

# Copyright ©

---

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

# Eine einfache Methode zur Auszählung von Bakterien mit aktivem Elektronentransportsystem in Wasser- und Sedimentproben\*)

VON RODOLFO ITURRIAGA und GERHARD RHEINHEIMER

**Zusammenfassung:** Es wird eine einfache Methode beschrieben, die das Erkennen und Auszählen von Bakterienzellen mit aktivem Elektronentransportsystem in Wasser- und Sedimentproben ermöglicht. Sie beruht auf der Reduktion eines Tetrazoliumsalzes (INT) zu rotgefärbtem Formazan. Anhand von 3 Beispielen werden die Anwendungsmöglichkeiten der Methode diskutiert.

**A simple method for counting bacteria with active electron transport system in water and sediment samples (Summary):** A simple method is described whereby it is possible to recognize and count bacteria cells with active electron transport system in samples of water and sediment. It is based on the reduction of a tetrazolium salt (INT) to a red colored formazan. By means of 3 examples the uses of the method are discussed.

## Einleitung

Für die Beurteilung der bakteriologischen Verhältnisse von Gewässern ist nicht so sehr die Gesamtzahl der vorhandenen Bakterien von Bedeutung — wie sie durch direkte mikroskopische Auszählung ermittelt werden kann — als vielmehr die Zahl der aktiven Keime, die an den stofflichen Umsetzungsprozessen teilhaben. Dementsprechend sollte bei mikrobiologischen Untersuchungen von Wasser, Detritus und Sedimenten eine Differenzierung der aktiven und inaktiven Zellen angestrebt werden.

Ein Charakteristikum der atmenden Zelle ist ihr respiratorisches Elektronentransportsystem (ETS). Tetrazoliumsalze wie INT (2- (Iodophenyl 7-3- (p-Nitrophenyl)-5-Phenyl-2H-Tetrazoliumchlorid) bieten die Möglichkeit, die Aktivität des in der Zelle vorhandenen ETS zu bestimmen. Diese Salze dienen als  $H^+$ -Acceptoren und bilden stabile, gefärbte organische Verbindungen (Formazane), die in der Regel dort festgestellt werden können, wo sich aktive Dehydrogenasen befinden. Tetrazolium-Salze werden dementsprechend auch bei histochemischen Präparaten benutzt, um die Dehydrogenaseaktivität zu beobachten (GAHAM und KALINA, 1968).

Zur Bestimmung des respiratorischen Potentials im Plankton wurde von CURL und SANDBERG (1961) eine spektrophotometrische Methode für die Messung der Aktivität von Dehydrogenasen entwickelt. Die Tetrazolium-Reduktionsmethode wurde mit Erfolg für die Bestimmung der respirativen Elektronentransport-Aktivität des Planktons in Binnenseen und im Meer sowie in Sedimenten und Böden verwendet (PACKARD, HEALY und RICHARDS 1972, PACKARD 1971, MALICKY-SCHLATTE 1973 und SKUJINS 1973).

Die Reduktion des INT-Salzes kann aber auch zur Bestimmung der einzelnen aktiven Organismen dienen (siehe auch KADLECOVA 1965) und zwar sowohl von Phyto- und Zooplankton — als auch von Aufwuchsbakterien. Im folgenden wird eine Methode beschrieben, die sich besonders auch für die Ermittlung der Zahl der aktiven Bakterien in Wasser- und Sedimentproben eignet.

---

\*) Der Erstautor ist Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung.

## Methodik

Zur Darstellung des Elektronentransport-Systems in aktiven Zellen aus Wasser- und Sedimentproben wird durch Zusatz von INT die Bildung eines roten Formazans bewirkt. Als Elektronendonatoren dienen Natriumsuccinat, NADH und NADPH.

Es werden folgende mit Aqua bidest. hergestellte und durch Membranfilter mit  $0,2\ \mu$  Porenweite filtrierte Lösungen benötigt:

- a) 0,4 M Di-Natriumsuccinat
- b) 0,88 mM reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH)
- c) 0,25 mM reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH)
- d) 0,2 %iges 2-(Iodophenyl)-3-(p-Nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chlorid (INT).  
J. T. Baker Chem. B. V. Holland.

Die Lösungen sollten täglich frisch angesetzt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Zu jeweils 10 ml des zu untersuchenden Wassers oder einer Sedimentaufschwemmung wird die gleiche Menge entsprechendes zuvor sterilisiertes Wasser zugegeben und mit folgenden Substanzen versetzt: 0,5 ml Succinat-Lösung, 0,5 ml NADH-NADPH-Lösung, 1 ml INT-Lösung. Reaktion auf pH 7,7 einstellen. Sodann wird 30 Minuten lang bei einer Temperatur von  $20\ ^\circ\text{C}$  bebrütet und danach mit 0,15 ml Formaldehyd fixiert. 1 oder 2 ml dieser Proben werden durch Nuclepore Filter (Shandon) mit  $0,2\ \mu$  Porenweite filtriert. Anschließend werden die Filter nachgewaschen.

Auf den Filtern kann noch eine Differentialfärbung der Zellwand erfolgen. Dazu sind folgende Lösungen herzustellen:

1. Molybdätposphorsäure 1% in Aqua dest. Diese Stammlösung ist vor Benutzung 1 : 10 mit Aqua dest. zu verdünnen.
2. Methylgrün 1% in Aqua dest. Die Stammlösung wird vor Benutzung mit Formaldehyd und Aqua dest. im Verhältnis 1 : 5 : 5 verdünnt.

Auf die bebrüteten und mit 2 ml Aqua dest. nachgewaschenen Filter wird 1 ml Molybdätposphorsäurelösung gegeben, 1 Minute stengelassen, dann bei 0,5 atü filtriert und mit 3 ml Aqua dest. nachgespült, danach 1 ml der Methylgrün-Lösung dazugeben und 3 Minuten stehenlassen, durchfiltrieren, nachspülen mit 3–4 ml Aqua dest., an der Luft trocknen.

Zur mikroskopischen Untersuchung werden kleine Filterstücke herausgeschnitten und auf Objektträger gelegt, mit Immersionsöl aufgehellt und mit einem Deckglas bedeckt. Zum Mikroskopieren werden blaue Lichtfilter zur besseren Unterscheidung benutzt.

Organismen mit aktivem Elektronentransport-System sind in den aktiven Zellbereichen rot gefärbt. Die rote Farbe des Formazans bleibt in den fixierten Zellen stabil. Die Zellwand hingegen hat eine hellgrüne Färbung angenommen. Man kann die roten aktiven und die grünen nichtaktiven Bakterienzellen gut unterscheiden und getrennt auszählen. Bei größeren Zellen lassen sich meist mehrere Stellen mit aktivem Elektronentransportsystem erkennen. Besonders eindrucksvoll ist dieses bei Planktonalgen, Protozoen und kleinen Metazoen.

## Anwendungsbeispiele

In Wasserproben aus der Kieler Förde wurde der Anteil der aktiven Keime an der Gesamtzahl der Bakterien ermittelt, wobei für die letztere die fluoreszenzmikroskopische

### Tafel 1 (zu R. ITURRIAGA und G. RHEINHEIMER)

#### WASSERPROBE KIELER FÖRDE

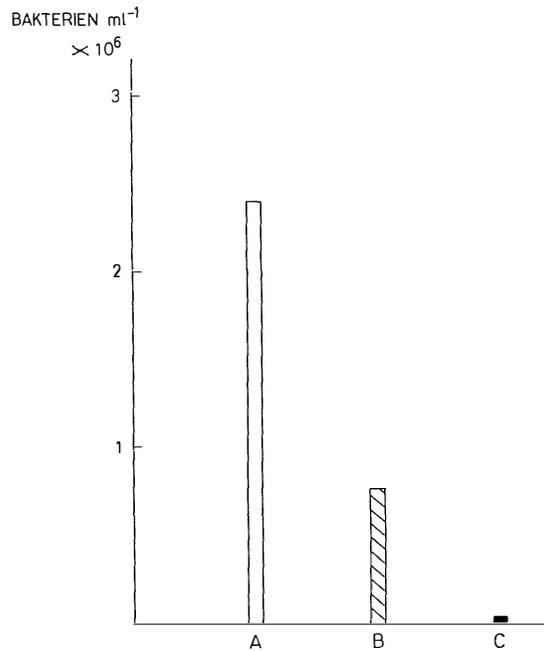


Abb. 1: Gesamtzahl der Bakterien (A), Zahl der Bakterien mit aktivem Elektronentransportsystem (B) und Saprophytenzahl (C) in einer Wasserprobe aus der Kieler Förde.

#### ABWASSERPROBE

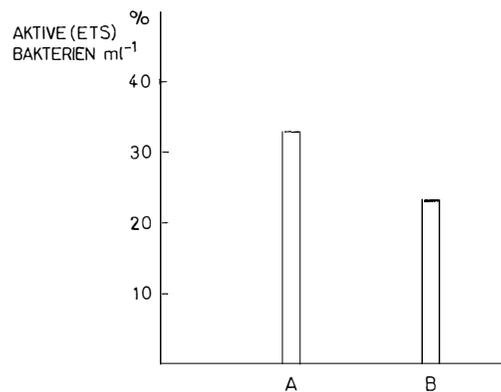


Abb. 2: Prozentualer Anteil der Bakterien mit aktivem ETS in mit Leitungswasser (A) und mit Ostseewasser (B) im Verhältnis 1 : 10 verdünntem Abwasser der Stadt Kiel.

Tafel 2 (zu R. ITURRIAGA und G. RHEINHEIMER)

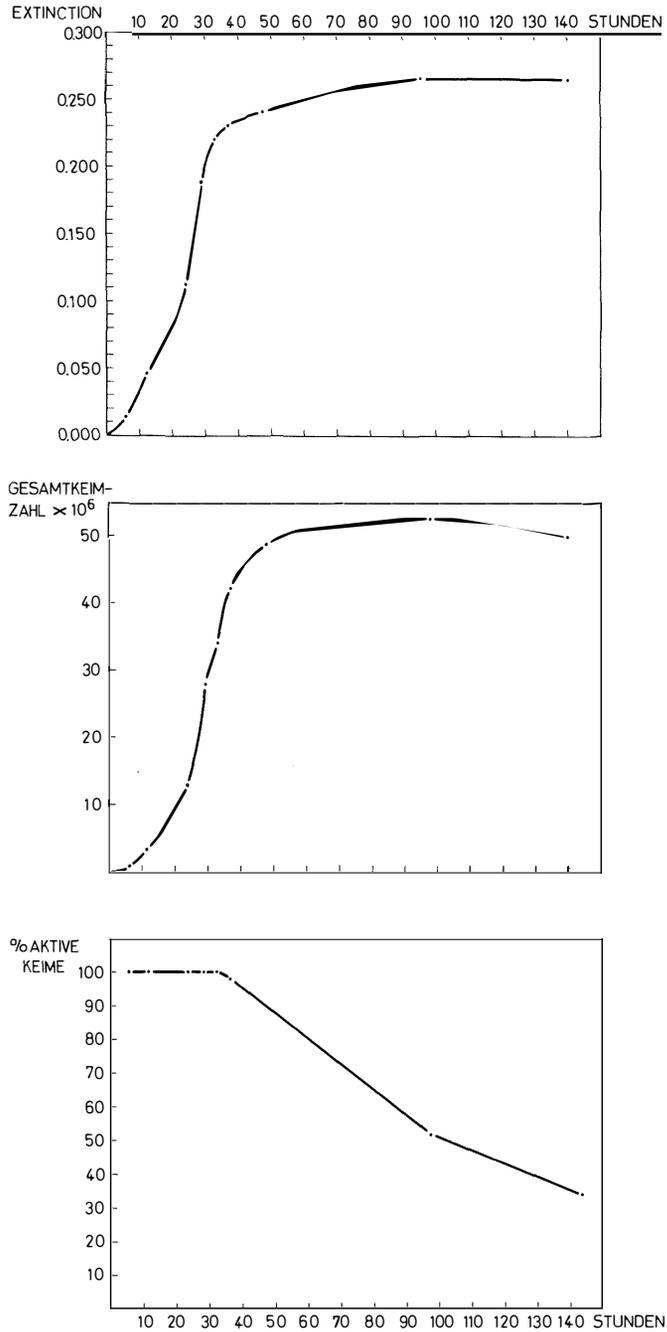


Abb. 3: Wachstumskurven eines Photobacterium-Stammes (oben und mitte) sowie prozentualer Anteil der Bakterien mit aktivem ETS (unten).

Methode nach ZIMMERMANN und MEYER-REIL (1974) Anwendung fand, mit der auch die kleinsten Zellen erfaßt werden können. Zu Vergleichszwecken erfolgte auch die Bestimmung der Saprophytenzahl auf Hefeextrakt-Pepton-Agar nach ZOBELL. Ein Beispiel gibt Abbildung 1. Danach liegt der Anteil der aktiven Bakterien bei 33% und der der Saprophyten bei 1,6% der Bakteriengesamtzahl. Bei einer anderen Probe belief er sich auf 19,3% bzw. 2,8%.

Ein interessantes Ergebnis brachte auch der Vergleich einer Abwasserprobe aus dem Hauptsammler der Stadt Kiel, die mit Süßwasser und parallel dazu mit Ostseewasser mit einem Salzgehalt von 20‰ (jeweils im Verhältnis 1 : 10) verdünnt wurde. Wie Abbildung 2 zeigt, belief sich der Anteil der aktiven Bakterien in dem mit Süßwasser verdünnten Abwasser auf 33% — in dem mit Ostseewasser verdünnten dagegen auf nur 23% der gesamten Bakterienzahl.

Mit einigen Reinkulturen mariner Bakterien wurde die Veränderung des Anteils der aktiven Zellen an der Gesamtzahl in den verschiedenen Wachstumsphasen untersucht. In der Regel betrug der Anteil der aktiven Bakterien in der logarithmischen Phase etwa 100% und begann nach Erreichen der stationären Phase zunächst langsam und dann rascher zurückzugehen. Ein gutes Beispiel geben die in Abbildung 3 dargestellten Wachstumskurven eines Leuchtbakteriums (Stamm 147), das aus dem Persischen Golf isoliert wurde. Die Geschwindigkeit des Rückgangs der Zellen mit aktivem Elektronentransportsystem hängt von Art und Kulturbedingungen des geprüften Bakterienstammes ab.

Schon diese wenigen Beispiele zeigen die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten der beschriebenen Methode. Ein gewisses Problem stellen jedoch die sehr kleinen meist kokkoiden Bakterien mit einem Zelldurchmesser von weniger als 0,2  $\mu$  dar. Denn bei diesen kann die Färbung auch bei Verwendung eines sehr leistungsfähigen Mikroskops oft nicht mehr eindeutig festgestellt werden. Sie lassen sich nur mit Hilfe der oben erwähnten fluoreszenzmikroskopischen Methode erkennen, bei der eine sichere Unterscheidung von aktiven und inaktiven Zellen nicht möglich ist. Daher ist bei Betrachtung der Zellzahl in Wasser- und Sedimentproben (s. Abb. 1) der Anteil der aktiven Formen wahrscheinlich in Wirklichkeit etwas größer. Betrachtet man dagegen die bakterielle Biomasse, so ist dieser Fehler im Hinblick auf die geringe Größe der nicht mehr sicher erfaßbaren aktiven Bakterien kaum von Bedeutung.

#### Literaturverzeichnis

- CURL, H. jr. und SANDBERG, J. (1961): The measurement of dehydrogenase activity in marine organisms. *J. mar. Res.* **19**, 123—138.
- GAHAM, P. B. und KALINA, M. (1968): The use of tetrazolium salts in the histochemical demonstration of succinic dehydrogenase activity in plant tissues. *Histochemie* **14**, 81—88.
- KADLECOVA, O. (1965): Zitiert nach DAUBNER, I. (1972): *Mikrobiologie des Wassers*. BLV München, 440 S.
- MALICKY-SCHLATTE, G. (1973): Über die Dehydrogenaseaktivität im Sediment des Lunzer Untersees. *Arch. Hydrobiol.* **72**, 525—532.
- PACKARD, T. T. (1971): The measurement of respiratory electrontransport activity in marine phytoplankton. *J. mar. Res.* **29**, 235—243.

- PACKARD, T. T., HEALY, M. L. und RICHARDS, F. A. (1971): Vertical distribution of the activity of the respiratory electron transport system in marine plankton. *Limnol. Oceanogr.* **16**, 60—70.
- SKUJINS, J. (1973): Dehydrogenase: An indicator of biological activities in arid soils. *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)* **17**, 235—241.
- ZIMMERMANN, R. und MEYER-REIL, L.-A. (1974): A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforsch.* **30**, 1, 24—27.