkeit verschiedener Gele zulassen. Dazu wurden PCR-Produkte der 16S rDNA verschiedener Bakterienspezies mittels DGGE analysiert. Aufgrund des aus Sequenzunterschieden resultierenden unterschiedlichen Laufverhaltens wurde ein Standard aus *Porphyromonas endodontis*, *Moraxella osloensis*, *Legionella sainthelensis*, *Dehydroabietic acid-degrading bacterium*, *Stenotrophomonas maltrophila* und *Corynebacterium asperum* zusammengestellt. Diese Reihenfolge entspricht der Abfolge der Banden im denaturierenden Polyacrylamidgel (von oben nach unten) wie es in Abbildung 24 dargestellt ist. Aufgrund mehrerer rRNA-Operons in Organismen steht oftmals nicht nur eine Bande für einen Mikroorganismus und daher ist eine einzelne Beschriftung der Banden nicht möglich. Die Reihenfolge der dargestellten Organismen ergab sich aus Vorversuchen, in denen die 16S rDNA-Fragmente der Mikroorganismen in getrennten Laufspuren aufgetragen und analysiert wurden.

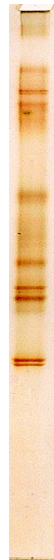


Abbildung 24 Standard aus 16S rDNA-Fragmenten (7%iges Polyacrylamidgel, Gradient 43% bis 60%). Der Standard besteht aus Amplifikaten von *Porphyromonas endodontis*, *Moraxella osloensis*, *Legionella sainthelensis*, *Dehydroabietic acid-degrading bacterium*, *Stenotrophomonas maltrophila* und *Corynebacterium asperum* (LUDWIG 2002)

IV. 2. 1. 2. 2 Vergleichende Untersuchungen der Talsperrensedimente

Nach der 16S rDNA-Amplifikation und Analyse im DGGE-Gel zeigten die erhaltenen Bandenmuster deutliche Unterschiede zwischen den Talsperren Neunzehnhain, Quitzdorf und Saidenbach. Das Amplifikat der Sedimente aus Muldenberg lieferte kein charakteristisches Bandenmuster. In der Abbildung 25 sind repräsentative Bandenmuster der untersuchten Talsperren abgebildet.

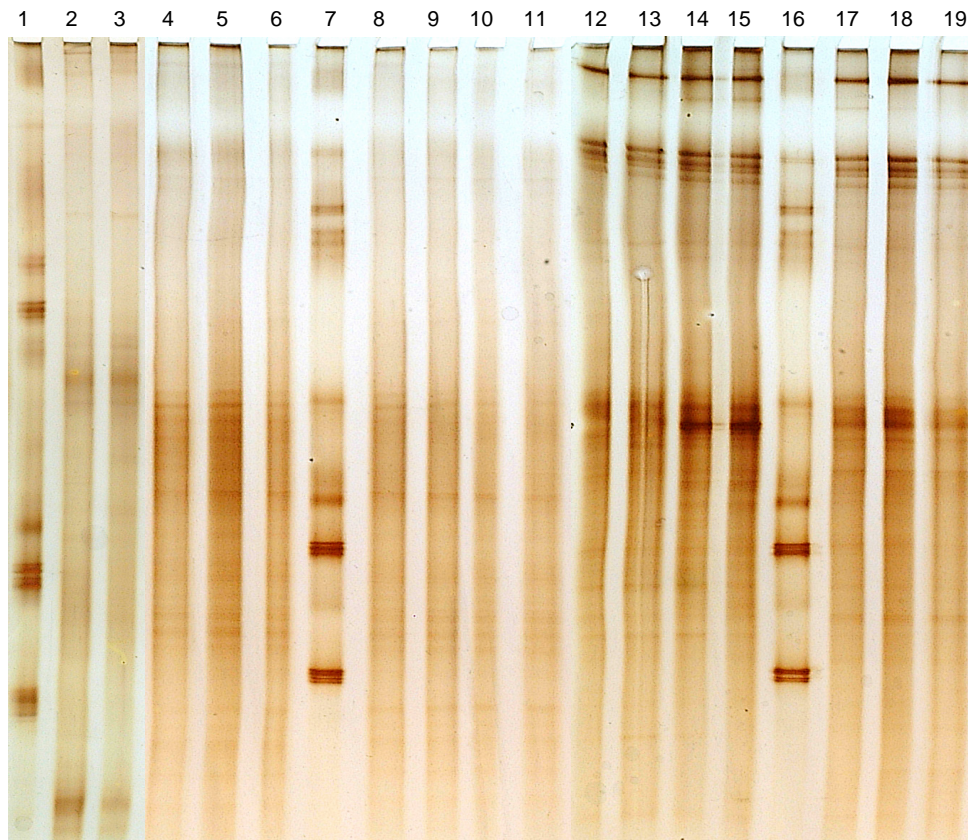


Abbildung 25 DGGE-Bandenmuster (Probenauftrag in Tabelle 6)

In dem DGGE-Gel wurden neben dem Standard die amplifizierte 16S rDNA der Talsperren aufgetragen. Gradient 43% bis 65% (LUDWIG 2002)

Tabelle 6 Probenauftrag in dem Polyacrylamidgel in Abbildung 25 25

Spur	Talsperre	Probenahme	Horizont in cm	Niedere denat. Konzentration in %	Hohe denat. Konzentration in %
1	Standard	-	-	43	65
2	Neunzehnhain	1	4 bis 5	43	65
3	Neunzehnhain	1	0 bis 0,5	43	65
4	Quitzdorf	7	0 bis 0,5	43	65
5	Quitzdorf	7	0,5 bis 1	43	65
6	Quitzdorf	7	1 bis 1,5	43	65
7	Standard	-	-	43	65
8	Quitzdorf	7	1,5 bis 2	43	65
9	Quitzdorf	7	2 bis 3	43	65
10	Quitzdorf	7	3 bis 4	43	65
11	Quitzdorf	7	4 bis 5	43	65
12	Saidenbach	8	0 bis 0,5	43	65
13	Saidenbach	8	0,5 bis 1	43	65
14	Saidenbach	8	1 bis 1,5	43	65
15	Saidenbach	8	1,5-2	43	65
16	Standard	-	-	43	65
17	Saidenbach	8	2 bis 3	43	65
18	Saidenbach	8	3 bis 4	43	65
19	Saidenbach	8	4 bis 5	43	65

Durch die Resultate der vergleichenden 16S rDNA Analyse waren Unterschiede im DGGE-Bandenmuster der Talsperren zu erwarten. Diese Erwartung konnte bestätigt werden. Zwischen den einzelnen Probenahmen der Talsperrensedimente waren nur geringe Variationen der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu vermuten, da das Sediment eine stabile Schichtung aufwies. Die Analyse mehrerer Probenahmen von verschiedenen Jahreszeiten einer Talsperre lieferte identische oder nur wenig abweichende Muster. Diese geringen Unterschiede zeigen, dass die mikrobielle Zusammensetzung des Sedimentes kaum saisonalen Schwankungen unterliegt. Wenn es Veränderungen gibt, so sollten sich diese vor allem an der Sedimentoberfläche bemerkbar machen, da der Wasserkörper Veränderungen im Jahresverlauf unterlegen ist.

Im Sediment nehmen mit zunehmender Tiefe organisches Material und Sauerstoff ab. In Abhängigkeit des verfügbaren Sauerstoffs sowie auch der Nährstoffe waren Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung in den Horizonten zu erwarten. Entgegen dieser Annahme zeigte die Analyse der unterschiedlichen Horizonte einer Probenahme stabile Muster. Diese Stabilität ist jedoch bei der Betrachtung aktiver Mikroorganismen nicht sehr wahrscheinlich, da unterschiedliche Nährstoff- und Sauerstoffbedingungen die Spezieszusammensetzung bestimmen. Dieser Einfluss wurde ebenfalls durch eine Abnahme der Zellzahlen mit der zunehmenden Tiefe offensichtlich. Aus der Abnahme der Zellzahlen wird deutlich, dass ein gewisser Anteil der DNA entweder extrazellulär an das Sediment

gebunden vorliegen muss oder in den abgestorbenen Bakterien im Sediment noch vorhanden ist, um mittels der DGGE die gleichen Muster wie im oberen Horizont verursachen zu können (LUNA 2002).

Eine starke Beeinflussung der Bandenmuster könnte von der DGGE selbst ausgehen. Zur Analyse muss eine GC-reiche Sequenz (GC-Klammer) an das zu untersuchende DNA-Fragment angefügt werden. Durch Verwendung eines modifizierten Primers, der diese Sequenz 5'-seitig besitzt, wird die Verlängerung des Fragmentes erreicht. Diese GC-reiche Sequenz verlängert den Primer um etwa 40 Nukleotide, was zu einer veränderten Kinetik führt.

Die Grundlage für den Vergleich verschiedener Proben bildet das resultierende Bandenmuster. Jedoch ist die Separation der Banden schwierig, da der GC-Gehalt der 16S rDNA bei verschiedenen Spezies ähnlich ist. Die Ausbildung von unterschiedlichen Schmelzdomänen in den jeweiligen Sequenzen ist für die Trennung entscheidend. Diese Auftrennung ist im Hinblick auf die zu erwartende Vielfalt an unterschiedlichen Sequenzen (Mikroorganismen im Sediment) nicht vollständig zu erreichen. Dies wird daran verdeutlicht, dass der Unterschied zwischen der niedrigen und hohen denaturierenden Konzentration nur 15% beträgt.

Somit erschienen im Bandenmuster sehr eng zusammenliegende Banden als sog. Schmier. Diese Banden konnten nicht spezifischer separiert werden und somit ist die statistische Auswertung nicht möglich.

In der Literatur wurden bis jetzt mit der DGGE (beispielsweise bei McCAIG 2001 und TESKE 1996) nur Bandenmuster zu einem Zeitpunkt gezeigt. Untersuchungen der Dynamik, des Wechsels des Vorhandenseins von Mikroorganismen an einem Ort zu unterschiedlichen Zeiten wurden bisher mit dieser Technik noch nicht durchgeführt. Eine entscheidende Beeinflussung der Methode resultiert aus der notwendigen Verwendung der GC-reichen Sequenz, des verwendeten Primerpaares (entscheidend für die Charakteristika des Fragmentes) und aus dem generierbaren Bandenmuster aus dem genutzten denaturierenden Gradienten.

IV. 2. 1. 3 Analyse der sulfatreduzierenden Bakterien auf Grundlage der DSR-Amplifikate

IV. 2. 1. 3. 1 Entwicklung eines spezifischen Primersystems

Zur DGGE-Analyse der Diversität sulfatreduzierender Bakterien wurde ein Primersystem auf der Grundlage der von WAGNER (1998) beschriebenen Primer DSR1F und DSR4R entwickelt. Die ursprünglichen Primer amplifizieren ein Fragment, welches die α - und β - Untereinheit der Dissimilatorischen Sulfit Reduktase (DSR) umfasst und eine Länge von 1,9 kb aufweist. Die Entwicklung eines neuen Primers war notwendig, da die Amplifikationseffizienz mit zunehmender Fragmentlänge sinkt und eine optimale Auftrennung der Fragmente im DGGE nur bei kürzeren Fragmenten (bis ca. 500 bp) gewährleistet ist. Basierend auf der Erstellung und Analyse von Sequenz-Alignments von DSR-Sequenzen (NCBI-Datenbank) wurde ein Sequenzbereich ermittelt, welcher eine hohe Spezifität für sulfatreduzierende Organismen aufweist (Abbildung 26). Dieser Bereich wurde für die *Desulfovibrio*-Gruppe angepasst und als Zielsequenz des Primers DSR-FLR gewählt.

			* * *	*
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	29	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTTGACGGCT	BCCCDATGGTTGCGT	_TGCTTC_CATCGCA
<i>Desulfovibrio spec.</i>	29	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTCCGACGGCT	BCCCDACGGCTGCGT	_GGCCTC_CATCGCC
<i>Desulfovibrio vulgaris oxamicus</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCDACGGCTGCGT	_GGCCTC_CATCGCC
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCDACGGCTGCGT	_GGCCTC_CATCGCC
<i>Desulfomonas pigra</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCDACGGCTGCGT	_GTGCGC_CATGGCC
<i>Desulfovibrio africanus</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCDATGGGCTGCGT	_GTGTTT_CATCGCC
<i>Desulfovibrio longus</i>	47	GTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCGACGGCTGCGT	_GGCCTC_CATCGCC
<i>Desulfovibrio intestinalis</i>	47	CTACAATTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCDACGGTTGCGT	_GTGCGC_CATGGCG
<i>Desulfococcus multivorans</i>	29	CTATAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCDACGGTTGTTT	_TGCTTC_CATCGCC
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGCT	BCCCGACGGCTGCGT	_GGCCTC_CATCGCC
<i>Desulfomicrobium escambiense</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGATGGTT	BCCCGAATGGTTGCGT	_GGCCTC_CATCGCC
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	44	GTACAAGTTTAAATTCAGTTTGACGGCT	BCCCDACCTGCTGCGT	_GGCCTC_CATCGCC
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGATGGTT	BCCCGAATGGTTGTTT	_GGCTTC_CATTGCC
<i>Desulfomicrobium apsheronum</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGATGGTT	BCCCGAATGGTTGCGT	_GGCTTC_CATCGCT
<i>Desulfovibrio cuneatus</i>	47	CTACAAGTTCAAGTTCAAGTTGACGGTT	BCCCDACGGTTGCGT	_AGTGC_CATTGCA

Abbildung 26 Partielles Alignment von DSR-Sequenzen.

Die Zielsequenz des Primers DSR-FLR ist eingerahmt (* degenerierte Basen) (LUDWIG 2002)

Die Spezifität des Primersystems DSR-FLR in Kombination mit DSR1F wurde mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese sowie durch Klonierung und anschließender Sequenzierung des PCR-Produktes überprüft. *Desulfovibrio desulfuricans* als Positiv-Kontrolle lieferte ein PCR-Produkt der erwarteten Länge (450 bp), während die DNA von *E. coli* zu keinem Amplifikat führte. Die extrahierte DNA aus den Sedimentproben (Gesamthorizonte) wurde ebenfalls mit diesem Primersystem und parallel mit DSR1F/DSR4R amplifiziert. Dabei wurde mit den Primern DSR1F/DSR-FLR in der Talsperre Quitzdorf eine hohe Amplifikationseffizienz erreicht, hingegen mit DSR1F/DSR4R (Amplifikation des gesamten DSR-Gens) nur eine geringe Amplifikationseffizienz. Zur qualitativen Kontrolle der mittels des neuen Primersystems erhaltenen PCR-Fragmente wurden diese in *E. coli* kloniert und anschließend zufällig ausgewählte rekombinante Klone sequenziert und mit Datenbanken verglichen.

Bei allen analysierten Sequenzen handelte es sich um DSR-Sequenzen (Tabelle 7). Dabei zeigten die Sequenzen größte Ähnlichkeit zu Sequenzen von *Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16* (Accession-Nr. AY096042) und *Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SU-29* (Accession-Nr. AY096057).

Diese Sequenzen wurden in der vergleichenden 16S rDNA Analyse nicht gefunden. Das ist darauf zurückzuführen, dass mittels universeller Primer eine Vielzahl von Sequenzen amplifiziert werden und es dabei zu einer Begünstigung von bestimmten Sequenzen kommen kann. Andererseits kann die Amplifikation von Sequenzen, deren Zielregion nicht ideal auf die Primersequenz abgestimmt ist, unterdrückt werden. Möglicherweise spielt neben diesem Fakt auch die Anzahl der entsprechenden „benachteiligten“ Sequenzen eine Rolle. Höchstwahrscheinlich sind die im DGGE detektierten Sequenzen F1SP-16 und F1SU-29 nur in geringen Abundanzen in den Sedimenten vorhanden, sodass sie in den Genbibliotheken der vergleichenden 16S rDNA Analyse nicht nachgewiesen wurden.

Tabelle 7 Ergebnis des Datenbankvergleichs

Klon-Nr.	Sequenz-Homologien	Identifizierung mit % und e ^{-x} Wert
1	100%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 90%, e ⁻¹⁴²
2	98,4%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 90%, e ⁻¹⁴⁴
15	97,8%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 90%, e ⁻¹⁴⁶
5	95,3%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 91%, e ⁻¹²⁹
7	93,3%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 91%, e ⁻¹⁴²
9	92,1%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 90%, e ⁻¹⁴¹
8	88%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SP-16 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 90%, e ⁻¹⁴³
12	71%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SU-29 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 88%, e ⁻¹¹⁹
10	70%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SU-29 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 85%, e ⁻⁸⁹
4	69%	Uncultured sulfate reducing bacterium clone F1SU-29 dissimilatory sulfite reductase subunit A (dsrA) gene, partial cds mit 85%, e ⁻⁹¹

Der e-Value berechnet sich aus dem Score und aus der Länge der Sequenz. Der e-Value gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die gefundenen Sequenz nur zufällig mit der vorgegebenen Sequenz übereinstimmt. Je kleiner der e-Value, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Sequenzen miteinander verwandt sind. (LUDWIG 2002)

In Abbildung 27 und Abbildung 28 sind die Alignments zwischen der Sequenz des Klon Nr. 15 (die Benennung „Klon Nr. 15“ entspricht dem 15. analysierten Klon) und der Sequenz F1SP-16 auf Ebene der DNA und der Aminosäuresequenz dargestellt. Aufgrund des hohen e-Value Wertes von e⁻¹⁴⁶ ist eine enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen den entsprechenden Organismen sehr wahrscheinlich.


```

F1SP-16      1  GCGGTCATCGGCGGGTATCCCGATCTCCAGGAGCAGTTCCCGTCTATCGCCCACTTCCAC
Klon 15      1  GCGGTCATCGGCGGGTATCCCGATCTCCAGGAGCAGTTCCCGTCTATCGCCCACTTCCAC

F1SP-16     61  ACCATGCGGTGTTAATCAGCCGGGAGCTATTTTACACACGGGATATCTCAGAACCCTT
Klon 15     61  ACCATGCGGTGTTAATCAGCCGGGAGCTATTTTACACACGGGATATCTCAGAACCCTT

F1SP-16    121  TGTGATCTGTGGGAGTACCGTGGAGCCGGGATGATGACTTTTCATGGATCAGCCGGCGAC
Klon 15    121  TGTGATCTGTGGGAGTACCGTGGAGCCGGGATGATGACTTTTCATGGATCAGCCGGCGAC

F1SP-16    181  ATCATTITTCCTGGGACCTTTTACCGAACAACCTGGAGCCCATTTTCTTGAATGACCCAT
Klon 15    181  ATCATTITTCCTGGGACCTTTTACCGAACAACCTGGAGCCCATTTTCTTGAATGACCCAT

F1SP-16    241  GTGCTTCAGCAGGATCTGGGCGGGTCGGGTTCAAACTCAAGACGCTTCCCTGCTGCATC
Klon 15    241  GTGCTTCAGCAGGATCTGGGCGGGTCGGGTTCAAACTCAAGACGCTTCCCTGCTGCATC

F1SP-16    301  GGAAAGACCCCGCTGCGAGTGGTCCCTGCTATGACACACAGGATATGTGCTACAAATGACC
Klon 15    301  GGAAAGACCCCGCTGCGAGTGGTCCCTGCTATGACACACAGGATATGTGCTACAAATGACC

F1SP-16    361  CAACCACTATCAGGACCAACTGCACCGTCCCAAGTTCGCCATCAAGTTCARATTCARATTT
Klon 15    361  CAACCACTATCAGGACCAACTGCACCGTCCCAAGTTCGCCATCAAGTTCARATTCARATTT

F1SP-16    421  GACGGCT
Klon 15    421  GACGGCT
    
```

Abbildung 27 Alignment der Sequenzen von Klon Nr. 15 und F1SP-16
(homologe Bereiche sind schwarz unterlegt) (LUDWIG 2002)

```

F1SP-16      1  GVIGRYSDLQEQFPSIAHFHTMRVNVQPGSYFYNTDYLRTLCDLWEYRSGMNMFHGSTGD
Klon 15      1  GVIGRYSDLQEQFPSIAHFHTMRVNVQPGSYFYNTDYLRTLCDLWEYRSGMNMFHGSTGD

F1SP-16     61  IIFLGTFTFTEQLEP|FFELTHWLQDDLGGSGSNLRTPSCC|GKARCEWNSCVDTQDMCVENT
Klon 15     61  IIFLGTFTFTEQLEP|FFELTHWLQDDLGGSGSNLRTPSCC|GKARCEWNSCVDTQDMCVENT

F1SP-16    121  HWQDELHWPQFPYKFKFKSDG
Klon 15    121  TWQDELHWPQFPYKFKFKSDG
    
```

Abbildung 28 Alignment der Aminosäuresequenzen des Klon Nr. 15 und F1SP-16
(Einbuchstabencode, schwarz unterlegt entspricht homologen Bereichen) (LUDWIG 2002)

Die Abbildungen veranschaulichen die hohe Übereinstimmung der DNA-Sequenzen aus Klon 15 mit F1SP-16. Aufgrund des degenerierten Codes ergibt sich in Abbildung 28 auf Aminosäureebene eine bedeutend höhere Übereinstimmung. Der Austausch von nur 4 Aminosäuren deutet auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft der beiden Sequenzen bzw. Mikroorganismen an.

CASTRO (2002) beschäftigte sich mit der Erforschung der genetischen Diversität von sulfatreduzierenden Bakterien entlang eines Nährstoffgradienten in den Everglades. Im Rahmen der Erforschung des Gebietes wurden mehrere Klonierungen durchgeführt, Genbibliotheken erstellt sowie eine phylogenetische Analyse der gefundenen DSR-Sequenzen durchgeführt (Abbildung 29). Die Sulfatkonzentrationen der Everglades und der Talsperren sind nicht vergleichbar, da die Einheit der angegebenen Konzentration nicht ineinander umrechenbar sind. CASTRO gibt die Konzentration als Sulfat in 0,44 mg/g Boden an. Die Untersuchung der Talsperre Quitzdorf ergab je nach Probenahme zwischen 30 mg und 75 mg Sulfat/l. Aufgrund der geographischen Entfernung der untersuchten Ökosysteme müsste es sich bei Sequenzen, die in der Studie von CASTRO und gleichermaßen in den

Talsperren vorkommen, zumindest von der Verbreitung her um eine ubiquitär vorkommende Spezies handeln. Die Auswertung der DSR-Bibliothek von CASTRO zeigt eine verblüffende Übereinstimmung zur durchgeführten DSR-Klonierung der untersuchten Talsperren. Die Einordnung der klonierten Sequenzen in das Dendrogramm von CASTRO ergibt, dass die klonierten Sequenzen in die DSR-Cluster 8 und 9 einzuordnen sind. CASTRO stellte fest, dass sich zwischen Frühling und Sommer die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft im Sulfat-belasteten Boden ändert, aber der Anteil des DSR-Clusters 8 an den gesamten Sequenzen relativ gleich bleibt. Das DSR-Cluster 9 konnte CASTRO nur im Sommer nachweisen. Die Anwendung der DGGE zeigte, dass sich das Bandenmuster zwischen verschiedenen Jahreszeiten kaum oder nicht verändert. Dies wäre vielleicht mit bekannten Unterschieden zwischen den Mikroorganismen der DSR-Cluster 8 und DSR-Cluster 9 möglich. CASTRO zeigt, dass in Abhängigkeit der Sulfat-Belastung der Böden die Struktur bzw. Zusammensetzung der sulfatreduzierenden Bakterien in belasteten Böden stabiler ist.

In Abbildung 29 ist das Dendrogramm von CASTRO (2002) dargestellt, welches die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der in seiner Studie erhaltenen DSR-Sequenzen beschreibt.

Diese Resultate unterstreichen die Spezifität des Primersystems DSR1F und DSR FLR für die Amplifikation der Gene der α -Untereinheit der Dissimilatorischen Sulfid Reduktase. In weiterführenden Untersuchungen wurde dieses Primersystem verwendet.

Zur Steigerung der Amplifikationseffizienz wurde der Zusatz von DMSO getestet. DMSO ist als Additiv in der PCR-Reaktion vor allem bei GC-reichen Sequenzen wirksam. Es unterbindet bzw. vermindert die Bildung von Sekundärstrukturen und verbessert somit die Amplifikation der betreffenden Zielsequenz.

In diesem Ansatz wurde extrahierte DNA aus dem Gesamthorizont der Talsperre Quitzdorf amplifiziert. Gegenüber einer Reaktion ohne DMSO stieg bei dem Zusatz von DMSO die Konzentration des PCR-Produktes im PCR-Ansatz erheblich an. Analoge Ergebnisse konnten auch in allen anderen getesteten Sedimentproben der Talsperren Neunzehnhain, Quitzdorf und Saidenbach erzielt werden. Die Spezifität sollte durch DMSO nicht beeinflusst werden, da es nicht zu einer unspezifischeren Bindung der Primer kommt, sondern DMSO besonders die Ausbildung von Sekundärstrukturen vermindert. Weitere Amplifikationen wurden standardisiert unter Zusatz von DMSO zum Mastermix durchgeführt.

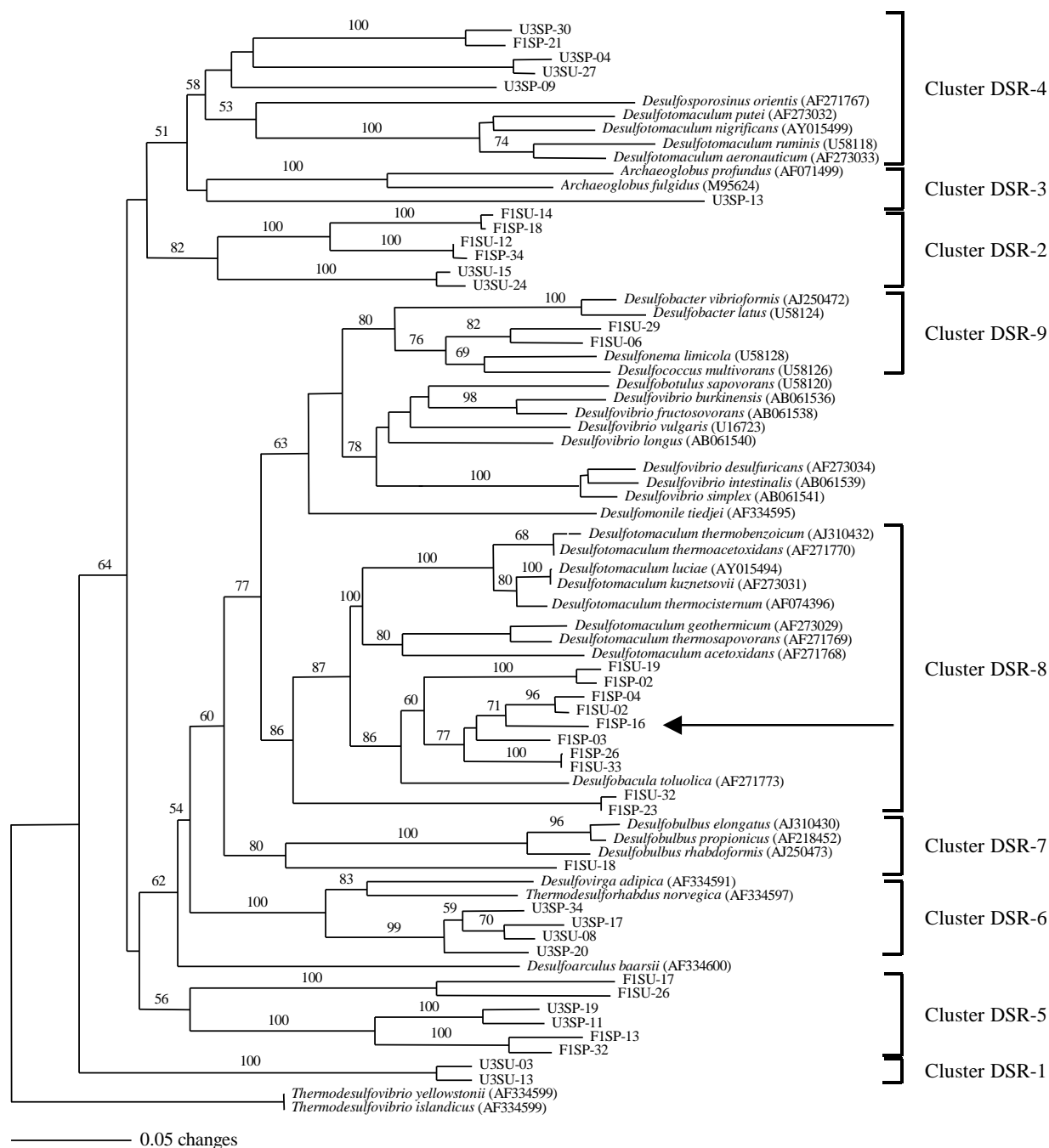


Abbildung 29 Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der gefundenen DSR-Sequenzen (CASTRO 2002) Die hohe Ähnlichkeit der in vorliegender Studie detektierten Sequenz (Klon Nr. 15) mit F1SP-16 erlaubt den Rückschluss auf einen ubiquitär vorkommenden Organismus.

IV. 2. 1. 3. 2 Identifikation sulfatreduzierender Bakterien durch Sequenzanalyse

Um die Organismen ausgehend von den im DGGE-Gel dargestellten Banden zu identifizieren, wurden aus Gelen ausgeschnittene Banden (DNA) erfolgreich reamplifiziert. Die anschließende Sequenzierung zeigte, dass es sich zumeist um Mischsequenzen handelte, d.h. eine Bande repräsentierte mehrere Mikroorganismen. Die Datenbankrecherche mit Einzelsequenzen (Banden, welche ausschließlich eine Sequenz repräsentierten) bestätigte die Ergebnisse der durchgeführten Klonierung zur qualitativen Kontrolle des neuen Primersystems. Zusätzlich wurde festgestellt, dass der GC-Gehalt der Sequenzen nicht mit der räumlichen Trennung der Banden korrelierte, d.h. nahezu identische Sequenzen konnten aus den oberen und unteren Teil des Geles isoliert werden. Diese Tatsache ist entweder auf die enorme Bedeutung der Schmelzdomänen (Punktmutationen) oder auf eine unzureichende Auftrennung zurückzuführen.

In allen Talsperren konnten mittels der spezifischen PCR die Gene der α -Untereinheit der Dissimilatorischen Sulfid Reduktase amplifiziert werden. Diese wurden im DGGE-Gel aufgetrennt und anschließend die erhaltenen Bandenmuster verglichen. Ein repräsentatives Gel der untersuchten Talsperren ist in Abbildung 30 dargestellt.

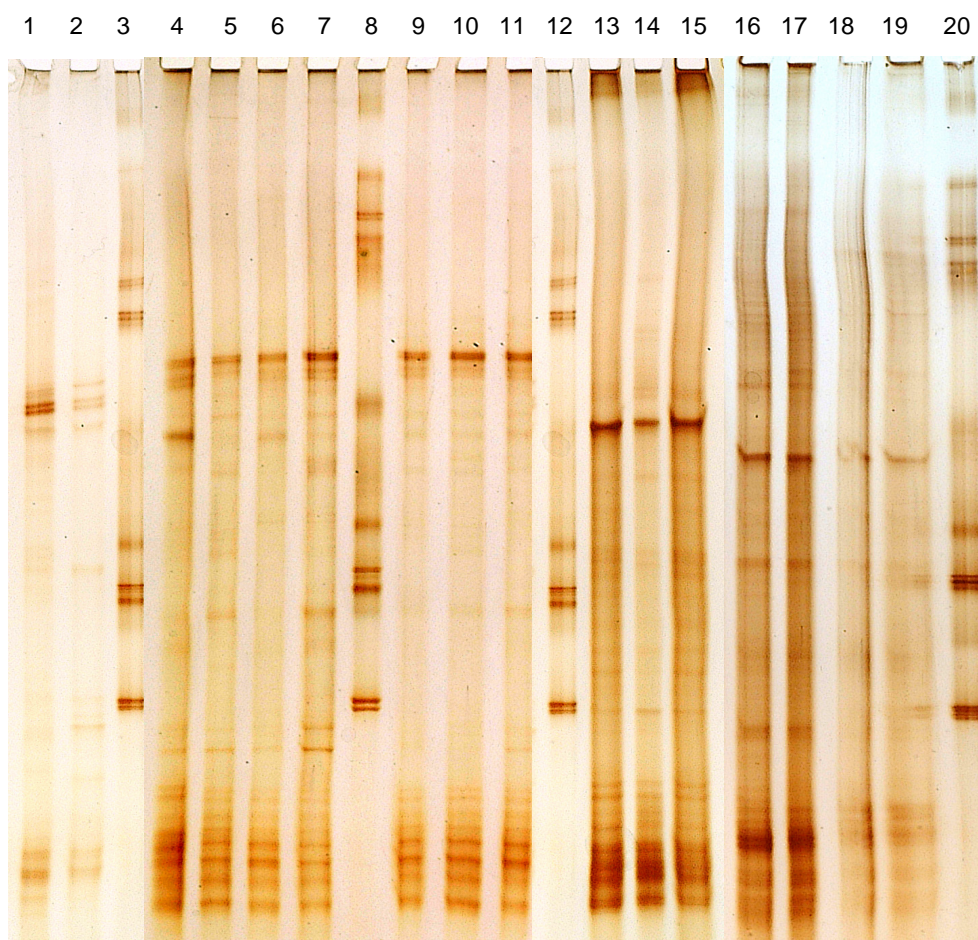


Abbildung 30 PCR-Produkte der α -Untereinheit im DGGE (Probenauftrag siehe Tabelle 8)

Unterschiede im Bandenmuster der Talsperren werden verdeutlicht, Spuren 1 und 2: Muldenberg, Spuren 4-7: Neunzehnhain, Spuren 13-15: Quitzdorf und Spuren 16-19: Saidenbach. (LUDWIG 2002)

Tabelle 8 Probenauftrag im DGGE

Spur	Talsperre	Probe- nahme	Horizont in cm	Niedere denaturierende Konzentration [%]	Hohe denaturierende Konzentration [%]
1	Muldenberg	5	0 bis 0,5	43	65
2	Muldenberg	4	2 bis 3	43	65
3	Standard	-	-	43	65
4	Neunzehnhain	1	0 bis 0,5	43	65
5	Neunzehnhain	1	4 bis 5	43	65
6	Neunzehnhain	4	0 bis 0,5	43	65
7	Neunzehnhain	5	0 bis 0,5	43	65
8	Standard	-	-	43	65
9	Neunzehnhain	7	2 bis 3	43	65
10	Neunzehnhain	7	4 bis 5	43	65
11	Neunzehnhain	7	0 bis 0,5	43	65
12	Standard	-	-	43	65
13	Quitzdorf	9	0 bis 0,5	43	65
14	Quitzdorf	4	2 bis 3	43	65
15	Quitzdorf	1	4 bis 5	43	65
16	Saidenbach	8	0 bis 0,5	43	65
17	Saidenbach	8	0,5 bis 1	43	65
18	Saidenbach	8	1 bis 1,5	43	65
19	Saidenbach	8	1 bis 1,5	43	65
20	Standard	-	-	43	65

In Abbildung 30 sind signifikante Unterschiede im Bandenmuster zwischen den einzelnen Talsperren erkennbar, was auf das Vorkommen unterschiedlicher sulfatreduzierender Mikroorganismen hinweist. Neunzehnhain, Quitzdorf und Saidenbach zeigten ähnliche Anzahlen an Banden, während Proben von Muldenberg zu deutlich weniger Banden führten. Jeweils innerhalb einer Talsperre konnten kaum Unterschiede im Bandenspektrum festgestellt werden, weder im Vergleich der Horizonte noch zwischen verschiedenen Probenahmen.

Die Analyse der Talsperrensedimente auf der Grundlage der Dissimilatorischen Sulfit Reduktase mittels DGGE führte zu charakteristischen Bandenmustern für die Talsperren Muldenberg, Neunzehnhain, Quitzdorf und Saidenbach. Die DGGE-Muster wiesen Ähnlichkeiten im unteren Bereich der Auftrennungsstrecke auf, im übrigen Auftrennungsbereich konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Unterschiedliche Muster waren aufgrund der Trophie der Talsperren zu erwarten. Die Ähnlichkeit zweier DGGE-Muster (Probe A und B) auf einem Gel wurde mittels Sorenson Index ermittelt.

Der Sorenson Index wird berechnet durch: $C_s = 2j/(a+b)$, wobei j die Anzahl der gemeinsamen Banden zwischen zwei Proben darstellt, a ist die Gesamtzahl an Banden der Probe A und b ist die Gesamtzahl an Banden der Probe B.

Durch diese Berechnung ergeben sich Werte zwischen 0 (Proben sind vollkommen unterschiedlich) und 1 (Proben sind identisch). Zwischen den Talsperren wurden im Vergleich des Horizontes 0-0,5 cm

Sorenson Indices von 0,14 (Vergleich Mul-Sai), 0,15 (Vergleich Qui-Mul, Neu-Mul), 0,18 (Vergleich Sai-Neu) und 0,3 (Vergleich Qui-Sai und Neu-Qui) errechnet. Somit sind die Talsperrensedimente nahezu vollkommen unterschiedlich.

Besonders bei der Analyse der sulfatreduzierenden Mikroorganismen zwischen den Horizonten war eine Änderung der Zusammensetzung zu vermuten, konnte aber in der Analyse nicht bestätigt werden. Der Vergleich der Horizonte mittels Sorenson Index lieferte Werte um 0,8, die Horizonte sind daher nahezu identisch. Die Sulfatreduktion ist ein heterotropher und meist unter anaeroben Bedingungen ablaufender Prozess, es müssen Reduktionsäquivalente (Kohlenstoffverbindungen) vorhanden sein. Durch die Jahreszeiten und die Dichteanomalie des Wassers bedingt, ergeben sich Unterschiede im Redoxpotential an der Oberfläche des Sedimentes und auch im Sediment selbst. Die Untersuchungen der unterschiedlichen Horizonte einer Probenahme ergab jeweils ein sehr ähnliches Muster. Höchstwahrscheinlich wurde hier extrazellulär vorliegende DNA oder DNA in abgestorbenen Bakterienzellen amplifiziert und aufgetrennt (LUNA 2002). Ein ähnliches Muster, welches auf aktive Sulfatreduzierer zurückzuführen ist, war zwischen den Horizonten nicht zu erwarten, da in tieferen Sedimenthorizonten verstärkt Sulfatreduzierer nachweisbar sein müssten. SASS (1998) beschrieb, dass die Isolation sulfatreduzierender Bakterien aus oxischen Sedimentschichten möglich wäre, jedoch das Wachstum dieser Organismen stark durch Sauerstoff inhibiert wird.

Die Verwirbelung des Sedimentkernes bei der Absenkung der Plastikröhre in das Sediment während der Probenahme kann nicht als Einflussfaktor gewertet werden, da anhand chemischer Parameter die einzelnen Sedimentschichten klar definiert werden konnten (MAAßEN 2003).

Mit der Auftrennung der amplifizierten 16S rDNA-Fragmente wie auch der Gene der α -Untereinheit der Dissimilatorischen Sulfid Reduktase in der DGGE konnte die genotypische Diversität der Mikroorganismen in den Talsperrensedimenten verdeutlicht werden. Das Bandenmuster der 16S rDNA-Fragmente zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Sedimenten. Weiterhin konnten Sequenzen von Sulfatreduzierern detektiert, anschließend kloniert und identifiziert werden. In der Klonierung wurden die Unterschiede aus dem Bandenmuster bestätigt. Die Klonierung von ausgeschnittenen Banden ist jedoch nicht die unbedingte Konsequenz bei der Analyse mittels DGGE. Vielmehr liegt das Ziel der DGGE in der Darstellung von räumlichen und zeitlichen Varianzen der mikrobiellen Zusammensetzung anhand von Fingerprintmustern. In der vorliegenden Arbeit wurde ein enorme mikrobielle Sequenzdiversität im Bandenmuster festgestellt. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse der vergleichenden 16S rDNA Analyse.

IV. 2. 2 Der Terminale Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (T-RFLP)

Die Methode der T-RFLP sollte für eine rasche, kulturunabhängige Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften eingesetzt werden. Die Grundlage für diese Analyse bildete die universelle Amplifikation der 16S rDNA zur Erfassung nahezu aller im Sediment enthaltenen Mikroorganismen. Aus den resultierenden Peakmustern sollten Aussagen über die Zusammensetzung und Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft getroffen werden. Die einzelnen Peaks, d.h. die Fragmentlängen, sollten die Identifikation von Mikroorganismen in den Sedimenten erlauben. Neben der Analyse aller im

Sediment vorkommender Bakterien sollten die Sedimente auf das Vorkommen von sulfatreduzierenden Organismen untersucht werden.

Für die Talsperrensedimente aller Probenahmen wurde die T-RFLP Analyse durchgeführt. Das Sediment von Muldenberg wies eine hohe Konzentration an Huminstoffen auf, welche die PCR oft negativ beeinflusste oder inhibierte. Positive Ergebnisse konnten durch den Einsatz von $MgCl_2$ oder durch Verdünnen erreicht werden. Somit verlief die universelle Amplifikation der 16S rDNA Fragmente von allen Talsperrensedimenten erfolgreich. Die Amplifikate wurden anschließend mit den Enzymen *MspI* und *RsaI* in Parallelansätzen geschnitten.

IV. 2. 2. 1 Entwicklung einer Software zur Auswertung von T-RFLP Daten (TOAST)

Die Auswertung von T-RFLP- Daten zur Identifizierung von Mikroorganismen erfolgt computergestützt. Dazu ist eine Software mit Datenbank notwendig, welche die ermittelten Fragmentlängen mit virtuell geschnittenen Datenbanksequenzen vergleicht. Die im Internet verfügbare Datenbank zur Auswertung von T-RF's, das Ribosomal Database Project II (RDP-2) der Michigan State University, beinhaltet ca. 16.000 virtuell verdaute Sequenzen. Darunter befindet sich nur ein verschwindender Anteil an „Unidentifizierten Bakterien“. Ein wesentlicher Nachteil von RDP-2 besteht im Fehlen aktueller 16S rDNA Sequenzen, da das Programm nur in unregelmäßigen Zeitabständen aktualisiert wird. Weiterhin sind die Suchfunktionen sowie die Benutzerfreundlichkeit nicht optimal konfiguriert. Die Funktion von RDP-2 beschränkt sich lediglich auf einem Abgleich von Fragmentlängen und dazugehörigen Organismen, es ist nicht möglich, Unterverzeichnisse mit eigenen Sequenzen anzulegen. Daher war es mit der zur Verfügung stehenden Datenbank nicht uneingeschränkt möglich, den erhaltenen Fragmentlängen Mikroorganismen zuzuordnen.

Um die Analyse von T-RFLP- Daten zu erweitern und zu verbessern, wurde das T-RFLP Operation Analysis Software Tool (TOAST) entwickelt (LUDWIG 2002). Dieses Programm wird lokal auf einem Macintosh installiert und erlaubt die individuelle Analyse von T-RFLP- Daten. Durch eine integrierte, vollständig indizierte Datenbank wurden schnelle und umfangreiche Analysen möglich.

TOAST wurde mit den im Internet verfügbaren bakteriellen 16S rDNA Sequenzen der NCBI-Datenbank erstellt und ist jederzeit aktualisierbar. Zum jetzigen Zeitpunkt sind über 41.000 Sequenzen mit über 460.000 berechneten Fragmentlängen in der Software enthalten. Durch die Verwendung von bis zu 7 verschiedenen Primern (4 universelle, 3 spezifische) und 5 Restriktionsenzymen (*AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MspI* und *RsaI*) sind mit TOAST vielfältige Möglichkeiten der Auswertungen gegeben. Des Weiteren bietet das Programm die Möglichkeit, eine auf eigenen Sequenzen (z.B. aus Klonierungen) basierende Datenbank zu erstellen. Die hauptsächliche Anwendung von TOAST besteht in der Suche von Datenbankeinträgen zu ermittelten Fragmentlängen. Es ist weiterhin möglich, durch Eingabe einer Fragmentlänge oder Text gezielt nach Datenbankeinträgen zu suchen. Diese Suche ermöglicht es, schnell die Fragmentlängen eines einzelnen Mikroorganismus oder einer Gruppe von Mikroorganismen zu ermitteln. Weiterhin stehen eine Vielzahl von Such- und Vergleichsfunktionen zur Analyse von Fragmentlängen und der damit verbundenen potentiell vorhanden Mikroorganismen zur Verfügung.

IV. 2. 2. 1. 1 Vergleich von RDP-2 und TOAST

Entscheidend für eine Datenbank ist die Aktualität der Sequenzen. Da T-RFLP universell zur Analyse von bakteriellen Gemeinschaften verwendet werden kann, ist die Aktualität der Datenbank v.a. im Hinblick auf Sequenzen von noch nicht kultivierbaren Mikroorganismen besonders wichtig. Genau diese Aktualität ist bei RDP-2 nicht gegeben. TOAST bietet eine Datenbank auf Grundlage der frei im Internet verfügbaren Sequenzen und ist jederzeit aktualisierbar. In RDP-2 ist es nicht möglich, eine auf eigenen Sequenzen basierende Datenbank zu erstellen. Die neu entwickelte Software ermöglicht die Erstellung und Auswertung der eigenen Datenbank analog zu den enthaltenen Sequenzen. Mit dieser Möglichkeit ist die Aktualität der Datenbank und der Vergleich von T-RFLP mit der Klonierung gewährleistet. Weiterhin bietet TOAST den direkten Vergleich von identifizierten Datenbankeinträgen zwischen verschiedenen Proben an, RDP-2 dagegen analysiert nur die Ähnlichkeit der Chromatogramme und keine unterschiedlichen Mikroorganismen. Die Besonderheit von TOAST ist die Möglichkeit von vergleichenden Analysen und speziellen Suchen.

IV. 2. 2. 2 Analyse der Talsperresedimente mit der T-RFLP

In Abbildung 31 sind ausgewählte T-RFLP Chromatogramme der Sedimente dargestellt.

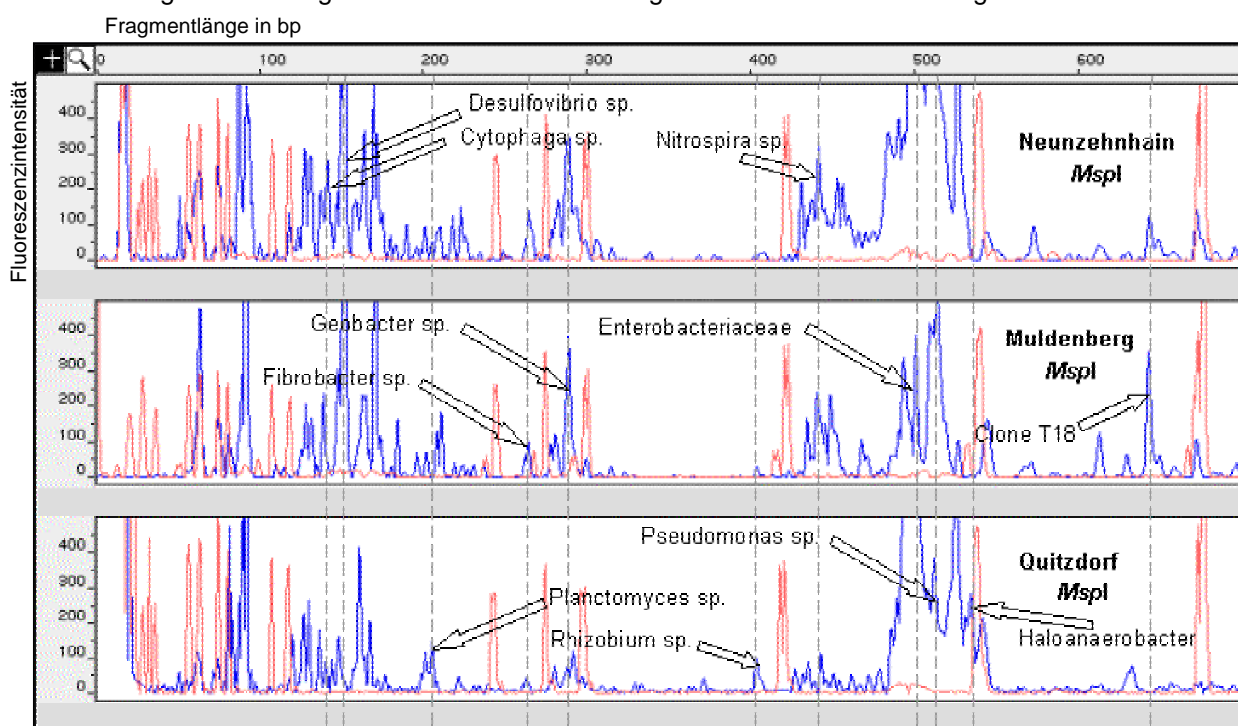


Abbildung 31 Chromatogramme der T-RFLP Analyse, Restriktion mit *MspI* (rot: Standard)

Dargestellt ist jeweils der Gesamthorizont 0-5 cm der Talsperren. Einzelnen Peaks konnten die zugrunde liegenden Organismen zugeordnet werden. Die Zuordnung erfolgt durch Fragmentlängenbestimmung anhand eines mitgeführten Standards und ist abhängig vom verwendeten Enzym.

Die Abbildung 31 zeigt exemplarisch Chromatogramme der Talsperrensedimente. Berechnet durch die Genescan-Software wurden die Datenreihen zum jeweiligen Chromatogramm angezeigt und basierend auf den ermittelten Fragmentlängen konnten die entsprechenden Organismen durch Datenbankvergleiche identifiziert werden.

In der Abbildung 31 wurden anhand einiger Beispiele den generierten *MspI*-Fragmentlängen Organismen zugeordnet. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Peakmuster im Vergleich der Talsperren signifikante Unterschiede aufweisen. Die Unterschiede werden in mehreren Bereichen deutlich: von 50-100 bp, 120-230 bp, bei 400 bp, 420-550 bp und bei 650 bp. Beispielsweise konnte in Muldenberg und Neunzehnhain der Uncultured eubacterium clone T18 (in der Abbildung Clone T18 genannt) (Accession-Nr. AF495453) nachgewiesen werden (bei 650 bp), welcher in Quitzdorf nicht vorkam. Diese Sequenz wurde ebenso in der vergleichenden 16S rDNA Analyse in den Genbibliotheken für Muldenberg und Neunzehnhain innerhalb der unidentifizierten Mikroorganismen gefunden, aber nicht in Quitzdorf oder Saidenbach. In vielen weiteren Parallelen konnten die Ergebnisse der 16S rDNA Analyse durch die Resultate der T-RFLP bestätigt werden. So wurden in der T-RFLP und übereinstimmend mit der 16S rDNA Analyse Vertreter der Domäne *Nitrospira* nur in Neunzehnhain, Muldenberg und Saidenbach nachgewiesen, *Spirochaetales* nur in Quitzdorf und Saidenbach und Vertreter der *Planctomycetales* in allen Talsperren detektiert. Bei einem näheren Vergleich der Ergebnisse aus der 16S rDNA Analyse mit der T-RFLP konnten sämtliche in den Genbibliotheken enthaltenen phylogenetischen Hauptgruppen in den Resultaten der T-RFLP wiedergefunden werden. Auch im Vorkommen von Spezies innerhalb der phylogenetischen Gruppen gab es Übereinstimmungen, so wurde in der T-RFLP, wie auch in den Genbibliotheken *Geobacter* sp. unter den delta *Proteobacteria* in allen Talsperren gefunden. In den nachgewiesenen T-RF's von Neunzehnhain konnten u.a. *Ralstonia* sp., *Gordonia* sp., Gram-positive bacteria SOGA31, *Heliobacterium* sp., Metal-contaminated soil clone K20-80, Metal-contaminated soil clone K20-51, *Mesorhizobium loti*, *Bacillus halodurans*, *Bradyrhizobium* sp., Agricultural soil bacterium clone SC-I-17, Agricultural soil bacterium clone SC-I-2, Agricultural soil bacterium clone SC-I-17, Agricultural soil bacterium clone SC-I-2, *Alcaligenes faecalis*, *Azoarcus* sp., *Hyphomicrobium* sp. und *Actinomyces* sp. aus den Genbibliotheken detektiert werden. Die Wiederfindung von Sequenzen aus den Genbibliotheken in den T-RF's der T-RFLP betrug in Neunzehnhain 70%, in Quitzdorf 85%, in Muldenberg 78% und in Saidenbach 76%.

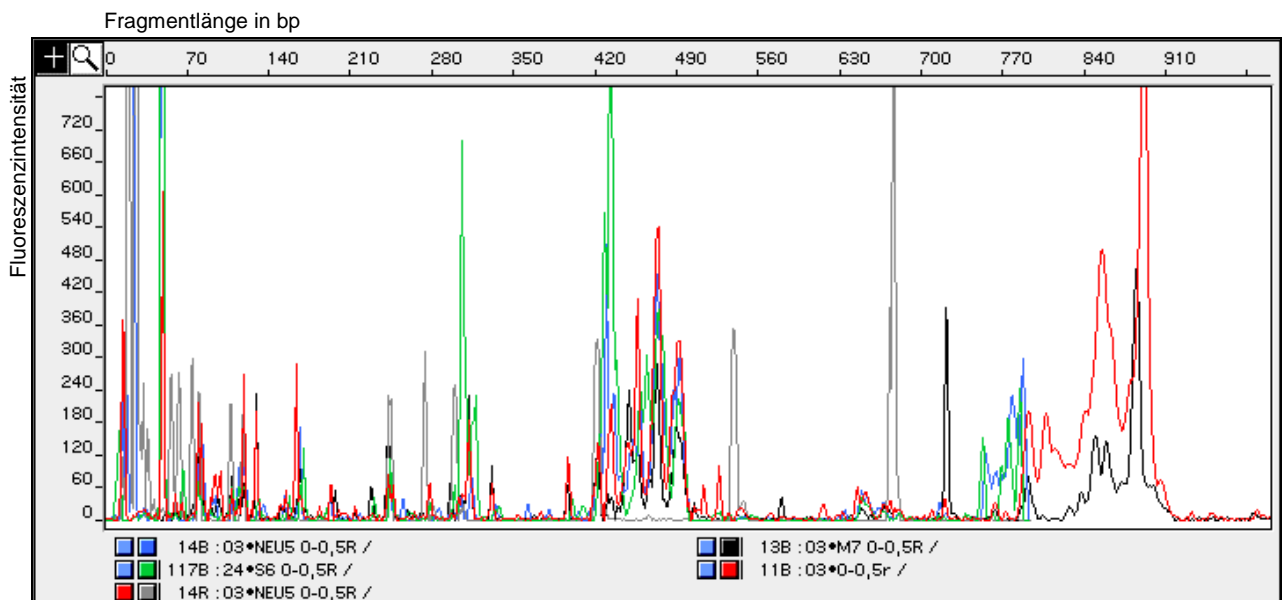


Abbildung 32 Chromatogramm der T-RFLP Analyse, Restriktion mit *RsaI* (grau: Standard)

Dargestellt ist jeweils der Horizont 0-0,5 cm aller Talsperren. Blau: Neunzehnhain (Probenahme 5), Grün: Saidenbach (6), Schwarz: Muldenberg (7), Rot: Quitzdorf (7), der interne Standard wurde grau dargestellt, um visuell in den Hintergrund zu rücken.

Abbildung 32 veranschaulicht Unterschiede zwischen den Talsperren, zusammengefaßt in einem Chromatogramm. Aufgrund der eingeschränkten Möglichkeit der Streckung der Abszisse wird auch die Darstellung der Unterschiede beeinträchtigt. Diese Abbildung zeigt nur die Restriktion mit *RsaI*, durch Kombination mit der *MspI*-Restriktion wurden mittels computergestützter Analyse die potentiell enthaltenen Organismen identifiziert.

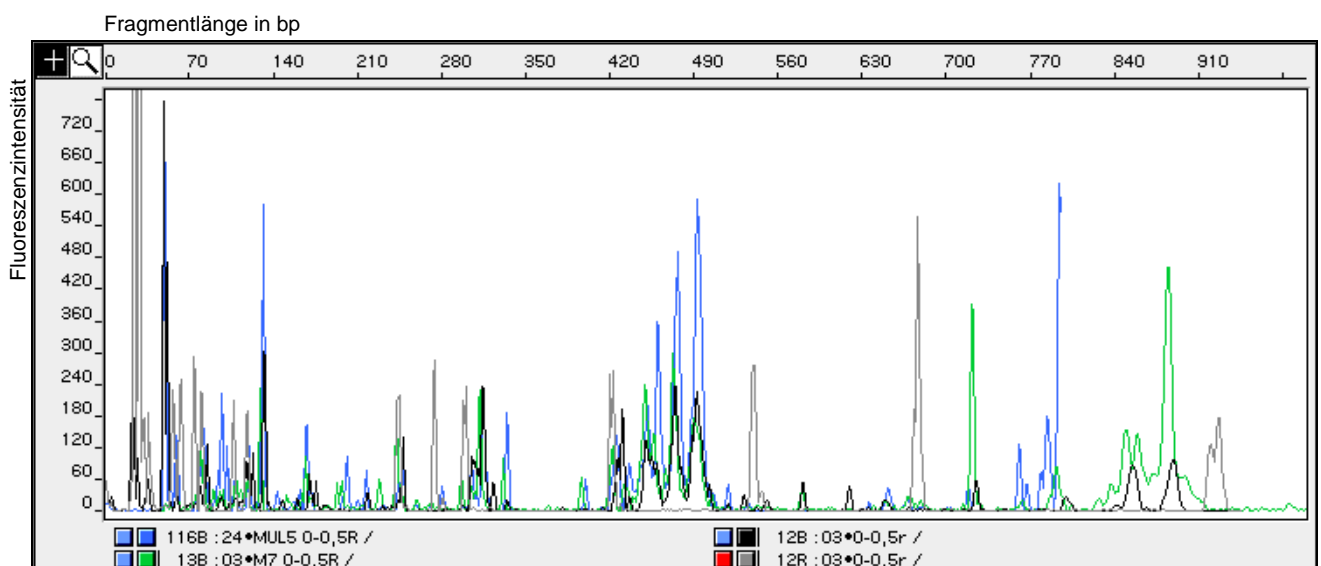


Abbildung 33 Chromatogramm der T-RFLP Analyse, Restriktion mit *RsaI* (grau: Standard)

Dargestellt ist jeweils der Horizont 0-0,5 cm der Talsperre Muldenberg. Blau: 5. Probenahme, Grün: 7. Probenahme, Schwarz: 8. Probenahme, der interne Standard wurde grau dargestellt, um visuell in den Hintergrund zu rücken.

Die Abbildung 33 zeigt die Analyse des obersten Horizontes der Talsperre Muldenberg in verschiedenen Probenahmen bzw. zu verschiedenen Jahreszeiten. Es sind deutliche Unterschiede in den Mustern zu erkennen, einzelne Peaks variieren erheblich in der Intensität, so dass jahreszeitliche Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose offensichtlich werden.

IV. 2. 2. 3 Vergleich der Mikroorganismen in den Sedimenten

TOAST erstellt für die eingegebenen Fragmentlängen eine Liste an identifizierten Mikroorganismen. In Tabelle 9 bis 11 sind Ausschnitte aus Listen abgebildet.

Tabelle 9 Ausschnitt einer Liste aus insgesamt 3311 identifizierten Organismen (Mul 7; 0,5-1 cm)

Fragmentlänge in bp					Datenbankeintrag
<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	
210	75	358	138	870	<i>Amoebobacter roseus</i> strain DSM 235
210	75	358	138	870	<i>T.roseopersicina</i>
224	75	358	138	870	<i>A.pedioformis</i>
236	228	360	163	870	<i>Saccharopolyspora hirsuta</i> strain ATCC 27875
69	247	557	92	871	<i>C.salexigens</i>
226	185	557	137	871	Phototrophic bacterium (BN 3201)
211	74	359	137	871	<i>Chromatium tepidum</i>
212	75	360	138	871	<i>Chromatium</i> sp. RW
193	245	556	138	871	Phototrophic bacteria clone 359
601	39	1085	89	872	<i>Microscilla furvescens</i>
227	193	360	138	872	Phototrophic bacteria clone 345
227	193	360	138	872	Phototrophic bacteria clone 261
227	186	360	138	872	Phototrophic bacteria clone 136
227	193	360	138	872	<i>Lamprocystis roseopersicina</i> strain DSM 229
227	193	360	138	872	<i>Amoebobacter purpureus</i> strain DSM 4197
169	39	82	151	872	<i>Nannocystis exedens</i> (strain Na e571)
169	39	82	151	872	<i>Nannocystis aggregans</i> (strain Na a1)
79	204	189	206	872	Uncultured bacterium clone p-1977-s962-5
231	316	78	138	873	<i>Thiorhodospira sibirica</i>
160	197	563	207	873	<i>C.polysaccharolyticum</i>

Tabelle 10 Ausschnitt einer Liste aus insgesamt 4807 identifizierten Organismen (Neu 5; 0,5-1 cm)

Fragmentlänge in bp					Datenbankeintrag
<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	
141	191	339	148	420	Uncultured bacterium clone UP4
125	39	511	148	420	<i>Methylocapsa acidiphila</i> type strain strain B2
249	226	82	150	420	Uncultured alpha proteobacterium clone B1rii13
143	39	340	150	420	<i>Methylosinus</i> sp. LW4
206	39	511	437	420	Uncultured sludge bacterium A27b
248	39	61	437	420	Marine bacterium ATAM407_58
248	39	61	437	420	Uncultured alpha proteobacterium clone CD1D9
248	39	61	437	420	Uncultured bacterium clone CD5A8
206	291	80	437	420	Uncultured alpha proteobacterium clone B1si39
248	191	511	437	420	<i>Methyloarcula marina</i>
248	39	61	437	420	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>
141	225	339	437	420	Rhizosphere soil bacterium clone RSC-II-92, (partial)
141	191	61	437	420	Alpha proteobacterium A0838
248	39	61	437	420	<i>Sulfitobacter</i> sp. DSS-2
250	193	340	437	420	<i>Roseivivax halotolerans</i>
206	225	339	437	420	<i>Zoogloea</i> sp.
125	191	511	437	420	Unidentified eubacterium MHP17
142	191	339	437	420	<i>Methylocystis echinoides</i>
206	39	511	437	420	Uncultured sludge bacterium A27b
190	290	667	489	420	Unknown marine bacterioplankton clone SAR6
249	39	512	129	421	<i>Paracoccus kondratievae</i>
205	128	226	129	421	<i>Microcystis elabens</i>
205	128	226	129	421	<i>Microcystis holsatica</i>
205	128	668	129	421	<i>Synechococcus</i> -like str. P212
205	128	226	129	421	<i>Synechococcus</i> -like str. P211
205	128	668	129	421	<i>Synechococcus</i> PCC6307

Tabelle 11 Ausschnitt einer Liste aus insgesamt 3937 identifizierten Organismen (Sai 6; 0,5-1 cm)

Fragmentlänge in bp					Datenbankeintrag
<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	
71	39	92	87	308	Unidentified eubacterium (clone LBS24)
71	616	92	87	308	Uncultured bacterium MK08
200	39	92	87	308	Capnocytophaga sputigena
71	39	92	87	308	Coenonia anatina
71		92	87	308	Cytophaga sp.
71	39	92	87	308	Unidentified bacterium isolate SS2
71	616	92	87	308	Flavobacterium sp. IC001
	39	92	87	308	Marine bacterium R2A103
200	39	92	87	308	C.sputigena
71	39	1085	87	308	Flavobacterium odoratum
200	39	92	87	308	Capnocytophaga sputigena
179	39	94	89	308	Marine bacterium ATAM173a_3
72	280	94	89	308	Colwellia sp. KAT2
72	280	94	89	308	Marine psychrophile SW17
600	39	92	538	308	Gelidibacter algens ACAM 551
600	39	92	538	308	Gelidibacter algens ACAM 550
600	39	92	538	308	Gelidibacter algens ACAM 536T
600	39	92	538	308	Gelidibacter algens
236	617	369	85	309	Agricultural soil bacterium clone SC-I-41, (partial)
		92	87	309	Cytophagales str. MED9
139	39	93	88	309	Uncultured bacterium clone CDD5
236	255	94	89	309	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone BIui38
72	281	95	90	309	Unidentified eubacterium SCB49
236	406	93	141	309	Rhizosphere soil bacterium isolate RSI-32, (partial)
140	1003	94	204	309	Eubostrichus dianae epibacterium 1_60
209	296	373	293	309	Uncultured sponge symbiont PAWS53

In den Tabellen sind die virtuell generierten Fragmentlängen von Organismen durch die Verwendung verschiedener Enzyme dargestellt.

Die umfangreichen Ergebnisse wurden mittels Multi-Dimensional Scalings (MDS) ausgewertet. MDS stellt das Resultat eines Vergleiches in einer zweidimensionalen Fläche dar. Die berechneten Ähnlichkeiten der Proben werden in einem graphisch darstellbaren Abstand der Proben zueinander veranschaulicht (SOMERFIELD 1995, CLARKE 1997). Der Abstand stellt ein Maß für die Unterschiedlichkeit dar. Die Berechnung des Abstandes der Proben erfolgt mittels diverser Parameter. Daraus ergibt sich eine sehr gute Eignung von MDS für die Darstellung von Ergebnissen von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften.

Zur Auswertung der Ähnlichkeiten der Talsperren wurden die gesamten Listen der potentiell in den Sedimenten vorhandenen Mikroorganismen speziell gefiltert. Diese Filterung generiert eine Auflistung von enthaltenen mikrobiellen Gattungen mit einer zugehörigen Anzahl an gefundenen Datenbankeinträgen (Spezies) dieser Gattung. In der Abbildung 34 ist das Ergebnis des Vergleiches der vorkommenden Gattungen aller untersuchten Probenahmen der Talsperren Muldenberg, Neunzehnhain, Quitzdorf und Neunzehnhain zu sehen. Mittels MDS werden deutliche Unterschiede im mikrobiellen Spektrum zu den einzelnen Probenahmedaten, wie auch zwischen den Talsperren deutlich. Auch Probenahmedaten in einem vergleichbaren Zeitraum (S6, Q7, N5 und M5) sind vollkommen unterschiedlich.

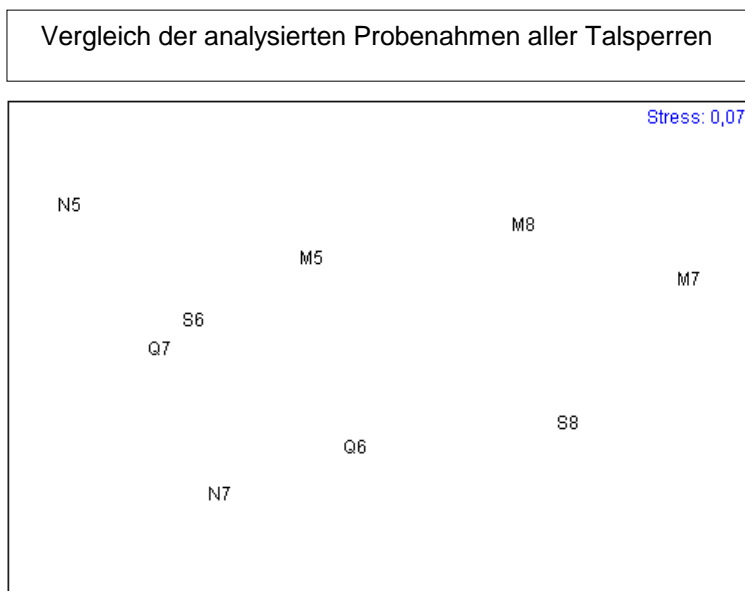


Abbildung 34 Graphische Darstellung der Ähnlichkeiten der mikrobiellen Zusammensetzung
 Dargestellt sind die Ähnlichkeiten zwischen den Probenahmen, die Buchstaben entsprechen den Talsperren und die Zahl der Probenahme (Q7: Quitzdorf, 7. Probenahme)

In den folgenden Abbildungen sind exemplarisch die Ähnlichkeiten der analysierten Probenahmen in Bezug auf die Anzahl der vorkommenden *MspI* und *RsaI*- Fragmentlängen dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der identifizierten Datenbankeinträge pro Fragmentlänge als Zusatzinformation verwendet.

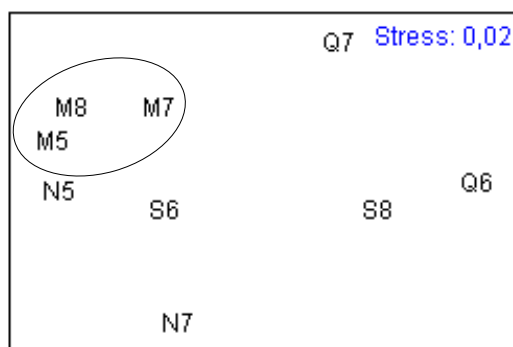


Abbildung 35 Vergleich der Probenahmen, Horizont 0,5-1 cm
 Dargestellt sind die Ähnlichkeiten in der Anzahl der *MspI* Fragmentlängen

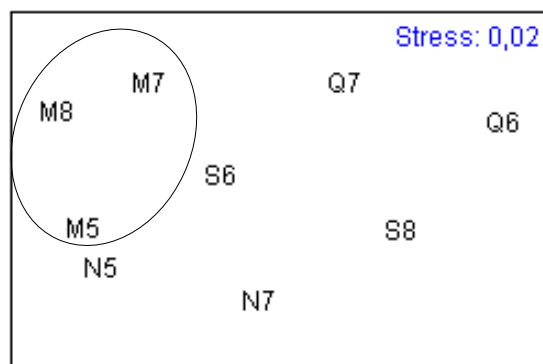


Abbildung 36 Vergleich der Probenahmen, Horizont 0,5-1 cm

Dargestellt sind die Ähnlichkeiten in der Anzahl der *RsaI* Fragmentlängen

Diese Abbildungen verdeutlichen die Unterschiede der analysierten Probenahmen hinsichtlich der potentiell enthaltenen Mikroorganismen in den Talsperren Muldenberg, Neunzehnhain, Quitzdorf und Saidenbach. Aus den Abbildungen geht hervor, dass die einzelnen Proben der Talsperre Muldenberg näher zusammen liegen als die Proben der anderen Talsperren. Die Proben einer Talsperre zeigten meist eine geringere Ähnlichkeit als die Proben aus unterschiedlichen Talsperren. Anhand der *MspI* und *RsaI* –Fragmentlängen wird auch ein Unterschied zwischen S6 und Q7 deutlich.

Die Auswertung zeigte Unterschiede im mikrobiellen Spektrum zwischen den Talsperren. Da die Talsperren eine unterschiedliche Trophie besitzen, war dieses Resultat zu vermuten. Diese Unterschiedlichkeit der mikrobiellen Zusammensetzung wurde bereits durch die Chromatogramme deutlich. Entscheidend war die Zusammenfassung der ermittelten Spezies zu Gattungen. Durch die Zusammenfassung der zahlreich gefundenen Datenbankeinträge wurden die Analysen in ihrer Aussagekraft verstärkt.

IV. 2. 2. 4 Die Analyse der sulfatreduzierenden Bakterien mittels T-RFLP

Die mittels TOAST identifizierten Mikroorganismen wurden hinsichtlich des Vorkommens sulfatreduzierender Mikroorganismen geprüft. Es konnten in allen Talsperren zu jeder Probenahme Sulfatreduzierer nachgewiesen werden. Die ermittelten Spezies wurden den entsprechenden Gattungen zugeordnet und mittels MDS analysiert. Dabei konnten Unterschiede zwischen den Talsperren festgestellt werden. Beispielsweise wurden bestimmte Gattungen in allen untersuchten Talsperrensedimenten gefunden: *Alicyclobacillus*, *Chromatium*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Microbacterium*, *Olavius*, *Sulfobacillus* und *Thermodesulfobacterium*. Andere Gattungen waren nur in bestimmten Talsperren zu finden: ausschließlich in Saidenbach *Desulforegula*, in Muldenberg, Saidenbach und Quitzdorf *Desufococcus*. Für die Darstellung mittels MDS wurden zusätzlich zur Gattung auch die einzelnen Sedimenthorizonte zusammengefaßt, um Aussagen über das Vorkommen spezieller Gattungen treffen zu können. Diese Untersuchung erfolgte auch mit den sulfatreduzierenden Bakterien. Auch hier waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Beprobung einer Talsperre als auch zwischen den Talsperren festzustellen. Weitere Unterschiede waren in der Häufigkeit einer Gattung in

den einzelnen Sedimenthorizonten zu erkennen. Bei der Gegenüberstellung aller identifizierten sulfatreduzierenden Gattungen aus einer Probenahme einer Talsperre, waren die Horizonte klar unterschiedlich. So wurden innerhalb der sulfatreduzierenden Mikroorganismen *Acidithiobacillus* ausschließlich in einem Horizont von Quitzdorf (Probenahme 6) gefunden. *Alicyclobacillus* wurde in 4 Horizonten von Neu (Probenahme 4) und 6 Horizonten von Neu (Probenahme 7) detektiert und weiterhin in 5 Horizonten Mul (5), in 2 Horizonten Mul (7) und in 3 Horizonten Mul (8). Aufschluss über weitere Vorkommen von Sulfatreduzierern gibt Tabelle 12.

Tabelle 12 Sulfatreduzierende Mikroorganismen in den Sedimenthorizonten

Sulfatreduzierende Organismen	Neu 5	Neu 7	Mul 5	Mul 7	Mul 8	Sai 6	Sai 8	Qui 6	Qui 7
<i>Chromatium</i>	6	3	1	1	2	3	1	3	6
<i>Desulfotobacterium</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Desulfoarculus</i>	6	1	4	0	0	0	0	0	0
<i>Desulfobacca</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>Desulfobacter</i>	7	0	4	1	1	3	0	5	4
<i>Desulfobacterium</i>	7	3	4	3	4	7	4	6	7
<i>Desulfobacula</i>	1	0	1	3	3	0	0	0	0
<i>Desulfobulbus</i>	7	0	5	2	1	5	2	5	7
<i>Desulfocella</i>	7	2	4	1	0	1	1	0	0
<i>Desulfococcus</i>	2	0	3	1	1	3	1	6	7
<i>Desulfofrigus</i>	7	0	5	1	1	7	4	0	0
<i>Desulfohalobium</i>	7	1	2	0	2	0	0	0	1
<i>Desulfomicrobium</i>	5	1	0	0	1	0	3	0	0
<i>Desulfomonas</i>	0	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>Desulfomusa</i>	2	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>Desulfonatronum</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>Desulfonema</i>	6	2	4	4	3	7	3	4	7
<i>Desulforegula</i>	0	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>Desulforhopalus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Desulfotignum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Desulfotomaculum</i>	7	3	4	2	4	7	5	6	7
<i>Desulfovibrio</i>	7	6	6	5	3	7	5	6	7
<i>Desulfuromonas</i>	0	0	6	2	1	7	6	4	4
<i>Dethiosulfovibrio</i>	6	0	3	0	3	0	0	0	0
<i>Olavius</i>	3	2	3	1	1	6	1	5	5
<i>Sulfobacillus</i>	7	5	4	3	3	5	2	6	7
<i>Thermodesulfobacterium</i>	7	1	4	4	4	7	2	1	7
<i>Thiomicrospira</i>	6	0	0	2	1	7	0	0	2

Vorkommen von sulfatreduzierenden Mikroorganismen bzw. Gattungen in den Sedimenthorizonten der untersuchten Talsperren (die Zahl nach der Talsperre gibt die Probenahme an). Die angegebene Zahl entspricht der Anzahl der Horizonte, in dem die Gattung nachgewiesen wurde und beträgt maximal 7 (7 Einzelhorizonte).

Deutlich sind in Tabelle 12 Unterschiede im Vorkommen sulfatreduzierender Bakterien zwischen den Horizonten und an verschiedenen Probenahmedaten zu erkennen.

Auch in dieser Untersuchung wurden Parallelen zur vergleichenden 16S rDNA Analyse deutlich, auch, wenn sich die Untersuchung in der 16S rDNA Analyse größtenteils auf den Gesamthorizont bezieht. So konnte *Desulfobacca* in der Genbibliothek des Sedimentes von Saidenbach und *Desulfobacterium*

in den Genbibliotheken aller Talsperren detektiert werden. *Desulfobulbus* konnte in Quitzdorf, *Desulfococcus* in Neunzehnhain und *Desulfomicrobium* in Saidenbach bestätigt werden. *Desulfonema* wurde auch in den Genbibliotheken von Neunzehnhain, Saidenbach und Quitzdorf und *Desulfotomaculum* in Saidenbach und Quitzdorf nachgewiesen.

IV. 2. 2. 5 Überschätzung der T-RFLP Ergebnisse

Mit der T-RFLP ist eine Überschätzung der mikrobiellen Diversität möglich, da die Fragmentlängen abhängig von der kombinatorischen Suche und technischen Schwankungen (z.B. Gellauf) Variationen unterliegen sind. Der Anstieg der durch die kombinatorische Suche bedingten Überschätzung ist in Abbildung 37 dargestellt. Für diese Abbildung wurden Fragmentlängen zufällig ausgewählter Mikroorganismen zur Datenbanksuche verwendet und mit den Organismen aus der T-RFLP-Analyse verglichen. Es wurde deutlich, dass eine Korrelation zwischen der Reduktion der Überschätzung und der Anzahl verwendeter Restriktionsenzyme besteht.

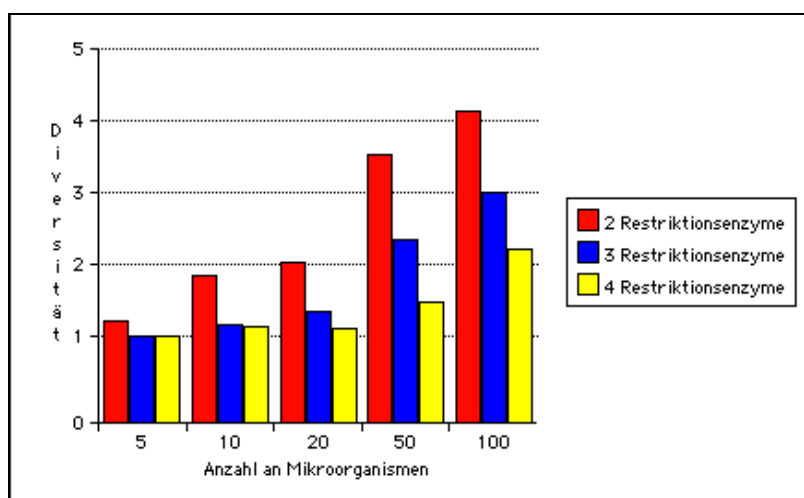


Abbildung 37 Anstieg der ermittelten mikrobiellen Diversität

Dargestellt ist die Verwendung von 2 bis 4 Restriktionsenzymen bei steigender Populationsdichte (LUDWIG 2002). Mit der Anzahl der Fragmentlängen innerhalb der Analyse im TOAST steigt die Überschätzung an. Werden beispielsweise die Fragmentlängen von 100 zufällig ausgewählten Mikroorganismen zur Identifikation verwendet, steigt bei der Verwendung von 2 Restriktionsenzymen die Diversität auf das Vierfache an. Werden jedoch 4 Enzyme benutzt, wird die Überschätzung unter gleichen Voraussetzungen reduziert. Dieses Ergebnis spiegelt die Zunahme der Genauigkeit bei der Verwendung mehrerer Enzyme wider.

Die Ergebnisse der T-RFLP zeigen, dass die mikrobielle Zusammensetzung in Talsperren mit dieser Technik sehr gut abschätzbar und vergleichbar ist. Es lassen sich die vorkommenden Mikroorganismen bestimmen und verschiedene Auswertungen durchführen. Innerhalb der Auswertung ermöglicht TOAST viele neue Wege der Interpretation und bietet noch Raum für weitere Auswertungen.

IV. 2. 3 Die Automatisierte Ribosomale Intergene Spacer Analyse (ARISA)

Abgeleitet von der RISA stellt die ARISA eine automatisierte Methode zur Abschätzung der mikrobiellen Diversität dar. Basierend auf den Längenheterogenitäten in der Spacer-Region sollten mit dieser Technik auch nahe verwandte Spezies unterschieden werden. Die ARISA-PCR Fragmente können Längen zwischen 400 bp und 1200 bp, teilweise bis 1400 bp aufweisen (FISHER 1999, BORNEMAN 1997). Die rRNA wird durch eine Familie tandemartig angeordneter Gene kodiert (Abbildung 38).

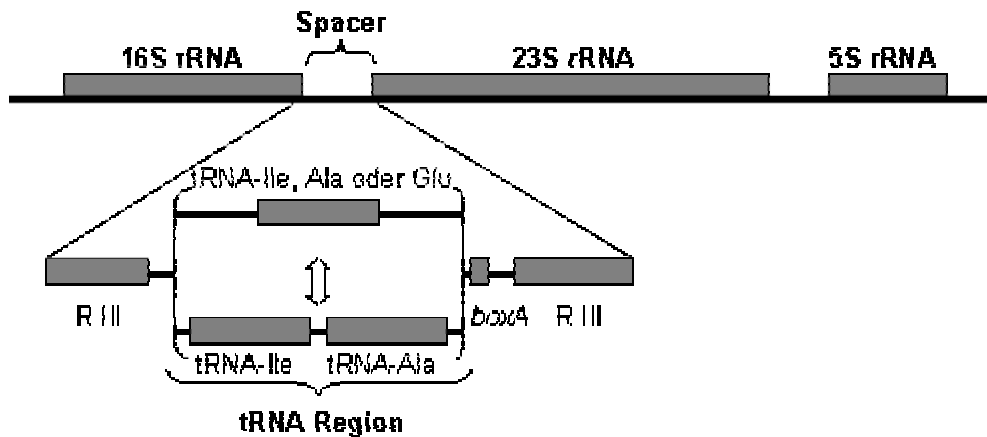


Abbildung 38 Darstellung der 16S-23S rRNA Spacer-Region

In der Spacer-Region befinden sich verschiedene Gene mit Längenheterogenitäten zwischen Spezies und Gattungen

Zur Abdeckung des Bedarfs an ribosomaler RNA für die Ribosomen müssen mehrere Kopien der Gene vorhanden sein. Die Anzahl der 16S rDNA-Operons ist eine speziesspezifische Charakteristik. Eukaryotische Genome weisen einige Hundert ribosomale RNA-Gene auf (*Saccharomyces cerevisiae*: 140 rRNA-Gene, *Vicia faba*: 9500 rRNA-Gene). Bei Prokaryoten beträgt die Anzahl zwischen 1 und 15 (KLAPPENBACH 2000). Das *E. coli* Genom trägt sieben Gene für rRNA, welche verteilt auf der Genkarte vorkommen. Die sieben rRNA Gene besitzen sehr ähnliche Strukturen. Jedes Gen beinhaltet Bereiche für die 16S rRNA, 23S rRNA und 5S rRNA und den dazwischenliegenden Spacern. In der Spacer-Region zwischen der 16S und der 23S rRNA sind Gene für tRNAs lokalisiert. Das *E. coli* Genom enthält 80 tRNA-Gene, wovon 14 in den Transkriptionsabschnitten der rRNA Gene vorkommen. In der Region zwischen der 16S und 23S rRNA befinden sich davon ein oder zwei Gene. Das pathogene Bakterium *Rickettsia prowazekii* und *Mycoplasma pneumoniae* besitzen ein rRNA-Operon, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium weist wie *E. coli* sieben Kopien im Genom auf. Die größte Anzahl rRNA-Operons wurde in sporenbildenden Bodenbakterien nachgewiesen: *Bacillus subtilis* und *Clostridium paradoxum* enthalten 10 und 15 Kopien. Die Anzahl und Lage der rDNA-Kopien variiert demzufolge in verschiedenen Organismen beträchtlich. Verschiedene Hypothesen wurden vorgeschlagen, um die Variationen in der Kopienzahl zu begründen. Generell wird vermutet, dass multiple Kopien des rRNA-Operons für hohe Wachstumsraten verantwortlich sind. KLAPPENBACH (2000) stellte fest, dass die rRNA-Operon Kopienzahlen von Prokaryoten im direkten Zusammenhang damit stehen, wie schnell Bakterien auf komplexen Nährmedien zu wachsen

vermögen. Bodenbakterien, welche auf einem nährstoffreichen Medium mit hoher Wachstumsrate wuchsen, wiesen durchschnittlich 5,5 Kopien der rRNA-Gene für die kleine Untereinheit auf, hingegen Bakterien, welche nur langsam Kolonien bildeten, enthielten im Mittel 1,4 Kopien.

SANSILA (1998) konnte Isolate von *Mycobacterium tuberculosis* und *M. avium* unter Verwendung von spezifischen Primern für die Spacer-Region sicher identifizieren und voneinander abgrenzen. Die verwendeten Methoden basierten auf PCR und Restriktionsverdau, wie auch auf Hybridisierungen. Es konnte festgestellt werden, dass schnell wachsende Mykobakterien ein oder zwei amplifizierte Fragmente aufwiesen während langsam wachsende Mykobakterien jeweils nur ein Fragment lieferten. Diese Tatsache stimmt mit der Vermutung von KLAPPENBACH (2000) überein. In Abbildung 39 aus KLAPPENBACH ist die Korrelation zwischen der Koloniebildung und der Kopienzahl der rRNA Operons dargestellt. Die Berechnung basiert dabei auf Isolaten aus Reisfeldern (Japan) (schwarze Graphen) und Bodenisolaten (Michigan) (weiße Graphen). Deutlich zu erkennen ist eine höhere rRNA-Operon Kopienzahl in schnell wachsenden Isolaten.

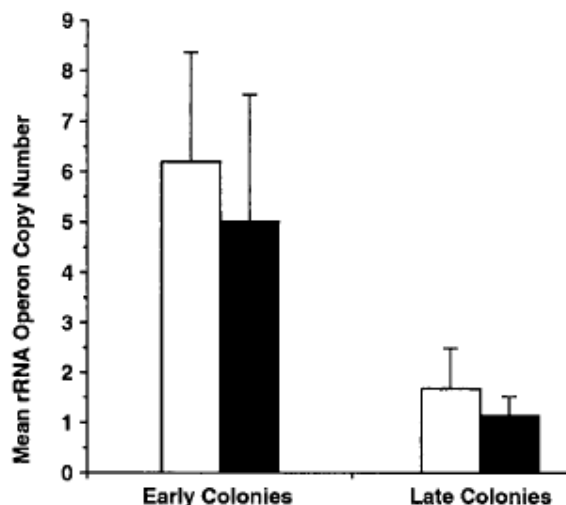


Abbildung 39 Anzahl an Operon-Kopien

Die Anzahl ist abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit (aus KLAPPENBACH 2000)

IV. 2. 3. 1 ARISA mit Reinkulturen

Um reproduzierbare Aussagen zu gewährleisten, wurde die Methode in Vorversuchen an 33 verschiedenen Reinkulturen erprobt (Tabelle 13).

Dazu wurden Stämme der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und Stämme aus Kultivierungsversuchen aus den Sedimenten verwendet, welche zunächst angezüchtet und einer DNA-Extraktion unterzogen wurden.

Tabelle 13 Die verwendeten Reinkulturen

<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Legionella sainthelens</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Streptococcus equi</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Hafnia alvei</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Pasteurella canis</i>	<i>Corynebacterium asperum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>

Für die Analyse im Sedimentbereich wurden zwei universelle Primersysteme getestet: 16S 1406F/ 23S 115R und 16S 1492F/ 23S 115R. Durch die 5'-seitige Fluoreszenzmarkierung (TET) des Reverse-Primer erhielten die PCR-Produkte eine terminale Markierung. Beide Primersysteme ermöglichten eine sehr effiziente Amplifikation und erwiesen sich somit als geeignet für die Analyse. Für weitere Untersuchungen wurde das Primerpaar 16S 1406F/ 23S 115R verwendet, da es basierend auf der Bindungsstelle, längere Fragmentbereiche lieferte. Die Produkte wurden im automatischen Sequenziersystem aufgetrennt und die Analyse der ARISA-Profile erfolgte unter Verwendung der GeneScan[®] Analysis Software. Da sich die Emissionsspektren der verwendbaren Fluoreszenzfarbstoffe überlagern, muss für die Auswertung für jeden Farbstoff eine entsprechende Matrix generiert werden. Daher wurde für den Farbstoff TET eine neue Matrix zur Berechnung der Fragmentlängen in der GeneScan-Analyse erstellt.

Für alle Reinkulturen wurden die 16S-23S rDNA Spacer-Regionen in der PCR detektiert und im Agarosegel eine erste Längenabschätzung vorgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass viele Organismen mehrere Spacerlängen aufwiesen, welche sich oftmals in einem sehr engen Bereich befanden. Aufgrund der geringen Laufweite äußerte sich dieses Resultat im Agarosegel als sog. Schmier. Die Produkte wurden anschließend in die automatisierte Analyse eingesetzt. Für jeden Mikroorganismus konnten spezifische Peakmuster generiert werden. Für *E. coli* konnten drei Spacerlängen festgestellt werden: 648, 718 und 739 bp. In Wiederholungsversuchen konnte dieses Resultat bestätigt werden. Die Methode ist demnach geeignet, reproduzierbare und speziesspezifische Aussagen zu treffen.

Alle Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* wiesen Peaks innerhalb von drei Clustern auf: Cluster 1: 480-550 bp; Cluster 2: 620-660 bp und Cluster 3: 710-820 bp (Anhang; Abbildung A1 und Anhang; Abbildung A2).

Die Clusterbildung konnte innerhalb der *Bacilli* nicht beobachtet werden. In der Abbildung A3 (Anhang) sind die Peakmuster von *B. licheniformis*, *B. cereus* und *B. subtilis* dargestellt und in Abbildung 40 weitere Spezies.

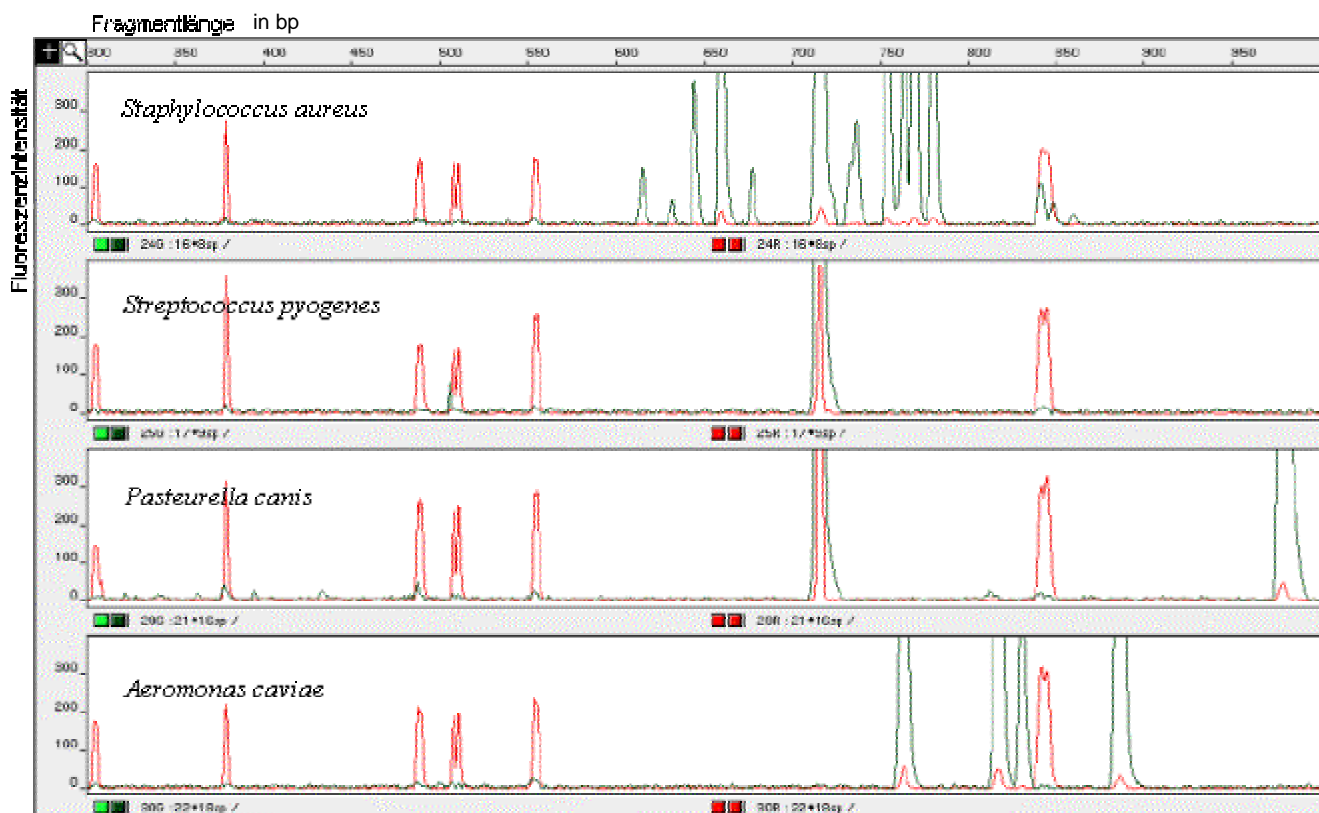


Abbildung 40 Die Spacerlängen weiterer ausgewählter Spezies (grün), Standard (rot)

Es sind deutliche Unterschiede in den Spacerlängen der Organismen zu erkennen. Die Abbildung zeigt aber auch Gemeinsamkeiten, so weisen *S. pyogenes* und *P. canis* gleiche Spacerlängen im Bereich von 700-750 bp auf. Die Fragmentlängen wurden anhand eines mitgeführten Standards ermittelt.

In der Tabelle A1 (Anhang) sind, soweit aus den Untersuchungen und in der Datenbank (<http://rdp.cme.msu.edu/rrn>) vorhanden, die Anzahl der detektierten Spacer und die RNA-Operons von einigen Spezies dargestellt.

Beim Vergleich der Datenbankangaben mit der gefundenen Anzahl an Spacerlängen waren Unterschiede feststellbar. Höchstwahrscheinlich weisen einige Spacer der Operons innerhalb eines Organismus die gleiche Länge auf und führen somit nur zu einem Peak in der Elektrophorese. FROTHINGHAM (1994) stellte fest, dass zwischen verschiedenen Vertretern des *M. tuberculosis* Komplex nicht unterschieden werden konnte, da alle Vertreter dieses Komplexes eine identische 16S-23S rDNA Spacersequenz und Spacerlänge aufweisen.

Die Reinkulturen lieferten nach Amplifikation der Spacer-Region spezifische, reproduzierbare Peakmuster. Es konnte festgestellt werden, dass die Muster Spezies-spezifisch dargestellt werden, es aber nur bei den Enterobakterien einen Hinweis auf Familien-spezifische Muster durch Clusterbildung gibt.

Die Verteilung der rDNA Kopien innerhalb phylogenetischer Gruppen von Bakterien zeigte keinen evolutionäre Zusammenhang zwischen der Kopienzahl und der phylogenetischen Zuordnung (KLAPPENBACH 2000). Beispielsweise weisen Vertreter der gamma *Proteobacteria* sehr verschiedene Kopienzahlen auf: *E. coli*: 7, *Haemophilus influenzae*: 6, *Vibrio cholerae*: 9, *Pseudomonas*

stutzeri: 4 und *P. putida*: 6. Auch innerhalb der alpha *Proteobacteria* sind keine Ähnlichkeiten zwischen den Kopien feststellbar: *Agrobacterium tumefaciens* besitzt 4 Operon-Kopien, *Sinorhizobium meliloti*: 3, *Caulobacter crescentus*: 2, *Rhodobacter sphaeroides*: 3 und *Sphingomonas sp. RB2256* eine Kopie (KLAPPENBACH 2000).

In der Abbildung 41 sind die Genomgröße verschiedener Organismen und die zugehörige Operon Kopienzahl dargestellt. Folgende phylogenetische Gruppen werden darin repräsentiert: *Proteobacteria*: alpha (n=8), beta (n=3), gamma (n=9), epsilon (n=4), CFB (n=7), Cyanobakterien (n=4), Spirochaeten (n=4), HGC gram positive Bakterien (n=7), Thermophile (n=3). Darin wird deutlich, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Genomgröße und der Kopienzahl besteht. Die verwendeten Daten sind online unter <http://rdp.cme.msu.edu/rrn> verfügbar (KLAPPENBACH 2000).

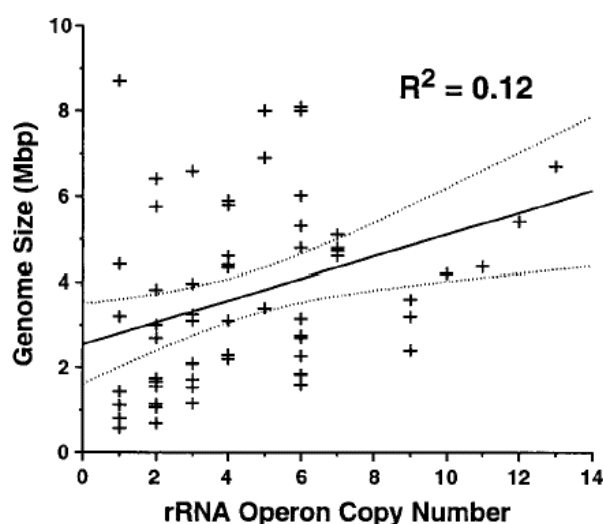


Abbildung 41 Korrelation zwischen Genomgröße und rRNA-Operon Kopien

Eine lineare Regression für alle Datenpunkte wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate erstellt (aus KLAPPENBACH 2000)

IV. 2. 3. 2 ARISA mit Sedimentproben

Die ARISA wurde mit Talsperrensedimenten (Gesamthorizont und alle Einzelhorizonte) von Quitzdorf (Probenahmen 1 bis 8) und Saldenbach (Probenahmen 6 bis 8) durchgeführt. Dabei konnte im Agarosegel keine Längenabschätzung vorgenommen werden, da sich die Amplifikate in einem Schmier äußerten. Damit war ein erster Hinweis auf eine enorm hohe Anzahl von Spacerlängen gegeben. Bei der anschließenden Analyse im Polyacrylamidgel zeigte sich ein diverses Peakmuster (Abbildung 42 und Anhang; Abbildung A4).

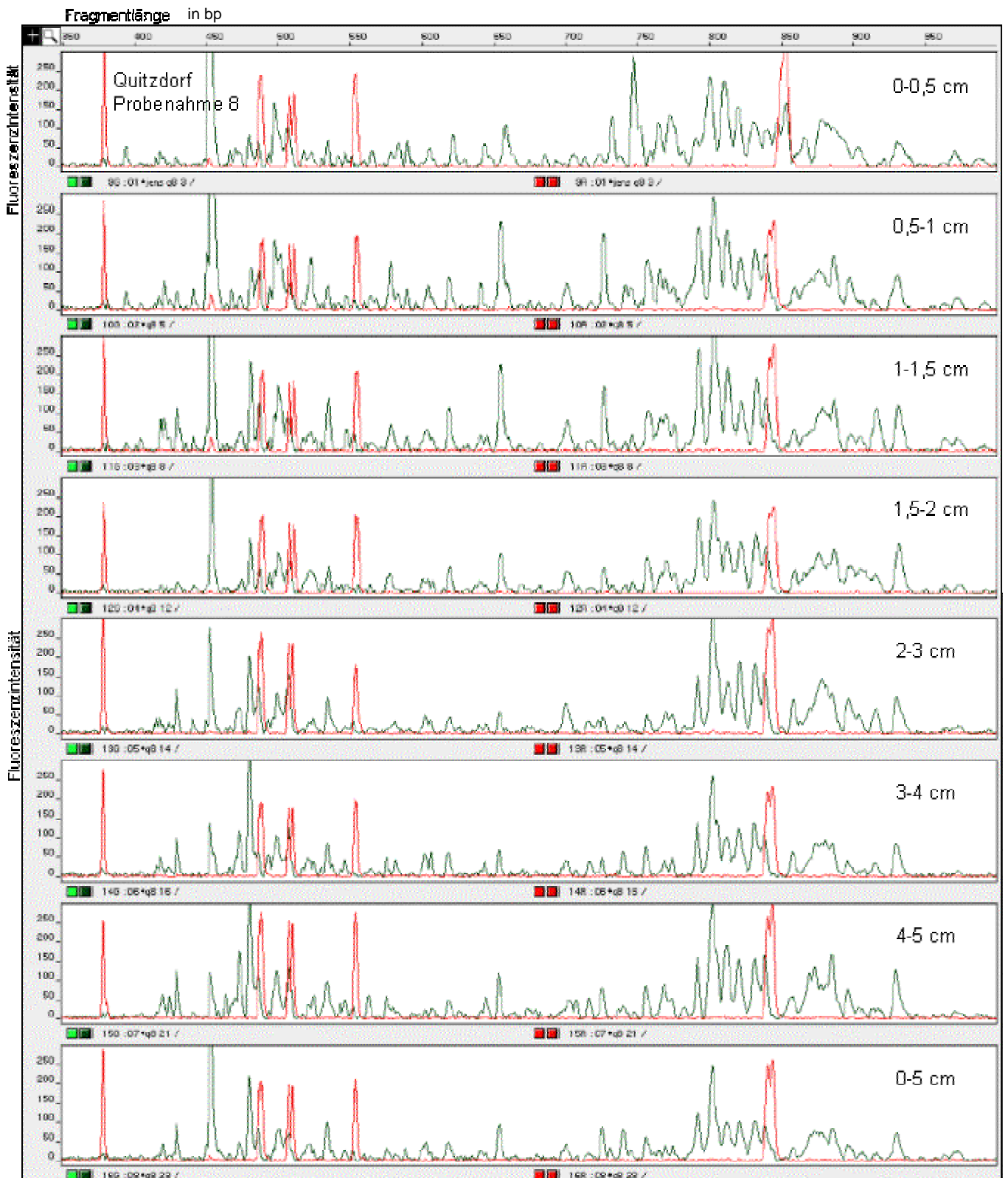


Abbildung 42 Spaceranalyse von Sedimentproben aus der Talsperre Quitzdorf (grün), Standard (rot)
 Dargestellt sind alle analysierten Horizonte, Restriktionsverdau mit *MspI*

In der Talsperre Quitzdorf konnten in der ARISA kaum Unterschiede im Peakmuster zwischen den Horizonten festgestellt werden (Abbildung 42). Die Talsperre Saldenbach weist hingegen einige Variationen auf (Anhang; Abbildung A4): in den Horizonten 1-1,5 cm; 1,5-2 cm und 4-5 cm wurde die Spacerlänge von 397 bp nachgewiesen, welche in den anderen Horizonten nicht vorkam. Ab dem

Horizont 1,5-2 cm wurde ein Peak bei 702 bp detektiert, welcher in den obersten Schichten nicht vorhanden war. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hier um eine Spezies oder Gattung, welche durch vergangene, temporäre Einträge in die Talsperre eingespült wurde.

Eine signifikante Veränderung in der mikrobiellen Gemeinschaft konnte in der ARISA zwischen den Horizonten nicht festgestellt werden. Das wird dadurch begründet, dass viele Organismen mehrere Fragmentlängen aufweisen und somit eine Verschleierung des Fehlens oder Hinzukommens von Spezies erfolgt. Durch das Vorhandensein von mehreren Spacerlängen wird auch die Identifizierung von einzelnen Spezies in komplexen Proben unmöglich.

Auch beim Vergleich der Sedimente von Quitzdorf und Saidenbach ergaben sich nur schwache Unterschiede. In Quitzdorf fehlen beispielsweise die Spacerlängen 397 bp und 565 bp, welche in Saidenbach vorhanden waren. Im Bereich von 450-500 bp und 750-850 bp lieferten beide Talsperrensedimente Spacerlängen mit sehr hohen Fluoreszenzintensitäten. Das könnte darauf hindeuten, dass sich sehr hohe Anzahlen der entsprechenden Spezies im Sediment befanden und es sich um ubiquitäre Bakterien handelt. Die Gesamtanzahl der detektierten Peaks lag bei Saidenbach und Quitzdorf in einem ähnlichen Bereich: Quitzdorf wies 72 Peaks auf und Saidenbach 75 Peaks. Genaue Aussagen über die Diversität in den Sedimenten können allerdings nicht getroffen werden, da in dieser Analyse nicht ein Peak für eine Spezies steht, sondern bis zu 15 Peaks eine Spezies definieren können. Somit kann es leicht zu einer Überschätzung der mikrobiellen Diversität kommen.

Aber auch eine Unterschätzung der Diversität ist möglich, da viele Mikroorganismen Spacer-Regionen mit der gleichen Länge aufweisen. Datenbanken und Literaturangaben sind bei dieser Analyse leider keine erschöpfliche Hilfe, es gibt nur sehr wenige Angaben zu Anzahlen von rDNA-Kopien im Genom, Spacerlängen oder Spacersequenzen.

Für die Identifizierung von Reinkulturen hat sich die ARISA als sehr geeignet herausgestellt. Zur Analyse von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften ist sie hingegen nur begrenzt einsetzbar.

IV. 2. 4 Vergleich von DGGE, T-RFLP UND ARISA

Es wurden die molekularbiologischen Fingerprinttechniken DGGE, T-RFLP und ARISA zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in den Sedimenten eingesetzt. Die DGGE Analyse der 16S rDNA und der α -Untereinheit der DSR zeigte deutliche Unterschiede im Bandenmuster zwischen den Talsperren. Allerdings konnten kaum oder keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probenahmen sowie den verschiedenen Sedimenthorizonten nachgewiesen werden.

Die Auswertung der T-RFLP Daten zeigte dagegen, dass die Mikroorganismen zu verschiedenen Zeiten in einer Talsperre sowie zwischen den Talsperren variieren. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen Probenahmen sowie zwischen den Horizonten einer Talsperre gezeigt werden. Die ARISA erwies sich als geeignet zur Generierung speziesspezifischer Fingerabdrücke beim Einsatz von Reinkulturen. In Proben, welche mehrere Organismen enthalten, kann die Methode nur begrenzt herangezogen werden, begründet auf der Tatsache, dass viele Organismen mehr als eine Spacerlänge aufweisen.

Der resultierende Unterschied zwischen T-RFLP und DGGE, welche beide das gleiche Target amplifizieren, sollte somit mit der DGGE in Zusammenhang stehen. Beide Verfahren nutzen

amplifizierte DNA und analysieren das erhaltene PCR-Produkt. Unterschiede bestehen in den Annealingtemperaturen sowie in den verwendeten Primern.

Die Amplifikation der 16S rDNA wurde für die T-RFLP bei 50 °C (wie auch bei der ARISA für die Spacer-Region), im Gegensatz zu 55 °C für die 16S rDNA Analyse in der DGGE durchgeführt. Dieser Unterschied war nicht gravierend, da keine Veränderungen im Bandenmuster bei der niedrigeren Annealingtemperatur im DGGE gezeigt werden konnten. Der bedeutendere Unterschied besteht in der notwendigen Verwendung der GC-Klammer. Da die Kinetik des Primers durch die GC-Klammer stark beeinflusst wird, werden höchstwahrscheinlich nur bestimmte Zielsequenzen zur Amplifikation genutzt, was in einem typischen Bandenmuster resultiert.

Somit konnte mit großer Sicherheit bewiesen werden, dass die DGGE, im Gegensatz zur T-RFLP nicht in der Lage ist, vorhandene unterschiedliche 16S rDNA Sequenzen darzustellen. Die ARISA ist in der Lage, zwischen Reinkulturen sicher zu diskriminieren, aber nicht in Proben mit hoher mikrobieller Diversität. Als am besten geeignete Methode zur Analyse der mikrobiellen Diversität in Sedimenten erwies sich die T-RFLP.

IV. 3 Funktionelle Gruppen in den Sedimenten

IV. 3. 1 Spezifische PCR zum Nachweis von Denitrifikanten und Nitrifikanten

Denitrifizierende Bakterien sind phylogenetisch sehr heterogen verteilt und daher auf der Basis der 16S rDNA Analyse nur schwer erfassbar. Daher werden bedeutende metabolische Eigenschaften zur Detektion und Analyse dieser physiologischen Gruppe genutzt. Denitrifikanten besitzen die Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen Nitrat über Nitrit und Distickstoffoxid zu molekularem Stickstoff zu reduzieren. Die Schlüsselenzyme der Nitratatmung stellen die Nitrit Reduktasen (Nir) dar. Die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid wird hauptsächlich durch zwei Reduktasen katalysiert, welche durch zwei verschiedene Nitrit Reduktase-Gene kodiert werden. Ein Enzym enthält Kupfer (NirK), das zweite Enzym Cytochrom cd_1 (NirS). Die Enzyme weisen strukturelle Unterschiede auf, sind aber funktionell und physiologisch äquivalent. Zur molekularbiologischen Detektion von denitrifizierenden Bakterien etablierte und evaluierte BRAKER (2000) zwei Primersysteme zur Amplifikation der Gene NirK und NirS. Im Gegensatz zur weiten Verbreitung von NirS wurde NirK bisher nur in 30% aller Denitrifikanten nachgewiesen. Beim Nachweis von Denitrifikanten (Isolaten) im marinen Sediment (Washington, USA) wurde von BRAKER (2000) festgestellt, dass alle Isolate ausschließlich mit den NirS-spezifischen Primern erfolgreich amplifiziert werden konnten. Das NirK-Primersystem lieferte nur PCR-Produkte in einigen Anreicherungskulturen. Die NirK-Primer amplifizieren höchstwahrscheinlich nur die Gene der Spezies, für die die Primer ursprünglich kreiert wurden (*Alcaligenes faecalis* S-6, *Achromobacter cycloclastes*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas* sp. strain G-179, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhizobium* sp.). Die NirS-Gene erwiesen sich somit als wesentlich höher konserviert als die NirK-Gene. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Zielregion der NirS-Primer zum Nachweis von Denitrifikanten gewählt. Als Positivkontrolle wurde extrahierte DNA von *Pseudomonas aeruginosa* und als Negativkontrolle DNA von *E. coli* eingesetzt.

Die extrahierte DNA aus *P. aeruginosa* wurde im ersten Ansatz mit den Primern NirS 1f/NirS 6r amplifiziert und sequenziert, um die Kontrolle eindeutig zu bestimmen. Die Sequenzierung lieferte 100% Sequenzübereinstimmung zu *Pseudomonas aeruginosa* gene for nitrite reductase (Accession-Nr. X16452).

Die PCR-Bedingungen mussten in Vorversuchen an die Verwendung im Sedimentbereich angepasst werden. Dazu war es nötig, die Temperatur für die Anlagerung der Primer in mehreren Ansätzen zu optimieren und die Zyklenzahlen schrittweise zu erhöhen. Bei einer Annealing-Temperatur von 47 °C und einer Zyklenzahl von 37 konnte eine effiziente Amplifikation der NirS-Gene erzielt werden. In die Untersuchungen zum Nachweis von Denitrifikanten in den Talsperresedimenten wurden alle Einzelhorizonte, wie auch der Gesamthorizont der Probenahmen 4, 6 und 8 von Saidenbach, Probenahmen 5, 6 und 7 von Quitzdorf, Probenahmen 4, 5 und 6 von Neunzehnhain und Probenahmen 5, 6 und 7 von Muldenberg einbezogen.

Eutrophe Gewässer wie die Talsperre Quitzdorf und Saidenbach sind sehr reich an gelösten Nährstoffen wie Nitrat und Phosphat. Ausgehend von extrahierter DNA aus den Sedimentproben waren in jeder Probenahme und in jedem Horizont dieser Talsperren Denitrifikanten mittels der spezifischen PCR nachweisbar. Die oligotrophe Talsperre Neunzehnhain wies ebenfalls zu allen Probenahmedaten und Horizonten Denitrifikanten im Sediment auf. In der Talsperre Muldenberg konnten keine denitrifizierenden Organismen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch Wiederholungsversuche bestätigt.

Von Anreicherungskulturen aus Neunzehnhain und Saidenbach wurde ebenfalls die spezifische PCR durchgeführt. Dabei konnten in allen Horizonten der Talsperresedimente Denitrifikanten detektiert werden. Im Anschluss an diese Ergebnisse wurden mit der spezifischen PCR für Denitrifikanten alle bisher stattgefundenen Probenahmen und Einzelhorizonte untersucht. So konnten die gewonnenen Ergebnisse bestätigt und reproduzierbar gestaltet werden.

Die spezifisch amplifizierten Fragmente aus den Talsperren Quitzdorf 7, Saidenbach 4 und Neunzehnhain 4 konnten in einer anschließenden Klonierung und Analyse von jeweils 100 Klonen sicher als denitrifizierende Organismen bestätigt werden. In Neunzehnhain wurde vorwiegend *Ralstonia eutropha* (Accession-Nr. AF114789) und *Pseudomonas fluorescens* (Accession-Nr. AF114792) mit Sequenzähnlichkeiten von über 96% identifiziert und in der Genbibliothek von Saidenbach dominierte *P. fluorescens* mit mehr als 95% Übereinstimmung. Quitzdorf wies eine gleichmäßige Verteilung von Rhizobien (*Rhizobium* sp. JEYF11 mit der Accession-Nr. AB069652, *Bradyrhizobium* sp. mit Accession-Nr. AB069654), *P. aeruginosa* und einem *Unidentified bacteria denitrifying isolate IFAM 3698* (Accession-Nr. AJ224910) auf. Bei der Einordnung der identifizierten Spezies in phylogenetische Gruppen konnte festgestellt werden, dass alle drei Talsperren Vorkommen von Denitrifikanten innerhalb der alpha und gamma *Proteobacteria* zeigten (Abbildung 43). Denitrifikanten unter den beta *Proteobacteria* konnten nur in der Talsperre Neunzehnhain nachgewiesen werden. Weiterhin wurden in Neunzehnhain, Saidenbach und Quitzdorf die NirS-Gene innerhalb der unidentifizierten Mikroorganismen detektiert.

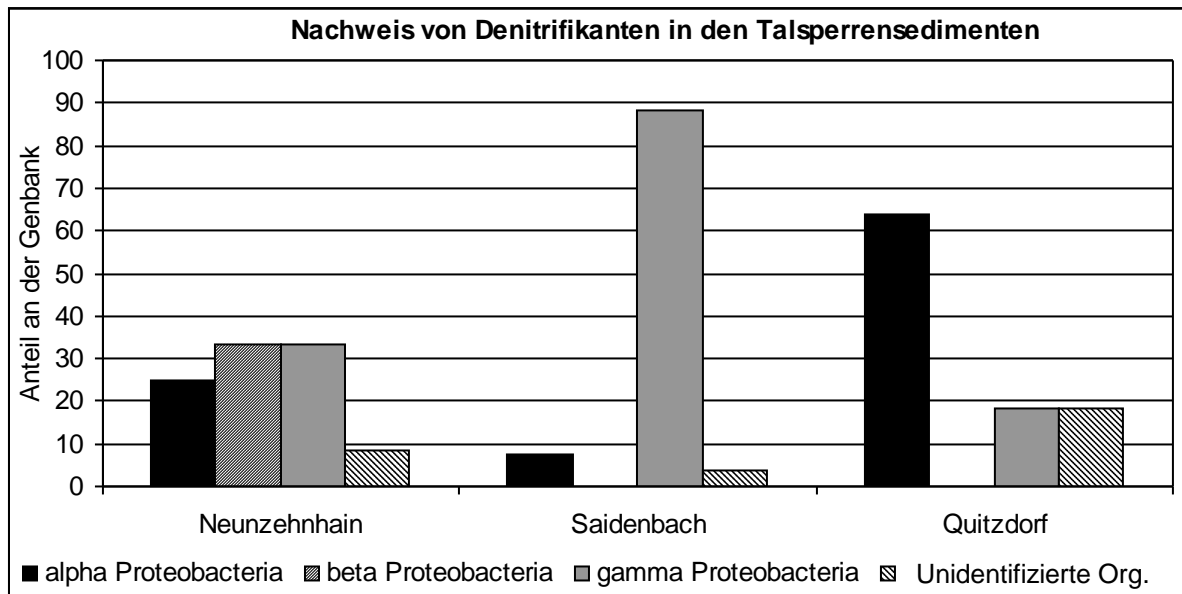


Abbildung 43 Denitrifikanten anhand phylogenetischer Gruppen in den Sedimenten

In den Talsperren Saidenbach und Quitzdorf konnten keine Denitrifikanten innerhalb der beta Proteobacteria nachgewiesen werden.

Die Nitrifikation ist die mikrobielle Oxidation von Ammonium über Nitrit zu Nitrat. Die Nitrifizierer nutzen hierbei die durch die Bildung von Nitrit (272 kJ) und Nitrat (79 kJ) freigesetzte Energie zur Lebenserhaltung. Die Oxidation von Ammonium zu Nitrit durch autotrophe Nitrifizierer spielt eine zentrale Rolle im globalen Stickstoff-Zyklus und in landwirtschaftlich genutzten Böden dominiert die Ammoniumoxidation. Der erste Reaktionsschritt, die Oxidation von Ammonium zu Nitrit, wird hierbei von obligat aeroben Bakterien der Gattung *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* und *Nitrosolobus* vollzogen. Dabei wird die Oxidation von Ammonium zu Hydroxylamin durch die Ammonium Monooxygenase katalysiert. Die zweite Reaktion, die Oxidation von Nitrit zu Nitrat, erfolgt durch die Bakterien der Gattung *Nitrobacter*. Diese Reaktion läuft schneller ab als die erste, daher findet sich Nitrit im Boden nur in Spuren. Die Nitrifikation wird durch zahlreiche Einflussfaktoren, z. B. die Konzentration an Ammonium im Boden, den Sauerstoffpartialdruck und den pH-Wert des Bodens beeinflusst.

Die spezifische PCR für nitrifizierende Bakterien zielt auf die Gene der Ammonium Monooxygenase (Amo) ab (JURETSCHKO 1998). In die Untersuchung wurden folgende Probenahmen der Talsperren einbezogen: Saidenbach 2, 4, 6 bis 9, Quitzdorf 2, 4, 7, 9, Neunzehnhain 2, 4, 7 und Muldenberg 1, 2, 7. Als Positivkontrolle wurde in jeder PCR die DNA von *Nitrosomonas sp* amplifiziert, als Negativkontrolle diente DNA von *E. coli*. Analog zur Vorgehensweise zum spezifischen Nachweis von Denitrifikanten mussten auch für die Amplifikation der Nitrifikanten-DNA optimale Bedingungen (Anpassung der Temperaturen und Zyklenzahlen) geschaffen werden.

Die Amo-Gene nitrifizierender Mikroorganismen konnten ausschließlich in der Talsperre Saidenbach nachgewiesen werden. Im Anschluss an dieses Ergebnis wurden alle Probenahmen und Einzelhorizonte der Talsperren untersucht und die Ergebnisse konnten bestätigt werden.

Das positive Resultat im Sediment von Saidenbach wurde anschließend durch Klonierung und Sequenzierung von 100 rekombinanten Klonen überprüft. Dabei konnte das Unidentified bacterium-

DNA for ammonia monooxygenase (Accession-Nr. Z97850) mit einem Anteil an der Genbibliothek von 30% und *Nitrosospira* sp. NpAV ammonia monooxygenase operon copy 3 (Accession-Nr. U92432; U38251; U72981) mit 25% Anteil identifiziert werden. Die Sequenzen wiesen dabei Übereinstimmungen von 94-99,7% auf. Mit Anteilen von 8% und mit Ähnlichkeiten von 98,4% und 98,7% zu Datenbanksequenzen wurden *Nitrosolobus multiformis* ammonia monooxygenase subunit AmoC1 (Accession-Nr. U91603), das Unknown Proteobacterium amoA gene (Accession-Nr. AJ388571) und das Unidentified bacterium Poll-8 ammonia monooxygenase (amoA) gene (Accession-Nr. AF272475) detektiert. Diverse weitere unidentifizierte Bakterien kamen in geringen Anteilen in der Genbibliothek vor. Dabei handelte es sich in jeder Sequenz um die Gene der Ammonium Monooxygenase. Demzufolge wurde mit dem verwendeten Primersystem sehr spezifisch das Zielgen amplifiziert. Ein weiterer Nachweis für die spezifische Amplifikation zeigte sich darin, dass keine Spezies der Gattung *Nitrobacter*, welche am Schritt der Oxidation von Nitrit zu Nitrat beteiligt sind, in der Genbibliothek detektiert wurden.

Die Sequenz des Unidentified bacterium-DNA for ammonia monooxygenase wurde von ROTTHAUWE (1997) beschrieben bei der Untersuchung der Eignung des amoA-Systems für die molekularbiologische Detektion und Charakterisierung Ammonium-oxidierender Populationen in Umweltproben. Bei einem Vergleich von Standorten wird eine individuelle, habitatspezifische Besiedlung durch nitrifizierende Bakterien deutlich. In der Talsperre Saidenbach dominierte das Unidentified bacterium (Accession-Nr. Z97850) neben *Nitrosospira* sp. NpAV. *Nitrosospira* spp. stellte auch den Hauptvertreter an der Reiswurzel und in Anreicherungsproben aus der Ostsee dar, in Teich- und Klärwerksproben dominierten *Nitrosomonas eurapaea*-verwandte Spezies (HORZ 2000). AmoA-Sequenzen, welche aus Proben von drei verschiedenen Seen in Holland (Ijsselmeer, Gooimeer und Drontermeer) erzielt worden waren, bestanden zum überwiegenden Teil aus *Nitrosomonas urea*-verwandten Sequenzen (SPEKSNIJDER 1998, HORZ 2000). Dies läßt eine starke Verbreitung von *Nitrosomonas*- und *Nitrosospira*-verwandten Nitrifizierern in Süßwasser-Habitaten vermuten.

IV. 4 Potentiell pathogene Mikroorganismen und Protozoen

IV. 4. 1 Der molekularbiologische Nachweis von Mykobakterien

Das Ziel der vergleichenden 16S rDNA Analyse der Mykobakterien bestand in der Identifizierung und phylogenetischen Klassifizierung. Klassische Verfahren zur Identifizierung von Mykobakterien beanspruchen einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand, Mykobakterien sind schwer kultivierbar und wachsen sehr langsam. Weiterhin gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse schwierig und eine Identifizierung der Spezies ist mit klassischen Methoden oftmals nicht möglich. Besonders bei Mykobakterien stellt die PCR, verbunden mit einer Sequenzanalyse, die Methode der Wahl dar. Sie erlaubt die rasche und sichere Identifikation der meisten Mykobakterienspezies (KIRSCHNER 1993, SPRINGER 1995).

Mykobakterien sind sehr widerstandsfähig und lassen sich nur schwer lysieren (BÖDDINGHAUS 1990). Zur effektiven Lyse von Mykobakterien wurde daher ein mechanischer Aufschluss mittels Bead-Beater gewählt. Die anschließende Nukleinsäure-Extraktion erfolgte mit dem System „Spin Kit for Soil“. Die Amplifikation eines ca. 600 bp langen Bereiches der mykobakteriellen 16S rDNA erfolgte mittels eines genus-spezifischen Primersystems (semi-nested PCR) (KIRSCHNER 1993). Von allen Probenahmen aus 2000 wurde der Gesamthorizont sowie die Einzelhorizonte auf das Vorkommen von Mykobakterien untersucht.

Nach der ersten Amplifikationsrunde waren meist nur vereinzelt schwache Banden der erwarteten Länge erkennbar. Erst die zweite Amplifikationsrunde führte zur einer ausreichenden Amplifikation mykobakterieller 16S rDNA-Fragmente. Mittels der semi-nested PCR wurden in allen untersuchten Talsperren und in jedem Horizont mykobakterielle 16S rDNA-Gene amplifiziert. Die Notwendigkeit der semi-nested PCR lässt erkennen, dass nur geringe Kopienzahlen mykobakterieller 16S rDNA im Sediment enthalten waren. Daher ist zu vermuten, dass Mykobakterien nur einen geringen Anteil der im Sediment vorkommenden Bakterien repräsentieren.

Ein positives PCR-Ergebnis lässt keine Aussagen über die Vitalität der Organismen zu, die amplifizierte DNA kann von lebenden oder toten Organismen stammen oder als freie DNA in der Probe vorliegen (McKAY 1992). Stammt die amplifizierte 16S rDNA von lebenden, vermehrungsfähigen Mykobakterien, wäre eine Abnahme bzw. ein Verschwinden der Organismen in tieferen Sedimentschichten anzunehmen, da sie aerob bis mikroaerophil leben. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden, es wurden in jedem Horizont Mykobakterien nachgewiesen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um freie DNA oder um DNA toter Organismen handelt.

Zur Identifizierung der in den Sedimenten vorkommenden Mykobakterienspezies wurden die aus dem Gesamthorizont der Probenahmen 1 aller Talsperren amplifizierten mykobakteriellen 16S rDNA-Fragmente in *E. coli* kloniert und Genbibliotheken erstellt. Aus jeder Genbibliothek wurden ca. 100 zufällig ausgewählte, rekombinante Klone durch Sequenzierung der Inserts analysiert. Die Sequenzen wurden mit Nukleinsäure-Datenbanken (EMBL- bzw. GenBank-Datenbank und RIDOM-Datenbank) verglichen, um ähnliche oder identische Sequenzen festzustellen. Die EMBL-Datenbank enthält eine große Anzahl umweltrelevanter mykobakterieller 16S rDNA-Sequenzen, wie auch von klinischen Isolaten. Die Qualität der Sequenzen ist jedoch oft schlecht, da viele dieser Sequenzen schon vor

einigen Jahren in die Datenbank aufgenommen wurden und aufgrund der damals noch mit einer hohen Fehlerrate behafteten Sequenzierungstechniken viele Ungenauigkeiten aufweisen. Die RIDOM-Datenbank enthält gut abgesicherte Einträge von mykobakteriellen Typstämmen und die Sequenzen weisen eine hohe Qualität auf. Diese Datenbank wurde zur Identifikation von klinischen Mykobakterienisolaten erstellt, das Spektrum an ubiquitären Mykobakterien aus Umweltproben ist gering. Zur Absicherung der Resultate wurden die Sequenzen aus den Talsperrensedimenten mit beiden Datenbanken verglichen.

In den folgenden Abschnitten werden die Identifikationen der mykobakteriellen 16S rDNA-Sequenzen mit den höchsten Ähnlichkeiten zu Datenbanksequenzen dargestellt. Sequenzen mit weniger als 95% Übereinstimmung wurden in der weiteren vergleichenden Analyse nicht berücksichtigt.

IV. 4. 1. 1 Mykobakterien in der Talsperre Saidenbach

In 108 sequenzierten rekombinanten Klonen wurden 12 verschiedene Mykobakteriensequenzen identifiziert. 62 Sequenzen und damit der überwiegende Anteil zeigte Ähnlichkeit zu *Mycobacterium* IWGMT 90093 (EMBL-Identifizierung) bzw. *M. wolinsky* (RIDOM-Identifizierung) (Anhang; Tabelle A2). Bis zu einer Sequenzübereinstimmung von 97% ist eine Spezieszuordnung möglich (STACKEBRANDT 1994). Aufgrund der Ähnlichkeit von 97,5% handelt es sich daher bei dieser Sequenz um *Mycobacterium* IWGMT 90093. Der größte Teil der im Sediment gefundenen Sequenzen zeigte ca. 97% Übereinstimmung zu den in den Datenbanken abgelegten Mykobakteriensequenzen. Bei geringeren Sequenzübereinstimmungen muss davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um die gefundenen Spezies handelt, sondern um nahe verwandte Mykobakterienspezies. Besonders im Umweltbereich ist ein großer Anteil der vorkommenden Organismen noch nicht identifiziert. Sequenzen mit geringeren Ähnlichkeiten liefern einen deutlichen Hinweis auf neue, noch nicht charakterisierte Spezies.

Im Sediment der mesotrophen Talsperre Saidenbach konnte ein breites Spektrum an mykobakteriellen Sequenzen ermittelt werden. Das dominierende *Mycobacterium* sp. IWGMT 900093 ist ein skotochromogenes, langsam-wachsendes Bakterium und eng mit *M. interjectum* verwandt (WAYNE 1996). Weitere Sequenzen wurden in geringen Anteilen nachgewiesen. Diese Mykobakterien repräsentieren fakultativ pathogene oder ubiquitär im Boden oder Wasser vorkommende Spezies.

Der größte Teil der mykobakteriellen Sequenzen aus den Talsperrensedimenten wurde erstmals aus Umweltproben, besonders aus Wasser und Boden isoliert. Einige detektierte Spezies der Talsperren wurden aus Patientenmaterialien gewonnen. Das verdeutlicht, dass es sich bei vielen in der Umwelt vorkommenden Mykobakterienspezies um fakultativ pathogene Mikroorganismen handelt.

IV. 4. 1. 2 Mykobakterien in der Talsperre Muldenberg

Bei der Untersuchung der oligotrophen, stark versauerten Talsperre Muldenberg wurde in 82 rekombinanten Klonen ausschließlich *Mycobacterium malmoense* und *Mycobacterium conspicuum* identifiziert. Alle Sequenzen zeigten mit EMBL und RIDOM übereinstimmende Ergebnisse mit sehr hohen Ähnlichkeiten (99%) zu Datenbanksequenzen. 76 Sequenzen wurden als *M. malmoense* (Accession-Nr. AF152560) mit Homologien von 96,2-98,8% und weitere 6 Sequenzen mit Ähnlichkeiten von 97,6-99,5% als *M. conspicuum* (Accession-Nr. X88922) identifiziert.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse von RIDOM und EMBL, wie auch die hohe Sequenzhomologie legen nahe, dass es sich eindeutig um die Spezies *M. malmoense* und *M. conspicuum* handelt. *Mycobacterium malmoense* wurde 1977 erstmalig in Malmö (Schweden) aus Sputum von einem lungenkranken Patienten isoliert und ist ein nicht pigmentiertes, langsam wachsendes Mykobakterium (FALKINHAM 1996, SCHRÖDER 1977, SNEATH 1986). *M. malmoense* wurde später auch in Nord- und Westeuropa sowie in den USA nachgewiesen. Besonders bei immungeschwächten Patienten sind *M. malmoense* Infektionen (neben *M. avium* Infektionen) weit verbreitet (FALKINHAM 1996). Auch bei Kindern mit Gebärmutter-Lymphadenitis und Erwachsenen mit chronischer Lungenerkrankung wurde *M. malmoense* isoliert. *Mycobacterium conspicuum* repräsentiert ebenfalls eine fakultativ pathogene Spezies. Als langsam wachsendes, nicht photochromogenes Bakterium bildet *M. conspicuum* gelbe Kolonien. Die Erstisolierung erfolgte aus Untersuchungsmaterial von zwei HIV-positiven Patienten aus Deutschland (SPRINGER 1995). *M. conspicuum* wurde bisher nicht aus Umweltproben isoliert. Das Vorkommen der beiden fakultativ pathogenen Spezies in der Talsperre Muldenberg deutet auf ein mögliches Infektionsrisiko bei der Resuspension der Erreger aus dem Sediment in den Wasserkörper hin. Die identifizierten Sequenzen könnten aber auch von abgestorbenen Organismen stammen und demnach kein Risiko darstellen. An dieser Stelle wäre in Folgeuntersuchungen die hygienische Relevanz durch die Kultur der Spezies zu prüfen.

IV. 4. 1. 3 Mykobakterien in der Talsperre Quitzdorf

Das Sediment der eutrophen Talsperre Quitzdorf enthielt nahezu ausschließlich Sequenzen, welche als *Mycobacterium sp.* strain MCRO 7 (Accession-Nr. X93033) mit Ähnlichkeiten von 96,4-99,2% identifiziert wurden (76 Sequenzen von 82 analysierten rekombinanten Klonen). Diese Sequenz besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu *M. nonchromogenicum* und konnte auch in der Talsperre Neunzehnhain nachgewiesen werden. Zwei Sequenzen erwiesen sich als *Mycobacterium sp.* TA5 (Accession-Nr. AB028483) mit 97,0-98,1%. Weitere Sequenzen wurden nur vereinzelt gefunden: *Mycobacterium austroafricanum* (Accession-Nr. AF190800) mit 98,1% Homologie, *M. moriokaense* (Accession-Nr. AJ429044) mit 99,2% und *M. fallax* (Accession-Nr. M29562) mit 96%. Aufgrund der geringeren Sequenzhomologie von *M. fallax* ist in diesem Fall nicht gesichert, dass es sich tatsächlich um die Spezies handelt. Höchstwahrscheinlich verbirgt sich hinter dieser Sequenz eine bisher noch nicht identifizierte Mykobakterien-Spezies. *M. fallax* als schnell wachsendes, nicht pigmentiertes und *M. tuberculosis* in der Kolonimorphologie und einigen biochemischen Eigenschaften ähnliches Bakterium

und konnte bereits aus verschiedenen Umwelthabitaten isoliert werden (LEVY-FREBAULT 1983). Ein mögliches Pathogenitätspotential konnte bisher nicht nachgewiesen werden (SNEATH 1986).

Einige Mykobakterien werden aufgrund ähnlicher Eigenschaften zum *M. parafortuitum* Komplex zusammengefaßt: *M. parafortuitum*, *M. aurum*, *M. neoaurum*, *M. diernhoferi* und *M. austroafricanum*. *M. austroafricanum* ist ein schnell wachsendes, skotochromogenes Mykobakterium, welches nicht mit Erkrankungen assoziiert ist (SNEATH 1986, TSUKAMURA 1983). Isolieren konnte man es bisher aus Wasser in Südafrika. Auch von *M. neoaurum* konnte bisher keine Pathogenität festgestellt werden und das Vorkommen beschränkt sich auf Böden (SNEATH 1986).

Bei den in der Talsperre Quitzdorf vorkommenden Mykobakterien handelt es sich demnach hauptsächlich um Umweltkeime, welche keine Krankheiten verursachen und demnach keine potentielle Gefahr darstellen.

IV. 4. 1. 4 Mykobakterien in der Talsperre Neunzehnhain

Die 82 analysierten Klone der oligotrophen Talsperre Neunzehnhain repräsentierten vier verschiedene Sequenzen. Mit Homologien von 96,0-98% wurden 65 der Sequenzen als *Mycobacterium* sp. TA5 (EMBL) bzw. *M. moriokaense* (RIDOM) identifiziert (Abbildung 44). Bei *Mycobacterium* sp. TA5 handelt es sich um ein Bodenisolat, mit der Fähigkeit, die flüchtige aliphatische Chlorverbindung 1,1,1-Trichlorethan (TCA) zu 2,2,2-Trichlorethanol abzubauen. TCA kommt oft in verschmutzten Böden und Grundwasser vor und steht im Verdacht der karzinogenen und leberschädigenden Wirkung (YAGI 1999). Das TCA-abbauende Enzym wurde noch nicht weiter charakterisiert, wird jedoch in großen Mengen durch *Mycobacterium* sp. TA5 produziert. Das Bakterium kann weiterhin Ethan, Ethanol und andere Kohlenstoffquellen assimilieren. Aufgrund der 16S rRNA-Sequenz wird die nahe Verwandtschaft zu *Mycobacterium duvalii* deutlich, welches ebenfalls im Sediment nachgewiesen werden konnte. Das in der RIDOM-Datenbank identifizierte *Mycobacterium moriokaense* ist ein nicht pigmentiertes, schnell wachsendes Mykobakterium, welches aus Bodenproben in Morioka (Japan) isoliert wurde (TSUKAMURA 1986). Die gleichzeitige Isolierung dieser Spezies aus dem Sputum eines Tuberkulose-Patienten zeigt das pathogene Potential dieses Bakteriums. *M. moriokaense* ist *M. fortuitum* und *M. chelonae* ähnlich, unterscheidet sich jedoch in manchen physiologischen Eigenschaften von diesen Spezies.

Weiterhin lieferte der Datenbankvergleich bei 15 Sequenzen Ähnlichkeiten von 96,3-97,4% zu *Mycobacterium* sp. strain MCRO 7. *Mycobacterium* sp. MCRO7 ist eng verwandt mit *Mycobacterium nonchromogenicum*, welches aus Mäusen isoliert wurde, denen Erde injiziert wurde (SNEATH 1986). Bei dieser Spezies handelt es sich um schnell wachsende, thermotolerante Mykobakterien (SPRINGER 1995).

Zwei weitere Sequenzen wiesen Homologien unter der Speziesgrenze von 97% auf: *M. smegmatis* (Accession-Nr. Y08453) und *Mycobacterium* sp. strain MCRO 17 (Accession-Nr. X93028). Die Ähnlichkeit dieser Sequenzen läßt jedoch vermuten, dass es sich um bisher nicht bekannte, verwandte Spezies handelt. *M. smegmatis* als nicht pigmentiertes, schnell wachsendes Bakterium, kann sich auf Nähragar gleitend fortbewegen und ist *M. fortuitum* biochemisch sehr ähnlich (RECHT 2000, SNEATH 1986). Isoliert wurde *M. smegmatis* häufig aus Böden und Wasser. Vor einigen Jahren noch als

saprophytäres Bakterium eingestuft, erlangt die Spezies heute klinische Bedeutung bei Wund- und Gewebeeinfektionen sowie Osteomyelitis. *Mycobacterium* sp. MCRO 17 ist ein schnell wachsendes, thermotolerantes Bakterium und wurde anfangs biochemisch als *M. scrofulaceum* identifiziert. Erst mit der 16S rDNA Analyse konnte eine höhere Ähnlichkeit zu *M. flavescens* aufgeklärt werden (SPRINGER 1995).

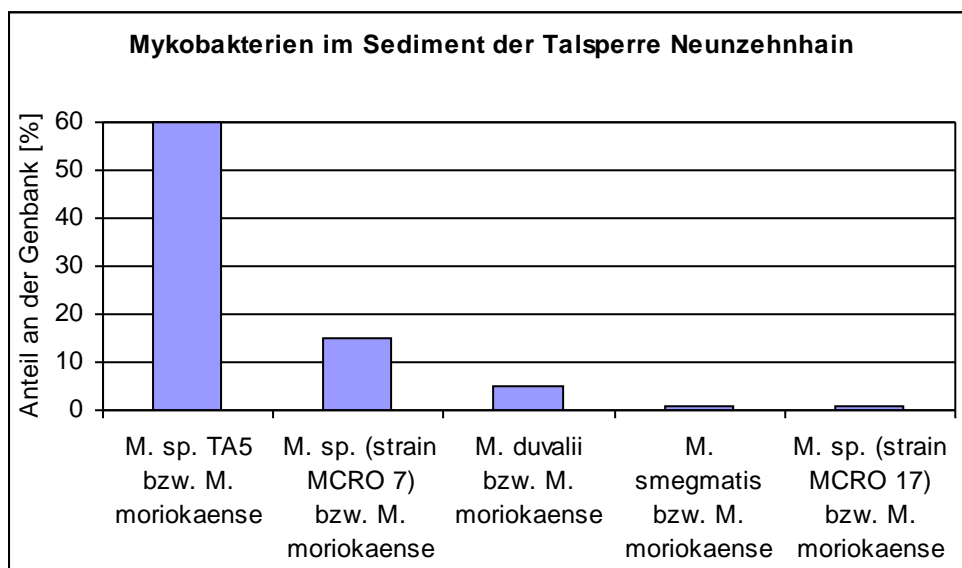


Abbildung 44 Zusammensetzung der Mykobakterien-16S rDNA-Bibliothek von Neunzehnhain

IV. 4. 1. 5 Mykobakterien im Vergleich der Talsperren

In den Talsperrensedimenten konnten verschiedene mykobakterielle Sequenzen detektiert werden, wobei Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Sequenzspektrum zwischen den Talsperren sichtbar wurden.

Wiederholt nachgewiesene Sequenzen waren *Mycobacterium* sp. strain MCRO 7 und *Mycobacterium moriokaense* in Neunzehnhain, Quitzdorf und Saidenbach. *Mycobacterium* sp. TA5 wurde in Quitzdorf und Neunzehnhain identifiziert. Die dominierenden Sequenzen in den Talsperren stellten *Mycobacterium* IWGMT 90093 in Saidenbach, *Mycobacterium malmoense* in Muldenberg, *Mycobacterium* sp. strain MCRO 7 in Quitzdorf und *Mycobacterium* sp. TA5 in Neunzehnhain dar. Die größte Anzahl (12) unterschiedlicher Sequenzen wurde in Saidenbach gefunden, in Quitzdorf betrug die Zahl der verschiedenen Sequenzen 5, 4 in Neunzehnhain und Muldenberg wies das geringste Sequenzspektrum auf.

Die in den Talsperren gefundenen Sequenzen zeigten Homologien von 96% bis über 99%. Sequenzhomologien unter 97% weisen auf weitere, bisher nicht charakterisierte aber eng verwandte Spezies hin. Diese Beobachtung unterstreicht die Tatsache, dass die mit molekularen Techniken aus natürlichen Ökosystemen erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen nur selten mit Sequenzen bekannter, kultivierbarer Bakteriespezies übereinstimmen (SCHUPPLER 1995).

Aus dem Vergleich mykobakterieller 16S rDNA-Sequenzen aus den Talsperren lassen sich keine Zusammenhänge zwischen dem Auftreten bestimmter Mykobakterienspezies und dem Trophiegrad

der untersuchten Gewässer ableiten. Die in den 16S rDNA-Bibliotheken repräsentierten Sequenzen belegen das ubiquitäre Vorkommen vieler Mykobakterien. Das in dieser Untersuchung gefundene Spektrum an Mykobakterien zeigt, dass auch Gewässersedimente ein Reservoir für fakultativ pathogene Mykobakterien darstellen und damit im Falle einer Resuspension der Sedimente und der enthaltenen Mikroorganismen ein Gefährdungspotential bergen.

Mykobakterien können aufgrund ihres Pathogenitätspotentials in drei Risikogruppen eingeteilt werden:

Risikogruppe I: ubiquitäre, saprophytäre Mykobakterien

Risikogruppe II: fakultativ pathogene Mykobakterien

Risikogruppe III: obligat pathogene Mykobakterien.

Der Nachweis von obligat pathogenen Mykobakterien bedeutet immer eine Erkrankung, fakultativ pathogene Mykobakterien spielen besonders bei Infektionen von immungeschwächten Personen eine große Rolle. Die in den 16S rDNA-Genbibliotheken der untersuchten Talsperren identifizierten Spezies beinhalten Mykobakterien der Risikogruppen I und II, es handelt sich um saprophytäre oder fakultativ pathogene Vertreter. Die Tabelle 14 verdeutlicht die Einordnung der Spezies in die Risikogruppen. Diese Tabelle ist jedoch nicht vollständig, da die Identifizierung und Einordnung vieler Umweltbakterien in Hinblick auf ihre Pathogenität bisher noch nicht erfolgt ist.

Tabelle 14 Einteilung der Mykobakterien in Risikogruppen (BÖTTGER 1991)

Risikogruppe I	Risikogruppe II	Risikogruppe III
<i>M. fallax</i> , <i>M. flavescens</i> ,	<i>M. avium</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. xenopi</i> ,	<i>M. bovis</i> , <i>M. leprae</i> ,
<i>M. nonchromogenicum</i> ,	<i>M. haemophilum</i> , <i>M. asiaticum</i> ,	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. ulcerans</i>
<i>M. gastri</i> , <i>M. gordonae</i> ,	<i>M. kansasii</i> , <i>M. intracellulare</i> ,	
<i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> ,	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. malmoense</i> ,	
<i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i>	<i>M. marinum</i> , <i>M. scrofulaceum</i> ,	
	<i>M. shimoidei</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i>	

Viele ubiquitäre oder nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) sind freilebende Saprophyten, welche in verschiedenen Umwelthabitaten wie Wasser, Staub, Boden oder Luft nachgewiesen werden können (FALKINHAM 1996, MENDUM 2000). Sie besitzen die Fähigkeit der Persistenz und Vermehrung im Wasser und können aus Wasseraufbereitungsanlagen in der ganzen Welt isoliert werden (COVERT 1999). Ihre Resistenz gegenüber Desinfektionstechniken im Trinkwasserbereich oder Schwermetallen ist bekannt, wie auch die Toleranz gegenüber einem weiten Temperaturbereich, pH-Schwankungen, Salz- und Sauerstoffkonzentrationen (FALKINHAM 1996). Demnach ist die Physiologie der Mykobakterien entscheidend für ihre Ökologie und weite geographische Verbreitung. Besonders die schnell wachsenden NTM besitzen die Fähigkeit, weit in der Umwelt verbreitete Substanzen (Alkane, Benzene, Huminsäuren, PAK, Pyren, Trichlorethylen, Propan, Vinylchloride) abzubauen (FALKINHAM 1996).

In den letzten Jahren war eine Häufigkeitsverschiebung und ein Anstieg der mykobakteriellen Erkrankungen auslösenden Spezies von den obligat zu den fakultativ pathogenen Mykobakterien zu beobachten (FALKINHAM 1996, KIRSCHNER 1993, MENDUM 2000). Die durch NTM (*M. avium* und *M. intracellulare*) verursachten Infektionen waren ursprünglich Lungenerkrankungen. Mit dem Beginn

der AIDS-Pandemie und der Zunahme abwehrgeschwächter Personen erkrankten 25-50% der Patienten in Europa und den USA an weiteren nicht-tuberkulösen Mykobakterien (FALKINHAM 1996). Die Umwelt (Wasser, Boden) spielt dabei als hauptsächliche Infektionsquelle eine große Rolle (BÖTTGER 1995, COVERT 1999, MENDUM 2000). Die Krankheitsbilder beschränken sich nicht mehr auf die Lunge sondern es findet ein Befall unterschiedlichster Organe (Lymphknoten, Haut, Gewebe, Knochen, Gelenke) statt. Die Chemotherapie in der Behandlung dieser Erkrankungen ist wenig effektiv, da viele NTM resistent sind gegenüber zahlreichen Antibiotika (FALKINHAM 1996). Die Resistenz basiert bei langsam wachsenden Mykobakterien auf der Produktion von Proteinen, Pigmenten oder Polysacchariden, welche die Aktivität der eingesetzten Antibiotika beeinträchtigen (FALKINHAM 1996). Weiterhin stellen die meisten Mykobakterien intrazelluläre Pathogene dar und sind somit schwer angreifbar für Antibiotika. Darüber hinaus sind immungeschwächte Personen oft mit mehr als einer Mykobakterienspezies infiziert (FALKINHAM 1996).

Aufgrund des vermehrten Auftretens von NTM-Infektionen sind Nachweismethoden gefragt, welche einen schnellen Nachweis und Identifikation sowie eine hohe Wiederfindungsrate garantieren. Obwohl Selektivmedien zur Kultivierung von Mykobakterien zur Verfügung stehen, sind sie kaum für die Anzucht von NTM geeignet (KAMALA 1994, FALKINHAM 1996). Molekularbiologische Techniken wie die PCR stellen daher für den schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweis nicht-tuberkulöser Mykobakterien ein wichtiges diagnostisches Werkzeug dar.

IV. 4. 2 Der Nachweis von Enterobakterien

Die Familie der *Enterobacteriaceae* stellt die wichtigste Bakterienfamilie in der Humanmedizin dar. Sie umfaßt Gattungen und Spezies, welche definierte, mit typischer klinischer Symptomatik einhergehende Krankheiten verursachen (Typhus, Ruhr, Pest), sowie viele Opportunisten, die vor allem nosokomiale Infekte (Harnwegs- und Wundinfekte, Pneumonien) hervorrufen. Das natürliche Habitat von Enterobakterien ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Neben der fäkal-oralen Schmierinfektion stellt kontaminiertes Wasser das wichtigste Übertragungsmedium für bakterielle Krankheitserreger dar (KAYSER 1998). Die Beurteilung der Trinkwasserqualität basiert auf dem Nachweis von *E. coli*, coliformen Bakterien und Enterokokken (Fäkalstreptokokken) als Indikatorkeime für eine fäkale Verunreinigung (FRICKER 1994, KUHLMANN 2000, SCHLEGEL 1992).

IV. 4. 2. 1 Der molekularbiologische Nachweis von Enterobakterien

Bei der Untersuchung der Sedimente auf das Vorkommen von Enterobakterien wurde jeweils der Gesamthorizont jeder Talsperre analysiert.

Nach mechanischem Zellaufschluss und der Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus den Sedimenten erfolgte eine *Enterobacteriaceae*-spezifische Amplifikation auf der Grundlage der 16S rDNA. Aus dem Ergebnis der Gelelektrophorese wurde auf das Vorkommen von Enterobakterien geschlossen. In allen untersuchten Sedimenten konnten Enterobakterien nachgewiesen werden. Allerdings ermöglicht die PCR nur eine pauschale Aussage über das Vorkommen von Enterobakterien. Eine genauere Einordnung der vorliegenden Arten wurde im molekularbiologischen Ansatz nicht

durchgeführt, da die Identifizierung von enterobakteriellen Spezies auf der Basis der 16S rDNA wenig Erfolg verspricht. Die Mitglieder der *Enterobacteriaceae* weisen in der Sequenz ihrer 16S rDNA sehr große Ähnlichkeiten auf, sie sind partiell sogar identisch. Beispielsweise sind *E. coli* und *Shigella* sp. in ihrer 16S rDNA-Sequenz nahezu nicht unterscheidbar.

Anhand des PCR-Ergebnisses konnte daher nicht bestimmt werden, ob es sich um Indikatoren für fäkale Verunreinigungen handelt oder um evtl. ubiquitär in Gewässern vorkommende Vertreter der Enterobakterien. Um die entsprechenden Spezies molekularbiologisch zu identifizieren, wären weitergehende Untersuchungen erforderlich gewesen, beispielsweise auf der Grundlage von weniger konservierten Bereichen der DNA (z.B. die intergene Spacer Region zwischen der 16S und der 23S rDNA) oder Hybridisierungen mit Spezies-spezifischen Primern. Da mit der PCR keine Aussagen über die hygienische Relevanz der Organismen getroffen werden konnten, erfolgte eine weitergehende Charakterisierung der vorkommenden Arten der *Enterobacteriaceae* mittels Kultivierung und biochemischer Identifizierung.

IV. 4. 2. 2 Die Kultivierung und Identifikation von Enterobakterien im Talsperrenvergleich

Die mikrobiologische Untersuchung von Gewässern oder Talsperren beschränkte sich bisher auf die Analyse des Wasserkörpers, es liegen keine Daten über das Vorkommen von Enterobakterien in Sedimenten vor. Nach den positiven Ergebnissen in der PCR bestand daher die Frage, ob aus dem Sediment vitale, vermehrungsfähige Enterobakterien durch Kultur nachgewiesen werden können und welche Spezies dominieren.

Vertreter der *Enterobacteriaceae* waren sehr gut auf spezifischen Selektivnährböden (Endo-, Leifson-Agar, Winkle-Platten etc.) kultivierbar. Die Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) verschiedener Kolonien konnten aufgrund unterschiedlicher Morphologie ermittelt werden und zur Identifizierung wurde eine biochemische Differenzierung mittels API 20E-System (Biomerieux) durchgeführt. Zur Analyse wurde jeweils der Gesamthorizont folgender Probenahmen eingesetzt: Saidenbach 4, Quitzdorf 4, Muldenberg 3 und Neunzehnhain 4.

Aeromonas hydrophila und Spezies der Gattung *Enterobacter* konnten in allen Talsperren identifiziert werden, in Quitzdorf, Saidenbach und Neunzehnhain wies *A. hydrophila* die höchsten Keimzahlen auf. Dieses Bakterium wird in die Familie der *Vibrionaceae* eingeordnet und ist ein Oxidase positives, bewegliches Stäbchen. *A. hydrophila* wird häufig in Oberflächengewässern, Abwasser, Böden oder Lebensmitteln nachgewiesen, ist aber auch als Besiedler von Feuchtbereichen medizinischer Apparaturen bekannt (HANDFIELD 1996, KAYSER 1998, KROVACEK 1994, KÜHN 1997, WOHLFARTH 2001). Als fakultativ pathogener Organismus kann *A. hydrophila* ein potentielles Infektionsrisiko darstellen, da es die Standard-Chlorung bei der Wasseraufbereitung zu überstehen vermag und daher oft im Trinkwasser vorkommt (HANDFIELD 1996, CASCON 1996). Die aus Umweltproben leicht zu isolierenden Bakterien besitzen verschiedene Virulenzfaktoren wie Hämolysin-, Zytotoxin- und Enterotoxinaktivität, welche die Ursachen für Krankheitsbilder wie Gastroenteritis, Endokarditis, Meningitis, Pneumonie oder Wundinfektionen insbesondere bei abwegeschwächten Patienten, Kindern und älteren Menschen darstellen (HANDFIELD 1996, KROVACEK 1994).

Vertreter der Gattung *Enterobacter* wie *E. cloacae*, *E. agglomerans* und *E. aerogenes* kommen im Wasser, Abwasser, Boden, Pflanzen und im Intestinaltrakt von Mensch und Tier vor. Sie sind beweglich und zeigen häufig Resistenzen gegenüber Antibiotika (KRIEG 1984). Bei immungeschwächten oder hospitalisierten Patienten kann eine Infektion, z.B. ausgelöst durch kontaminiertes Wasser oder Lebensmittel, zu Harnwegs-, Atemwegs- oder Hauterkrankungen führen (KAYSER 1998).

Serratia liquefaciens konnte ausschließlich in Neunzehnhain in hohen Keimdichten nachgewiesen werden. Dieses Bakterium kommt ubiquitär in der Umwelt vor und kann besonders bei abwehrgeschwächten Personen opportunistische und nosokomiale Infektionen hervorrufen (KRIEG 1984). Das Sediment von Quitzdorf wies im Gegensatz zu den anderen Talsperren hohe Anzahlen an *Leclercia adecarboxylata* auf. *L. adecarboxylata* ist eine neue Spezies innerhalb der *Enterobacteriaceae*. Das Bakterium wurde erstmals 1962 von Leclerc als bewegliches, gram-negatives Stäbchen beschrieben und als *Escherichia adecarboxylata* bezeichnet (KRIEG 1984, TEMESGEN 1997). *Leclercia* wurde bisher hauptsächlich von Patienten mit Wundinfektionen und Pneumonien isoliert, konnte aber auch in Umweltproben nachgewiesen werden.

Vibrio fluvialis wurde nur in Saidenbach und Neunzehnhain detektiert. Dieser zur Familie der *Vibrionaceae* gehörende Organismus ist ein typisch gebogenes, Oxidase positives, bewegliches Stäbchen. Es ist weit verbreitet und wird häufig in Assoziation mit Wassertieren gefunden (CHAKRABORTY 1997). Als fakultativ pathogenes Bakterium kann es bei Menschen Diarrhoe verursachen (AHSAN 1988, BRENNER 1983, RAHMAN 1992). Weitere in geringen Anteilen identifizierte Spezies waren *Citrobacter freundii* in Quitzdorf, *Hafnia alvei* in Muldenberg und *E. coli* in Neunzehnhain. *C. freundii* und *H. alvei* kommen im Darm von Mensch und Tier vor, sind aber auch im Wasser, Abwasser und Boden weit verbreitet (KRIEG 1984). *C. freundii* ist unbeweglich, kann Citrat als einzige C-Quelle verwenden und ist in der Lage, opportunistische, nosokomiale Infekte zu verursachen (KAYSER 1998). *H. alvei* kann Atemwegs- und Harnwegsinfektionen bei immunsupprimierten und hospitalisierten Patienten auslösen. Der natürliche Lebensraum von *E. coli* ist der Darmtrakt von Mensch und Tier, daher gilt *E. coli* als Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen von Gewässern. Das Bakterium ist Oxidase negativ, beweglich und der häufigste Erreger bakterieller Infekte des Menschen. Sein Pathogenitätspotential entfaltet sich besonders bei abwehrgeschwächten Personen. *E. coli* kann extraintestinale (Harnwegsinfekte, Sepsis) und intestinale Infekte verursachen, die durch enteropathogene (EPEC), enterotoxische (ETEC), enteroinvasive (EIEC) und enterohämorrhagische (EHEC) Pathovaren hervorgerufen werden (KAYSER 1998).

Neben den Enterobakterien dominierte in den Isolaten *Pseudomonas fluorescens*/*P. putida* in Muldenberg. Pseudomonaden wurden ebenfalls aus dem Sediment von Neunzehnhain angezüchtet. Diese ubiquitär verbreiteten Bakterien stellen keine eigene taxonomische Kategorie dar, sie beinhalten physiologisch hochspezialisierte Bakterien. Pseudomonaden sind sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen und können bei abwehrgeschwächten Personen nosokomiale Infekte wie Pneumonien, Hautinfektionen, Endokarditiden oder Sepsis verursachen (KAYSER 1998). Für die Pathogenese spielen Exo- und Zytotoxine als Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle.

Die mit Hilfe des Computerprogrammes zur API-Identifizierung ermittelten Spezieszuordnungen und prozentualen Wahrscheinlichkeiten zeigten zum größten Teil sehr sichere Resultate. In einigen Fällen

wurden Spezies mit geringer prozentualer Übereinstimmung eingeordnet. Das beruht auf teilweise untypischen biochemischen Reaktionen im API und damit schwer ablesbaren und auswertbaren Streifen. Ursprünglich wurde das API-System zur Identifizierung von medizinisch relevanten Bakterien entwickelt, welche typische Reaktionen im API zeigen. Die Bestimmung von Bakterien aus Umweltproben ist mit dem API 20E-System problematischer, da mögliche in der Umwelt vorkommende, fakultativ oder nicht pathogene Organismen nicht im Auswertungsschema berücksichtigt werden (HOLMES 1992). Eine alternative Möglichkeit zur Identifizierung und Typisierung von Enterobakterien wäre die Technik der eindimensionalen SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese), welche Spezies-spezifische Proteinmuster liefert (HOLMES 1992). Jedoch wurde auch mit dieser Methode das mikrobielle Spektrum in Umweltproben noch nicht aufgeklärt und demnach steht nur ein kleiner Anteil der vorkommenden Mikroorganismen als Proteinmuster für vergleichende Studien zur Verfügung.

Im Sediment der Talsperre Quitzdorf wären Vorkommen von *E. coli* oder *Enterobacter* sp. als Anzeiger für eine fäkale Verunreinigung zu erwarten gewesen, da es sich um ein eutrophes Gewässer handelt, dessen Einzugsgebiet durch intensive landwirtschaftliche Nutzung gekennzeichnet ist. *E. coli* wurde aber nur in Neunzehnhain gefunden. *Enterobacter* sp. wurde hingegen in allen untersuchten Sedimenten nachgewiesen. Der Nachweis von *Enterobacter* in oligotrophen Talsperren wie auch die Abwesenheit von *E. coli* im Sediment von Quitzdorf weisen darauf hin, dass kein Zusammenhang zwischen dem Trophiegrad und dem Spektrum identifizierter Enterobakterien besteht. Neben *Enterobacter* sp. wurde auch *Aeromonas hydrophila* in allen untersuchten Sedimenten gefunden, was die ubiquitäre Verbreitung dieses fakultativ pathogenen Bakteriums demonstriert.

Die ermittelten Keimzahlen an Enterobakterien lassen eine Beziehung zum Trophiegrad der Talsperren vermuten (WOHLFARTH 2001). Für die oligotrophe Talsperre Neunzehnhain wurden KbE-Werte zwischen 100 KbE/ml und 3300 KbE/ml ermittelt. Die oligotrophe, jedoch versauerte und gering besiedelte Talsperre Muldenberg zeigte ähnliche Werte zwischen 100 KbE/ml und 2800 KbE/ml. Etwas höhere Koloniezahlen (100-10600 KbE/ml) wurden für die mesotrophe Talsperre Saidenbach festgestellt, deren Einzugsgebiet von Landwirtschaft und Tierhaltung geprägt ist. Die höchsten Keimzahlen wurden im Sediment der eutrophen Talsperre Quitzdorf gefunden. Die Werte für diese Talsperre, deren Umgebung durch intensive Landwirtschaft, Großviehhaltung und dichte Besiedlung charakterisiert ist, schwankten zwischen 300 KbE/ml und 28000 KbE/ml. Die Werte für die oligo- bzw. mesotrophen Talsperren lagen damit um einen Faktor von 10^{-2} unter den Keimzahlen von Quitzdorf.

Die Ergebnisse des mikrobiologischen wie auch molekularbiologischen *Enterobacteriaceae*-Nachweises verdeutlichen ein ubiquitäres Vorkommen dieser Bakterien in den Talsperrensedimenten. Das ermittelte Keimspektrum zeigte eine unterschiedliche Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Talsperre und es handelte sich bei den meisten Enterobakterien um fakultativ pathogene Spezies. Während kein Zusammenhang zwischen den identifizierten Bakterienspezies und dem Trophiegrad der Talsperren ersichtlich war, konnte zwischen den KbE-Werten und der Trophie eine Korrelation festgestellt werden.

IV. 4. 3 Der molekularbiologische Nachweis von Legionellen

Legionellen sind ubiquitär in feuchten Biotopen, besonders in Warmwasserbereichen, wie Abwasserbehandlungsanlagen, Warmwassersystemen, Kühltürmen, Klimaanlage und Sprudelbädern nachweisbar (KAYSER 1998). Als fakultativ intrazelluläre Bakterien in Amöben sind sie zu einem gewissen Grad gegen Chlorung oder Erhitzung in Wassersystemen geschützt. Durch Inhalation erregerrhaltiger Wassertröpfchen können Legionellen verschiedene Krankheitsbilder verursachen, vor allem bei älteren und immungeschwächten Personen.

Neben einer aufwendigen und langwierigen Kultivierung auf Spezialnährmedien gewinnt heute der sensitive und spezifische Nachweis mittels PCR eine immer größere Bedeutung (CLOUD 2000, JONAS 1995, PALMER 1993, VESEY 1992). In dieser Arbeit wurde ein semi-nested PCR-System zum molekularbiologischen Nachweis von Legionellen in den Talsperrensedimenten eingesetzt. In allen untersuchten Sedimenten konnten keine Legionellen nachgewiesen werden.

Es war vorstellbar, dass Legionellen in die Talsperren eingespült werden und sich in den Sedimenten ablagern. Aufgrund der dort herrschenden, für die Legionellen ungenügenden Umweltbedingungen und der geringeren Zahl an Amöben erfolgt aber vermutlich keine Vermehrung, so dass die Anzahl an Legionellen im Sediment der Talsperren zu niedrig ist, um einen Nachweis zu ermöglichen. Der starke Verdünnungseffekt der in die Talsperren eingetragenen Legionellen, sowie die Untersuchung relativ kleiner Probenvolumina erschweren zusätzlich einen Nachweis. Den Verdünnungseffekt verdeutlichen Studien, in denen nur durch Filtration größerer Wassermengen (1-10 l) und anschließender PCR Legionellen in Umweltproben detektiert werden konnten (VESEY 1992).

IV. 4. 4 Nachweis von Protozoen

In den letzten Jahren sind Parasiten als neue Gruppe von Krankheitserregern, welche durch Wasser übertragen werden können, in den Blickpunkt des Interesses gelangt. Mit dem Giardien-Ausbruch Mitte der 70er Jahre in Roma NY wurde die Rolle von pathogenen Protozoen in den USA erkannt. Heute gelten Giardien und Cryptosporidien in den USA als die wichtigsten mit dem Wasser übertragbaren Krankheitserreger. Besonders in Entwicklungsländern ist die Giardiose weit verbreitet (KAUCNER 1998, MAYER 1996, ROCHELLE 1997). Seit Ende der 80er Jahre wird auch über Zwischenfälle aus England und einigen anderen europäischen Staaten berichtet. 1982 wurde erstmals über einen Toxoplasmen-Ausbruch berichtet, bei dem 39 von 98 Soldaten einer Einheit nach dem Genuss von Oberflächenwasser bei einer Feldübung erkrankten. Ein Ausbruch durch Toxoplasmen, bei dem die Erreger mit dem Wasser einer öffentlichen Wasserversorgung übertragen wurden, ereignete sich 1994/95 in Kanada. Erst seit dem Cryptosporidien-Ausbruch in Milwaukee 1993 haben die Parasiten auch in Deutschland eine größere Aufmerksamkeit gewonnen.

Die Kontamination der Gewässer beruht meist auf einer direkten fäkalen Verunreinigung durch Einleitung behandelter und unbehandelter Abwässer oder dem Abspülen landwirtschaftlicher Nutzflächen (FRANZEN 1999, MEDEMA 1998). Bei jedem Ausbruch, bei dem ein Hinweis auf die Quelle der Kontamination vorliegt, wird ein direkter Bezug zum Eintragungsschwerpunkt gesucht (Tabelle 15). Darüber hinaus wird im Zusammenhang mit den Ausbrüchen immer wieder auf besondere

Ereignisse wie starke Regenfälle, Hochwasser, Eintrag von Oberflächen- oder Abwasser in Brunnen hingewiesen. Eine weitere Gefahr besteht in der Ablagerung von eingetragenen Parasiten im Gewässersediment und der Freisetzung in den Wasserkörper durch Resuspensionsprozesse (WOHLFARTH 2001).

Tabelle 15 Ursachen für die trinkwasserbedingten Ausbrüche durch *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* und *Toxoplasma gondii* mit 100 und mehr Betroffenen bis 1999 (Bundesgesundheitsblatt)

Ursachen für die Ausbrüche	Anzahl der Ausbrüche		
	<i>G. lamblia</i> (nach 1954)	<i>C. parvum</i> (nach 1984)	<i>T. gondii</i> (1994)
GESAMT	29	37	1
Kontamination von Trinkwasser	3		
Fehler in der Aufbereitung bzw.unzureichende Aufbereitung	16	13	1
Verwendung von desinfiziertem aber nicht filtriertem Wasser	6		
Kontamination von Grundwasser (Brunnen)	1	4	
unzureichende Desinfektion	1		
Rückführung von Filterrückspülwasser ins Rohwasser		1	
ohne Angabe	7	19	

Microsporidien wurden Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt und können ein breites Spektrum an Vertebraten und Invertebraten infizieren. Bis 1985 wurden nur acht Fälle einer Microsporidieninfektion beim Menschen beschrieben. Seit Beginn der HIV-Pandemie werden diese Parasiten als opportunistische Erreger bei HIV-infizierten Patienten, immunsupprimierten Patienten sowie Reisenden aus tropischen und subtropischen Gebieten beobachtet.

Auch in Deutschland zählen Microsporidien zu den häufigsten Durchfallkeimen. Sie können in rund einem Drittel aller Patienten und in zwei Drittel aller HIV-Patienten mit chronischen Diarrhoen nachgewiesen werden (SOBOTTKA 1998). Auch Cryptosporidien-Infektionen sind in den vergangenen Jahren durch das Aufkommen von AIDS und der erhöhten Anzahl von HIV-Patienten drastisch angestiegen (DOWD 1998, MARSHALL 1997, MÜLLER 1999, KAYSER 1998, PIENIAZEK 1999). Ein weiteres Infektionsrisiko abwehrgeschwächter Patienten stellen Toxoplasmen dar (KAYSER 1998). Diese Protozoen zeichnen sich aus durch ein ubiquitäres, weltweites Vorkommen und eine geringe Wirtsspezifität. Die Übertragung erfolgt durch kontaminiertes Wasser oder Lebensmittel (CHOI 1997, KAYSER 1998).

Um Risiken durch pathogene Protozoen in den Talsperren abzuschätzen und um zu prüfen, ob sich die Organismen im Sediment absetzen und akkumulieren können, wurden alle Sedimentproben aus 2000 (alle Horizonte) auf das Vorhandensein von Parasiten untersucht. Der Nachweis erfolgte mit einem umfangreichen Methodenspektrum.

IV. 4. 4. 1 Die Rolle der Protozoen bei der Abwasser- und Trinkwasseraufbereitung

Grundwasser, Oberflächenwasser und unbehandeltes Abwasser stellen potentielle Infektionsquellen für Microsporidien dar (DOWD 1998, MARSHALL 1997). Microsporidien besitzen die Größe von Bakterien und werden von herkömmlichen Filtern zur Trinkwasseraufbereitung nicht zurückgehalten. Langsamsandfilter und künstliche Infiltration können Alternativen der Wasseraufbereitung darstellen (DOWD 1998). Daher sind sensitive Nachweismethoden für Microsporidien in Zukunft von großer Bedeutung.

Die Zysten von Giardien haften während der Abwasserbehandlung und in Oberflächenwässern mit Abwassereinleitung an organisch-biologischen Partikeln (MEDEMA 1998). Aufgrund vieler beschriebener Epidemien ist die Beseitigung der Zysten während der Trinkwasseraufbereitung mit speziellen Filtern, durch Bodenpassage und Desinfektion von äußerster Wichtigkeit. Doch gegen die üblichen Desinfektionsverfahren wie Chlorung, Ozonung oder UV-Verfahren sind die Zysten wesentlich resistenter als Bakterien. Andere Aufbereitungsverfahren wie Flockung und Filtrationstechniken entfernen die Zysten sehr gut.

Während der Abwasserbehandlung haften Cryptosporidien-Oozysten an organischen Partikeln (MEDEMA 1998). Da die Oozysten sehr klein sind, können sie herkömmliche Filtersysteme in Aufbereitungsanlagen passieren. Sie sind gegen die Desinfektionsmittel Chlor, Chlordioxid und Ozon resistent, was ihre vollständige Beseitigung während der Trinkwasseraufbereitung verhindert (JOHNSON 1995, SISCHO 2000). Flockung und Langsamsandfiltration sind sehr gut geeignet zur Eliminierung der Protozoen. Durch Erhitzen über 65 °C für 5-10 min, Gefrieren oder Trocknung sind die Oozysten von *C. parvum* vollständig inaktivierbar.

Um sicherzustellen, dass sich keine Toxoplasmen im Trinkwasser befinden, darf das Wasser während der Aufbereitung nicht nur desinfiziert werden, sondern es müssen zusätzlich Filter mit einer Porengröße unter 10 µm eingesetzt werden.

IV. 4. 4. 2 Nachweismethoden für Protozoen

Zum Nachweis von Microsporidien werden in der Klinik Stuhlproben traditionell mit verschiedenen Färbemethoden (GRAM-Färbung, GIEMSA-Färbung, modifizierte Trichrom-Färbung) gefärbt (MARSHALL 1997). Mehr und mehr finden jedoch der Western Blot oder molekularbiologische Methoden wie PCR oder Gensonden Anwendung zum Nachweis von Microsporidien (DOWD 1998, MARSHALL 1997, MÜLLER 1999). Die PCR bietet neben ihrer Sensitivität und Spezifität vor allem die Möglichkeit einer Spezies-Identifizierung.

Der Nachweis von Giardien ist für die Kontrolle von Trinkwasser und Badeseen von großer Bedeutung, doch es herrscht ein Mangel an effektiven, schnellen und präzisen Nachweismethoden (MAYER 1996). Um die geringe Anzahl von Zysten in Wasserproben nachweisen zu können, müssen oft große Mengen an Wasser (100-1000 l) filtriert werden, um eine Konzentrierung zu erreichen (KAUCNER 1998). Moderne Nachweisverfahren wie die Flowzytometrie, immunomagnetische Separation, Enzymimmunoassays, direkte Fluoreszenzfärbung und PCR sollen die Detektion verbessern

(MARSHALL 1997, ROCHELLE 1997). Für die Untersuchung von Sedimenten steht kaum Literatur zur Verfügung.

Um die Risiken von Cryptosporidien-Infektionen abzuschätzen, muss eine mögliche Resuspension der Cryptosporidien aus dem Sediment kalkulierbar oder auszuschließen sein. Dazu sind Untersuchungen des Sedimentes notwendig. Um Wasserproben auf das Vorkommen von Cryptosporidien zu untersuchen, ist auch hier die Filtration großer Wassermengen erforderlich (KAUCNER 1998). Herkömmliche Nachweismethoden wie die Mikroskopie und Immunfluoreszenz sind wenig sensitiv und zeitintensiv (JOHNSON 1995). Neben Western Blot und RAPD bieten alternative Methoden wie die PCR die Vorteile der Spezifität, Sensitivität und Effektivität, deshalb wurde sie -neben dem Immunoassay- als Nachweisverfahren der Cryptosporidien in Sedimenten gewählt (MARSHALL 1997, PIENIAZEK 1999, ROCHELLE 1997).

Um die Risiken einer durch Trinkwasser ausgelösten Toxoplasmose abzuschätzen, ist die Untersuchung nicht nur des Wassers, sondern auch des Sedimentes erforderlich, um mögliche Resuspensionen und damit Trinkwasserkontaminationen abschätzen zu können. Die Filtration von 700-1000 l Wasser mit anschließender Oozysten-Detektion (Latex-Agglutination, ELISA) ist ein bewährter, klassischer Nachweis der Toxoplasmen in der Wasseranalyse (ISAAC-RENTON 1998, CHOI 1997).

IV. 4. 4. 2. 1 Lichtmikroskopischer Nachweis

Zum lichtmikroskopischen Nachweis von Cryptosporidien, Microsporidien und Giardien wurden vier Parallelproben jeder Sedimentprobe SAF-fixiert und gefärbt. Die Untersuchung der Sedimentproben der einzelnen Talsperren mit Hilfe der Mikroskopie war stets negativ, es konnten mittels dieser Technik keine Cryptosporidien, Microsporidien oder Giardien in den Talsperrensedimenten nachgewiesen werden. Die Kontrollmaterialien (Positivproben) wurden parallel dazu behandelt. Weiterhin wurden die Konzentrationen an Zysten/Oozysten im Positivmaterial bestimmt, um anschließend in der PCR Nachweisgrenzen zu ermitteln.

Im Kontrollmaterial C1 und C2 für Cryptosporidien waren die 4-6 µm großen, ovalen, mittels ZIEHL-NEELEN-Färbung rot gefärbten Oozysten im mikroskopischen Bild deutlich zu erkennen und von anderen Strukturen und Partikeln gut zu unterscheiden. In 1 µl des Kontrollmaterials C1 wurden 15 Oozysten und in 1 µl C2 1 Oozyste detektiert. Die Mikroskopie ist demnach geeignet zum Nachweis von Protozoen. Die negativen Ergebnisse im Sediment können auf zu geringe Konzentrationen an Erregern zurückgeführt werden.

IV. 4. 4. 2. 2 Der Nachweis von Cryptosporidien und Giardien mittels ELISA

Der Nachweis von Giardien und Cryptosporidien im Gesamthorizont erfolgte durch die Detektion der spezifischen Antigene GSA 65 (Giardien) und CSA (Cryptosporidien) in Enzymimmunoassays. Mit dem ELISA konnten keine Cryptosporidien oder Giardien in den Sedimentproben nachgewiesen werden. Für beide Parasiten wurden mit Kontrollmaterialien positive Ergebnisse im ELISA erzielt, was verdeutlicht, dass ein Nachweis dieser Organismen mittels Enzymimmunoassay möglich ist.

IV. 4. 4. 2. 3 Der molekularbiologische Nachweis von Protozoen

Untersuchungsmaterialien enthalten meist nur geringe Anzahlen an Zysten oder Oozysten. Klassische Methoden zum Nachweis erweisen sich häufig als wenig sensitiv. Auf der Grundlage der spezifischen Amplifikation von Genen der Protozoen wird es möglich, eine Nachweismethode mit hoher Effizienz und Sensitivität anzuwenden.

Der molekularbiologische Nachweis von Cryptosporidien basiert auf der spezifischen Amplifikation des Genabschnittes des Oozystenprotein CpR1. Zur Anwendung im Sedimentbereich wurde ein publiziertes PCR-System (CPF/CPR) etabliert und evaluiert (LABERGE 1996). Besonderes Interesse bestand in der Ermittlung der Nachweisgrenze als Maß für die Sensitivität. LABERGE beschreibt die Detektion von 1-10 Oozysten in Rohmilch (WOHLFARTH 2001).

Aus den Kontrollmaterialien C1 und C2 wurde die DNA extrahiert und in die PCR eingesetzt. Aus der Mikroskopie waren die Anzahlen der Oozysten bekannt und für den PCR-Ansatz wurden die einzusetzenden Genomäquivalente berechnet. Begonnen bei Genomäquivalenten von 15 Oozysten wurde bis eine Oozyste in die PCR eingesetzt. Dabei konnte eine ca. zehnfach höhere Anzahl Oozysten in C1 gegenüber C2 bestätigt werden. Eine Oozyste, bzw. ein Genomäquivalent entsprach der 10^{-3} Verdünnung des DNA-Eluates aus C1 und der 10^{-2} Verdünnung des Eluates C2. Weiterhin wurde eine Nachweisgrenze von 1 Oozyste ermittelt.

Dieses Ergebnis belegt eine sehr hohe Sensitivität für den Cryptosporidien-Nachweis mittels PCR bei dem verwendeten PCR-System, es kann bis zu einer einzigen Oozyste erfaßt werden.

Die Untersuchung der Talsperren führte trotz der hohen Sensitivität in allen untersuchten Sedimentproben zu negativen Ergebnissen, korrelierend mit den mikroskopischen und serologischen Resultaten. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass Oozysten von Cryptosporidien in den untersuchten Talsperrensedimenten nicht bzw. in verschwindend geringen Konzentrationen vorhanden waren.

Der Nachweis von Giardien erfolgte mit drei verschiedenen Primersystemen. Der Giardia-spezifische Primer GIA 1F wurde in dieser Arbeit entwickelt.

Analog zur Vorgehensweise im Cryptosporidien-Nachweis wurde in der Mikroskopie die Anzahl der Zysten in 1 µl Kontrollmaterial bestimmt und die Genomäquivalente nach DNA-Extraktion errechnet. In die PCR wurden Genomäquivalente von 100 Zysten, gestaffelt in Zehnerschritten bis 10 Zysten und 9 bis eine Zyste eingesetzt.

Dabei erwiesen sich die Primersysteme ABB 97F/ABB 220R und GGL/GGR mit geringer Sensitivität, nur geeignet zum Nachweis von hohen Zystenkonzentrationen bis 200 Genomäquivalente im PCR-Ansatz. Die Primerkombination GIA 1F/GGR zeigte eine hohe Spezifität und Selektivität. Es konnte im Positivmaterial bis zur Konzentration von 10 Genomäquivalenten ein positives Ergebnis festgestellt werden. Um die Giardien-spezifische Amplifikation nachzuweisen, wurde eine Klonierung des PCR-Produktes angeschlossen. Die Analyse durch Sequenzierung zeigte ein eindeutiges Ergebnis: im Ansatz war ausschließlich *Giardia lamblia* nachzuweisen. Damit konnte die Spezifität des entwickelten Primers sichergestellt werden.

Das *Toxoplasma gondii*-spezifische Gen B1 wurde mittels einer nested PCR amplifiziert. Das aus der ersten Amplifikationsrunde resultierende 220 bp lange Fragment wurde mit innerhalb dieser Sequenz bindenden Primern reamplifiziert und lieferte ein ca. 190 bp langes Fragment (STEUBER 1995). Die verwendeten Primer besitzen nach STEUBER eine hohe Sensitivität zum Nachweis von 1 bis 10 Genomäquivalenten in einer Probe.

Von den Talsperrensedimenten wurde jeweils der Gesamthorizont auf das Vorkommen von Toxoplasmen untersucht. Trotz der hohen Sensitivität des PCR-Systems konnten keine Toxoplasmen in den untersuchten Talsperrensedimenten nachgewiesen werden.

IV. 4. 4. 3 Talsperrensedimente als relevante Protozoen-Reservoirs

Aufgrund der humanpathogenen Relevanz und der Übertragbarkeit mittels Trinkwasser wurden die Talsperrensedimente auf das Vorkommen von Giardien, Cryptosporidien, Microsporidien und Toxoplasmen untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit einem vielseitigen Methodenspektrum. Trotz mikroskopischer, enzymatischer und molekularbiologischer Nachweismethoden mit einer Nachweisgrenze bis zu einer Oozyste in der Probe konnten die Protozoen in den untersuchten Sedimenten nicht nachgewiesen werden.

Ein Vorkommen von Protozoen in den Talsperrensedimenten wäre durchaus denkbar gewesen. Beispielsweise können Microsporidien sporen bei 4 °C Wassertemperatur länger als ein Jahr überdauern (MARSHALL 1997). Den Nachteil bei der Untersuchung von Wasserproben auf Protozoen stellt die aufwendige Konzentration großer Wassermengen durch Filtration dar (DOWD 1998, FRANZEN 1999). Die Sedimente als „Sedimentationsfalle“ könnten demgegenüber eine wesentlich höhere Konzentration an Sporen enthalten.

Das Einzugsgebiet der Talsperre Quitzdorf besteht zum größten Teil aus intensiver Landwirtschaft mit Großviehhaltung und dichter Besiedlung. Daher wäre es wahrscheinlich, im Sediment dieser Talsperre Protozoen zu detektieren. Eine intensive Flächennutzung und landwirtschaftliche Tierhaltung dominieren auch das Einzugsgebiet der Talsperre Saldenbach. Durch das Abspülen landwirtschaftlicher Nutzflächen und fäkale Verunreinigungen von Zuflüssen wurde eine Kontamination des Wasserkörpers und der Sedimente vermutet. Die Vermutungen konnten aber auch mit einem umfangreichen Methodenspektrum nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu Quitzdorf und Saidenbach stellen die Einzugsgebiete der Talsperren Neunzehnhain und Muldenberg unbesiedelte Nadelwaldflächen bzw. kaum besiedelte, forstwirtschaftlich genutzte Flächen dar. Hier waren Vorkommen von Parasiten nur mit geringer Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Diese Erwartung wurde bestätigt, es konnten keine Parasiten nachgewiesen werden.

Die negativen Ergebnisse können wie folgt interpretiert werden:

In der Mikroskopie wird der Nachweis von Protozoen deutlich erschwert durch schlechte Wiederfindungsraten in den Umweltproben, verursacht durch geringe Anzahlen von Parasiten. Weiterhin könnten die Zysten, Oozysten oder Sporen aufgrund ihrer geringen Größe, bzw. durch mangelhafte Kontraste zwischen den Strukturen und anderen gefärbten Partikeln übersehen werden. Die Interferenz mit Algen (laut RODGERS 1995: besonders *Navicula minima*, eine Kieselalge und *Synechococcus elongatus*, ein Cyanobakterium) erschweren die Auswertung. Diese Möglichkeiten bestehen besonders für den Nachweis von Microsporidien. Für Cryptosporidien und Giardien stand Positivmaterial zur Verfügung, in welchem die Protozoen eindeutig nachgewiesen und somit die genannten Fehlerquellen ausgeschlossen werden konnten. Ein wichtiger Punkt ist jedoch, dass den Sedimenten nur kleine Stichproben entnommen wurden und trotz vierfachen Ansatzes nur geringe Volumina untersucht werden konnten.

Aufgrund der hohen Sensitivität von ELISA und PCR weisen die negativen Ergebnisse dieser Analysen darauf hin, dass in den Talsperrensedimenten tatsächlich keine Parasiten-Vorkommen bestehen. Wäre auch nur eine Zyste oder Oozyste in der Sedimentprobe enthalten, hätte man sie mit diesen Methoden nachweisen können.

Daraus schlussfolgernd weisen die Talsperrensedimente höchstwahrscheinlich keine oder nur geringste Konzentrationen der untersuchten Protozoen auf. Demzufolge besteht keine Gefahr für die Trinkwassernutzung bzw. für Badegäste. Möglicherweise findet eine Ablagerung der Parasiten nach Abspülung von Feldern und landwirtschaftlichen Nutzflächen bereits in Zuflüssen der Talsperren oder Bächen statt. Eine Untersuchung der Zuflüsse könnte zeigen, ob die nachweisbare Zahl an Parasiten mit zunehmender Entfernung vom Ursprungsort bis hin zur Talsperre abnimmt. Weiterhin findet eine zusätzliche Verdünnung der Protozoen im Freiwasserkörper statt und erschwert den Nachweis der Parasiten. Diese Aussage wird unterstützt durch die Vorgehensweise beim klassischen Nachweis der Protozoen im Freiwasser (DOWD 1998, ISAAC-RENTON 1998, WOHLFARTH 2001). Das Sediment fungiert als Speicherkörper im Gewässer. Wenn eine Einspülung von Parasiten stattgefunden hätte, wären die Zysten, Oozysten oder Sporen über einen gewissen Zeitraum sedimentiert. Die Untersuchung des Sedimentes ist daher eine effektive und aussagekräftige Analyse. Es können Schlussfolgerungen über zurückliegende Ereignisse und Prognosen für zukünftige Geschehen getroffen werden.

IV. 5 Abschlussdiskussion: Die molekularbiologische Analyse von Talsperresedimenten

Die Charakterisierung von Sedimenten und Identifikation von Bakterien ist ein Punkt allgemeiner Diskussion. Im Vordergrund steht auch hierbei die Anwendung molekularbiologischer Techniken. Für die taxonomische Zuordnung gilt die Bestimmung der Nukleinsäuresequenzen inzwischen vielfach als „ultimatives“ Maß der Charakterisierung. Die Sequenzierung der rRNA Gene ermöglicht einen kulturunabhängigen Vergleich der verschiedensten, phylogenetisch weit entfernten Organismen.

Es bleibt festzustellen, dass die bakterielle Systematik auch mittels der Nukleinsäuretechniken bislang kein stabiles, phylogenetisch-basiertes Klassifikationssystem erreicht hat. Das Ziel der Klassifikation ist ein praktisches Schema, anhand dem unbekannte Organismen identifiziert werden können. Sie soll so akkurat und praxisrelevant wie möglich die Affinität zwischen Organismen wiedergeben. Die hierfür erhobenen Daten können mittels statistischer Methoden objektiv analysiert werden und die daraus entwickelten Klassifikationen können unabhängig getestet werden. Wenn neue Daten belegen, dass die bisherige Klassifikation nicht korrekt ist, wird mittels der neuen Information eine bessere Klassifikation konstruiert. Dies geschieht zur Zeit mit Hilfe der Sequenzdaten. Zur Entwicklung eines anwendbaren Klassifikationssystems der Bakterien sind die verschiedenen Identifikationsmethoden in einem vielschichtigen (polyphasischen) Ansatz anzuwenden (HOCH 1999).

Die Kombination der unterschiedlichsten Methoden in der vorliegenden Arbeit, die vergleichende 16S rDNA Analyse, Fingerprinttechniken und die spezifische Detektion von Organismen, ist grundsätzlich für die Analyse von Umweltproben als optimal anzusehen.

Dabei konnten in der 16S rDNA Analyse die Organismen sicher identifiziert werden und diese Methode bot die Möglichkeit der Zuordnung im phylogenetischen Kontext, auch wenn es sich bei einem großen Teil der gefundenen Sequenzen um unidentifizierte Organismen handelte. Die verwendeten Fingerprinttechniken erlauben Aussagen über saisonale oder vertikale Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung des Sedimentes und durch die spezifische Detektion konnten Organismen mit einem speziellen Metabolismus oder potentiell pathogene Organismen nachgewiesen werden.

Die Analyse nur mit einer dieser Techniken würde niemals eine umfassende Charakterisierung erlauben. Da die phylogenetische Einordnung der Organismen in den untersuchten Sedimenten nun bekannt ist, müsste in weiteren Studien besonderer Wert auf die kulturelle phänotypische Beschreibung gelegt werden, da bislang sehr viele Bakterien nur aufgrund ihrer Sequenz benannt sind und aus dem Namen einer Sequenz kaum oder gar nichts über die Fähigkeiten und Lebensweise des Organismus ausgesagt werden kann.

Somit bietet die Analysen-Kombination einschließlich Kultur eine zuverlässige taxonomische Bestimmung und kann gleichzeitig eine weitergehende physiologische Beschreibung des Phänotyps erzielen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Kombination der in dieser Arbeit verwendeten Methoden konnte eine Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung der obersten 5 cm von den Talsperrensedimenten Neunzehnhain, Muldenberg, Quitzdorf und Saidenbach erzielt werden.

Die untersuchten Talsperren unterscheiden sich in den chemischen Profilen wie auch in der Quantität und Qualität des sedimentierenden organischen Materials. Demzufolge waren Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung zu erwarten, verdeutlicht durch die Präsenz oder Abwesenheit verschiedener bakterieller Spezies oder phylogenetischer Gruppen.

Die Sedimente von Talsperren beherbergen eine komplexe und diverse mikrobielle Gemeinschaft. Die vergleichende 16S rDNA Analyse offenbarte in 2541 analysierten rekombinanten Klonen 528 verschiedene Sequenztypen, welche zu 293 OTUs zusammengefaßt werden konnten. Obwohl die Gemeinschaften der verschiedenen Talsperren nur schwach auf der Ebene der phylogenetischen Gruppen differierten (Unterschiede im Vorkommen der *Spirochaetales*- nur in Saidenbach und Quitzdorf; *Nitrospira*-Gruppe- in Neunzehnhain, Muldenberg und Saidenbach; Grüne Schwefelbakterien- nur in Neunzehnhain und Quitzdorf; Cyanobakterien- nur in Quitzdorf und Saidenbach), konnte durch die Verwendung von Ähnlichkeitsindices gezeigt werden, dass jede Talsperre eine spezifische mikrobielle Sedimentgemeinschaft aufweist. Das wird auch deutlich an dem hohen Anteil an OTUs (über 59%), welche nur in einer Talsperre gefunden wurden.

Über 60% aller Klone wiesen Ähnlichkeiten von mehr als 97% zu 16S rDNA-Sequenzen kultivierter Organismen oder zu Sequenzen auf, welche in verschiedenen Diversitäts-Studien zur natürlichen bakteriellen Diversität gefunden wurden. Diese Sequenzen konnten in 14 bekannte phylogenetische Gruppen eingeordnet werden. Alle anderen Klone zeigten hohe Sequenzhomologien zu unidentifizierten, phylogenetisch bisher nicht eingeordneten Bakterien. Diese Bakterien waren mit Anteilen zwischen 19,8% (Muldenberg) und 54,6% (Saidenbach) in den 16S rDNA Bibliotheken repräsentiert. Diese Ergebnisse betonen die Wichtigkeit von Studien der mikrobiellen Struktur der Sedimente. Die Untersuchungen bestätigen neueste Ergebnisse aus der Literatur und zeigen, dass die mikrobielle Diversität in Sedimenten weit höher ist, als bisher angenommen.

Ein sehr deutlicher Anzeiger für einen eutrophen Charakter stellte innerhalb der *Cyanobacteria* die Gattung *Microcystis* dar. In allen Talsperren wurde eine Häufung von Sequenzen der *Proteobacteria* und *Firmicutes* gefunden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit detektierten Sequenztypen zwischen 75% (Muldenberg) und 85% (Neunzehnhain) der geschätzten Diversität abdecken.

Die Schlussfolgerung aus dieser Untersuchung legt nahe, dass der trophische Charakter und die Unterschiede zwischen den Talsperren die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft beeinflussen. Dies wurde besonders deutlich in der Speziesdiversität. Die bakterielle Dichte der mikrobiellen Gemeinschaft hingegen wird nicht, oder nur zu einem geringen Teil, von der Trophie beeinflusst.

Die mittels 16S rDNA Analyse und FISH bestimmte quantitative bakterielle Zusammensetzung der Talsperrensedimente wies große Unterschiede auf. Somit konnte das bekannte Problem bestätigt werden, dass die 16S rDNA Analyse zur Quantifizierung von Bakterienpopulationen nicht geeignet ist.

Mittels Fingerprinttechniken (DGGE, T-RFLP, ARISA) konnten komplexe Muster der mikrobiellen Diversität erzeugt werden. Besonderes Interesse bestand im Monitoring von jahreszeitlichen Schwankungen der mikrobiellen Population innerhalb einer Talsperre, an dem Vergleich der Talsperren und einzelner Talsperrenhorizonte und in der Detektion spezifischer Organismengruppen. Die Analyse mit DGGE, ARISA und T-RFLP beinhalteten im ersten Schritt Optimierungsarbeiten, Herstellung von Standards, Generierung einer neuen Matrix und Primerdesign.

Im DGGE-Bandenmuster der 16S rDNA-Fragmente konnten deutliche Unterschiede zwischen den Talsperren festgestellt werden. Saisonale Unterschiede innerhalb einer Talsperre konnten nicht nachgewiesen werden, hinweisend auf eine stabile mikrobielle Zusammensetzung des Sedimentes. Auch zwischen den Horizonten konnten kaum Unterschiede festgestellt werden. Diese Stabilität weist auf die Amplifikation von DNA hin, die entweder extrazellulär an das Sediment gebunden vorliegt oder in den abgestorbenen Bakterien im Sediment noch vorhanden ist.

Untersuchungen der Dynamik, des Wechsels des Vorhandenseins von Mikroorganismen an einem Ort zu unterschiedlichen Zeiten sind mit dieser Technik in der Literatur noch nicht belegt. Die Auftrennung von Fragmenten in der DGGE birgt viele Problempunkte, entscheidend bei der Analyse komplexer Gemeinschaften.

Bei der Untersuchung der Diversität sulfatreduzierender Bakterien auf der Grundlage der Dissimilatorischen Sulfit Reduktase im DGGE wurden signifikante Unterschiede im Bandenmuster zwischen den einzelnen Talsperren erkennbar, was auf das Vorkommen unterschiedlicher sulfatreduzierender Mikroorganismen hinweist. Sequenzen von Sulfatreduzierern konnten detektiert, kloniert und identifiziert werden und bestätigten, wie auch eine statistische Auswertung, die Unterschiedlichkeit der Talsperren. Zwischen den Horizonten einer Talsperre und zwischen Probenahmedaten konnten kaum Unterschiede im Bandenspektrum festgestellt werden, was die Ergebnisse der vergleichenden 16S rDNA Analyse bestätigt und höchstwahrscheinlich auf extrazellulär vorliegende DNA zurückzuführen ist. Auch in der DGGE konnte eine enorme mikrobielle Sequenzdiversität im Bandenmuster festgestellt werden und die Ergebnisse der vergleichenden 16S rDNA Analyse untermauern.

In der T-RFLP konnten ebenfalls signifikante Unterschiede im Peakmuster im Vergleich der Talsperren nachgewiesen werden. Jahreszeitliche Veränderungen der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose wurden durch die Variation der Intensität bestimmter Peaks offensichtlich. Basierend auf den ermittelten Fragmentlängen konnten die entsprechenden Organismen durch Datenbankvergleiche identifiziert werden. Zur Identifizierung der Organismen wurde die Software TOAST (LUDWIG 2002, innerhalb dieser Arbeit) entwickelt. Die statistische Auswertung der gefundenen Mikroorganismen deckte Unterschiede im mikrobiellen Spektrum der Talsperren auf und bestätigte somit die bisherigen Analysen.

In vielen Parallelen konnten die Ergebnisse der 16S rDNA Analyse durch die Resultate der T-RFLP bestätigt werden, auf der Ebene der phylogenetischen Gruppen wie auch auf Speziesebene. Die Wiederfindung von Sequenzen aus den Genbibliotheken in den T-RF's der T-RFLP betrug in Neunzehnhain 70%, in Quitzdorf 85%, in Muldenberg 78% und in Saidenbach 76%. Auch innerhalb der

sulfatreduzierenden Bakterien waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Beprobung einer Talsperre als auch zwischen den Talsperren festzustellen. Weitere Unterschiede waren in der Häufigkeit einer Gattung in den einzelnen Sedimenthorizonten zu erkennen. Parallelen zur vergleichenden 16S rDNA Analyse wurden auch hier deutlich.

In der ARISA konnte für jede Reinkultur ein spezifisches Peakmuster generiert werden. Es wurde festgestellt, dass viele Organismen mehrere Spacerlängen aufweisen, welche sich oftmals in einem sehr engen Bereich befinden. Innerhalb der *Enterobacteriaceae* wurde eine Clusterbildung der Peaks beobachtet. Weiterhin konnten Literaturangaben bestätigt werden, dass einige Spacer innerhalb eines Organismus die gleiche Länge aufweisen und somit nur zu einem Peak in der Elektrophorese führen. Ebenso wurde bestätigt, dass die Verteilung der rDNA Kopien innerhalb phylogenetischer Gruppen von Bakterien keinen evolutionären Zusammenhang zwischen der Kopienzahl und der phylogenetischen Zuordnung zeigt.

Bei der Analyse der Talsperresedimente mittels ARISA konnten keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft zwischen den Horizonten, selbst im Talsperrenvergleich festgestellt werden. Das wird dadurch begründet, dass viele Organismen mehrere Fragmentlängen aufweisen und somit eine Verschleierung des Fehlens oder Hinzukommens von Spezies erfolgt. Durch das Vorhandensein von mehreren Spacerlängen wird auch die Identifizierung von einzelnen Spezies in komplexen Proben unmöglich. Daher können keine genauen Aussagen über die Diversität in den Sedimenten getroffen werden, da in dieser Analyse nicht ein Peak für eine Spezies steht, sondern bis zu 15 Peaks eine Spezies definieren können. Somit kann es leicht zu einer Überschätzung der mikrobiellen Diversität kommen.

Für die Analyse mittels ARISA steht bis jetzt keine umfangreiche Datenbank oder Literatur zur Verfügung, es gibt nur sehr wenige Angaben zu Anzahlen von rDNA Kopien im Genom, Spacerlängen oder Spacersequenzen. Für die Identifizierung von Reinkulturen hat sich die ARISA als sehr geeignet herausgestellt. Zur Analyse von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften ist sie hingegen nur begrenzt einsetzbar.

Durch die Verwendung der molekularbiologischen Fingerprinttechniken DGGE, T-RFLP und ARISA zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in den Sedimenten konnten viele Parallelen in den Ergebnissen gezogen, aber auch Schwachstellen der Analysenmethoden aufgedeckt werden. Ausschließlich mittels T-RFLP konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Talsperren ein unterschiedliches mikrobielles Spektrum aufweisen, sondern auch, dass die Mikroorganismen saisonal und zwischen den Horizonten einer Talsperre variieren. Somit konnte mit großer Sicherheit bewiesen werden, dass die DGGE, im Gegensatz zur T-RFLP nicht ausreichend in der Lage ist, vorhandene unterschiedliche 16S rDNA Sequenzen in einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft darzustellen.

In der spezifischen PCR zum Nachweis von Denitrifikanten und Nitrifikanten wurde festgestellt, dass in den eutrophen Talsperren Quitzdorf und Saidenbach, wie auch in der oligotrophen Talsperre Neunzehnhain in jeder Probenahme und in jedem Horizont Denitrifikanten nachweisbar waren. In der

Talsperre Muldenberg konnten keine denitrifizierenden Organismen detektiert werden. Nitrifizierende Bakterien wurden ausschließlich in der Talsperre Saidenbach nachgewiesen.

In allen untersuchten Talsperren und in jedem Horizont wurden mykobakterielle 16S rRNA-Gene erfolgreich amplifiziert. Jedoch war eine semi-nested PCR notwendig, was auf geringe Kopienzahlen mykobakterieller 16S rDNA und somit auf einen geringen Anteil an Mykobakterien in den Sedimenten hindeutet. Im Sequenzspektrum der Mykobakterien wurden Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Talsperrenvergleich sichtbar. Die dominierenden Sequenzen in den Talsperren stellten *Mycobacterium* IWGMT 90093 in Saidenbach, *Mycobacterium malmoense* in Muldenberg, *Mycobacterium* sp. strain MCRO 7 in Quitzdorf und *Mycobacterium* sp. TA5 in Neunzehnhain dar. Die größte Anzahl unterschiedlicher Sequenzen wurde in Saidenbach gefunden, gefolgt von Quitzdorf. Die repräsentierten Sequenzen belegen das ubiquitäre Vorkommen von Mykobakterien und es wurde gezeigt, dass auch Gewässersedimente ein Reservoir für saprophytäre oder fakultativ pathogene Mycobakterien darstellen und damit im Falle einer Resuspension der enthaltenen Mikroorganismen ein Gefährdungspotential bergen.

In allen untersuchten Sedimenten konnten Enterobakterien mittels PCR nachgewiesen werden. Eine genauere Einordnung der vorliegenden Arten wurde im molekularbiologischen Ansatz nicht durchgeführt, da die Identifizierung von enterobakteriellen Spezies auf der Basis der 16S rDNA wenig Erfolg verspricht. Die Mitglieder der *Enterobacteriaceae* weisen in der Sequenz ihrer 16S rDNA sehr große Ähnlichkeiten auf. In der weitergehenden Charakterisierung der Spezies mittels Kultivierung und biochemischer Identifizierung wurden *Aeromonas hydrophila* und Spezies der Gattung *Enterobacter* in allen Talsperren identifiziert. *Serratia liquefaciens* konnte ausschließlich in Neunzehnhain in hohen Keimdichten nachgewiesen werden. Das Sediment von Quitzdorf wies im Gegensatz zu den anderen Talsperren hohe Anzahlen an *Leclercia adecarboxylata* auf. *Vibrio fluvialis* wurde nur in Saidenbach und Neunzehnhain detektiert. Das Computerprogramm zur API-Auswertung wurde ursprünglich zur Identifizierung von medizinisch relevanten Bakterien entwickelt. Die Bestimmung von Bakterien aus Umweltproben ist mit dem API-System problematischer, da mögliche in der Umwelt vorkommende, fakultativ oder nicht pathogene Organismen nicht im Auswertungsschema berücksichtigt werden. In dieser Untersuchung wurde deutlich, dass möglicherweise die Keimzahlen der Enterobakterien aber nicht das Spektrum identifizierter Enterobakterien einen Zusammenhang mit der Trophie vermuten lassen.

Aufgrund der humanpathogenen Relevanz und der Übertragbarkeit mittels Trinkwasser wurden die Talsperrensedimente auf das Vorkommen von Giardien, Cryptosporidien, Microsporidien, Toxoplasmen und Legionellen untersucht. Die Untersuchung der Talsperren führte trotz der hohen Sensitivität in allen untersuchten Sedimentproben zu negativen Ergebnissen. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass durch diese Organismen keine Gefahr für die Trinkwassernutzung bzw. für Badegäste besteht.

In dieser Arbeit wurde ein breites Methodenspektrum angewendet. Aus den Ergebnissen schlussfolgernd konnten Literaturangaben bestätigt und Resultate der Analysen untermauert werden. Fingerprinttechniken sind besonders geeignet, um eine Vielzahl von Proben zu untersuchen und daraus Unterschiede oder Gemeinsamkeiten herauszufinden. Der große Vorteil der vergleichenden 16S rDNA Analyse liegt in der genauen und zuverlässigen Identifizierung. Besonders die Ergebnisse der T-RFLP konnten in dieser Arbeit die Resultate der 16S rDNA Analyse bestätigen.

In vorliegender Arbeit wurde eine hohe Komplexität und enorme Diversität der mikrobiellen Biozönosen in den untersuchten Sedimenten deutlich.

Die untersuchten Talsperrensedimente sind gekennzeichnet durch Unterschiede in der Bodenbeschaffenheit und in ihrem trophischen Status. Es ist zu vermuten, dass sich derartige Umweltbedingungen in der mikrobiellen Zusammensetzung und Struktur widerspiegeln. Die Analyse der Sedimente offenbarte Unterschiede in der Diversität und mikrobiellen Spezieszusammensetzung der verschiedenen Talsperrensedimente. Dieses Ergebnis bekräftigt die Aussage, dass die mikrobielle Struktur möglicherweise die Unterschiede im trophischen Charakter und die Beschaffenheiten der Talsperre reflektieren können.

Inwieweit allochthone oder autochthone Bedingungen die mikrobielle Zusammensetzung beeinflussen, ist noch weitestgehend unbekannt. Mit den bisherigen Ergebnissen ist eine Abschätzung der mikrobiellen Diversität in den Talsperren möglich. Um aus diesen Resultaten auf spezifische Umweltparameter, welche für den jeweiligen trophischen Status der untersuchten Talsperren gelten, schließen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig, um unser Verständnis der Struktur und Funktion des komplexen Sedimentökosystem zu erweitern.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Achenbach LA, Carey J, Madigan MT (2001) Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Appl Envir Microbiol* 67:2922-2926

Ahsan CR, Sanyal SC, Zaman A, Neogy PKB, Huq MI (1988) Immunobiological relationships between *Vibrio fluvialis* and *Vibrio cholerae* enterotoxins. *Immun Cell Biol* 66:251-252

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K (1999) Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH

Amann R, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169

Atlas RM (1993) Detecting gene sequences using the polymerase chain reaction. p. 267-270. *In* Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (ed.). Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers

Atlas RM (1993) Extraction of DNA from soils and sediments. p. 261-266. *In* Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (ed.). Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers

Bak F, Finster K, Rothfuß F (1992) Formation of dimethylsulfide and methanethiol from methoxylated aromatic compounds and inorganic sulfide by newly isolated anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* 157:529-534

Barns SM, Takala SL, Kuske CR (1999) Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom Acidobacterium in the Environment. *Appl Envir Microbiol* 65:1731-1737

Bertram S, Gassen HG (1991) Gentechnische Methoden. Gustav Fischer Verlag

Black EK, Finch GR, Taghi-Kilani R, Belosevic M (1996) Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *FEMS Microbiol Lett* 135:187-189

Blum H, Beier H, Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99

Bödinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC (1990) Detection and identification of Mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 28:1751-1759

Bornay-Llinares FJ, da Silva AJ, Moura INS, Myjak P, Pietkiewicz H, Kruminis-Lozowska W, Kraczyk TK, Pieniasek NJ (1999) Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* 65:1455-1458

Borneman J, Triplett EW (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* 63:2647-2653

Böttger EC (1991) Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern-die Familie Mycobacteriaceae. *Immun Infekt* 19:143-152

Böttger EC (1995) Ribosomale Nukleinsäuren-Eine universelle diagnostische Zielstruktur. *Biospektrum*. 3:15-22

Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64 (10):3769-3775

Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM (2000) Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. *Appl Environ Microbiol* 66:2096-2104

Bram RJ, Young RA, Steitz JA (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell* 19:393-401

Brenner DJ, Hickman-Brenner FW, Lee JV, Steigerwalt AG, Fanning GR, Hollis DG, Farmer JJ, Weaver RE, Joseph SW, Seidler RJ (1983) *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. *J Clin Microbiol* 18:816-824

Brett U (1986) Modifizierte ZIEHL-NEELSEN-Färbung. *mta* 6:415-416

Calvo-Bado LA, Morgan JAW, Sergeant M, Pettitt TR, Whipps JM (2003) Molecular Characterization of *Legionella* Populations Present within Slow Sand Filters Used for Fungal Plant Pathogen Suppression in Horticultural Crops. *Appl Environ Microbiol* 69 (1):533-541

Cascon A, Anguita J, Hernanz C, Sanchez M, Fernandez M, Naharro G (1996) Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 62:1167-1170

Castro H, Reddy KR, Ogram A (2002) Composition and function of sulfur-reducing prokaryotes in eutrophic and pristine areas of the Everglades. *Appl Environ Microbiol* 68:6129-6137

Castro H, Reddy KR, Ogram A (2002) Poster zum ASM Meeting: Genetic Diversity of Sulfate-reducing Bacteria Along a Nutrient Gradient in the Everglades. Departments of Soil and Water Science, and Microbiology and Cell Science, University of Florida, Gainesville, Florida

Chakraborty S, Nair GB, Shinoda S (1997) Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. Rev environ health 12:63-80

Champlaud D, Gobet P, Naciri M, Vagner O, Lopez J, Buisson JC, Varga I, Harly G, Mancassola R, Bonnin A (1998) Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. melagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. Appl Envir Microbiol 64:1454-1458

Chandler DP, Brockman FJ, Fredrickson JK (1997) Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. Mol Ecol 6:475-482

Chandler DP, Brockman FJ, Bailey TJ, Fredrickson JK (1998) Phylogenetic Diversity of Archaea and Bacteria in a Deep Subsurface Paleosol. Microb Ecol 36 (1):37-50

Chatzinotas A, Hahn D, Zeyer J Distribution of uncultured planctomycete in forest soils. Unpublished

Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, Cho SY, Dubey JP (1997) Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. J Infect Dis 175:1280-1282

Clarke KR, Warwick RM (1997) Quantifying structural redundancy in ecological communities. Oecologia 113:278-289

Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR (2000) Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol 38:1709-1712

Coates JD, Ellis D, Gaw CW, Lovley DR (1999) Geothrix fermentans gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. Int J Syst Bacteriol 49:1615-1622

Coates JD, Michaelidou U, Bruce RA, O'Connor SM, Crespi JN, Achenbach LA (1999) Ubiquity and Diversity of Dissimilatory (Per)chlorate-Reducing Bacteria. Appl Envir Microbiol 65 (12):5234-5241

Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN (1999) Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. Appl Envir Microbiol 65:2492-2496

Cullen DW, Hirsch PR (1998) Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. Soil Biol Biochem 30:983-993

Dabert P, Sialve B, Delgenes JP, Moletta R, Godon JJ (2001) Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:500-509

DeLong EF, Pace NR (2001) Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. *Syst Biol* 50 (4):470-478

Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, McCracken VJ, Aminov R, Mackie RI, Gaskins HR (2000) Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Envir Microbiol* 5:2166-2174

Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, Pace NR (1998) Microbial Diversity in a Hydrocarbon- and Chlorinated-Solvent-Contaminated Aquifer Undergoing Intrinsic Bioremediation. *Appl Envir Microbiol* 64:3869-3877

Dowd SE, Gerba CP, Enriquez FJ, Pepper IL (1998) PCR amplification and species determination of microsporidia in formalin-fixed feces after immunomagnetic separation. *Appl Envir Microbiol* 64 (1):333-336

Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL (1998) Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Envir Microbiol* 64:3332-3335

Dunbar J, Takala S, Barns SM, Davis JA, Kuske CR (1999) Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Envir Microbiol* 65:1662-1669

Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR (2000) Assessment of Microbial Diversity in Four Southwestern United States Soils by 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Appl Envir Microbiol* 66 (7):2943-2950

Falkinham III, Joseph O (1996) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9:177-215

Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E (1995) Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Envir Microbiol* 61:2798-2801

Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Appl Envir Microbiol* 68 (1):219-226

Felske A, Bruemmer IHM, Wagner-Doebler I Selective 16S rDNA analysis of uncultured Planctomycetes. Unpublished

Felske A, Wolterink A, van Lis R, de Vos WM, Akkermans ADL (2000) Spatial Distribution of 16S rRNA Levels from Uncultured Acidobacteria in Soil. Lett Appl Microbiol 31:118-122

Fisher MM, Triplett EW (1999) Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. Appl Environ Microbiol 65 (10):4630-4636

Franzen C, Müller A (1999) Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of Microsporidia. Clin Microbiol Rev 12:243-285

Fricker EJ, Fricker CR (1994) Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia coli* and coliforms in water. Lett Appl Microbiol 19:44-46

Frostegard A, Courtois S, Ramisse V, Clerc S, Bernillon D, le Gall F, Jeannin P, Nemse X, Simonet P (1999) Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Appl Environ Microbiol 65:5409-5420

Frothingham R, Hills HG, Wilson KH (1994) Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 32:1639-1643

Fry J (2000) Bacterial diversity and "unculturables". Microbiol today 27:186-188

Gangadharam PRJ, Jenkins PA (1997) Mycobacteria – Basic aspects. International Thomson Publishing

Ganten D, Ruckpaul K (1997) Molekular- und zellbiologische Grundlagen. Springer Verlag

Gassen HG, Sachse GE, Schulte A (1994) Grundlagen und Anwendungen der PCR. Gustav Fischer Verlag

Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature 345:60-63

Glöckner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. Appl Environ Microbiol 66:5053-5065

Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol. 2 Health criteria and other supporting information, 1996 (pp. 940-949) and Addendum to Vol. 2 . 1998 (pp. 281-283) Geneva, World Health Organization

Gürtler V, Stanisich VA (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S-rDNA spacer region. *Microbiology* 142:3-16

Handfield M, Simard P, Couillard M, Letarte R (1996) *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis, and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). *Appl Envir Microbiol* 62:3459-3461

Handfield M, Simard P, Letarte R (1996) Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*. *Appl Envir Microbiol* 62:3544-3547

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Envir Microbiol* 63:3233-3241

Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 43:1-11

Hiorns WD, Methe BA, Nierzwicki-Bauer SA, Zehr JP (1997) Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Envir Microbiol* 63:2957-2960

Hiraishi A, Kishimoto N, Kosako Y, Wakao N, Tano T (1995) Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemoorganotroph *Acidobacterium capsulatum*. *FEMS Microbiol Lett* 132:91-94

Hoch C (1999) Polyphasische Analyse der mikrobiellen Population des Spittelwassersediments. Dissertation an der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Holmes AJ, Bowyer J, Holley MP, O'Donoghue M, Montgomery M, Gillings MR (2000) Diverse, yet-to be cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiol Ecol* 33:111-120

Holmes B, Costas M (1992) Identification and typing of Enterobacteriaceae by computerized methods 127-149. In Board RG, Jones D, Skinner FA (ed.) *Ident Meth Appl Envir Microbiol*. Blackwell Scientific Publications

Horz HP (2000) Entwicklung und Anwendung molekularer Techniken zur Charakterisierung von nitrifizierenden und methanotrophen Populationen in natürlichen Ökosystemen. Dissertation im Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J Bacteriol* 180:4765-4774

Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR (1998) Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring. *J Bacteriol* 180:366-376

Hunter-Cevera J (1998) The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol* 1:278-285

Iida T, Ohkuma M, Ohtoko K, Kudo T (2000) Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. *FEMS Microbiol Ecol* 34 (1):17-26

Imhoff JF, Suling J, Petri R (1998) Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera Allochromatium, Halochromatium, Isochromatium, Marichromatium, Thiococcus, Thiohalocapsa and Thermochromatium. *Int J Syst Bacteriol* 48:1129-1143

Isaac-Renton J, Bowie WR, King A, Irwin GS, Ong CS, Fung CP, Shokeir MO, Dubey JP (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl Envir Microbiol* 64:2278-2280

Jackson CR, Harper JP, Willoughby D, Roden EE, Churchill PF (1997) A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl Envir Microbiol* 63:4993-4995

Janeway CA, Travers P (1997) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag

Janssen PH, O'Farrell KA (1999) Detection of Verrucomicrobia in a Pasture Soil by PCR-Mediated Amplification of 16S rRNA Genes. *Appl Envir Microbiol* 65:4280-4284

Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM, Sait M (2002) Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia. *Appl Envir Microbiol* 68:2391-2396

Jenkins PA, Duddridge LR, Yates MD, Grange JM (1992) Identification of pathogenic and environmental mycobacteria. p. 311-324. *In* Board RG, Jones D, Skinner FA (ed.). *Ident Meth Appl Envir Microbiol*. Blackwell Scientific Publications

Johnson DW, Pieniasek NJ, Griffin DW, Misener L (1995) Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Envir Microbiol* 61:3849-3855

Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, Bhakdi S (1995) Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of Legionellae in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol* 33:1247-1252

Jørgensen BB, Fenchel T (1974) The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Mar Biol* 24:180

Juretschko S, Timmermann G, Schmid M (1998) Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-Like Bacteria as Dominant Populations. *Appl Envir Microbiol* 64:3042-3051

Juretschko S, Loy A, Lehner A, Wagner M (2002) The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol* 25:84-99

Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS (2002) Isolating "Uncultivable" Microorganisms in a Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* 296:1127-1129

Kamala T, Paramasivan CN, Herbert DI, Venkatesan P, Prabhakar R (1994) Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl Envir Microbiol* 60:1021-1024

Kaucner C, Stinear T (1998) Sensitive and rapid detection of viable Giardia cysts and Cryptosporidium parvum oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transkription-PCR. *Appl Envir Microbiol* 64:1743-1749

Kawasaki H, Hoshino Y, Yamasato K (1993) Phylogenetic diversity of phototrophic purple non-sulfur bacteria in the Proteobacteria alpha-group. *FEMS Microbiol Lett* 112:61-66

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (1998) *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag

Kirschner P, Meier A, Böttger EC (1993) Genotypic identification and detection of Mycobacteria-Facing novel and uncultured pathogens. p. 173-190. *In* Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ *Diagnostic molecular microbiology-principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington D.C

Kishimoto N, Kosako Y, Tano T (1991) *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic, chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr Microbiol* 22:1-7

Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM (2000) rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Appl Envir Microbiol* 66:1328-1333

Klein J (1991) Immunologie. VCH Verlag

Klein M, Friedrich M, Roger AJ, Hugenholtz P, Fishbain S, Abicht H, Blackall LL, Stahl DA, Wagner M (2001) Multiple Lateral Transfers of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *J Bacteriol* 183 (20):6028-6035

Knippers R (1997) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag

Kreft JU, Schink B (1993) Demethylation and degradation of phenylmethylesters by the sulfide-methylating homoacetogenic bacterium strain TMBS4. *Arch Microbiol* 159:308-315

Krieg NR, Holt JG (ed.) (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore

Krovacek K, Pasquale V, Baloda SB, Soprano V, Conte M, Dumontet S (1994) Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in southern Italy. *Appl Envir Microbiol* 60:1379-1382

Kuhlmann B (1998) Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Population im Grundwasser. Abschlussbericht am Institut für Wasserforschung GmbH Dortmund

Kuhlmann B, Preuß G (2000) Anwendung molekularbiologischer Verfahren in der Grund- und Trinkwasseranalytik. Veröffentlichungen des Institutes für Wasserforschung GmbH Dortmund

Kühn I, Allestam G, Huys G, Janssen P, Kersters K, Krovacek K, Stenström TA (1997) Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. *Appl Envir Microbiol* 63:2708-2715

Kuske CR, Barns SM, Busch JD (1997) Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions. *Appl Envir Microbiol* 63:3614-3621

Laberge I, Ibrahim A, Barta JR, Griffiths MW (1996) Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization. *Appl Envir Microbiol* 62:3259-3264

LaPara TM, Nakatsu CH, Pantea L, Alleman JE (2000) Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl Envir Microbiol* 66 (9):3951-3959

- Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer KH, Wagner M (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Envir Microbiol* 65:1289-1297
- Leff LG, Dana JR, McArthur JV, Shimkets LJ (1995) Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl Envir Microbiol* 61:1141-1143
- Leng X, Mosier DA, Oberst RD (1996) Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Appl Envir Microbiol* 62:643-647
- Levy-Frebault V, Rafidinarivo É, Prome JC, Grandry J, Boisvert H, David HL (1983) *Mycobacterium fallax* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 33:336-343
- Liesack W, Stackebrandt E (1992) Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol* 174:5072-5078
- Liesack W, Bak F, Kreft U, Stackebrandt E (1994) *Holophaga foetida* gen. nov., spec. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch Microbiol* 162:85-90
- Lin CK, Tsen HY (1996) Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. *J Appl Bact* 80:659-666
- Llobet-Brossa E, Rosselló-Mora R, Amann R (1998) Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl Envir Microbiol* 64: 2691-2696
- Lonergan DJ, Jenter HL, Coates JD, Philips EJP, Schmidt TM, Lovley DR (1996) Phylogenetic Analysis of Dissimilatory Fe(III)-reducing Bacteria. *J Bacteriol* 178 (8):2402-2408
- Lüdemann H, Arth I, Liesack W (2000) Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl Envir Microbiol* 6 (2):754-762
- Lüdemann H, Conrad R (2000) Molecular retrieval of large 16S rRNA gene fragments from an Italian rice paddy soil affiliated with the class Actinobacteria. *Syst Appl Microbiol* 23 (4):582-584
- Ludwig F (2002) Untersuchung komplexer mikrobieller Gemeinschaften im Talsperrensediment mittels molekularer Fingerprint-Techniken. Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden

Ludwig W, Bauer SH, Bauer M, Held I, Kirchhof G, Schulze R, Huber I, Spring S, Hartmann A, Schleifer KH (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol Lett* 153:181-190

Ludwig W, Schleifer KH (1999) Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News* 65:752-757

Luna GM, Manini E, Danovaro R (2002) Large Fraction of Dead and Inactive Bacteria in Coastal Marine Sediments: Comparison of Protocols for Determination and Ecological Significance. *Appl Envir Microbiol* 68:3509-3513

Maaßen S (2003) Vergleichende Untersuchungen über den potentiellen Eintrag von Nährstoffen in den Wasserkörper von Talsperren durch Freisetzung aus dem Sediment. Dissertation am Institut für Mikrobiologie der TU Dresden

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2001) *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Gustav Fischer

Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, Cadranel J, Lecossier D, van Embden J, Hance AJ (1996) Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 34:1209-1215

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Envir Microbiol* 64:795-799

Marsh TL (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* 2 (3):323-327

Marsh TL, Kurzhals RL, Dojka MA, Icopini L, Long DT, Pace NR Molecular diversity of a soil bacterial community from a metal contaminated super fund site. Unpublished

Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR (1997) Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 10:67-85

Marti HP, Escher E (1990) SAF-Eine alternative Fixierlösung für parasitologische Stuhluntersuchungen. *Schweizerische medizinische Wochenschrift, J Suisse de Medecine Basel* 120:1473-1476

Martin AP (2002) Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl Envir Microbiol* 68:3673-3682

Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* 67:2354-2359

Mayer CL, Palmer CJ (1996) Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl Environ Microbiol* 62:2081-2085

McCaig AE, Glover LA, Prosser JI (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol* 65:1721-1730

McCaig AE, Glover LA, Prosser JI (2001) Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Appl Environ Microbiol* 67:4554-4559

McKay AM (1992) Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Lett Appl Microbiol* 14:129-135

Medema GJ, Schets FM, Teunis PFM, Havelaar AH (1998) Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl Environ Microbiol* 64:4460-4466

Mehlhorn H, Piekarski G (1998) *Grundriß der Parasitenkunde*. Gustav Fischer Verlag

Mendum TA, Chilima BZ, Hirsch PR (2000) The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. *FEMS Microbiol Lett* 185:189-192

More MI, Herrick JB, Silva MC, Ghiorse WC, Madsen EL (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl Environ Microbiol* 60:1572-1580

Müller A, Stellermann K, Hartmann P, Schrappe M, Fätkenheuer G, Salzberger B, Diehl V, Franzen C (1999) A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diagn Laborat Immun* 6:243-246

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700

Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2 (3):317-22

Neefs JM, Van de Peer Y, de Rijk P, Chapelle S, de Wachter R (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acid Res*, Oxford University Press. 21:3025-3049

O'Farrell KA, Janssen PH (1999) Detection of Verrucomicrobia in a Pasture Soil by PCR-Mediated Amplification of 16S rRNA Genes. *Appl Envir Microbiol* 65 (9):4280-4284

Ollar RA, Connell ND (1999) *Molecular mycobacteriology*. Marcel Dekker Inc.

Overmann J, Tuschak C (1997) Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria. *Arch Microbiol* 167:302-309

Pace NR (1996) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 62:463-470

Palmer CJ, Tsai YL, Paszko-Kolva C, Mayer C, Sangermano LR (1993) Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl Envir Microbiol* 59:3618-3624

Phelps CD, Kerkhof LJ, Young LY (1998) Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiol Ecol* 27:269-279

Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura INS, Arrowood MJ, Ditrich O, Addiss DG (1999) New Cryptosporidium genotypes in HIV-infected persons. *Em Inf Dis* 5:444-449

Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl Envir Microbiol* 64 (10):3724-3730

Rahman MM, Qadri F, Albert MJ, Hossain A, Mosihuzzaman M (1992) Lipopolysaccharide composition and virulence properties of clinical and environmental strains of *Vibrio fluvialis* and *Vibrio mimicus*. *Microbiol Immun* 36:327-338

Ravenschlag K, Sahm K, Amann R (2000) Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic Sediments (Svalbard). *Appl Envir Microbiol* 67 (1):387-395

Recht J, Marinez A, Torello S, Kolter R (2000) Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 182:4348-4351

Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Envir Microbiol* 58:3417-3418

Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL (1997) Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl Envir Microbiol* 63:106-114

Rodgers MR, Flanigan DJ, Jakubowski W (1995) Identification of algae with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. *Appl Envir Microbiol* 61:3759-3763

Rogall T, Flohr T, Böttger EC (1990) Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 136:1915-1920

Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM (2000) Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Appl Envir Microbiol* 66 (6):2541-2547

Rosello-Mora R, Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25:39-67

Röske I (2000) Entwicklung einer kombinierten Untersuchungsmethode (mit Einsatz von Gensonden) zur Abschätzung der Freisetzung von Laststoffen aus Sedimenten von Talsperren und Seen. Projektbeschreibung zum Forschungsvorhaben 02WT 9997/2 des BMBF

Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, Fischer M, Mauch H (2000) Novel diagnostic algorithm for identification of Mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol* 38:1094-1104

Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Envir Microbiol* 63:4704-4712

Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM (2000) Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl Envir Microbiol* 66:844-849

Sander A, Ruess M, Bereswill S, Schuppler M, Steinbrueckner B (1998) Comparison of Different DNA Fingerprinting Techniques for Molecular Typing of *Bartonella henselae* Isolates. *J Clin Microbiol* 36 (10):2973-2981

Sansila A, Hongmanee P, Chuchottaworn C, Rienthong S, Rienthong D, Palittapongarnpim P (1998) Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* by Amplification of the 16S-23S Ribosomal DNA Spacer. *J Clin Microbiol* 36:2399-2403

Sass H, Wieringa E, Cypionka H, Babenzien HD, Overmann J (1998) High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. Arch Microbiol 170:243-251

Schlegel HG (1992) Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag

Schleifer KH, Horn M (2000) Mikrobielle Vielfalt. Biologen heute 452:1-5

Schneider S (2001) Bioindikation der Trophie in Fließgewässern mit Hilfe submerser Makrophyten. Hrsg. Bayer. Landesamt für Wasserwirtschaft. Materialien Nr. 102

Schönen D, Karanis P (2001) Beobachtungen über parasitenbedingte Ausbrüche durch Trinkwasser und Maßnahmen zu deren Vermeidung. Teil II: Literaturüberblick über Trinkwasserbedingte Ausbrüche durch *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* und *Toxoplasma gondii*. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 44:371-376

Schröder KH, Juhlin I (1977) *Mycobacterium malmoense* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 27:241-246

Schuppler M, Mertens F, Schön G, Goebel UB (1995) Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. Microbiology 141 (2):513-521

Seitz HM (2002) Zur Diagnostik von Giardia (Lambliä)- und von Kryptosporidien-Infektionen. Laborat Med 26 (7-8):379

Selenska-Pobell S, Flemming K, Radeva G, Tzvetkova I, Tzvetkova T, Merroun M, Raff J Diversity and activity of bacteria in uranium mining waste piles. Unpublished

Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J (2000) Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. Appl Envir Microbiol 66:2263-2266

Sieber HU (1992) Talsperren in Sachsen. Landestalsperrenverwaltung des Freistaates Sachsen

Sischo WM, Atwill ER, Lanyon LE, George J (2000) Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. Preventive Veterinary Medicine. 43:253-267

Smalla K, Cresswell N, Mendonca-Hagler LC, Wolters A, van Elsas JD (1993) Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. J Appl Bacteriol 74:78-85

Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K (2001) Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Appl Envir Microbiol* 67:2284-2291

Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (ed.) (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.2, The Williams and Wilkins Co. Baltimore

Soave R (1996) *Cyclospora*: an overview. *Clin Infect Dis* 23:429-435

Sobotka I, Albrecht H, Schafer H (1998) Disseminated Encephalitozoon (Septata) intestinalis infection in a patient with AIDS: novel diagnostic approaches and autopsy-confirmed parasitological cure following treatment with albendazole. *J Clin Microbiol* 33:2948

Somerfield PJ, Clarke KR (1995) Taxonomic levels, in marine community studies, revisited. *Mar Ecol Prog ser* 127:113-119

Speksnijder AGCL, Kowalchuk GA, Roest K, Laanbroek HJ (1998) Recovery of a novel group of *Nitrosomonas*-like 16S rDNA sequences from freshwater habitats. *Syst Appl Microbiol* 21: 321-330

Spring S, Schulze R, Overmann J, Schleifer KH (2000) Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol Rev* 24:573-590

Springer B, Tortoli E, Richter I, Grünwald R, Rüscher-Gerdes S, Uschmann K, Suter F, Collins MD, Kroppenstedt RM, Böttger EC (1995) *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. *J Clin Microbiol* 33:2805-2811

Sreter T, Kovacs G, da Silva AJ, Pieniazek NJ., Szell Z, Dobos-Kovacs M, Marialigeti K, Varga I (2000) Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. *Appl Envir Microbiol* 66:735-738

Stackebrandt E, Liesack W, Goebel BM (1993) Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J* 7 (1):232-236

Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849

Stackebrandt E, Pukall R, Ulrichs G, Rheims H (1999) Analysis of 16S rDNA clone libraries: Part of the big picture. In: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds.) (1999) Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada

Stein LY, La Duc MT, Grundl TJ, Nealson KH (2001) Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Envir Microbiol* 3 (1):10-18

Steuber S, Niu A, Bauer C, Reetz J, Roth A, Janitschke K (1995) Der Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Abortengewebe vom Schaf mittels der Polymerase-Kettenreaktion. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 102:91-93

Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6613-6617

Suzuki MT, Giovannoni SJ (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Envir Microbiol* 62:625-630

Temesgen Z, Toal DR, Cockerill II, Franklin R (1997) Leclercia adecarboxylata infections: case report and review. *Clin Infect Dis* 25:79-81

Teske A, Wawer C, Muyzer G, Ramsing NB (1996) Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl Envir Microbiol* 62:1405-1415

Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nüsslein K, Marsh TL, Flynn SJ (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol* 13:109-122

Tsai YL, Olson BH (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Envir Microbiol* 58:2292-2295

Tsai YL, Palmer CJ, Sangermano LR (1993) Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Appl Envir Microbiol* 59:353-357

Tsukamura M, van der Meulen HJ, Grabow WOK (1983) Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic Mycobacteria of the Mycobacterium parafortuitum complex: Mycobacterium austroafricanum sp. nov. and Mycobacterium tiernhoferi sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 33:460-469

Tsukamura M, Yano I, Imaeda T (1986) *Mycobacterium moriokaense* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol* 36:333-338

Ulrich KU (1998) Vergleichende Untersuchungen zu Auswirkungen des Sediments auf die Wasserbeschaffenheit in Trinkwassertalsperren unter Berücksichtigung von Stauspiegelschwankungen. Dissertation an der Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften der TU Dresden

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch: Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) vom 21. Mai 2001, BGBl. I S. 959

Vesey G, Corbin A, Dennis J (1992) Identification of *Legionella* species. p. 111-125. In Board RG, Jones D, Skinner FA (ed.). *Ident Meth Appl Envir Microbiol*. Blackwell Scientific Publications

Vetriani C, Jannasch HW, MacGregor BJ, Stahl DA, Reysenbach AL (1999) Population Structure and Phylogenetic Characterization of Marine Benthic Archaea in Deep-Sea Sediments. *Appl Envir Microbiol* 65 (10):4375-4384

Volossiuk T, Robb EJ, Nazar RN (1995) Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl Envir Microbiol* 61:3972-3976

von Wintzingerode F, Goebel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21:213-229

von Wintzingerode F, Selent B, Hegemann W, Goebel UB (1999) Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl Envir Microbiol* 65 (1):283-286

Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA (1998) Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *J Bacteriol* 180:2975-2982

Ward-Rainey N, Rainey FA, Schlesner H, Stackebrandt E (1995) Assignment of hitherto unidentified 16S rDNA species to a main line of descent within the domain Bacteria. *Microbiology* 141:3247-3250

Wawer C, Muyzer G (1995) Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Appl Envir Microbiol* 61 (6):2203-2210

Wayne LG, Good RC, Böttger EC, Butler R, Dorsch M, Ezaki T, Gross W, Jonas V, Kilburn J, Kirschner P, Krichevsky MI, Riddl M, Springer B, Stackebrandt E, Tarnok I, Tarnok Z, Tasaka H, Vincent V, Warren NG, Knott CA, Johnson R (1996) Semantide- and chemotaxonomy-based analyses of some problematic phenotypic clusters of slowly growing mycobacteria, a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* 46:280-297

Weber H (1997) Wörterbuch der Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag

Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL (1994) Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 7:426-461

Weidner S, Arnold W, Puhler A (1996) Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Envir Microbiol* 62:766-771

Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Envir Microbiol* 63:3741-3751

Woese CR (1997) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271

Wohlfarth J (2001) Erfassung und Identifizierung potentiell pathogener Mikroorganismen in Sedimenten von Trinkwassertalsperren. Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA (1999) Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Envir Microbiol* 65:1578-1583

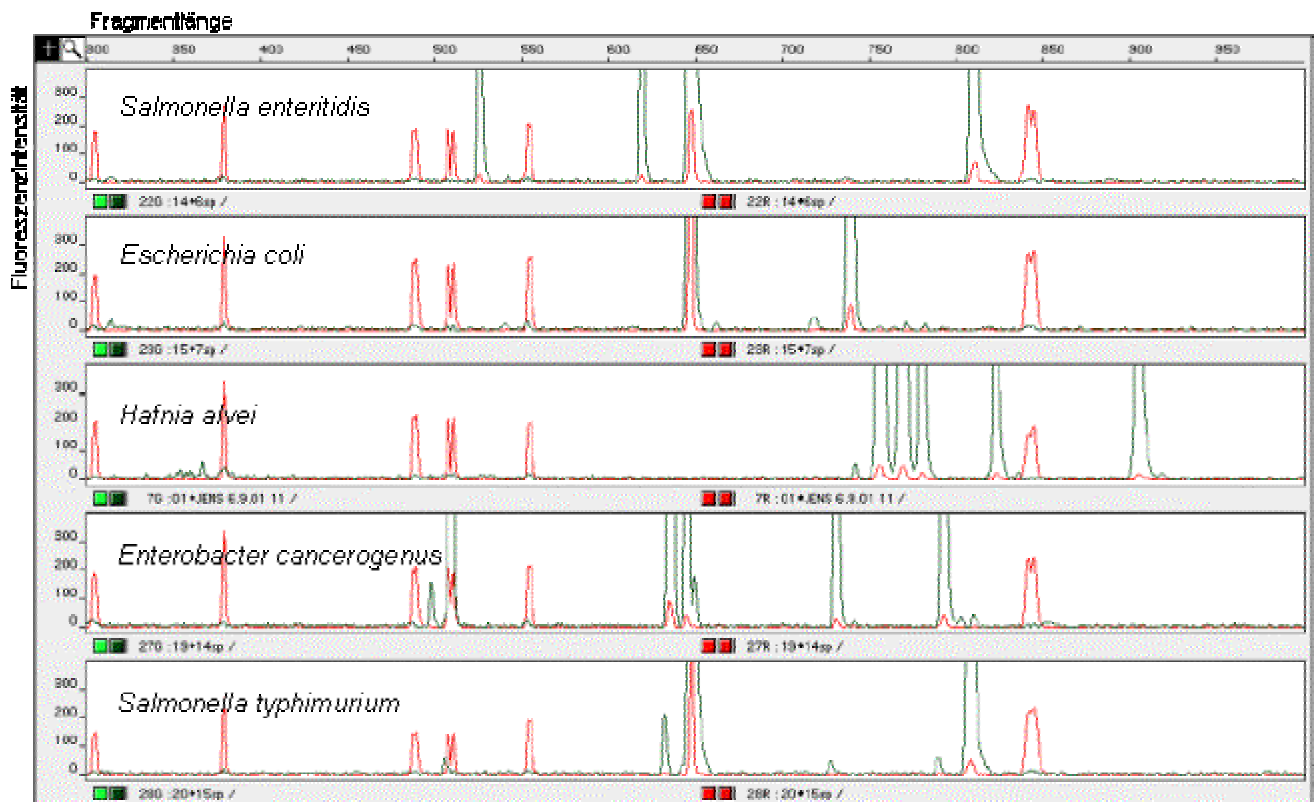
Yagi O, Hashimoto A, Iwasaki K, Nakajima M (1999) Aerobic degradation of 1,1,1-trichlorethane by *Mycobacterium* spp. isolated from soil. *Appl Envir Microbiol* 65:4693-4696

Yeates C, Gillings MR, Davison AD, Altavilla N, Veal DA (1997) PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Lett Appl Microbiol* 25:303-307

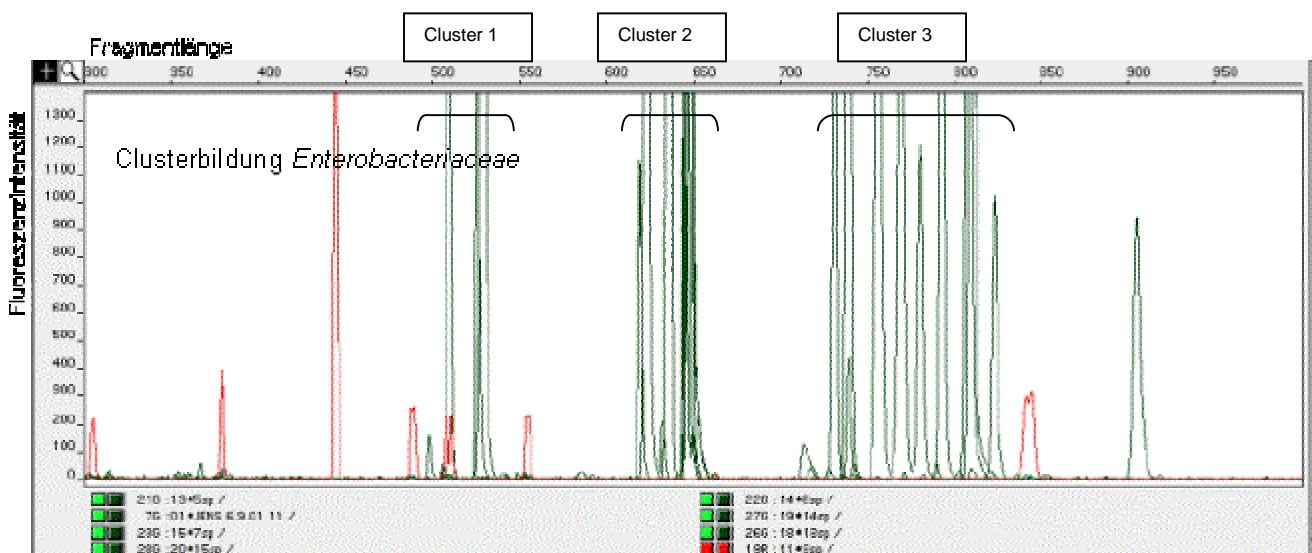
Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Envir Microbiol* 62:316-322

Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Envir Microbiol* 64 (10):3854-3859

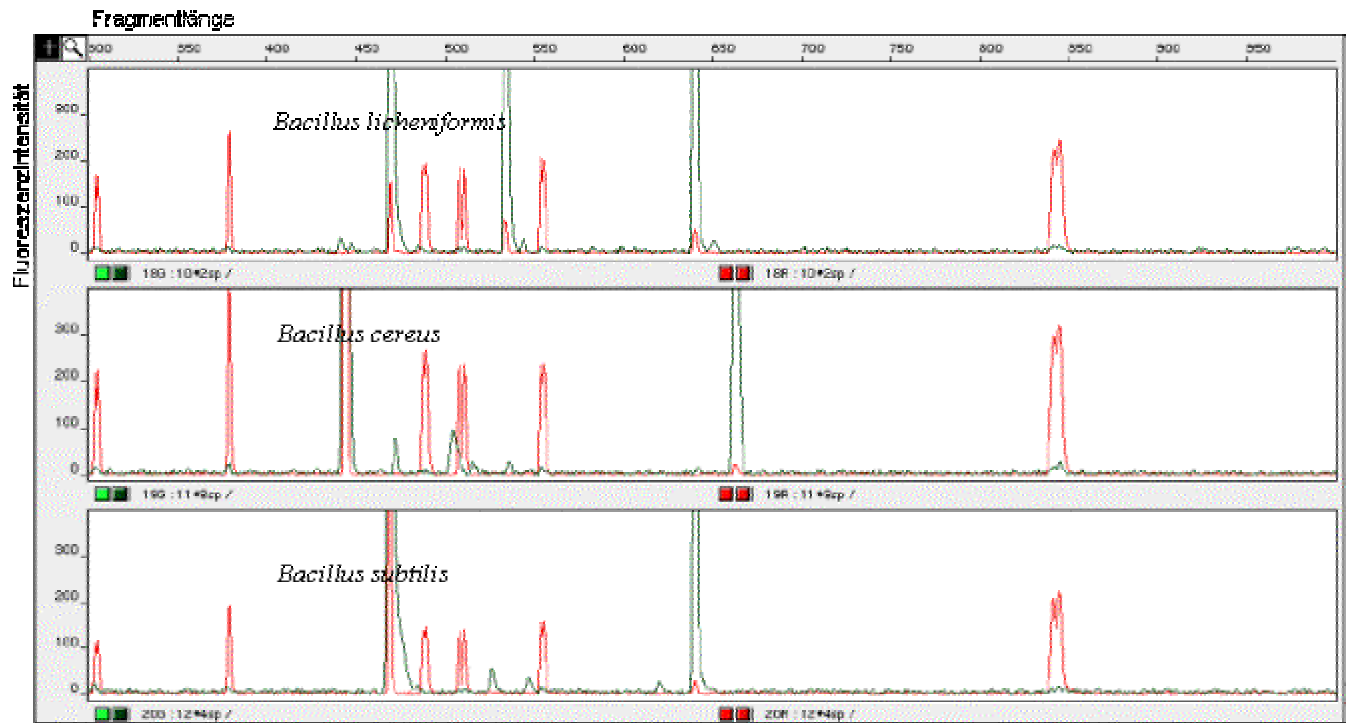
VII ANHANG



Anhang; Abbildung A1 Spacerlängen von Vertretern der *Enterobacteriaceae* (grün), Standard (rot)
Die Fragmentlängen wurden anhand eines mitgeführten Standards ermittelt.



Anhang; Abbildung A2 Cluster 1 bis 3 innerhalb der Familie der Enterobakterien (grün), Standard (rot)
Es sind drei Cluster zu erkennen: Cluster 1: 480-550 bp; Cluster 2: 620-660 bp und Cluster 3: 710-820 bp. Die Fragmentlängen wurden anhand eines mitgeführten Standards ermittelt.



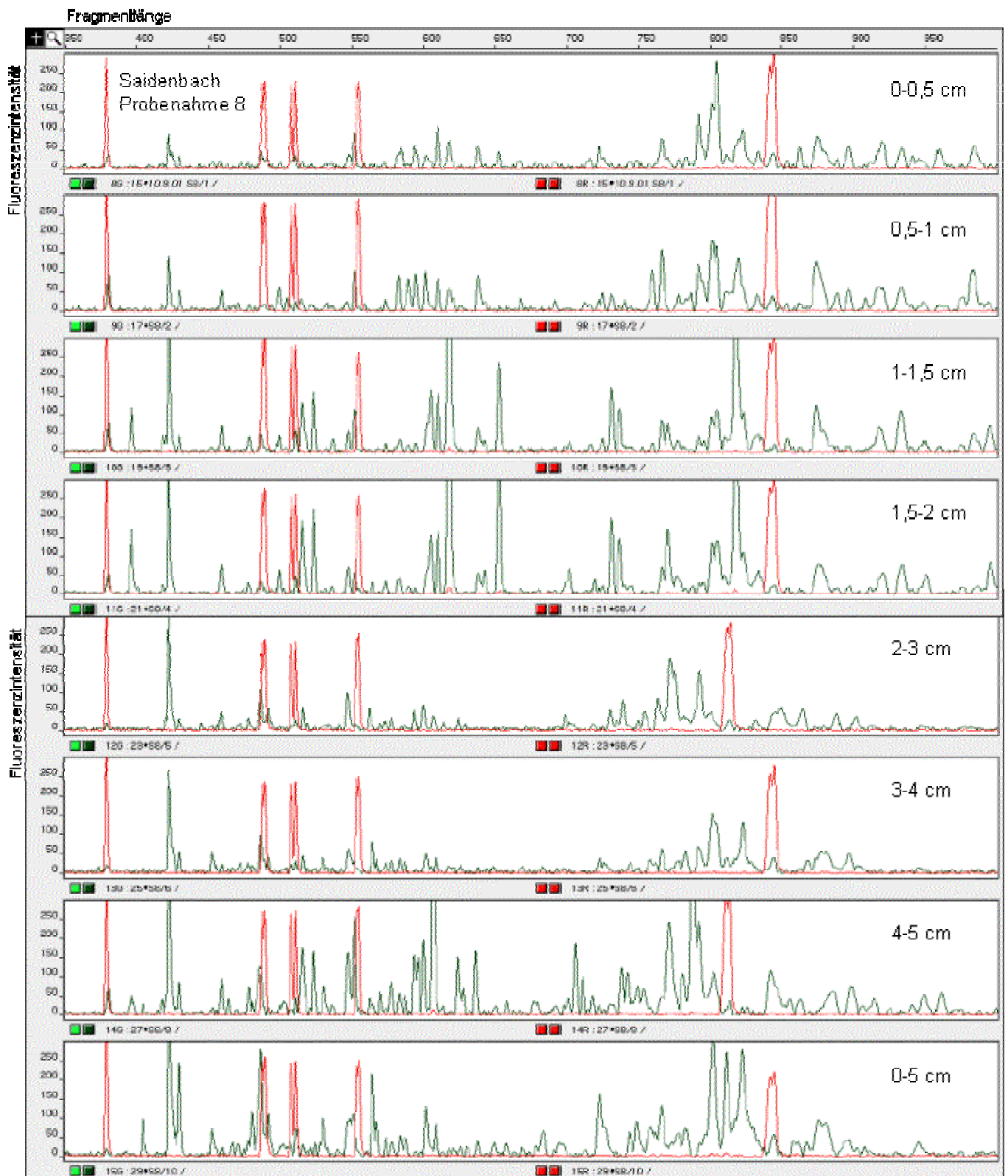
Anhang; Abbildung A3 Spacerlängenbestimmung von *Bacillus*-Spezies (grün), Standard (rot)

Innerhalb der untersuchten *Bacilli* konnte keine Clusterbildung beobachtet werden. Dargestellt sind die Peakmuster von *B. licheniformis*, *B. cereus* und *B. subtilis*. Die Fragmentlängen wurden anhand eines mitgeführten Standards ermittelt.

Anhang; Tabelle A1 Anzahl detektierter Spacerlängen und Anzahl rRNA-Operons

Spezies	Anzahl verschiedener Spacerlängen	Anzahl der rRNA-Operons (Datenbank)
<i>Bacillus licheniformis</i>	3	nicht bekannt
<i>Bacillus cereus</i>	4	9
<i>Bacillus subtilis</i>	2	10
<i>Streptococcus equi</i>	1	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	4
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	6
<i>Streptococcus bovis</i>	4	nicht bekannt
<i>Pasteurella canis</i>	2	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	6
<i>Legionella sainthelens</i>	2	nicht bekannt
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1	1
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	4	nicht bekannt
<i>Aeromonas caviae</i>	4	10
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1	nicht bekannt
<i>Pseudomonas veronii</i>	1	nicht bekannt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	4
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7	4
<i>Corynebacterium asperum</i>	1	nicht bekannt
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	5	nicht bekannt
<i>Escherichia coli</i>	3	7
<i>Proteus mirabilis</i>	5	7
<i>Citrobacter freundii</i>	2	7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	nicht bekannt
<i>Enterobacter cancerogenes</i>	6	nicht bekannt
<i>Hafnia alvei</i>	6	nicht bekannt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	nicht bekannt
<i>Shigella sonnei</i>	3	7
<i>Shigella flexneri</i>	3	7
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	7
<i>Salmonella paratyphi</i>	4	7
<i>Salmonella enteritidis</i>	4	7

Die Anzahl der Spacer ist speziesspezifisch. Jedoch weisen einige Spacer verschiedener Organismen gleiche Längen auf, sodass in der Elektrophorese nur ein Peak erscheint.



Anhang; Abbildung A4 Spaceranalyse von Sedimentproben aus der Talsperre Saidenbach (grün), Standard (rot)

Dargestellt sind alle analysierten Horizonte, Restriktionsverdau mit *MspI*. Im Gegensatz zu den tieferen Horizonten trat in den Horizonten 1-1,5 cm; 1,5-2 cm und 4-5 cm die Spacerlänge von 397 bp auf. Unterhalb 1,5 cm wurde ein Peak bei 702 bp detektiert. Das weist auf Spezies oder Gattungen hin, welche durch temporäre Einträge in die Talsperre eingespült wurde.

Anhang; Tabelle A2 Sequenzen der Talsperre Saidenbach

Sequenz	Anzahl	Accession-Number	Prozentuale Homologie
EMBL: <i>Mycobacterium</i> IWGMT 90093 RIDOM: <i>Mycobacterium wolinsky</i>	62	X88910	95,7-97,5% 95,5-96,8%
EMBL: <i>Mycobacterium</i> sp. 'MCRO 33' RIDOM: <i>Mycobacterium wolinsky</i>	9	AF152559	96,2-97,0% 96,7%
EMBL: <i>Mycobacterium</i> sp. (strain MCRO 7) RIDOM: <i>Mycobacterium moriokaense</i> / <i>M. confluentis</i>	9	X93033	96,2-98,5% 96,8-98,7%
EMBL: <i>Mycobacterium elephantis</i> RIDOM: <i>Mycobacterium moriokaense</i>	9	AJ010747	96,0-98,2% 96,3-97,9%
EMBL, RIDOM: <i>Mycobacterium komossense</i>	7	X55591	95,1-96,9%
EMBL: <i>Mycobacterium ratisbonense</i> RIDOM: <i>Mycobacterium komossense</i>	4	AF055331	96,2-96,8% 96,5%
EMBL, RIDOM: <i>M. wolinsky</i> strain ATCC 700010	3	Y12873	96,5-96,8%
EMBL: <i>Mycobacterium</i> sp. RJGII-135 RIDOM: <i>Mycobacterium rhodesiae</i>	1	U30661	96,9% 96,6%
EMBL, RIDOM: <i>Mycobacterium confluentis</i>	1	X63608	97,8%
EMBL: <i>Mycobacterium shimoidei</i> RIDOM: <i>Mycobacterium cookii</i>	1	X82459	96,1% 95,0%
EMBL: <i>Mycobacterium</i> sp. (strain MCRO 17) RIDOM: <i>Mycobacterium moriokaense</i>	1	X93028	97,3% 97,6%
EMBL: <i>Mycobacterium</i> sp. (strain 89-446) RIDOM: <i>Mycobacterium wolinsky</i>	1	X93995	95,5% 95,6%

12 verschiedene Mykobakteriensequenzen wurden in 108 sequenzierten rekombinanten Klonen detektiert. Dabei wurde der größte Teil durch *Mycobacterium* IWGMT 90093 (EMBL-Identifizierung) bzw. *M. wolinsky* (RIDOM-Identifizierung) repräsentiert.

VIII DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. I. Röske und Herrn Dr. M. Schuppler für die Bereitstellung des Themas sowie für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, welche mir wertvolle inhaltliche und praktische Anregungen für die Ausfertigung der Arbeit lieferte. Bei Herrn Prof. Dr. med. E. Jacobs möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene bedanken. Herrn Prof. Dr. M. Göttfert und Herrn Prof. Dr. U. Szewzyk danke ich ganz herzlich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Allen Freunden und Kollegen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung und konstruktiven Ratschläge danken. Besonders danke ich Silke Rachlitz für die unentwegte Unterstützung im Laboralltag. Uwe Jungnickel sei Dank für die Behebung der diversen (technischen) SOS-Notrufe und Volker Bellmann für die Fotoarbeiten. Ein weiteres Dankeschön gilt Diana Günther und Ines Wolf für die abendlichen Spezialseminare und den moralischen Beistand.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Angewandte Mikrobiologie der TU Dresden bedanken, insbesondere bei Dr. A. Wobus und M. Eschenhagen für die wertvollen bis essentiellen Ratschläge und die gute Zusammenarbeit. S. Maaßen danke ich für die organisatorische Planung und Probenahme.

Meinen Praktikanten (Kathleen Herzog, Helena Hempel, Jens Knauer und Anja Offelder) und Diplomanden (Jana Wohlfarth und Frank Ludwig) sei Dank für die vielschichtigen Diskussionen und ihre Unermüdlichkeit.

Für die Förderung meiner Arbeit möchte mich herzlich beim BMBF bedanken.

Ganz besonders danke ich Beule für die aufgebrauchte unendliche Geduld, für die moralische Unterstützung und dass er mir gezeigt hat, dass es auch außerhalb der Wissenschaft noch viele wichtige Dinge gibt, z.B. das Leben. Bei allen Freunden bedanke ich mich für die Entspannungspausen, und besonders beim Bäcker für das sorgfältige Korrekturlesen.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema

Molekularbiologische Analyse mikrobieller Gemeinschaften
in Talsperrensedimenten

selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen ein.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 03.02.04

Catrin Bleul

Diese Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Prof. Dr. Isolde Röske (Institut für Mikrobiologie) und Herrn Dr. Markus Schuppler (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene) angefertigt und vom BMBF gefördert.