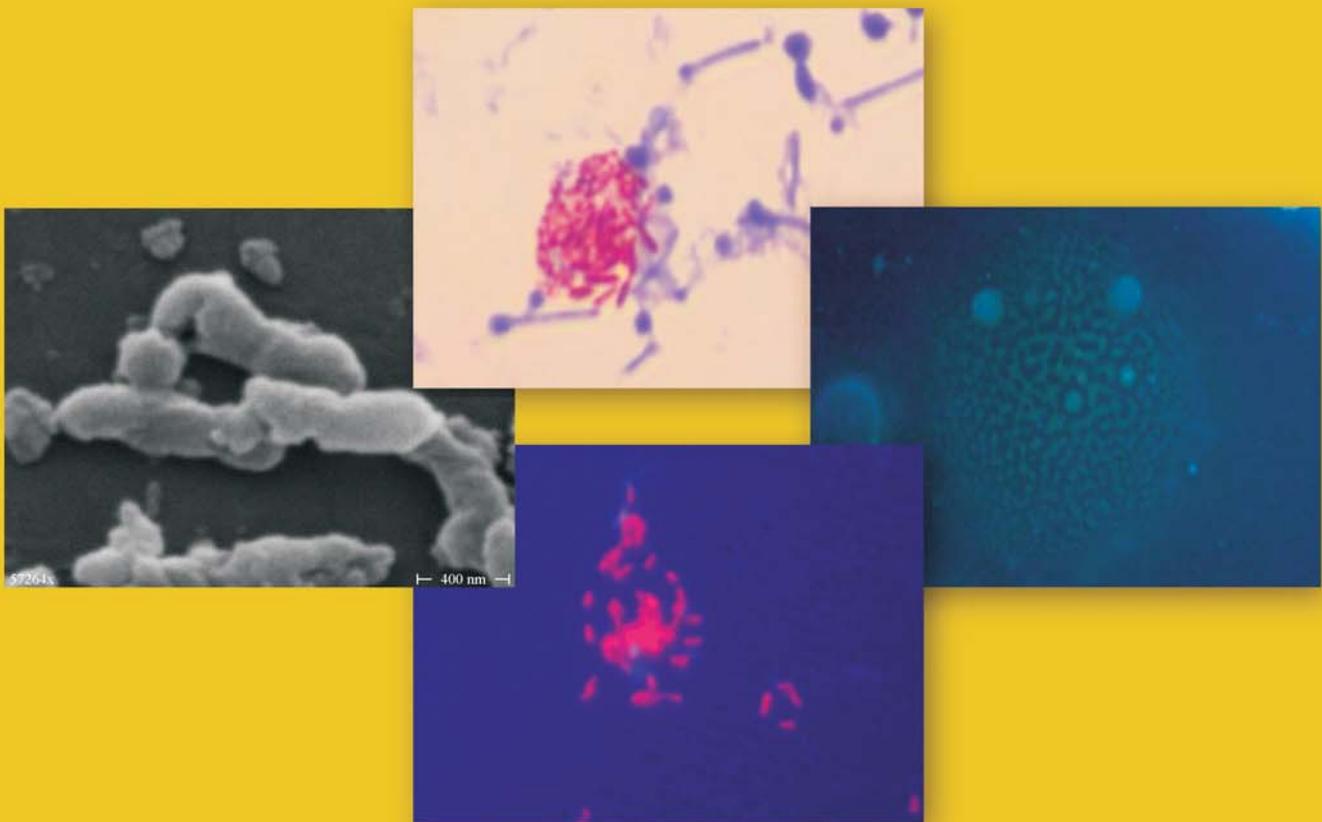


**René Kaden**

# **Mikrobiologische Gewässeranalytik**

**Am Beispiel der Untersuchung einer Trinkwassertalsperre**



René Kaden

**Mikrobiologische Gewässeranalytik**

Am Beispiel der Untersuchung einer Trinkwassertalsperre

ISBN: 978-3-8366-1741-3

Herstellung: Diplomica® Verlag GmbH, Hamburg, 2009

Zugl. Diplomica Verlag GmbH, Hamburg, Deutschland, Fachbuch

---

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden und der Verlag, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

© Diplomica Verlag GmbH

<http://www.diplomica.de>, Hamburg 2009

## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis .....  | I   |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | III |
| 1 Einleitung .....  | 1   |
| 1.1 Ökologie von Talsperren .....   | 1   |
| 1.2 Die Talsperre Saldenbach .....  | 3   |
| 1.3 Aspekte der Trinkwasseraufarbeitung .....                                       | 6   |
| 1.4 Mikrobielle Biozönose .....   | 7   |
| 1.4.1 Phagen .....  | 8   |
| 1.4.2 Mycobakterien .....   | 11  |
| 1.5 Zielstellung .....  | 13  |
| 2 Material und Methoden .....   | 14  |
| 2.1 Bakterienstämme, Phage, Plasmid .....   | 14  |
| 2.2 Nährmedien .....  | 15  |
| 2.2.1 Nährmedium zur Anzucht von <i>E. coli</i> bei der Klonierung .....            | 15  |
| 2.2.2 Nährmedien zur Untersuchung biochemischer Stoffwechselleistungen .....        | 16  |
| 2.2.3 Mycobakterien-Kultivierung .....  | 22  |
| 2.2.4 Medien zur Phagen-Untersuchung .....  | 23  |
| 2.3 Probenahme und Abtrennung .....   | 24  |
| 2.4 Molekularbiologische Methoden .....   | 27  |
| 2.4.1 DNA-Extraktion .....  | 27  |
| 2.4.1.1 Fast DNA® Spin for Soil (Q Biogene) .....                                   | 27  |
| 2.4.1.2 Bead Beater- Aufschluß .....  | 28  |
| 2.4.1.3 QIAamp® DNA-Stool Mini Kit (Qiagen 2001) .....                              | 28  |
| 2.4.1.4 QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen 2003) .....                              | 28  |
| 2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....   | 28  |
| 2.4.2.1 Primer .....  | 29  |
| 2.4.2.2 PCR-Programme .....   | 30  |
| 2.4.3 Gelelektrophorese und DNA-Detektion .....                                     | 30  |
| 2.4.4 DNA-Extraktion aus Agarosegel .....   | 31  |
| 2.4.5 Klonierung (Invitrogen 2004) .....  | 32  |
| 2.4.6 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) .....                        | 33  |
| 2.4.7 Sequenzierung .....   | 33  |
| 2.4.7.1 Aufreinigung der Proben für die Sequenzier-PCR .....                        | 34  |
| 2.4.7.2 Sequenzier-PCR .....  | 34  |
| 2.4.7.3 Aufreinigung der Proben für die Sequenzierung .....                         | 34  |
| 2.4.7.4 Sequenzierung .....   | 35  |
| 2.4.8 Datenbank NCBI Blast .....  | 35  |
| 2.4.9 Catalyzed reporter deposition fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung ..... | 36  |
| 2.4.9.1 Puffer und Lösungen für CARD FISH .....                                     | 36  |
| 2.4.9.2 Fixierung und Lysozym-Behandlung .....                                      | 37  |
| 2.4.9.3 Hybridisierung und Sonden .....   | 38  |
| 2.4.9.4 Fluoreszenzmikroskopie .....  | 40  |
| 2.5 Bakteriophagen-Plaquetest .....   | 41  |
| 2.5.1 Phagenextraktion .....  | 41  |
| 2.5.2 Somatische Coliphagen .....   | 41  |
| 2.5.3 F-spezifische Bakteriophagen .....  | 43  |
| 2.6 Kultivierung und Bestimmung von Mikroorganismen .....                           | 44  |
| 2.6.1 Bakterienkultur auf Wassermedium .....  | 44  |
| 2.6.2 BIOLOG .....  | 45  |

## Inhaltsverzeichnis

---

|  |     |
|--|-----|
| 2.6.2.1 Biolog Sedimentproben.....                                       | 45  |
| 2.6.2.2 Biolog Reinkulturen.....   | 46  |
| 2.6.3 Mycobakterien .....  | 47  |
| 2.6.3.1 Mycobakterien-Kultur.....  | 47  |
| 2.6.3.2 Färbemethoden für Mycobakterien.....                             | 48  |
| 2.6.3.3 Identifizierung von Mycobakterien.....                           | 49  |
| 2.6.4 Rasterelektronenmikroskopie.....                                   | 50  |
| 3 Ergebnisse und Diskussion .....  | 51  |
| 3.1 Phagenuntersuchung .....   | 51  |
| 3.2 CARD-FISH.....   | 55  |
| 3.2.1 Vergleich kumulative Berechnung vs. Einzelwertbetrachtung.....     | 55  |
| 3.2.2 Vergleich ALF1b mit ALF968 .....                                   | 56  |
| 3.2.3 Allgemeine Verteilung der Bakteriengruppen .....                   | 59  |
| 3.2.4 Jahreszeitliche Betrachtung der Bakteriengruppen im Sediment ..... | 62  |
| 3.2.5 Auftreten der Bakteriengruppen 2005 und 2006.....                  | 64  |
| 3.2.6 Tiefenprofilabhängige Verteilung der Bakterien im Sediment.....    | 65  |
| 3.3 Allgemeine 16S-Klonierung und Sequenzierung .....                    | 69  |
| 3.3.1 Artenspektrum.....   | 72  |
| 3.3.2 Jahreszeitlicher Vergleich.....                                    | 73  |
| 3.3.3 Vergleich Pelagial und Sediment.....                               | 76  |
| 3.3.4 Besonderheiten der Proben der Vorsperre Forchheim.....             | 76  |
| 3.4 Vergleich der Ergebnisse von CARD FISH und Klonierung .....          | 77  |
| 3.5 Untersuchung bakterieller Stoffwechseleistungen mittels BIOLOG.....  | 80  |
| 3.5.1 Average Well Color Development (AWCD).....                         | 80  |
| 3.5.2 Vergleich der Proben .....   | 81  |
| 3.6 Wassermedium Kulturen.....   | 85  |
| 3.6.1 Charakterisierung der Kulturen auf Wassermedium.....               | 85  |
| 3.6.1.1 Koloniemorphologie .....   | 85  |
| 3.6.1.2 Gruppierung anhand von Restriktionsmustern .....                 | 87  |
| 3.6.1.3 Sequenzierung.....   | 88  |
| 3.6.2 Charakterisierung einer neuen Spezies .....                        | 92  |
| 3.6.2.1 Molekularbiologische Untersuchung .....                          | 92  |
| 3.6.2.2 Physiologische Parameter .....                                   | 94  |
| 3.6.2.3 BIOLOG.....  | 95  |
| 3.6.2.4 Durchlichtmikroskopie.....                                       | 96  |
| 3.6.2.5 Rasterelektronenmikroskopie.....                                 | 96  |
| 3.6.3 Abgrenzung der neuen Spezies von bekannten Arten .....             | 97  |
| 3.7 Mycobakterien .....  | 99  |
| 3.7.1 Mycobakterien PCR.....   | 99  |
| 3.7.1.1 Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden .....            | 99  |
| 3.7.1.2 Primervergleich.....   | 99  |
| 3.7.1.3 Mycobakterien im Sediment – Nachweis mittels PCR.....            | 100 |
| 3.7.2 Mycobakterien RFLP und Sequenzierung.....                          | 100 |
| 3.7.5 Mycobakterien-Kultur.....  | 104 |
| Zusammenfassung.....   | 107 |
| Tabellenanhang .....   | 109 |
| Literatur.....   | 138 |
| Internetquellen und Datenbanken .....                                    | 146 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| $\lambda$      | Wellenlänge [nm]  |
| $\mu$          | mikro ( $10^{-6}$ )   |
| A              | Adenin  |
| Abb.           | Abbildung   |
| Aqua dest.     | Destilliertes Wasser  |
| AWCD           | Average Well Color Development, Durchschnittliche Farbentwicklung       |
| b              | Basen   |
| bp.            | Basenpaare  |
| C              | Cytosin   |
| CARD-FISH      | catalyzed reporter deposition fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung |
| CF             | Cytophaga- Flavobakterien (Sonde CARD FISH)                             |
| DAPI           | 4'-6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid                             |
| ddNTP          | di- Desoxynukleotide  |
| DEPC           | Diethylidicarbonat  |
| DES            | DNA Elution Solution Ultra pure water                                   |
| DIN            | Deutsche Industrienorm  |
| DIS            | Draft International Standard  |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP           | Desoxynukleotide  |
| dsDNA          | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure                                  |
| E              | <u>E</u> ntnahmestelle an der Staumauer                                 |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>   |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat  |
| F              | Probenahmestelle Vorsperre <u>F</u> orchheim                            |
| Fa.            | Firma   |
| FISH           | fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung                               |
| FITC           | Fluoreszein-5-isothiocyanat   |
| g              | Gramm   |
| G              | Guanin  |
| GC             | Mol % Guanin und Cytosin  |
| H              | Probenahmestelle <u>H</u> aselbach                                      |
| H              | Geißeln (H- Antigen)  |
| h              | Stunde  |
| ha             | Hektar  |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                 |   |
|-----------------|---|
| HCl             | Salzsäure   |
| HGC             | hoher Guanin – Cytosin- Gehalt (Sonde für CARD FISH)              |
| IJSEM           | International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology |
| IPTG            | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid                              |
| IS              | Insertionssequenz   |
| ISO             | International Standards Organisation                              |
| Kap.            | Kapitel   |
| kB              | Kilobasen   |
| KbE             | Koloniebildende Einheiten   |
| km <sup>2</sup> | Quadratkilometer  |
| l               | Liter   |
| LB              | Luria- Bertani (Medium)   |
| LTV             | Landestalsperrenverwaltung  |
| m               | milli (10 <sup>-3</sup> )   |
| M               | Molar   |
| m <sup>3</sup>  | Kubikmeter  |
| MAC             | <i>Mycobacterium avium</i> Complex                                |
| Mio.            | Million   |
| MSA             | Modified SCHOLTENS' - Agar  |
| MSB             | Modified SCHOLTENS' - Broth                                       |
| MTZ             | Medizinisch Theoretisches Zentrum der Universitätsklinik Dresden  |
| NaCl            | Natriumchlorid  |
| NCBI            | National Center for Biotechnology Information                     |
| NN              | Höhe über Normal Null   |
| Nr.             | Nummer  |
| OD              | Optische Dichte   |
| PACT            | Antibiotikasupplement für Mycobakterien- Nährböden                |
| PBS             | phosphate buffered saline (Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung)   |
| PCR             | polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion              |
| PFA             | Paraformaldehyd   |
| pfp             | Plaque forming particles  |
| PI              | Propidiumiodid  |
| plp             | phage-like particles  |
| REM             | Rasterelektronenmikroskop   |
| RF              | Replikative Form  |
| RFLP            | Restriktions- Fragment- Längenpolymorphismus                      |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                |   |
|----------------|---|
| RNA            | Ribonukleinsäure                                |
| rpm            | Umdrehungen pro Minute                          |
| S              | Probenahmestelle <u>S</u> aidenbach             |
| SAA            | Standardarbeitsanweisung                        |
| SDS            | sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)   |
| SEWS-M         | Salz- Ethanol- Waschlösung                      |
| SLS            | Sample Loading Solution                         |
| sp.            | Species   |
| spp.           | Species (Plural)                                |
| ss             | semi solid, halbfest                            |
| ssDNA          | einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure          |
| ssp.           | Subspecies                                      |
| T              | Thymin  |
| <i>Taq</i>     | <i>Thermus aquaticus</i>                        |
| T <sub>m</sub> | Schmelztemperatur                               |
| TRBA           | Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe |
| Tris           | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan                |
| TTC            | Triphenyltetrazoliumchlorid                     |
| TVO            | Trinkwasserverordnung                           |
| TYGA           | Tryptone- yeast extract- Glucose Agar           |
| TYGB           | Tryptone- yeast extract- Glucose Broth          |
| U              | unit (Einheit der Enzymaktivität)               |
| UV             | Ultraviolett                                    |
| vs.            | versus; im Vergleich mit                        |
| X-Gal          | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galactosid           |
| z.B.           | zum Beispiel                                    |

# 1 Einleitung

## 1.1 Ökologie von Talsperren

Talsperren dienen hauptsächlich der Trinkwasserversorgung, der Energiegewinnung und dem Hochwasserschutz. Allerdings bedingen sie auch, daß weltweit 20 % der jährlichen Sedimentfracht der Flüsse zurückgehalten wird. Das entspricht  $2-5 \cdot 10^9$  metrischen Tonnen Sediment, welche die Weltmeere nicht erreichen (TAKEUCHI 1996). Außerdem führen Talsperren zu einer Unterbrechung von Fluß-Ökosystemen, was auf Fische einen enormen Einfluß hat. So erreichen wandernde Fische ohne extra angelegte Fischtreppe ihre Laichplätze nicht mehr. Außerdem entspricht die Wasserbeschaffenheit nach einer Talsperre nie der, die der Fluß ohne das Bauwerk aufweisen würde (SCHÖNBORN 2003). Allerdings stellen Talsperren auch einen neuen Lebensraum für Spezies dar, welche sich nicht in Flüssen ansiedeln würden und führten so zur Entstehung völlig neuer Ökosysteme. Diese werden maßgeblich durch die Verfügbarkeit der Nährstoffe, welche entweder allochthonen oder autochthonen Ursprungs sein können, beeinflusst.

Unter Nährstoffen versteht man neben organisch gebundenem Kohlenstoff insbesondere Phosphor- und Stickstoffverbindungen. Letztere werden neben dem Eintrag durch die Landwirtschaft aus dem Boden ausgespült, wo im Frühjahr die Mineralisierungsrate durch Ammonifikation und folgende Nitrifikation steigt. In saurer Nadelstreu, welche im Einzugsgebiet der untersuchten Talsperre Saidenbach als Auflage dominiert, erreicht die Mineralisierung bei 20 °C ein Optimum. Die Nitrifikation wird nicht durch  $\text{NH}_3$ -Mangel begrenzt, da die Ammonifikationsrate in Nadelstreuauflagen stets höher ist als die Nitrifikationsrate (FRANK 1996). Mittels des Gehaltes an Phosphor können Gewässer einer Trophiestufe zugeordnet werden. So wurden nach einer Empfehlung von CARLSON (1977) die in Tabelle 1.1 aufgeführten Trophiegrade festgelegt.

Tabelle 1.1: Trophiestufen von Gewässern (nach CARLSON 1977, WETZEL 1983)

| Trophiestufe     | Trophieindex | $\text{P}_{\text{tot}}$ | Chlorophyll | Secchi-Tiefe |
|------------------|--------------|-------------------------|-------------|--------------|
| ultra-oligotroph | <20          | <3 µg/l                 | <0,3 µg/l   | >16 m        |
| oligotroph       | 20-35        | 3-9 µg/l                | 0,3-2 µg/l  | 7-16 m       |
| mesotroph        | 35-50        | 9-24 µg/l               | 2-6 µg/l    | 2-6 m        |
| eutroph          | 51-65        | 24-75 µg/l              | 6-40 µg/l   | 0,75-2 m     |
| hypereutroph     | >65          | >75 µg/l                | >40 µg/l    | <0,75 m      |

Die Bestimmung des Trophiegrades eines Gewässers erfolgt zur Frühjahrsvollzirkulation, da sich der Nährstoffgehalt im Jahresverlauf ändert. So führt zum Beispiel der Nährstoffreichtum des Gewässers im Frühjahr zu einer Massenentwicklung von Diatomeen. Diese entwickeln sich bis zur Sommerstagnation und sedimentieren nach dem Absterben aufgrund ihrer relativ hohen Dichte, welche durch ihre Kieselsäurehüllen bedingt ist (UHLMANN 2001). Dabei wird der in den Bakterien gebundene Phosphor temporär im Sediment abgelagert.

Häufig liegt Phosphat im Sediment an dreiwertige Eisenionen gebunden vor. Herrschen dort anoxische Verhältnisse, bedingt das niedrige Redoxpotential eine Eisensulfidbildung unter Freisetzung der Phosphationen, was zur Eutrophierung führt. Daher sollte der Nitratgehalt des Sedimentes nicht zu stark absinken (persönliche Mitteilung BENNDORF 2005).

Für die Verteilung von Nährstoffen bzw. von Mikroorganismen, die einen großen Teil davon umsetzen, ist unter anderem die Vollzirkulation eines Gewässers von Bedeutung. Beeinflusst wird dieses Ereignis maßgeblich durch die sich ändernde Dichte des Wassers bei Temperaturänderung, das Verhältnis zwischen Tiefe und Oberfläche des Gewässers sowie die Schergeschwindigkeit von Luftströmungen. Viele Talsperren sind aufgrund ihrer relativ großen Oberfläche und geringen Tiefe dimiktisch. Das bedeutet, daß eine Frühjahrs- und Herbstvollzirkulation stattfindet. Diese Prozesse führen dazu, daß nicht nur die Nährstoffe verteilt werden, sondern auch Habitate zerstört und viele neue ökologische Nischen geschaffen werden. Die Intermediate Disturbance Hypothesis besagt, daß sich direkt nach massiven Störungen eines Ökosystems mehr Arten ansiedeln als vor dem Ereignis. Diese Störungen müssen in zeitlichen Intervallen erfolgen, in denen die Organismen sich nicht nur ansiedeln, sondern auch anpassen können. Nach der Vollzirkulation ist demnach auch eine größere Artenzahl an Organismen im Wasser zu erwarten.

Neben den abiotischen Faktoren haben auch die biotischen einen großen Einfluß auf ein Ökosystem. Die Vielfalt an Interaktionen zwischen den unzähligen Lebewesen ist außerordentlich groß. So existieren unter anderem neben symbiontischen oder kommensalischen auch parasitäre oder Räuber-Beute-Beziehungen. Letztere werden durch den Fraßdruck (top-down) bzw. Beutemangel (bottom-up) reguliert (MC QUEEN 1986). So kann ein Ökosystem nur funktionieren, wenn wenigstens die untersten trophischen Ebenen verfügbar sind. Das sind bezogen auf die Talsperren die Produzenten, welche aufgrund ihrer autotrophen Lebensweise anorganische in organische Biomasse umwandeln, sowie die heterotrophen Primär- bzw. Sekundärkonsumenten. Überaus wichtig für ein Ökosystem sind auch die Destruenten, welche durch Mineralisation organischen Materials Nährelemente in den Kreislauf zurückführen. Diese Leistung wird vor allem von Bakterien, welche in allen Bereichen der Talsperre vorkommen, vollbracht. Diese können entweder frei suspendiert, an anorganischem Material oder als Aggregation z.B. in Biofilmen vorkommen. Die Mikroorganismen können neben ihrer Aufgabe als terminale Zersetzer jedoch auch als Produzenten ganz am Anfang der Nahrungskette stehen. Ein Beispiel dafür sind die photoautotroph lebenden Cyanobakterien. Da der größte Teil der Bakterienspezies noch nicht bekannt ist, lassen sich keine endgültigen Aussagen über die Gesamtheit der mikrobiellen Interaktionen treffen. Um diese Wechselbeziehungen zu erforschen, bedarf es einer Kultivierung der Bakterien. Das ist jedoch, in Abhängigkeit vom Habitat der Mikroorganismen bisher nur bei 0,001 % bis 15 % der Spezies gelungen. Aus dem Wasser mesotropher Seen konnten nur 0,1 bis 1 % der Bakterien kultiviert werden (AMANN 1995).

## **1.2 Die Talsperre Saidenbach**

Die Talsperre Saidenbach wurde in den Jahren 1929 bis 1933 erbaut. Sie ist mit einem Stauraum von 22,38 Mio. m<sup>3</sup> die größte Trinkwassertalsperre im Mittleren Erzgebirgskreis und zählt neben der Talsperre Eibenstock, welche einen Stauraum von 75 Mio. m<sup>3</sup> aufweist, zu den größten Trinkwasserreservoirs Sachsens. Die Talsperre Saidenbach versorgt die Wasserwerke Einsiedel und Zschopau mit Rohwasser. Die mittlere Abgabemenge beträgt dabei 780 l/s. Gestaut wird der Wasserlauf des Saidenbaches, des Haselbaches, des Lippersdorfer Baches und des Hölzelbergbaches, welche über 10 Vorbecken und eine Vorsperre die Talsperre erreichen. Bei Vollstau hat die Talsperre eine Wasseroberfläche von 146,41 ha. Aufgrund des Verhältnisses zwischen Tiefe und Oberfläche findet im Wasserkörper unter normalen Bedingungen eine Frühjahrs- und Herbstvollzirkulation statt. Die Talsperre ist dimiktisch. Das Wassereinzugsgebiet umfaßt eine Fläche von 60,783 km<sup>2</sup> und wird zu 72% landwirtschaftlich genutzt (LTV 2006). Der mesotrophe Status der Talsperre Saidenbach (WOBUS 2003) entwickelte sich in den letzten Jahren immer mehr in Richtung der Oligotrophie. Dies ist größtenteils auf die Nutzung phosphatfreier Waschmittel seit den 90er Jahren zurückzuführen. Auch eine effektivere Durchsetzung der Einhaltung von Schutzzonen bezüglich landwirtschaftlicher Nutzung seit den 90er Jahren hat zu einem Rückgang der Nährstoffeinträge geführt.

Neben der Trinkwasserbereitstellung dient die Talsperre Saidenbach auch dem Hochwasserschutz. Ein Überlaufen während des Hochwassers von 2002, bei welchem auch viele Erzgebirgsbäche extrem hohe Pegel aufwiesen, konnte jedoch nicht verhindert werden. Dieses Extremereignis hatte einen entscheidenden Einfluß auf das Ökosystem der Talsperre. So wurden zum Beispiel unzählige Karpfen, welche sich im Normalfall in größeren Tiefen aufhalten, über den Überlauf aus dem Gewässer gespült (UHLIG 2006, persönliche Information). Nach diesem Ereignis wurden neu geschaffene ökologische Nischen besiedelt sowie Interaktionen zwischen den Spezies bzw. den Arten und ihrer Umgebung ausgebildet.

Diese Arbeit soll den Gewässerkomplex der Talsperre Saidenbach hinsichtlich einiger ausgewählter ökologischer Gesichtspunkte mit dem Schwerpunkt der mikrobiellen Biozönose charakterisieren. Die Untersuchungsobjekte sind die Talsperre Saidenbach mit den Probenahmestellen E (Entnahmestelle), S (Saidenbach) und H (Haselbach) sowie die Vorsperre Forchheim mit der Probenahmestelle F. Die geographische Lage der Gewässer sowie die näherungsweise Angabe der Beprobungsstellen sind aus Abbildung 1.1 ersichtlich.

Die Talsperre Saidenbach sowie die Vorsperre Forchheim befinden sich im Mittleren Erzgebirgskreis in Sachsen, in der Nähe von Marienberg. Die Zuläufe erreichen die Talsperre aus dem Kreis Freiberg bzw. dem Mittleren Erzgebirgskreis.

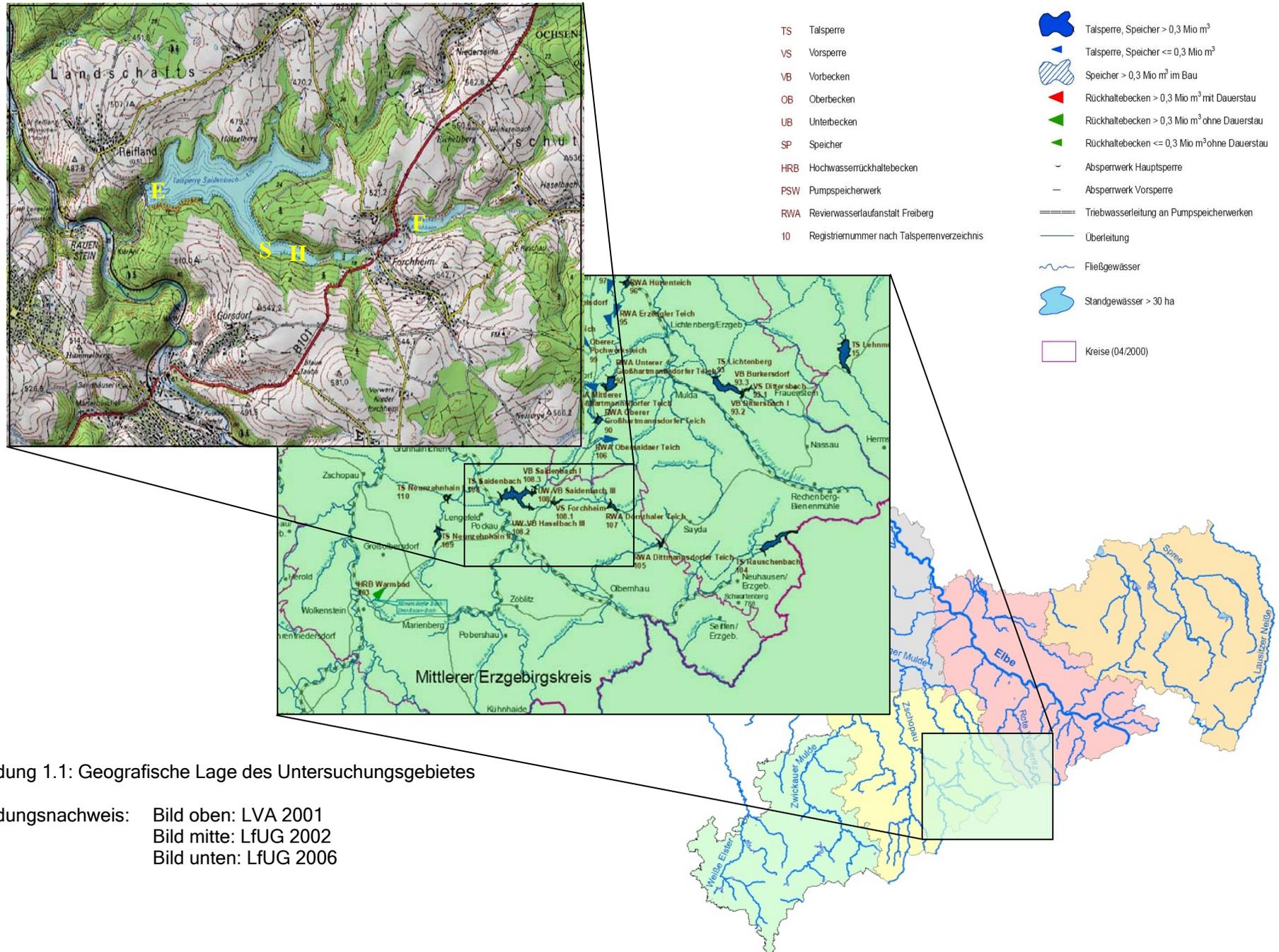


Abbildung 1.1: Geografische Lage des Untersuchungsgebietes

Abbildungsnachweis: Bild oben: LVA 2001  
 Bild mitte: LfUG 2002  
 Bild unten: LfUG 2006

Die Elimination des durch die Landwirtschaft eingetragenen Phosphors und Stickstoffs sowie von Schwebstoffen wird sowohl durch die Vorsperre Forchheim mit der Probenahmestelle F als auch durch 10 Vorbecken, wovon vier als Unterwasser- Vorsperren angelegt sind, realisiert. Die Unterwassersperre des Saidenbaches ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Verweildauer des Wassers in diesen nährstoffeliminierenden Becken sollte 3 bis 5 Tage betragen, um die Sedimentation von allochthonem Material und Phytoplanktern, welche zunächst frei verfügbares Phosphat binden, sicherzustellen. Bedingt durch diese Funktion ist eine Beräumung dieser Absetzbecken relativ häufig nötig (UHLMANN und HORN 2001).

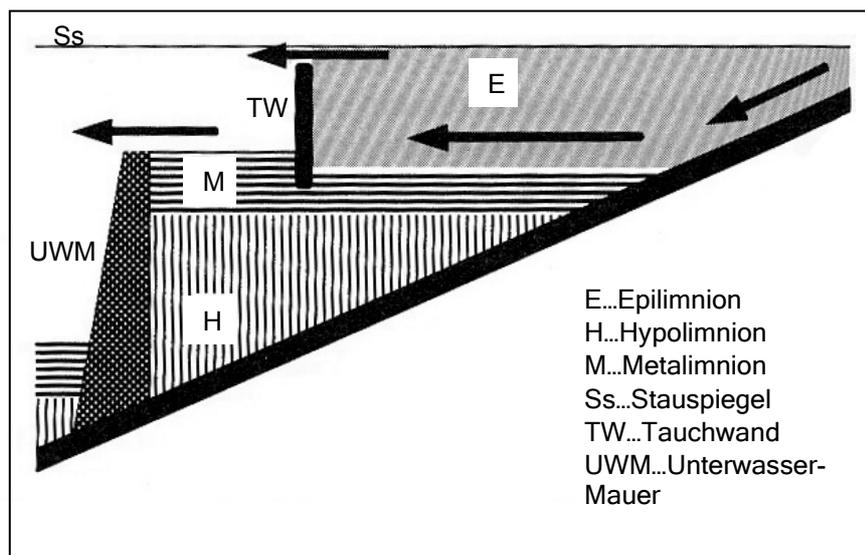


Abbildung 1.2: Unterwasser-Vorsperre der Talsperre Saidenbach, verändert nach Uhlmann und Horn 2001

Die Geschwindigkeit des Wassers wird an der Tauchwand herabgesetzt. Dadurch können Partikel geringerer Größe sedimentieren, welche sonst bei höheren Fließgeschwindigkeiten mitgerissen werden. Die Probenahmestelle H befindet sich in Fließrichtung direkt vor der Unterwassermauer, an welcher das Sediment folglich mächtiger ist als an der Probenahmestelle S, welche sich nach der Mauer befindet. Aufgrund der Architektur der Tauchwand und der Unterwassermauer gelangt nur das vorgereinigte meta- bzw. hypolimnische Wasser in die Talsperre Saidenbach. Die nächste und letzte Barriere in Fließrichtung stellt die Staumauer mit einer Höhe von 48 m und einer Länge von 334 m dar. Davor befindet sich die Probenahmestelle E. Das Sediment ist an dieser Stelle erwartungsgemäß am mächtigsten.

### 1.3 Aspekte der Trinkwasseraufarbeitung

Das Rohwasser der Talsperre Saidenbach wird in den Wasserwerken Zschopau und Einsiedel zu Trinkwasser aufgearbeitet. Um eine gleichbleibend gute Qualität des Trinkwassers zu gewährleisten, steht mit der novellierten Trinkwasserverordnung (TVO), inkraftgetreten 2003 (BGBl 2001), ein nationaler Standard zur Verfügung. Darin ist geregelt, daß je 1 ml Trinkwasser nicht mehr als 100 Bakterien mittels Kultivierung auf Nähragar bei Inkubation für 24 Stunden bei 20 °C bzw. 36 °C nachweisbar sein dürfen. Außerdem dürfen sich in 100 ml Wasser weder coliforme Keime, *E. coli* oder Fäkalstreptokokken sowie in Trinkwasser aus Oberflächengewässern keine Clostridien bzw. deren Sporen befinden. Coliforme Bakterien sind Indikatororganismen für fäkale Verunreinigung. Da sich im Falle des Auftretens humanpathogener Bakterien und Viren in einem Säugetierorganismus diese in den Fäkalien befinden, wird der Nachweis von coliformen Keimen bzw. Fäkalstreptokokken als Hinweis auf das mögliche Vorkommen potentieller Krankheitserreger gewertet. Im Rohwasser, so wie es in der Talsperre verfügbar ist, lassen sich allerdings coliforme Keime und gelegentlich *E. coli* nachweisen. Es ist die Aufgabe der Wasserwerke, die Trinkwasserqualität entsprechend der TVO sicherzustellen. Dafür werden neben physikalischen Fällungs- und Filtriermethoden auch diverse Desinfektionsmaßnahmen, wie zum Beispiel Chlorierung oder Ozonierung, durchgeführt. Die Effektivität dieser Behandlung ist unter anderem von der Behandlungsdauer, dem Wiederverkeimungspotential, der Konzentration der eingesetzten Substanz und der Resistenz bestimmter Mikroorganismen abhängig. In Abbildung 1.3 ist dargestellt, wie resistent Mikroorganismen bzw. biologische Strukturen wie Prionen gegenüber Desinfektionsmitteln im Allgemeinen sind.

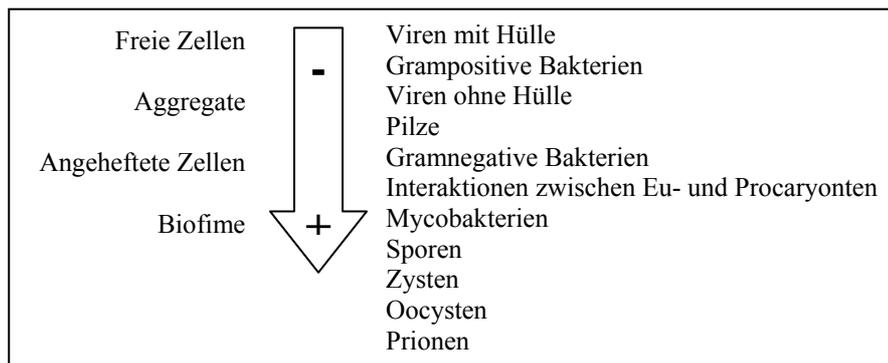


Abbildung 1.3: Resistenz gegenüber Bioziden (verändert nach MARA 2003)  
(- geringe Resistenz, + hohe Resistenz)

Interessant in Hinblick auf die Eliminierung von Krankheitserregern aus dem Trinkwasser ist die Tatsache, daß Mycobakterien, bedingt durch ihre Mykolsäure-Zellwand, relativ hohe Resistenzen gegenüber Desinfektionsmitteln aufweisen. Sehr resistent sind auch Interaktionen zwischen Pro- und Eukaryonten, wie sie zum Beispiel bei Legionellen vorkommen, oder Sporen, wie sie von Clostridien gebildet werden.

## 1.4 Mikrobielle Biozönose

Die mikrobielle Biozönose eines Gewässers ist durch diverse Interaktionen zwischen den Lebewesen gekennzeichnet. So gibt es neben den autotrophen Produzenten, welche anorganischen Kohlenstoff in organische Formen überführen, auch heterotrophe Organismen, welche diesen durch ihre Abbauleistung wieder zu Kohlendioxid oxidieren. Dabei kann es vorkommen, daß schwer zersetzbare Moleküle zum vollständigen Abbau zunächst von Mikroorganismen mit einem dafür prädestinierten Enzymbestand degeneriert werden müssen. Die so entstehenden Fragmente können wiederum durch andere Bakterien oder Pilze verwertet werden (RHEINHEIMER 1991). Viele Mikroorganismen verwerten Substrate unter Freisetzung von Verbindungen, welche durch andere Arten nutzbar sind. Die Spezies *Escherichia coli* und *Proteus vulgaris* können in Form einer Metabiose zum Beispiel ein Harnstoff-Lactose-Medium verstoffwechseln. *Escherichia coli* ist dabei in der Lage, Lactose zu zersetzen, während *Proteus vulgaris* Harnstoff abbaut. Die Spaltprodukte werden vom jeweils anderen Bakterium als C- bzw. N-Quelle genutzt (SCHWARTZ 1961). Als Interaktionen sind neben der Metabiose auch Aufwuchs, Kommensalismus, Symbiose, Konkurrenz, Grazing und Parasitismus zu beobachten (RHEINHEIMER 1991). Diese Wechselwirkungen finden auf so vielfältige Weise statt, daß erst ein geringer Teil davon verstanden ist.

Bakterien können im Wasser entweder frei suspendiert, in Flocken, als Aggregate oder oberflächenassoziiert an organischem sowie anorganischem Material als Biofilm vorkommen. In Sediment sind viele Spezies partikelgebunden.

Die meisten im Freiwasser und Sediment der gemäßigten Breiten natürlich vorkommenden Bakterienspezies sind psychrophil oder psychrotolerant. Diese Kaltwasseradaptation ermöglicht die Nutzung von Nährstoffressourcen in kühlen, tiefen Gewässerschichten bzw. im Winterhalbjahr.

Da der Bestand an Mikroorganismen in einem Gewässer so groß ist, daß eine komplette Erfassung mit derzeitigen Diagnosemethoden unmöglich ist, wurden, um Untersuchungen zu vereinheitlichen und vergleichbar zu machen, einige Bakterienspezies zu phylogenetischen Gruppen zusammengefaßt. Für diese Gruppen wurden spezielle Nachweismethoden entwickelt, mit welchen eine erste Charakterisierung einer Gewässer- bzw. Sedimentprobe durchgeführt werden kann. So werden zum Beispiel Archaea-spezifische Primer genutzt, um Aussagen über den Bestand der Archaeobakterien treffen zu können. In der Catalyzed Reporter Deposition Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (CARD FISH) kommen Oligonukleotidsonden zum Einsatz, mit welchen sich zum Beispiel die einzelnen Gruppen der Proteobakterien oder des Cytophaga-Flavobakterien-Komplexes nachweisen lassen.

### 1.4.1 Phagen

Eine besondere Form der Interaktion zwischen Mikroorganismen stellt die Beziehung zwischen Phagen und Bakterien dar.

Phagen sind Viren, welche Bakterien infizieren. Sie sind ubiquitär und befallen eine Vielzahl von Archae- und Eubakterienspezies, auch Cyanobakterien (SUTTLE 2000), Mycobakterien oder die zur Lebensmittelherstellung genutzten Lactobazillen (KUTTER 2005). Phagen sind die zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden „Lebensformen“ auf der Erde. Ihre Gesamtzahl wird weltweit auf  $10^{30}$  bis  $10^{32}$  geschätzt (KUTTER 2005). Selbst in voralpinen Gebirgsseen wurden Konzentrationen von bis zu  $2 \cdot 10^8$  plp ml<sup>-1</sup> nachgewiesen (BERGH 1989). Phagen sind nicht zur Eigenbewegung befähigt. Sie werden entweder im Wirtsorganismus transportiert oder mittels Diffusion in stehenden bzw. durch Strömung in fließenden limnischen oder marinen Systemen verfrachtet. Die Erkennung des Wirtes erfolgt durch spezifische Rezeptorareale an der Bakterienzellwand, welche durch Lipopolysaccharide bzw. Lipoproteide gebildet werden. Diese Domänen bedingen auch die Wirtsspezifität. Diese ist außerdem abhängig vom Trophiegrad des Gewässers. Je nährstoffreicher ein Ökosystem ist, desto höher ist die Wirtsspezifität (KUTTER 2005). Diese Selektivität kann dazu führen, daß nur noch einzelne Stämme einer Bakterienart durch eine Phagenspezies befallen werden können (BAROSS 1978).

Phagen besitzen eine überaus hohe Resistenz gegenüber UV- Licht der Wellenlänge 260 nm sowie einige Spezies gegenüber pH-Werten bis 3. Der normale Toleranzbereich liegt jedoch bei pH 5 bis pH 8 (KUTTER 2005).

#### F-spezifische Bakteriophagen

Einige Bakterien, wie z.B. *Salmonella typhimurium*, können filamentöse Ausstülpungen der Zelloberfläche, sogenannte Pili, ausbilden, welche dem Gentransfer innerhalb der Bakterienspezies dienen. Einige Phagenarten der Gruppen *Podoviridae* (DNA) bzw. *Leviviridae* (RNA) adsorbieren ausschließlich an spezifische Rezeptorareale an den Pili.

#### Infektionszyklus am Beispiel der T-Phagen:

Der Infektionszyklus bei T-Phagen wird eingeleitet, indem das Virus mit dem Schwanz an spezielle Rezeptordomänen bindet. Dabei wird die Phagenadsorption durch die Konzentration bestimmter Ionen, wie z.B. Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, im umgebenden Medium beeinflusst. Nach der Anheftung des Phagen erfolgt die Bindung der Spikes an die Wirtszellwand. Eine Kontraktion der viralen Schwanzröhre führt zur Beschädigung der äußeren Lagen der bakteriellen Zellwand. Deren Mureinschichten werden mittels Phagenlysozym in Disaccharide zerlegt. Nach vollständiger Penetration wird durch fortlaufende Kontraktion des Virus die Nukleinsäure aus dem Kopf des Phagen in den Wirt injiziert. Sofort beginnt in der Bakterienzelle die Translation der frühen Proteine.

Diese bedingen z.B. die Synthese und Methylierung der Phagen-DNA, so daß diese nicht durch das Restriktionssystem der Wirtsorganismen abgebaut wird. Die sogenannten späten Proteine sind hauptsächlich Struktureiweiße, welche zur Kapselsynthese notwendig sind. Ein enzymatisch wirkendes spätes Protein ist das zur Penetration der Wirtszelle notwendige Lysozym. Dieses wird terminal in den Phagenschwanz integriert (SCHUSTER 1998). Vor der Lyse der Bakterienzelle erfolgt das self-assembling der Viren, welches mittels bestimmter molekularer Konformationen der Strukturproteine realisiert wird. Das Platzen der Wirtszelle wird durch Lysine erreicht, welche die vier Hauptbindungen des Mureins hydrolysieren. Als konservierte Lysine werden Muramidase, Glucosamidase, Endopeptidase und L-Alanin-Amidase gebildet. Darüber hinaus können spezifische Substrate zur Lyse synthetisiert werden (KUTTER 2005). Bei Einzelstrang-DNA-Phagen, wie z.B.  $\Phi$ X174, wird nach Infektion zunächst aus der ssDNA ein Doppelstrang mittels der wirtseigenen DNA-Polymerase synthetisiert. Dieser wird als replikative Form (RF) bezeichnet. Je besser der Ernährungszustand einer Bakterienzelle ist, desto mehr Replikationsorte für RF sind vorhanden (SCHUSTER 1998).

### Temperente Phagen:

Unter temperenten Phagen versteht man Viren, welche sich zunächst in das bakterielle Genom integrieren und dort bei jeder Zellteilung an die nächste Generation weitergegeben werden. Es kommt erst zur Lyse des Wirtes, wenn ein spezifischer Repressor in der Bakterienzelle inaktiviert wird, was durch Stressoren wie UV-Licht, Mitomycin oder Ascorbinsäure geschehen kann. Die DNA der Phagen trägt Informationen, welche die Physiologie und die Morphologie der Bakterienzelle manipulieren können. So kann es zur Geißelbildung durch Phagenbefall kommen (SCHUSTER 1998). Manche apathogenen Bakterien werden nach Infektion mit Phagen humanpathogen. So wird erst nach Integration des *tox*-Genes des Phagen  $\beta$  in das Genom von *Corynebacterium diphtheriae* das Diphtherietoxin gebildet, was Membranschädigung, Herzschäden, vasomotorische Schocks und Blutungsneigung bedingt (SCHUSTER 1998). Weder der Phage noch das Bakterium sind einzeln für den Menschen pathogen. Ähnlich verhält es sich mit der Evolution von *Vibrio cholerae*. Die Pathogenität dieses Bakteriums wurde durch zwei Phagenspezies bedingt. Nach der Aufnahme des *tcp*-Operons vom VPI-1 Phagen ins bakterielle Genom wird der Rezeptor TCP exprimiert. An diesen Rezeptor bindet CTX $\Phi$ , ein temperenter Phage, welcher nach Insertion seiner DNA ins Wirtsgenom die Pathogenität des Bakteriums durch Bildung des Choleratoxins vermittelt (FARUQUE 1998). Auch die Produktion der zwei Shiga-Toxine Stx1 und Stx2 in *E. coli* O157:H7 wird durch Bakteriophagen induziert (DUMKE et al. 2004).

Viele Bakterien tragen temperente Phagen in ihrem Genom. Bei der Untersuchung der Sequenzdaten wurde festgestellt, daß bei Eliminierung der viralen DNA aus dem Genom eine Sequenzhomologie erreicht wird. Daher mußten einige bis dahin unterschiedliche Spezies zu einer Art zusammengefaßt werden (SCHUSTER 1998).