



Bayerisches Landesamt
für Wasserwirtschaft

A large, stylized blue brushstroke graphic that starts as a thick, rounded shape on the left and tapers into a long, thin line extending towards the right, ending in a rounded tip. It is positioned behind the title text.

**Einführung in die
Grundwasserbiologie**
Methodik und Interpretationshinweise

Materialien Nr. 81 (Juni 1999)
2. Überarbeitete Auflage (Mai 2000)

**Einführung in die
Grundwasserbiologie**
Methodik und Interpretationshinweise

Materialien Nr. 81 (Juni 1999)
2. Überarbeitete Auflage (Mai 2000)

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Lazarettstraße 67, D-80636 München,
eine Behörde im Geschäftsbereich des Bayerischen Staatsministeriums für Landesentwicklung
und Umweltfragen

Bearbeitet: Dr. Michael Gierig, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft
Brigitta Ballweg, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft
AG Zoosystematik und Morphologie der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg

Druck: Eigendruck
Für den Druck wurde umweltfreundliches, chlorfrei gebleichtes Papier verwendet.

Nachdruck und Wiedergabe – auch auszugsweise – nur mit Genehmigung des Herausgebers

Vorwort

Grundwasser lebt - keine ganz neue Erkenntnis, wie schon Untersuchungen aus der zweiten Hälfte des neunzehnten Jahrhunderts zeigen. Trotzdem ist die wichtige ökologische Funktion der Bakterien und Tiere im Grundwasser vorübergehend etwas in Vergessenheit geraten. Anthropogene Einflüsse auf das Grundwasser - immerhin die wichtigste Ressource für unser Lebensmittel Nummer 1, das Trinkwasser - haben die Bedeutung der Selbstreinigungskraft der ökologischen Einheit Boden / Grundwasser und die Sensibilität dieses Ökosystems wieder mehr ins Blickfeld rücken lassen.

Noch weiß man nur wenig über diesen weitgehend unsichtbaren und daher leicht zu übersehenden Biotop. Daß aber grundwasserbiologische Untersuchungen nicht nur Selbstzweck sind oder ausschließlich der Befriedigung wissenschaftlicher Neugier dienen, zeigen die in der Praxis umgesetzten Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen. So ließen sich bereits in einer Reihe von Fällen wertvolle Erkenntnisse über die Filterleistung der natürlichen Bodenpassage im Einzugsgebiet von Brunnen, den Einfluß von Oberflächenwasser auf das Grundwasser und zur Effektivität der Trinkwasseraufbereitung gewinnen.

Die in den letzten Jahren am Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft durchgeführten Untersuchungen zur Grundwasserbiologie haben so die hohe Bedeutung eines intakten Ökosystems Boden / Grundwasser für ein einwandfreies und reines Grundwasser belegt. Gezeigt hat sich aber auch, daß künftig in Fachfragen von Boden-, Grund- und Trinkwasserschutz sowie Trinkwassergewinnung und -aufbereitung biologische Aspekte stärkere Berücksichtigung finden müssen. Nicht zuletzt im Zusammenhang mit den neuen Aufgaben der Wasserwirtschaft im Bereich des Bodenschutzes wird daher die Erfassung und Interpretation biologischer Prozesse in Boden und Grundwasser deutlich an Bedeutung gewinnen. Dieser Band soll daher vor allem dazu dienen, den aktuellen Wissensstand über grundwasserbiologische Untersuchungen nicht nur den Spezialisten zu vermitteln, sondern allen, die sich mit Grundwasser- und Bodenschutz oder Wasserversorgung beschäftigen.

Der vorliegende Materialienband stellt die überarbeitete zweite Auflage des inzwischen vergriffenen Bandes Nr. 81 vom Juni 1999 dar. Dies werten wir als Beleg dafür, daß die Erkenntnisse der Grundwasserbiologie auch von praktischem wasserwirtschaftlichen Nutzen sind. In Anbetracht der enormen Bedeutung eines reinen Grundwassers - nicht nur als Trinkwasserressource sondern auch aus ökologischer Sicht - erscheint es notwendig, daß die Überwachung der biologischen Grundwasserbeschaffenheit künftig zumindest an ausgewählten Stellen Aufnahme in das Routineprogramm der technischen Gewässeraufsicht findet.

Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft
Abteilung „Gewässerökologische Forschung“
München, im April 2000



Dr. Walter Mühlhölzl
Abteilungsleiter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	9
2. Bedeutung biologischer Prozesse für das Grundwasser.....	10
2.1. Grundlagen der Grundwasserbiologie	10
2.2. Biologische Besonderheiten der Trinkwassergewinnung aus Uferfiltrat.....	17
2.3. „Neue“ Krankheitserreger im Grundwasser	18
2.3.1. Allgemeines über parasitäre Protozoen.....	19
2.3.2. Cryptosporidium und Giardia im Wasser.....	20
2.3.3. Aktuelle Belastungssituation im Grund- und Trinkwasser	21
3. Organisation einer biologischen Grundwasserbeprobung	22
3.1. Hinweise zur Auswahl der Messstellen	22
3.2. Vorbereitung der Probennahmeausrüstung	23
3.3. Probennahme, Vorbehandlung und Verarbeitung	
für meiofaunistische Untersuchungen.....	25
3.3.1. Probennahme.....	25
3.3.2. Vorbereitung der Probe	27
3.3.3. Untersuchung der Meiofauna	28
3.4. Probennahme, Vorbehandlung und Verarbeitung	
für mikrobiologische Untersuchungen.....	32
3.4.1. Probennahme.....	32
3.4.2. Probenvorbehandlung	32
3.4.3. Mikrobiologische Untersuchungen.....	33
3.4.3.1. Koloniezahlbestimmung.....	33
3.4.3.2. Zellzahlbestimmung	34
4. Typische Vertreter der Grundwasserorganismen	
4.1. Grundwassermikroflora	39
4.2. Grundwasserfauna.....	48
5. Beispiele aus der Praxis.....	85
6. Möglichkeiten und Grenzen der grundwasserbiologischen Untersuchung.....	98
7. Literatur	100



1 Einleitung

Etliche Wasserfassungen in Bayern sind potenziell durch den Einfluß von Oberflächenwasser in hygienischer Hinsicht gefährdet. Über 20 % der abgegebenen Wassermenge müssen mittlerweile einer Desinfektion unterzogen werden - mit steigender Tendenz. Durch das normale hygienisch-chemisch orientierte Überwachungsprogramm können negative Beeinflussungen oft erst mit dem Auftreten derjenigen hygienisch relevanten Bakterien erkannt werden, die gemäß der TrinkwV untersucht werden müssen. Der Einbau einer Desinfektionsanlage oder eine weitergehende Aufbereitung ist dann meist unumgänglich. Zusätzlich kommt gerade bei Oberflächenwassereinfluß die hygienische Gefährdung durch Krankheitserreger wie z.B. parasitäre Protozoen (Cryptosporidium und Giardia) hinzu, die nicht durch das klassische Indikatorsystem erfaßt werden können und zudem durch eine Desinfektion allein nicht kontrollierbar sind.

Nicht zu unterschätzen sind auch die Einwirkungen von schädlichen Bodenverunreinigungen, wie z.B. Altlasten auf die Reinigungswirkung der Deckschichten über dem Grundwasserleiter. Der Großteil der Reinigungswirkung findet in der belebten Bodenzone, also etwa den obersten 50 cm statt. Veränderungen im Reinigungspotential können gravierende Auswirkungen auf die Grundwasserqualität haben.

Die chemischen Parameter können dabei nur in beschränktem Umfang Aufschlüsse über Änderungen der mikrobiellen Umsetzungsprozesse liefern, bieten lediglich eine "Momentaufnahme" der Grundwasserbeschaffenheit zum Zeitpunkt der Probennahme. Ausgehend von der Überlegung, daß biologische Untersuchungen im Grundwasser ähnlich wie bei Oberflächengewässern Aufschluß über die länger andauernden Einflüsse geben können, wurde nach Möglichkeiten gesucht, bereits im Vorfeld Indikatoren für eine hygienische Gefährdung zu finden.

Über die Indikationsfunktion biologischer Parameter im Grundwasser ist außer den klassischen hygienischen Untersuchungen praktisch nichts bekannt. Das wesentliche Ziel der im folgenden vorgestellten Untersuchungen ist es daher, den Wissensstand über die biologische Grundwasserbeschaffenheit und die entsprechenden Untersuchungsmethoden in Bayern zu erweitern und vor allem mögliche Indikatoren für eine Beeinflussung des Grundwassers durch Oberflächenwasser nachzuweisen. Im Vordergrund steht dabei die potenzielle Gefährdung der Wasserversorgungen mit Uferfiltratanteil, da hier die biologischen Prozesse im Untergrund zu einem wesentlichen Teil an der Aufbereitung des Trinkwassers beteiligt werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß in vielen Fällen ein diffuser Oberflächenwassereinfluß bereits durch eine einfache mikroskopische Untersuchung nachgewiesen werden kann.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sollen eine erste Einführung in die Grundwasserbiologie und die entsprechende Untersuchungsmethodik geben. Die dabei vorgestellten Organismen stellen aber lediglich einen Ausschnitt aus der Grundwasserfauna und -flora dar und sollen den Einstieg in eigene Untersuchungen erleichtern.

Zunehmend wird erkannt, daß infolge der allgemeinen anthropogenen Grundwasserbelastungen künftig die Kenntnis der biologischen Umsetzungsprozesse und der ökologischen Zusammenhänge im Grundwasser erheblich an Bedeutung gewinnen wird. Aus diesem Grund wäre zu wünschen, daß die in diesem Band vorgestellten Methoden und Untersuchungen den notwendigen Eingang in die tägliche Arbeit in der wasserwirtschaftlichen Praxis finden.

2 Bedeutung biologischer Prozesse für das Grundwasser

2.1 Grundlagen der Grundwasserbiologie

An dieser Stelle kann und soll kein vollständiger Abriß der bisherigen Kenntnisse über die Grundwasserbiologie erfolgen. Zum besseren Verständnis sollen jedoch kurz die wesentlichen Grundlagen erläutert werden. Zusätzlich wird ein Überblick über die wichtigsten Ergebnisse der bislang durchgeführten eigenen Untersuchungen gegeben.

Erste Untersuchungen zur Trinkwasserbiologie in Mitteleuropa wurden von COHN und HAS-SALL Mitte des 19. Jahrhunderts durchgeführt. Für beide waren Choleraepidemien die Ursache ihrer Untersuchungen. In der damaligen Zeit galten noch andere Begriffe von Hygiene und Ästhetik, wie z.B. das Zitat von NAEGELI (1877) belegt. Demnach entspricht das „*Auftreten von Organismen im Trinkwasser etwa einer Made in einer Kirsche*“ und „*der Genuß einer Flasche von sog. verpestetem Trinkwasser sei nur die homöopathische Dosis einer Mahlzeit von Käse*“. Trotzdem hatte das Trinkwasser auch damals mit Image-Problemen zu kämpfen, wie eine Karikatur von 1827 (Abbildung 1) zeigt.



Abbildung 1: Karikatur aus dem Jahre 1827 über die Verschmutzung des Themsewassers in London bei seinem Eintritt in das Grand Junction Wasserwerk (The Dolphin or Grand Junction Musance).

Noch vor wenigen Jahrzehnten wurden auch zahlreiche andere Organismen in Brunnen gefunden, deren Auftreten in der heutigen Wasserversorgung undenkbar ist. So schreibt beispielsweise BEGER noch 1966(!): *Berücksichtigt man die Verständnislosigkeit, Unachtsamkeit und Gleichgültigkeit, mit der noch gegenwärtig manche Brunnenbesitzer und Brunnenbenutzer der Trinkwasserversorgung gegenüberstehen, so ist die Behauptung nicht übertrieben, daß es an*

Unrat und Abfall nichts gibt, was nicht schon in einem nicht fest verschlossenen Kesselbrunnen aufgefunden worden ist, selbst die Überreste von Hunden, Katzen, Ratten, Mäusen, Hamstern, Maulwürfen, Igel, Gänsen, Hühnern, Fröschen, Kröten und Molchen, die durch irgendein Mißgeschick in die Brunnen gerieten und dort unbeachtet zugrunde gingen.

Nicht zuletzt dank der Erkenntnisse der modernen Hygiene sind derlei Mißstände heute nicht mehr zu beobachten. Trotzdem hat sich aber der Wissensstand über das Grundwasser als ökologisch höchst bedeutsamen Lebensraum bis heute nicht wesentlich erweitert. Dabei handelt es sich aufgrund der dort herrschenden, sehr spezifischen Milieubedingungen um einen hochinteressanten und faszinierenden Lebensraum, der außer einer vielfältigen Mikroflora auch noch viele höher entwickelte Organismen beherbergt. Wesentliche Kennzeichen dieses Lebensraumes sind völlige Dunkelheit, weitgehende Temperaturkonstanz und Nahrungsarmut (THIENEMANN, 1925). Diese Bedingungen haben das Entstehen einer hoch spezialisierten Fauna und Mikroflora gefördert, deren Ursprünge bis in die letzte Eiszeit zurückreichen.

Mikrobiologie des Grund- und Trinkwassers

Untersuchungen, die die Mikrobiologie des Grundwassers betreffen, beschränkten sich bis vor wenigen Jahren weitgehend auf die hygienisch relevanten Mikroorganismen. Erst mit zunehmendem Interesse an den mikrobiellen Umsetzungsprozessen - etwa bei der Uferfiltration - und besonders auch bei Grundwasserverunreinigungen (Altlastenproblematik) wurde die Bedeutung der eigenständigen Grundwassermikroflora deutlicher. Die Stoffwechsellleistungen der Grundwasserbakterien sind vielfältig und werden bei der Langsandsandfiltration und der Trinkwassergewinnung aus Uferfiltrat bereits seit Ende des letzten Jahrhunderts biotechnologisch eingesetzt. Trotz der teilweise enormen Bedeutung dieser Prozesse für die Trinkwasserversorgung ist nach wie vor wenig über sie bekannt.

Mit den bei den klassischen mikrobiologischen Untersuchungen nahezu ausschließlich verwendeten hygienisch orientierten Methoden sind kaum Bakterien im Grundwasser nachweisbar, da diese auf den nährstoffreichen Substraten nicht zur Entfaltung kommen können. Erst mit dem Einsatz spezieller nährstoffarmer Nährböden können nennenswerte Zahlen an koloniebildenden Einheiten gefunden werden. Doch auch mit diesen verfeinerten Verfahren kann nur ein kleiner Teil der tatsächlich vorhandenen Population erfaßt werden, da viele dieser Organismen aufgrund ihrer Spezialisierung auf bestimmte Stoffwechselprozesse unter den üblichen Laborbedingungen nicht zum Wachsen kommen. Den Durchbruch brachte erst die Entwicklung spezieller fluoreszenzmikroskopischer Färbemethoden, mit deren Hilfe alle Bakterien einer Probe unter dem Mikroskop ausgezählt werden können. Mit einer neu entwickelten Methode von SCHAULE et al. (1993) ist nun auch eine Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Bakterien möglich.

Entscheidend für die Bakterienflora des Grundwassers ist die mit der Tiefe zunehmende Nahrungsarmut. Untersuchungen von GOTTFREUND et al. (1983) und HOOS & SCHWEISFURTH (1982) zeigten aber, daß auch in 90 m Tiefe noch zahlreiche Bakterien nachweisbar sind. Eine Tiefenbegrenzung konnte bislang nicht festgestellt werden.

Nach WOLTERS & SCHWARTZ (1956) befindet sich mit über 80 % die Masse der Bakterien eines Grundwasserleiters als Biofilm auf festen Oberflächen, nur ein relativ geringer Teil schwimmt frei suspendiert im Interstitialwasser mit. Untersuchungen von MARXSEN (1982) und anderen haben diese Werte bestätigt. Aus diesem Grund kann mit der Beprobung des Grundwassers selber immer nur ein geringer Teil der eigentlichen Grundwassermikroflora untersucht werden. Mangels geeigneter Routinemethoden zur mikrobiologischen Beprobung der festen Bestandteile des Grundwasserleiters bezieht sich der Großteil der bisherigen Veröffentlichungen jedoch auf die suspendierten Bakterien.



In eigenen Versuchen wurde in Anlehnung an Versuche von ALTMEIER & SCHWEISFURTH (1989) und MARXSEN (1982) durch das Einbringen von Aufwuchsträgern (sandgefüllte, perforierte Plastikröhrchen, Länge ca. 15 cm, **Abbildung 2**) in Grundwassermeßstellen versucht, den Anteil der sessilen Mikroflora zu quantifizieren. Die dabei erzielten Daten wiesen eine sehr große Streubreite auf, ein Zusammenhang der mit den Aufwuchsträgern gefundenen Werte mit den jeweiligen Koloniezahlen des Grundwassers konnte nicht festgestellt werden. Generell war die Besiedlung sehr gering, als höchster Wert konnte eine besiedelte Fläche von 0,07 % gefunden werden. Bei den Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop konnte trotz intensiver Suche auf den fixierten Proben kein Bewuchs festgestellt werden. **Abbildung 3** zeigt das ursprüngliche Filtermaterial vor der Exponierung in verschiedenen Vergrößerungen. Deutlich erkennbar ist eine stark gegliederte Oberfläche, die eigentlich aufgrund dieser Rauigkeit gute Ansatzpunkte für eine Biofilmbildung bietet.

Abbildung 2: Sandgefüllte Aufwuchsträger

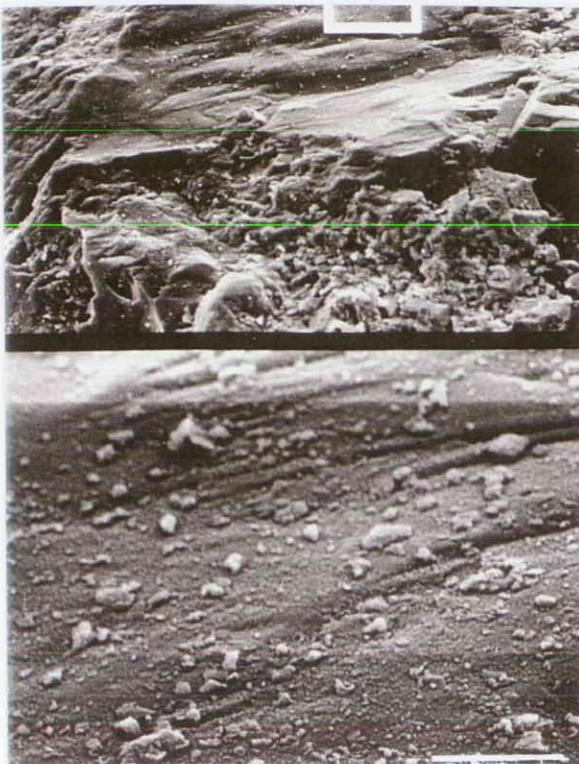


Abbildung 3: Frischer Sand
(Maßstab oberes Bild 63 µm, Ausschnitt 6,3 µm)



Abbildung 4: Sand nach 3 Monaten
(Maßstab oberes Bild 55 µm, Ausschnitt 5,5 µm)

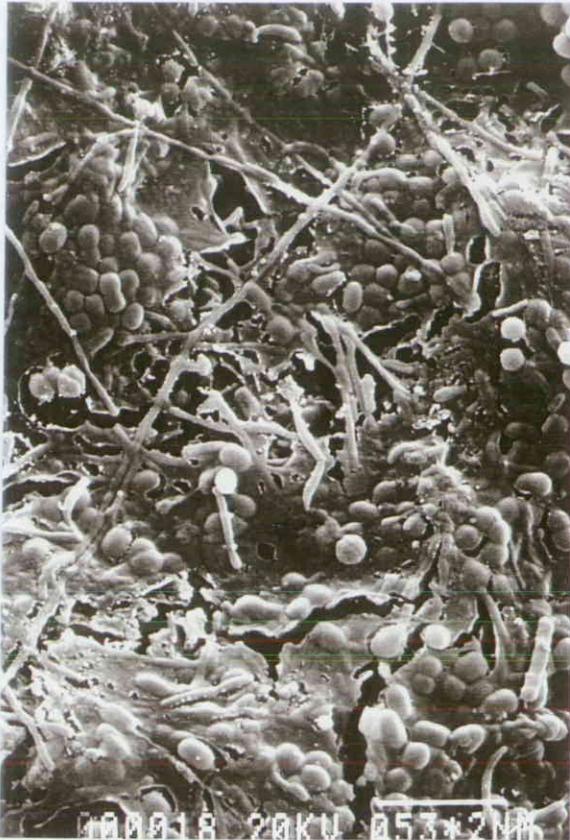


Abbildung 5: Filtermaterial aus einem biologisch arbeitenden Filter (Maßstab 5,3 µm)

Abbildung 4 zeigt das Material nach 3 Monaten Exposition. Gegenüber dem ursprünglich eingesetzten Material sind keinerlei Veränderungen zu erkennen. Zum Vergleich zeigt **Abbildung 5** Filtermaterial aus einem biologisch arbeitenden Trinkwasserfilter, der von einem dichten Biofilm bewachsen ist. Vergleichbare Untersuchungen von MARXSEN (1982), TUSCHEWITZKI & GRUBERT (1988) und ALTMEIER & SCHWEISFURTH (1989) bestätigen auch die sehr geringen Besiedelungsdichten. Schwankungen in der Größenordnung von 10^2 - 10^3 werden auch von SCHMITT et al. (1997) bei der Untersuchung der Biofilmbildung im Trinkwasser erwähnt. TUSCHEWITZKI & GRUBERT (1988) fanden bei REM-Untersuchungen von Grundwassersedimenten aufgrund einer Besiedelungsdichte von max. 0,00004 % ebenfalls keine Bakterien auf dem Material und geben an, daß bei 5000-facher Vergrößerung nur in einem von 1 Million Bildausschnitten ($384 \mu\text{m}^2$) eine Bakterie zu sehen wäre. Geht man bei der vorliegenden Untersuchung von der stärksten gefundenen Besiedelung von $1,7 \times 10^6$ Bakterien je

Gramm Material aus, so würde etwa eine Bakterie je $1000 \mu\text{m}^2$ zu finden sein, also etwa in jedem dritten Bildausschnitt. Unter Berücksichtigung des Vorkommens extrem kleiner Formen und der im allgemeinen eher inselartigen mikrobiellen Besiedelung von Oberflächen ist eine REM-Untersuchung zur Analyse der mikrobiellen Besiedelung im Grundwasser nicht geeignet. Zur Charakterisierung der sessilen Mikroflora ist die Verwendung von Aufwuchsträgern jedoch die einzige mit vertretbarem Aufwand einsetzbare Methode. Trotz der genannten Schwierigkeiten wird daher weiter versucht werden, die Methode so weit zu standardisieren, daß reproduzierbare und vergleichbare Werte erhalten werden können.

Die autochthone Grundwassermikroflora ist an die in weiten Teilen ihres Biotops vorherrschende Nahrungsarmut bestens adaptiert. Aufgrund mikroskopischer Untersuchungen kam MARXSEN (1982) dennoch zu dem Schluß, daß sich der Großteil der Grundwasserbakterien wegen ihrer geringen Größe in mehr oder weniger inaktivem Zustand befindet. Diese Bakterien haben eine Länge zwischen 0,1 und 0,5 µm (sonst durchschnittlich 1-3 µm), die bei "normalen" Bakterien unter Laborbedingungen sonst nur bei Hungerkulturen auf Minimalmedien zu finden ist. Bei Verbesserung der Nahrungssituation sind sie jedoch jederzeit zu höherer Aktivität und Wachstum bereit.

Die im Normalfall geringe Aktivität ist auch der Grund, warum enzymatische Methoden zur Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der Grundwassermikroflora sich bislang noch nicht etablieren konnten, da bisher auch mit Fluoreszenzmethoden keine reproduzierbaren Messungen mit ausreichender Empfindlichkeit möglich sind.

Die wesentlichen Stoffwechselleistungen umfassen den Abbau der natürlich vorkommenden organischen Substanzen, sowie die Umsetzungen des Stickstoffkreislaufes (Denitrifikation, Nitrifizierung und Nitrifikation), des Schwefelkreislaufes (Desulfurierung und Sulfurierung) sowie des Eisen- und Mangankreislaufes.

Neben den klassischen hygienischen Indikatorbakterien wie beispielsweise *E.coli* gibt es noch weitere Bakterien mit Indikatorfunktionen. So deutet z.B. das Vorkommen von *Crenothrix polyspora* auf einen Mischbereich von sauerstoffarmem, reduziertem und sauerstoffreichem Grundwasser hin (BUMB & SCHWEISFURTH 1981). Das Vorkommen von Bakterien der Gattungen *Flexibacter* und *Sporocytophaga* im Grundwasser zeigt an, daß in diesem Bereich eine mangelhafte Bodenfilterwirkung gegeben ist und ein hygienisch bedenklicher Zufluß von Oberflächenwasser möglich ist (SCHINDLER 1989, MÜLLER 1993).

Insgesamt haben vor allem die neueren Forschungsarbeiten gezeigt, daß es im Grundwasser eine wesentlich reichere autochthone Grundwassermikroflora gibt, als man lange Zeit anhand der klassischen, rein hygienisch orientierten Untersuchungsmethoden annahm. Diese ist jedoch trotz teilweise hoher Bakterienzahlen - auch in reinen Grundwässern können bis zu 10^6 Keime je ml gefunden werden - hygienisch in keiner Weise bedenklich, da es sich nicht um tier- oder humanpathogene Mikroorganismen handelt. Vielmehr ist das Vorhandensein dieser hoch spezialisierten eigenständigen Mikroflora von entscheidender Bedeutung für die Reinheit des Grundwassers.

Grundwassertiere

Im Grundwasser kommen nicht nur zahlreiche spezifische Bakterienarten vor, sondern auch zahlreiche an die spezifischen Lebensbedingungen adaptierte Tiere. Wegen der Begrenztheit des dort zur Verfügung stehenden Lebensraumes können nur Tiergruppen im Grundwasser vorkommen, deren Vertreter klein genug sind, um sich im Lückensystem fortzubewegen. Neben den Protozoa (Einzellern) sind vor allem Arten der *Turbellaria* (Strudelwürmer), *Rotatoria* (Rädertierchen), *Nematoda* (Fadenwürmer), *Polychaeta* (Vielborster), *Oligochaeta* (Wenigborster), *Gastropoda* (Schnecken), *Tardigrada* (Bärtierchen), *Acari* (Milben) und *Crustacea* (Krebstiere) anzutreffen. Die größten Exemplare erreichen eine Größe von max. 3 cm (*Niphargus*), die Masse ist jedoch unter 1 mm groß und mit freiem Auge nicht zu erkennen (SCHMINKE, 1997). Entwicklungsgeschichtlich interessant sind vor allem Organismen, die in den seit der letzten Eiszeit mehr oder weniger konstanten Milieubedingungen des Grundwassers einen Zufluchtsort vor den Veränderungen an der Erdoberfläche gefunden haben. Diese Glazialrelikte, deren oberirdische Verwandten nahezu ausgestorben sind, stammen vor allem aus dem Bereich der Krebstiere (HUSMANN 1956). Neuere Theorien zur Entwicklungsgeschichte der Grundwasserfauna gehen eher davon aus, daß expansive, generalistische Arten den Ausgangspunkt für die Evolution der stygobionten Fauna darstellen (SCHMINKE, 1997).

Allen diesen Tieren gemeinsam ist, wie bereits erwähnt, ihre geringe Größe sowie das generelle Fehlen von Lichtsinnesorganen und Körperpigmenten. Charakteristisch ist auch die langgestreckte spindelförmige Gestalt der größeren Grundwasserorganismen, die ihnen die Fortbewegung in den meist engräumigen Klüften und Spalten eines Grundwasserleiters erleichtert (siehe **Abbildung 6**).

	<i>Asellus aquaticus</i>	<i>Stenasellus virei</i>
Marsupialphase	3 Wochen	66 Wochen
Juvenilphase	3 Monate	60 - 84 Monate
Fortpflanzungs- rhythmus	1 Gelege pro Monat	1 Gelege alle 2 - 4 Jahre
Häutungen	einmal alle 2 - 3 Wochen	einmal im Jahr
Dauer der Häutungen	1,5 Tage	14 Tage
Lebensdauer	1 Jahr	15 Jahre

Tabelle 1: Vergleich von Lebensdaten einer oberirdisch lebenden Assel (*Asellus aquaticus*) und einer Grundwasserassel (*Stenasellus virei*). (aus SCHMINKE, 1997)

Der gesamte Lebenszyklus ist gegenüber den oberirdischen Verwandten deutlich verlängert. Ist beispielsweise die durchschnittliche Lebensdauer eines typischen Copepoden etwa 6 Monate, so berichtet SCHMINKE (1997) von einer Lebensdauer von 14 Jahren bei einem *Niphargus virei* und von 15 Jahren bei einer Assel der Gattung *Stenasellus* (weitere Daten siehe **Tabelle 1**).

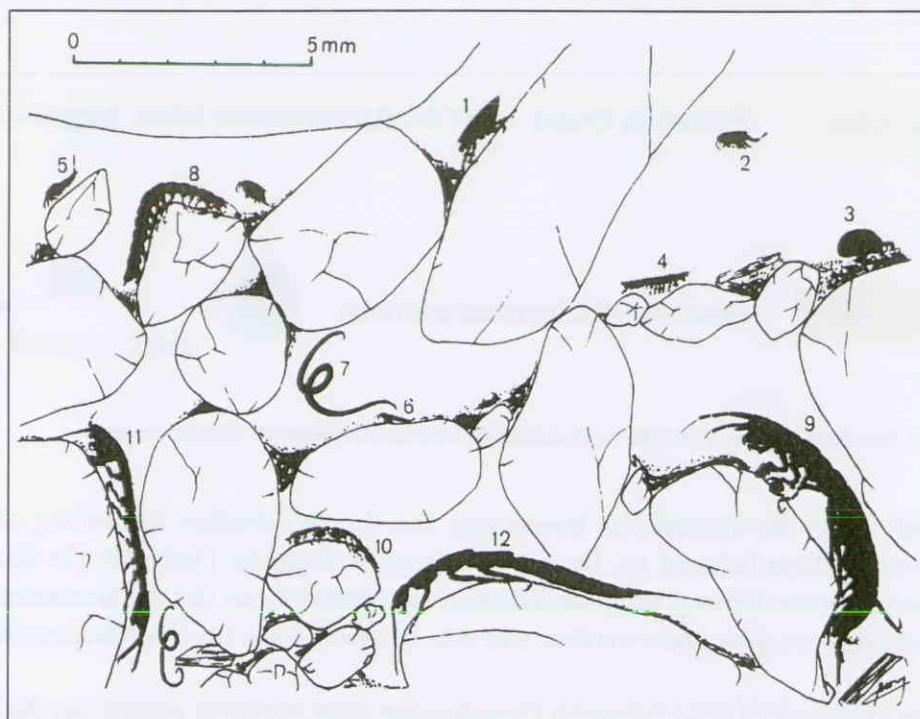


Abbildung 6: Tiere im Lückensystem grundwasserführender Kiese und Sande (nach Bou, aus SCHMINKE (1997)). 1 - *Hydracaria* (Milbe), 2 - Cyclopoide (Ruderfußkrebs), 3 - *Ostracoda* (Muschelkrebs), 4 - *Bathynella* (Brunnenkrebs), 5 - Harpacticoide (*Elaphoidella spec.*; Ruderfußkrebs), 6 - Harpacticoide (*Parastenocaris sp.*; Ruderfußkrebs), 7 - Nematode (Fadenwürmer), 8 - *Balcanella* (Ruderfußkrebs) 9 - Amphipode (*Niphargus spec.*), 10 - Assel (*Microcharon spec.*), 11 - Assel (*Stenasellus spec.*), 12 Steinfliegenlarve (*Leuctra spec.*)

Die für das Grundwasser typischen Arten, deren gesamter Lebenszyklus nur im Grundwasser ablaufen kann, werden nach THIENEMANN (1925) als "stygebiont" (nach dem Unterweltfluß Styx aus der griechischen Mythologie) bezeichnet. Organismen, die ihren Hauptlebensraum in Oberflächengewässern haben und sich bevorzugt dort vermehren, zusätzlich aber zumindest Teile ihrer Entwicklung auch im Grundwasser vollziehen können, werden als "stygo phil" bezeichnet. Dies sind vor allem Formen, die in Mischzonen zwischen Grund- und Oberflächenwasser vorkommen, wie beispielsweise im Interstitial eines Flusses. Von dort können sie dann ins Grundwasser einwandern. Reine Oberflächenwasserformen, die im Grundwasser nicht oder

nur beschränkte Zeit lebensfähig sind, werden als "stygoxen", also dem Grundwasser fremd bezeichnet. Dazu zählen beispielsweise alle Algen, die aquatischen Larvenstadien fliegender Insekten u.a.m.(vgl. **Abbildung 7**).

Die Untersuchungen über die Indikationsfunktion der Grundwasserfauna stehen erst am Anfang. Fest steht bislang, daß das alleinige Vorkommen von "echten" stygobionten Organismen in den meisten Fällen als Indikator für ein einwandfreies, nicht oder nur sehr gering verunreinigtes Grundwasser gewertet werden kann. Für die stygophilen Organismen gilt dies dort, wo sie als Begleitfauna der Stygobionten auftreten, in analoger Weise. Bei ausschließlichem Vorkommen sind sie Hinweis auf eine Versickerungszone.

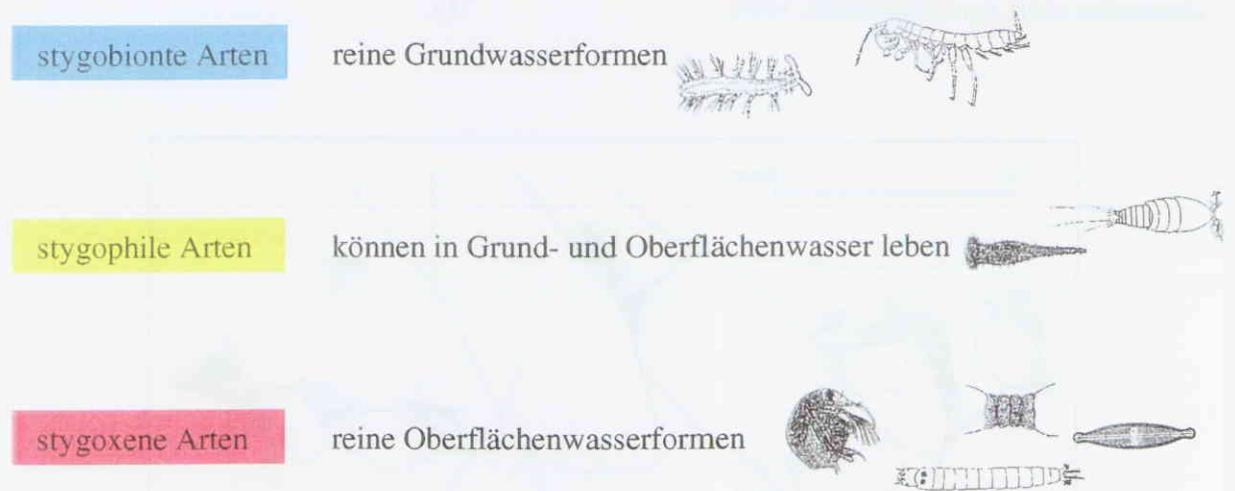


Abbildung 7: Charakteristische Vertreter verschiedener Faunenelemente im Grundwasser

In diesem Fall hängt die ökologische Bewertung von der saprobiellen Einstufung dieser Organismen ab, soweit diese bekannt ist. Da nur wenig autökologische Daten für die Grundwasserfauna vorliegen, können bislang keine detaillierten Erkenntnisse aus der Zusammensetzung einer Grundwasserbiozönose gewonnen werden, wie dies beispielsweise im Oberflächenwasserbereich der Fall ist.

Das Auftreten stygoxener Organismen im Grundwasser zeigt zunächst einmal nur die Infiltration von Oberflächenwässern an. Allerdings lassen sich bei Kenntnis der saprobiellen Einstufung und des natürlichen Lebensraumes dieser Organismen wichtige Rückschlüsse über die möglichen Kontaminationspfade ziehen.

Die ökologische Bedeutung der Grundwassertiere ist noch nicht vollständig geklärt. Vor allem aus Untersuchungen an Langsandsandfiltern, die als Modellgrundwasserleiter angesehen werden können (HUSMANN, 1956), wurde geschlossen, daß die Hauptbedeutung in der Freihaltung der Porenräume des Grundwassers liegt. Die permanente Nahrungszufuhr müßte bei ausschließlich bakterieller Mineralisation auf Dauer zu einer Kolmation (Verstopfung) der Porenräume führen. Versuche von EDER (1980) haben diese Vermutung bestätigt. Bei diesen Versuchen wurden sandgefüllte Säulen mit Sedimentbakterien aus dem Freiland beimpft und unter definierten Bedingungen mit Nährstoffen versorgt. In eine Säule wurden zusätzlich Nematoden zugegeben. Bei höherer Nahrungszufuhr bildete sich auf der Sandsäule ohne Nematoden ein starker Biofilm, der letztendlich zur Verstopfung führte. Auf den mit Nematoden besetzten Säulen ließ sich dies nicht beobachten. EDER (1980) folgerte, daß die Bakterien für die Mineralisation der organischen Substanzen zuständig sind, wohingegen die Nematoden die Dichte der Bakterien regeln und

gleichzeitig den vorhandenen Biofilm durch ständige Freßtätigkeit auf einem hohen Aktivitätsniveau halten.

Das Zusammenwirken von Bakterien und Grundwassertieren scheint so von wesentlicher Bedeutung für die Freihaltung des Porensystems im Grundwasser zu sein und damit auch für die Aufrechterhaltung wichtiger mikrobiologischer Umsetzungsprozesse.

Durch die Verlangsamung der Entwicklung der Grundwassertiere ist aber die Biozönose des Grundwassers empfindlich gegenüber Einwirkungen von außen, so daß Grundwasserverschmutzungen für das Zusammenwirken der Grundwassermikroflora und -fauna gravierende Folgen haben können. Für die Zukunft gewinnt daher die Kenntnis der ökologischen Zusammenhänge im Grundwasser aus zwei Gründen erheblich an Bedeutung:

- Zum einen aus grundsätzlichen Überlegungen des allgemeinen Grundwasserschutzes heraus, da das Grundwasser ein bislang zwar weitgehend unbekanntes, deswegen aber nicht weniger schützenswertes Biotop darstellt,
- und zum anderen, weil sauberes Grundwasser mit einer intakten Flora und Fauna die wichtigste Ressource für unser Trinkwasser bildet.

2.2 Biologische Besonderheiten der Trinkwassergewinnung aus Uferfiltrat

Seit Anfang dieses Jahrhunderts ist die reinigende Wirkung einer Bodenpassage bei der Trinkwassergewinnung bekannt. Vor allem in dicht besiedelten Gebieten mit hohem Wasserbedarf wurden Entnahmebrunnen in der Nähe von Flüssen und Seen niedergebracht, um so das durch den Boden nachströmende Oberflächenwasser zu nutzen. Eine Variante dieser natürlichen Uferfiltration stellt die künstliche Grundwasseranreicherung dar, bei der Oberflächenwasser zur Verbesserung des Grundwasserdargebots zusätzlich versickert wird.

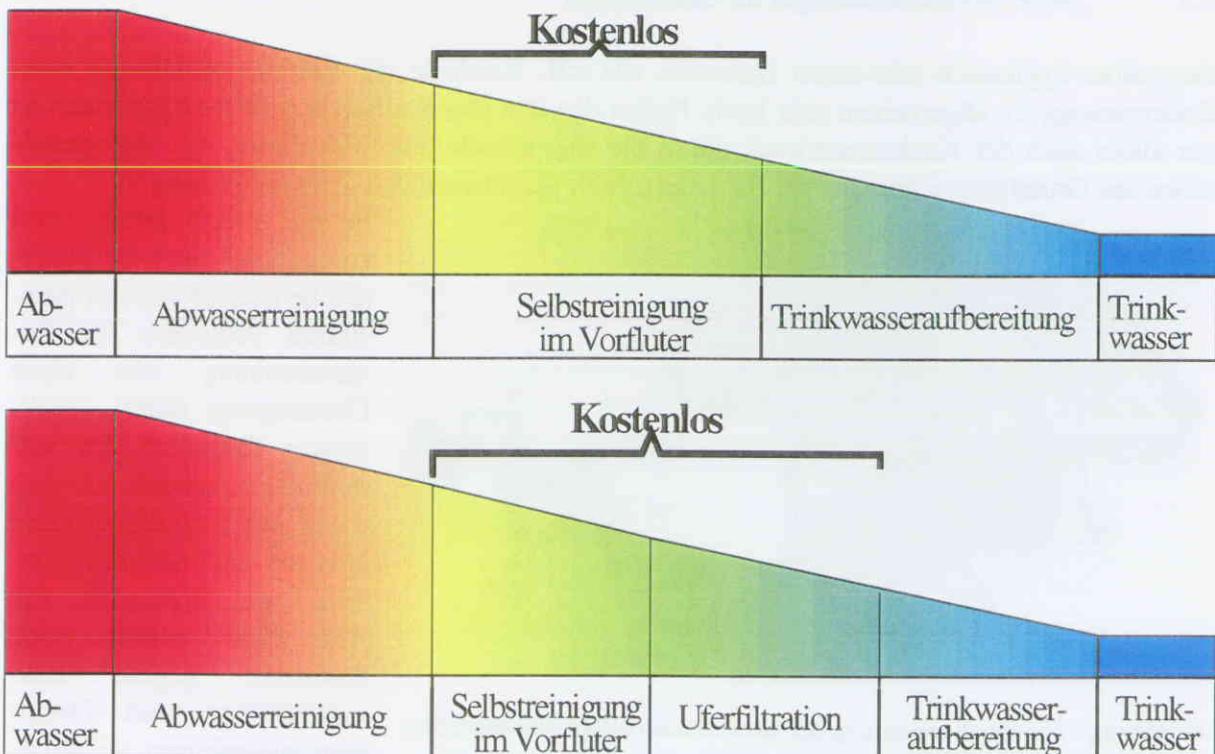


Abbildung 8: Zusätzliche Reinigungswirkung der Untergrundpassage bei der Trinkwassergewinnung aus Uferfiltrat

Bei der natürlichen Uferfiltration, wie sie in Bayern vorwiegend zum Einsatz kommt, finden weitergehende Reinigungsvorgänge statt, die die natürliche Selbstreinigung im Fließgewässer ergänzen (siehe **Abbildung 8**).

Beim Übergang in das Grundwasser wird das versickernde Flußwasser durch physikalische, chemische und vor allem biologische Vorgänge mehr und mehr dem Charakter des eigentlichen Grundwassers angepaßt. Ungelöste Stoffe werden durch Filtration und Adsorption zurückgehalten und falls möglich biologisch abgebaut. Gelöste Substanzen werden durch Adsorption, Ionenaustausch und Ausfällung zurückgehalten und gleichfalls soweit wie möglich auf biologischem Weg mineralisiert. Biologisch nicht abbaubare gelöste Stoffe dringen je nach Rückhaltevermögen des Untergrundes früher oder später ins Grundwasser vor.

Beim Eintritt in den Boden vergrößert sich die für die mikrobiologischen Umsetzungsprozesse relevante reaktive Oberfläche im Vergleich zum Oberflächengewässer erheblich, so daß es i.d.R. zu einer deutlichen Beschleunigung der Abbauvorgänge kommt. Der wesentliche Unterschied zum Oberflächengewässer liegt darin, daß kein Sauerstoff mehr über die Photosynthese nachgeliefert werden kann. Die Abbauprozesse verlaufen zunächst aerob, bei entsprechender organischer Belastung des Flußwassers ist aber dann im weiteren Verlauf der Uferfiltratstrecke die Ausbildung anaerober Zonen möglich. Hier werden die organischen Substanzen weiter abgebaut, durch entsprechende Redoxprozesse kann es dabei aber auch zur Remobilisierung von Eisen und Mangan, sowie zur Bildung von Ammonium, Schwefelwasserstoff und Methan kommen. Bei höheren Konzentrationen dieser Stoffe kann die nachfolgende Aufbereitung erhebliche Schwierigkeiten bereiten. Beim Kontakt des Uferfiltrats mit sauerstoffreichem landseitigem Grundwasser können etliche dieser reduzierten Substanzen von anderen Mikroorganismen wiederum oxidiert werden, was Massenvermehrungen einzelner Bakteriengruppen und das „Zuwachsen“ von Brunnen nach sich ziehen kann (BUMB & SCHWEISFURTH; 1981).

2.3 „Neue“ Krankheitserreger im Grundwasser

Gegenüber hygienisch relevanten Bakterien wie z.B. *E.coli* ist die Eliminationsleistung einer Bodenpassage im allgemeinen sehr hoch. Neben den rein physikalischen Filtrationsprozessen ist vor allem auch der Konkurrenzdruck durch die sog. autochthone Mikroflora, also die spezifischen ans Grundwasser angepaßten Bakterien, dafür verantwortlich (siehe **Abbildung 9**).

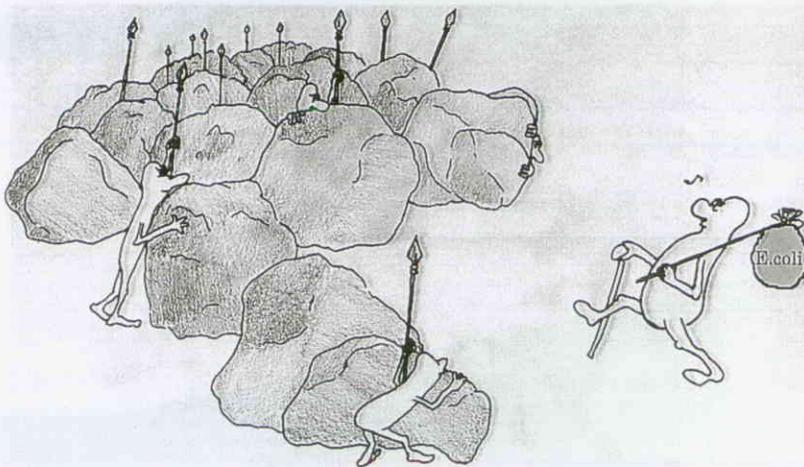


Abbildung 9: Eliminationsleistung der autochthonen Mikroflora gegenüber grundwasserfremden Bakterien

In den letzten Jahren wird zunehmend auch die hygienische Bedeutung von parasitären Protozoen im Zusammenhang mit einer Übertragung durch Trinkwasser diskutiert. Im wesentlichen handelt es sich dabei um *Cryptosporidium parvum* und *Giardia lamblia*, zwei Protozoen, die sich durch extrem hohe Resistenz gegen Umwelteinflüsse und Desinfektionsverfahren auszeichnen. Spektakulärer Höhe-

punkt war eine durch *Cryptosporidium* ausgelöste Epidemie 1993 in Milwaukee, USA, in deren Verlauf über 400.000 Personen erkrankten.

Beide Protozoen bilden Dauerstadien (Oozysten bzw. Zysten) aus, die sehr widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse sind und durch Fäkalien infizierter Tiere und Menschen auf verschiedenen Wegen in die Gewässer gelangen können. Probleme im Trinkwasserbereich können daher in erster Linie bei oberflächenwasserbeeinflusstem Grundwasser (z.B. Uferfiltrat) sowie unzureichenden Wasserschutzgebieten auftreten, wenn keine oder nur eine unzureichende Aufbereitung existiert.

2.3.1 Allgemeines über parasitäre Protozoen

Cryptosporidium

Die Gattung *Cryptosporidium* gehört systematisch zur Klasse der Sporentierchen (Sporozoa) im Stamm der Protozoa. Verantwortlich für die Erkrankungen bei Tier und Mensch ist nur die Art *Cryptosporidium parvum*. Der Parasit ist bei fast allen Nutztieren und vielen Wildtieren verbreitet, wobei besonders häufig Jungtiere befallen sind. Eine Übertragung von Tier auf Mensch ist möglich.

Der Entwicklungsgang von *Cryptosporidium* besteht aus einem mehrphasigen Generationswechsel (Abbildung 10). Infektios sind die Oozysten und die Sporozysten (Größe 4 - 6 µm), die außerhalb des Wirtes länger als ein Jahr überlebensfähig sind.

Jede Sporozyste enthält 4 Sporozoite, die sich an der Oberfläche der Darmzellen festheften, durch Zerfallsteilung vermehren und so zu einem Massenbefall des Darmes führen. Dadurch wird 2-10 Tage nach der Infektion eine akute Gastroenteritis ausgelöst, die von starken Bauchkrämpfen und heftigen wäßrigen Diarrhöen begleitet wird. Bei Patienten mit intaktem Immunsystem dauern die Symptome zwischen 3 und 14 Tagen an, bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem kann die Infektion im schlimmsten Fall allerdings auch tödlich verlaufen.

Die infektiöse Dosis ist extrem niedrig, im Extremfall kann eine Oozyste zur Infektion ausreichen. Eine Behandlung ist derzeit nicht möglich.

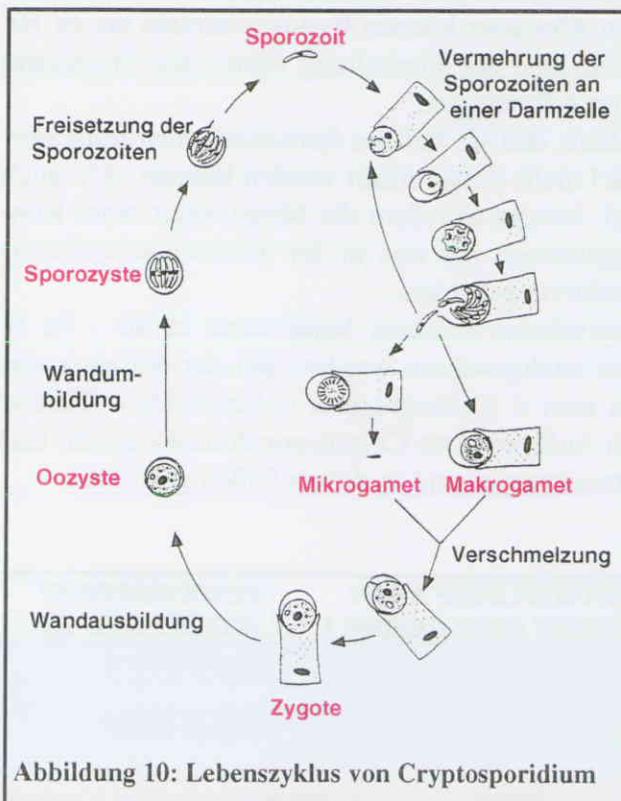


Abbildung 10: Lebenszyklus von *Cryptosporidium*

Giardia

Die Gattung *Giardia* gehört systematisch zur Klasse der Geißeltierchen (Zoomastigophora) im Stamm der Protozoa. Verantwortlich für die Erkrankungen bei Menschen ist nur die Art *Giardia lamblia*. Der Parasit ist bei vielen Nutz- und Wildtieren verbreitet, wobei aquatisch lebenden Wildtieren wie Bibern und Bisamratten mit Infektionsraten von über 90 % besondere Bedeutung zukommt (daher der amerikanische Name „Beaver-Feaver“ für Giardiasis). Eine Übertragung von Tier auf Mensch ist möglich.

Die Infektion wird durch 10 - 15 µm große Zysten ausgelöst. Aus jeder Zyste können 2 sog. Trophozoite hervorgehen, die sich mittels eines Saugnapfes an den Darmzellen des Wirtes anheften. Die Trophozoiten vermehren sich durch Zweiteilung, bei Massenbefall der Darmzellen werden etwa analog zur Cryptosporidiose Symptome wie z.B. krampfartige Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und wäßrige Durchfälle ausgelöst. Gleichzeitig wird die Fettsorption über die Darmoberfläche vermindert. Es besteht die Gefahr der Abmagerung und Austrocknung des infizierten Organismus.

2.3.2 Cryptosporidium und Giardia im Wasser

Die parasitären Protozoen können fäkal-oral durch ihre resistenten Dauerstadien, die Oozysten (bei *Cryptosporidium*) bzw. Zysten (bei *Giardia*) übertragen werden. Infizierte Menschen und Tiere können durch ihre Fäkalien zur Wasserverunreinigung beitragen. In ungeklärten Abwässern kommen *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten in Konzentrationen von bis zu 10^5 je 100 l vor. Im geklärten Abwasser können Reduktionsraten bis zu 10^3 erreicht werden. Einträge aus der Landwirtschaft und der Tierhaltung führen also insgesamt zu einer höheren Belastung als Einleitungen von Kläranlagen.

Problematisch an diesen Organismen ist vor allem, daß sie mit den herkömmlichen Indikatorsystemen nach der TrinkwV (*E.coli*, Coliforme) nicht sicher erfaßt werden können, d.h. auch wenn die Befunde nach TrinkwV negativ sind, besteht trotzdem die Möglichkeit einer Kontamination. Darüber hinaus können diese Organismen mit den in der Trinkwasseraufbereitung üblichen Desinfektionsmethoden nicht inaktiviert werden.

Je nach Belastungszustand des Oberflächengewässers konnten bundesweit in 30 - 70 % *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten nachgewiesen werden. Bei der Nutzung von Wässern für die Trinkwasserversorgung kann man 4 Risikogruppen unterscheiden (Tabelle 2). In den Gruppen III und IV ist u.U. mit dem Auftreten von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten zu rechnen, regelmäßige Untersuchungen sind in diesen Fällen anzuraten.

VERSORGUNGSTYP	RISIKOGRUPPE	MIKROBIOLOGIE NACH TRINKWV (VOR DESINF.)	EINZUGSGEBIET (ZONE I UND II)
ohne Aufbereitung ohne Desinfektion	I	stets einwandfrei	einwandfrei
mit Aufbereitung ohne Desinfektion	II	stets einwandfrei	einwandfrei
mit/ohne Aufbereitung mit Desinfektion	III	nie <i>E.coli</i> gel. KZ, selten Coliforme	nicht einwandfrei
mit/ohne Aufbereitung mit Desinfektion	IV	gel. <i>E.coli</i> regelm. KZ und Coliforme	nicht einwandfrei

Tabelle 2 : Risikopotential nach Rohwasserkategorien

2.3.3 Aktuelle Belastungssituation im Grund- und Trinkwasser

Nach den bisherigen, allerdings noch recht spärlichen Untersuchungen sind bundesweit je nach Region 30- 70% der Oberflächengewässer mit *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten kontaminiert. Grundwasser ist i.d.R. deutlich geringer kontaminiert, aussagekräftige Daten liegen bislang aber noch nicht vor. Dasselbe gilt für die Situation in Bayern, auch hier gibt es über einige Einzelfunde im Roh- und auch im Trinkwasser hinaus keine weiteren Daten.

Epidemien sind aber bislang weder in Bayern noch aus anderen Bundesländern bekannt geworden, wobei hier 2 Erläuterungen gegeben werden müssen:

- Bundesweit existiert kein epidemiologisches Erfassungssystem, das vergleichbar mit dem der USA oder Großbritannien wäre. Es ist daher möglich, daß kleinere Epidemien unentdeckt bleiben.
- Einschränkend muß jedoch gleichzeitig erwähnt werden, daß aufgrund des in Deutschland üblichen Multi-Barrieren-Prinzips (allgemeiner Grundwasserschutz, Ausweisung von Wasserschutzgebieten mit hohen Auflagen, qualifizierte Aufbereitungstechnologie) keine mit den genannten Ländern vergleichbare Situation herrscht. Die Sicherheitsstandards sind gerade bei der Nutzung von Oberflächenwasser deutlich höher, so daß das Risiko einer Trinkwasserkontamination erheblich niedriger ist.

Trotzdem besteht natürlich regional durchaus ein gewisses Risiko, zumal bei Anlagen mit einer Desinfektion als alleiniger Aufbereitungsstufe.

Aufgrund der hohen Kosten der Untersuchung und der bislang bundesweit geringen Laborkapazitäten sollte daher zur Erhöhung der Sicherheit bei risikobehafteten Wasserversorgungsanlagen nach Untersuchungsalternativen gesucht werden. Hier kann die grundwasserbiologische Untersuchung zumindest als Mittel für eine erste Risikoabschätzung eingesetzt werden. In einer Studie von GOLLNITZ et al. (1997) konnten Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Planktonorganismen und parasitären Protozoen festgestellt werden.

Falls also in einer Wasserfassung Organismen aus einem Oberflächengewässer, wie z.B. Algen o.ä., nachgewiesen werden können, besteht zumindest das Risiko, daß diese Wasserfassung auch hygienisch gefährdet werden kann. Im Fall eines negativen Nachweises und entsprechend einwandfreier mikrobiologischer Befunde ist das Kontaminationsrisiko demzufolge als gering einzustufen, bei einem positiven Nachweis sind weitergehende Untersuchungen dringend anzuraten.

Ohne weitergehende, zur Zeit aber noch nicht existierende Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von Organismen aus dem Oberflächenwasser im Grundwasser und der Anwesenheit von parasitären Protozoen können dies vorläufig nur orientierende Untersuchungen sein.

3 Organisation einer biologischen Grundwasserbeprobung

3.1 Hinweise zur Auswahl der Meßstellen

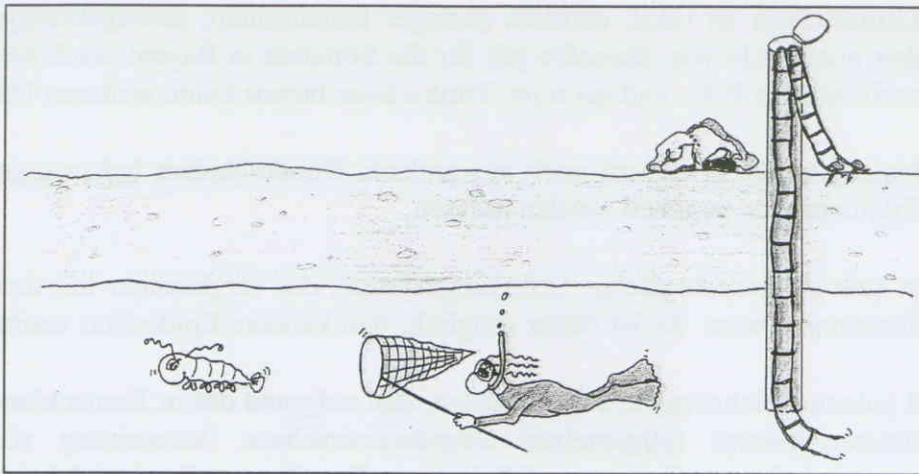


Abbildung 11: Eine freie Beprobung des Grundwassers ist selten möglich

Biologische Grundwasserproben können grundsätzlich an Brunnen oder an Grundwassermeßstellen entnommen werden, eine direkte Probennahme im Grundwasser ist i.a. nur an Quellaustritten oder ähnlichem möglich. Die Probennahme an Brunnen

erfolgt i.d.R. direkt am Wasserhahn und bedarf daher keiner weiteren Erläuterung. Die biologische Beprobung von Grundwassermeßstellen gestaltet sich hingegen komplizierter. Anhand der Erfahrungen, die im Forschungsprojekt „Untersuchungen zur Biologie des Grundwassers und die Beeinflussung durch Oberflächenwasser“ gesammelt wurden, wird die nachfolgend vorgestellte Vorgehensweise empfohlen. Für weitere Informationen sei auf den Band 120 der DVWK-Schriften „Parameter und Methoden der biologischen Charakterisierung des Untergrundes - Feststoffe und Wasser“ hingewiesen.

Folgende Punkte erfordern bei der Vorbereitung und während der Probennahme besondere Beachtung:

- Es sollten Ausbaupläne vorliegen, aus denen sowohl die Lage des geschlitzten Bereichs, als auch die Schlitzweite hervorgehen. Eine repräsentative Probe wird stets aus diesem Bereich entnommen. Für die meiofaunistische Beprobung ist es wichtig, daß die Schlitzweite möglichst groß ist (mindestens 1 mm), damit auch größere Tiere wie beispielsweise Amphipoden erfaßt werden können (vgl. **Abbildung 12**).
- Eine Beprobung des Meßstellensumpfes kann zuweilen interessante Zusatzinformationen liefern. In diesem Bereich sammeln sich häufig größere Tiere, wie Brunnendrahtwürmer oder Krebse.
- Die Meßstellen sollten über ein Peilrohr verfügen, das sich so weit über den Boden erhebt, daß keine Erde in das Grundwasser fallen kann. Bei ebenerdigen Meßstellen läßt sich das kaum verhindern, Verfälschungen sind somit unvermeidbar.
- Die Meßstellen müssen sich in einem guten Zustand befinden. Das bedeutet, daß die Schlitz nicht durch Verockerungen oder sonstige Ablagerungen verstopft sein dürfen, was bei alten, selten abgepumpten Meßstellen häufig der Fall ist. Will man eine alte Meßstelle trotzdem be-

- Die Schläuche, die für die bakteriologische Beprobung von Grund- und Oberflächenwasser verwendet werden, müssen vor jedem Probennahmetermin desinfiziert werden. Sie werden dazu mit 0,06%iger H_2O_2 befüllt und nach mind. 2 Stunden Einwirkzeit mit demin. Wasser gründlich ausgespült. Damit sich keine Biofilme bilden oder sonstige Verunreinigungen in den Schläuchen anlagern können, werden alle drei Schläuche unmittelbar nach jedem Probennahmetermin mit Leitungswasser und anschließend mit demin. Wasser ausgespült.
- Es soll vermieden werden, daß die Schläuche bei der Probennahme durch Erde verunreinigt werden. Sie werden daher auf Schlauchwägen aufgerollt. Beim Abrollen dürfen sie keinen Bodenkontakt bekommen. Angelrutenhalter können dabei hilfreich sein.

Pumpen

- Die bakteriologische Probennahme erfolgt über eine Tauchpumpe, die ebenfalls desinfiziert wird. Am Ende des Schlauches befindet sich ein abflammbarer Wasserhahn.
- Die Planktonprobe muß mittels Saugpumpe entnommen werden, da die empfindlichen Organismen durch die Tauchpumpe zerstört werden würden. Die angesaugte Probe durchläuft ein spezielles Probennahmesystem, das einen Kontakt der Probe mit der Pumpe vermeidet (siehe **Abbildung 12**).

Probennahmegeräte (pro Probennahmestelle)

- bakteriologische Proben:

Koloniezahlbestimmung:	1 x 500 ml-Glasflasche mit Schraubdeckel (steril*)
Gesamtkeimzahlbestimmung:	1 x 100 ml-Meßkolben (steril*)
Zahl der aktiven Bakterien:	1 x 100 ml-Meßkolben (steril*) mit Einwaage von 10-12 mg CTC, lichtgeschützt durch Alufolie

* Zum Sterilisieren werden die Gefäße und Deckel im Sterilschrank 2 Stunden bei 180 °C erhitzt.

- meiofaunistische Proben:

Grundwasserprobe mit 5µm-Netz:	1 x 100 ml-Glasflasche mit Schraubdeckel
Grundwasserprobe mit 55µm-Netz:	1 x 250 ml-Glasflasche mit Schraubdeckel
Sumpfsprobe:	1 x 1000 ml-Glasflasche mit Schraubdeckel

Anmerkung: Wenn sehr viel Sediment in einer Probe ist, dann größere oder mehrere Flaschen pro Probe verwenden.

Sonstige Utensilien

- Bunsenbrenner zum Abflammen des Probennahmehahns
- pro Probennahmestelle je ein Planktonnetz inklusive Netzbecher mit 5 µm und mit 55 µm Maschenweite
- Kühltasche
- Probennahmetopf für Planktonbeprobung

3.3 Probennahme, Vorbehandlung und Verarbeitung für meiofaunistische Untersuchungen

3.3.1 Probennahme

Bei der Probennahme mit einer Tauchpumpe besteht die Gefahr, daß größere Tiere, wie z.B. Flohkrebse und Asseln, zerstückelt werden. Eine Artbestimmung ist dann nicht mehr möglich. Aus diesem Grund ist eine Probennahme mit dem unten beschriebenen Probennahmesystem an Grundwassermeßstellen grundsätzlich vorzuziehen. Bei der Probennahme an Brunnen ist die Probennahme über Tauchpumpen i.a. unumgänglich, so daß die Ergebnisse, zumindest was die größeren Tiere angeht, mit einem gewissen Vorbehalt zu werten sind.

- Die Planktonentnahme erfolgt an Grundwassermeßstellen stets zu Beginn der Probennahme, da mit dem ersten Schwung die meisten Organismen abgesaugt werden.
- Es werden in der Regel 100 l Wasser entnommen.
- Bei der Beprobung von Grundwassermeßstellen kommt ein spezielles Probennahmesystem zum Einsatz, das nach einem Muster der Carl v. Ossietzky Universität Oldenburg gebaut wurde (siehe **Abbildung 12**). Dieses beruht auf dem Prinzip einer Vakuumkammer, in die ein Planktonnetz eingehängt ist. Mittels einer Vakuumpumpe wird zunächst die Kammer befüllt, um die nötige Wassersäule für die Saugpumpe zu erzeugen. Die Saugpumpe ist dem System nachgeschaltet, sie saugt aus dem oberen Drittel der Kammer das Wasser ab, wodurch ein kontinuierlicher Durchfluß gegeben ist. Das Wasser durchläuft zuerst das Planktonnetz, in dem sich die Tiere fangen, bevor es seitlich abgesaugt wird. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Tiere nicht in Kontakt mit der Pumpe kommen und im Wasser ohne Turbulenzen langsam in den Trichter des Planktonnetzes sinken können, um sich schließlich im Netzbecher zu sammeln.

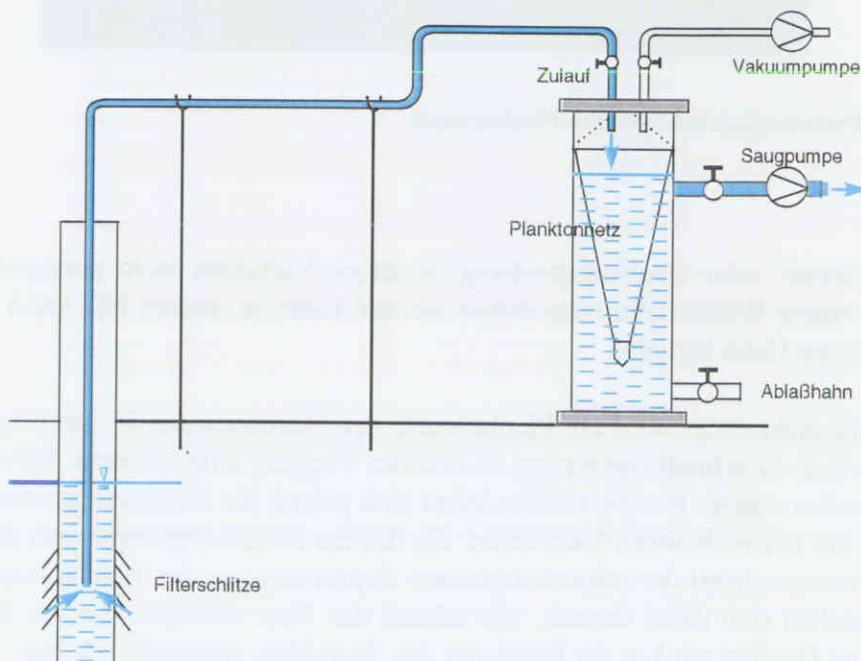


Abbildung 13: Probennahmesystem für Grundwasserorganismen



Abbildung 14 : Probennahmekammer mit Planktonnetz

- Bei der Brunnen- oder Quellenbeprobung ist dieses Verfahren nicht notwendig, sofern das Wasser an einem Wasserhahn entnommen werden kann. In diesem Fall kann man das Netz direkt unter den Hahn hängen.
- In den Probennahmetopf wird ein Planktonnetz der Maschenweite $55\ \mu\text{m}$ eingehängt. Ein $5\ \mu\text{m}$ -Netz würde zu schnell verstopfen, so daß der Vorgang unter großem Aufwand oft unterbrochen werden müßte. In vielen Fällen lohnt sich jedoch die Zusatzinformation, die die Probennahme mit einem feineren Netz liefert. Zu diesem Zweck entnimmt man die $5\ \mu\text{m}$ -Probe am besten entsprechend der bakteriologischen Beprobung mit der Tauchpumpe; die Entnahmemenge richtet sich dabei danach, wie schnell das Netz verstopft. Bei der Beprobung von Brunnen und Quellen wird in der Regel nur das $5\ \mu\text{m}$ -Netz verwendet, da hier wesentlich weniger Partikel vorhanden sind, die die Poren zusetzen könnten.

- Bei stark verockerten oder sandigen Meßstellen verstopft auch das 55- μm -Netz oft anfangs schnell, da durch das Herablassen des Schlauches Ablagerungen losgelöst werden können. Ist der Abfluß nicht mehr gewährleistet, so muß die Probennahme kurz unterbrochen und die bereits filtrierte Teilprobe aufgefangen werden. Das gereinigte Netz kann danach wieder eingehängt und die Probennahme fortgesetzt werden.
- Ist die Filtration abgeschlossen und das Probenvolumen auf den Netzbecher eingeeengt, so läßt man das Konzentrat in die Sammelflasche ab. Das Netz wird anschließend mehrmals mit Wasser aus dem Probennahmetopf nachgespült, das Spülwasser ebenfalls aufgefangen.
- Die weißen Grundwassertiere heben sich kaum gegenüber dem ebenfalls weißen Netz ab. Man muß daher genau überprüfen, ob Tiere im Netz, insbesondere an der Übergangsstelle vom Trichter zum Netzbecher, hängen geblieben sind.
- Die Proben werden in Glasflaschen mit Schraubdeckel abgefüllt und in einer Kühltasche transportiert. Sind viele große Tiere zu sehen, so füllt man die Flaschen nicht ganz voll, um ihnen Atemluft zu lassen. Ansonsten ist es jedoch besser, die Flaschen bis zum Rand aufzufüllen, um die Zerstörung empfindlicher Organismen durch Schütteln beim Transport zu vermeiden. Bei Wässern mit sehr viel Sediment sollte man die Probe mit genügend Wasser auf mehrere Flaschen aufteilen, damit die Tiere nicht zerdrückt werden.
- Nach jeder Probennahmestelle wird der Schlauch für die PlanktonProbennahme mit mitgebrachtem Leitungswasser gespült, damit es zu keinen Verschleppungen kommt.

3.3.2 Vorbereitung der Probe

- Die Probe wird in kleinen Portionen in eine Petrischale gefüllt; bei der Durchsicht mit dem Binokular sollte sich nur eine Sichte Ebene ergeben.
- Enthält eine Probe sehr viele Partikel, so daß das Aussortieren kaum noch möglich ist, muß verdünnt werden. Man läßt die Schwebstoffe auf den Grund des Probennahmegefäßes sinken und gießt den größten Teil des Überstandes in ein anderes Gefäß ab. Der Satz sollte jedoch so flüssig sein, daß sich die Organismen noch gut bewegen können. Dann wird jeweils nur ein kleiner Teil der konzentrierten Probe in die Schale gegeben und mit genügend Überstandeswasser verdünnt, so daß sich ein klares mikroskopisches Bild ergibt. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis der gesamte Satz untersucht ist.
- Sind nur sehr wenige Partikel in einem großen Wasservolumen enthalten, so kann die Probe mittels eines Filters eingeeengt werden. Als Filter kann ein kleines Sieb mit einer Maschenweite von 5 bis 55 μm (entsprechend dem eingesetzten Planktonnetz) verwendet werden. Die abfiltrierten Tiere und Partikel werden anschließend in einer kleineren Wassermenge wieder aufgenommen.
- Grundsätzlich wird zum Verdünnen oder zum Aufheben von lebendigen Tieren nur Probenwasser verwendet, andere Wässer können den Organismen schaden.

3.3.3 Untersuchung der Meiofauna

Die Organismen einer Planktonprobe sollten möglichst innerhalb von 24 Stunden nach der Probennahme quantifiziert, aussortiert und gegebenenfalls konserviert werden, um Fraßverluste und die Auflösung von empfindlichen Organismen (*Troglochaetus beranecki* zerfällt z.B. bereits nach 1-2 Tagen aus bislang nicht bekannten Gründen) zu minimieren.

Einteilung in Organismengruppen

Bei der Auswertung von Planktonproben können zwei Gruppen von Organismen unterschieden werden. Die Gruppe 1 (siehe **Abbildung 15**) beinhaltet dabei kleinere Organismen bis zu einer Größe von ca. 150 µm, die z.T. in hoher Zahl vorkommen und auch aufgrund ihrer geringen Größe nicht vollständig ausgezählt werden können. Ihre Menge wird daher stichprobenartig nach Erfahrungswerten abgeschätzt und in Abundanzen ausgedrückt:

Häufigkeitsskala für Mikroorganismen (Gruppe 1)		
1 = Einzelfund;	2 = selten;	3 = mäßig häufig;
5 = häufig;	7 = sehr häufig;	9 = Massenvorkommen

Die Größe und die zumeist verhältnismäßig geringe Anzahl der Organismen der Gruppe 2 (siehe **Abbildung 16**) machen eine Bestimmung der Stückzahl dagegen möglich.

Die genannte Unterscheidung beruht auf Erfahrungswerten, kann aber je nach Probe und Auswertungsroutine auch variabel angewandt werden (z.B. Einzelzählung von Rotatorien).

Sonstige Partikel

- anorganische Partikel
 - Fasern (häufig bunt schillernd)
 - Sandkörner
 - Fe- und Mn- Ablagerungen
- organische Partikel
 - Flocken aus Zerfallsteilen, Bakterien, Pilzen etc.
 - Pflanzenfasern
 - Pollen

Aussortieren der Tiere

- Als erster Schritt der Planktonbestimmung sollten die Tiere der Gruppe 2 möglichst rasch nach der Probennahme aussortiert werden, da diese das Ergebnis durch Fraß verfälschen können.
- Größere Tiere wie Amphipoden, Bathynellen oder Cyclopiden können häufig bereits mit bloßem Auge erkannt und aussortiert werden. Ein erstes Durchschauen ohne Hilfsmittel kann das anstrengende Durchsuchen mit dem Binokular verkürzen. Stellt man die Petrischale zu diesem Zweck auf einen dunklen Untergrund, so heben sich die meist weißen Tiere sehr deutlich ab.
- Die Petrischale wird systematisch nach Tieren durchgesehen, eine Schale mit Raster kann dabei hilfreich sein. Der Vorgang wird mehrmals wiederholt, da sich die Tiere im Untersuchungsfeld bewegen. In der Regel wird einmal auf größere Tiere untersucht, dreimal auf kleinere. Dazwischen wird die Probe immer wieder durchmischt, um unter Partikeln verborgene Tiere sichtbar zu machen.

Gruppe 1

Bakterien (Bacteriophyta)

Einzelzellen: Stäbchen u. Kokken



Fadenbildende Bakterien

Crenothrix polyspora



Fe- und- Mn-Oxidierer

Leptothrix sp.



Gallionella sp.

Schwefel-Oxidierer



Beggiatoa sp.



Thiothrix sp.

Blaualgen (Cyanophyta)

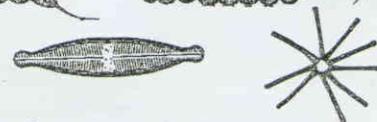


Höhere Algen

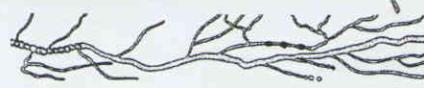
Grünalgen (Chlorophyta)



Kieselalgen (Diatomeae)



Pilze (Mycophyta)



Geißeltierchen (Flagellata)



Wimpertierchen (Ciliata)



Stentor sp.

Amöben (Rhizopoda)

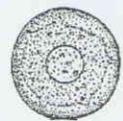
Nacktamöben (Amoebida)



Schalenamöben (Testacea)



Euglypha sp.



Arcella sp.

Rädertiere (Rotatoria)



Abbildung 15: Organismen der Gruppe 1 (Abbildungen aus Streble & Krauter, 1988)

Gruppe 2

Fadenwürmer (Nematoda)



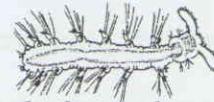
Strudelwürmer (Turbellaria)



Wenigborster (Oligochaeta)

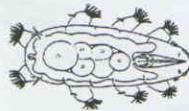


Vielborster (Polychaeta)

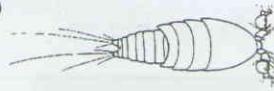


Troglochaetus beranecki

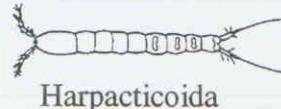
Bärtierchen (Tardigrada)



Ruderfußkrebse (Copepoda)



Cyclopoida



Harpacticoida

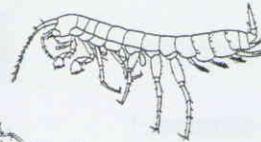


Nauplie (Larve)

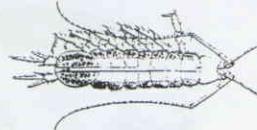
Muschelkrebse (Ostracoda)



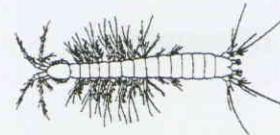
Flohkrebse (Amphipoda)



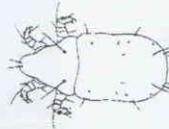
Asseln (Isopoda)



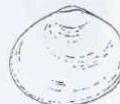
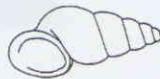
Bathynellen (Syncarida)



Milben (Acari)



Schnecken (Gastropoda)

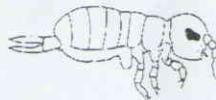


Muscheln (Bivalvia)

Wasserflöhe (Phyllopoda)



Springschwänze (Collembola)



Insektenlarven



Abbildung 16: Organismen der Gruppe 2 (Abbildungen aus Streble & Krauter 1988 und Bole & Velkovrh, 1986)

Sammeln und Quantifizieren der Tiere

- Die Organismen werden mit Glaspipetten, Präpariernadeln, Impfösen oder Pinzetten entnommen und in Blockschälchen gesammelt.
- Es hat sich bewährt, die Organismen bereits bei der Überführung von der Petrischale in die Blockschälchen zu zählen und nicht nachträglich in den Blockschälchen.
- In den Blockschälchen muß immer genügend Wasser sein, damit sich die Tiere frei bewegen können.
- Es ist sinnvoll einzelne Tiergruppen in verschiedenen Blockschälchen getrennt zu sammeln. So kann man Fraßverluste minimieren und die Tiere können leichter wiedergefunden werden. Bei manchen Tieren, so z. B. bei Asseln, empfiehlt es sich sogar die einzelnen Exemplare gesondert aufzubewahren, da sich diese auf zu engem Raum gegenseitig angreifen.
- Die Grundwasserorganismen sind sehr licht- und wärmeempfindlich. Man sollte die Proben daher nie unnötig außerhalb des Kühlschranks herumstehen lassen. Die Kühlschranktemperatur sollte ca. 10 °C betragen. Während des Aussortierens ist es ratsam, die Blockschälchen mit den Organismen auf Kühlelemente zu stellen. Müssen sie länger aufbewahrt werden, so lagert man sie abgedeckt im Kühlschrank. Beim Aussortieren der flinken Copepoden ist es hilfreich, wenn man die Probe zeitweise kalt stellt, was eine Verlangsamung ihrer Bewegungen zur Folge hat.

Konservierung

- Zur dauerhaften Lagerung der Tiere werden diese in 5%iger Formalinlösung konserviert. (Achtung: Die 37-%ige Formaldehydlösung entspricht einer 100%igen Formalinlösung, da es sich hier um die gesättigte Lösung des Gases handelt !).
- Die Tiere werden aus den Blockschälchen entnommen und mit wenig Flüssigkeit in ein kleines Glasgefäß mit Schraubdeckel gegeben. Zunächst wird nur ein Tropfen Formalin zugesetzt, um die Tiere zu betäuben. Anschließend wird die gewünschte Formalinkonzentration eingestellt.
- Alle Tiere einer Probe kommen nach Gruppen getrennt in Gefäße, die stets genau mit Probennummer, -bezeichnung, Probennahmeort, -datum und dem verwendeten Konservierungsmittel beschriftet sind.

Kleinere Organismen (Gruppe 1)

- Nachdem die größeren Tiere entfernt wurden, wird die Probe lichtmikroskopisch auf feinere Strukturen untersucht. Wurden beim vorherigen Schritt Tiere übersehen, so können sie bei der Stichprobenuntersuchung noch gefunden und registriert werden.
- Mit einer Pasteurpipette werden mehrere Stichproben vom Grund und vom Überstand der Planktonprobe entnommen und systematisch mit dem Mikroskop bis zur 1000-fachen Vergrößerung untersucht. In Proben mit wenig Partikeln sollte auch hier das Volumen mit einem Sieb (5 µm) eingengt werden. Die Abundanzen werden dann wie oben beschrieben ermittelt.

3.4 Probennahme, Vorbehandlung und Verarbeitung für mikrobiologische Untersuchungen

3.4.1 Probennahme

Die Entnahme der Proben erfolgt unter Berücksichtigung der DEV, DIN 38 411 an einem abflammbaren Wasserhahn entweder soweit vorhanden direkt am Brunnen, ansonsten wie unter 3.2 beschrieben. Schläuche und Pumpe werden vor der Probennahme mind. 2 Stunden mit 0,06% iger H₂O₂-Lösung desinfiziert.

3.4.2 Probenvorbehandlung

Die Proben werden folgendermaßen abgefüllt und behandelt:

- Koloniezahl: sterile 500 ml Glasflasche, sofort kühlen und am nächsten Morgen ansetzen.
- Lebendzellzahl: 100 ml in sterilen 100 ml-Glaskolben, in den 10 - 12 mg CTC vorgelegt sind, bis zum nächsten Morgen bei 20°C lagern, anschließend kühlen.
- Gesamtzellzahl (mit Acridinorange): 100 ml in sterilen 100 ml-Glaskolben, bis zum nächsten Morgen bei 20°C lagern, anschließend bis zur Weiterverarbeitung kühlen.

3.4.3 Mikrobiologische Untersuchungen

3.4.3.1 Koloniezahlbestimmung

Koloniezahlbestimmungen auf verschiedenen Nährböden

Der DEV-Nährboden (Merck 11471) ist aus der TrinkwV bekannt. Auf diesem nährstoffreichen Medium wachsen vor allem Bakterien mit einem hohen Bedarf an organischem Kohlenstoff (saprophytische Bakterien).

Das Probenwasser wird mit einem Drigalsky-Spatel auf dem vorgegossenen, erkalteten Nährboden verteilt (Oberflächen-Spatel-Verfahren). In Petrischalen mit 145 mm Durchmesser wird 1 ml aufgebracht, in die Standard-Petrischalen mit 94 mm Durchmesser 0,1 ml. Gegebenenfalls werden weitere Verdünnungsstufen jeweils mit 0,1 ml angesetzt. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 20°C, die Kolonien werden das erste Mal nach 48 Stunden (wie in der Trinkwasserverordnung vorgeschrieben) und dann nochmals nach 7 Tagen ausgezählt.

Der R2A-Nährboden (Difco 1826-17-1) enthält deutlich weniger Nährstoffe als der DEV-Nährboden, wirkt also selektiv zugunsten der oligocarbophilen Grundwasserbakterien, da diese von einem zu hohen Nährstoffangebot gehemmt werden können.

Der Ansatz erfolgt wie beim DEV-Nährboden, nur wird hier bei 27 °C inkubiert und anschließend nach 7 Tagen ausgezählt.

Nachweis von Bakterien der Flexibacter-/Sporocytophaga-Gruppe und von violett pigmentierten Bakterien

Neben der Gesamtkeimzahl wird mit den R2A-Platten auch die Zahl der Bakterien ermittelt, die der Flexibacter-Sporocytophaga-Gruppe (F/Sp) angehören, sowie violett pigmentierte Bakterien (v.p.). Nach SCHINDLER (1989) handelt es sich dabei um bewegliche Bakterien, die sehr gut am Boden adsorbieren. Werden sie nun entweder durch Sickerwasser von oben oder über die Uferfiltration ins Grundwasser gespült, so zeigt dies eine mangelnde Filterwirkung des Bodens gegenüber Kontaminationen von der Oberfläche an und damit mögliche hygienische Risiken.

F/Sp- und v.p.- Bakterien sind selber aus hygienischer Sicht völlig unbedenklich, allerdings dienen sie als Hinweis für eine potenzielle Gefährdung des Grundwassers durch fäkale Verunreinigungen.

Kolonien der F/Sp-Bakterien sind in der Regel gelb und haben häufig einen Schwärmsaum oder sind insgesamt nicht klar umrissen. Bakterien dieser Gruppe werden anhand des Nachweises von Flexirubinpigmenten ermittelt. Beim Auftropfen von 20%iger KOH färben sich die Kolonien rot (s. **Abbildung 17**) und bei anschließendem Auftropfen von 1%iger HCl entfärben sie sich wieder. Kolonien von violett pigmentierten Bakterien verfärben sich beim Auftropfen der KOH grün.



Abbildung 17: Platten mit R2A-Medium nach 2 Tagen Inkubation, 7 Tagen Inkubation und mit positivem F/Sp-Nachweis nach Auftropfen von KOH (Pfeile)
Die eigentlich hellgelben R2A-Platten erscheinen hier wegen der gewählten Unterlage blau-grün.

3.4.3.2 Zellzahlbestimmung

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Direktzählung werden die Gesamtzellzahl und der Anteil der stoffwechselaktiven Bakterien der Grundwasserproben ermittelt. Die Bakterien werden dazu mit verschiedenen Reagenzien als leuchtende Objekte im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und ausgezählt.

Die Vorteile dieser Methode gegenüber der Koloniezahlbestimmung sind die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse und die weitgehende Erfassung aller Bakterien.

Vitalitätsfärbeverfahren mit CTC (nach SCHAULE, FLEMMING UND RIDGWAY)

Die wäßrige Lösung des Tetrazoliumsalzes CTC (5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid) ist farblos und fluoresziert nicht, während das korrespondierende Formazan (CTF) im roten Bereich bei 620 nm fluoresziert, wenn es bei 420 nm angeregt wird.

Über das Elektronen-Transport-System des Bakterienstoffwechsels wird das lösliche CTC zum wasserunlöslichen CTF reduziert und im Zellinneren eingelagert. Atmungsaktive Bakterien, die CTF enthalten, werden als rotfluoreszierende Punkte auf schwarzem Hintergrund ausgezählt.

Bestimmung der Gesamtzellzahl

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden bisher zwei Farbstoffe getestet, DAPI und Acridinorange. Im Gegensatz zum CTC werden sie nicht aktiv in die Zellen eingelagert, sondern binden an die DNA bzw. RNA von lebenden und toten Bakterien.

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) läßt die Bakterien bei einer Anregung mit 365 nm in hellblauem Licht (390 nm) auf schwarzem Hintergrund erscheinen. Diese Methode hat den Vorteil, daß sie in einer Probe in Kombination mit CTC angewendet werden kann, wodurch ein unmittelbarer Vergleich angestellt werden kann. Für Trinkwasseruntersuchungen ist sie uneingeschränkt anwendbar.

In Grundwasserproben dagegen befinden sich neben den Bakterien auch viele organische und anorganische Partikel, die bei der eingesetzten Wellenlänge ebenfalls bläulich erscheinen können. Dieser Umstand erschwert die DAPI-Zählung erheblich. Auch in Proben mit Aggregat- und Schleimbildungen ist die Methode nur eingeschränkt einsetzbar.

Mit Acridinorange eingefärbt grenzen sich die meisten Bakterien hier auch in schleimiger Matrix, sowie gegenüber den schwach rötlich leuchtenden Schwebstoffen sehr deutlich grün ab. Nach HOBBIÉ et al. (1977) fluoresziert der reine DNA-AO-Komplex bei einer Bestrahlung mit 436 nm oder 490 nm grün, der RNA-Komplex rot-orange und Überlagerungen von beiden gelb. Der mit 95 % größte Anteil der Bakterien im Grundwasser, der sich in inaktivem Zustand oder langsamem Wachstum befindet, erscheint damit grün, tote oder stark aktive Bakterien rot. Der Nachteil der Methode ist, daß sich die Fluoreszenz mit der des CTF überlagert und die Reagenzien somit nicht im selben Ansatz eingesetzt werden können.

Versuchsvorbereitung

CTC: Polyscience 19292;

Einwaage in sterilen Meßkolben: 10-12 mg pro 100 ml Probe

Der Kolben wird mit Alufolie umwickelt, damit das Reagenz vor Lichteinstrahlung geschützt ist.

Acridinorange: Merck 1333

Gebrauchslösung: 0,1 g/l in Phosphat-Puffer pH 6,88; mehrere Wochen im Kühlschrank haltbar; vor Gebrauch sterilfiltriert

DAPI: Merck 24653

Stammlösung: 0,1 g/l in a.dem.; ca. 2 Wochen im Kühlschrank haltbar, auch einfrierbar

Gebrauchslösung: 1:10-Verdünnung der Stammlösung mit a.dem. unmittelbar vor Gebrauch (0,01 g/l); sterilfiltriert

!!! Beim Umgang mit den genannten Reagenzien sollen Handschuhe, beim Einwiegen zusätzlich ein Atem- und Augenschutz getragen werden!!!

Probennahme und Inkubation

- Untersuchungen von SCHAULE et al. (1993) haben ergeben, daß Proben transport und -lagerung zu einer Inaktivierung der Bakterien führen können. Die Grundwasserproben werden daher unmittelbar nach der Probennahme mit dem CTC angesetzt.
- Parallel dazu wird auch die Probe für die AO-Färbung entnommen. Für jeden Ansatz werden 100 ml Grundwasser in sterile Kolben gefüllt.
- Durch den zeitlichen Ablauf der Probennahme ist eine Inkubationsdauer von 18-24 Stunden festgelegt.
- Die Kolben werden im Dunkeln zunächst im Laborbus, später bei 20 °C im Brutschrank gelagert. Da die Temperaturen im Laborbus zu verschiedenen Jahreszeiten stark variieren, muß man sich mit Kühltasche bzw. Heizung behelfen.

Färbung

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben über Polycarbonatfilter von Millipore mit 0,2 µm Porenweite abfiltriert und anschließend weiter behandelt.

a) Kombinationsfärbung CTC/DAPI

Nachdem der CTC-Ansatz abfiltriert wurde, wird der Filter mit 1 ml der DAPI-Gebrauchslösung überschichtet und im Dunkeln 15 Minuten inkubiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und mit 20 ml sterilfiltriertem a.dem. nachgespült.

b) Acridinorange (AO) und CTC

Hier erfolgt die getrennte Bearbeitung der Proben. Der CTC-Ansatz wird lediglich abfiltriert. Für die AO-Färbung wird die abfiltrierte Parallelprobe mit 3 ml Gebrauchslösung überschichtet, 3 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend gespült. In **Abbildung 18** sind die einzelnen Versuchsschritte schematisch dargestellt.

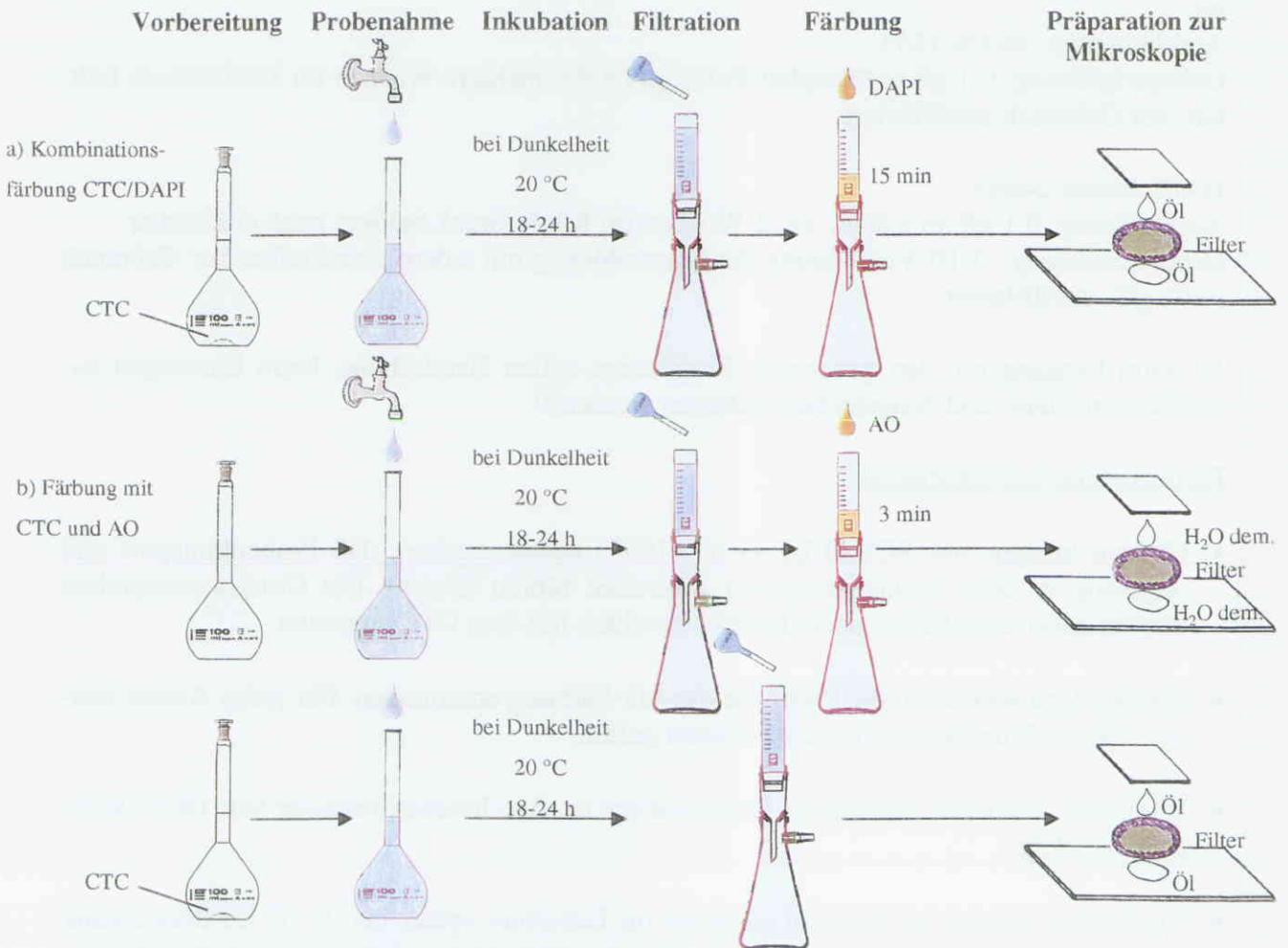


Abbildung 18: Ablaufschema bei der Fluoreszenzfärbung

Anmerkungen:

- Im Grundwasser können die Gesamtzellzahlen stark variieren. Kann die Keimzahl einer Probe nicht abgeschätzt werden, so wird das Probenvolumen aufgeteilt in 10 ml und 90 ml. Je nach Bakteriendichte wird die 10 ml- oder die 90 ml-Teilprobe ausgezählt.
- Ebenso verfährt man bei einer Probe, die durch Sand oder andere Partikel verunreinigt ist, wie es in Proben, die an Grundwassermeßstellen entnommen werden, häufig der Fall ist.
- Insbesondere die Durchführung der CTC-Färbung ist relativ störanfällig gegen verschiedene Wasserinhaltsstoffe, so daß eine qualifizierte Bewertung der Ergebnisse eine längere Einarbeitungszeit und eine Mindestanzahl von Proben erfordert.

Präparation für die mikroskopische Auswertung

- Die Proben sollten möglichst innerhalb von 7 Tagen nach der Färbung ausgezählt werden, da die Qualität bei der Lagerung, insbesondere durch Lichteinstrahlung abnimmt. Gelagert werden die Filter z. B. in Petrischalen, die mit Parafilm verschlossen und in den Kühlschrank gestellt werden.
- Für die Auswertung wird jeweils nur eine Filterhälfte verwendet, so daß man noch eine in Reserve hat.
- Der DAPI/CTC-Filter wird auf einem Objektträger mit fluoreszenzfreiem Immersionsöl (Neolab 1-6111) dünn unter- und überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.
- Der AO-Filter wird in sterilfiltriertes dem. Wasser eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Mikroskopische Auszählung

Die Zählung erfolgt bei 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) in der Auflicht-Fluoreszenz mit Hilfe eines geeichten Okulgitters. Im Projekt wurde dabei ein Leitz-Dioplan-Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung Ploemopak III und folgende Filter verwendet (mikroskopisches Bild vgl. Abb. 19):

Filtersystem I3, Blau-Anregung für Acridinorange

Filtersystem I3 mit Sperrfilter LP 580 für CTC

Filtersystem A, UV-Anregung für DAPI

- Ausgezählt werden zehn Großquadrate mit jeweils 100 Kleinquadraten nach dem Zufallsprinzip über die Filterfläche verteilt.
- Eine Zählung ist nur möglich, wenn die Bakterien in einer Schicht auf dem Filter liegen. Bei Proben mit großer Bakteriendichte oder vielen Partikeln ist nur eine Auswertung anhand der 10 ml-Teilprobe möglich.
- Pro Zählquadrat sollten nicht mehr als 200 Keime ausgezählt werden, da die Augen rasch ermüden und die Keime bei der Bestrahlung schnell verblassen. Bei höherer Keimdichte wird

der Zählvorgang dadurch beschleunigt, daß nur Teilbereiche des Quadrates ausgewertet und später auf das gesamte Zählfeld hochgerechnet werden.

- Das Vorkommen von Schleimbildungen kann das Auszählen der Keime unmöglich machen. In diesem Fall wird lediglich notiert, daß und in welchem Maße Schleimklumpen vorliegen.
- Grundsätzlich werden alle Besonderheiten, wie das gehäufte Auftreten von anorganischen und organischen Partikeln, das Vorkommen von höheren Organismen oder auffälligen Bakterienformen und -größen schriftlich festgehalten.

Berechnung

$$\text{Gesamtzellzahl / ml} = (\text{MW der Zählung} * F) / \text{Probenvolumen in ml}$$

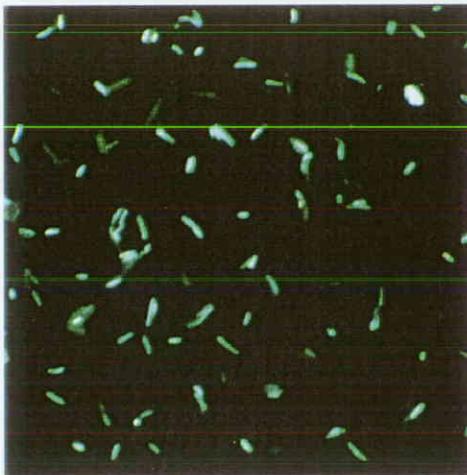
MW = der Mittelwert aus der Bakterienzahl von 10 Zählungen

$$F = BF / ZQ$$

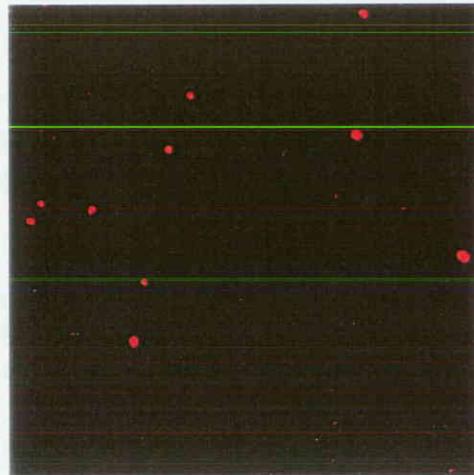
$$BF = \text{benetzte Filterfläche} \quad BF = \pi * (d/2)^2$$

d = innerer Durchmesser des Filteraufsatzes

ZQ = Fläche des Zählquadrats mit 1000-facher Vergrößerung



a



b

Abbildung 19: Fluoreszenzfärbungen im mikroskopischen Bild; *a*: DAPI, *b*: CTC