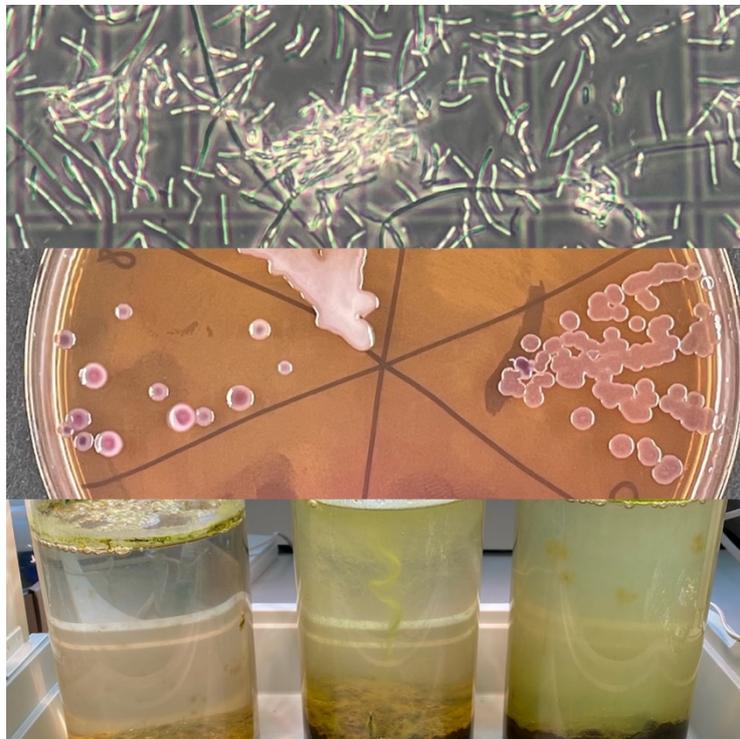


Reichswald-Gymnasium  
Zum Kirchbühl 14,  
66877 Ramstein-Miesenbach

Jugend Forscht  
2024

# Mikrobielle Welten: Die kleinsten Lebewesen im Fokus

Ein Projekt von  
Emma Distler, Lilly Grimm



Fach: Biologie

Projektbetreuerin: Esther Sternheim

Abgabe: 11.01.2024

## 1. Kurzfassung

Sauberes Trinkwasser ist eine wertvolle Ressource, dennoch ist es stark belastet durch zahlreiche Schadstoffe. In einem intakten Ökosystem sorgen Bakterien für den Abbau von abgestorbenen Organismen und machen dadurch wichtige Nährstoffe für die Primärproduzenten wieder verfügbar. Entscheidend hierfür ist die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft und die Dichte der verschiedenen Bakterienstämme. Wir wollten wissen, ob der Einfluss des Menschen diese Bakteriengemeinschaft verändert. Daher haben wir das Mikrobiom eines Parkteichs, des Seewoogs, der für ein Artenschutzprojekt in zwei unterschiedlich genutzte Bereiche unterteilt wurde, genauer unter die Lupe genommen. Um zu einem aussagekräftigen Ergebnis zu gelangen, wurden zahlreiche mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt. Außerdem konnten wir die Auswirkungen eines Starkregenereignisses auf die Bakterienflora untersuchen. Insgesamt konnten wir sowohl quantitativ als auch qualitativ auffällige Abweichungen feststellen.

## 2. Inhaltsverzeichnis

### Inhalt

1.	Kurzfassung .....	2
2.	Inhaltsverzeichnis .....	3
3.	Abbildungsverzeichnis.....	4
4.	Tabellenverzeichnis.....	4
5.	Einleitung .....	5
6.	Vorgehensweise, Materialien und Methode .....	6
6.1	Winogradsky-Säulen .....	6
6.2	Koloniezahlbestimmung .....	7
6.3	Biochemische Tests zur Identifizierung von Bakterien .....	7
6.4	Flow Cytometrie.....	8
6.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	8
6.6	ATP-Messungen .....	9
6.7	Nachweis von Escherichia coli .....	9
6.8	Chemisch-physikalische Parameter .....	9
7.	Ergebnisse .....	10
7.1	Winogradsky Säulen.....	10
7.2	Koloniezahlbestimmung (3.03.23) .....	12
7.3	Biochemische Tests zur Identifizierung von Bakterien (15.05.23) .....	12
7.4	Flow Cytometrie (17.10.23) .....	13
7.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion (17.10.23) .....	13
7.6	ATP-Messungen (17.10.23).....	13
7.7	Nachweis von Escherichia coli (17.10.23) .....	14
7.8	Chemisch-Physikalische Parameter .....	14
8.	Ergebnisdiskussion.....	14
8.1	Winogradsky-Säulen .....	14
8.2	Koloniezahlbestimmung .....	15
8.3	Biochemische Tests zur Identifizierung von Bakterien .....	15
8.4	Cytoflow .....	15
8.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	16
8.6	ATP-Messung .....	16
8.7	Nachweis von E. coli .....	17
8.8	Chemisch-physikalische Parameter .....	17

9. Zusammenfassung .....	18
10. Literaturverzeichnis .....	20

### 3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2: Ansatz der Winogradsky-Säulen (16.2.23)	9
Abbildung 3: Ansatz der Winogradsky-Säulen (24.2.23)	9
Abbildung 4: Ansatz der Winogradsky-Säulen (9.3.23)	9
Abbildung 5: Ansatz der Winogradsky-Säulen (28.3.23)	10
Abbildung 6: Ansatz der Winogradsky-Säulen (11.4.23)	10
Abbildung 7: Winogradsky-Säulen (3.3.23)	10
Abbildung 8: Koloniezahlbestimmung großer Seewoog	11
Abbildung 9: Koloniezahlbestimmung kleiner Seewoog	11
Abbildung 10: a kleiner Seewoog, b großer Seewoog	11
Abbildung 11: Flow-Cytometrie	12
Abbildung 12: qPCR-Messung	12
Abbildung 13: Eichgerade zur Extinktion im Verhältnis zum ATP-Gehalt	13
Abbildung 14: Nachweis von Escherichia coli	13

### 4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biochemische Tests ausgewählter Kolonien	11
Tabelle 2: Messung der relativen Lumineszenz (RLU)	12
Tabelle 3: Chemisch-physikalische Untersuchung der beiden Seewoogbereiche	13

## 5. Einleitung

Für das Ökosystem See spielen sowohl die Biozönose und das Biotop als auch das Mikrobiom eine entscheidende Rolle. Im weitesten Sinn umfasst der Begriff Mikrobiom alle Mikroorganismen, die die Erdkruste, Gewässer und Erdatmosphäre besiedeln. Im engeren Sinn bezieht er sich auf die Gesamtheit der natürlichen Besiedlung von Mikroorganismen in einem vielzelligen Lebewesen oder einem begrenzten Ökosystem [1].

Alle Organismen werden in drei Domänen zusammengefasst. Dabei handelt es sich um eine Klassifikation auf der Grundlage ihrer zellulären Strukturen und ihres genetischen Aufbaus. Die erste dieser Domänen stellen die Bakterien (*gr. Bakterion, Stäbchen*) dar. Es handelt sich um einzellige Organismen ohne membranumhüllten Zellkern, welche als die früheste Form des Lebens bekannt sind. [2] Als selbstständige Einheiten führen sie ihr Leben unabhängig von Kolonien oder Zellverbänden. Aufgrund dessen und ihrer raschen Vermehrung sind sie hervorragend als Modellorganismen geeignet, denn Mikroorganismen können im Labor zu extrem hohen Zelldichten heranwachsen. [3]

Die durchschnittliche Größe einer Bakterienzelle liegt zwischen 1 und 5  $\mu\text{m}$ . Bakterien werden vor allem anhand ihrer Zellform (stäbchenförmig oder kugelförmig) und ihrer Eigenschaft bei der Gramfärbung eingeteilt. Grampositive Bakterien weisen eine sehr dicke Mureinschicht auf, welche bei den gramnegativen Bakterien nur in einer dünneren Form vorhanden ist. Es gibt allerdings auch weitere Klassifizierungen, wie beispielsweise anhand des Stoffwechsels, wobei man zum Beispiel zwischen Aerobiern und Anaerobiern unterscheiden kann. [2]

Bei der Verarbeitung der toten Biomasse spielen Destruenten, also unter anderem das Mikrobiom, eine große Rolle. Manche Bakterien können außerdem Photosynthese betreiben und somit organische Verbindungen mit Hilfe des Sonnenlichts selbst herstellen. Zudem sind sie für viele chemische Reaktionen verantwortlich, die die heutige Existenz menschlichen Lebens ermöglichen. Bakterien spielen bei der Stickstofffixierung, der Nitrifikation und der Denitrifikation im Stickstoffkreislauf eine bedeutende Rolle und auch im Phosphatkreislauf übernehmen sie eine essentielle Aufgabe für die Regulation sowie die Gesundheit der Pflanzen. [4]

Vor 5 Jahren startete unter der Leitung von Dr. Bernd ein Projekt zur Erhaltung der Artenvielfalt am Seewoog in Ramstein-Miesenbach. Eine Hälfte wurde durch eine naturnahe Gestaltung künstlich von dem größeren Bereich mit Hilfe einer Mauer abgegrenzt. Trotzdem werden beide Seebereiche mit dem gleichen Wasser versorgt, was eine direkte Gegenüberstellung ermöglicht. Um einen Lebensraum für viele teilweise bedrohte Tierarten zu bieten, wurde der hohe Fischbestand in den größeren Bereich umgesiedelt. In bereits durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der kleine Seewoog durch seine naturnahe Entwicklung eine sehr hohe ökologische Wertigkeit aufweist. Angesichts dieser Tatsache, stellte sich für uns die Frage, inwiefern sich die unterschiedlichen Biozönosen auf die Bakterienzusammensetzung auswirken und auf welche Art und Weise die unterschiedliche Nutzung durch den Menschen hierbei eine Rolle spielt. Anhand solcher Grundlagen lässt sich die Wirksamkeit einer solchen Maßnahme diskutieren. Dies ist auch im Hinblick auf den fortschreitenden Klimawandel von großer Bedeutung, denn es wird zwangsweise zu einer deutlichen Veränderung der Ökosysteme kommen, was sich unvermeidbar auf die Zusammensetzung von Mikroorganismen auswirkt. Schließlich folgen Auswirkungen auf das gesamte Zusammenspiel innerhalb eines Ökosystems.

Ziel der Untersuchung ist die Beantwortung der zugrundeliegenden Forschungsfrage: Wie wirkt sich die naturnahe Gestaltung auf das Mikrobiom des kleinen Seewooges im Vergleich zu dem des großen Seewoogs aus.

Zu Beginn der Versuche wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Der naturnah gestaltete kleine Seewoog weist im Vergleich zum großen Seewoog eine andere Zusammensetzung und Dichte der Bakteriengemeinschaft auf und es kommen aufgrund der unterschiedlichen Nutzung insgesamt weniger problematische Bakterien wie Escherichia Coli vor, was positiv für die Gewässerqualität ist.

## 6. Vorgehensweise, Materialien und Methode

Es wurden zunächst Winogradsky-Säulen angelegt sowie Wasserproben auf Vollnährmedium ausplattiert, um sowohl anaerobe als auch aerobe Bakterien über diese Kultivierungsmethoden sichtbar zu machen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Bakteriengemeinschaften. Im weiteren Verlauf konnten nun einige Bakterienkolonien mithilfe verschiedener Selektivnährböden auf bestimmte Stoffwechseleigenschaften hin untersucht werden. Auf diese Weise ließen sie sich einzelnen Gruppen genauer zuordnen. Da die Ergebnisse jedoch von den in der ersten Versuchsreihe gewonnenen Eindrücken deutlich abwichen, wurden eine qPCR, Flow-Cytometrie-Messungen, eine Bestimmung der bakteriellen Aktivität anhand von ATP sowie ein E.coli-Nachweis durchgeführt. Hierdurch konnten verschiedene Daten zur Bakteriendichte und -aktivität gewonnen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass im naturnah umgestalteten Bereich keine E.coli-Bakterien vorkommen. Die biochemischen Tests einiger Bakterien sowie die qPCR, Flow-Cytometrie, ATP-Bestimmung und der E.coli-Nachweis konnten an der RPTU in den Laboren von Prof.Frankenbergs-Dinkel und Prof.Stoeck durchgeführt werden.

### 6.1 Winogradsky-Säulen

Bei der Erstellung einer Winogradsky-Säule handelt es sich um einen Versuch zur Isolation und nachfolgenden Bestimmung von Mikroorganismen. Sergej Nikolajewitsch Winogradsky entwickelte diese Ende des 19. Jahrhunderts. [5] Die Säule stellt ein eigenes kleines Ökosystem dar, in dem man den Mikroorganismen verschiedene Lebensbedingungen ermöglichen kann. Es bilden sich Nährstoff-, Sauerstoff- und Lichtgradienten aus und die Mikroorganismen siedeln sich je nach Anpassung in unterschiedlichen Schichten an. Dort stehen ihnen unterschiedliche Substrate zur Verfügung, welche die Mikroben mit ihren spezifischen Stoffwechselbedingungen umsetzen. In den oberen Schichten herrscht beispielsweise ein Sauerstoffüberschuss, jedoch ist dort die  $H_2S$ -Konzentration gering. Umgekehrt verhält es sich am Boden der Säule. Da die Bakterien immer in Matten, also einer recht hohen Anzahl, auftreten, kann man mit der Zeit farbliche Unterschiede erkennen. [6, 7]

Es wurden insgesamt zwei verschiedene Versuche angesetzt, mit der Intention, die Lichtverhältnisse zu variieren. In einer Probe befindet sich zum Vergleich stets nur Boden und Wasser des Sees.

Ansatz 1 [8]	Ansatz 2 [7]	Vergleichsprobe
500 ml Wasser	950 ml Wasser	500 ml Wasser
100 g Erde	200 g Erde	100 g Erde
4 ml Calciumsulfat Lösung (CaSO <sub>4</sub> )	15 g Calciumsulfat Lösung (CaSO <sub>4</sub> )	
4 ml Gelatinelösung	0,3 g Pepton	

#### Vorgehensweise:

Zunächst wurde 1 l Wasser pro Seewoog-Bereich entnommen. Im Anschluss daran stellte man die Calciumsulfat-Lösung her, indem man 4 g Gips mit 4 ml Wasser mischte. Gips enthält Schwefel und

stellt somit eine Nahrungsquelle der schwefeloxidierende Bakterien dar. Die Blattgelatine wurde in Wasser gelegt, bis sie sich aufgelöst hat. Diese dient als Nahrungsquelle für die verschiedenen Mikroorganismen und wurde anschließend mit der  $\text{CaSO}_4$ -Lösung und dem Eisen in eine hohe zylinderförmige Glassäule gefüllt. Nun gab man 100 g der Erde hinzu, und füllte die Säule vorsichtig mit dem Seewasser auf. Im Unterschied zum ersten Ansatz, welcher sich stets auf der Fensterbank befand, ummantelte man die Säulen des zweiten Ansatzes mit Alufolie und belichtete diese gezielt von oben mit Hilfe einer Pflanzenlampe. Zudem wurde Pepton anstelle von Gelatine verwendet. Alle Ansätze wurden über mehrere Wochen beobachtet und Veränderungen vermerkt.

## 6.2 Koloniezahlbestimmung

Dieses Verfahren dient den Ermittlungen der Bakterienzahl und der Quantifizierung von aeroben, heterotrophen Bakterien in einem Gewässer. Durch Plattieren können koloniebildende Einheiten einfach ausgezählt werden. [9, 18]

### Vorgehensweise:

Auch in diesem Fall entnahm man erneut Wasserproben aus beiden Gewässern mit ausreichender Tiefe. Den gelförmigen Grundstoff der Nährboden stellte das Polysaccharid Agar dar [7]. Um die Platten selbst zu gießen, wog man 2,5 g Nähragar ab und gab es mit 100 ml destilliertem Wasser in einen Erlenmeyerkolben. Dieser wurde verschlossen und bei  $121^\circ\text{C}$  für 20 Minuten im Dampfdrucktopf gekocht, bevor man ihn erneut auf  $50^\circ\text{C}$  abkühlen ließ. Anschließend goss man den Agar in Petrischalen und wartete, bis er erstarrt war.

Bevor man die Wasserproben auf den Agar auftrug, musste zunächst eine Verdünnungsreihe hergestellt werden. Dies wurde gezielt durchgeführt, sodass man für jeden Seebereich vier verschiedene Verdünnungen ( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ ) erhielt. Mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spaltes plattierte man nun die verdünnten Bakteriensuspensionen auf den vorbereiteten Platten aus. Dabei war es wichtig, dass man eine Beschädigung des Agars vermied und eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet war. Auch die sterile Arbeitsweise trug zur späteren Aussagekräftigkeit der Ergebnisse maßgeblich bei.

## 6.3 Biochemische Tests zur Identifizierung von Bakterien

Um die Bakteriengruppen weiterhin einzugrenzen arbeitete man zudem mit verschiedenen Nähragar-Zusammensetzungen und Nährlösungen. Fünf Kolonien pro Seewoog-Bereich sollten anhand spezifischer Stoffwechseleigenschaften möglichst bestimmten Bakteriengruppen näher zugeordnet werden.

- Endo-Agar ist zur Anzucht sowie Unterscheidung von Enterobacteriaceae (gramnegativ) gut geeignet. Eine Vermehrung von grampositiven Bakterien wird gehemmt. [10]
- Mit Chinablau-Laktose Agar kann man sowohl grampositive als auch gramnegative Kolonien eingrenzen. Zudem dient er der Unterscheidung zwischen Laktose-positiven und -negativen Kolonien. [11]
- Auch beim MacConkey Agar wird das Wachstum der grampositiven Bakterien eingedämmt, allerdings ist es sowohl für Laktose-positive als auch für Laktose-negative Keime möglich sich zu vermehren. Man kann diese mit Hilfe eines pH-Indikators differenzieren. [12]
- Citrat dient zur Eingrenzung der coliformen Bakterien, Lactose identifiziert Enterobakterien und Acetamid ermöglicht eine selektive Bestimmung der Pseudomonaden. [13, 14]

## 6.4 Flow Cytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen innerhalb einer heterogenen Zellpopulation gezählt sowie deren Größe, Form und Eigenschaften analysiert. Dadurch ist dies eine geeignete Methode, um innerhalb weniger Minuten die Bakteriendichte in einem Gewässer zu erfassen. In einem FACS-Gerät werden die Probezellen nacheinander durch einen engen Kanal geleitet und dort mit Licht beleuchtet. Dieses Licht wird von den Zellen auf verschiedene Weise gebrochen und ausgestrahlt, was wiederum von bestimmten Sensoren erfasst werden kann. Man unterscheidet in dem Fall zwischen vorwärts gestreutem Licht und Seitenstreulicht. Um ein vollständiges Bild zu erhalten, werden die Daten gesammelt und integriert. Man kann die Umstände dank spezieller Software-Programme hervorragend prüfen. [15]

Zunächst musste man eine Suspension individueller Zellen vorbereiten, indem man jeweils drei Proben beider Seewoog-Bereiche mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzte, um in Nachhinein bestimmte Zellpopulationen identifizieren zu können. Im Anschluss daran platzierte man die vorbereiteten Proben im Flow-Cytometer. Mit Hilfe des Software-Programmes lässt sich das Gerät in einfacher Praxis steuern. Nachdem alle sechs Proben durch das Gerät geflossen waren, erhielt man umfassende Daten, wobei für die der Arbeit zugrunde liegende Frage vor allem die absolute Zellzahl von großer Bedeutung ist. Hinzu kommt das Punktdiagramm, welches jedes Ereignis als einzelnen Punkt auf einem Streudiagramm darstellt und die Intensität jedes Kanals auf einer eigenen Achse abbildet. Dies dient primär der Analyse multiparametrischer Daten und erlaubt es zudem eventuellen Zelldebris zu identifizieren.

## 6.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die qPCR dient dem gezielten Nachweis und der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Sie basiert auf der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch an doppelsträngige DNA binden. Die Farbstoffe zeigen anfänglich eine geringe Hintergrundfluoreszenz, die jedoch bei der Bindung an die entsprechende DNA erheblich steigt. Während der Amplifikation der Zielsequenz führt dies zu einer zunehmenden Fluoreszenz, die direkt proportional zur Menge der in jedem PCR-Zyklus vorhandenen DNA ist. Um das Vorhandensein von Bakterien quantitativ mithilfe dieser Methode nachzuweisen, wurde die Region V6 innerhalb der 16S rRNA-Gensequenz bei dieser qPCR vervielfältigt. V6 codiert einen Teil der kleinen ribosomalen Untereinheit der Bakterien und umfasst etwa eine Länge von 200 Basen. [16]

### Vorgehensweise:

Um eine Real-Time PCR erstellen zu können mussten zunächst wieder Wasserproben entnommen werden. Die Proben beider Bereiche filtrierte man mit einer Peristaltik-Pumpe, welche 0,04 Umdrehungen pro Minute aufweist. Hierbei fördern die peristaltischen Wellen die Wasserbewegung in den beiden Schläuchen. Durch jeweils einen Schlauch läuft das Wasser eines Seewoog-Bereiches. Am Ende der beiden Schläuche wurde ein Bakterienfilter befestigt. Dieser besteht aus einer Membran von genau 0,22 µm, was bedeutet, dass die Bakterien dort hängen bleiben.

Nun musste die DNA für die qPCR aus den Gewässerproben extrahiert werden. Dafür benutze man das DNeasy® PowerWater® Kit. Dieses besteht, inklusive der schon durchgeführten Filtration, aus insgesamt 23 Schritten. Zunächst mussten die Bakterien vom Filter abgelöst werden. Das entstandene Filtrat gab man nun in ein *PowerWater DNA Bead Tube*, um die kultivierten Bakterienproben zu homogenisieren. Anschließend gab man abwechselnd unterschiedliche Lösepuffer hinzu, vortexte oder zentrifugierte

die Proben und überführte sie in neue Eppendorf-Gefäße. Insgesamt arbeitete man mit vier verschiedenen Lysepuffern, um die DNA vollständig aus den Bakterien zu isolieren und aufzureinigen

Nachdem nun die fertigen DNA-Proben hergestellt wurden, arbeitete man mit einem Photometer, um die Dichte beider Lösungen herauszufinden. Es war nämlich von großer Bedeutung bei eventuellen Ungleichheiten eine Angleichung durch Verdünnung vorzunehmen. Anschließend nutzte man die Proben und bereitete sie gezielt für die PCR vor. Folgende Mischung wurde hierfür angesetzt:

- 1 µl DNA-Template, 10 µl Super Mix, 1 µl Primer V6 (forward primer), 1 µl Primer V6 (reverse primer), 7 µl Wasser

Der Super Mix ist eine vorgefertigte Mischung, die eine DNA-Polymerase, Salze, Magnesium und dNTPs für eine effiziente PCR-Amplifikation enthält. Nachdem man die fertigen Proben hergestellt hatte, überführte man sie in ein Rack. Im Endeffekt erhielt man sechs Standard-Kontrollen, drei Proben des großen und drei des kleinen Seewoogs. Anschließend setzte man das Rack in die PCR Maschine und ließ die regulären drei Zyklen (Denaturierung, Hybridisierung, Polymerisation) ablaufen. Diese Schritte wurden in 40 Zyklen wiederholt, um am Ende genug DNA hergestellt zu haben.

## 6.6 ATP-Messungen

Eine ATP-Messung wurde durchgeführt, um sich mit der Aktivität innerhalb der beiden Seewoog-Bereiche auseinanderzusetzen. Dabei ist der Energiespeicher ATP ein Indikator für stoffwechselaktive Zellen.

### Vorgehensweise:

Zunächst bereitete man eine 96-Well-Platte vor, indem man in die ersten sechs Vertiefungen Standards pipettierte, um im Endeffekt die gemessenen Werte vergleichen zu können. Anschließend gab man in je 3 Vertiefungen 100 µl der Wasserproben beider Seewoog-Bereiche. Man fügte daraufhin 100 µl eines speziellen Reagenzes hinzu. Dieses unterstützt die Lyse von Bakterienzellen und erzeugt zusätzlich ein Lumineszenzsignal, welches sich proportional zur vorhandenen ATP-Menge verhält, die wiederum in direkter Proportionalität zur Anzahl der Zellen in der Kultur steht. Das Lumineszenzsignal wird durch eine Luciferase-Reaktion hervorgerufen. Mit Hilfe der Standards lassen sich dann genaue Werte erheben.

## 6.7 Nachweis von Escherichia coli

Um die Quantität der Enterobacteriaceae E. coli genauer zu bestimmen, kann man ein miniaturisiertes MPN (Most Probable Number)-Verfahren in Mikrotiterplatten anwenden. Dafür wurden 1:2 und 1:20 Verdünnungen der Wasserproben in die Vertiefungen der Platte eingepflegt, welche ein getrocknetes Nährmedium enthalten. 2/3 der Mikrotiterplatten befüllte man mit der 1:2 Verdünnung, wohingegen sich im restlichen Drittel die 1:20 Verdünnung befand. Es wurde eine Mehrfachpipette verwendet, welche acht Vertiefungen gleichzeitig belud. Nach zwei-tägiger abgedunkelter Bebrütung konnte man die Platten unter UV-Licht auswerten, wobei das Vorkommen von E. coli durch Fluoreszenz angezeigt wurde.

## 6.8 Chemisch-physikalische Parameter

Erfasst wurden Wasserproben beider Seewoogteile, die man daraufhin auf die Parameter Temperatur, Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Eisen (Fe) und Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) prüfte.

Vorgehensweise:

Für diesen Versuch benötigte man Wasserproben sowie den JBL Proaquatest Lab Testkoffer. Es wurde ein Liter Wasser aus der Tiefe beider Seewoog-Bereiche mit Hilfe eines selbstgebauten Schöpfbechers entnommen. Nun vermischte man vorgegebene Mengen der Wasserproben mit den jeweiligen Reagenzien des Testkoffers, welche der Identifikation der oben genannten Parameter dienen. Die Farbe, welche die Probe anschließend angenommen hatte, verglich man mit der gegebenen Farbkarte. Die Intensität des Farbumschlages bestimmt die Höhe des jeweiligen Wertes. Um eine mögliche Veränderung der einzelnen Gehalte festzustellen, nahm man drei Wasserproben in verschiedenen Monaten und bei unterschiedlichen Wetterlagen. Mit Hilfe der erhaltenen Werte war es möglich Rückschlüsse auf eventuelle Verschmutzungen und Aktivitäten bestimmter Organismen zu ziehen, was wiederum von großer Bedeutung für die Bewertung der Wasserqualität des Seewooges ist.

## 7. Ergebnisse

### 7.1 Winogradsky Säulen

#### Erster Ansatz:

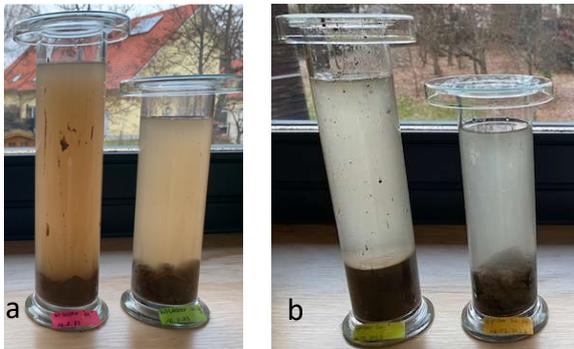


Abb.2 Ansatz der Winogradsky-Säulen (16.2.23), a Kleiner Seewoog, b Großer Seewoog

Das Bettvolumen der beiden Vergleichssäulen war sehr uneben, wobei sich der Schlamm beim Ansatz dicht auf dem Boden absetzte. Das Wasser in den Säulen des kleinen Seewooges war eher bräunlich, das des großen Seewooges eher milchig weiß.

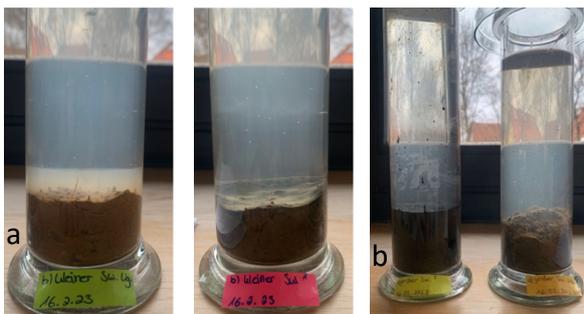


Abb.3 Winogradsky-Säulen (24.2.23), a Kleiner Seewoog, b Großer Seewoog

Der Boden des Ansatzes des kleinen Seewooges hat sich bräunlich gefärbt und ist oberhalb von einer schwärzeren, dichten Erdschicht bedeckt. Die Trübungen in allen Säulen haben sich weitestgehend gelegt, jedoch schwammen kleine Tiere im Wasser, die wir durch Mikroskopie als Ruderfußkrebse identifizieren konnten. In der Erde haben sich kleine Gänge gebildet. Außerdem wiesen die Säulen des Fischteichs eine ölige Schicht an der Oberfläche auf und der Boden hat sich schwarz verfärbt. Im Gegensatz zu der Vergleichssäule ist die Erde um einiges heller und weniger eben.



Abb.4 Winogradsky-Säulen (9.3.23), a Kleiner Seewoog, b Großer Seewoog

Der Boden des Ansatzes des kleinen Seewoogs hat sich wenig verändert, lediglich beim Wasser kann man deutliche Unterschiede in der Farbe festhalten. Dieses verfärbte sich zwischenzeitlich, vor allem an der Erdoberfläche, gelb. In der Vergleichssäule des großen Seewoogs fand eine grünliche Verfärbung statt und im Ansatz bestand weiterhin eine starke Verschmutzung. Die weißen Wassertierchen sind insgesamt überall etwas weniger geworden. Ansonsten glichen die weiteren Beobachtungen den Observationen der letzten Male.

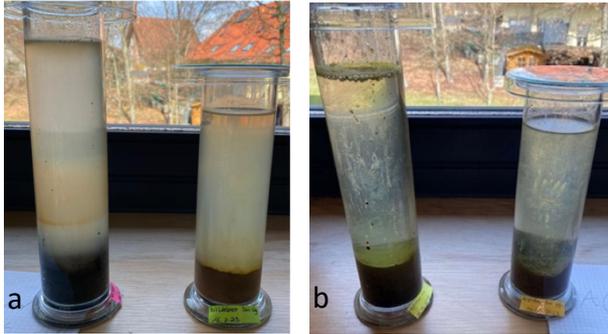


Abb.5 Winogradsky-Säulen (28.3.23), a Kleiner Seewoog (kl Sw), b Großer Seewoog (gr Sw)

Im Ansatz des kleinen Seewoogs bildete sich eine gelbe Schicht des Wassers und unter ihr zeigte sich nun eine eher milchig trübe Schicht. In Richtung Boden lief diese in eine klare Schicht über. In der Vergleichsprobe bildete sich eine gelbe Verfärbung über der Erde, die nach oben hin milchig trüb wurde. Im Ansatz des großen Seewoogs lag nun ebenfalls eine Grünfärbung vor, die vor allem die Bereiche über dem Boden sowie an der Oberfläche betraf. Auffällig waren überdies die Bläschen an der Oberfläche, die hier nur beim Ansatz erfasst werden konnten, wobei der grüne Schimmel auch in der Säule des Vergleichs vorhanden war.



Oberhalb des Bodens im Ansatz des kleinen Seewoogs hat sich eine deutlich klare Schicht gebildet, die in eine gelbe Schicht verläuft. Es folgt eine milchig weiße Schicht. Die Andeutungen der Untersuchungen der letzten Male haben sich bestätigt und weiterhin verdeutlicht. Die zuvor beschriebenen farblichen Erscheinungen wurden noch intensiver. Das Schlammbett war mittlerweile in allen Säulen sehr verdichtet und es waren kaum noch Tierchen zu verzeichnen.

Abb.6 Winogradsky-Säulen (11.4.23), kl Sw

## Zweiter Ansatz



Abb. 7 Winogradsky-Säulen (3.3.23), links: Ansatz kl Sw, Mitte: Kontrolle gr Sw, rechts: Ansatz gr Sw

Die Säulen wurden am 03.03.2023 hergestellt. Sieben Tage später haben sich auch hier die Trübungen vom Ansetzen weitestgehend aufgelöst und das Glas war bei allen Säulen sehr sauber. Schon bei der ersten Verzeichnung der Beobachtungen waren dieselben weißen Tiere, Ruderfußkrebse, zu erkennen, die auch beim ersten Ansatz gesichtet werden konnten. Bezüglich des Schlammbetts auf dem Boden der Säule konnte man hier deutlich weniger Unterschiede erkennen. Nach 25 Tagen wurde in diesem Fall bei allen Säulen ein Farbumschlag ins Grünliche verzeichnet.

Auffällig war die Gasbildung an der Wasseroberfläche, die nur bei der Vergleichssäule völlig ausblieb. Der Boden hatte vor allem auch bei den Ansätzen eine sehr dunkle Farbe angenommen. Dort haben sich jeweils sehr dicke grüne Streifen sowie besonders große Blasen an der Wasseroberfläche gebildet. In der Vergleichssäule entwickelten sich im Wasser grüne Fäden.

### 7.2 Koloniezahlbestimmung (3.03.23)

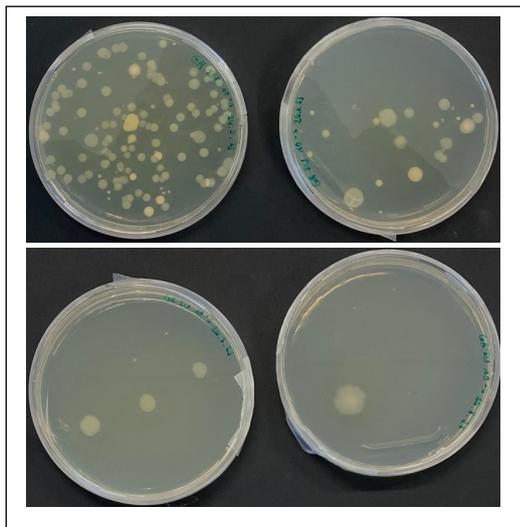


Abb. 8 Koloniezahlbestimmung großer Seewoog, Verdünnungsstufen von oben links nach unten rechts:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$

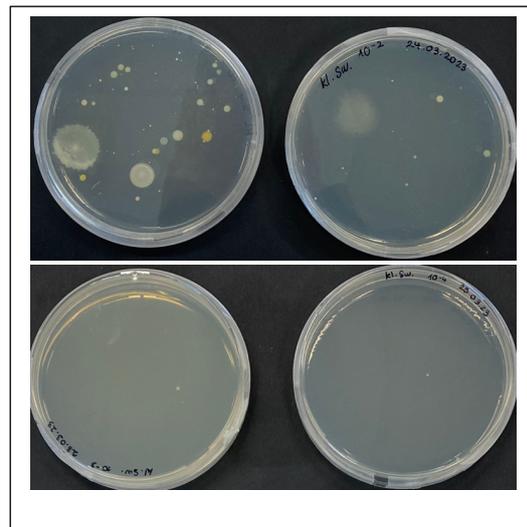


Abb. 9 Koloniezahlbestimmung kleiner Seewoog, Verdünnungsstufen von oben links nach unten rechts:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$

Aufgrund der Verdünnung haben sich bei der ersten Verdünnungsstufe die meisten Kolonien entwickelt, während die Anzahl pro höherer Stufe immer geringer wird. Es fällt deutlich auf, dass die Anzahl der Kolonien im großen Seewoog-Bereich vergleichsweise sehr hoch ist. Zählt man die Kolonien bei einer Verdünnung von  $10^{-2}$ , so sind ungefähr 23 auf der Platte vorhanden (-> 23000 Bakterien/ml), im Gegensatz zu ca. 9 im kleinen (-> 9000 Bakterien/ml). Viele Bakterienkolonien sehen im Vergleich zum kleinen Seewoog sehr uniform aus und weisen oft ähnliche Größen aus. Auffällig ist zudem ein unangenehmer Geruch, der von den Platten des große Seewoogs ausgeht. Beim Ansatz zum kleinen Seewoogbereich haben sich nach vier Tagen zahlreiche Bakterien unterschiedlichster Form, Größe und Farbe gebildet. Die Bakterienkulturen weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. Beispielsweise erkennt man bei der ersten Verdünnungsstufe eine gewellte Umrandung oder eine gelbe Verfärbung bei unterschiedlichen Kulturen.

### 7.3 Biochemische Tests zur Identifizierung von Bakterien (15.05.23)

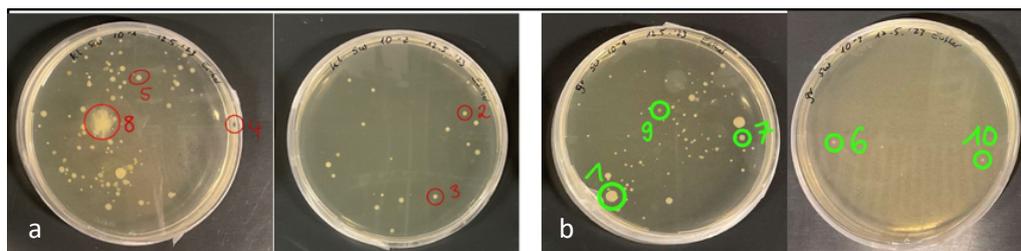


Abb. 10 a kleiner Seewoog, b großer Seewoog, Verdünnungsstufen links  $10^{-1}$ , rechts  $10^{-2}$

Medium	Bakterium 2	Bakterium 3	Bakterium 4	Bakterium 5	Bakterium 8	Medium	Bakterium 1	Bakterium 6	Bakterium 7	Bakterium 9	Bakterium 10
Vollmedium	/	/	/	/	Leichte Trübung	Vollmedium	Trübung	/	/	/	/
Acetamid	/	/	/	/	/	Acetamid	/	/	/	/	/
Laktose	/	/	/	/	Leichte Trübung	Laktose	/	/	/	/	/
Citrat	/	Trübung	Trübung	/	Trübung	Citrat	/	/	Trübung	/	/
McConkey	/	Wachstum	Wachstum	/	Wachstum	McConkey	/	/	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Brolacin	Wachstum	/	Wachstum	/	/	Brolacin	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Wachstum
Endo-Agar	/	Wachstum	/	/	Wachstum	Endo-Agar	/	/	Wachstum	/	Wachstum

Tab. 1 Biochemische Tests ausgewählter Kolonien: links kleiner Seewoog, rechts großer Seewoog

### 7.4 Flow Cytometrie (17.10.23)

a. Großer Seewoog:

b. Kleiner Seewoog:

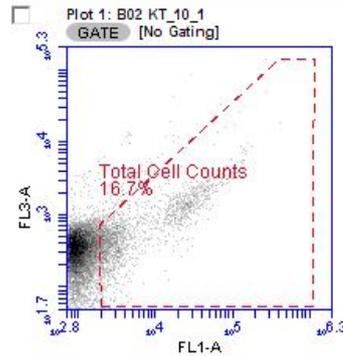
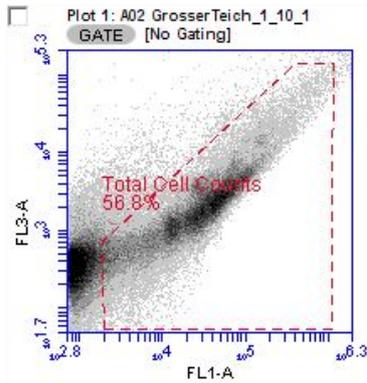


Abb. 11 a. Flow-Cytometrie, Total Cell Counts: 47833, b. Total Cell Counts: 1860

$47833 \times 5 = 239165 \rightarrow$  **2,391 Mrd. Bakterien/L** wurden in großen Seewoog gezählt, während es im kleinen Seewoog nur  $1860 \times 5 = 9300 \rightarrow$  **93 Mio. Bakterien/L** sind.

### 7.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion (17.10.23)

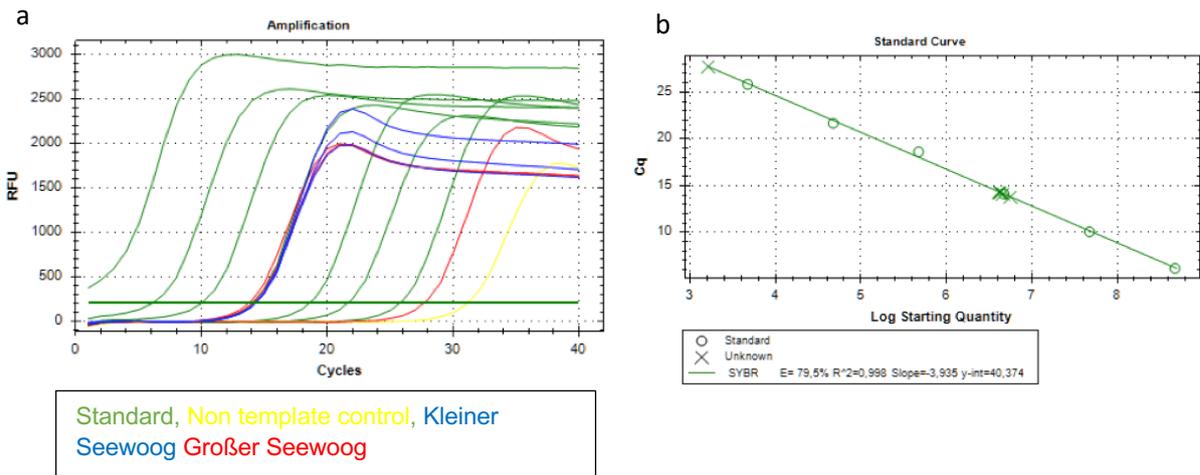


Abb. 12 qPCR-Messung: a. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (RFU) der PCR- Ansätze in Abhängigkeit von der Anzahl an PCR-Zyklen (max. 40). Gemessen wurden 7 Standardreaktionsansätze, 6 Proben von den Seewoogbereichen und ein Kontrollansatz ohne DNA (non-template). Als Schwellenwert wurde der Übergang zur logarithmischen Phase (grüne Linie) gewählt. b. Für die Erstellung der Standardkurve wurde die jeweilige Startkonzentration (Schwellenwert) der Proben gegen den Cq-Wert aufgetragen.

### 7.6 ATP-Messungen (17.10.23)

	1	2	3	4	5	6	Mittelwert
Standards	<b>2,89E+07</b>	<b>3,14E+06</b>	<b>3,86E+05</b>	<b>3,75E+04</b>	<b>1,33E+04</b>	<b>9,67E+03</b>	
Großer Seewoog	4,76E+05	5,03E+05					4,82E+ 0,5
Kleiner Seewoog	4,91E+04	2E+04					3,455E+04

Tab. 2 Messung der relativen Lumineszenz (RLU) [17]

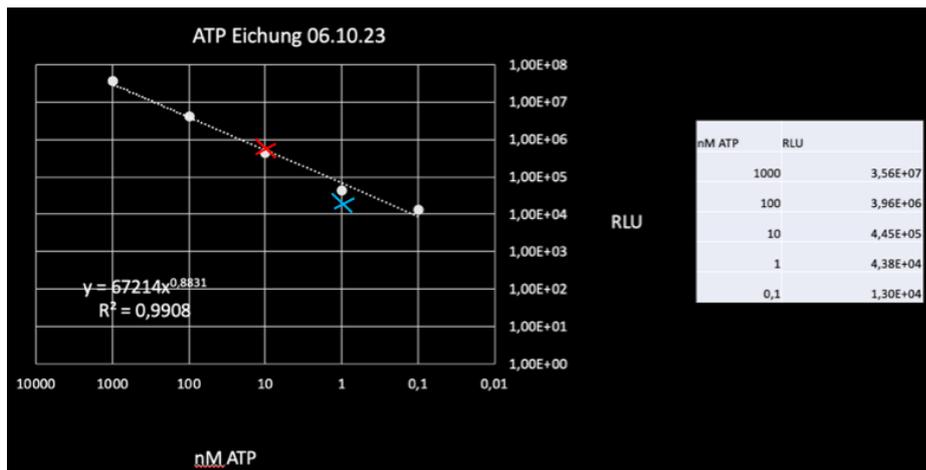


Abb. 13 Eichgerade zur Extinktion im Verhältnis zum ATP-Gehalt, rotes Kreuz: Mittelwert großer Seewoog, blaues Kreuz: Mittelwert kleiner Seewoog

### 7.7 Nachweis von Escherichia coli (17.10.23)

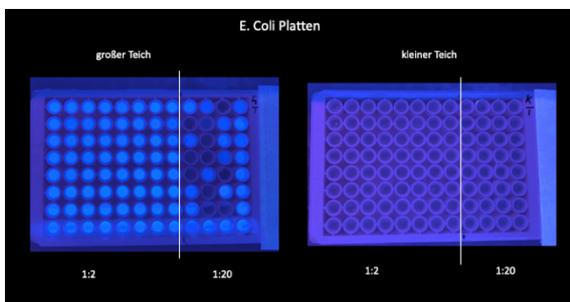


Abb. 14 Fluoreszierende Vertiefungen stehen für die Anwesenheit von E. coli Bakterien.

Laut Auswertungstabelle des Testherstellers befinden sich daher 10687 E.coli Bakterien in einem Liter Wasser aus dem großen Seewoog.

### 7.8 Chemisch-Physikalische Parameter

Bei bisherigen Versuchen einer Jugend Forscht Arbeit wurde bereits gezeigt, dass den chemisch-physikalischen Parametern sich teilweise unterscheiden. Einige chemisch-physikalische Parameter wurden hier nochmals überprüft, um auszuschließen, dass sich die Bedingungen in den beiden Seebereichen stark verändert hatten.

	Ammonium (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Eisen (mg/l)	Sauerstoff (mg/l)
3.03.23					
Großer Seewoog	0,05	0,025	0,5	0,02	7
Kleiner Seewoog	0,05	0,05	1	0,05	6,9
14.04.23					
Großer Seewoog	0,05	0,1	0,5	0,05	7
Kleiner Seewoog	0,05	0,1	1	0,05	6,5
17.10.23					
Großer Seewoog	0,05	0,05	1	Reagenz leer	8-10
Kleiner Seewoog	0,05	0,15	1	Reagenz leer	8-10

Tab. 3 Chemisch-physikalische Untersuchung der beiden Seewoogbereiche

## 8. Ergebnisdiskussion

### 8.1 Winogradsky-Säulen

Die Entwicklung der bakteriellen Lebensgemeinschaften in den Winogradsky-Säulen der beiden Seewoogbereiche unterschied sich deutlich.

Die schwarze Schicht, die in und über dem Boden erscheint, besteht aus Sulfat reduzierenden Bakterien. Klassische Beispiele für diese Gruppe sind *Desulfovibrio* oder *Desulfotomaculum*. Die Blasen im und am Boden bestehen aus Methan und werden wahrscheinlich von Methanogenen wie beispielsweise *Methanococcus* verursacht. Darüber erkennt man eine gelbe Schicht. Diese kann man den violetten Nicht-Schwefelbakterien, wie zum Beispiel *Rhodospirillum* oder *Rhodomicrobium* zuordnen. In der weißen milchigen Schicht finden sich die nichtphotosynthetischen Schwefeloxidatoren wieder. Ein Beispiel für diese Gruppe sind Bakterien der Gattung *Beggiatoa*. [3]

## 8.2 Koloniezahlbestimmung

Schaute man sich die verschiedenen Verdünnungen an, so war deutlich zu erkennen, dass beim großen Seewoog insgesamt mehr Bakterienwachstum stattfand, wobei auch viele Kolonien in ihrer Morphologie sehr ähnlich erschienen. Dies würde nun der Hypothese entsprechen, welche mit Hilfe von theoretischen Informationen formuliert wurden (siehe 3. Einleitung). Auch die Vielfalt des großen Bereichs fiel deutlich geringer aus, als es beim naturnahen Seewoog der Fall war (siehe Abb. 9). Bei diesem erkennt man deutlich mehr verschiedenen Formen, Größen und Farben, was ein Hinweis auf die Vielzahl der unterschiedlichen Bakterien in der Wasserprobe und somit auch im kleinen Seewoog ist.

## 8.3 Biochemische Tests zur Identifizierung von Bakterien

Über alle Bakterienkolonien der Platten des großen Seewoogs, außer eins und sechs, kann man sagen, dass sie gramnegativ sind, da sie auf MacConkey-Agar wachsen (siehe Tabelle 1, rechts). Da keine Farbveränderung vorliegt ist davon auszugehen, dass sie Laktose nicht verwerten (siehe Tabelle 1, rechts). Es könnte sich um *E. coli*, Citrobakter oder *Klebsiella* handeln, wobei auch das Vorkommen von Streptokokken oder Staphylococccen nicht ausgeschlossen werden kann. Da die Kolonien sieben und zehn auf Endo-Agar wachsen, sollte es sich hier um coliforme Keime handeln (siehe Tabelle 1, rechts). Beim kleinen Seewoog lässt sich über die Kolonien vier und fünf sagen, dass es sich um eine Kontamination handeln könnte. Die Trübung bei den Kolonien fünf und acht in der Lactose-Boullion würde auf coliforme Bakterien hinweisen, allerdings findet keine richtige Farbveränderung statt, weshalb eher eine Zuordnung zu den Hefen vorliegt. Bakterienkolonie zwei und drei wachsen nicht auf MacConkey Agar, weshalb beide grampositiv sein müssen. Die Bakterienkolonie 2 zeigt eine Farbänderung auf dem Brolacin Nährboden, welche durch ein saures Produkt zu Stande kommt. Dieses weist Mikroorganismen nach, die im Urin vorkommen. Bakterien der 3.Kolonie verursachen eine Trübung im Citrat Medium, was bedeutet, dass sie wahrscheinlich *E. coli* negativ und *Enterobacter* positiv sind. Entgegen unserer Erwartung sind bei dieser Untersuchung im kleinen Seewoog-Bereich mehr coliforme Bakterien nachzuweisen, als dies beim großen Bereich der Fall ist. Angesichts der Tatsache, dass in ersterem keine Fische vorhanden sind und Menschen sowie Hunden der Zugang verwehrt ist war dies eine unvorhergesehene Feststellung. An dieser Stelle muss jedoch ein Starkregenereignis angeführt werden, welches am Vortag der Probenentnahme stattfand. Dabei gelangten vermutlich äußere Einträge in den kleinen Teich, was zu einer sehr starken braunen Trübung des Wassers und dadurch vermutlich zur anschließenden Kontamination führte, wodurch sich die entsprechenden Ergebnisse erklären ließen.

## 8.4 Cytowflow

In dem dargestellten Diagramm in Abb. 11 sind nur die Zellen innerhalb des rot gestrichelten Fensters von Bedeutung. Alles, was außerhalb dessen zu erkennen ist, gehört zum Zelldebris, also den abgestorbenen Zellbestandteilen und ist somit nicht aussagekräftig für das Ergebnis. Um einen Vergleich beider Seewog-Bereiche zu ermöglichen, nimmt man die Total Cell Counts mal fünf und

rechnet sie dann auf einen Liter hoch. Tut man dies, so kommt man zu dem Ergebnis, dass im großen Seewoog mit 2,391 Mrd. Bakterien/L mindestens 25 mal mehr Bakterien mit dem Flow Cytometer gemessen werden konnten als im kleinen Seewoog mit 93 Mio. Bakterien/L, was unsere ursprüngliche Hypothese bestätigt.

### 8.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Dargestellt ist in Abb. 12 a die relative Fluoreszenzintensität (RFU) der PCR- Ansätze in Abhängigkeit von der Anzahl an PCR-Zyklen (max. 40). Gemessen wurden 7 Standardreaktionsansätze, 6 Proben von den Seewoogbereichen und ein Kontrollansatz ohne DNA (non-template). Als Schwellenwert wurde der Übergang zur logarithmischen Phase (grüne Linie) gewählt. Für die Erstellung der Standardkurve in Abb. 12 b. wurde die jeweilige Startkonzentration (Schwellenwert) der Proben gegen den Cq-Wert aufgetragen. Anhand der Standardkurve wurde vom Programm die jeweilige Kopienzahl des untersuchten Genabschnitts berechnet. Um nun die tatsächliche Anzahl der Kopien, die über die qPCR entstanden sind, zu berechnen, mussten noch die verschiedenen Verdünnungsschritte einbezogen werden (hier tabellarisch zusammengefasst):

	Großer Seewoog	Kleiner Seewoog	Umrechnungs-Faktor
Probenherstellung	500 ml	75 ml	gr Sw -> x 13,3 (Liter) kl Sw x 2 (Liter)
DNA-Extraktion	31,2 ng/ul	160,3 ng/ul : 5 = 32 ng/ul	x 5 gr SW
PCR-Template	20 ng/ul	20 ng/ul	x 0,66 beide
Kopienzahl	$4,6 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	

Gr Sw:  $5100000 \times 0,66 \times 5 \times 13,3 = 223.839.000 \rightarrow 223 \text{ Mio. Kopien/L}$

Kl Sw:  $4600000 \times 0,66 \times 2 = 6.072.000 \rightarrow 6 \text{ Mio. Kopien/L}$

Somit ergibt sich für den großen Seewoogbereich ein 37fach höherer Wert an über die qPCR erhaltenen Genkopien des DNA-Bereichs, der für die Region V6 innerhalb des 16SrRNA-Gens codiert und damit nachweist, dass es sich um Bakterien-DNA handelt. Man kann hiermit allerdings nicht direkt auf die Anzahl der in dem Bereich lebenden Bakterien eingehen, da z.B. auch abgestorbene Bakterien bzw. DNA, die von diesen stammt, durch diese Methode mitgezählt werden. Dennoch wird deutlich, dass sich im großen Seewoog eine wesentlich höhere Bakteriendichte feststellen lässt als im kleinen.

### 8.6 ATP-Messung

Dargestellt ist in Tab. 2 die ATP-Messung als Maß für die Aktivität der Bakterien in den jeweiligen Seewoogbereichen. Während Probe 1-6 die Standards darstellen, mit deren Hilfe eine Eichgerade erstellt werden kann, da die jeweilige ATP-Konzentration in nM hier bekannt ist, sind zusätzlich je zwei Messungen mit Proben aus dem großen bzw. dem kleinen Seewoogbereich sowie die sich daraus ergebenden Mittelwerte gezeigt. Dargestellt ist in Abb. 13 die relative Lumineszenz der Standards (Y-Achse) in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration an ATP in nM (X-Achse). Anhand der für die Standards gemessenen Werte konnte eine Eichgerade zur Ermittlung der ATP-Konzentration in nM erstellt werden. Für die beiden Mittelwerte der Proben aus den Seewoogbereichen konnte nun anhand der Eichgerade der durchschnittliche ATP-Gehalt berechnet

werden. Dabei gilt, dass je höher die relative Lumineszenz ist, desto höher ist der Gehalt an ATP und damit die bakterielle Aktivität. Um den durchschnittlichen ATP-Gehalt zu ermitteln, werden die gemessenen Werte in die Eichgerade eingetragen, die zuvor mithilfe der Standards erstellt worden war. Anhand der relativen Lumineszenz ergibt sich daher für den großen Seewoogbereich ein Mittelwert von 481600 (RLU), was einer Konzentration von 10 nM ATP entspricht. Beim kleinen Seewoogbereich ergibt sich ein Mittelwert von 34550 (RLU), der einer Konzentration von 1 nM ATP entspricht.

Der große Seewoogbereich weist somit einen um den Faktor 10 höheren ATP-Gehalt und damit eine höhere bakterielle Aktivität auf als der kleine Seewoogbereich.

### 8.7 Nachweis von E. coli

In Abb. 14 ist auf den E. coli Platten des kleinen Seewoogs keine Lumineszenz zu erkennen, was bedeutet, dass in diesem Fall dieser Bakterienstamm nicht nachgewiesen werden kann. Stattdessen leuchtete beim großen Seewoog jedoch jede einzelne Vertiefung, also 64 von 64 Wells und selbst bei der 1:20 Verdünnung ist dies auch noch bei 21 von 32 Wells, also über der Hälfte, der Fall. Insgesamt kommt man somit auf einen E. coli Wert von 10687 Bakterien pro 100 Milliliter. EU weit festgelegte Baderichtlinien besagen, dass ein Badegewässer mit unter 500 E. coli Bakterien pro 100 Milliliter einen ausgezeichneten Status besitzt. Auch, wenn der Seewoog selbst kein Badegewässer darstellt, so dient dieser Wert als eine grobe Referenz, um auszusagen, dass wir einen Wert von mehr als 20 Mal diesem Richtwert feststellen konnten. Dies ist ein Beweis dafür, dass durch die naturnahe Gestaltung des kleinen Seewoogs eine erhebliche Verbesserung der Wasserqualität bis zu dem gegebenen Zeitpunkt stattfand. Die hohe Anzahl an E. coli Bakterien lässt sich mit dem Vorkommen der Fische sowie auch den äußeren Einwirkungen erklären. Der große Bereich ist einer fäkalen Verunreinigung beispielsweise durch Hunde ausgesetzt.

### 8.8 Chemisch-physikalische Parameter

In Abb. 15 lässt sich erkennen, dass die beiden Seebereiche zum Zeitpunkt der Messung mit einer Sauerstoffkonzentration von 7mg/l im Grenzbereich liegen, da für Fischgewässer Werte ab bzw. über 8mg/l anzustreben sind. Die Sauerstoffproduktion hängt v.a. von der Lichtverfügbarkeit und dem Vorhandensein der Pflanzennährstoffe Stickstoff und Phosphat ab, denn dies benötigen Algen und Pflanzen, um Fotosynthese zu betreiben, so dass Sauerstoff entsteht. Verbraucht wird Sauerstoff von den im Gewässer lebenden Organismen, zu denen u.a. Fische, Amphibien- und Insektenlarven sowie andere Wirbellose zählen, als auch den Detritus abbauende Bakterien. Daher können niedrigere Sauerstoffkonzentrationen auf eine verringerte Fotosyntheseleistung oder einen erhöhten Verbrauch, z.B. aufgrund einer hohen Bakteriendichte zurückzuführen sein. Für ersteres spricht, dass es zum Zeitpunkt der Messung noch sehr winterlich kalt war. [21]

Laut den Fischgewässerrichtlinien [19, 20] sind jedoch v.a. die Nitrit-Werte auffällig, die im April erheblich über dem Richtwert von 0,1mg/l lagen, wobei insbesondere der kleine Seewoogbereich kritisch war, da hier bereits im März der Grenzwert von 0,03mg/l überschritten wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit den bereits in der vorangegangenen Untersuchung der Seewoogbereiche erhobenen Daten. Betrachtet man nun alle den Stickstoffgehalt betreffenden Werte (Nitrit, Nitrat, Ammonium), so ist der Nitratwert am höchsten. Dies ist jedoch normal, denn in unbelasteten bzw. sauerstoffhaltigen Gewässern sollte dieser Wert aufgrund der Umwandlung von Ammonium zu Nitrat auch am höchsten sein. Bei der Nitrifikation von stickstoffhaltigen Molekülen wie Harnstoff und Proteinen ist Stickstoff in Form von Nitrit ein Zwischenprodukt. Je höher der Eintrag von zum Beispiel

Harnstoff, desto höher ist normalerweise auch die Verstoffwechslung der Bakterien im Stickstoff-Phosphat-Kreislauf. Normalerweise ist dieses Zwischenprodukt sehr kurzlebig, jedoch kann eine Anreicherung dessen auch zustande kommen, wenn die Bakterien bei der Nitrifikation zum Beispiel durch toxische Einflüsse gestört sind. Bei zu hoher Konzentration ist dies schädlich für Fische aber auch Menschen.

## 9. Zusammenfassung

Gemäß unserer Hypothese, dass sich die naturnahe Gestaltung nicht nur positiv auf die Artenvielfalt auswirkt, sondern auch auf die Zusammensetzung und Dichte des Mikrobioms, waren die Ergebnisse der ersten Versuche zur Koloniezählung sowie die Unterschiede, die sich bei den Winogradsky-Säulen ergaben, bereits Hinweise auf eine derartige positive Auswirkung des Projekts.

Allerdings widersprachen die Ergebnisse der biochemischen Tests zur Identifizierung von Bakterien, die 2 Monate später durchgeführt wurden, diesen ersten Eindrücken deutlich.

Es fällt auf, dass man mehr coliforme Bakterien wie Enterobakterien dem kleinen Seewoog zuordnen kann, als dem großen Bereich des Sees. Dies widerspricht unserer vorherigen Überlegung, da auf Grund der naturnahen Gestaltung, bei der alle Fische in den großen Seewoog umgesiedelt wurden, durch einen Zaun auch das Baden von Hunden im kleinen Bereich nicht mehr möglich ist. Daher sollten sich somit eigentlich weniger Fäkalien im kleinen Bereich befinden.

Enterobakterien sind gramnegative, meist stäbchenförmige Bakterien, zu denen typische Darmkeime wie *Escherichia coli*, *Klebsiellen* und *Proteus* gehören. Als Bakterien der Darmflora gelangen sie durch Ausscheidungen von Lebewesen ins Wasser. Zusätzlich können sie aber auch durch Oberflächendüngung von umliegenden Feldern oder Kontamination durch Fäkalien in den Seewoog gelangen. [3, 9] Auch der Nitrit-Wert ist im kleinen Seewoog höher als im Großen, was widersprüchlich zu der Fischumsiedlung in den großen Bereich ist.

Somit lassen sich zwar Unterschiede zwischen den beiden Seewoogteilen feststellen, jedoch war die mikrobielle Zusammensetzung zum Zeitpunkt dieser Beprobung anders als erwartet. Trotz der Maßnahmen, die ergriffen wurden zum Schutz der Artenvielfalt, fanden wir coliforme Bakterien in diesem Bereich. Ein möglicher Grund für diesen Zustand könnte der Starkregen am Vortag der Wasserentnahme gewesen sein. Bereits zu diesem Zeitpunkt, fiel uns die braune Trübung des kleinen Seewoogs auf. Unsere Vermutung ist, dass durch den Regen und die vorherige Düngung der umliegenden Felder viel Kontamination in den kleinen Bereich des Seewoogs gelangte. Die Kontamination durch Düngung ist der plausibelste Grund, weshalb der Nitrit- Wert und die Konzentration der coliformen Bakterien so hoch ist.

Durch eine weitere Entnahme einer Wasserprobe nach weiteren 5 Monaten und zusätzliche Versuche bestätigte sich diese Vermutung. Bei dem Versuch zum Nachweis von *E. Coli* zeigte sich, dass im Gegensatz zum großen Seewoog, keine dieser Bakterien im kleinen Seewoog Bereich vorhanden sind. Auch ein erneutes Durchführen dieses Versuches verfestigte die Annahme. Zudem konnten wir feststellen, dass der große Seewoogbereich eine weitaus höhere Bakteriendichte pro Liter aufweist als der kleine Bereich. Es ist zu vermuten, dass die erhöhte Bakteriendichte im großen Seewoog mit einer deutlich höheren Nährstoffverfügbarkeit zusammenhängt, da die als Destruenten fungierenden Bakterien abgestorbene Tier- und Pflanzenteile sowie Algen abbauen. Dies ist u.a. im Hinblick auf den Sauerstoffverbrauch im Wasserkörper von Bedeutung, denn viele dieser Destruenten verbrauchen für ihren Stoffwechsel Sauerstoff. Ist der Verbrauch jedoch zu hoch, entstehen anaerobe Verhältnisse, unter denen v.a. anaerobe Bakterien den Detritus abbauen. Hierbei entstehen u.a. giftige

Stoffwechselprodukte wie z.B.  $H_2S$ , die für Organismen wie Fische, aber auch Insekten- und Amphibienlarven schädlich sind. [3, 2]

Insgesamt betrachtet bestätigt sich unsere Hypothese und man kann durchaus sagen, dass die Maßnahmen, die ergriffen wurden, um einen naturnahen Bereich zu gestalten, nicht nur die Artenvielfalt von Insekten und Amphibien sowie Vögeln und Reptilien fördert, sondern auch die mikrobielle Vielfalt und -dichte und somit die Gewässerqualität fördert. Die Versuchsergebnisse der zweiten Untersuchung lassen sich daher vermutlich auf eine Kontamination durch Oberflächeneintrag (Düngung) infolge des Starkregens zurückführen, was die Zusammensetzung der Bakterien sehr stark beeinflusst und sich negativ auf die Wasserqualität des kleinen Seewoogbereichs ausgewirkt hat.

## 10. Literaturverzeichnis

- [1] <https://de.wikipedia.org/wiki/Mikrobiom> (Stand: 29.05.2023)
- [2] Baron, Diethard / Braun, Jürgen / Erdmann, Andrea / Erdmann, Ulf/Hansen, Sabine /Hansen, Thomas / Heinze, Rudolf/Hörnemann, Anja / Lucius, Eckhard R., Genetik: Grüne Reihe. Materialien SII, Braunschweig 2012
- [3] Madigan M. et.al., Brock, Mikrobiologie Kompakt, 13. Auflage, Hallbergmoos 2015
- [4] Prof. Dr. Knodel H., Linder Biologie, Schroedel, 23. Auflage, Braunschweig 2010
- [5] [https://de.wikipedia.org/wiki/Sergei\\_Nikolajewitsch\\_Winogradski](https://de.wikipedia.org/wiki/Sergei_Nikolajewitsch_Winogradski) (Stand: 30.05.2023)
- [6] Telgmann G., Die Winogradsky-Säule, Modellversuch zur Mikrobiologie, in: Biologie in unserer Zeit von 2003, S. 318 – 323
- [7] Steinbüchel A. et.al., Mikrobiologisches Praktikum, Versuche und Theorie, S.93 - 98, 2013
- [8] [https://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/dv01/1\\_10.htm](https://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/dv01/1_10.htm)
- [9] Klee O., Wasser untersuchen, Einfache Analysemethoden und Beurteilungskriterien, 3. Auflage, 1998
- [10] <https://flexikon.doccheck.com/de/Endo-Agar> (Stand: 01.06.2023)
- [11] <https://de.wikipedia.org/wiki/Chinablau-Lactose-Agar> (Stand: 01.06.2023)
- [12] <https://flexikon.doccheck.com/de/MacConkey-Agar> (Stand: 01.06.2023)
- [13] <https://de.wikipedia.org/wiki/Acetamid> (Stand: 01.06.2023)
- [14] <https://flexikon.doccheck.com/de/Enterobacteriaceae> (Stand: 01.06.2023)
- [15] <https://de.wikipedia.org/wiki/Durchflusszytometrie> (Stand: 17.010.2023)
- [16] [https://de.wikipedia.org/wiki/Real\\_Time\\_Quantitative\\_PCR](https://de.wikipedia.org/wiki/Real_Time_Quantitative_PCR) (Stand: 17.010.2023)
- [17] [https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/bactiter-glo-microbial-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=0ce55f402f4f418eb2862911968f6022&sc\\_lang=en](https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/bactiter-glo-microbial-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=0ce55f402f4f418eb2862911968f6022&sc_lang=en)
- [18] Alexander, Steve K., Mikrobiologisches Grundpraktikum. Ein Farbatlas, Pearson 2006
- [19] Das europäische Parlament Rat der Europäischen Union (2006): „Richtlinie 2006/44/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom September 2006 über die Qualität von Süßwasser, das schutz- oder verbesserungsbedürftig ist, um das Leben von Fischen zu erhalten“. URL: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:264:0020:0031:DE:PDF>
- [20] Abwasser Analysezentrum: Nitrit-Stickstoff im Abwasser Url: <https://www.abwasser-analysezentrum.de/parameteruebersicht/nitrit-stickstoff>
- [21] <https://www.biologie-schule.de/oekosystem-see-eutrophierung.php> (Stand: 02.06.2023)

