

Mikrobiologische Gewässeranalytik

Am Beispiel der Untersuchung
einer Trinkwassertalsperre

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

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 ALFIb 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 Stoffwechselleistungen 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