Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bakterienflora und Bestimmung ihrer heterotrophen Aktiviät in organisch belastetem und unbelastetem Grundwasser sandig-kiesiger Ablagerungen

Jürgen Marxsen*

SUMMARY

Bacteriological investigations were carried out in the groundwater of sandy and gravelly deposits of the river Fulda valley in an area named «Johannesaue» near the town Fulda (Hesse, Fed. Rep. of Germany). In January 1979 water samples were collected from 16 pumping tubes distributed in organically polluted and unpolluted areas (see Figs. 2 - 4).

For characterizing the bacterial populations, methods used for surface waters were modified and, as far as the author is aware, these methods were used for the first time for investigations pertaining subterranean waters. The bacteria were counted by means of epifluorescence microscopy after staining the bacteria with the fluorochrome acridine orange. This technique renders possible the simultaneous registration of shape and size of bacteria. Parameters characterizing the heterotrophic bacterial activity were measured with ^{14}C-labelled glucose. The number of bacteria in the groundwater collected through pumping tubes, varied from 1.4 to 11.3 million bacteria per ml (see Table 2, Fig. 6). The relative glucose uptake potential v_r, which was measured at one substrate concentration (600 µg glucose $\cdot l^{-1}$) where the maximum uptake velocity is almost reached (see Fig. 5), was 0.12 - 0.74 µg glucose $l^{-1} \cdot h^{-1}$ (see table 2, Fig. 9). The corresponding specific potential was 0.02-0.18 µg glucose $\cdot h^{-1} \cdot cell^{-1}$ (see Table 2, Fig. 10). The results agreed with the values of maximum uptake velocity V_{max} which was measured at the same time in some of the groundwater samples (see Table 3).

The data give first information about distribution of the number of bacteria and of heterotrophic bacterial activity in the groundwater of the investigation area. Relationships could be shown between the bacteriological parameters (Figs. 6 - 10) on the one hand and the concentration of oxygen (Fig. 3) and the values of COD measured with $KMnO_4$ (Fig. 4) on the other hand.

*Limnologische Flussstation des Max-Planck-Institute für Limnologie, D-6407 Schlitz (Hessen), Fed. Rep. of Germany.

1. EINLEITUNG

Grundasserworkommen in sandig-kiesigen Ablagerungen sind für die Versorgung der Bevölkerung mit Trinkwasser von grosser Bedeutung. Porige Grundwasserleiter liefern den grössten Teil des Grund - und Quellwassers, das 1975 71,5% der Förderung der grossen Kommunalen Wasserwerke der Bundesrepublic Deutschland ausmachte, wie aus der Statistik des Bundes der deutschen Gas - und asserwirtschaft (BGW) ersichtlich ist (nach Matthess, 1979).

Viele Grundwasservorkommen sind durch anthropogene Verunreinigungen meist organischer Art belastet. Trotz der hohen Selbstreinigungskapazität poriger Grundwasserleiter können sich dadurch sowohl direkte Beeinträchtigungen und Gefährdungen der Trinkwasserversorgung ergeben als auch die Nutzung von potentiellen Wassergewinnungsgebieten bei zukünftig steigendem Bedarf in Frage gestellt werden. Daher ist die Kenntnis der Vorgänge bei der Eliminierung von Verunreinigungen durch übermässige Zufuhr von organischen Stoffen sowie bei der Herstellung und Erhaltung natürlicher bzw. Naturnaher Verhältnisse im Grundwasser sandig-kiesiger Ablagerungen nicht nur von theoretischem Interesse sondern auch von grosser praktischer Bedeutung.

Die Reinigungsmechanismen bei der Passage von organisch verunreinigtem Wasser durch porige Grundwasserleiter sind vielfältiger Art (Matthess, 1973, Schmidt, 1977). Neben physikalischen und chemischen Prozessen sind biologische Abbauleistungen von besonderer Bedeutung (Golwer et al., 1970, Husmann, 1974/75, 1978, Schwille, 1977). Im Zusammenspiel vor allem von Bakterien, Pilzen, Protozoen und der Mehrzellerfauna erfolgt die allmähliche Mineralisierung der infiltrierten Stoffe, deren einzelne Schritte sowie deren wechselseitige Wirkungen zu einem grossen Teil noch nicht bekannt sind (Husmann, 1978).

In den letzen Jahren sind für die bakteriologische Untersuchung von Oberflächengewässern wesentlich verbesserte Methoden zur Erfassung der Bakterienzahlen und der heterotrophen bakteriellen Aktivität entwickelt worden. Grundwasseruntersuchungen unter Verwendung dieser Verfahren sind bisher nicht bekannt geworden.

Eine auflichtfluoreszenmikroskopische Methode unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange zur Ermittlung der Bakterienzahl, die auf Strugger (1949) zurückgeht, ist in den letzen Jahren in zahlreichen Gewässern erfolgreich angewendet worden, z. B. in Seen von Jones (1974), Daley &

Hobbie (1975), Overbeck (persönl. Mitt.), in Seesedimenten von Bührer (1977), in Flüssen von Rheinheimer (1977, a, b), Goulder (1980), in Aestuaren von Daley & Hobbie (1975), Goulder (1976, 1977), Bowden (1977), Rheinheimer (1977, a, b), Wright (1978), im Meer von Zimmermann & Meyer-Reil (1974), Watson et al. (1977), Wright (1978). Bisherige Ermittlungen von Gesamtbakterienzahlen des Grundwassers im Rahmen ökologischer Fragestellungen erfolgten durch Bestimmung von «Keimzahlen» (z.B. Wolters & Schwartz, 1956, Farkasdi et al., 1969, Golwer et al., 1972, Mestrov & Lattinger-Penko, 1977/78). Dabei ist zu berücksichtigen, dass so nur ein Teil, meist sogar nur ein kleiner Teil, der Bakterien erfasst wird (vgl. z.B. Jannasch & Jones, 1959, Kusnezow, 1959, Daubner, 1972, Straskrabova, 1973, Overbeck, 1973, Reichardt, 1978).

Heterotrophe bakterielle Aktivitäten können mittels ^{14}C-markierter organischer Substanzen ermittelt werden, wobei man für die verwendete Substanz, je nach spezieller Anwendungsform der Methodik, einen oder mehrere der folgenden Parameter erhält: tatsächliche Aufnahmegeschwindigkeit, Umsatzzeit, Aufnahmepotential, relatives Aufnahmepotential, Affinität der Population zum Substrat. Auch diese Methode hat in verschiedenen Oberflächengewässern zu besseren Kenntnissen der bakteriellen Stoffumsetzungen geführt. Als Beispiele seien genannt Untersuchungen von Seen: Wright & Hobbie (1965, a, b, 1966), Allen (1969), Overbeck (1975), von Seesedimenten: Blauw (1978), von Flüssen: Düsing (1973), Marxsen (1976, 1980), Goulder (1980), von Aestuaren: Crawford et al. (1974), Wright (1976), Goulder (1976, 1977), in Meeren: Seki et al. (1974), Gocke (1975), Wright (1978).

Die beiden Methoden wurden erstmals, soweit bekannt, zur Untersuchung von Bakterien im Grundwasser sandig-kiesiger Ablagerungen genutzt. Die Arbeiten wurden innerhalb des von Husmann geplanten und in Angriff genommenen Projektes «Das ökologische Gleichgewicht im Grundwasser und seine Störung durch infiltrierende Substanzen» (Husmann, 1974/75, 1978) ausgeführt. Sie sollen die bisher berücksichtigten ökologischen Gegebenheiten (hydrologische, physikalische und chemiche Parameter, Substratbeschaffenheit, Metazoenfauna) ergänzen und damit die Grundlage für gesamtökologische Schlussfolgerungen im Rahmen dieses von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Vorhabens wesentlich erweitern. Nachdem zunächst die vertikale Verteilung mehrzelliger Organismen und chemischer Substanzen im Vordergrund der Grundwasseruntersuchungen stand wurden nun zusätzlich die entsprechenden stygoökologischen Gegebenheiten in ihrer horizontalen Ausdehnung erfasst. Hierzu diente ein bereits vorhandenes Grundwasserspiegel-Kontrollsystem von Peilrohren im

anschliessenden Talauenbereich. Das aus diesen Peilrohren zutage geförderte Grundwasser liess erkennen, dass der zusätzlich erfasste Untergrund von einem mit organischen Substanzen belasteten Grundwasserstrom durchflossen wird. Die sich damit ergebende Möglichkeit zur Untersuchung subterraner abwasserbiologischer Vorgänge führte, im Hinblick auf die immer bedeutsamer werdenden trinkwasser-hygienischen Fragestellungen, zu einer Verlegung des Schwergewichtes der Arbeiten. Erste Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen, die sich bei der Bearbeitung einer im Januar 1979 entnommenen Probenserie aus diesem neu erfassten Untersuchungsgebiet ergaben, werden hier vorgelegt.

2. UNTERSUCHUNGSGEBIET JOHANNESAUE BEI FULDA

Das Untersuchungsgebiet Johannesaue ist am Rande der Stadt Fulda im Tal des hier von Süden nach Norden fliessenden Flusses Fulda gelegen. Die Fulda bildet auch den Ostrand des Gebietes, das im Westen von Hängen begrenzt wird, die vorwiegend mit Löss und Lösslehm bedeckt sind, worunter sich Buntysandstein-, Muschelkal-, und Keuperyschichten befinden. Im Norden und Süden setzt sich die Fulda-Talaue fort, die in den oberen Schichten aus alluvialem Auelehm mit Kies und Sand besteht. Eine geomorphologische Uebersicht gibt Abb. 1, eine geologische Uebersichtskarte enthält Husmann (1974/75).

Die zur Wasserentnahme genutzten eisernen Peilrohre (Innendurchmesser: 51 mm) wurden 1963 erstellt. Sie bestehen jeweils am unteren Ende aus einem 0,5 m langen Sumpfrohr, darüber folgt ein perforierter Rohrabschnitt. Der obere Teil des Rohres von 0,5 m unter Flur bis über der Bodenoberfläche ist wieder geschlossen. Im perforierten Bereich wurden die Rohre mit einer Kiesschüttung umgeben. Für die hier beschriebenen bakteriologischen Untersuchungen wurden Proben aus insgesamt 16 noch voll intakten Rohren entnommen (zu deren Lage s. Abb. 2), in weiteren 4 intakten Rohren war der Wasserstand für eine Entnahme zu niedrig.

Die Rohre erreichen eine Tiefe von 3,0 m bis 6,3 m unter Flur. Sie enden mit wenigen Ausnahmen in Tonschichten des oberen Buntsandsteins, die das obere Grundwasserstockwerk von dem darunterliegenden trennen. Ueber der Tonschicht befinden sich Ablagerungen der Fulda von sandigem Kies in einer Mächtigkeit von 1,6 m bis 3,3 m, darüber schluffig-tonig-feinsandige Deckschichten mit einer Mächtigkeit von 0,4 m bis 4,0 m. Bei den Bohrungen für die Peilrohre 24, 28, 31, 32 wurde unter der Auelehmdecke zunächst 0,3 m bis 1,0 m schluffiger Sand angetroffen, darunter erst sandiger Kies. Im Bereich der Rohre 10,

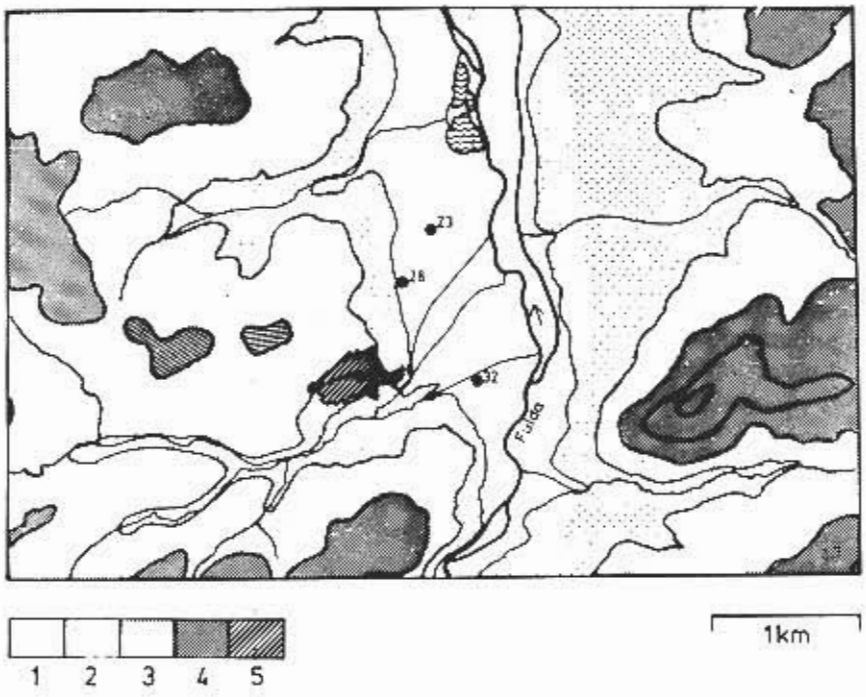

Abb. 1. Geomorphologische Uebersicht. Die Ausdehnung des untersuchten Gebietes ist durch die Einzeichnung der am weitesten im Norden (PR 23), im Westen (PR 28) und im Süden (PR 32) gelegenen Peilrohe kenntlich gemacht. Zum Vergleich s. Abb. 2.
1: Höhenlage unter 260 m über NN, 2:260 . 280 m, 3: 280 - 300 m, 4: über 300 m, 5: Ortschaft Johannesberg.

11, 12, 13 werden die sandig-kiesigen Ablagerungen nicht von Ton sondern von plattigem Sandstein unterlagert. In diesem Bereich gelangt Wasser aun dem oberen Grundwasser-stockwerk in das darunter geleygene. Die Angaben zur Geologie des Untersuchungsgebietes erfolgen nach Preul (1964). Eine genaue Darstellung der Schichtenfolge des Untergrundes bei PR 26 gibt Husmann (1974/75).

In Abb. 2 sind die Linien gleichen Grundwasserstandes von Januar 1979 eingezeichnet. Daraus ergibt sich, unter ergänzender Heranziehung der Abb. 1 (Geomorphologie), die Annahme, dass im südlichen Teil des untersuchungsgebietes ein Zustrom von Grundwasser aus dem westlichen Seitental in das Fuldatal erfolgt. Weiter nördlich ist die Strömung dagegen meist deutlich etwa parallel zur Fulda ausgerichtet, abgesehen von den Bereichen um die Peilrohre 10, 11, 12, 13, wo sich die fehlende Tonschicht zwischen dem oberen und dem unteren Grundwas-

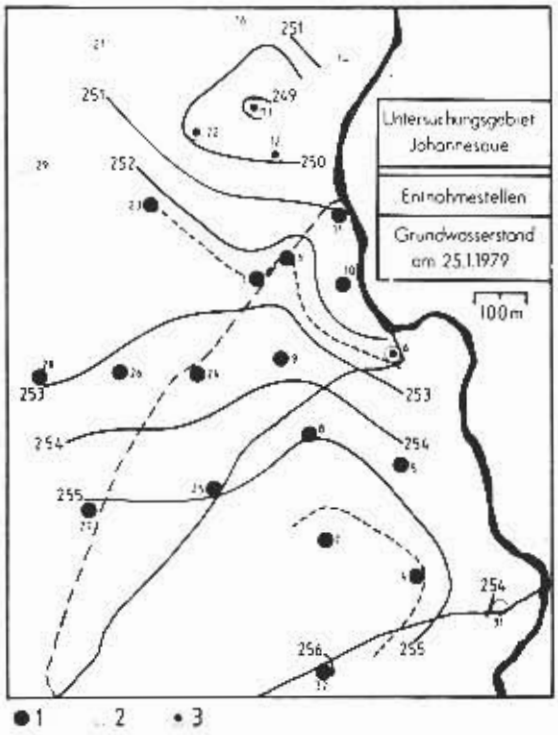

Abb. 2. Grundwasserspiegel zu NN am 25.1.1979 und Lage der Untersuchungsstellen (Peilrohre) in der Johannesaue. Die kleinen Zahlen geben die Nummern der Peilrohre an. Die grossen Zahlen kennzeichnen Linien gleichen Grundwasserstandes (m über NN), jeweils mit der Höhendifferenz von 1,00 m. Die stellenweise eingezeichneten unterbrochenen Linien entsprechen einem Höhenunterschied von 0,50 m zu den durchgezogenen Linien. Das Grundwasser strömt senkrecht zu den Linien gleichen Wasserstandes.

Im Osten begrenzt die Fulda das Untersuchungsgebiet. Von Südwesten her fliessen 3 kleine Arme eines Bachès der Fulda zu. Das Bett des nördlichsten ist die meiste Zeit des Jahres trocken (durch Unterbrechungen gekennzeichnet).

1: Peilrohre, aus denen regelmässig Proben entnommen werden. 2: Peilrohre, die nicht in die bakteriologischen Untersuchungen einbezogen sind. 3: Peilrohre, die in die bakteriologischen Untersuchungen einbezogen sind, aus denen aber wegen zu niedrigen Wasserstandes im Januar 1979 keine Proben entnommen werden konnten.

ser-stockwerk auf Wasserstand und Strömungsrichtung auswirkt.

Die chemischen Parameter Sauerstoffkonzentration und Kaliumpermanganatverbrauch, als Mass für die gelösten organischen Substanzen, sind in den Abb. 3 und 4 in ihrer flächenhaften Verteilung dargestellt. Die Bestimmung des gelösten

Tab. 1. Chemische und physikalische Parameter von ausgewählten Peilrohren und der Fulda bei PR 6.

	PR 3	PR 25	PR 26	PR 28	Fulda
Temperatur (°C)	4,3	8,0	8,1	7,3	1,7
Leitfähigkeit ($\mu S_{20} \cdot cm^{-1}$)	334	346	415	370	461
pH	6,94	6,71	6,96	6,77	7,47
Säurebindungsvermögen ($mval \cdot l^{-1}$)	2,2	3,2	2,9	2,3	1,5
Chlorid ($mg \cdot l^{-1}$)	37	31	40	40	118
Sauerstoff ($mg\ O_2 \cdot l^{-1}$)	2,4	0,7	3,3	7,4	-
$KMnO_4$-Verbrauch ($mg\ O_2 \cdot l^{-1}$)	1,8	2,5	0,4	0,2	2,3
Phosphat ($mg\ P \cdot l^{-1}$)	0,08	0,02	0,03	0,04	0,35
Nitrat ($mg\ N \cdot l^{-1}$)	3,54	0,34	2,50	7,07	3,70
Nitrit ($\mu g\ N \cdot l^{-1}$)	9	9	Sp.	3	56
Ammonium ($mg\ N \cdot l^{-1}$)	0,06	0,39	0,03	0,05	1,50

molekularen Sauerstoffs erfolgte nach dem Winkler-Verfahren, die Entnahmetechnik ist bei Husmann (1974/75) ausführlich dargestellt. Zur Bestimmung des $KMnO_4$ - Verbrauches und zu den Analysenmethoden der ausserdem in Tab. 1 genannten chemischen Parameter siehe Brehm (1975).

Die Verteilung der O_2 - Konzentration zeigt deutlich die horizontale Ausdehnung der Verunreinigungszone. In vorhergehenden Untersuchungen (1977 und 1978) konnte zeitweise in Peilrohren im mittleren Bereich des belasteten Grundwasserstromes bis hin zu PR 9 kein Sauerstoff nachgewiesen werden. Die Verteilung der Werte des $KMnO_4$ - Verbrauches zeigt deutliche Parallelen zu den Sauerstoffwerten, mit Ausnahme des Bereiches um die Rohre 1 und 3. Trotz erhöhter Mengen an gelöster organischer Substanz wurde dort ein ununterbrochenes Ansteigen des Sauerstoffgehaltes registriert.

Möglicherweise erfolgt die Infiltration der Verunreinigungssubstanzen nicht kontinuierlich, so dass mit mehr oder weniger stossartigen Belastungen gerechnet werden muss. Das legten auch schon die chemischen Befunde der zurückliegenden Entnahmen nahe. Die Substanzen um die Rohre 1 und 3 könnten dann die Reste einer bereits weitgehend abgebauten Verunreinigung sein, von der vor allem noch biologisch schwer abbaubare Stoffe zurückgeblieben sind, die keinen erhöhten Sauerstoffverbrauch bewirken. Zudem wäre ein Ausgleich des möglicherweise erhöhtet Sauerstoffverbrauches durch gesteigerte Sauerstoffzufuhr infolge des stärkeren Gefälles in diesem bereich gegeben (vgl. Abb. 2).

Die relativ niedrigen Werte des $KMnO_4$ - Verbrauches am Beginn der Erfassung des verunreinigten Grundwasserstromes

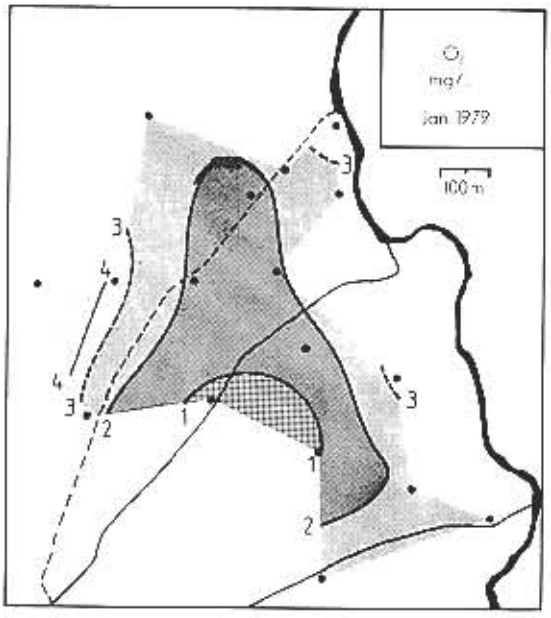

Abb. 3 Sauerstoffgehalt des Grundwassers im Untersuchungsgebiet in der Johannesaue (mg $O_2 \cdot l^{-1}$), dargestellt mit Hilfe von Linien gleicher Konzentrationen. Die in die Untersuchung einbezogenen Peilrohre sind mit einem Punkt markiert. Vgl. Abb. 2.

(bei PR 25 2,5 mg 0_2 - Verbrauch/l) zeigen an, dass der Abbauprozess bereits dort recht weit fortgeschritten ist.

Weitere chemische Parameter von einigen Peilrohren und von der Fulda in der Nähe von PR 6 sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Ausgangsort der Verunreinigung ist wahrscheinlich ein Dorf, as etwa 400 m vom nächstgelegenen Peilrohr entfernt in südwestlicher Richtung gelegen ist (vgl. Abb. 1).

3. METHODIK

a. Entnahme der Proben

Die Probenentnahme für meiofaunistische, chemische und bakteriologische Untersuchungen erfolgte an einem Peilrohr jeweils unmittelbar nacheinander.

Nach Entfernen der Schutzkappe des Rohres wurde zunächst der Wasserstand registriert. Danach wurde mit einer auf das Rohr aufgeschraubten Membranpumpe 50 l Wasser für meio-

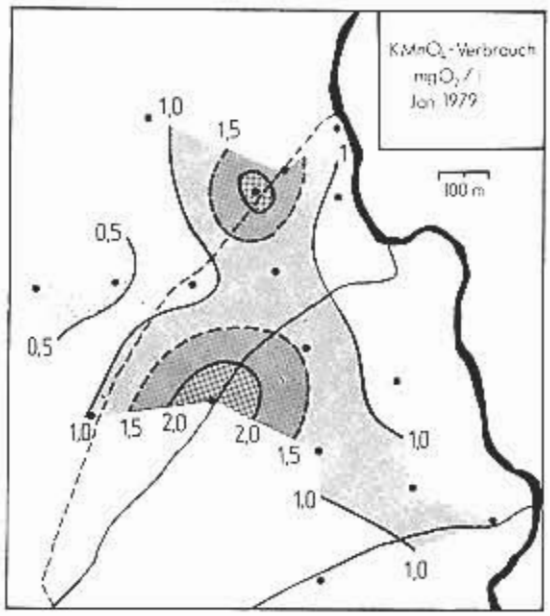

Abb. 4. Chemischer Sauerstoffbedarf (Kaliumpermanganatverbrauch, mg $O_2 \cdot l^{-1}$) des Grundwassers im Untersuchungsgebiet in der Johannesaue. Vgl. Abb. 2 und 3

faunistische Untersuchungen gefördert. In den letzten entnommenen 10 l Wasser wurde die Temperatur gemessen. Anschliessend wurde zur Entnahme der Proben für die chemischen Analysen ein Silikonschlauch (innerer Durchmesser 5 mm) bis in eine Tiefe von 1 m über dem Rohrende hinabgelassen. Die Proben wurden also 0,5 m oberhalb des Beginns der Rohrperforation entnommen. Zur Förderung der chemischen und bakteriologischen Proben wurde eine Schlauchpumpe benutzt. Zunächst wurde unter Verwendung eines Zellstoffilters eine Sauerstoffprobe blasenfrei entnommen, anschliessend in gleicher Weise 250 ml Wasser für die Untersuchung von pH, Leitfähigkeit, Säurebindungsvermögen und Chlorid. 250 ml Probe für die Ermittlung von Phosphat, $KMnO_4$ - Verbrauch, Nitrat, Nitrit und Ammonium wurden ohne Zellstoffilter in sonst gleicher Weise entnommen. Eine ausführliche Darstellung der hier nur kurz beschriebenen Methodik zur Entnahme von meiofaunistischen und chemischen Proben gibt Husmann (1974/75).

Das Material für die bakteriologischen Untersuchungen wurde im Prinzip so wie die chemischen Proben entnommen (selbstverständlich ohne Verwendung eines Filters). Je nach Bedarf wurde 0,4 l bis 1,0 l Grundwasser in sterile Flaschen abgefüllt.

Davon wurden 100 ml für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung sofort mit frisch filtriertem Formol fixiert (Endkonzentration in der Probe: 2%).

Ein grosses Problem ist der Rückschluss von der aus einem Peilrohr entnommenen Probe auf die tatsächliche Bakterienpopulation im benachbarten Untergrund. Durch die am Anfang der Entnahme erfolgte Förderung einer grösseren Wassermenge für faunistische Untersuchungen ist die Gefahr, dass man eine spezielle Bakterienflora Peilrohr erhält, sicherlich erheblich reduziert. So wird angenommen, dass die Zuzammensetzung der Bakterienpopulationen der entnommenen Probe der der Populationen in den umgebenden Ablagerungen entspricht.

Der grösste Teil der Bakterien in natürlichen porigen Grundwasserleitern befindet sich auf festen Partikeln (über 80%), aber Loslösung und Mitführung von Zellen im Wasser ist möglich (Matthess, 1973). Bei der hier beschriebenen Entnahmetechnik erfasst man nur die freien Bakterien und die auf den zutage geförderten Partikeln. Die sicher sehr zahlreichen Bakterien auf den grösseren und schwereren Partikeln, die nicht nach oben gelangen, bleiben unberücksichtigt. Ueber die Relation der erfassten zu den nicht erfassten Bakterien kann zunächst noch nichts ausgesagt werden. Da die Untergrundverhältnisse im Untersuchungsbereich aber insgesamt ähnlich sind (Preul, 1964) und da der Kiesschüttung um die Rohre eine gewisse Pufferwirkung gegenüber den vorhandenen Unterschieden zugeschrieben wurde, hatte die Erwartung bestanden, zumindest einen immer etwa gleichen Anteil der tatsächlichen Bakterienflora der natürlichen Ablagerungen zu erfassen.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, hat sich diese Erwartung als offensichtlich nur zum Teil berechtigt erwiesen. Daher wird jetzt eine Methodik entwickelt, die besseren Aufschluss über die tatsächlichen Besiedlungsverhältnisse der Umgebung von Peilrohren in sandig-kiesigen Ablagerungen verspricht (Marxsen, 1982). Trotz der geschilderten Mängel erlauben die vorliegenden Untersuchungsbefunde schon einige Aussagen über Struktur und Aktivität der Bakterienpopulationen im Grundwasser des Untersuchungsgebietes Johannesaue.

b. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bakterienflora

Die auflichtfluoreszenzmikroskopische Untersuchungstechnik von Bakterien im Gewässer geht auf Strugger (1949) zurück, der diese Technik vor Allem für die Erfassung von Bodenbakterien erarbeitet hat. Für diese Zwecke wurde sie schon bald vielfach ausgenutzt (z.B. Burrichter, 1953, Haber, 1959, Feldmann, 1957) und wird auch heute noch verwendet (z.B. Troll-

denier, 1972, Zvyaginsev, 1973). Für die Anwendung in Gewässern wurde sie zwar auch schon bald vorgeschlagen (Jannasch, 1954, Deufel, 1959), setzte sich aber nicht durch.

Da bei einigen Untersuchungen erhebliche Schwankungen der Ergebnisse bei Veränderungen der Methodik beobachtet wurden (Jones, 1974, Daley & Hobbie, 1975), empfiehlt sich jeweils eine genaue Angabe des Verfahrens einschliesslich der verwendeten Optik.

Die Einzelheiten des Verfahrens bei den durchgeführten Untersuchungen werden im folgenden mitgeteilt.

0,1 g Acridinorange (Fa. Serva) wird in 1,0 l Phosphatpuffer pH 7,0 (Fa. Merck) gelöst. Die Lösung bleibt lichtgeschützt einige Wochen gebrauchsfähig. Sie wird vor dem Gebrauch partikelfrei filtriert (Porenweite des Filters: 0,2 µm).

In einem Vakuumfiltrationsgerät wird mindestens 50 ml Probenwasser durch ein Filter von 0,2 µm Porenweite filtriert(Nuclepore Siebfilter-Membran aus Polycarbonat der Fa. Nuclepore Corp., Pleasanton, Calif., Durchmesser 50 mm). Gegebenenfalls erforderliche kleinere Probenmengen (bei zu grosser Bakterien-bzw. Partikeldichte) werden mit partikelfrei filtriertem Leitungswasser (Porenweite des Filters: 0,2µm) auf mindestens 50 ml aufgefüllt. Bei den Untersuchungen in der Johannesaue betrug das Volumen der Proben vor der Verdünnung 0,5 ml bis 10 ml.

Danach wird 5 ml Farbstofflösung vorsichtig auf das noch im Filtrationsapparat befindliche Filter gegeben. Nach 3 Minuten wird abgesaugt.

Dann wird 8 ml Isopropanol vorsichtig auf das Filter gegeben und kurz etwas angesaugt. Es muss auf jeden Fall noch ausreichend Isopropanol über dem Filter stehen (mindestens in gleicher Höhe wie die Farbstofflösung vorher). Nach 5 Minuten wird abgesaugt.

8 ml Xylol wird vorsichtig auf das Filter gegeben. Ansaugen wie bei Isopropanol. Absaugen nach 3 Minuten. (Bei einigen Grundwasserproben war der Verzicht auf die Entfärbung mit Xylol von Vorteil).

Die Aufbewahrung der Filter bis zur mikroskopischen Untersuchung erfolgt im Exsikkator in Petrischälchen aus Glas.

Die Auswertung geschieht bei Auflicht mit einem Zeiss Photomikroskop (Lichtquelle: Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 50, Filterkombination: Erregerfilter BP 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520, Objektiv: Neofluar 100/1,30 Oel, Vergrösserung 1250fach). Dazu wird aus dem Filter ein Stück herausgeschnitten und auf einem Objektträger in ein Tröpfchen destilliertes Wasser oder Puffer pH 7,0 (s.o.) gebracht. Die Bakterien leuchten bei der Betrachtung grün, während anorgani-

sche Partikel rotbraun erscheinen. Je Filter wurden mindestens 400 Bakterien ausgezählt.

Bei der Zählung wurden die Bakterien nach Form und Grösse unterschieden. Folgende Grössenklassen wurden festgelegt, für Stäbchen: Länge bis 1 µm, 1-2 µm, 2-3 µm, 3-4 µm, über 4 µm, für Kokken: Durchmesser bis 0,5 µm, 0,5-1 µm, 1-2 µm, über 2 µm Ausserdem wurde eine Gruppe für die sonstigen Bakterien eingerichtet. Bei dieser Erfassung der Bakterien nach Grösse und Form war keine exakte Ausmessung aller Bakterien möglich. Das wäre viel zu aufwendig gewesen. Es wurde im allgemeinen nur eine Grössenschätzung vorgenommen.

Bei der Berechnung der Gesamtbakterienzahl wurden die auf undurchsichtigen Partikeln gezählten Zellzahlen verdoppelt.

In der Literatur finden sich zahlreiche Abwandlungen fast aller Teilschritte der Methodik. Bei den Voruntersuchungen wurden daher zur Optimierung des Verfahrens für die durchzuführenden Untersuchungen zahlreiche mehr oder weniger stark voneinander abweichende Verfahrensweisen überprüft. Von den dabei aufgetretenen Problemen sollen nur einige angesprochen werden.

Dem Puffer, in dem der Farbtsoff gelöst wird, wurde schon von Strugger (1949) erhebliche Bedeutung beigemessen. Die Ergebnisse, die mit dem von Overbeck (persönl. Mitt.) verwendeten Phosphatpuffer pH 7.0 erzielt wurden, konnten auch durch Verwendung anderer Puffer von pH 6,0 bis pH 7,2 nicht verbessert werden. Der Acetatpuffer pH 4,0 (Bührer, 1977) ergab sogar eine deutliche Verschlechterung der Erkennbarkeit der Bakterien.

Gelegentlich hat die Entfärbung der Filter nur mit Isopropanol ein besseres mikroskopisches Bild gebracht als die Entfärbung mit Isopropanol und Xylol.

Die Betrachtung der noch feuchten Filter, wie sie Jones (1974), Daley & Hobbie (1975), Watson et al. (1977) vornehmen, ist aus arbeitstechnischen Gründen ungünstig. Zimmermann & Meyer-Reil (1974) und Rheinheimer (1977, a, b) beobachteten eine so geringe Schrumpfung der Bakterien in den bei ihnen vorherrschenden Grössenklassen, dass sie unberücksichtigt bleiben kann. Auch hier wurden entsprechend geringe Schrumpfungen angenommen, zumal die Entwässerung und Trocknung der Bakterien (gleichzeitig mit Entfärbung über Isopropanol und Xylol) relativ schonend geschieht.

Für die Einbettung eines Filterstückchens zur mikroskopischen Betrachtung werden in der Literatur zahlreiche verschiedene Möglichkeiten empfohlen. Abgesehen von der Untersuchung in noch feuchtem Zustand werden als Einbettungs-

mittel verwendet: Paraffinöl (Schwantes, 1971), Caedax + Paraffinöl (1+1) (Jannasch, 1954), Glycerin, Immersionsöl (Overbeck, persönl. Mitt.), Zimtaldehyd + Eugenol (2+1) (Zimmermann & Meyer-Reil, 1974). Die Erfahrungen mit diesen verschiedenen Substanzen waren äusserst unterschiedlich.

Die brillantesten mikroskopischen Bilder ergab die Einbettung in Paraffinöl bzw. in Paraffinöl + Caedax (1+1). Vor tiefschwarzem Hintergrund heben sich die freien Bakterien, grün, gelb und rot leuchtend, durchweg klar ab. Bakterien, die Detritusteilchen oder anorganische Partikel besiedeln, sind aber nur ausnahmsweise so klar erkennbar, dass sie auch sicher quantitativ erfasst werden können. Da bei denn meisten Präparaten nur ein kleiner Teil der Partikel besiedelnden Bakterien sichtbar ist und freie Bakterien in den vorliegenden Proben in der Regel keinen weitaus überwiegenden Anteil stellen, hat eine Auswertung derartiger Präparate wenig Sinn.

Ein nur wenig schlechteres mikroskopisches Bild zeigt sich bei Einbettung in Glycerin. Immersionsöl ergibt meist eine deutliche grüne Fluoreszenz des ganzen mikroskopischen Bildes, die zu Beginn des Betrachtens die Fluoreszenz der Bakterien überstrahlt, aber meist nach einer gewissen Zeit verblasst ist, so dass man dann ähnliche Bilder wie bei den bereits genannten Materialien erhält. Zimtaldehyd + Eugenol (2+1) zeigt ebenfalls meist eine deutliche grüne Fluoreszenz des ganzen mikroskopischen Bildes, die aber nicht nachlässt. Allerdings sind gelegentlich die Detritus und anorganische Partikel besiedelnden Bakterien gut zu erkennen, auch in Fällen, in denen Paraffinöl bzw. Paraffinöl + Caedax (1+1) völlig ungeeignete Bilder ergeben.

Die Betrachtung von bereits getrockneten Filtern in destilliertem Wasser oder in Puffer pH 7,0, die durch die guten Erfahrungen anderer Autoren bei der Untersuchung noch feuchter Filter angeregt wurde, ergibt durchweg zufriedenstellende bis gute Ergebnisse. Die Partikel besiedelnden Bakterien sind deutlich erkennbar. Sie leuchten grün, nach längerer Bestrahlung auch gelb, während die Partikel rot bis rotbraun erscheinen.

Auch die freien Bakterien leuchten grün und sind deutlich sichtbar. Allerdings ergeben sich auch Nachteile bei dieser Betrachtungsweise. So leuchtet das Filter, insbesondere die Poren, ebenfalls grünlich, was die Erkennbarkeit der Bakterien erschwert. Auch nimmt die Leuchtkraft relativ schnell ab. Zählt man aber ein Gesichtsfeld bzw. einem Ausschnitt davon schnell genug aus, ist eine sichere Erfassung der Bakterien, einschliesslich ihrer Zuordnung zu verschiedenen Formen und Grössenklassen, ohne Schwierigkeiten möglich.

c. Bestimmung der heterotrophen bakteriellen Aktivität

Die Methoden zur Bestimmung von heterotrophen bakteriellen Aktivitäten in Gewässern wurden in Anlehnung an die ^{14}C-Technik zur Bestimmung der Primärproduktion von Steemann Nielsen (1952) entwickelt. Parsons & Strickland (1962) stellten bei Untersuchungen im Pazifik erstmals fest, dass die Aufnahme von Glucose und Acetat durch planktische Organismen entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik verläuft. Das bedeutet: Mit zunehmender Substratkonzentration steigt die Aufnahmegeschwindigkeit zunächst an, strebt dann aber einem Sättigungswert zu (s. Abb. 5). Parsons & Strickland schlugen vor, bei einer Konzentration von 250 µg C/l die Aufnahmegeschwindigkeit v als «relatives heterotrophes Potential» zu bestimmen. Sie zeigten, dass bei dieser Konzentration die natürliche Substratkonzentration keine wesentliche Rolle mehr spielt.

Durch Untersuchungen von Wright & Hobbie (1965, a, b, 1966) bzw. Hobbie & Wright (1965) stellte sich heraus, dass bei derart hohen Substratkonzentrationen schon Diffusionsprozesse, vor allem bei Anwesenheit von Algen, die Ergebnisse verfälschen können. Bei geringen Konzentrationen erhielten aber auch sie eine der Michaelis-Menten-Kinetik entsprechende Aufnahme. Sie schlugen deshalb vor, bei mehreren Konzentrationen eines Substrates die Aufnahmegeschwindigkeit in diesem niedrigeren Konzentrationsbereich zu verfolgen.

Analog zur Michaelis-Menten-Gleichung ergibt sich die Gleichung

$$v = \frac{V_{max} \cdot (S_n + A)}{K_t + S_n + A} \qquad (1).$$

Darin bedeuten:

- v Aufnahmegeschwindigkeit,
- V_{max} maximale Aufnahmegeschwindigkeit,
- S_n natürliche Substratkonzentration,
- A addierte Substratkonzentration,
- K_t Aufnahmekonstante (entspricht der Substratkonzentration, bei der $v = 0{,}5 \cdot V_{max}$ ist).

Die Methode ergibt die folgenden 3 ökologischen Parameter:

- V_{max} maximale Aufnahmegeschwindigkeit (Aufnahmepotential, heterotrophes Potential),
- $K_t + S_n$ Summe aus der Aufnahmekonstanten K_t und der natürlichen Substratkonzentration S_n,
- T_t Umsatzzeit («turnover time»), Quotient aus $K_t + S_n$ und V_{max} ($T_t = (K_t + S_n)/V_{max}$).

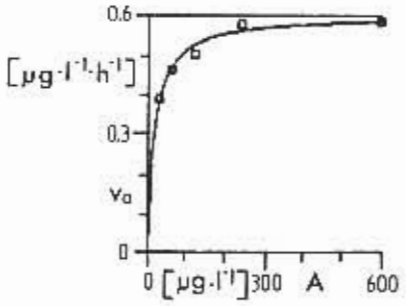

Abb. 5. Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit v_a von der Substratkonzentration A. Man erkennt, dass bei der Bestimmung des relativen heterotrophen Potentials v_r unter Verwendung einer Konzentration Werte ähnlich V_{max} erreicht werden, wenn die Konzentration im Sättigungsbereich (z.B. bei 600 µg Glucose · l^{-1}) gewählt wird. (Versuch vom 22.1.1979, PR 26. V_{max} = 0,599 µg Glucose $\cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$, $K_t + S_n$ = 17,6 µg Glucose $\cdot l^{-1}$, T_t = 29,4 h.)

Solange die natürliche Sustratkonzentration nicht bekannt ist, kann auch die tatsächliche Aufnahmegeschwindigkeit v_n nicht ermittelt werden. Man muss sich also mit dem Aufnahmepotential V_{max} als Mass für eine heterotrophe Aktivität begnügen. Auch für die Aufnahmekonstante K_t, die ein Mass für die Affinität der Bakterienpopulation zum Substrat ist, ergibt sich kein Wert. Man erhält nur die Summe aus K_t und S_n.

In dieser Untersuchung wurden sowohl die aufnahmekinetischen Parameter nach Wright & Hobbie bestimmt als auch ein «relatives heterotrophes Potential» (mit v_r bezeichnet) in Anlehnung an den Vorschlag von Parsons & Strickland bei einer Substratkonzentration von 600 µg Glucose/l. Die letztere Bestimmung ist wesentlich weniger zeitaufwendig und erlaubt daher die Erfassung eines wesentlich grösseren Untersuchungsgebietes. Wählt man die Konzentration des Substrates relativ hoch, wie geschehen, so gelangt man bereits in den Sättigungsbereich der Aufnahmekurve (s. Abb. 5) und erhält einen Wert für v_r, der nahe bei V_{max} liegt. Probleme mit Diffusionsprozessen, die Wright & Hobbie (1966) vor allem mit Algenpopulationen hatten, ergaben sich nicht.

Die Proben wurden in einer temperaturisolierten Kiste ins Labor transportiert und spätestens nach 2,5 Stunden verarbeitet. In 15 Fläschchen wurde je 10 ml Probe gegeben. Dann wurde zu je 3 Fläschchen die gleiche Menge an ^{14}C-markierter Substanz hinzugefügt, so dass sich 5 verschiedene Konzentrationen von 30 bis 600 µg Glucose/l ergeben. Jeweils eine der 3 Parallelproben wurde vor Versuchsbeginn mit Formol fixiert (Endkonzentration in der Probe: 2%).

Nach der Inkubation von 1 Stunde bei Standorttemperatur wurden die Proben über Membranfilter (0,2 µm Porenweite, 25 mm Durchmesser, Zellulosenitrat) unfixiert filtriert. Die Filter wurden in Szintillationsbecher gegeben, die umgehend mit Szintillatorflüssigkeit (Emulsifier Scintillator der Fa. Packard) gefüllt wurden. Die Auswertung erfolgte mit einem Flüssigszintillationszähler BF 5000.

Zur Ermittlung des relativen heterotrophen Potentials wurden nur Konzentrationen von 600 µg Glucose/l verwendet.

Die Berechnung der Aufnahmegeschwindigkeit v erfolgt nach der Gleichung

$$v = \frac{c \cdot A}{C \cdot \mu \cdot t} \qquad (2) \quad .$$

Darin bedeuten:

- c cpm der abfiltrierten Organismen,
- C cpm von 1 µCi ^{14}C (Ampullenaktivität),
- µ hinzugegebene Menge an µCi,
- t Inkubationszeit.

Die Berechnung der aufnahmekinetischen Parameter geschieht im allgemeinen über linearisierte Formen der Michaelis-Menten-Gleichung, vor allem durch die Transformation nach Eadie, bei der S/v gegen S aufgetragen wird. Die Problematik der verschiedenen Auswertungsmethoden ist ausführlich diskutiert bei Marxsen (1976, 1980). Vor allem die Berechnung der Parameter T_t und $K_t + S_n$ ist bei stark heterogenen Bakterienpopulationen ziemlich unsicher (Williams, 1973). Relativ zuverlässig ist dagegen auch in diesem Fall der Vert für V_{max}. Das gilt besonders, wenn man die Berechnung der Parameter direkt entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung mit Hilfe eines Iterationsprogrammes vornimmt, wie es hier geschehen ist.

Ein Unsicherheitsfaktor bei der Ermittlung der aufnahmekinetischen Parameter in dieser Untersuchung ist die Vernachlässigung der Respiration der aufgenommenen Glucose. Düsing (1973) fand z.B. in der Fulda unterhalb der Stadt Fulda Respirationsraten von 15-23%. Andere Autoren geben für limnische Biotope bis 40% an (vgl. Zusammenstellung bei Marxsen, 1976, 1980). So ergeben sich für die Parameter V_{max} und T_t aus dieser Vernachlässigung gewisse Unsicherheiten.

Die Aufnahme von Glucose gibt natürlich nicht die Aktivität der gesamten Bakterienpopulation wieder, sondern es wird nur die Fraktion erfasst, die auch Glucose als Substrat unter den vorhandenen Bedingungen verwerten kann. Auch ist Glucose nur eine von vielen im Grundwasser vorhandenen Substanzen.

Aber sie hat sich, als zentrale Substanz im Stoffwechsel aller Zellen, als besonders geeignetes Modellsubstrat bewährt.

Die Entnahme von Bakterienpopulationen aus ihrer natürlichen Umgebung und ihre Untersuchung im Labor ist immer problematisch. Bakterien können auf derartige Aenderungen ihrer Umweltbedingungen sehr empfindlich reagieren (Overbeck, 1972, 1973), so dass die Ergebnisse oft Folge von «Flascheneffekten» sind. Durch schnelle Verarbeitung der Proben und moglichst geringe Veränderungen der Standorttemperatur wurde versucht, diese Effekte möglichst klein zu halten.

Das komplette aufnahmekinetische Untersuchungsprogramm kam in einer Peilrohrreihe etwa senkrecht zum Infiltrationsstrom (PR 28-26-24-9) und in einer Reihe etwa in Strömungsrichtung (PR 7-8-9-1-3-11) (vgl. Abb. 2) zur Anwendung, während das relative heterotrophe Potential v_r an allen Entnahmestellen des Untersuchungsgebietes bestimmt wurde.

4. ERSTE ERGEBNISSE

Die Schwankungsbreite der in der Johannesaue im Januar 1979 ermittelten Bakterienzahlen einschliesslich der Anteile einiger Gruppen zeigt Tab. 2. Die flächenhafte Verteilung der Zahl der Bakterien/ml im geförderten Grundwasser zeigt Abb. 6. Ausserdem sind dargestellt in Abb. 7 die Zahl der «grossen» Bakterien/ml (als solche werden Stäbchen mit einer Länge über 1 µm und Kokken mit einem Durchmesser über 1 µm angesehen)

Tab 2. Extremwerte der Untersuchungsergebnisse der bakteriologischen Parameter.

Gesamtzahl an Bakterien/ml	1,4	(PR 8)	11,3	(PR 4)	x10⁶
Anteil der Stäbchen (%)	40	(PR 1)	70	(PR 7)	
Anteil der Kokken (%)	30	(PR 7)	60	(PR 1)	
Anteil der Bakt. $>$ 1 µm (%)	11	(PR 3)	41	(PR 7)	
Zahl der Bakt. $>$ 1 µm/ml	0,37	(PR 8)	2,4	(PR 4)	x10⁶
v_r (µg Glucose · l⁻¹ · h⁻¹)	0,12	(PR 28)	0,74	(PR 24)	
v_r/B (µg Glucose · h⁻¹ · Bakt.⁻¹)	0,02	(PR 27)	0,18	(PR 8)	x10⁻⁹
V_{max} (µg Glucose · l⁻¹ · h⁻¹)	0,10	(PR 9)	0,69	(PR 7)	
V_{max}/B (µg Glucose · h⁻¹ · Bakt.⁻¹)	0,03	(PR 11)	0,19	(PR 7)	x10⁻⁹
$K_t + S_n$ (µg Glucose · l⁻¹)	17	(PR 24)	162	(PR 11)	
T_t (h)	29	(PR 26)	809	(PR 28)	

(Es bedeuten: v_r relatives heterotrophes Potential, B Zahl der Bakterien/ml, V_{max} maximale Aufnahmegeschwindigkeit, heterotrophes Potential, K_t Aufnahmekonstante einer Bakterienpopulation für ein Substrat, S_n natürliche Substratkonzentration, T_t Umsatzzeit.)

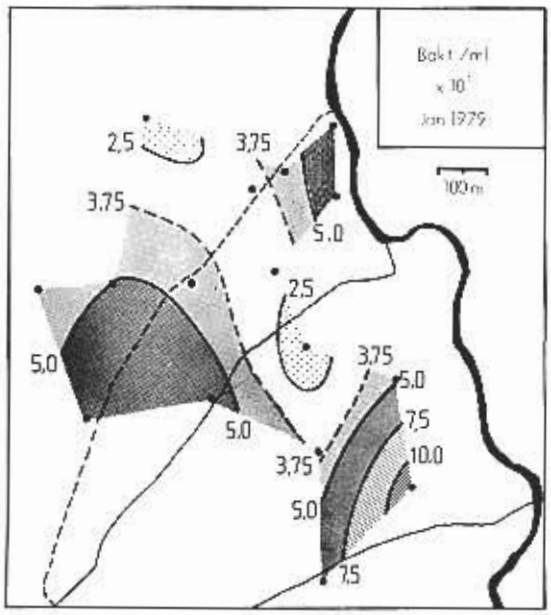

Abb. 6. Verteilung der Zahl der Bakterien pro ml (fluoreszenzmikroskopische Zählung) im Grundwasser des Untersuchungsgebietes Johannesaue.

und in Abb. 8 der prozentuale Anteil dieser grossen Bakterien an der Gesamtzahl.

Tab. 2 enthält auch die Extremwerte der Untersuchungen der aufnahmekinetischen Parameter, die an 9 Untersuchungsstellen ermittelt wurden, sowie des relativen heterotrophen Potentials (v_r), das an allen 15 Untersuchungsstellen bestimmt wurde. Die Verteilung der Werte des relativen heterotrophen Potentials in der Johannesaue wird in Abb. 9 erkennbar.

Ausserdem wurde noch jeweils das spezifische Aufnahmepotential berechnet, das ist das Aufnahmepotential bezogen auf die Bakterienzahl (B). Den Schwankungsbereich der Werte für das spezifische Aufnahmepotential V_{max}/B (spezifisches heterotrophes Potential) und das spezifische *relative* heterotrophe Potential v_r/B gibt ebenfalls Tab. 2. v_r/B ist zudem noch in Abb. 10 dargestellt.

5. OEKOLOGISCHE AUSSAGEN UND PROBLEME

a. Bakterienzahlen

Die Verteilung der Bakterienzahlen (Abb. 6) im Grundwasser des Untersuchungsgebietes kann zwar nicht als unregel-

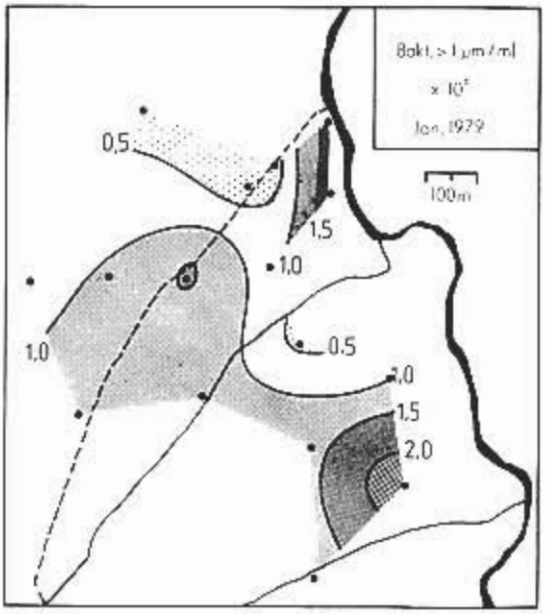

Abb. 7. Verteilung der Zahl der grossen Bakterien pro ml (fluoreszenzmikroskopische Zählung) im Grundwasser des Untersuchungsgebietes Johannesaue. Grosse Bakterien: Stäbchen mit einer Länge über 1 µm und Kokken mit einem Durchmesser über 1 µm.

mässig bezeichnet werden, aber eine einheitliche Tendenz in Beziehungen zu chemischen Parametern wie Sauerstoff (Abb. 3) und Kaliumpermanganatverbrauch (Abb. 4) ist nicht erkennbar. Das gilt auch für die anderen chemischen Substanzen, deren Verteilung hier nicht dargestellt ist.

Ein etwas anderes Bild ergibt sich, berücksichtigt man nur die grossen Bakterien (Abb. 7). Lässt man den Wert von PR 11 an der nordöstlichen Ecke des Untersuchungsgebietes wegen des vermuteten Einflusses von Fuldawasser unberücksichtigt, so ergibt sich eine deutliche Beziehung zur Verteilung des Sauerstoffgehaltes. Die höchsten Werte für diesen Teil der Bakterien wurden mit über 2 x 10^6/ml bei PR 4 und PR 24 am Rande des Verunreinigungsstromes ermittelt. Gleichzeitig wird eine Abnahme der Zahl dieser Bakterien während des Uebergangs zum nicht organisch belasteten Teil des Untersuchungsgebietes im Westen (PR 28) sowie in Fliessrichtung (vgl. Abb. 2 Fliessrichtung) nach Norden deutlich.

Der Wert von PR 8 liegt deutlich ausserhalb der allgemeinen Tendenzen. Es muss offen bleiben, ob hier tatsächlich nur eine relativ kleine Bakterienzahl im Untergrund vorhanden ist oder

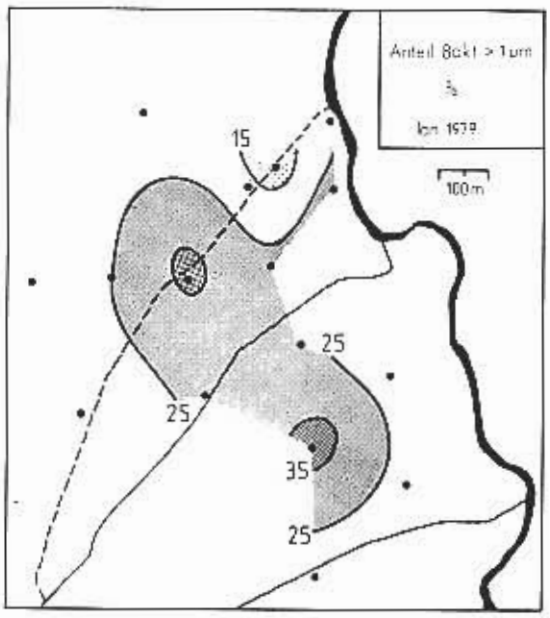

Abb. 8. Verteilung des Anteils der grossen Bakterien (> 1 µm, vgl. Abb. 7) an der Gesamtzahl (in %) im Grundwasser des Untersuchungsgebietes Johannesaue.

ob sich die Unzulänglichkeiten der Entnahmemethode und die Unterschiede in den Ablagerungsverhältnissen hier besonders bemerkbar machen.

Die getrennte Betrachtung von grossen Bakterien rechtfertigt sich dadurch, dass sie durch ihre grössere Biomasse für die bakteriellen Stoffumsetzungen von grösserer Bedeutung sind als die oft zahlreicheren kleineren Bakterien. Es ist auch bekannt, dass der Anteil der grösseren Bakerien mit zunehmendem Trophiegrad eines Gewässers zunimmt, ebenso wie der Anteil der Stäbchen (Rheinheimer, 1977, a, Daubner, 1972). Eine Betrachtung des Vorkommes der Stäbchen im Untersuchungsgebiet ergab allerdings keine erkennbaren Beziehungen zu anderen Parametern.

Da gewisse Vorbehalte gegenüber der Entnahmetechnik hinsichtlich der Erfassung eines an allen Entnahmestellen etwa gleich grossen Anteils der Bakterienflora der sandig-kiesigen Ablagerungen bestehen, aber die Beziehungen von Nährstoffverhältnissen zu Bakterienform und - grösse bekannt sind, erscheint eine vergleichende Betrachtung des prozentualen Anteils der verschiedenen Formen - und Grössenklassen sinnvoll.

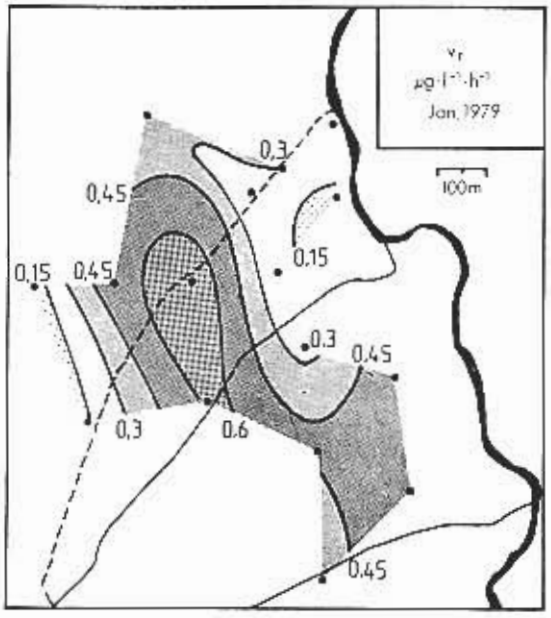

Abb. 9. Verteilung des relativen heterotrophen Potentials v_r (μg Glucose $\cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$) im Grundwasser des Untersuchungsgebietes Johannesaue.

Der Anteil von Kokken (30 - 60% der Gesamtzahl) und der von Stäbchen (40 - 70%) zeigt keine Beziehung zu anderen Parametern, im Gegensatz zum Anteil der grossen Bakterien (11 - 41%) (Abb. 7). Hier ergeben sich einige deutliche Veränderungen gegenüber der Verteilung der absoluten Zahlen. PR 24 übertrifft mit 38% immer noch die Werte der umgebenden Untersuchungsstellen. Das Maximum an grossen Bakterien bei dieser Betrachtungsweise hat sich aber zu PR 7 (41%) verschoben. Besonders auffällig ist auch, dass sich der Wert von PR 8 jetzt problemlos in die allgemeine Tendenz einfügt. Ueberhaupt stimmt die Ausdehnung der Zone mit einem hohen Anteil grosser Bakterien (über 25%) erstaunlich gut mit der Ausdehnung des sauerstoffarmen Gebietes (Abb. 3) überein. Der Anteil der grossen Bakterien ist im sauerstoffarmen Bereich am grössten und nimmt zu den Rändern des subterranen Verunreinigungsstromes, besonders deutlich am Westrand des Gebietes bei PR 27 und PR 28 erkennbar, und in Fliessrichtung, vor allem bei PR 1 und PR 3 gut sichtbar, ab.

So charakterisieren die Anteile der Formen - und vor allem der Grössenklassen an der bakteriellen Gesamtmenge die Populationen, die in den sandig-kiesigen Ablagerungen vorhanden

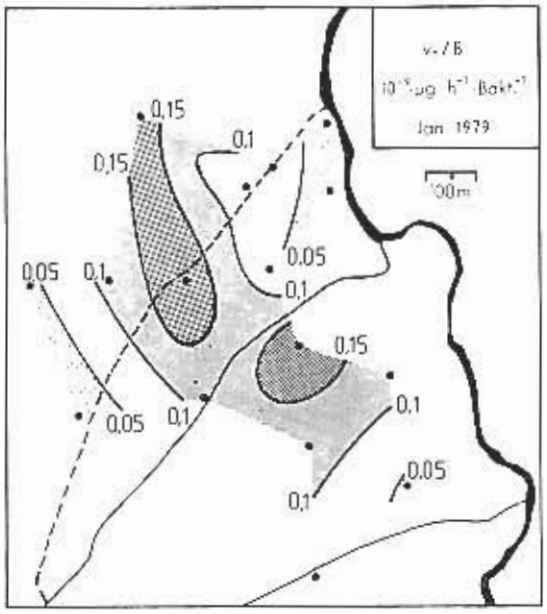

Abb. 10. Verteilung des spezifischen relativen heterotrophen Potentials (v_r pro Bakterienzelle, µg Glucose · h^{-1} · $Bakt^{-1}$) im Grundwasser des Untersuchungsgebietes Johannesaue.

sind, wahrscheinlich besser, als es die ermittelten absoluten Zahlen tun.

b. Heterotrophe Aktivität

Die Schwankungsbreite der 3 aufnahmekinetischen Parameter, die entlang der Peilrohrreihen 28 - 26 - 24 - 9 und 7 - 8 - 9 - 1 - 3 - 11 ermittelt wurden, zeigt Tab. 2. Die Werte für T_t (Umsatzzeit) und für K_t+S_n (Summe aus der Affinitätskonstanten der Bakterienpopulation für das Substrat und der natürlichen Substratkonzentration) sind in ihrem Verlauf entlang der Untersuchungslinien etwas uneinheitlich und nur schwer zu interpretieren. Sie sollen daher hier nicht diskutiert werden.

Vergleichswerte aus anderen Biotopen für das Aufnahmepotential von Glucose, als Mass des heterotrophen Potentials einer Bakterienpopulation, enthält Tab. 4. Dabei zeigt sich, dass die V_{max} - Werte aus den Grundwasseruntersuchungen in der Johannesaue Grössenordnungen erreichen können, wie sie in eutrophen Seen angetroffen werden (Plussee, Erken). Sie bleiben allerdings unter den Maximalwerten, die im stark mit Abwasser belasteten Lötsjön oder in der Fulda unterhalb der Einleitungs-

stelle der seinerzeit noch ungeklärten Abwässer der Stadt Fulda ermittelt wurden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Werten der vorliegenden Untersuchung um Daten aus dem Januar handelt, während zumindest die Maximalwerte aus den anderen Biotopen aus dem Sommer stammen. Vor allem aber muss beachtet werden, dass durch die Peilrohrentnahme nur ein kleiner Teil der Bakterien, die tatsächlich für die Stoffumsetzungen im Grundwasser verantwortlich sind, erfasst wird. Der grösste Teil befindet sich auf den abgelagerten Sand- und Kiespartikeln (s. dazu z.B. Matthess, 1973), so dass das wirkliche heterotrophe Potential in porösen Grundwasserleitern sicher noch um einiges höher anzusetzen ist.

Die Vermutung einer Vergleichbarkeit von V_{max} (heterotrophes Potential) und des relativen heterotrophen Potentials v_r bei der angewendeten Konzentration von 600 µg Glucose/l hat sich bestätigt. Das zeigen der Korrelationskoeffizient beider Parameter ($r=0,98$, $P<0,001$) und der Vergleich der absoluten Werte; v_r ist regelmässig nur wenig kleiner als V_{max}.

Betrachtet man die flächenhafte Verteilung von v_r, so zeigt sich eine Tendenz zu einem Maximum dieses Masses des bakteriellen Umsatzpotentials im Bereich des Uebergangsgebietes von sauerstoffarmem zu sauerstoffreichem Grundwasser. Ebenso ergibt sich eine deutliche Tendenz der Abnahme zu den nicht

Tab. 3. Korrelationen (***$P \leq 0,001$, *$0,01 < P \leq 0,05$, ohne Zeichen $P > 0,05$).

Bakterien/ml	- v_r	0,29
Bakterien > 1 µm/ml	- v_r	0,58*
Stäbchen > 1 µm/ml	- v_r	0,59*
V_{max}	- v_r	0,98***

organisch belasteten Gebieten im Westen und in Fliessrichtung des Grundwasserkörpers. Problematisch erscheint wiederum das Ergebnis von PR 8.

Dieses Bild verschiebt sich bei Betrachtung des spezifischen relativen heterotrophen Potentials (v_r/B), also bei Bezug von v_r auf die Zahl der Bakterien (Abb. 10). Hier liegen die höchsten Werte bei den Peilrohren 8, 23 und 24, also im randlichen Bereich des belasteten Grundwasserstromes. Hohe Werte gibt es auch im sauerstoffarmen inneren Bereich des erfassten belasteten Gebietes. Die Abnahme zu den nicht verschmutzten Arealen im Westen und auch im Südosten sowie in Fliessrichtung ist deutlich.

Die Korrelationsberechnungen von Bakterienzahlen und relativem heterotrophen Potential (Tab. 3) ergeben keine signifikante Korrelation von v_r mit den Gesamtbakterienzahlen. Es

Tab. 4. Ausgewählte V_{max}-Werte für die Aufnahme von Glucose aus anderen Gewässern.

Gewässer	V_{max} ($\mu g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	Quelle
Plussee, Holstein	0,2 - 1,2	Overbeck, 1975
Crooked Lake, Indiana, USA	1 - 10	Wetzel, 1967
Erken, Schweden	0,007 - 0,5	Hobbie & Wright, 1968
Lötsjön, Schweden	0,1 - 15	Allen, 1969
Fulda	< 250	Düsing, 1973
Pamlico River Aestuar, North Carolina, USA	0,06 - 9,64	Crawford et al., 1974
Rohrwiesenbach, Hessen (Waldabschnitt)	0,05 - 3,0	Marxsen, 1976, 1980
Breitenbach, Hessen (Wiesenabschnitt)	0,09 - 1,5	Marxsen, 1976, 1980

gibt aber deutlicche Beziehungen zu den grossen Bakterien. Das stimmt überein mit der Annahme einer besonderen Bedeutung dieser Bakterien für den heterotrophen Stoffumsatz, die sich sowohl aus ihrer grossen Biomasse als auch aus ihrem besonders zahlreichen Vorkommen in Gewässern mit erhöhtem Nährstoffgehalt ergibt.

Eine direkte Berechnung der bakteriellen Biomasse war noch nicht möglich. Auf einer derartigen Grundlage ergäben sich möglicherweise noch deutlichere Korrelationen mit den v_r - Werten.

Auch die Betrachtung der Ergebnisse der Untersuchungen zur heterotrophen Aktivität zeigt die Problematik der Entnahmetechnik auf. Besonders auffällige Abweichungen weisen die Daten von PR 8 auf.

Die Parameter der heterotrophen bakteriellen Aktivität sind, ebenso wie schon die Zahl der Bakterien sowie der Anteil der grossen Bakterien, bei PR 1 und PR 3 nicht erhöht, obwohl die Konzentration der gelösten organischen Substanz in diesem Bereich einen deutlichen Anstieg aufweist. Damit entsprechen die bakteriellen Parameter den Sauerstoffwerten, deren Tendenz zum Anwachsen in Fliessrichtung des Grundwasserstromes nicht gestört ist. Das Fehlen eines Anstiegs der bakteriellen Aktivität trotz offensichtlich erhöhter Menge an organischen Substanzen spricht für das Vorhandensein von relativ schwer abbaubaren organischen Stoffen in diesem Bereich (vgl. S.).

6. SCHLUSSBETRACHTUNG

Sowohl die auflichtfluoreszenzmikroskopische Methode zur Erfassung von Gesamtbakterienzahlen in Gewässern als auch die Verfahren zur Bestimmung der heterotrophen Aktivität

mittels ^{14}C-markierter organischer Substanzen haben sich als geeignet auch zur Charakterisierung von bakteriellen Populationen im Grundwasser sandig-kiesiger Ablagerungen erwiesen.

Einer Verbesserung bedarf die Entnahmetechnik. Sie ermöglichte im Rahmen dieser Untersuchungen nur die Erfassung eines kleinen Teiles der im Grundwasser wirksamen Bakterien. Das Verhältnis des erfassten Teiles zur Gesamtzahl, das an verschiedenen Entnahmestellen schwanken kann, konnte nicht ermittelt werden. Es ist jedoch damit zu rechnen, dass diese Schwächen der Entnahmetechnik beim Fortgang der Arbeiten überwunden werden (vgl. Marxsen, 1982). Trotz der Notwendigkeit einer Weiterentwicklung der Methodik haben sich erste bemerkenswerte Befunde bei der Untersuchung eines organisch verunreinigten Grundwasserstromes ergeben, sowohl zur quantitativen Verteilung der Bakterien als auch über ihre heterotrophe Aktivität.

Derartige Ergebnisse können zur genaueren Erfassung der Rolle der Bakterien innerhalb der biologischen Selbstreinigungsprozesse in porösen Grundwasserleitern beitragen. Da die gegen Infiltrationen sehr anfälligen grundwasserführenden sandig-kiesigen Substrate (vgl. Husmann, 1972) auch naturgegebene Trinkwasserreservoire darstellen, haben die hier angegangenen subterranlimnologischen Probleme besondere Bedeutung bei der Bewältigung der zunehmenden Wassersorgen auf der einleitend schon betonten ökologischen Grundlage mit Berücksichtigung aller an den intergranularen Selbstreinigungsprozessen beteiligten Faktoren.

DANKSAGUNG

Die Untersuchungen wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) an Dr. Siegfried Husmann, Schlitz, finanziell ermöglicht, wofür der DFG auch an dieser Stelle gedankt sei. Dr. S. Husmann gebührt herzlicher Dank für seine vielfältigen Bemühungen, die die Durchführung dieser Arbeiten möglich machten, sowie für die zahlreichen und ausführlichen Diskussionen zur Untersuchungsthematik. Mein Dank gilt auch dem Leiter der Limnologischen Flussstation in Schlitz, Prof. Dr. J. Illies, der einen Arbeitsplatz an der Station zur Verfügung stellte. Besonders danke ich auch dem Direktor der Abteilung Allgemeine Limnologie des Max-Planck-Instituts für Limnologie in Plön, Prof. Dr. J. Overbeck, für die vielfältige Förderung der Untersuchungen und zahlreiche wertvolle Diskussionen.

Das zur Untersuchung des Grundwassers genutzte Peilrohrnetz gehürt der Stadtwerke Fulda GmbH. Für die Erlaubnis zur Nutzung der Peilrohre sowie für die Unterstützung und Förderung der Arbeiten sei auch an dieser Stelle sehr herzlich gedankt. Besonders hervorgehoben sei die Hilfe der Herren Hammer und Hermuth.

Die chemischen Untersuchungen wurden gemeinsam mit Dr. J. Brehm, Schlitz, durchgeführt, dem ich auch für die Diskussionen zur Interpretation der chemischen Befunde danke. Bester Dank gebührt auch Dr. H. J. Krambeck, Plön, für die Durchführung der Berechnungen zur Aufnahmekinetik einschliesslich der maschinellen Herstellung der Abbildungen hierzu; Abb. 5 ist dieser

Serie entnommen. G. Susemichel, Schlitz, danke ich sehr führ die Hilfe bei der Entnahme der Proben.

Für die Hilfe bei der Formulierung der englischen Texte danke ich Dr. N.K. Kaushik, Guelph, Ontario (Canada,), z. Zt. (Sommer, 1980) Schlitz.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Johannesaue im Fulda-Tal bei Fulda wurde ein sandig-kiesige Ablagerungen durchziehender, durch organische Substanzen verunreinigter Grundwasserstrom untersucht. Dazu wurden im Januar 1979 aus 16 über das Gebiet verteilten Peilrohren (Abb. 2) Proben entnommen.

Zur Charakterisierung der Bakterienpopulationen wurden, soweit bekannt, erstmals bisher nur in Oberflächengewässern angewandte Verfahren benutzt, die zum Teil für die Grundwasseruntersuchungen verändert wurden. Die Zahl der Bakterien wurde mit Hilfe einer auflichtfluoreszenzmikroskopischen Methode unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange ermittelt, die gleichzeitig eine Erfassung der Bakterien nach Form und Grösse ermöglichte. Die heterotrophe bakterielle Aktivität charakterisierende Parameter wurden mit Hilfe ^{14}C-markierter organischer Substanzen bestimmt.

Die Zahl der Bakterien im mittels Peilrohren entnommenen Grundwasser schwankte zwischen 1,4 und 11,3 x 10^6 Bakterien pro ml (Tab. 2, Abb. 6). Das relative Glucose-Aufnahmepotential v_r, das bei einer Substratkonzentration im Sättigungsbereich der Aufnahmekurve gemessen wurde, betrug 0,12 - 0,74 µg Glucose $\cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ (Abb. 9), das entsprechende spezifische Potential betrug 0,02 - 0,18 µg Glucosle $\cdot h^{-1} \cdot$Bakt.$^{-1}$ (Abb. 10). Die Ergebnisse stimmen mit den stellenweise gleichzeitig ermittelten Werten der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} gut überein (Tab. 2).

Die vorliegenden Befunde geben erste Aufschlüsse über die Verteilung der Bakterienzahlen und der heterotrophen bakteriellen Aktivität im Grundwasser des Untersuchungsgebietes. Es konnten Beziehungen aufgezeigt werden zwischen den bakteriologischen Parametern und dem Sauerstoffgehalt (Abb. 3) sowie dem Kaliumpermanganatverbrauch (Abb. 4).

LITERATUR

ALLEN, H.L. 1969. Chemo-organotrophic utilization of dissolved organic compounds by planktic algae and bacteria in a pond. Int. Revue ges. Hydrobiol. 54: 1-33.

BLAUW, T. 1978. Aufnahmekinetik von Bakterienpopulationen im Sediment des Plussees. Vehr Ges. Oekologie (Kiel, 1977) 6:131-135.

BOWDEN, W.B. 1977. Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1229-1232.

BREHM, J. 1975. Hydrologische und chemische Uebersichtsuntersuchungen an den Fliessgewässern des Schlitzerlandes. III. Die Fulda. Beitr. Naturkunde Osthessen 9/10: 37-80.

BUEHRER, H. 1977. Verbesserte Acridinorangemethods zur Direktzählung von Bakterien aus Seesedimenten. Schweiz. Z. Hydrol. 39: 99-103.

BURRICHTER, E. 1953. Beiträge zur Beurteilung von Böden auf Grund fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung ihrer Mikroflora. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenk 63:154-171.

CRAWFORD, C.C., J.E. HOBBIE & K.L. WEBB 1974. The utilization of dissolved free amino acids by estuarine microorganisms. Ecology 55: 551-563.

DALEY, R.J. & J.E. HOBBIE 1975. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. Limnol. Oceanogr. 20: 875-882.

DAUBNER, I. 1972. Mikrobiologie des Wassers. BLV Verlagsgesellschaft, München.
DEUFEL, J. 1959. Zählung von Wasserbakterien auf Membranfiltern mittels Fluoreszenzmikroskopie. Naturwissenschaften 46:654.
DUESING, F. 1973. Zur Stoffwechseldynamik der fliessenden Welle: bakterieller Abbau gelöster organischer Komponenten. Dissertation, Universität Kiel.
FARKASDI, G., A. GOLWER, K.H. KNOLL, G. MATTHESS & W. SCHNEIDER 1969. Mikrobiologische und hygienische Untersuchungen von Grundwasserverunreinigungen im Unterstrom von Abfallplätzen. Städtehygiene 20: 25-31.
FELDMANN, A. 1957. Der quantitative Bakterienbesatz von Dauergrünlandböden und seine Beeinflussung durch organische Düngung. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenk. 78:56-65.
GOCKE, K. 1975. Studies on short-term variations of heterotrophic activity in the Kiel Fjord. Mar. Biol. 33: 49-55.
GOLWER, A., G. MATTHESS & W. SCHNEIDER, 1970. Selbstreinigungsvorgänge im aeroben und anaeroben Grundwasserbereich. Vom Wasser 36:64-92.
GOLWER, A., K.H. KNOLL, G. MATTHESS, W. SCHNEIDER & K.H. WALLHAEUSER, 1972. Mikroorganismen im Unterstrom eines Abfallplatzes. Gesundheits-Ingenieur 5: 142-152.
GOULDER, R. 1976. Relationship between suspended solids and standing crops and activities of bacteria in an estuary during a neap-spring-neap tidal cycle. Oecologia 24:83-90.
— 1977. Attached and free bacteria in an estuary with abundant suspended solids. J. Appl. Bact. 43:399-405.
— 1980. Seasonal variation in heterotrophic activity and population density of planktonic bacteria in a clean river. J. Ecol. 68:349-363.
HABER, W. 1959. Vergleichende Untersuchungen der Bodenbakterienzahlen und der Bodenatmung in verschiedenen Pflanzenbeständen. Flora 147: 1-34.
HOBBIE, J.E. & R.T. WRIGHT, 1965 . Bioassay with bacterial uptake kinetics: glucose in freshwater. Limnol. Oceanogr. 10: 471-474.
— 1968. A new method for the study of bacteria in lakes: description and results. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 14:64-71.
Verein. Limnol. 14: 64-71.
HUSMANN, S. 1972. Das ökologische Gleichgewicht im Grundwasser sandig-kiesiger Ablagerungen und seine Störung durch versickernde Verunreinigungen; mit besonderer Berücksichtigung vertikaler Infiltrationsvorgänge. Tagungsbericht der Gesellschaft für Oekologie, Tagung Giessen 1972: 89-96.
— 1974/75 . Versuche zur Erfassung der vertikalen Verteilung von Organismen und chemischen Substanzen im Grundwasser von Talauen und Terrassen; Methoden und erste Befunde. Int. J. Speleol. 6: 271-302.
— 1978 . Die Bedeutung der Grundwasserfauna für biologische Reinigungsvorgänge im Interstitial von Lockergesteinen. gwf-wasser/abwasser 119: 293-302.
JANNASCH, H.W. 1954. Kurze Mitteilung zur Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie bei bakteriologischen Wasseruntersuchungen. Ber. Limnol. Flussstation Freudenthal 6:60.
JANNASCH, H.W. & G.E. JONES, 1959. Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. Limnol. Oceanogr. 4: 128-139.
JONES, J.G. 1974. Some observations on direct counts of freshwater bacteria obtained with a fluorescence microscope - Limnol. Oceanogr. 19:540-543.
KUSNEZOW, S.I. 1959. Die Rolle der Mikroorganismen im Stoffkreislauf der Seen. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

MARXSEN, J. 1976. Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Bakterienpopulationen der fliessenden Welle in Mittelgebirgsbächen. Dissertation, Universität Kiel.

— 1980. Untersuchungen zur Oekologie der Bakterien in der fliessenden Welle von Bächen. III. Aufnahme gelöster organischer Substanzen. Schlitzer Produktionsbiologische Studien (23-3). Arch. Hydrobiol., Suppl. 58: 207-272.

— 1982. Ein neues Verfahren zur Untersuchung der bakteriellen Besiedlung grundwasserführender sandiger Sedimente. Arch. Hydrobiol. 95:221-233.

MATTHESS, G. 1973. Die Behaffenheit des Grundwassers. Gebrüder Bornträger, Berlin, Stuttgart.

— 1979. Die Grundwasserbilanz der Bundesrepublik Deutschland. Umschau 79: 144-149.

MESTROV, M. & R. LATTINGER-PENKO, 1977/78. Ecological investigations of the influence of a polluted river on surrounding interstitial underground waters. Int. J. Speleol. 9: 331-355.

OVERBECK, J. 1972. Zur Struktur und Funktion des aquatischen Oekosystems. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 85: 553-577.

— 1973. Ueber die Kompartimentierung der stehenden Gewässer - ein Beitrag zur Struktur und Funktion des limnischen Oekosystems. Verh. Ges. f. Oekologie 2 (Saarbrücken 1973): 211-223.

— 1975. Distribution pattern of uptake kinetik responses in a stratified eutrophic lake (Plussee ecosystem study IV). Verh. Internat. Verein. Limnol. 19: 2600-2615.

PARSONS. T.R. & J.D.H. STRICKLAND, 1962. On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in sea water. Deep-Sea Res. 8: 211-222.

PREUL, F. 1962. Gutachtliche Stellungnahme zur Frage einer Grundwassersenkung beim Wasserwerk der Stadt Fulda in der Johannesaue. Stadt werke Fulda (unpubl.).

REICHARDT, W. 1978. Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

RHEINHEIMER, G. 1977a. Mikrobiologische Untersuchungen in Flüssen. I. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bakterienflora einiger norddeutscher Flüsse. Arch. Hydrobiol. 81: 106-118.

— 1977b. Mikrobiologische Untersuchungen in Flüssen. II. Bakterienbiomasse in einigen norddeutschen Flüssen. Arch. Hydrobiol. 81: 259-267.

SCHMIDT, K. 1977. Grundwasserschutz und die Auswirkungen von Verunreinigungen auf die Nutzung unterirdischer Gewässer. In: Handbuch des Umweltschutzes, VOGL J., HEIGL A. & SCHAEFER K., Eds., Verlag Moderne Industrie, 1. Nachl.: 1-12

SCHWANTES, H.O. 1971. Mikroskopischer Nachweis von Mikroorganismen auf Membranfiltern nach Filtration aus Flüssigkeiten mit Hilfe der Akridinorange-Fluoreszenz. Microsc. Acta 70:236-238.

SCHWILLE, F., 1977. Grundwasserbelastung durch organische Substanzen. Oesterreichische Wasserwirtschaft 29: 308-313.

SEKI, H., T. NAKAI & H. OTOBE, 1974. Turnover rate of dissolved materials in the Philippine Sea at winter of 1973. Arch. Hydrobiol. 73: 238-244.

STEEMAN NIELSEN, E. 1952. The use of radio-active carbon (^{14}C) for measuring of organic production in the sea. J. Cons. Int. Explor. Mer 18: 117-140.

STRASKRABOVA, V. 1973. Methods for counting water bacteria-comparison mit Acridinorange. Zbl. Bakt., Abt. II, 127:25-40.

STRUGGER, S. 1949. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Verlag M. & H. Schaper, Hannover.

TROLLDENIER, G. 1972. Fluoreszenzmikroskopische Zählung von Bodenbakterien. I. Historischer Ueberblick und Beschreibung eines Verfahrens zur Zählung von Bodenbakterien in Trockenpräparaten nach Färbung mit Acridinorange. Zbl. Bakt. Abt. II, 127: 25-40.

WATSON, S.W., T.J. NOVITSKY, H.L. QUINBY & F.W. VALOIS, 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. 33: 940-946.

WETZEL, R.G. 1967. Dissolved organic compounds and their utilization in two marl lakes. Hidrol. Közl. 47: 298-303.

WILLIAMS, P.J. leB. 1973. The validity of the application of simple kinetic analysis to heterogeneous microbial populations. Limnol. Oceanogr. 18: 159-165.

WOLTERS, N. & W. SCHWARTZ, 1956. Untersuchungen über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganism in reinen Grundwässern. Arch. Hydrobiol. 51: 500-541.

WRIGHT, R.T. 1978. Measurement and significance of specific activity in the heterotrophic bacteria of natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 36: 297-305.

WRIGHT, R.T., & J.E. HOBBIE, 1965a. The uptake of organic solutes in lake water. Limnol. Oceanogr. 10:22-28.

WRIGHT, R.T. & J.E. HOBBIE, 1965b. The uptake of organic solutes by planktonic bacteria and algae. Ocean Science and Ocean Engineering Trans. Limnol. Oceanogr. Marine Technol. Soc. 1:116-127.

WRIGHT, R.T. & J.E. HOBBIE, 1966. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. Ecology 47:447-464.

ZIMMERMANN, R. & LA MEYER-REIL, 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. Kiel. Meeresforsch. 30: 24-27.

ZVYAGINSEV, G.G., 1973. Microbial ecology as studied by luminescence microscopy in incident light. Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm) 17: 61-65.