

Karstprogramm 1995

Susanne Schmidt

Graz, im Jänner 1996

2. Teil: Konzeptive Weiterentwicklung des Nationalparklabors und versuchsweise analytische Behandlung.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITENDE BEMERKUNGEN	2
2.	EIN KLEINER GESCHICHTLICHER EXKURS IN DIE ERFORSCHUNG DER WASSERMIKROBIOLOGIE	2
3.	UNTERIRDISCHE GEWÄSSER IN MIKROBIOLOGISCHER BETRACHTUNG.....	4
3.1.	Verteilung und Anzahl der Mikroben im Grund bzw. Karstwasser	4
4.	AUFENTHALTSBEREICHE (MIKROHABITATE) DER MIKROBEN IM KARST	6
4.1.	Anpassung der Bakterien an unterirdische Bedingungen:.....	7
4.2.	Ernährungsformen:	7
4.3.	Rolle des Sauerstoffs und anderen Elektronenakzeptoren:	8
4.4.	Einfluß des pH- Wertes und der gelösten Salze.	8
4.5.	Temperatur.	9
4.6.	Einfluß des hydrostatischen Druckes.	9
4.7.	Dunkelheit.	9
4.8.	Sedimentbeschaffenheit und Durchlässigkeit.....	10
4.9.	Geochemische Funktion der Mikroorganismen:	10
4.10.	Mikrobiologische Vorgänge in Karst(wasser)körpern.....	10
5.	MYXOBAKTERIEN.....	12
5.1.	Grundlegendes zur Biologie der Ordnung Myxobacteriales	12
5.2.	Modellvorstellung zur Mikrobiologie von Höhlensedimenten.....	12
	(MENNE ET AL., 1988).....	12
5.3.	Artenidentifikation in der Höhle (Hagengebirge)	13
5.4.	Psychotrophie	14
5.5.	Untersuchungen der Schwäbischen Alb nach Myxobakterien	15
6.	AUSWEITUNGEN DER MIKROBIOLOGIE IM NATIONALPARKLABOR	16
6.1.	Qualitätskontrolle – Qualitätssicherung bei bakteriologischen Untersuchungen	16
6.2.	Erweiterte Differenzierung des Keimspektrums durch VITEK-Analysen bei den Quellen	19
6.3.	Verwendung des EMX- Agar statt Endo- Agar (Vor- und Nachteile)	19
6.4.	Anwendung von Verdünnungsreihen bei stark mikrobiell belasteten Quellen (Steyernquelle und Hintere Rettenbachquelle)	21
6.5.	Beprobung der Seen in der Rettenbachhöhle	22
6.6.	Abhängigkeit der Escherichia coli- Coliformen- und Gesamtkeimzahl von der Trübung des Wassers.....	22
6.7.	Erfassung der Gesamtzellzahl durch Direktmessung mit Zählkammer und Suche nach einem Optimalmedium.....	23
6.8.	Untersuchung des Tagesrhythmus der Mikrobiologie in ausgesuchten Quellen.....	23
6.9.	Berechnung der Bakterienfracht pro Zeiteinheit:	23
6.10.	Untersuchung der Bakteriendrift über den Quellquerschnitt	24
7.	LITERATURVERZEICHNIS:	24

1. Einleitende Bemerkungen

Die Gewässermikrobiologie, vor allem die Erforschung von stofflichen Umsätzen durch Bakterieneinwirkung, hat immer mehr an Bedeutung gewonnen. Gerade deshalb ist auch das Interesse für mikrobiologische Vorgänge in Karstsystemen im Rahmen des Karstmonitoring- Projektes im NP-Kalkalpen größer geworden. Das unterirdische Karstwassersystem ist weit von einem homogenen System entfernt. So stellte sich auch die geplante Literatursuche bald als eine Suche nach Fragmenten in Teilbereichen vieler anderer Fachrichtungen heraus. Vor allem in Österreich wurde speziell die Karstwassermikrobiologie nur mangelhaft bearbeitet und wurde dann fast ausschließlich nach bakteriellen- hygienischen Kriterien für Gutachten ausgewertet. Eine bakteriologische Untersuchung von Quellwässern des Wasserverbandes „Totes Gebirge“, wurde in monatlichen Abständen über den Zeitraum vom 10.11.1988 bis 19.10. 1989 von der Steirischen Landesregierung durchgeführt. Weiters liegen umfangreiche mikrobiologische Arbeiten über den Steirersee zur Verfügung. (Diese beiden Studien werden als Vergleichsliteratur für das Karstmonitoring noch gesondert bearbeitet). Mikrobielle Grundlagenforschung im Bereiche von Grundwasser wurde vor allem in den Vereinigten Staaten betrieben. Auch in Europa gibt es einige Spezialisten, sowie gute Literatur vor allem in Ländern wie Deutschland und Frankreich. Auf interessante Beiträge im Bereich der speleologischen Sedimentuntersuchungen stieß ich durch Veröffentlichungen eines deutschen Mikrobiologen und Höhlenforschers. Durch sein großes Interesse auf dem Gebiet zur Erforschung der Karstsysteme konnte mittlerweile ein Treffen arrangiert werden. Herrn Benjamin Menne sei an dieser Stelle für seine Bereitschaft zur Mitarbeit und für zahlreiche Informationen, sowie für Hinweise auf Fehler und Ungenauigkeiten im Bereich der Karstmikrobiologie in der Nationalparkforschung Kalkalpen herzlichst gedankt. Das Anliegen dieser Arbeit soll einerseits eine ausführliche Einführung zu einem Allgemeinverständnis in die Mikrobiologie, sowie ein Anstoß für den Weiterausbau der mikrobiologischen Arbeit im Nationalparklabor sein.

2. Ein kleiner geschichtlicher Exkurs in die Erforschung der Wassermikrobiologie

Die Erforschung des Wassers auf wissenschaftlicher Grundlage begann in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Auch damals basierte vieles auf chemischen Grundlagen und die mikrobiologischen Untersuchungen waren vorwiegend hygienisch-mikrobiologischer Art, d.h. sie wurden zur Untersuchung des Wassers als Faktor bei der Übertragung von Krankheitserregern durchgeführt. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts bewirkten Erkenntnisse durch Diagnostik der Bakterien des Wassers reges Interesse an der bakteriologischen Wasseruntersuchung. Man konnte nachweisen, daß praktisch alle Wässer eine gewisse Anzahl von Mikroorganismen enthalten und das proportional dazu auch die Wasserverunreinigung ansteigt. Mit einbezogen wurden auch weitere die Bakterienzahl beeinflussende Faktoren, wie Jahreszeiten, Regenfälle und der Wasserstand. Erste hydrobakteriologische Erforschung im ökologischen Sinne führte VORONIN am Glubokoe- See Ende des vorigen Jahrhunderts (1897) durch. Er befaßte sich vor allem mit dem Verhältnis des Bakterienvorkommens in Gewässern zur Biomasse. Seine Ergebnisse sind jedoch nur aus einem kleinen Teil der Gesamtzahl der Mikroorganismen abgeleitet, da die Methodik der direkten Mikroskopie noch unbekannt war. Anfang des 20. Jahrhunderts widmete man sich der Erforschung der autochthonen und allochthonen Mikroflora in Seen und Stauseen und es konnten viele hydromikrobiologische Grundkenntnisse gewonnen werden. Zu diesen gehörten Ergebnisse über die zonale Verteilung der Bakterien im Wasser und über die Beziehung der Mikroorganismen zur Qualität und Quantität der Nährstoffe. Ein weiterer Erfolg und Meilenstein war das direkte mikroskopische Auszählen von Mikroorganismenzellen. Zu Beginn der vierziger Jahren erschienen erste Arbeiten über die Bakterienökologie, die Beziehung der Bakterien zum Phytoplankton und das detaillierte Studium des mikrobiellen Planktons als Ganzes, ermöglicht durch die Methode des direkten mikroskopischen Auszählens von Mikroben auf Membranfiltern. Auf Grund langjähriger Forschungen kam man bereits damals zu der Auffassung, daß bei Proben der gleichen Entnahmestelle die Ergebnisse der bakteriologischen Wasseruntersuchungen auch bei unveränderlichen Verunreinigungsgrad unterschiedlich sein können und das diese

Schwankungen in direkter Beziehung zu den hydrologischen Verhältnissen stehen. Als Klassiker der Gewässermikrobiologie sind sicherlich auch KOCH und GÄRTNER (19. Jhd.) nennenswert, die ihre Kenntnisse aber eher für öffentliche Gesundheitspflege verwerteten. Im Bereich der Hydrobakteriologie kam GÄRTNER zu der Feststellung, daß die Keimzahl im Wasser im besonderen Maße vom Gehalt an organischen Stoffen abhängig ist. Wichtig ist einer seiner wichtigsten hygienischen Leitsätze, nach denen ein Wasser mit mäßigen Organismengehalt keineswegs stets als unrein anzusehen ist, ein Wasser mit zunehmender Organismenzahl jedoch immer unappetitlicher und damit - obwohl Krankheitserreger fehlen können - für Trinkzwecke unbrauchbar wird. Die wesentlichsten Beiträge aus der Wasserhygiene kamen aus dem vergangenen halben Jahrhundert. Gegenwärtig befaßt sich eine immer größer werdende Anzahl von Spezialisten mit der Erforschung des Wassers vom Standpunkt der Mikrobiologie bzw. Limnomikrobiologie (Daubner, 1984). Die Ausweitung der Mikrobiologie in Richtung ökologischer Grundwasserstudien und speziell in Bereiche zur Erforschung von Karstsystemen begann in den 30 iger Jahren. Anfangs haben Wissenschaftler angenommen, daß unterirdische Systeme praktisch steril wären. Vor allem aber war es schwierig in diesen oft fast unzugänglichen Territorien sterile Proben zu entnehmen. Erste bakteriologische Analysen von Quellwässern erbrachten nur pathogene Bakterien oder Verunreinigungsfaktoren, die von der Oberfläche stammten. Die damals vermehrt durchgeführten Höhlenuntersuchungen ließen den Eindruck aufkommen, daß die in den Höhlen vorkommenden Bakterien nur von der Oberfläche stammen und durch Regenwasser, Kluftwasser, Luftthermik, Menschen oder Tiere in die Höhlen eingebracht werden. Aufgrund dieser Annahme war es nicht möglich, Bakterien als zur Höhle gehörend, einzuordnen. Der Nachweis und eine annähernde Aufschlüsselung von Gesamtbakterien in Wassersystemen wurde von WOLTERS und SCHWARTZ (1956) gemacht. In den 70 iger Jahren begannen die Arbeiten für die eigentliche Grundlagenforschung und ökologischen Studien über Oberflächengewässer, speziell in den USA und in Deutschland. Das Interesse für Grundwassermikrobiologie wurde in den 80 iger Jahren stärker, vor allem durch Arbeiten von GHORSE and BALKWILL, 1983; HIRSCH and RADES-ROHKOHL, 1983. Das wissenschaftliche Arbeiten an Grundwasserstudien war vorerst hauptsächlich von Sparten der Wassernutzung ausgegangen. Die Art der Verunreinigung des Grundwassers, das oft aus fossilen Wassersystemen stammt, sollte entschlüsselt werden. Umfangreiche Bestandsaufnahmen zwischen Ökologie, Physiologie und zytologischer Strukturforschung wurden gemacht. Man wandte sich immer spezielleren Bereichen zu und die kausal-analytisch-experimentelle Richtung gewann rasch ein deutliches Übergewicht über die deskriptiv-ökologische. Stimuliert wurde die Entwicklung der mikrobiologischen Forschungsprogramme unterirdischer Systeme vor allem in den USA (U.S. Department of Energy, U.S. Geological Survey, and U.S. Environmental Protection Agency), in England (Institute of Geological Science and Water Research Center) und in Deutschland (Umweltbundesamt) durch das bekannt werden der Kontamination von Tiefenwasser mit Radionukliden. Es war wichtig eine eigene Terminologie und Charakterisierung für die Mikrobiologie zu bekommen, denn vielfach war die hydrobiologische Terminologie vielfach überfordert, wenn es galt, mikrobiologische Phänomene einzugliedern. Die Unvereinbarkeit des produktionsbiologischen Autotrophie- Heterotrophie-Schemas mit den viel differenzierteren biochemischen Reaktionsmöglichkeiten bei Mikroorganismen gibt hierfür ein Beispiel. Dennoch gehen, vor allem aber von der ökologischen Mikrobiologie, an einer Grenze der Produktionsbiologie und der Stoffkreislaufforschung, wichtige Impulse aus. Mikroorganismen haben eine Doppelrolle für den Bereich als „Futterorganismen“ und als „Transformatoren“ im Stoffkreislauf der Bioelemente. In dieser Hinsicht stellen sie gewissermaßen eine zentrale Rolle im Ökosystem dar und die Hydromikrobiologie kann eine Brückenfunktion zwischen einzelnen Teildisziplinen der Ökologie ausfüllen. Die Besetzung dieser Forschungsarbeiten wurde interdisziplinär durchgeführt; Mikrobiologen, Hydrogeologen, und Geochemiker arbeiteten zusammen und entwickelten neue Beprobungstechniken. Die Ergebnisse der damaligen Forschungen sind im MICROBIAL ECOLOGY, VOL.16(1988), einem speziellen Abschnitt vom GEOMICROBIOLOGY JOURNAL, VOL.7(1989), und im PROCEEDINGS OF THE FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIOLOGY OF THE DEEP SUBSURFACE (1990) veröffentlicht. Mikrobiologische Ergebnisse von „Grundwasserstudien“ weisen immer sehr stark auf Habitate in Bodenschichten hin, weil

Mikroorganismen alle möglichen Mikrohabitate und möglichen Formen zum Überleben im Wasser in Anspruch nehmen. MADSEN UND GHJORSE, 1993 haben gezeigt, daß genau Grundwasserhabitate zum terrestrischen Habitat Synonymität erreicht haben. Die Arbeiten stützten sich schwerpunktmäßig auf die autochthone Mikrobiologie aus alten unberührten Karstsystemen. In den vergangenen Jahren ist sehr viel auf diesem Gebiet gearbeitet worden, doch muß man anschließen, daß die methodischen Grundlagen der mikrobiologischen Wasseranalytik allerdings noch sehr entwicklungsbedürftig und weniger zuverlässig und aussagekräftig geblieben sind als etwa die Methodik der Wasserchemie, (Microbial Ecology of Groundwater).

3. Unterirdische Gewässer in mikrobiologischer Betrachtung

Global gesehen verdunstet permanent Wasser, das in der Atmosphäre in Form von Wolken kondensiert und als Tau, Regen oder Schnee auf die Erdoberfläche zurückkehrt. Ein gewisser Anteil versickert im Boden und bildet Grundwasser, das sich über undurchlässigen Schichten staut. Andererseits dringt auch seitlich von Seen und Flüssen Wasser in den Boden ein. Die Bodenschicht, die das Grundwasser führt, wird als Grundwasserträger bezeichnet, die darunter liegende undurchlässige Schicht als Grundwasserstauer. In den Kapillaren von Felsböden befindet sich das Schichtwasser, was auch bei manchen Kalkgesteinen vorkommt, hauptsächlich aber bei groben Sandsteinen. In Karstgebieten kommt hauptsächlich Kluftwasser vor, das auch dem Karstgebiet die ausgeprägte Form gibt. Das Kluftwasser, das in Höhlen Stalaktiten und Stalagmiten entstehen läßt, ist auch vielfach nährstoffreicher als das Grund- und Schichtwasser und hat deshalb auch eine reichere Mikroflora. In Kalkgebirgen tritt das Kluft- und Schichtwasser auch in Form von Quellen aus. Die Mikrobiologie der Grundwässer umfaßt, wie auch andere Wässer, eigentlich alle mikroskopisch kleinen pflanzlichen und tierischen Lebewesen, wie Bakterien, Viren, Pilze, einzellige Algen, Protozoen und die kleinsten Metazoen wie Rotatorien. Aus methodischen Gründen befaßt sich die Mikrobiologie im NP-Labor vorerst nur auf Bakterien. Jedes Wasser enthält Bakterien, wobei die Arten und Individuendichte von physikalischen, chemischen und biologischen Faktoren begrenzt werden. Eine gewisse Ausnahme können jedoch Quellen darstellen, die aus verschiedenen Gründen Formen des Lebens ausschließen können (Temperaturen, hohe Konzentrationen toxischer Stoffe). Wichtig ist für die Mikrobiologie auch, gewisse Begriffe, die aus der Limnologie und Limnomikrobiologie kommen, zu definieren. Neben den gelösten Stoffen befindet sich im Wasser eine Vielzahl ungelöster und unlöslicher Verbindungen. Diese sind entweder suspendiert oder bewegen sich als Schwebestoffe, können aber auch sedimentieren. Schwebestoffe haben entweder einen organischen oder anorganischen Ursprung und werden in der Hydrobiologie als Seston (griech.: Abgesiebtes) bezeichnet. Ihr organischer Anteil wird als Bioseston und der unbelebte Anteil als Abioseston oder Tripton bezeichnet. In der Mikrobiologie wird anstelle der Netzfiltration (in der Hydrobiologie) die Membranfiltration angewandt, mit der man mit Membranfiltern, die eine effektive Porenweite im μm -Bereich haben, auch die kleinsten Organismen erreicht. So ist es möglich, die letzte Teilchen-Größen-Fraktion, die noch Organismen enthält, abzugrenzen. Diese Teilchenfraktion wird auch Mikroseston genannt. Frühere Bezeichnungen für die mikrobielle Besiedelung im Wasser waren auch Nannoplankton, oder ein definierterer Gesamtbegriff wie Ultrannoplankton für die mikrobielle Biozönose.

Verteilung und Anzahl der Mikroben im Grund bzw. Karstwasser

Wenn man im Vergleich die Gesamtheit an unterschiedlichen Gewässern (Oberflächengewässer; Grundwässer) betrachtet, so stellt man fest, daß Grundwässer zu den in der Natur reinsten Wasservorkommen zählen. Betrachtet man nun aber Wasservorkommen in Karstgebieten (Quellen u.ä.), dann stellt man mit geeigneten Methoden fest, daß Mikroorganismen, auch in zum Teil hoher Anzahl, in Tiefen existieren. Die Effektivität der natürlichen Filtrationskraft des Bodens nimmt bei so stark porösen Böden mit der geringeren Bodendichte ab. In solchen Böden muß natürlich eine größere Mächtigkeit vorhanden sein, um dieselbe Zahl von Mikroorganismen zu entfernen, wie im dichten Erdreich. Andererseits nimmt der Mikrobengehalt auch im Zeitverlauf an Menge ab. Wenn das

Wasser durchschnittlich 5m / Monat durchsickert, bedeutet dies, daß für eine Tiefe von 600 m 10 Jahre benötigt werden. In so langer Zeit werden Mikroorganismen aufgrund eines starken Mangels an Nährstoffen nicht überleben können. Mikroben besiedeln in Kalksteinformationen und Karstgebieten genauso über Bodenrisse o.ä. die „Unterwelt“. Hierfür spielen die geologische Formation unter der Erdoberfläche, die Durchlässigkeit der einzelnen Schichten und der hydrostatische Druck eine wichtige Rolle.

Die Artenverteilung der Mikroben im Karstwasser kann im allgemeinen in drei große Gruppen eingeteilt werden(Daubner, 1984; Rheinheimer 1991):

1. autochthone Wassermikroorganismen
2. Bakterien aus Boden und Luft
3. von Mensch und Tier eingetragene Mikroorganismen

Autochthone Bakterien (den echten Wasserbakterien), die in den Gewässern ihre eigentliche Heimat haben und sich nur dort optimal vermehren können, zeigen sehr differenzierte morphologische, physiologische und systematische Gruppen auf. Sie zeichnen sich in der Regel dadurch aus, daß sie sehr geringe Nährstoffkonzentrationen ausnutzen vermögen. In den meisten Fällen dominieren Gram-negative Bakterien, also solche, die nach der Gram- Färbung mit Kristallviolett und anschließender Behandlung mit Jod-Jodkalium- Lösung durch Alkohol wieder entfärbt werden. Es ist ein wichtiges taxonomisches Merkmal, womit man den Bau der Zellwand und weitere Merkmale erkennen kann. Es kommen aber auch chromogene, achromogene grampositive, Aktinomyceten und Pilze vor. Die Taxonomie von Grundwasser Organismen ist nur marginal entschlüsselt (BIANCHI et al.,1987; KÖIBEL-BOELKE et al.,1988b;BALKWILL et al.,1989;BREEN et al.,1989;JIMENEZ,1990). Folgende 24 unterschiedliche Gattungen geben einen Überblick der Mikroorganismen, die in Grundwasser und Sedimenten gefunden wurden (HIRSCH et al.,1992):

- Actinomyces
- Moraxella
- Achromobacter
- Bacillus
- Caulobacter
- Cythophaga
- Flavobacterium
- Hyphomicrobium
- Micrococcus
- Nocardia
- Pseudomonas
- Microcylus
- Prosthecomicrobium
- Planctomyces
- Gallionella
- Agrobacterium
- Clostridium u.a.

Gram-negative Bakterien dominierten in sandigen Bereichen, gram -positive Bakterien kamen zu einer höheren Anzahl in schlammigen Schichten vor (THORN UND VENTULLO,1988; FREDRICKSON et al.,1990).

In Quellen kommen andere Bakterien, durch verstärkte Infektionsmöglichkeit durch die Umgebung und der durch diese bewirkten Nährstoffzufuhr dazu. Es gibt weitere autochthone Bakterien, die zur Gruppe der phototrophen Bakterien gehören. Diese besitzen spezifische Enzyme zur anaeroben Photosynthese. Sie kommen hauptsächlich an der Grenze der aeroben und anaeroben Zone von Gewässern vor, können aber auch in Sedimenten vorkommen. Ein großer Fortschritt in der Bakteriologie sind die Erkenntnisse im Bereich der Myxobakterien. Sie wurden lange Zeit als reine Bodenorganismen bzw. Zelluloseersetzer betrachtet. Forschungen auf diesem Gebiet zeigten, daß der Metabolismus dieser Bakterien an niedrige Nährstoffkonzentrationen angepaßt ist, was auch einen

Beweis für einen Wasserbewohner darbringt. Diese morphologisch und physiologisch sehr interessante Gruppe von Mikroorganismen wird noch in einem eigenen Kapitel beschrieben. Weiters sind die meisten autochthonen Bakterien beweglich. Sie haben Geißeln, oder sie können am festen Substrat kriechen. Es wurden auch Fimbrien nachgewiesen, die eine Rolle etwa bei der Bildung von sternförmigen Zellaggregaten spielen. Aktiv bewegliche Bakterien sind zu gerichteten Ortsbewegungen sog. Taxien befähigt, die durch bestimmte Umweltfaktoren ausgelöst werden. Darunter gibt es die Chemotaxis, wo Bakterien auf chem. Verbindungen reagieren; die Aerotaxis, wo sich Bakterien zum Sauerstoff hinbewegen, anaerobe fliehen; die Phototrophie, wo phototrophe Mikroorganismen positiv phototaktisch, farblose heterotrophe Bakterien negativ phototaktisch reagieren, weil sie durch stärkere Lichteinwirkung geschädigt werden. In Gewässern wurden auch Bakterien gefunden, die sich in einem lokal geomagnetischen Feld orientieren. Dabei handelt es sich um magnetotaktische Organismen, deren Schwimmrichtung durch das Magnetfeld beeinflusst wird. Weitere charakteristische Wasserbewohner sind hauptsächlich die chromogenen Stäbchen *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marescens*, *Bacterium indicum*, *Chromobacter aureus*, *Chr. ochraceum*, *C. violaceum*, *Bacillus liquidus*, *Flavobacterium aquatile*, *Aeromonas puncta*, *Micrococcus candicans*, *M. aquatilis*, *M. coronatus*, *M. rhenanus*, *M. luteus*, *Staphylococcus margaritaceus*, *Sarcina alba* und *S. paludosa*. An Spirochaeten sind *S. plicatilis*, *Spirillum rugula*, *S. serpens*, *S. tenue*, *S. undula*, *S. volutans* u.a.

Gewässerbakterien stellen keine einheitliche Gruppe dar, denn sie kommen fast in allen Ordnungen der Klasse Bacteria vor.

Die Gruppe der Mikroben, die durch menschliche und tierische Ausscheidungen in Quellen gefunden werden, soll hier nicht mehr näher beschrieben werden. Diese Gruppe von Bakterien ist im Endbericht 1995 Teilprojekt 7/5 Teil 1 ausführlich bearbeitet worden.

4. Aufenthaltsbereiche (Mikrohabitate) der Mikroben im Karst

Der Großteil der Mikroorganismen, vor allem autochthone Bakterien, sind an Sedimente angeheftet. Nur ein geringer Anteil ist im freien Wasser zu finden. Um ein wahrheitsgetreues Bild der Mikroben in Wassersystemen zu bekommen ist es wichtig, auch Sedimentproben zu entnehmen. Das schwierige an den Forschungsarbeiten war und ist die Komplexität einer sterilen Probenahme und natürlich die hohen Kosten für adäquate Bohrungen. Es gibt Vergleichsstudien, wo die Stichhaltigkeit der Ergebnisse von ersten Arbeiten auf diesem Gebiet überprüft wurden. Arbeiten, wo die Proben nicht aseptisch genommen wurden oder von stehenden Quelltöpfen das Wasser entnommen wurden oder auch von Sedimententnahmen, wo die Anzuchtbedingungen nicht den autochthonen Organismen angepaßt waren, sind verglichen worden. Der erste wichtige Schritt für das Studium der Mikroben und deren Aktivitäten im Karst, war die Anforderung an die Technik zur geeigneten Probenentnahme.

Drei wichtige Kriterien für die Probenabnahme:

1. Die Probenabnahme soll aus einem definierten Biotopteil eine repräsentative Stichprobe liefern,

2. Die Probe darf nicht mit Biotopfremden Mikroorganismen in Berührung kommen

3. Die Probe muß möglichst unverändert zur Analyse gelangen;

d.h., physikalisch- chemisches Milieu und Populationszusammensetzung müssen während der Entnahme und des Transports zum Arbeitsplatz erhalten bleiben (Reichhardt, 1978).

Seit den ersten Versuchen von SCHREIBER(1929)und DUDICH(1930), Karsthöhlen mikrobiologisch zu untersuchen, haben sich erst vor kurzem die klassischen Methoden der Boden und Grundwassermikrobiologie eingebürgert. Außer den klassischen Methoden haben sich keine neuen Methoden in der Karstmikrobiologie bewährt. Höhlenbiotope sind so divers, daß es schwierig wird einen Überblick ihrer Mikrowelt zu geben. Wasser und Sedimentproben von Höhlen lieferten Mikroorganismen in einer beachtlichen Anzahl. Pro ml Wasser wurden 10^2 bis 10^4 Bakterien gefunden und pro Gramm Trockensediment 10^4 bis 10^8 Bakterien gefunden. Physiologische Aktivitäten (wie die Oxidation von Schwefelkomponenten, Eisen oder Magnesium; Nitrifikation oder Denitrifikation;

Stickstoffbindung, Zellulosezersetzung, usw.) zeigten sich aus Kulturmethode oder von chemischen Analysen. SARBU (1990) fand Schwefel-oxidierende Bakterien in einer Höhle, die keinen direkten Kontakt zur Oberfläche und auch keine Bestandteile einer thermischen Quelle aufzuweisen hatten. Die Liste von Gattungen und Arten von Bakterien, die man in Höhlen gefunden hatte, waren recht irreführend, denn die klassischen Methoden zur Identifikation waren teilweise nicht mehr durchführbar, und die Arten, die man identifizieren konnte, waren wahrscheinlich Bakterien von der Oberfläche. Man nimmt an, daß die meisten der nachweisbaren Bakterien von der Oberfläche durch Wasser, Tiere und Menschen eingebracht worden sind. Die Anwesenheit von abgestorbenen Pflanzenresten und Stücke von verfaulten Holz, verfrachtet durch das Regenwasser und Schmelzwasser oder auch durch unterirdische Flüsse, sind Beweise dafür. Wahrscheinlich entwickeln sich eingebrachte Oberflächenbakterien auf diesen organischen Materialien (KILBERTUS UND SCHWARTZ; 1981; EICHEM et al., 1993). Gerade durch solche Erkenntnisse ist es schwer geworden, autochthone Bakterien von den zahlenmäßig höheren Bakterien, die von Oberflächenbereichen kommen zu unterscheiden. Photosynthese betreibende Cyanobakterien und eukaryotische Algen, können sich an Höhleneingängen mit geringsten Lichtverhältnissen entwickeln. Auch einige Cyanobakterien können in völliger Dunkelheit leben, diese wurden aber nur in Gängen gefunden, die mit Oberflächenwasser versorgt wurden. Pilze vermehren sich teilweise an abgestorbenen Holz und Pflanzenresten, was aber diese Organismen von den autochthonen Organismen abgrenzen läßt. Die ersten Nachweise autochthoner Mikroorganismen in tiefen Wassersystemen gelangen mit biochemischen Markierungen (WHITE et al., 1983, 1990) und im nächsten Schritt durch Gesamtzellzahl- und Lebendzellzahl nachweisen. Einige der damals genommenen Proben waren anscheinend steril, andere hingegen zählten hohe Keimzahlen (bis zu 10^8 /g). Elektronenmikroskopische Untersuchungen bewiesen, daß es sich um autochthone Bakterien handelte. Diese Bakterien hatten eine unterschiedliche Morphologie und Physiologie, und man versprach sich dadurch mehr Information über das Leben bezüglich Tiefe und Metabolismus zu bekommen. BONE und BALKWILL (1988) haben die Mikroflora eines Bodens an der Oberfläche mit der Mikroflora einer seichten Wasserstelle in Oklahoma verglichen. Die gefundenen Species im Boden waren vollständig unterschiedlich zu denen die im Wasser überwiegen. Die Mikrobiologie ist im Bereich des Wassers artenärmer als im Boden, jedoch nimmt die anderartige Gestaltung nicht mit der Tiefe ab. Weitere Anhaltspunkte ergaben sich auch durch DNA- Analysen oder molekularbiologische Analysen mit 16 S-ribosomaler RNA. Man bekam Einblicke in eine noch größere Verschiedenartigkeit der unterirdischen Wasserbakterien, und man erkannte, daß kein gefundener Stamm identisch zu einem Stamm der Oberfläche war (JIMENEZ, 1990). Da es zu so einer Artendiversität gekommen ist, bedurfte es einer langen ökologischen Adaptionzeit in unterirdischen Systemen. OGUNSEITAN et al. (1987) isolierte Plasmide aus drei Proben, die er aus unberührten Grundwasser und aus kontaminierten Grundwasser entnommen hatte. Die meisten Plasmide enthielt die verunreinigte Probe.

Anpassung der Bakterien an unterirdische Bedingungen:

Die Bedingungen in der unterirdischen Welt sieht recht unvorteilhaft für Mikroorganismen aus: aufgrund fehlenden Lichtes ist keine Photosynthese möglich und auch keine Primärproduktion für heterotrophe Mikroorganismen. Mangelhaft sind auch Elemente wie org. Carbonsäuren, Stickstoff, Phosphor usw.. In tieferen Bereichen existiert beinahe eine mikroaerophile Atmosphäre, und die Temperaturen sind sehr niedrig. Bakterien sind aber bekannt dafür, daß sie in extremen ökologischen Nischen leben können. So ist es nicht verwunderlich, daß sie auch in diesem Bereich eine eigenständige morphologische und physiologische Dynamik entwickelt haben.

Ernährungsformen:

Autochthone Mikroorganismen in unterirdischen Systemen sind chemotroph. In diesen Habitaten wird die Aktivität von chemolithotrophen Organismen von einigen Faktoren beschränkt werden, vor allem durch niedrige Temperaturen in kalten Gebieten. In ursprünglichen Systemen, wo Stickstoff (Ammonium) fehlt, gibt es auch keine nitrifizierenden Bakterien, im Gegensatz zu Fe^{2+} oxidierenden

Bakterien wie Gallionella. Für diese mikroaerophilen Organismen genügt bereits wenig vorhandener Sauerstoff. HALLBECK UND PEDERSEN;1991 zeigten, das sie jedoch auch fähig sind heterotroph zu wachsen. Fe^{2+} und Mn^{2+} oxidierende Bakterien der Gattung Leptothrix sind wahrscheinlich auch nicht autotroph. Schwefelbakterien sind generell acidophil, und kommen in thermalen Gewässern mit höherem Schwefelgehalt vor (DAUMAS et al.,1986; SARBU,1990). Wasserstoff-oxidierende Bakterien wurden zu 35% aus größeren Tiefen von Sedimenten isoliert (FREDRICKSON et al.,1989). Manche Bakterien in tieferen Sedimentschichten sind chemoorganotroph. Außer in Torf oder Braunkohleschichten, ist aber der Anteil an org. Kohlenstoffen, sowohl im Wasser als auch im Sediment, sehr niedrig. Der Großteil des Grundwassers enthält weniger als 1 mg/l gelösten org. Kohlenstoff, und die Böden nur mehr Spuren davon. Wenige nicht so tief vorkommende Gewässer, enthalten ca. 9- 15 mg/l gelösten org. Kohlenstoff. Immerhin hängt die Möglichkeit, daß heterotrophe Formen in diesem Mikroökosystem existieren können, vom Gehalt an org. Komponenten (z.B. Vorhandensein von Stickstoff und Phosphorverbindungen, Huminstoffe...) im Boden ab. Diese heterotrophen Bakterien sind in der Lage komplexe Moleküle wie Huminstoffe, Kohlenwasserstoffe oder Phenole anzugreifen. Kohlendioxid kommt im Boden und in der Nähe der Wasseroberfläche vor. Dieses Resource des Kohlenstoffs nutzen alle autotrophen Bakterien. Auch heterotrophe Formen greifen auf Kohlendioxid zurück, aber es wäre zum Überleben für sie zu wenig. Obwohl gelöste Stickstoff und Phosphorkonzentrationen meist spärlich in Grundwassersystemen vorhanden sind, können sich autochthone Organismen in dieser oligotrophen Umgebung entwickeln (HIRSCH UND RADES-ROHKOHL,1983; GHIOSE UND WILSON, 1988). Darüber hinaus können sie auch ungelöstes Phosphat mobilisieren, so wie freien Kohlenstoff und Stickstoff fixieren. Morphologische Veränderungen im Bereich der Zelloberfläche usw. ermöglichen den Bakterien weiters unter oligotrophen Bedingungen zu überleben. Körperanhänge vergrößern die Zelloberfläche und ermöglichen so eine größere Aufnahme von Nährstoffen. Solche Anhänge sind auch wichtig für das Anheften an Partikeln. Einige produzieren eine Hülle zum Schutz und auch extrazelluläre Polysaccharide. Diese wiederum enthalten Stoffe, vor allem Kationen, da sie selbst meist negative Ladung besitzen (BALKWILL UND GHIOSE, 1985)

Rolle des Sauerstoffs und anderen Elektronenakzeptoren:

Sauerstoff und auch andere Elektronenakzeptoren sind für die Respirationsaktivitäten der Bakterien von großer Bedeutung. Sie sind für den Abbau von organischen Stoffen, der Remineralisierung, verantwortlich. Die Abbausequenz ist folglich auch immer vom org. Material, das zur Verfügung steht abhängig: O_2 , NO_3^- , MnO_2 , $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{SO}_4^{(2-)}$, HCO_3^- , und N_2 (GHIOSE UND WILSON;1988; PATRICK UND JUGSUIJIND, 1992). Bei Nährstoffmangel und langsamer Wachstumsrate wird das Sauerstoffangebot niedrig sein, außer es ist genug org. Kohlenstoff im Wasser vorhanden. Die meisten Trinkwasserquellen verfügen über reichlichen Sauerstoff. Aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien sind dominierend, auch in tieferen Bereichen des Grundwassers. Mehr als 10% der gefundenen Bakterien in tiefer gelegenen Sedimenten sind mikroaerophil, und wachsen unter dem niedrigen Sauerstoffpartialdruck optimal (BENOIT UND PHELPS, 1990).

Von den isolierten heterotrophen Baktereien sind die meisten imstande Nitrat zu reduzieren. Sie benutzen unter anaeroben Bedingungen Nitrat an Stelle von Sauerstoff als terminalen Wasserstoffakzeptor. Meist stellt sich bei Sauerstoffmangel das Enzymsystem auf die Nitratatmung um. Prinzipiell ist der Nitratanteil in sauberen Gewässern sehr niedrig. Aus diesem Grund wird in unterirdischen Systemen die Denitrifikation durch Mangel an Nitraten und organischen Kohlenstoffen begrenzt.

Weitere Elektronenakzeptoren im Grundwasser sind Eisen, Mangan, Sulfate und Hydrogencarbonate.

Einfluß des pH- Wertes und der gelösten Salze.

Der pH- Wert wird in seichten Gewässern durch Bicarbonate gepuffert. Der größere Anteil der Bakterien bewegt sich im neutralen Bereichen, jedoch können sie auch Abweichungen in den alkalischen oder basischen Bereich tolerieren. Aus diesem Grund ist der pH- Wert nicht unbedingt ein

limitierender Faktor. Änderungen des pH-Wertes können durch mikrobiologische Aktivitäten passieren, wie z.B. Oxidations- und Reduktionsprozesse usw.. Ältere Gewässer in tieferen Bereichen können höhere Konzentrationen an Salzen und toxischen Metallen enthalten (McNABB UND DUNLAP, 1975). Studien über die bakterielle Aktivitäten mit Salzkonzentrationen gibt es v.a. in Australien, die damit große Probleme in der Trinkwasserversorgung haben (BAULD et al., 1990).

Temperatur.

Einer der grundlegenden physikalischen Faktoren, der das Leben der Organismen beeinflusst, ist die Temperatur. Die Stoffwechselaktivität einer Zelle befindet sich in voller Abhängigkeit von den Temperaturbedingungen. Vermehrung und Metabolismus der Bakterien verlaufen in einem relativ engen Temperaturbereich. Die überwiegende Zahl der Mikroorganismen hat Grenzwerte von 8- 40 °C (mesophile Bakterien). Für viele pathogene Bakterien, die in warmblütigen Organismen leben, ist das Intervall noch enger (z.B. 29-41°C). Andererseits gibt es eurytherme Arten, die einen relativ weiten Temperaturbereich besitzen und häufig bei extremen Werten vorkommen. Psychrophile Bakterien (kälteliebende Bakterien) besitzen deutliche enzymatische Aktivitäten bei Temperaturen um 0 °C. Sie sind in kalten Habitaten weit verbreitet und sie wurden in Höhlen gefunden, wo die Temperatur auch unter 5°C abfiel. In diese Gruppe gehören auch die autochthonen Bakterien, die wiederum in obligat und fakultativ psychrophile Organismen unterteilt werden können. Erstere mit Temperaturminimum um -10°C und darunter, vermehren sich gut bei Temperaturen zwischen 5-15 °C und ihr Temperaturmaximum liegt bei 20 °C. Viele von ihnen sterben schon bei Zimmertemperatur ab. Fakultativ psychrophile Bakterien besitzen eine größere Wärmetoleranz. Ihre optimale Wuchstemperatur liegt um 20 °C und das Maximum kann 45°C erreichen. Im Bereich der Höhlensedimente ist wenig über die thermische Adaption von Bakterien bekannt. Man nimmt an, daß je 100 m Tiefe die Temperatur um 2°C abnimmt (CULLIMORE, 1993). Niedrige Temperaturen werden zum limitierenden Faktor für autotrophe Aktivitäten und Stickstofffixierung in kalten Grunwässern (GOUNOT, 1970). Ein Beweis für die Kontamination des Grundwassers mit der Oberfläche könnte durch die Ermittlung der Optimaltemperatur der jeweiligen Bakterien erbracht werden.

Einfluß des hydrostatischen Druckes.

Der hydrostatische Druck, der in Gewässern pro 10 m um 1 atm. (=101,325kPa) ansteigt, hat keinen Einfluß auf die Lebensweise der Bakterien (GHIORSE UND WILSON, 1988).

Dunkelheit.

Für Photosynthese betreibende Organismen (autotrophen Formen) ist das Fehlen von Licht ein limitierender Faktor. Eine große Anzahl von nicht Photosynthese betreibenden Bakterien besitzt Pigmente. Diese Arten sind in oberflächennahen Gewässern gefunden worden (HIRSCH et al.,1992). Pigmentierte Bakterien, die Carotinoide enthalten, sind weitgehend lichttolerant. In einigen Fällen, wie z.B. bei Corynebakterien, wird die Synthese von Carotinoiden durch Licht induziert (MULDER UND ANTHEUNISSE, 1963). Viele Untersuchungen von Corynebakterien in Höhlen ergaben bei fehlenden Lichtes ausbleibende Pigmentierung, genauso wie bei der Höhlenfauna. Bei über 515 Arthrobacterstämmen, die in Höhlen isoliert wurden, waren weniger als 1% pigmentiert. In Oberflächenböden waren es 19%, die pigmentiert waren. Fehlende Pigmentierung war ansonsten bei keinen anderen Bakterienpopulationen ohne Photosynthese beobachtet worden (GOUNOT,1973).

Sedimentbeschaffenheit und Durchlässigkeit.

Die Morphologie und Physiologie der Bakterien in Wassersystemen und in Sedimenten unterscheiden sich (KÖLBEL-BOELKE UND HIRSCH, 1989). Gram-negative Stäbchen dominieren im freien Wasser, und gram-positive Bakterien werden weitgehendst in Sedimentproben gefunden.

Sedimentorganismen sind meist unmobiler als Wasserbakterien (HIRSCH et al., 1992a). Bakterien sind in sandigen Schichten aktiver als in lehmigen Böden, wo eine geringe Durchlässigkeit von Bakterien auch durch mangelnden Sauerstoff, Nährstoffen und der Verfügbarkeit von Wasser resultiert. Gram-positive Bakterien sind öfters aus Tonmineralien isoliert worden, teilweise aus der ungesättigten Zone in Höhlen. Man muß generell sagen, daß in diesen unterirdischen Sedimentproben so viele Mikrohabitate existieren, daß die Einteilung der gefundenen Mikroorganismen zur Zeit noch schwer durchführbar ist (HIRSCH UND RADES-ROHKOHL, 1992).

Geochemische Funktion der Mikroorganismen:

Im Oberflächenbereich der Gewässer und Sedimente ist die Chemosynthese der Bakterien gut entschlüsselt. Sie sind für Prozesse wie der Mineralisation von organischen Stoffen, Nitrifikation, Denitrifikation, Stickstofffixierung, Oxidation und Reduktion von Schwefelverbindungen wichtig. Weitere Beteiligung bei physikalisch-chemischen Vorgängen, oftmals indirekte Beteiligung in vielen Prozessen von Oxidation und Reduktion, Lösungsvorgängen, Adsorption und Desorption sowie Beteiligung an komplexen Verbindungen sind von Wichtigkeit. Diese ganzen Funktionen können auch auf das Grundwasser übertragen werden, und sie sind sowohl für reine als auch verunreinigte Grundwässer gut erforscht worden. In ursprünglichen Wasser sind die Vorgänge unter oligotrophen Bedingungen verlangsamt. In Höhlen sind Bakterien für Absonderungen mitbeteiligt, bei der sog. Montmilchentstehung, in Salpeterformationen, und bei der Schwefelablagerung in Gesteinsformationen. Biologische Prozesse spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Höhlen, nicht nur im Karst, sondern auch bei anderen Formationen.

Im Laufe der Zeit haben sich Bakterien an Standorte angepaßt, an denen sonst kein organischer Organismus fähig wäre zu überleben. In Bereichen tief unter der Oberfläche haben sich diese an ein Milieu angesiedelt, das wenig Nährstoffe bietet und mikroaerophile Konditionen aufweist. Viele der Bakterien sind epilithisch. In unberührten Wassersystemen werden bakterielle Aktivitäten vom Nährstoffangebot und der Energiebereitstellung limitiert. Grundwasserbakterien sind imstande viele natürliche und fremde Stoffe wie Pestizide, Dünger, und industrielle Chemikalien abzubauen, sofern sie in Wasserbereiche gelangen. Weitere Grundlagenforschungen sind für eine bessere Charakterisierung der mikrobiologischen Populationen und deren Aktivitäten in unterirdischen Zonen von größter Bedeutung. Sehr wenig ist über die Bewegung von Bakterien in Sedimenten bekannt, oder über die Schichtung der aktiven Zonen. Es wäre auch wichtig vergleichende Studien über hydrologische und geochemische Faktoren, bezüglich der Anzahl der Bakterien, ihre Verteilung und Aktivität zu machen. Solche Erkenntnisse sind elementar für Versuche zur Selbstreinigung (Bioremediation) „in situ“ (Groundwater Ecology, USA).

Mikrobiologische Vorgänge in Karst(wasser)körpern

(von B. MENNE, Mühlacker)

1. Transportmedien

- ⇒ Wasser
- ⇒ Wind
- ⇒ Eis/ Schnee
- ⇒ Lebewesen

2. Die transportierten Mikroorganismen

- ⇒ Bakterien (gramnegativ)

- ⇒ Bakterien (grampositiv)
- ⇒ Viren
- ⇒ Hefen
- ⇒ Pilze
- ⇒ (Protozoen)

3. Ursprung/Herkunft der transportierten Organismen

- ⇒ Regenwasser
- ⇒ Epiphytischer Aufwuchs
- ⇒ Dung/Kot
- ⇒ Boden
- ⇒ Felsoberflächen
- ⇒ Müll/Detritus
- ⇒ Abwasser
- ⇒ Karstkörper

4. Parameter der zutretenden Biozönose

- ⇒ Klimazone des Versinkungsgebietes
- ⇒ Vegetationszone des Versinkungsgebietes
- ⇒ Nutzung (Art und Ausmaß) des -“-
- ⇒ Jahreszeit
- ⇒ Wetterlage(aktuell und vergangen)

5. Eintrittsarten in den Untergrund

- ⇒ punktförmig/direkt(Ponor, Schwinde offen)
- ⇒ punktförmig/indirekt(def. Versickerungsbereich)
- ⇒ flächig/direkt:nackter Karst
- ⇒ flächig/indirekt:bedeckter Karst

6. Entladungsprozesse im Untergrund

- ⇒ mechanische Zerstörung
- ⇒ Zelltod/Kolonientod
- ⇒ Filterung in Bodenkrume
- ⇒ Filterung in internen Sedimentlagern
- ⇒ Adsorption an Fels/Kluftoberflächen
- ⇒ Sedimentation in Stillwasserzonen
- ⇒ Fraß

7. Bio(chemische) Reaktion

- ⇒ Genaktivierung/Sekundärstoffwechsel
z.B. Antibiotika
- ⇒ Genaktivierung Energiestoffwechsel
- ⇒ Initialisierung von Dauerstadien (Sporen)
- ⇒ Übergang zu Starvation survival
(Sterben die Zellen beim Eintritt in den Untergrund?)
- ⇒ Reaktionsgeschwindigkeit
- ⇒ Selektion

8. Exportierung von MIO's

- ⇒ unveränderte Restladung im freien Wasser
- ⇒ Remobilisierte MIO's aus Sedimenten
- ⇒ Descendenten der subterranean MIO-Biozönose
- ⇒ Desorbierte Zellen

9. Vitalität der exportierten MIO

- ⇒ normal vital, vermehrungsfähig
- ⇒ subletal geschädigt

- ⇒ Dauerstadien/Starvation
- ⇒ „Vereinsamung“ von Zellen

Dieses Kapitel (Artikel) wird zur Zeit von B.MENNE bearbeitet.

5. Myxobakterien

Diese Organismengruppe ist für die autochthone Lebewelt in Karstgebieten von wichtiger Bedeutung und für Wissenschaftler von großem Interesse. Viele grundlegende Arbeiten zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung von Myxobakterien in Höhlensedimenten sind von Benjamin Menne durchgeführt worden. Folgendes Kapitel beruft sich hauptsächlich auf Arbeiten bzw. Veröffentlichungen des Mikrobiologen und Speleologen B.Menne.

Grundlegendes zur Biologie der Ordnung Myxobacteriales

Diese gram-negativen einzelligen, gleitend beweglichen und aerob lebenden Bakterien wurden bislang als reine Bodenbewohner und Zellulosezerersetzer eingeordnet. Jedoch aufgrund ihres Metabolismus, der an niedrige Nährstoffkonzentrationen angepaßt ist, könnten sie auch als „Wasserbewohner“ angesehen werden (DAUBNER, 1984). Sie leben heterotroph, indem ihre vegetativen Zellen Enzymsysteme zur Hydrolyse von Proteinen, Bakterien und bei Vertretern der Polyangiaceen zum Zellulose-Abbau verfügen. Phylogenetisch stehen die Myxobakterien den Myxomyceten nahe. Ein besonderes Kennzeichen der Myxobakterien ist ihre kooperative Morphogenese, während derer sich die Einzelzellen zu Fruchtkörpern ausformen. Im Bakterienschwarm bilden sich Aggregationszentren aus, auf die Einzelzellen zugleiten. Dort wird dann mittels Schleimabsonderung der Fruchtkörper gebildet, der arttypisch ist und auch ästhetisch sein kann. Die maximale Größe solcher Fruchtkörper liegt bei 1mm Durchmesser. Dadurch wird seine Identifikation mit dem Stereomikroskop nach 10 bzw. 20 Tagen Bebrütungszeit bei 30 °C möglich. Das Wachstumsoptimum der Myxobakterien liegt bei 25°C bis 30°C und das Temperaturminimum bei 15°C. Der pH-Wert ist bei 7 optimal; es können auch extremere Werte im basischen/sauren Bereich toleriert werden. Innerhalb der Fruchtkörper, aber auch durch bestimmte Reize außerhalb derselben, können Myxosporen ausgebildet werden. Sie sind durch ihre starke Wandverdickung sehr stabil gegen ungünstige Umweltbedingungen (MENNE, 1988).

Modellvorstellung zur Mikrobiologie von Höhlensedimenten

6. (Menne et al., 1988)

Energieinput:

Durch den Lichtmangel in Höhlen ist das Leben autochthoner Organismen vom Eintrag an organischen und anorganischen Stoffen bestimmt (WARTH, 1980). Wieviel den Mikroben an Nährstoffen (Energieinput) zur Verfügung steht, hängt in erster Linie vom Zufluß an frischem Wasser ab. Die in einem Mikrohabitat tatsächlich angelieferte Quantität und Qualität der Stoffe hängt von der Periodizität, der Intensität und der bereits zurückgelegten Versinkungsstrecke des Trägerwassers ab. Der Stoffaustausch wird durch die Korngröße des Sediments bezüglich der Verweilzeiten und der Durchströmungsmöglichkeiten des zutretenden Wassers beeinflusst. Durch die Lagerungsdichte nehmen sie auch Einfluß auf die Sauerstoffversorgung des Sediments. Ein wichtiger Aspekt für einen Eintrag und eine Verteilung von Material in Höhlen könnte durch den Höhlenwind angeführt werden. In Addition zu dieser Transportform sind durch den Wind entstehende Feuchtegradienten aufgrund von Wasserdampfdruckveränderungen zu beachten (BÖGLI; 1978; MENNE, 1988). Ergebnisse über die Bedeutung des chemolithotroph- autotrophen Lebens als zusätzliche Energiequelle, z.B. Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III), Sulfatreduktion oder ähnlichen Prozessen, konnten noch nicht präsentiert werden (SEEMANN, 1982). Letztendlich ist der Eintrag von organischem Material im Laufe der Sukzession durch aktiv die Höhle aufsuchende Lebewesen (Chiropteren od. Acvicoliden) ein wichtiger Faktor.

Reaktionsgeschwindigkeit:

Bedeutende und die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmende Faktoren sind die Temperaturverhältnisse. Höhlen stellen mit ihren relativ konstanten Klimabedingungen Kryostaten größten Ausmaßes dar. Die Reaktionsgeschwindigkeits- Temperaturregel kann in eingeschränkter Weise Anwendung finden. Im vom Autor ausgesuchten Untersuchungsgebiet (Hagengebirge), liegen die Temperaturen der Eingangsregionen zwischen 0°C und 2°C. Innerhalb der Höhlen finden sich in den tagnahen Zonen Temperaturen um 1,5°C, in den tagfernen Bereichen um 2,5°C (MENNE,1988).

Sukzession:

Quantitativ gesehen stehen Bakterien in Höhlen neben Pilzen an der Spitze der Organismen. Jedoch sind nur sehr spärliche Erkenntnisse über das Vorkommen der Bakterien in Höhlen gemacht worden. In Verbindung mit der Nutzung von Karstwasserkörpern zur Trinkwasserversorgung erscheint jedoch eine bessere Kenntnis der endogenen mikrobiologischen Verhältnisse im Karstkörper erforderlich (PAVUZA und TRÄNDL,1985). Wertvolle Daten ergeben sicherlich Keimzahluntersuchungen an Quellaustritten, jedoch werden die im Gebirgskörper stattfindenden Prozesse nicht vollständig beschrieben. Für die Beurteilung des Besiedelungsprozesses muß die zeitliche Ordnung, die sich aus der Geologie des Gesteines ergibt, Berücksichtigung finden. Nach Ablagerung des Sediments und dessen diagenetischer Verfestigung kann der Gebirgskörper als annähernd organismenfrei (steril) bezeichnet werden. Durch die Hebung, Verfrachtung und tektonische Beanspruchung des Gesteins kommt es zur Klüftung und damit zur Wasserwegigkeit. Mit dem eindringenden Oberflächenwasser erfolgt die primäre Besiedelung des Gesteinskörpers. In dieser Phase der Landschaftsentwicklung, die gleichzeitig die Initialphase der Speleogenese darstellt, erfolgt die Besiedelung ausschließlich durch eindringendes Oberflächenwasser und die damit verbundene passive Verfrachtung von Organismen des Bodens und des Regenwassers, sowie durch aktives Einwandern von Bodenorganismen in das wachsende Spaltensystem des Gesteins. Erst in einer späteren Phase der Landschaftsentwicklung nach Öffnung der Höhle durch mehr oder weniger großer Eingänge zur Außenwelt hin, kann die Einwanderung anderer, höhlentypischer Organismen erfolgen. Liegt eine mehrphasige Landschaftsentwicklung vor wie etwa im Hagengebirge (LANGENSCHIEDT, 1986), dann folgen mit der Tieferlegung des Karstwasserspiegels mehrere Sukzessionsphasen aufeinander, die jedoch nicht völlig gleichartig ablaufen werden. Die Vorfahren aller in der Höhle lebenden Organismen sind also ursprünglich von der Oberfläche eingewandert, zumindest in ihren jeweiligen Verbreitungs- bzw. Überdauerungsstadien. Diese Feststellung ist vor allem für die Beobachtung von Adaptions- und Selektionphänomenen von Bedeutung. Bakterien eignen sich gut zum Studium solcher Vorgänge (MENNE,1988).

In der Publikation von 1988 beschreibt der Autor die Untersuchung des Hagengebirges im Bereich des Eisgrabens, sowie der Wildpalfen- und Blühnbachkopfhochfläche auf die Besiedelung von Myxobakterien. In diesen hochalpinen Höhlensystemen konnten während ihrer Neulandforschung völlig unberührte, natürliche Böden aus den Sedimentationszonen entnommen werden.

Oberflächeneinflüsse konnten aufgrund der Lage des Untersuchungsgebietes ausgeschlossen werden. Hauptsächlich lag nackter Karst, abwechselnd mit alpinem Rasen vor.

Die Untersuchungen der Sedimente auf Myxobakterien und ihre Identifikation ist sehr zeitaufwendig und benötigt spezielle Methoden. Es wurden analytische Verfahren von KRZEMIENIEWSKA,H., & KRZEMIENIEWSKI,S.,(1926), SINGH,B.,(1947) für die Köderung angewandt, und nach der Systematik von McCURDY, H.D.,(1974) bestimmt.

Artenidentifikation in der Höhle (Hagengebirge)

Zum Erstenmal konnten mit der Untersuchung des Wildpalfensystems das Vorkommen von Myxobakterien in Höhlen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse fanden ihre Bestätigung durch mehr als 29 beprobte Lokalitäten aus anderen Karstgebieten.

Folgende Arten konnten festgestellt werden:

- Myxococcus fulvus
- Myxococcus coralloides
- Myxococcus virescens

- *Nannocystis exsedens*

Nach statistischer Auswertung der gesammelten Daten kann erkannt werden, daß mit zunehmender Tiefe weniger Proben einen positiven Befund aufweisen. Waren im tagnahen (d.h. einer Überdeckung von nicht mehr als 100 Meter Gestein) Probenteil noch 84,6% alle Proben positiv, so waren es im tagfernen Bereich nur noch 60%. Diese Ergebnisse entsprechen sehr gut der Modellvorstellung über Myxobakterien. Dies ist einerseits durch die Ernährungsweise der Myxobakterien als Saprophyten bedingt, da ihnen mit zunehmender Versinkungstiefe des Wassers ständig abnehmende Stoffmengen zur Verfügung stehen (= aktive Komponente). Andererseits erfolgt auch eine ständige Entladung des Trägerwassers an Bakterien und vegetative Zellen durch Adsorptionsprozesse im Gesteinskörper und in den Spaltenfüllungen (=passive Komponente). Je langsamer das Wasser den Gesteinskörper durchfließt und je größer der Quotient aus Kontaktfläche und Wassermenge ist, desto steiler ist der Entladungsgradient. Ein sekundäres Weiterverfrachten von Zellen darf nicht vergessen werden. Ein weiterer interessanter Befund lag in der Verteilung der einzelnen Arten auf die beiden Tiefenlagezonen. Im tagnahen Bereich war die Art *M. coralloides* knapp dominant, während im tagfernen Bereich eindeutig *M. fulvus* dominierte. Ein Vergleich mit der Besiedelung der Oberflächenböden konnte sich aus diversen Gründen nur auf drei Proben stützen. Alle drei Proben waren jedoch völlig einheitlich: *M. coralloides* dominierte über *M. fulvus*. Daraus ergäbe sich ein ständiges Abnehmen der Dominanz von *M. coralloides* mit zunehmender Tiefenlage. Das Fehlen von *M. virescens* im tagnahen Bereich konnte auf eine zu geringe Probenanzahl zurückgeführt werden. Auch der Einfluß von Chiropteren könnte maßgebend für das Fehlen von *M. virescens* sein, deren Mumien in der Nähe von Fundstellen von *M. virescens* zu finden sind. Eine interessante Tatsache war auch, daß in sehr reichen Rohkulturen meist größere Reste organischer Substanzen zu sehen waren (Fellreste von Chiropteren, Pflanzenzellen, Insektenpanzer etc.). Weiters wurde die Korrelation zwischen Sedimentfeuchte und Myxobakterienbefall diskutiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß in Proben trockener Standorte weniger Myxobakterien zu finden waren als in Proben feuchter Standorte. Negative Proben waren entweder häufig staubtrocken, oder es handelte sich um dicht gepackte Lehme oder Tone (MENNE et al., 1988).

Psychotrophie

Aufgrund der Befunde konnte MENNE auf aktive Lebensprozesse schließen. Es wurde nachgewiesen, daß mit zunehmender Tiefe weniger Proben befallen sind. Dieses Erkenntnis kann mit der ständigen Entladung des Trägerwassers erklärt werden und ist an sich ein passiver Prozeß. Anders jedoch verlief die nachweisbare Veränderung der Artendominanzen in den untersuchten Tiefenlagenzonen. Rein passive Prozesse würden zwar abnehmende Befallsraten, jedoch gleiche Dominanz erwarten lassen. Interessant waren die Befunde der Bebrütung bei 7°C. Bereits nach zwei bis drei Wochen konnte auf speziellen Platten ein Schwärmen der Bakterien festgestellt werden. Es erfolgte bei dieser Temperatur eine zelluläre Morphogenese von der Spore zur vegetativen Zelle. In weiterer Folge zeigte sich auch ein funktioneller Stoffwechsel, durch Lysis in der Bierhefesususpension. Nach sechs Wochen, dreimal so lang als bei 30 °C, zeigten sich Aggregationszentren und Fruchtkörper, die sogar normale Pigmentierung aufwiesen. Auch wurde während der Phase der Aggregation erheblich mehr Schleim gebildet, als bei 30°C. Der Myxobaktérienschwarm teilt sich in Domänen aus dichten Schleimpolstern, an denen randlich die Fruchtkörper gebildet werden. Die unter psychotropen Bedingungen gebildeten Myxosporen weisen lichtmikroskopisch eine verringerte Dichte aus. Solche Befunde wurden regelmäßig mit *M. fulvus* gemacht; direkt im Höhlensystem ausgelegte Versuche hatten nicht den Erfolg, da das Problem der Verpilzung und Austrocknung der Platten noch nicht gelöst war, und möglicherweise auch das Fehlen einer Lichtinduktion für die Fruchtkörperbildung eine Rolle spielte (MENNE). Die Ergebnisse dieser Untersuchung geben einen interessanten Einblick in die Mikrohabitate von Höhlen und legen erstmals Kenntnisse auf Lebensäußerungen und Stoffwechselaktivitäten der dort lebenden Bakterienwelt vor. Trotz einer sehr vorsichtigen Bewertung der Wissenschaftler gelang es gut die Habitate innerhalb der Höhle voneinander abzugrenzen. Der Einfluß der Tiefenlage auf die Organismenhäufigkeit und das Artenspektrum kann recht gut erkannt werden. Innerhalb des Systems werden möglicherweise psychotrophe Stämme selektiert. Der Autor

läßt diese Erkenntnisse auch für Wassernutzung von Karststöcken einsetzen; verweist auf die bakterielle Verunreinigung der Wasserversorgung von Hallstatt (TRIMMEL, 1982).

Keimzahluntersuchungen an den Quellaustritten sind wichtig, jedoch sollte auch der Vorgang in der „black box“ weiterführend als wichtig betrachtet werden. Durch Adsorption von Bakterien im Gesteinskörper, der anschließenden Selektion und den daraus folgenden Wachstumsprozesse werden unter Umständen sowohl qualitative als auch quantitative Änderungen der „Keimlast“ des Karstwassers zu erwarten sein. Vorgänge dieser Art sollten eingehend untersucht werden, um die Nutzbarkeit von Wässern aus Karstgebieten besser beurteilen zu können.

Untersuchungen der Schwäbischen Alb nach Myxobakterien

In einer weiteren Publikation aus dem Jahre 1992 beschreibt B. Menne die Besiedelung von klastischen Höhlensedimenten der Schwäbischen Alb durch Mikroorganismen der Ordnung Myxobacterales. Auch in dieser Arbeit werden am Beispiel der Myxobacterales einige Faktoren aufgezeigt, welche die Verteilung von heterotrophen, aeroben Mikroorganismen in klastischen Höhlensedimenten beeinflussen. Im besonderen wird der Einfluß der Höhlengewässer herausgestellt.

Ergebnisse der Untersuchung:

Artenspektrum:

Rund 40 bekannte Arten von Myxobakterien gibt es. Davon konnten aus den Proben insgesamt 5 isoliert werden:

- *Myxococcus fulvus*
- *Myxococcus virescens*
- *Myxococcus stipitatus*
- *Archangium gephyra*
- *Corallococcus coralloides*

Zu *Corallococcus coralloides* ist anzumerken, daß diese Art nach neueren Untersuchungen als eigene Gattung aufzufassen ist. Im Bericht von 1988 wurde sie noch der Gattung *Myxococcus* zugeordnet. Das Artenspektrum stellt eine Auswahl der oberirdisch vorkommenden Arten dar. Im Einzugsgebiet der Falkensteiner Höhle konnte oberirdisch zum Beispiel zusätzlich und recht häufig *Cystobacter fuscus* nachgewiesen werden.

Die Arten wurden in unterschiedlicher Häufigkeit in der Probengesamtheit angetroffen. Von 37 Proben wiesen 36 Befall durch Myxobakterien auf. Wie auch in anderen Höhlengebieten festgestellt werden konnte, ist *Myxococcus fulvus* die häufigste Art des Höhlenraumes. Sie kommt in fast allen Höhlensedimenten vor und bildet auch die Hauptmasse der Myxobakterien in den untersuchten Höhlen.

Einfluß des Biotopwassers:

Die Proben wurden in zwei Hauptgruppen „aquatische Biotope“ und „terrestrische Biotope“ eingeordnet. Als „aquatisches Biotop“ versteht man in diesem Rahmen, daß ein ständiger Wasserzutritt zum Sediment vorhanden ist (Sinterbecken, Tümpel, Bachlauf..). Alle anderen Biotope mit geringem oder fehlendem Wasserzutritt werden in der Gruppe „terrestrische Biotope“ zusammengefaßt. In der Höhle muß diese Einteilung exakt und in kleinstandörtlicher Betrachtungsweise erfolgen. In beiden Biotopen wurden je 5 Arten gefunden wobei die durchschnittliche Artenzahl im aquatischen Bereich wesentlich höher als in der terrestrischen Einheit ist. Dies ist auch ein Hinweis, daß Myxobakterien wäßrige Höhlenbiotope bevorzugen. Mit einer Ausnahme konnte die Art *M. fulvus* in allen Proben gefunden werden. Sie ist die typische Art des Höhlenraumes und kommt auch noch an extremsten Standorten vor (MENNE und RÜCKERT, 1988). Die Art *M. virescens* stellte in der hier beschriebenen Probengesamtheit die Charakterart der Höhlenbäche dar. Dies traf zu, sowohl was die Häufigkeit als auch die Befallstärke betraf. Im terrestrischen Bereich ist *M. virescens* nur in wenigen Höhlenböden anzutreffen gewesen. *M. stipitatus* konnte in diesem Zusammenhang nur als ein nicht näher bewertbarer Einzelfund betrachtet werden. Angemerkt werden konnte, daß die Art in wärmeren Höhlengebieten häufiger ist, während sie in kälteren bisher nie anzutreffen war. *A. gephyra* zeigte gleich wie auch *C. coralloides* ein intensiveres

Vorkommen im aquatischen Bereich. *C. coralloides* war in allen Fällen die zweithäufigste Art. Auch sie kommt häufiger in kälteren Höhlenbiotopen vor. *A. geophyra* reagierte auf den Biotopfaktor Wasser sensibler als *C. coralloides*, jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie *M. virescens*. Insgesamt zeigten die verschiedenen Arten ein differenziertes Reaktionsbild. Das aquatische Milieu fördert somit das Vorkommen von Myxobakterien. Die in den Höhlenraum eintretenden Gewässer stellen den bedeutensten Importmechanismus dar. Dies trifft sowohl auf die Zufuhr von Nährstoffen als auch den Transport der Organismen selbst zu. Weiters hat der Sedimenttyp Einfluß auf das Leben der Bakterien. Es ergab sich, daß Sedimente mit größeren Anteilen eine deutlich größere Besiedelung durch Myxobakterien besitzen (MENNE, 1992).

Kleinstandörtliche Unterschiede:

Sehr interessant erschien für diese Arbeit auch die exakte kleinstandörtliche Betrachtung der Befunde. Dafür wurde ein 2m langer Abschnitt der Falkensteiner Höhle ausgewählt (auf genaue örtliche Bezeichnungen wird hier verzichtet). Proben wurden in 2,5 m Höhe über dem Wasserspiegel entnommen, und zwar je eine auf der orografisch linken und rechten Wandseite. Gleichartig wurden zwei Proben in 20-30 cm Höhe über der Wasserlinie gezogen. Je eine Einzelprobe wurde dann entlang der Wasserlinie und auf dem Bachgrund entnommen. Um den Einfluß des Sedimenttyps zu verkleinern, wurde ein Abschnitt mit langsam fließendem Wasser ausgewählt. Während unter der Höhlendecke nur ein schwacher Befall mit Myxobakterien feststellbar ist, nimmt die Besiedelung in Richtung Höhlenbach zu. Im Bereich der Wasserlinie und des Bachgrundes sind hier alle Köder mit Myxobakterien befallen, einige sogar mit mehreren Arten am selben Ort. Das optimale Biotop scheint der Bereich der Wasserlinie (Spülsaum) zu sein. Der Aufenthalt im Bereich der Phasengrenzen ermöglicht den unter den gegebenen Temperaturbedingungen raschesten Stoffumsatz. Für mikrobiologische Untersuchungen und Folgeuntersuchungen, wie zum Beispiel die Verteilung von Bakterienfressern (Collembolen...) in Höhlensystemen, gilt es, solche kleinräumige und makroskopisch schwer wahrnehmbare Biotopgrenzen zu berücksichtigen.

Aus dieser Arbeit kann man sehr gut den Einfluß der Höhlengewässer und eines bestimmten Sedimenttyps auf die Lebensgemeinschaft von Bodenbakterien aus der Schwäbischen Alb erkennen. Vergleichende Betrachtungen dieser Arbeit führen zu gut übereinstimmenden Ergebnissen mit anderen Karstgebieten (MENNE, 1992).

7. Ausweitungen der Mikrobiologie im Nationalparklabor

Qualitätskontrolle – Qualitätssicherung bei bakteriologischen Untersuchungen

Auch in einem relativ kleinen Labor ist es fast unmöglich mit absoluter Sicherheit Analysenfehler zu vermeiden. Das gilt nicht nur für die Fehlerbereiche in der chemischen Analyse, sondern fängt auch bei der selbstkritischen Beurteilung der eigenen Arbeit an. Die Qualität von Analysenwerten ist von großer Bedeutung für alle Folgerungen, die aus ihnen gezogen werden. Ungenaue oder falsche Analysedaten würden unweigerlich zu entscheidenden Fehleinschätzungen in der Praxis führen. Qualitätssicherung bedeutet, daß wir uns mit der Messung und Kontrolle etwaiger Fehler beschäftigen müssen.

Nur Analyseergebnisse, die eine überprüfbare Richtigkeit und Präzision (Genauigkeit) aufweisen, sind vergleichbar (RUMP et al., 1992).

Untersuchungsmethoden:

1. "Presence/ absence"

Auftrag: Überprüfung der verwendeten Nährmedien.

2. „MPN“ (Most Probable Number)

Auftrag: Überprüfung des verwendeten Nährmediums sowie Kontrolle der Methode.

3. „Plattengußverfahren“

Auftrag: Kontrolle der Testkeime sowie der verwendeten Methode.

4. „Spatel- Verfahren“

Auftrag: Kontrolle der Testkeime sowie der verwendeten Methode.

5. „Membranfiltration“

Auftrag: Überprüfung der Methode.

Verwendete Testkeime:

☐ ENTEROCOCCUS FAECIUM (500 cfp)

☐ ENTEROBACTER CLOACAE (500 cfp)

Keimmaterialbezug:

☐ SVM

Sales Departmend

P.O.Box 457

720 AL BILTHOVEN

Phone: (31) 30 75 80 10

Fax: (31) 30 25 06 10

Ausführung der Qualitätskontrolle:

☐ (Testkeim: Enterococcus faecium (500 cfp)

1. Keimvorbereitung

a) Wasserbad erhitzen auf 38°C (+/- 0,2°C)

b) Gepuffertes Peptonwasser (pH 7,00; steril) vortemperieren (38,5°C).

(Temperatur eine Referenzprobe messen mit Pepton pH 7,00; 50ml)

c) Testkeim mit steriler Pipette direkt aus dem Gefrierfach in 50 ml steriles Peptonwasser geben.

d) Keimsuspension nach 10/20/30/ und 40 Minuten aufschütteln, Schaumbildung ist dabei unbedingt zu vermeiden!

(Keimsuspension bleibt im Wasserbad bei 38,5°C)

e) Keimsuspension in schmelzendes Eis geben.

(Verbrauch binnen eines Arbeitstages !!!)

2. Gußplattenmethode (KBE 22°C)

a) 0,1 ml sowie 1,0 ml der Keimsuspension werden in je eine sterile Petrischale pipettiert(Dreifachansatz)

b) Der Keimsuspension werden 10 ml Nährgelatine (Merck 10691) zugegossen.

c) Durch leichtes Schwenken Materialien vermischen.

d) 48 Stunden bei 22°C bebrüten (Temperatur im Brutschrank muß kontrolliert werden).

e) Auszählung der Kolonien mittels Lupe.

Ergebnis: bei KBE 22°C:

Gesucht: 1 Kolonie in 0,1 ml bzw.

10 Kolonien in 1,0ml

Leerwerte zur Sterilitätskontrolle der Nährgelatine und des Nähragars müssen angesetzt werden.

☐ 10 ml der Nährgelatine bzw. des Nähragars werden in sterile Petrischalen gefüllt und bei 22°C 48 Stunden bebrütet. In den Leerwerten darf kein

Keimwachstum nachgewiesen werden!!!

3.Membranfiltration (KBE 37°C)

a) Sterilen Filter (Porenenngröße 0,45 µm auf steriles Filtriergerät aufsetzen).

b) Das zu untersuchende Probenvolumen wird mit Unterdruck filtriert, der Filter anschließend mit Hilfe einer sterilen Pipette auf das Nährmedium übertragen.

c) Die Platten werden bei 37°C 48 Stunden bebrütet (Slanetz und Bartley-Platten).

Ergebnis:

Gesucht: 50 Kolonien in 5 ml

100 Kolonien in 10 ml

4. Presence- absence

a) Je 0,1 ml der Keimsuspension auf Slanetz und Bartley-Platten aufpipettieren, mit einer sterilen Spachtel Material gleichmäßig verteilen.

b) 48 Stunden bei 37°C inkubieren

Ergebnis:

Gesucht: 1 Kolonie in 0,1ml
 10 Kolonien in 1 ml

TESTKEIM: ENTEROBACTER CLOACAE (500 cfp)

1. **Keimvorbereitung:** siehe Keimvorbereitung Enterococcus faecium

2. **Presence/ absence:**

a) Je 0,1 ml der Keimsuspension auf Endo- Platten pipettieren, mit einem sterilen Spatel Material verteilen.

b) Platten bei 37°C 48 Stunden inkubieren.

Ergebnis:

Gesucht: 1 Kolonie in 0,1 ml

3. **MPN (Most Probable Number)**

Einfachansatz: in je 3 Röhrchen folgende Volumina pipettieren:

10,0 ml/ 1,0 ml/ 0,1 ml/ 0,01 ml

10,0 ml: alle 3 Röhrchen positiv

1,0 ml: alle 3 Röhrchen positiv

0,1 ml: alle 3 Röhrchen positiv

0,01 ml: alle 3 Röhrchen negativ

$$\text{MPN} / 100 \text{ ml} = \frac{(\text{Anzahl aller positiven Röhrchen}) \times 100}{\sqrt{(\text{ml aller neg. Proben}) \times (\text{ml aller Proben})}}$$

Gesucht: 10³ Keime in 100 ml

4. **Membranfiltration:**

a) Sterilen Filter 0,45µm Porengröße auf steriles Filtriergerät aufsetzen.

b) 100 ml der Keimsuspensionen durchfiltrieren, mit Aqua dest. nachspülen

c) Filter mit steriler Pipette auf Endo Agar übertragen.

d) 48 Stunden bei 37°C inkubieren.

Ergebnis:

Gesucht: 100 Kolonien in 10 ml

DIE GRUNDREGELN DES STERILEN ARBEITENS SIND UNBEDINGT EINZUHALTEN!!!

Erweiterte Differenzierung des Keimspektrums durch VITEK-Analysen bei den Quellen

Vom 2.5.- 4.5. 1996 wurde im Rahmen des Karst-Monitorings die geplante Meßkampagne an den Quellen durchgeführt. Für die Mikrobiologie wurde zusätzlich zu den schon bekannten Parametern (siehe Endbericht Teil 1), eine erweiterte Analyse des Keimspektrums durchgeführt. Es wurden, die unter dem Begriff der „Indikatorkeime“ genannten Bakterien durch eine biochemische Analyse mittels Computer bis zur Art genau identifiziert aber auch nicht-Indikatorkeime erfaßt. Die Ergebnisse werden im Endbericht 1996 erscheinen.

Verwendung des EMX- Agar statt Endo- Agar (Vor- und Nachteile)

Bis vor kurzem wurde für die Erfassung gram-negativer Bakterien der Endo-Agar verwendet. Er galt zwar als sehr verlässlicher Agar für das Wachstum dieser Keime, jedoch gab es auch ein paar Gründe, die für einen idealeren Agar sprachen (siehe auch Endbericht Teil1 1995).

Vergleich EMX-Agar mit Endo-Agar

EMX-Agar:

- ☐ simultaner Nachweis von: Coliformen Keimen (Blaufärbung) und Escherichia coli (Blaufärbung und Fluoreszenz)
- ☐ Bebrütung: 24 Stunden bei 37°C
- ☐ Bestätigungstests: Lactose und Indol (Röhrchentest: 24 Stunden bei 37°C) CO-Test (Cytochromoxidase) direkt auf Platte durchführbar.

ENDO-AGAR:

- ☐ simultaner Nachweis von Coliformen Keimen (rosa/rötliche Kolonien) und Escherichia coli (Fuchsinglanz)
- ☐ Bebrütung: 24 Stunden bei 44°C
- ☐ Bestätigungstests: Lactose und Indol (Röhrchentest: 24 Stunden bei 37°C) CO- Test (Cytochromoxidase) schwer durchführbar (ev. Kolonie auf Testplättchen übertragen → Schwierigkeit liegt bei der Ablesung des Tests durch die Eigenfärbung der am Endo- Agar gewachsenen Kolonien).

Nähere Betrachtung des EMX- Agars:

Vorteile:

- ☐ Bebrütung bei 37°C (damit Erfassung aller Coliformen Keime).
- ☐ die gefragten Kolonien heben sich von der Begleitflora weitgehend ab
- ☐ Coliforme Keime: Blaufärbung
- ☐ E coli: Blaufärbung und Fluoreszenz unter UV- Licht
- ☐ Proteus, Morganella und Providencia: weisen eine dunkelblaue Verfärbung auf
- ☐ Aeromonas hydrophila: Blaufärbung (falsch positive Ergebnisse sind aber einfach mit CO-Test auszuschließen)
- ☐ Vibrio metschnikovii: Blaufärbung, CO- Test negativ. Ausschluß falsch positiver Ergebnisse: Lactosetest (verzögerte Reaktion von Lactosevergärung in 3 oder mehreren Tagen)
- ☐ Serratia marcescens: Blaufärbung, CO- Test negativ, Ausschluß falsch positiver Ergebnisse: Lactosetest negativ
- ☐ Ablesbarkeit der Ergebnisse nach 24 Stunden (ausgeprägtere, deutlichere Kolonien gibt es aber nach 48 Stunden Bebrütung)
- ☐ Fluoreszenzmethode ist eine der sensitivsten Methoden (empfindlicher ist nur die radioaktive Markierung)
- ☐ Methode ist lt. Manafe anerkannt lt. DIN,ISO,IDF

Nachteile:

- ☐ UV-Licht wird zum Ablesen benötigt (Haut und Augenschädigungen möglich)
- ☐ abgedunkelter Raum wäre nötig
- ☐ pH-Abhängigkeit der Ergebnisse (Normalerweise entsteht ein saures Milieu bei Bakterienwachstum, Methode spricht im alkalischen Bereich an).
- ☐ Diffusion der fluorogenen Stoffe in die Umgebung (MUG = wasserlöslich), bei dichterem Keimwachstum ist die Fluoreszenz schwer einer einzigen Kolonie zuzuordnen.
- ☐ Indoltest wird direkt auf der Platte durchgeführt. Indol diffundiert in die Umgebung; bei hoher Keimzahl ist der Indoltest schwer einer einzigen Kolonie zuzuordnen.
- ☐ Lactosetest muß durchgeführt werden (Überimpfungsschritt ist aber notwendig) um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können (Serratia marcescens, Vibrio metschnikovii...)
- ☐ CO- Test ist flüssig durchzuführen (Übersichten der Platte mit Nadi- Reagenz; Teststreifenprinzip funktioniert hier schlecht und ist auch umständlich); Nadi- Reagenz ist giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berühren der Haut.
- ☐ Fluoreszenz kann durch falsche Materialien verhindert werden (Absorbtion)
- ☐ leicht grünliche Fluoreszenz tritt bei starker Begleitflora mit Pseudomonas aeruginosa auf.
- ☐ Lagerung im Kühlschrank (Haltbarkeit bei 2-8°C: 2 Monate (Lieferzeit: 2 Tage, Versand frei Haus)
- ☐ relativ teuer

Anmerkung:

Eventuell sind sowohl CO-Test als auch Indol- Test direkt auf der Platte bei einer Kolonie durchführbar.

Nachteil Endo Agar:

☐ Medium muß bei höherer Temperatur (44°C) bebrütet werden, um die Begleitflora zu unterdrücken (durch die höhere Temperatur werden aber auch einige Coliforme Keime nicht erfaßt).

☐ Fuchsinglanz bei E. coli kann durch höhere Keimzahlen unterdrückt werden.

Die Anwendung des EMX-Agars im Nationalparklabor ist zur Zeit noch in Frage gestellt (Anschaffung einer UV-Lampe usw.)

Anwendung von Verdünnungsreihen bei stark mikrobiell belasteten Quellen (Steyernquelle und Hintere Rettenbachquelle)

Aus den bisher gewonnenen Daten über die Verteilung der Keime an diversen Quellen, kann man annehmen, daß sie periodisch stärker verkeimt sein werden. Nach der Methode der Membranfiltration kann bei so hoher Verkeimung keine Keimzahlbestimmung mehr gemacht werden.

Keimzahl- Analogwerte (MPN) ersetzen die Keimzahlbestimmungen durch Kolonienzählung. An die Stelle fester Nährböden treten meist Submerskulturen, deren Anwachsen oder Nicht- Anwachsen in Abhängigkeit von der Probenverdünnung statistisch begründete, sog. MPN-Werte liefert. Eine weitere Gruppe von induzierten Analogwerten basiert ebenfalls auf Kulturverfahren. Hierbei werden gruppenspezifische Stoffwechselaktivitäten erfaßt.

„MPN“ Most Probable Number:

Aus den Verdünnungsschritten, die notwendig sind, um in beimpften Nährlösungen eine Keimfreie „Grenzverdünnung“ zu erreichen, zieht man gewisse Rückschlüsse auf die Konzentration zufallsverteilter, vermehrungsfähiger Zellen in der Ausgangssuspension. Dabei wird vorausgesetzt, daß jede vermehrungsfähige Einzelzelle nach genügend langer Inkubation die Nährlösung trübt (10^7 - 10^8 Zellen/ml), während keimfreie Ansätze klar bleiben (REICHHARDT).

Anwendung der MPN bei der Steyernquelle und Hintere Rettenbachquelle

Methode zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Coliformenzahl in 100 ml bei Verwendung von jeweils 3 Röhrchen zu 10 ml, 1 ml und 0,1 ml. (Nach: Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water). (Ev. reichen auch nur 2 Verdünnungsstufen an den Quellen).

Nährmedium: -Lactose- Gäragar

Materialien: -Brutschrank, einstellbar auf 44°C

-Maßpipetten, steril (2,0 ml/10,0 ml)

-Eprovettenständer

Durchführung:

a.) Pipettiert werden folgende Probenvolumina:

3 * 10 ml der Probe zu je 10 ml Lactose

3 * 1,0 ml der Probe zu je 5 ml Lactose

3 * 0,10 ml der Probe zu je 5 ml Lactose

Auswertung:

Nach einer Bebrütungsdauer von 24 Stunden wird festgestellt, in welchen Röhrchen eine positive Reaktion (d.h. Farbumschlag des Agars von grün auf gelb sowie Gasbildung) eingetreten ist. Je nach Zahl der positiven Reaktionen in den drei verschiedenen Verdünnungsstufen läßt sich aufgrund statistischer Berechnungen ermitteln, welche Coliformenzahl am wahrscheinlichsten in der Wasserprobe zu erwarten ist. Diese Zahlen liegen in Form von Tabellen vor, aus der die

entsprechenden Werte zu entnehmen sind. Die Tabelle zeigt auch einen Vertrauensbereich auf, daher ist sie der Formel zu bevorzugen.

Näherungsformel zur Berechnung der wahrscheinlichsten Coliformenzahl (nach Thomas aus Fair und Geyer).

$$\text{Coliformenzahl / 100 ml} = \frac{(\text{Zahl aller positiven Proben}) \times 100}{\sqrt{(\text{ml aller neg. Proben}) \times (\text{ml aller Proben})}}$$

Referenzen: ISO 9308-2
Standard Methods 9221-D(9-77)

Fehlerquellen: ⇒ Unachtsamkeit bei der Durchführung des Verfahrens
⇒ Unterschiede in der Zusammensetzung der Nährflüssigkeit
⇒ falsche Bebrütungstemperatur
⇒ falsche Bebrütungsdauer
⇒ kontaminierte Behältnisse

Beprobung der Seen in der Rettenbachhöhle

Diese Beprobung soll den Einfluß des oberflächennahen Abflusses auf die Mikrobiologie durch Vergleich der Höhlenproben mit den Proben Quelle Rettenbach herausarbeiten. Die Messungen können in Absprache mit den Meteorologen (WIMMER F.) vereinbart werden.

Methode: KBE- Bestimmungen (2-3 Standard- Untersuchungen und einem Röhrchentest z.B. Cult- dip Plus von Merk) (Anm. MENNE).

Folgende Methoden stehen zur Erweiterung der Methodik zur Diskussion (Absprache mit anderen Fachrichtungen und Zusammenarbeit mit B. Menne):

Folgende Anregungen von B. Menne, Mühlacker liegen zur Bearbeitung vor:

Abhängigkeit der Escherichia coli- Coliformen- und Gesamtkeimzahl von der Trübung des Wassers

Die Trübung des Wassers übt einen Einfluß auf das Leben der Mikroorganismen in den Gewässern aus. Sie wird durch das Seston verursacht, das die Gesamtheit des im Wasser schwebenden lebenden und toten Materials ausmacht, und woraus sich die Sedimente bilden. Es besteht nach DIETRICH et al. 1975 aus folgenden drei Komponenten:

- a.) die mineralische Trübe, die vom Lande in die Gewässer verfrachtet wird,
- b.) dem Detritus, der aus feinem anorganischem und organischem Zerreibsel vorwiegend organogener Herkunft besteht,
- c.) dem Plankton, dem im Wasser schwebenden pflanzlichen und tierischen Lebewesen.

Die Unterscheidung von mineralischer Trübe und Detritus ist oft kaum möglich, deshalb werden die beiden Komponenten als Tripton zusammengefaßt. Die Trübung kann optisch mit Hilfe eines Durchsichtigkeitsmeßgerätes bestimmt werden oder gravimetrisch ermittelt werden. Das Seston spielt als Substrat für viele Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Vor allem der Detritus trägt vielfach eine Aufwuchsflora von zahlreichen Bakterien. Dabei werden nicht nur die organischen Bestandteile von Mikroorganismen besiedelt, die diesen direkt als Nahrung dienen, sondern auch anorganische Bestandteile. Die anorganischen Schwebestoffe - gleich ob organogener oder minerogener Herkunft - adsorbieren an ihrer Oberfläche die in Wasser in nur geringer Konzentration gelösten Nährstoffe, so daß die Mikroben hier günstigere Ernährungsbedingungen finden als im freien Wasser. Das ist um so ausgeprägter, je nährstoffärmer das Wasser ist. Im allgemeinen kann man sagen, daß dort eine Trübungszunahme, die mit einem kräftigen Anstieg der Bakterienzahl einher geht, wenigstens teilweise auf eine Erhöhung des organischen Schwebstoffgehaltes zurückzuführen ist. Ändert sich

dagegen der Bakteriengehalt nur wenig, so ist sie vorwiegend durch anorganische Schwebstoffe bedingt. Der Vergleich von Trübungsmessungen und Gesamtbakterienzahlen läßt gewisse Rückschlüsse auf die Art der Trübungssstoffe zu (RHEINHEIMER, 1991).

Methode:

Filtration (5-8µm Porendurchmesser des sterilen Filters). Messung des gesamten Gehaltes an E. coli und Coliformen im Rohwasser und im Filtrat. Differenz davon sind dann die Keime die an den Partikeln festgehaftet sind.

Interessant ist die Messung der Korngrößenkurve (Untersuchungen der Limnologen); Bestimmung der Tonminerale; die Filter sollten aufgehoben werden; wenn man Tonmineralbestände bestimmten Regionen im Gebiet zuordnen könnte, wäre es auch möglich die Herkunft der Bakterien zu eruieren.

Erfassung der Gesamtzellzahl durch Direktmessung mit Zählkammer und Suche nach einem Optimalmedium

Die sog. Gesamtkeimzahl oder Kolonienzahl saprophytischer Bakterien auf nährstoffreichen Standardnährböden gelten als Indikator der Belastung eines Gewässers mit leicht abbaufähiger organischer Substanz. Die hiermit erfaßten Saprophyten repräsentieren in vielen Gewässern nur einen Bruchteil der heterotrophen Bakterienflora. Ein repräsentativeres Anreicherungsresultat wird erst möglich, wenn das Biotop-spezifische Substratmilieu ausreichend im Anreicherungsmedium berücksichtigt wird. Um eine maximale Keimausbeute zu erzielen, sucht man nach einem Optimalmedium.

Ansatz für die Karstquellen:

Zählung der Gesamtmikrobiozönose durch direkte mikroskopische Zählung (statistisch, z.B. Thoma Zählkammer) unter Fluoreszenz zur sicheren Differenzierung von mineralischen Partikeln.

Ausweitungsmöglichkeiten:

Suche mittels z.B. Back-tracking Algorithmus nach einem Optimalmedium für die Biozönose einer speziellen Quelle; d.h. gezieltes Annähern der direkten Zählung an die Keimzahlbestimmung nach Koch.

Untersuchung des Tagesrhythmus der Mikrobiologie in ausgesuchten Quellen

Ansatz:

Für die Analytik der Herkunft der Mikroorganismen ist es interessant festzustellen, ob irgend eine tageszeitliche Periodik in der Bakterienkonzentration beobachtbar ist. Dabei wäre es von großem Interesse sowohl hochgelegene Quellen, als auch die großen Karstquellen zu untersuchen.

Methode:

Probennahme an ausgewählten Quellen (im ähnlichen Verlauf wie Intensivkampagne) während eines ganzen Tages im 2 oder 3 Stundenrhythmus. Analytik mit Direktzählung und Plattenmethoden. (Verknüpfungen mit anderen Fachrichtungen wäre interessant).

Berechnung der Bakterienfracht pro Zeiteinheit:

Ansatz:

Die üblichen Meßmethoden bemessen die Anzahl der Bakterien auf den Milliliter Wasser (Konzentration). Dies ist eine mehr aus der hydrologischen/hygienischen Sicht geprägte Methodik. Aus mikrobiologischer Sicht wäre es von größtem Interesse, die Bakterienfrachten(g/h) zu ermitteln. Auf diese Weise wird es erst möglich genau zu erkennen, welche Wetterverhältnisse bzw. hydrologischen Situationen zu einer absolut geringen Aufschwemmung von Bakterien führen und welche Ereignisse zu hohen Bakteriendriften führen.

Methodik:

Näherungsweise Bestimmung mittels Annahme einer Standardmasse pro Zelle und Umrechnung der Coliformen - Einheiten in Verbindung mit der Quellschüttung zu Frachten. In verfeinerter Verfahrensweise Auswahl einer der Standardmessungen für die Bestimmung der Zellmassen. Verknüpfung mit anderen Fachrichtungen: Hydrologie und Meteorologie.

Untersuchung der Bakteriendrift über den Quellquerschnitt

Ansatz:

Insbesondere bei der Beprobung der Karstgroßquellen liegt kein näherungsweise punktförmiger Austritt vor. Unterschiedliche Wasserführungen können die Bakteriendriften im freien Wasser selbst auf unbekannte Weise beeinflussen. Es scheint daher- auch im Sinne der Frachtenberechnungen sinnvoll, sich durch zeitsimultane Probennahme bei verschiedenen Wasserständen einen Überblick über die Verteilung der Bakterien im Quellquerschnitt zu verschaffen.

Methodik: Bau eines sterilen Probennahmegerätes zur simultanen Probennahme über den Bachquerschnitt (Idee und Grundkonzept für eine solche Einrichtung wird von B.Menne entworfen). Bestimmung der Coliformen.

8. Literaturverzeichnis:

- ❑ Stmk. Landesregierung; Fachabteilung IIIc; Ölalarmdienst. Bakteriologische Untersuchungen von Quellwässern des WV „Totes Gebirge“ (von DI Rauter).
- ❑ Balkwill, D.L., and Ghiorse, W.C.(1985). Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. App. Environ. Microbiol.50, 580-588.
- ❑ Balkwill, D.L., Leach, F.R., Wilson,J.T.,McNabb, J.F., and White, D.C.(1988). Equivalence of microgial biomass measures based on the membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface aquifer sediments. Microb. Ecol. 16, 73-84.
- ❑ Bauld, J.,Evans,W.R. and Kellett, J.R.(1990). Groundeater system for the Murray Basin, Southern Australia. In „Microbiology of the Deep Subsurface“ (C.B.Fliermans and T.C.Hazen,eds.),S2,pp.83-96. WSRC Information Services, Aiken, South Carolina.
- ❑ Benoit, R.E.,and Phelps, T.J.(1990). Microaerophilic bacteria from subsurface sediments. In „Microbiology of the Deep Subsurface“ (C.B. Fliermans and T.C. Hazen,eds),S4,pp.87-96.WSRC Information Services, Aiken, South Carolina.
- ❑ Bianchi, A. et al.(1987). Etude bacteriologique des sediments quaternaires et pliocene superior du delta de la Mahakam(Kalimantan, Indonesie). In „Le sondage Misedor“,pp.206-224. Technip,Paris.
- ❑ Bone,T.L.,and Balkwill, D.L.(1988). Morphological and cultural comparison of microorganisms in surface soil and subsurface sediments at a pristine study in Oklahoa.Microb. Ecol. 16, 49-64.
- ❑ Cullimore, D.R.(1993). „Practical Manual of groundwater Microbiology“. Lewis, Chelsea, MI.
- ❑ Daubner, J.(1984). Mikrobiologie des Wassers, 2. überarb. Auflage, Akademie Verlag, Berlin.

- ❑ Daumas, S., Lombart, R., and Bianchi, A. (1986). A bacteriological study of geothermal spring waters dating from the dogger and trias period in the Paris Basin. *Geomicrobiol. J.* 4, 423-433.
- ❑ Dudich, E. (1930). Die Nahrungsquellen der Tierwelt in der Aggteleker Tropfsteinhöhle. *Allatorv. Közl.* 27, 77-85.
- ❑ Eichen, A.C., Dodds, W.K., Tate, C.M., and Edler, C. (1993). Microbial decomposition of elm and oak leaves in a karst aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3592-3596.
- ❑ Frederickson, J.K., et al. (1989). Lithotrophic and heterotrophic bacteria in deep subsurface sediments and their relation to sediment properties. *Geomicrobiol. J.* 7, 53-66.
- ❑ Frederickson, J.K., et al. (1990). Microorganisms in deep cretaceous sediments of the atlantic coastal plain: Vertical variations and sampling considerations. In „Microbiology of the Deep Subsurface“ (C.B. Fliermans and T.C. Hazen, eds.), S3, pp. 53-63. WSRC Information Services, Aiken South Carolina.
- ❑ Gärtner, A., (1902). Die Quellen in ihrer Beziehung zum Grundwasser und zum Typhus. Gustav-Fischer Verlag, Jena.
- ❑ Ghiorse, W.C. (1988). Microbial reduction of manganese and iron. In „Biology of Anaerobic Microorganisms“ (A.J.B. Zehnder, ed.), pp. 305-331. Wiley, New York.
- ❑ Ghiorse, W.C., and Balkwill, D.L. (1983). Enumeration and morphological characterization of bacteria indigenous to subsurface environments. *Dev. Ind. Microbiol.* 24, 213-224.
- ❑ Ghiorse, W.C., and Wilson, J. T. (1988). Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Adv. Appl. Microbiol.* 33, 107-172.
- ❑ Gounot, A.M. (1970). Quelques observations sur le micropeuplement des limons des grottes arctiques. *Bull. Soc. Linn. Lyon* 39, 226-236.
- ❑ Gounot, A.M. (1973). Recherches sur les bacteries cavernicoles. *C. R. Cong. Natl. Soc. Savantes, Sect. Sci.* 96(3), 257-265.
- ❑ Gilbert J., et al. „Groundwater Ecology“: Microbial Ecology of Groundwater; pp 189 - 215. (Universite Lyon I, Ecologie Microbienne, U.R.A. CNRS 1450, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
- ❑ Hallbeck, L., and Pedersen, K. (1991). Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2657-2661.
- ❑ Hirsch, P., and Rades-Rohkohl, E. (1983). Microbial diversity in a groundwater aquifer in Northern Germany. *Dev. Ind. Microbiol.* 24, 183-200.
- ❑ The natural microflora of the Segeberger Forst aquifer system. In „Progress in Hydrochemistry“ (G. Matthess, F. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz, and H.E. Usdowski, eds.), pp. 390-412. Springer-Verlag, Heidelberg.
- ❑ Hirsch, P., and Rades-Rohkohl, E. et al. (1992a). Morphological and taxonomic diversity of groundwater microorganisms. In „Progress in Hydrochemistry“ (G. Matthess, F. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz, and H.E. Usdowski, eds.) pp. 311-325. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Jimenez,L.(1990). Molecular analysis of deep- subsurface bacteria. Appl. Environ. Microbiol.56, 2108-2113.
- Kilbertus, G., and Schwartz,R.(1981). Relations microflore-microfaune dans la grotte de Sainte-Catherine(Pyrenees ariegeoises). I. Recherche des sources trophiques. Rev. Ecol. Biol.Sol 18,305-317.
- Kölbel- Boelke, J., and Hirsch, P. (1989). Comparative physiology of biofilm and suspended organisms in the groundwater environment. In“ Structure and Funktion of Biofilms“(W.G.Characklis and P.A. Wilderer, eds.),pp. 221-238. Wiley, New York.
- Madsen,E.L., and Ghiorse,W.C.(1993). Groundwater microbiology: Subsurface ecosystemprocesses. In Aquatic Microbiology: An Ecological Approach“ (T.E. Ford, ed.),pp.167-213. Blackwell, Boston.
- McNabb,J.F.,and Dunlap, W.J.(1975). Subsurface biological activity in relation to ground water pollution. In „Groundwater Pollution Microbiology“(C.P.Gerba and G. Bitton,eds.),pp.235-260.Wiley, New York.
- Mulder,E.G.,and Antheunisse, R.I.(1963). Morphologie, physiologie et ecologie des Arthrobacter. Ann. Inst.Pasteur, Paris 105, 46-74.
- Palik, P.(1960). A new blue-green alga from the cave Baradla near Aggtelek(Biospeologica Hungarica XII). Ann. Univ.Sci. Budap. Rolando Eotvos Nominatae, Sect. Biol. 3, 275-286.
- Patrick, W. H., and Jugsujinda, A.(1992). Sequential reduction and oxidation of inorganic nitrogen, manganese, and iron in flooded soil. Soil Sci. Soc. Am. J.56, 1071-7073.
- Reichhardt,W., (1978). Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie. Gustav-Fischer Verlag Stuttgart New York.
- Rheinheimer,G.(1991). Mikrobiologie der Gewässer. Gustav-Fischer Verlag.
- Sarbu, S.(1990). The unusual fauna of a cave with thermomineral waters containing H₂S from Southern Dobrogea, Romania. Mem. Biospeol.17, 191-195.
- Thorn, P. M.,and Vwentullo, R.M.(1988). Measurement of bacterial growth rates in subsurface sediments using the incorporation of tritiated thymidine into DNA. Microb. Ecol.6, 3-16.
- White, D.C.,Smith, G.A.,Gehorn, M.J.,Parker, J.H.,Findlay, R.H.,Martz.R.F.,and Frederickson, H.L.(1983). The groundwater aquifer microbiota: Biomass, community structure, and nutritional status. Dev. Ind.Microbiol. 24,201-211.
- White, D.C.,Ringelberg,D.B.,Guckert,J.B.,and Phelps, T.J.(1990).Biochemical markers for in situ microbial community structure. In „Microbiology of the Deep Subsurface“ (C.B.Fliermans and T.C. Hazen,ed.), S4,pp.45-56.WSRC Information Services, Aiken, South Carolina.

KARSTPROGRAMM AZ 1603

TP 1603-7.5./95 Mikrobiologie

Stellungnahme vom 24.06.1996

zum Endbericht Teil II vom Mai 1996

von Susanne SCHMIDT, Graz

Betrifft: Karstprogramm AZ. 1603, TP 7.5./95: Mikrobiologie der Quellen im
Nationalparkgebiet Kalkalpen, Teil II: Konzeptive Fortschreibung

Bezug: Bericht: Susanne SCHMIDT

Der zweite Teil des Auftrages 1603-7.5.1./1995 „Mikrobiologie der Quellen....“ widmet sich vertragsgemäß einer Literaturrecherche sowie Überlegungen zur Weiterarbeit im Rahmen des Karstprogrammes und auch des Nationalpark-Labors. Dieser Projektteil behandelt nicht die fäkalindikatorischen Durchsätze (siehe Teil I), sondern die parautochthonen bis autochthonen Bakterien des Karstsystems und deren wissenschaftliche Relevanz.

Der allgemeine Teil belegt anhand von Literaturrecherchen, daß die entscheidenden interdisziplinären Impulse zum Verständnis der Grund- und Karstwassermikrofauna wie so oft im wissenschaftlich beweglichen angelsächsischen Sprachraum zu finden sind. Im deutschsprachigen Milieu hat diese Entwicklung erst sehr spät begonnen und ist vielfach noch kaum in Diskussion, was an der traditionellen Dominanz des hydrogeologischen Faches in Österreich mit seinen zähen Machtstrukturen - Besetzung des Themas über Jahrzehnte von immer den selben Karstfachleuten - liegen mag. Hier eröffnet sich ein weites Feld der Innovation, da über (nord)alpine stygische Mikro - und Makrobionten kaum etwas bekannt ist.

Das Bakterienspektrum der unterirdischen Gewässer und Räume (darauf beschränkt sich die Arbeit) ist durch Arten dominiert, die mit wenig Nährstoffen auskommen. Bestimmte Gruppen besetzen dabei bestimmte Mikrohabitate und gehen Wechselwirkungen mit Wasserinhaltsstoffen, Sediment, Evakuationsraum und eingeschwemmten Substraten ein. Besonders interessant sind dabei physiologische Aktivitäten wie z.B. die Fe-, S- und N-Umsetzungen sowie Fixierungen bestimmter Elemente wie z.B. Mangan, wie 1996 in der Rettenbachhöhle nachgewiesen. Der Erläuterung der limitierenden Faktoren (wie Oligotrophie, Psychrophilie etc.) wird relativ breiter Raum gewidmet, was für die Einordnung der Taxa und der Habitate in bestimmten Quell- und Karstwassersystemen große Bedeutung hat.

Entscheidende Fortschritte erbrachte die Aufnahme konkreter Arbeiten mit B. MENNE, der von der Autorin angesprochen und eingeladen wurde. Die Überlegungen und Erkenntnisse dieses Spezialisten, der mittlerweile Forschungen im Nationalparkgebiet aufgenommen hat (Rettenbachhöhle), erstrecken sich von der mikrobiologischen Karstdynamik bis hin zur tiefenabhängigen Besiedelung von Myxobakterienstämmen (Bodenbewohner) der Karsthöhlen und sind somit für das Forschungsprogramm „Karstdynamik“ hoch relevant. In Verbindung mit der Weiterführung der seuchenhygienischen Routineanalyse bei Monitoring- und Ereigniskampagnen und mit dem Teilprojekt 7.5.2. (Tracerkeime) dürfen bald neue Erkenntnisse über Organismendrift und Stoffumsatz im Karstsystem erwartet werden.

Gemeinsam mit der Erfassung und Analyse der Quellbiozöten und ihres Nährstoffhaushaltes (Teilprojekte 1603-7.6. und 9.) wird ein enger Zusammenhang der Mikrobiologie zur Karstwasser-Stoffbilanz und ihrer Biotoprelevanz erkennbar. Möglicherweise spielen Mikrobionten bei der Höhlenentstehung, damit für die karsthydrographische Wirksamkeit und bei Verkarstungsprozessen ganz allgemein eine weit größere Rolle als bisher angenommen.

Der letzte Abschnitt der Arbeit befaßt sich mit aktuellen und optimierten Methoden der mikrobiologischen Analyse im Nationalpark-Labor sowie mit Ansätzen zur Erweiterung, vor allem der Erweiterung des Spektrums „KBE“ durch die Zählkammermethode. Die Erläuterungen zur Qualitätssicherung und Vereinheitlichung ergänzen die gegenwärtig stattfindende Neustrukturierung des hydrochemischen NPK-Labors unter neuer Leitung.

Ein eigenständiger Aufbau des NPK-Labors in Richtung Mikrobiologie ist weiterhin wünschenswert und vielversprechend, kann aber erst nach Abschluß der Standardisierung und Rationalisierung der Hydrochemie (automatische Probenwechsler für IC etc.) näher ins Auge gefaßt werden.

Die Arbeit leistet insgesamt wertvolle Anregungen und Grundlagen für die Analyse der Mikrobiologie im Rahmen des Karstprogrammes und entspricht den in sie gesetzten Erwartungen. Der Teilauftrag 1603-7.5./95 ist somit als erfüllt zu betrachten.

Für die Koordination des Karstprogrammes:

Anlagen: Bericht (5fach)
 Diskette mit Bericht

⇒ **SIEHE ORIGINALBERICHT!!!**