

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.

Untersuchungen über die Ausbreitung und Vermehrung von *E. coli* in Schlicksedimenten von Küstengewässern*

VON JENNY SIMMANN und GERHARD RHEINHEIMER

Zusammenfassung: 1. Versuche zur Vermehrung und Einwanderung von Colibakterien ins Sediment erfolgten mit dem Teststamm *E. coli* K 12. Dessen Verhalten wurde in Labor- und Freilanduntersuchungen überprüft und in Abhängigkeit vom Salz-, Nährstoff- und Schwefelwasserstoffgehalt diskutiert.

2. Einwanderung und Vermehrung von *E. coli* K 12 im Sediment konnte im Laborversuch in speziell dafür konstruierten Säulen beobachtet werden. Im sterilisierten Schlicksediment wurde aktive Einwanderung von *E. coli* K 12 mit recht gleichmäßiger Geschwindigkeit festgestellt. Im unsterilisierten Sediment erfolgte die Einwanderung mit erheblich höherer Geschwindigkeit. Dieses kann auf einen passiven Transport der Bakterien durch Würmer oder andere schlickbewohnende Tiere zurückzuführen sein.

3. Eine Vermehrung von *E. coli* K 12 wurde im Laborversuch nur in sterilisiertem Brackwasser-sediment festgestellt. In allen anderen Proben starben die Keime mehr oder weniger schnell ab.

4. Freilanduntersuchungen im Watt der Nordsee zeigten, daß unter natürlichen Verhältnissen das Absterben von *E. coli* im Sediment erheblich langsamer erfolgt als im Seewasser gleichen Salzgehaltes.

Investigation on the migration and multiplication of *Escherichia coli* in mud sediments of coastal waters (Summary): 1. Experiments on the reproduction and migration of coli bacteria in sediment were carried out with the test strain *E. coli* K 12. The behavior of this strain was investigated during laboratory and outdoor experiments, and discussed with regard to the concentration of salt, nutrients and hydrogen sulfide.

2. Migration and multiplication of *E. coli* K 12 in sediment could be observed in laboratory experiments with cylinders specially constructed for this purpose. The active migration of *E. coli* K 12 in sterilized mud sediment was found to take place at a uniform rate. The migration in unsterilized sediment occurred with much greater rapidity. This could be the result of passive transport of the bacteria by means of worms or other animals living in the sediment.

3. In laboratory experiments, a multiplication of *E. coli* K 12 was found only in sterilized brackish water sediment. In all other samples the bacteria died off more or less rapidly.

4. Outdoor experiments in the muddy beach of Nordstrand showed that under natural conditions the dying off of *E. coli* in sediment occurs much more slowly than in seawater with the same salinity.

1. Einleitung

Coliforme Bakterien gelangen vor allem durch Abwassereinleitung in die Gewässer. Sie dienen in der Wasserhygiene als Anzeigerorganismen für fäkale Verunreinigungen, daher muß bei ihrem Vorkommen auch mit einem Vorhandensein von pathogenen Darmbakterien gerechnet werden. Es ist bekannt, daß Coliforme im Meer und auch in vielen Binnengewässern relativ schnell absterben (RHEINHEIMER 1967). Dennoch lassen sie sich in Sedimenten häufig nachweisen (s. WEYLAND 1967).

Die Frage, ob hier eine Vermehrung der Darmbakterien stattfinden kann, ist oft in der Literatur aufgeworfen worden.

Als ein Beispiel sei eine Untersuchung von BROEK und MOM (1954) genannt, die eineinhalb Jahre nach einer Paratyphusepidemie in einer kleinen holländischen Stadt nur in Schlamm-, nicht aber in Wasserproben der Poldergräben, in die die Abwässer

*) Die Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

der Stadt eingeleitet wurden, lebende Typhuskeime nachweisen konnten. Sie äußerten daher die Vermutung, daß sich die Typhusbakterien im Schlamm nicht nur behauptet sondern sogar vermehrt hätten.

Es liegen nur wenige Untersuchungen über eine Vermehrung von Darmbakterien im Sediment vor und die Beantwortung der Frage ist uneinheitlich. Die meisten Ergebnisse wurden zudem im Sandsediment gewonnen. SADJEDI (1971) konnte keine Vermehrung von *E. coli* und Coliformen im Sandsediment der Kieler Bucht nachweisen. TILOVA (1957 und 1959, zit. nach DAUBNER 1972) stellte eine Vermehrung von *E. coli* in Sedimenten russischer Seen besonders während der Frühjahrs- und Sommermonate fest.

Wegen dieser uneinheitlichen Beurteilung erschien es interessant, in einer Untersuchung die Frage nach Ausbreitung (bzw. Einwanderung) und Vermehrung von Darmbakterien in Schlicksedimenten zu klären.

Die Untersuchungen wurden vergleichend in Nord- und Ostseeproben unterschiedlichen Salzgehalts vorgenommen.

2. Methoden

2.1 Probenentnahme

Die Sedimentproben wurden vom Schiff aus mit dem Backengreifer, der sich oben durch zwei Klappen öffnen läßt, genommen. Aus der Oberflächenschicht des Sedimentes bis zu 2 cm Tiefe wurde mit Spatel und abgeschnittener Spritze unter sterilen Bedingungen jeweils 1 cm³ Sediment entnommen, in sterile Verdünnungsflaschen gegeben und sofort zur Keimzahlbestimmung an Bord weiterverarbeitet. Zur Bestimmung des Trockengewichts und der organischen Substanz wurden außerdem ca. 50 cm³ Sediment entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in Plastiktöpfen eingefroren.

Die Sedimentprobenentnahme von Land aus erfolgte unter sterilen Bedingungen mit Spatel und abgeschnittener Spritze oder — in größeren Tiefen des Sediments — mit Kanülen und sterilen Einwegspritzen.

Vor dem Autoklavieren wurde den V2AStahl-Kanülen von 3,5 mm Durchmesser ein Silikonschlauch von ca. 5 cm Länge aufgesetzt. Auf diese Schläuche wurden dann vor der Probenentnahme sterile Einwegspritzen mit abgeschnittener Spitze gesetzt, um das Aufsaugen des Sediments zu erleichtern. Die ersten 2 ml des aufgesogenen Sedimentes wurden stets verworfen. Zur Weiterverarbeitung wurde 1 cm³ des erneut aufgesogenen Sedimentes benutzt.

Wasserproben wurden in autoklavierten Sektflaschen mit Hilfe von ZoBell-Schöpfern von Bord aus steril entnommen und sofort weiterverarbeitet. Für die Entnahme der Proben für die chemische Untersuchung des Wassers fanden Nansen-Schöpfer Verwendung, in die zur Temperaturmessung Kippthermometer eingebaut waren.

2.2 Ermittlung der Coliformenzahl

Wegen der einfachen Handhabung (HALLS und AYRES 1974) und der größeren Ergiebigkeit (HENDERSON 1959) wurde die Coliformenzahl auf Endo-Nährkartonscheiben (NKS) (Sartorius Membranfilter GmbH, Contr.-Nr. SM 14003) bestimmt. Die Kolonien der coliformen Bakterien erscheinen dunkel- bis hellrot und zeigen zum Teil Fuchsin- glanz.

Da jedoch bekannt ist, daß die Werte auf NKS viel zu hoch sein können, wurde zusätzlich eine Bestimmung der Coliformenzahl auf dem Dreifarben Nährboden nach GASSNER (1918) (abgekürzt: G) (modifiziert nach „Mikrobiologisches Handbuch“ MERCK) vorgenommen.

Als Bebrütungstemperatur wurde nach Vorversuchen 37 °C ausgewählt, um eine möglichst vollständige Erfassung aller Coliformen zu gewährleisten (s. a. SADJEDI 1971).

2.3 Bestimmung der Koloniezahl

Direkt nach der Probenentnahme wurde der Bakteriengehalt der Sediment- und Wasserproben nach der KOCH'SCHEN Gußplattenmethode bestimmt. Man bezeichnet die so erhaltene Bakterienzahl in der Literatur häufig als Saprophytenzahl. Sie entspricht der Koloniezahl in den DEUTSCHEN EINHEITSVERFAHREN (1960).

Als Nährmedium diente das ZoBell-Medium (s. SCHLIEPER 1968, abgeändert, ohne $\text{FePO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) mit abgestuftem Salzgehalt.

Salzwassermedium (ZS)	25 ⁰ / ₀₀ Salzgehalt
Brackwassermedium (ZB)	8 ⁰ / ₀₀ Salzgehalt
Süßwassermedium (ZL)	

Zur Aufteilung von Bakterienaggregaten und zur Abtrennung der Bakterien von Sedimentpartikeln wurden die Sedimentproben in der ersten Verdünnungsstufe (10^{-2}) zwei Minuten mit dem Ultra-Turrax (GUNKEL 1964) behandelt. Wasserproben wurden zwei Minuten geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu erreichen. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 20 °C und die Auszählung nach 14 Tagen. Die Werte werden angegeben als Koloniezahl pro 1 ml Feuchtsediment (FS) oder pro 1 ml Probenwasser.

2.4 Charakterisierung der Sedimente

Um einen Eindruck von der Art eines Sedimentes zu gewinnen, wurden folgende Kriterien herangezogen:

- Grobe Einteilung des Sedimentes nach seiner Korngröße (z. B. Grobsand, Feinsand, Schlack, Schlicksand usw.).
- Kurze Beschreibung des äußeren Erscheinungsbildes (z. B. Dicke von aeroben Schichten, evtl. Vorhandensein eines Schwefelwasserstoffmilieus, unmittelbar auffallende Besiedlung von Muscheln, Polychaeten, etc.).
- Bestimmung des Wassergehaltes (s. DEUTSCHE EINHEITSVERFAHREN 1960). Die Werte werden angegeben als % Wassergehalt pro 1 g Feuchtgewicht des betreffenden Sedimentes.
- Bestimmung der organischen Substanz. Die Werte werden angegeben als % Glühverlust (s. DEUTSCHE EINHEITSVERFAHREN 1960) pro 1 g Feuchtgewicht des Sedimentes.

2.5 Teststamm

Als Teststamm diente eine Reinkultur des Stammes *E. coli* K 12 aus dem Institut für Genetik in Köln, der sich seit 1969 in der Abteilung Marine Mikrobiologie im Institut für Meereskunde in Kiel befindet. Er wurde als bewegliches Stäbchen von 2–3 μ Länge identifiziert, das auf NKS — bei gleicher Größenordnung der Zellzahl — gleichmäßig große Kolonien mit Fuchsinglanz bildet.

Um die Versuchsergebnisse besser interpretieren zu können, wurden außer der mikroskopischen und biochemischen Differenzierung die Salzgehaltansprüche des Teststammes in einer Salzreihe (s. MEYER-REIL 1973) überprüft.

Wie aus der Abbildung 1 zu ersehen ist, liegt das Optimum zwischen 10 und 15⁰/₀₀ NaCl. Da es sich bei *E. coli* K 12 nicht um ein marines Bakterium handelt, muß der Teststamm, wie auch in Nachuntersuchungen bestätigt werden konnte, als osmophil angesprochen werden.

2.6 Versuchsaufbau

Für einen Teil der Untersuchungen wurden, angeregt durch eine Arbeit von KRUMBEIN (1970), Plexiglassäulen konstruiert, um das Vermehrungs- und Einwanderungsverhalten des Teststammes besser beobachten zu können. Sie bestehen aus einem Plexiglaszylinder von etwa 1 m Länge und 10 cm Durchmesser, der sich oben und unten öffnen läßt. Seitlich in die Säule sind in bestimmten Abständen Löcher gebohrt, die mit Gummistopfen verschlossen werden können. Die Säule kann entweder von oben unter sterilen Bedingungen mit Sediment gefüllt oder es kann auf Grund ihrer Konstruktion ein natürlicher Schlickkern im Freiland ausgestochen werden. Nach Füllung der Säule werden sterile V2A-Kanülen, auf die ein für die Säulenlöcher passender Gummistopfen gezogen ist, in die gewünschten Probenentnahmetiefen des Sedimentkernes eingesetzt. Auf dem nach außen ragenden Teil der Kanülen sitzt ein Siliconschlauch, der mit einer Klemmschraube verschlossen werden kann. Auf diese Schläuche werden zur Probenentnahme sterile 2 ml Einwegspritzen mit abgeschnittener Spitze gesetzt, die Klemmschraube geöffnet und so das Sediment der jeweiligen Tiefe vorsichtig aufgesogen.

Das wird bei jeder Probenentnahme einmal wiederholt, um zu verhindern, daß das in dem Kanülen- und Schlauchvolumen verbliebene Sediment der vorangegangenen Probe die Versuchsergebnisse verfälscht.

Die Sterilisation der Plexiglassäulen erfolgt durch zweiwöchige Bestrahlung mit UV-Licht. Die Sterilität ist vor Versuchsbeginn zu überprüfen.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

In einem Vorversuch wurde das Verhalten von *E. coli* K 12 zunächst einmal in sterilisiertem Seewasser überprüft, um alle weiteren Versuchsergebnisse besser interpretieren zu können.

Die sterilisierte Plexiglassäule wurde dazu mit autoklaviertem Seewasser von 32⁰/₀₀ Salzgehalt gefüllt und mit einer *E. coli* K 12 Suspension vorsichtig von oben beimpft. In verschiedenen Säulentiefen konnten dann nach 3, 6 und 11 Stunden Proben entnommen und die Colizahlen bestimmt werden.

Dabei zeigte sich ein auffälliger Rückgang der Colizahlen während der ersten drei Stunden und danach ein stetiges weiteres Abfallen der Zahlen. Nach 21 Stunden konnten nur noch in der Oberflächenprobe lebende Colikeime nachgewiesen werden. (s. Abb. 4).

Damit decken sich die Ergebnisse ganz eindeutig mit den Angaben in der Literatur, wo immer wieder auf ein rasches Absterben von Coliformen und anderen nicht marinen Bakterien in Seewasser hingewiesen wird (RHEINHEIMER 1966, BONDE 1967, KETCHUM, AYRES und VACCARO 1952).

3.2.1 Verhalten von *E. coli* K 12 in sterilisiertem Schlicksediment

Zur Beantwortung der in der Untersuchung gestellten Frage sollte zunächst einmal geklärt werden, ob eine Einwanderung und Vermehrung von *E. coli* im Sediment ohne die etwaige Beeinflussung durch andere Organismen möglich ist.

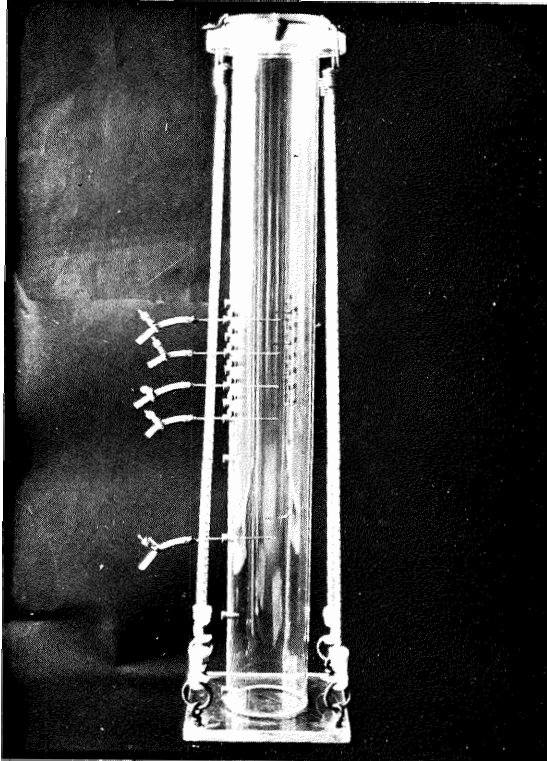


Abb. 2: Plexiglassäule zur Untersuchung des Vermehrungs- und Einwanderungsverhaltens von Bakterien in Sedimenten

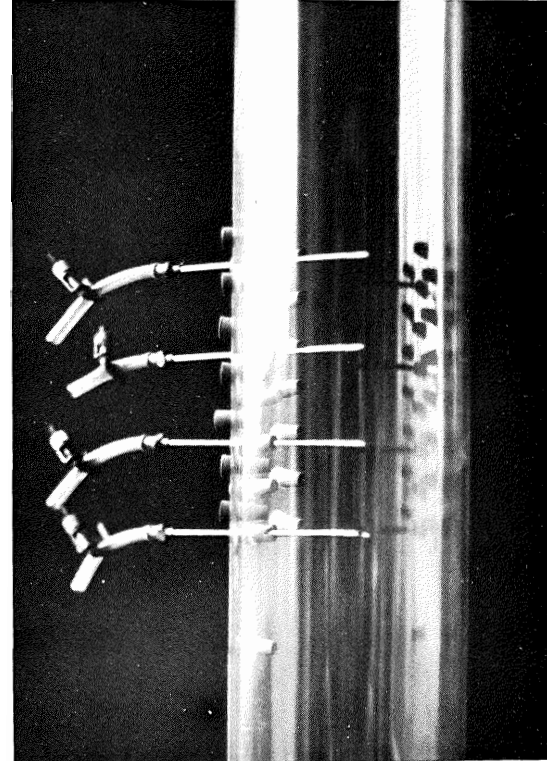


Abb. 3: Ausschnitt der Plexiglassäule mit eingesetzten Kanülen.

Tafel 2 (zu J. SIMMANN und G. RHEINHEIMER)

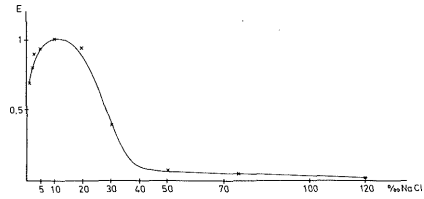


Abb. 1: Salzkurve von E. coli K 12.

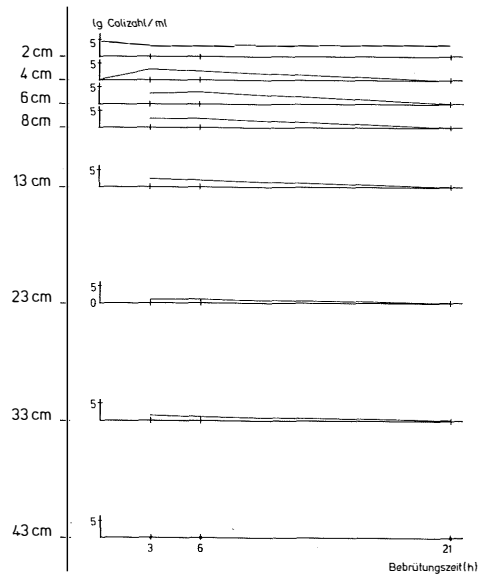


Abb. 4: Ergebnisse der Colizahlbestimmungen auf NKS in der Säule mit sterilisiertem Seewasser. Auffällig ist der starke Rückgang der Colizahl während der ersten drei Stunden um etwa zwei Zehnerpotenzen. Nach 21 Stunden sind nur noch in der Oberflächenprobe lebende Colikeime nachzuweisen.

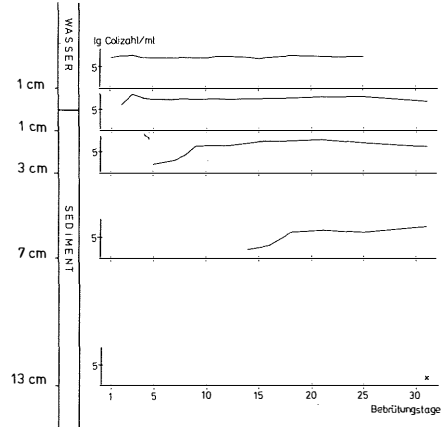


Abb. 5: Colizahlbestimmungen auf NKS in der Säule mit sterilisiertem Brackwasserschlicksediment der Schlei.

Folgender Aufbau wurde für die Versuche benutzt: Das mit dem Ultra-Turrax homogenisierte und anschließend autoklavierte Sediment jeder Probe wurde in die sterile Plexiglassäule eingefüllt und mit ebenfalls autoklaviertem Wasser des gleichen Probenstandortes überschichtet. Da das Schlicksediment nach seiner Einfüllung gewöhnlich etwas zusammensackte und außerdem ein Temperatenausgleich in der gesamten Säule geschaffen werden sollte, stand es einen Tag bei der Bebrütungstemperatur ab. Danach wurde in das überstehende Wasser mit einer bekannten Impfmenge einer E. coli K 12 Suspension beimpft. Die Versuche wurden stets abgebrochen, sobald E. coli K 12 in der größten Probenentnahmetiefe festzustellen war.

Es muß noch erwähnt werden, daß Bakterien in der Säule, bedingt durch die Art der Probenentnahme, stets erst ab einer Größenordnung von 10^2 Keimen pro ml nachgewiesen werden konnten.

Als geeignete Bebrütungstemperatur erwiesen sich nach Voruntersuchungen $20\text{ }^\circ\text{C}$. Die Sedimente beider Proben lassen sich folgendermaßen kurz charakterisieren:

- a) Station: Schlei, Große Breite
 Datum: 13. 2. 1974
 Aussehen: Schwarzer, an der Oberfläche weicher, in tieferen Schichten zäher Schlick mit Blatt- und Muschelresten. Auffallend war starker H_2S -Geruch, auch nach dem Autoklavieren.
 Wassergehalt: 72,5%
 Glühverlust: 4,85%
 Koloniezahlen: ZS 27×10^6
 ZB 30×10^6
 ZL 21×10^6
 N 13×10^5
 Coliformenzahl: NKS 1×10^4
 G 3×10^4
 Temperatur des überst. Wassers: $5,6\text{ }^\circ\text{C}$
 Salzgehalt des überst. Wassers: $5,58^0/_{00}$
- b) Station: Ostsee, Kieler Bucht (KBM II)
 Datum: 18. 4. 1974
 Aussehen: Schlick mit ca. 2 cm dicker bräunlicher heller Oberfläche, in tieferen Schichten schwarz und von festerer Konsistenz, von großen Muscheln besiedelt und schwach H_2S haltig (nach dem Autoklavieren nicht mehr feststellbar).
 Wassergehalt: 48,7 %
 Glühverlust: 2,46%
 Koloniezahlen: ZS 31×10^4
 ZB 45×10^4
 ZL 25×10^3
 N 35×10^3
 Coliformenzahl: NKS —
 G 75

Salzgehalt: 12,15‰
Temperatur des überst. Wassers: 5,4 °C
Salzgehalt des überst. Wassers: 16,21‰

Das erste auffallende Ergebnis ist, daß *E. coli* K 12 befähigt ist, unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in Sedimente einzuwandern. Die Einwanderung vom überstehenden Wasser in die Oberflächenschichten des Sediments erfolgte sehr schnell. Einen Tag nach der Beimpfung waren bis zu 1 cm Sedimenttiefe bereits 10^6 Keime pro ml nachzuweisen.

Die Einwanderungsgeschwindigkeit war so hoch, daß sie sicherlich nicht nur durch ein passives Absinken der Keime erklärt werden kann sondern auf ein aktives Zubewegen der Keime auf das Sediment zurückgeführt werden muß. Auch das weitere Eindringen in tiefere Sedimentschichten dürfte auf aktive Reaktionen der beweglichen Keime zurückzuführen sein. Die Möglichkeit eines leichteren Eindringens der Keime auf Grund einer Beeinflussung durch die Säulenwandung konnte nach Überprüfung ausgeschlossen werden. Die Einwanderungsgeschwindigkeit in tiefere Sedimentschichten betrug, wie sich aus den Abbildungen 5 und 6 ablesen läßt, im Falle des Brackwasserschlicksedimentes ca. 1 cm pro Tag.

Es ist anzunehmen, daß der größere Schwefelwasserstoffgehalt des Schleisedimentes sich negativ auf die Einwanderungsgeschwindigkeit ausgewirkt hat. Da davon auszugehen ist, daß ein kleinerer Gehalt an organischer Substanz und ein größerer Salzgehalt sich negativ auf *E. coli* auswirken, sich aber im Ostseesediment unter diesen Voraussetzungen eine größere Einwanderungsgeschwindigkeit ergab, scheinen diese beiden Faktoren hier keinen Einfluß gehabt zu haben.

Zur Feststellung einer Vermehrung in den Sedimenten wurde die Gesamtmenge der *E. coli* K 12 Keime in der Säule für mehrere Versuchstage errechnet und der Impfmenge in einer graphischen Darstellung gegenübergestellt. Da die Ausrechnung jedoch nur überschlagsmäßig erfolgen konnte, handelt es sich nicht um Werte, die die genaue Anzahl der Colibakterien in der Säule zu einem bestimmten Zeitpunkt angeben können. Sie vermag somit nur die jeweiligen Tendenzen aufzuzeigen.

Die Gesamtcolimenge des Sedimentes stieg in der Schleiprobe (vgl. Abb. 7 oben) ständig an, so daß sich am letzten Tag eine Vermehrung um etwa das Siebzehnfache der Impfmenge ergab. Dagegen ließen sich in der Ostseeprobe am letzten Tag nur noch zwei Drittel der Impfmenge im Sediment feststellen.

In der Schleiprobe vermehrten sich die Colibakterien also stark, während ihre Zahl in der Ostseeprobe insgesamt abnahm. Diese unterschiedlichen Ergebnisse dürften in erster Linie auf die verschiedenen Nährstoffgehalte der Sedimente zurückzuführen sein. Es liegt nahe, daß der Nährstoffgehalt des Ostseesedimentes zu gering ist, um insgesamt eine Vermehrung von *E. coli* zu gestatten.

Demgegenüber scheint der höhere Schwefelwasserstoffgehalt im Schleisediment einer Vermehrung der Colibakterien nicht entgegengewirkt zu haben. Ferner ist unwahrscheinlich, daß der höhere Salzgehalt des Ostseesedimentes mit dazu beigetragen hat, eine Vermehrung zu verhindern. Aus der Überprüfung der Salzgehaltsansprüche muß nämlich geschlossen werden, daß *E. coli* K 12 bei günstigen Nährstoffbedingungen bei 12‰ Salzgehalt optimales Wachstum zeigt. Somit dürfte der Nährstoffgehalt die Vermehrung entscheidend beeinflußt haben.

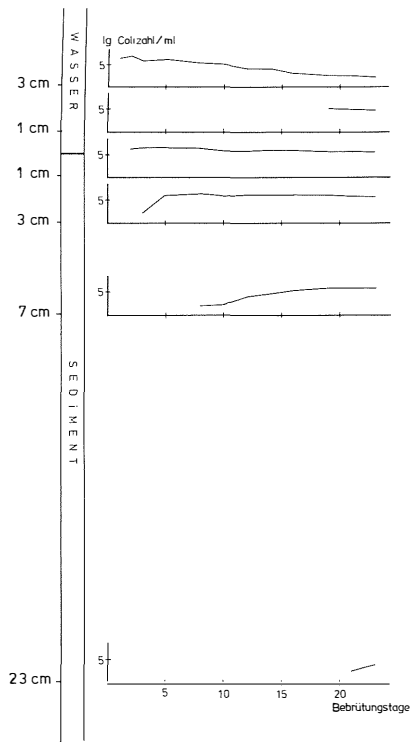


Abb. 6: Ergebnisse der Colizahlbestimmungen auf NKS des Säulenversuches mit sterilisiertem Schlicksediment der Ostsee. Die 1 cm Probe im überstehenden Wasser wurde erst gegen Ende des Versuches eingeführt.

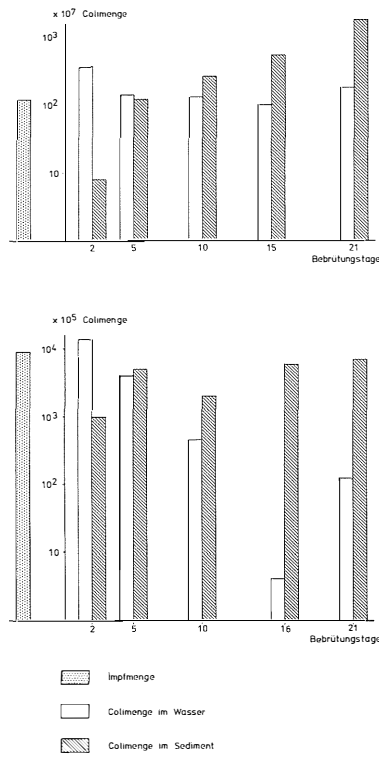


Abb. 7: Darstellung der Colimenge in der Säule bei den Versuchen mit sterilisiertem Schlicksediment (Schleisediment oben, Ostseesediment unten).

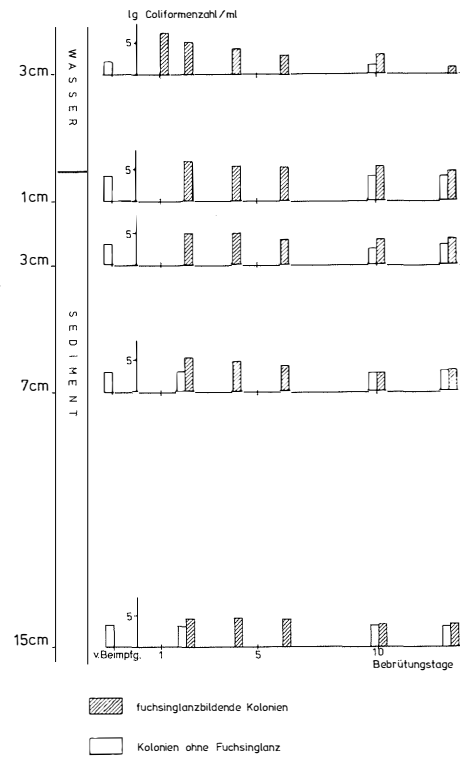


Abb. 8 Ergebnisse der Coliformenzahlbestimmungen auf NKS in dem Säulenversuch mit natürlichem Schlickkern.

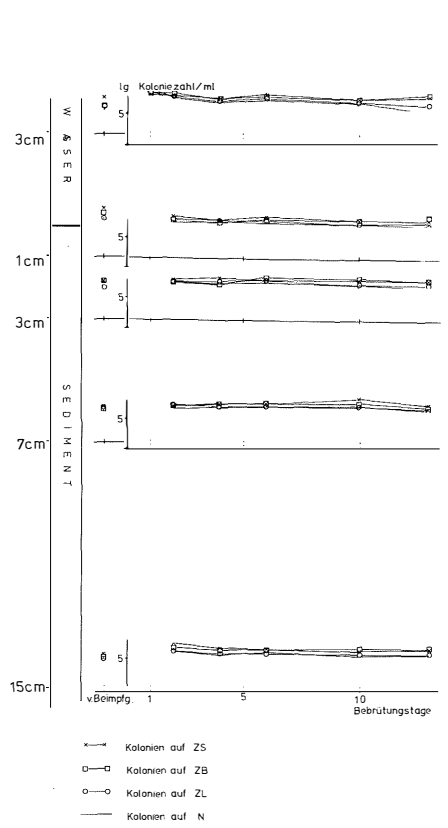


Abb. 9: Ergebnisse der Koloniezahlbestimmungen in dem Säulenversuch mit natürlichem Schlickkern.

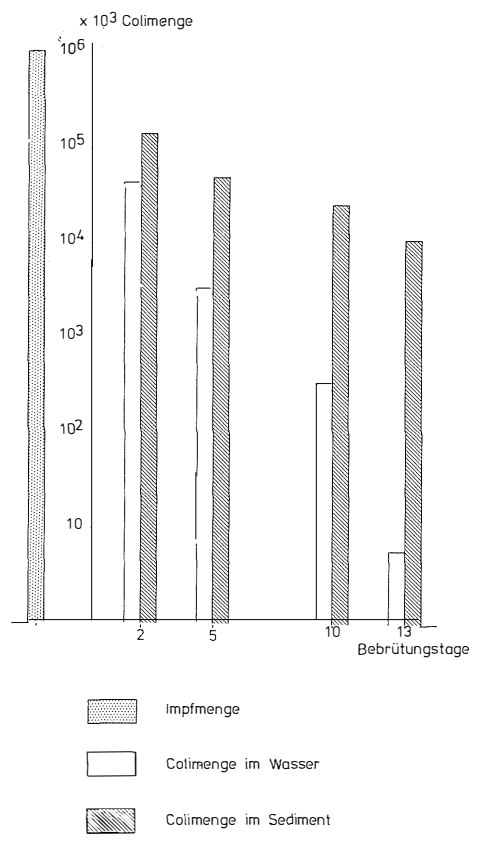


Abb. 10: Darstellung der Vermehrungs- und Absterberaten der E. coli K12 Keime im Säulenversuch mit natürlichem Schlickkern.

3.2.2 Verhalten von E. coli K 12 in nichtsterilisiertem Schlicksediment

Um im Laborversuch festzustellen, inwieweit sich die bisherigen Ergebnisse im sterilen Sediment auf unsterilisiertes übertragen lassen, wurde ein natürlicher Bohrkern aus Schlicksediment im überstehenden Wasser mit einer E. coli K 12 Suspension beimpft und bei in situ Temperatur bebrütet. Das Sediment wurde wie folgt charakterisiert:

Station: Nordsee, Nordstrand, südlich des Dammes
Datum: 7. 6. 1974
Aussehen: Schlicksediment mit hauchdünner brauner Oberflächenschicht und ca. 3 cm dicker hellgrau-bräunlicher aerober Schicht, darunter schwarz und erheblich zäher, H₂S-Geruch war kaum wahrnehmbar.
Das Sediment war mit Würmern (Nereis und andere Polychaeten) besiedelt, ca. 5—10 Wurmlöcher wurden pro 1 dm² gezählt.

(Werte für den Oberflächenbereich von 0—3 cm Tiefe)

Wassergehalt: 60,9 %
Glühverlust: 3,10%
Koloniezahlen: ZS 60 × 10⁶
ZB 10 × 10⁶
ZL 2 × 10⁵
N 3 × 10⁵
Coliformenzahl: NKS 2 × 10³
G 6 × 10³
Temperatur: 12,5 °C
Salzgehalt des überst. Wassers: 31,14⁰/₀₀



In der graphischen Darstellung der Colizahlen auf NKS wurden die jeweilige Zahl der Fuchsinglanzkolonien getrennt von den übrigen für jede Probe aufgetragen. Sie sinkt nach deren Erscheinen in der jeweiligen Sedimenttiefe stetig ab, während die Zahl der andersfarbigen Kolonien sich kaum verändert.

Da im natürlichen Schlicksediment von Nordstrand keine einzige Coliformenkolonie mit Fuchsinglanz nachzuweisen war (s. Abb. 8 in allen Probestiefen „vor Beimpfung“), ist davon auszugehen, daß alle Fuchsinglanzkolonien, die auf NKS während des Versuchs auftraten, die zugeimpften E. coli K 12 Kolonien darstellen. Diese Annahme konnte durch eine Überprüfung bei Versuchsende bestätigt werden. Alle folgenden Ergebnisse werden auf dieser Grundlage interpretiert.

Unter dieser Voraussetzung muß das Erscheinen von Fuchsinglanzkolonien am zweiten Versuchstag in allen geprüften Sedimenttiefen als Einwanderung von E. coli K 12 gewertet werden. Auffallend war, daß die Einwanderung in diesem Versuch völlig anders verlief als in den Versuchen mit sterilisiertem Schlicksediment.

Die mögliche Ursache der beobachteten schnellen Einwanderung ist schwer zu ergründen. Eine denkbare Erklärung könnte jedoch das Verhalten der Würmer, wie Nereis und anderer Polychaeten sein, die im Sediment der Säule beobachtet wurden. Diese Würmer bewohnen meist U-förmige Röhren im Sediment, in denen sie für ihre Sauerstoffversorgung einen Atemwasserstrom erzeugen (NEWELL 1970). Durch einen solchen Atemwasserstrom könnten die zugeimpften Colibakterien in tiefere Schichten des Sedimentes mit hinabtransportiert worden sein und sich daraufhin in der entsprechenden Sedimentschicht ausgebreitet haben.

Der nach der Einwanderung folgende stetige Rückgang der Zahl der fuchsinglanzbildenden Bakterienkolonien dürfte auf dem hohen Salzgehalt beruhen. Wie aus der Überprüfung der Salzgehaltansprüche hervorging, zeigt *E. coli* K 12 bei 31‰ Salzgehalt kein optimales Wachstum mehr. Allerdings ist in der Abbildung 8 ein wesentlich langsamerer Rückgang der Colizahl im Sediment zu beobachten als im überstehenden Wasser. Der erheblich höhere Nährstoffgehalt des Sediments dürfte dabei einen verzögernden Effekt haben. Der Rückgang der Colizahl könnte auch auf die Polychaeten zurückzuführen sein, die sich u. a. von Bakterien ernähren (NEWELL 1970). Dies erscheint jedoch als recht unwahrscheinlich und wird auch nicht durch einen gleichzeitigen Rückgang der Koloniezahlen bestätigt.

Eine Beeinflussung der zugeimpften *E. coli* Bakterien auf die vorhandene Bakterienpopulation des Sediments ist nicht festzustellen. Es wurde weder eine starke Änderung der Koloniezahlen noch eine solche der Anzahl der vorhandenen Coliformen beobachtet, wie aus Abbildung 9 und 8 hervorgeht. Die leichte Erhöhung der Koloniezahlen am zweiten Versuchstag dürfte auf der Zuimpfung von *E. coli* K 12 beruhen.

Um wiederum festzustellen, ob eine Vermehrung der zugeimpften Colikeime stattgefunden hat, wurde die Gesamtzahl der Fuchsinglanzkolonien (von denen angenommen werden konnte, daß sie den *E. coli* K 12 Keimen entsprachen) in der Säule für verschiedene Versuchstage errechnet. Für die Ausrechnung gilt das gleiche wie unter Punkt 3.2.1 gesagte.

Ein stetiger Rückgang der Zellzahl deutet darauf hin, daß in der Säule im Sediment keine Vermehrung stattgefunden hat. Insgesamt konnte am Versuchsende nur noch 6% der Impfmenge festgestellt werden. Der Abfall der Colizahl im überstehenden Wasser war wieder stärker als im Sediment (Abb. 10).

3.3 In vivo Untersuchungen

Um zu überprüfen, inwieweit sich die bisher gewonnenen Ergebnisse auf natürliche Verhältnisse übertragen lassen, erfolgten entsprechende Freilanduntersuchungen im Watt von Nordstrand an der schleswig-holsteinischen Nordseeküste. Dazu wurde eine Wattfläche von ca. 3 m² durch einen verzinkten Metallring von ca. 30 cm Höhe abgegrenzt. Er war zur Seeseite etwas geöffnet, um dem Wasser Ein- und Austritt in das abgegrenzte Areal zu erleichtern. Alle Sedimentproben wurden stets mit jeweils einer Parallele an verschiedenen Stellen der Ringmitte genommen, um möglichen Randeinflüssen aus dem Wege zu gehen.

Zur Beimpfung wurde eine Suspension von *E. coli* K 12 Keimen mittels einer Zerstäuberflasche direkt auf die Wattoberfläche gesprüht. Damit wurde eine möglichst gleichmäßige Verteilung erreicht. Die Beimpfung erfolgte stets kurz nachdem das ablaufende Wasser die Sedimentoberfläche freigegeben hatte.

a) Erster Freilandversuch

Datum: 2., 3. und 4. 7. 1974

Charakterisierung des Sediments:

Aussehen: Schlicksediment mit dünner rotbrauner Oberfläche und ca. 2 cm dicker, weicher, hellgrauer aerober Schicht; tiefere Schichten schwarz und fester; Besiedlung mit Schlickwürmern.

Wassergehalt: 60,6 %

Glühverlust: 3,11%

Koloniezahlen: ZS 13×10^6
 ZB 54×10^5
 ZL 11×10^5
 N 12×10^4

Coliformenzahl: NKS 7×10^3
 G 6×10^2

Salzgehalt des überst. Wassers: 31,15⁰/₀₀

Witterungsverhältnisse:

2. 7.: heiter bis wolkig; Wind aus westlichen Richtungen mit 3 Windstärken,
 3. 7.: bedeckt, regnerisch; Westwind mit 3 bis 4 Windstärken,
 4. 7.: bedeckt, einzelne Schauer; Westwind mit ca. 3 bis 4 Windstärken.

Probenentnahme- und Hochwasserzeiten:

Probenbezeichnung	Datum	Zeit	H. W.	N. W.
vor Beimpfung	2. 7.	14.30	12.20	18.50
nach Beimpfung	2. 7.	14.50		
nach 7 Stunden	2. 7.	21.50	0.50	7.14
nach 1. Flut	3. 7.	11.30	13.12	19.45
nach 3. Flut	4. 7.	11.00	1.40	8.04

Temperatur im Sediment bis ca. 5 cm Tiefe während der einzelnen Probenentnahmezeiten:

vor Beimpfung: 19 °C
 nach Beimpfung: 19 °C
 nach 7 Stunden: 14 °C
 nach 1. Flut: 16 °C
 nach 3. Flut: 17 °C

b) Zweiter Freilandversuch

Datum: 14. und 15. 8. 1974

Charakterisierung des Sedimentes:

Aussehen: Schlicksediment mit dünner rotbrauner Oberfläche und ca. 2 cm dicker hellgrauer aerober Schicht; tiefere Schichten schwarz und zäher; Besiedlung mit Schlickwürmern.

Wassergehalt: 60,9 %

Glühverlust: 3,11%

Koloniezahlen: ZS 69×10^5
 ZB 48×10^5
 ZL 77×10^4
 N 45×10^4

Coliformenzahl: NKS 18×10^3
 G 1×10^2

Salzgehalt des überst. Wassers: 31,15⁰/₀₀

Witterungsverhältnisse:

14. 8.: heiter bis wolkgig, schwül; Mittagstemperatur 26 °C im Schatten; schwache Winde aus südlichen Richtungen,
15. 8.: klar, sonnig, schwül; Mittagstemperatur 28 °C im Schatten; Wind Süd-West 2—3.

Probenentnahme- und Hochwasserzeiten:

Probenbezeichnung	Datum	Zeit	H. W.	N. W.
vor Beimpfung	14. 8.	11.00	9.32	15.54
nach Beimpfung	14. 8.	11.10		
nach 4 Stunden	14. 8.	15.00		
nach 8 Stunden	14. 8.	19.00	22.19	4.40
nach 1. Flut	15. 8.	9.00	10.58	

Temperatur im Sediment bis ca. 5 cm Tiefe während der einzelnen Probenentnahmezeiten:

vor Beimpfung:	18,5 °C
nach Beimpfung:	18,5 °C
nach 4 Stunden:	24,5 °C
nach 8 Stunden:	22,0 °C
nach 1. Flut:	20,5 °C

Wiederum wurden in den Abbildungen 11 und 12 die Kolonien mit Fuchsinglanz getrennt von denen ohne Fuchsinglanz aufgetragen. Wie bereits in dem vorangegangenen Versuch wird davon ausgegangen, daß es sich bei den ersteren um *E. coli* K 12 Kolonien handelt (s. S. 101).

Aus dem zusätzlichen Erscheinen von fuchsinglanzbildenden Bakterien zu den nur roten Kolonien auf NKS in den ersten 3 cm und 7 cm Proben nach der Beimpfung in Abbildung 11 und 12 ist auf eine Einwanderung von *E. coli* in das Sediment zu schließen. Die mit zunehmender Tiefe abnehmende Zahl von Fuchsinglanzkolonien deutet ebenfalls auf eine Einwanderung hin. Sie erfolgt mit großer Geschwindigkeit. Bereits 4 Stunden nach Beimpfung können in Abbildung 12 *E. coli* Keime in allen Tiefen nachgewiesen werden. Es besteht die Möglichkeit, daß diese hohe Einwanderungsgeschwindigkeit auf das Verhalten der das Sediment bewohnenden Würmer zurückzuführen ist, wie bereits bei dem Laborversuch mit unsterilisiertem Schlicksediment angenommen wurde.

Da sich während der Einwanderungszeit der Bakterien auf der Sedimentoberfläche jedoch kein überstehendes Wasser befand, kann die Einwanderung hier nicht mit einem Atemwasserstrom erklärt werden. Allerdings können durch ständiges Auf- und Abwandern der Würmer in ihrer Wohnröhre und durch ihre Freßbewegungen (NEWELL 1970) Bakterien in tiefere Sedimentschichten transportiert worden sein. Außerdem gibt es Wurmart, die während der Ebbe um ihren Wohnröhrenaussgang Tentakeln auf der Wattoberfläche ausbreiten, um Nahrungspartikel einzusammeln (THEEDE, mündlich), die sie dann in ihre Röhre zum Verzehr mitnehmen. Auch dabei besteht die Möglichkeit, daß Bakterien in tiefere Schichten eingeschleppt werden. Ebenso können jedoch auch andere schlickbewohnende Tiere einen Transport der Bakterien in tiefere Schichten verursacht haben.

Nach ihrer Einwanderung zeigt die Anzahl der *E. coli* Keime abnehmende Tendenz. Bereits während der Ebbe ist ein Rückgang zu verzeichnen (s. Abb. 11 und 12). Dieser dürfte auf den hohen Salzgehalt des Sediments zurückzuführen sein. Die Überprüfung

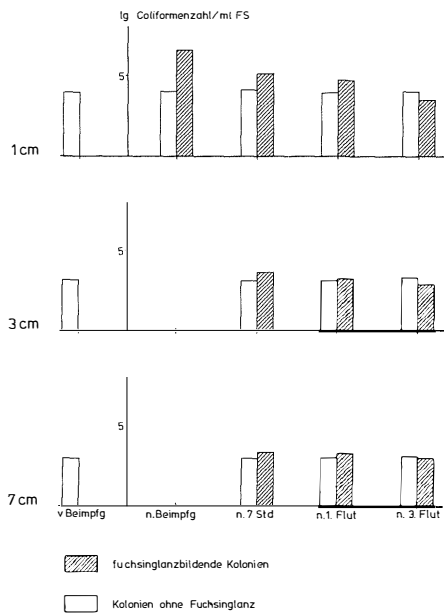


Abb. 11: Ergebnisse der Coliformenzahlbestimmungen des ersten Freilandversuches auf NKS.

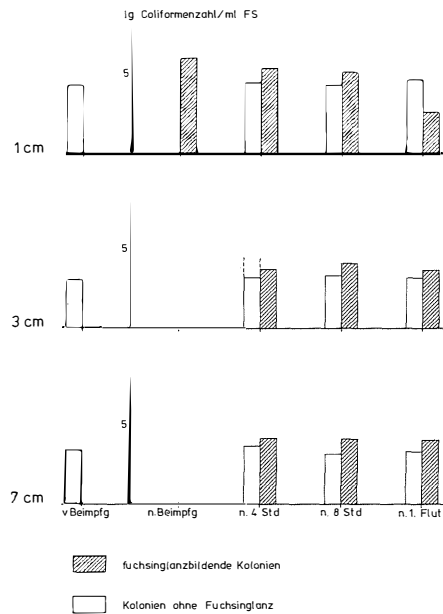


Abb. 12: Ergebnisse der Coliformenzahlbestimmungen des zweiten Freilandversuches auf NKS. Der zu niedrige Wert der 3 cm Probe „nach 4 Stunden“ ist wahrscheinlich auf einen Fehler während der Probenentnahme zurückzuführen (vgl. Abb. 13 und 15).

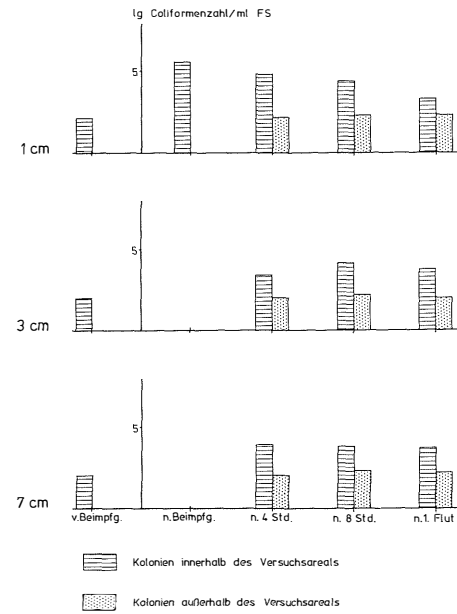


Abb. 13: Ergebnisse der Coliformenbestimmungen des zweiten Freilandversuches auf GASSNER-Agar.

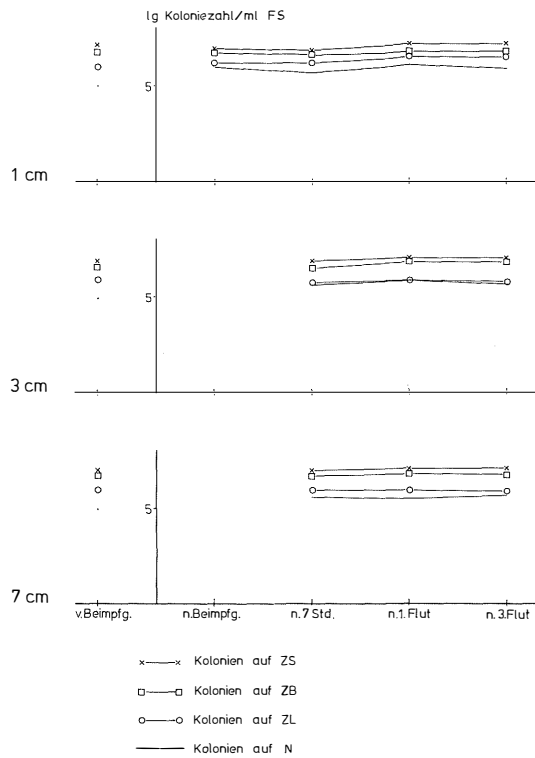


Abb. 14: Ergebnisse der Koloniezählbestimmungen des ersten Freilandversuches.

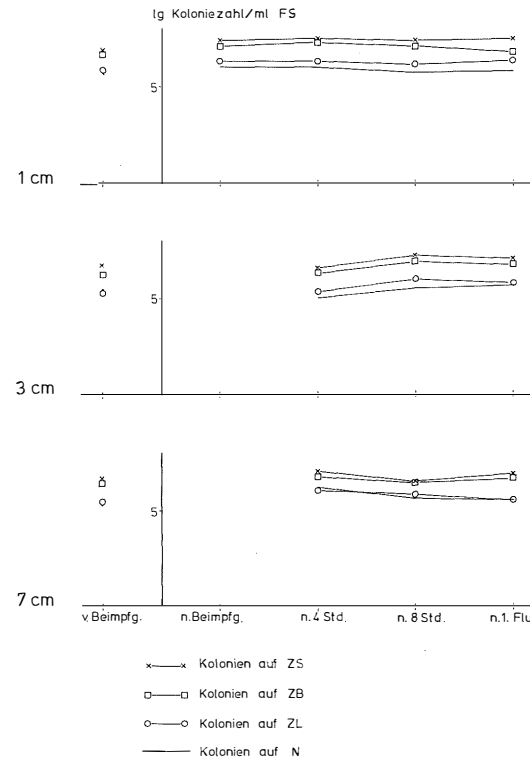


Abb. 15: Ergebnisse der Koloniezählbestimmungen des zweiten Freilandversuches.

der Salzgehaltsansprüche von *E. coli* K 12 (s. Abb. 1) könnte diese Vermutung bestätigen. Allerdings ist der Rückgang der Colizahl nicht so stark, wie bei dem Versuch mit sterilisiertem Seewasser gleichen Promillewertes zu verzeichnen war. Es ist anzunehmen, daß der höhere Nährstoffgehalt eines Sediments verzögernden Einfluß hat.

Bei dem Rückgang der Colizahlen aller weiterer Proben, die nach der ersten (s. Abb. 11 und 12) und nach der dritten Flut (s. Abb. 11) genommen wurden, spielen sicherlich außerdem noch Ausspülungen des Seewassers aus dem Sediment eine Rolle. Darauf ist wohl auch der wesentlich stärkere Rückgang der Colizahlen in den Oberflächenproben zurückzuführen.

Eine Beeinflussung der zugeimpften *E. coli* Keime auf die vorhandene Bakterienpopulation des Sediments ist nicht festzustellen. Sie drückt sich weder in einer deutlichen Veränderung der Koloniezahlen (s. Abb. 14 und 15) — noch in einer Veränderung der vorhandenen Coliformenpopulation aus.

Jedoch könnte eine umgekehrte Beeinflussung der zugeimpften *E. coli* Keime durch die vorhandene Bakterienpopulation vorliegen. Durch den Konkurrenzdruck der dem Milieu wesentlich besser angepaßten vorhandenen Population könnte der Abfall der *E. coli* Werte vielleicht ebenfalls erklärt werden.

Eine Vermehrung der zugeimpften *E. coli* K 12 Keime ist aus den stetig abfallenden Fuchsinglankoloniezahlen nicht abzulesen, obwohl die im Sediment während der Versuche herrschende Temperatur für natürliche Verhältnisse als optimal anzusehen ist und eine Vermehrung der Keime sicherlich auch zugelassen hätte (Vorversuche über das Temperaturverhalten des Teststammes können dies bestätigen). Die Temperatur scheint somit auf den Versuchsablauf keinen entscheidenden Einfluß gehabt zu haben.

Eine überschlagsmäßige Berechnung der Colimenge in dem Versuchsareal ergibt ebenfalls zu keinem Zeitpunkt der Versuche eine Vermehrung der Colikeime.

Die entscheidende Ursache für das Absterben der *E. coli* Zellen scheint der bereits erwähnte hohe Salzgehalt gewesen zu sein. Der Nährstoffgehalt des Sedimentes, gemessen als Glühverlust, scheint auf das Verhalten des Teststammes nur insoweit Einfluß gehabt zu haben, als er ein Absterben zwar zu verzögern, aber nicht aufzuhalten vermochte.

Literaturverzeichnis

- BONDE, G. J. (1967): Pollution of a Marine Environment. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 39, R. 45—63.
- BROEK, J. C. H. und MOM, C. P. (1954): Verseuchung von Poldergewässern mit *Salmonella Paratyphi* infolge Abwassereinführung. *G. I. Heft* 3/4, 65—69.
- DAUBNER, I. (1972): *Mikrobiologie des Wassers*. Akademie-Verlag GmbH., Berlin.
- EINHEITSVERFAHREN (1960): *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-, Schlammuntersuchung*. Verlag Chemie GmbH. Weinheim Bergstr., 3. Aufl.
- GASSNER, G. (1918): Ein neuer Dreifarbenährboden zur Typhus-Ruhr-Diagnose. *Zblt. Bakt. Abt. I*, 80, 219—222.
- GUNKEL, W. (1964): Die Verwendung des Ultra-Turrax zur Aufteilung von Bakterienaggregaten in marinen Proben. *Helgol. wiss. Meeresunters.* 11, 287—295.

- HALLS, S. und AYERS, P. A. (1974): A Membrane Filtration Technique for the Enumeration of *Escherichia coli* in Seawater. *J. appl. Bact.* **37**, 105—109.
- HENDERSON, W. L. (1959): Studies on the Use of Membrane Filters for the Estimation of Coliform Densities in Sea Water. *Sew. Industr. Wastes* **31**, 78—91.
- KETCHUM, B. H., AYERS, J. C. und VACCARO, R. F. (1952): Processes contributing to the Decrease of Coliform Bacteria in a tidal Estuary. *Ecology* **33**, 247—258.
- KRUMBEIN, W. E. (1970): On the behavior of pure cultures of marine microorganisms in sterilized and re-inoculated sediments. *Helgol. wiss. Meeresunters.* **20**, 17—28.
- MERCK, E. *Mikrobiologisches Handbuch*. Darmstadt.
- MEYER-REIL, L.-A. (1973): Untersuchungen über die Salzansprüche von Ostseebakterien. *Botanica Marina* Vol. XVI, S. 65—76.
- NEWELL, R. C. (1970): *Biology of Intertidal Animals*. Unwin Brothers Ltd., Woking and London, Great Britain.
- RHEINHEIMER, G. (1966): Einfluß von Ostseewasser auf limnische Bakterienpopulationen. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven*, **2**, 237.
- RHEINHEIMER, G. (1967): Verschmutzung und Selbstreinigung des Meeres. *Christiana Albertina* **3**, 39—46.
- SADJEDI, F. (1971): Qualitative und quantitative Untersuchungen zum Vorkommen der coliformen Bakterien im Bereich der westlichen Ostsee. *Diss. Kiel*.
- SCHLIEFER, C. (1968): *Methoden der meeresbiologischen Forschung*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- TITOVA, A. V. (1957): K voprosu vyživaemosti dizenterijnych bakterij v donnyh otloženíjach. — *Tr. Dnepropetr. n/i. Inst. im. Gamaleja* **3**, 1 (nach DAUBNER 1972).
- TITOVA, A. V. (1959): Kišečnaja paločka v donnyh otloženíjach kak pokazatel zagrijaznenija vodoemov. — *Tr. Dnepropetr. n/i. Inst. im. Gamaleja* **5**, 1.
- WAGNER, M. und SCHWARTZ, W. (1963): Behavior of a Suspension of Microbes, Migrating Through Sediments Under Marine and Limnic Conditions. *Symp on Marine Microbiology*, C. H. OPPENHEIMER (Ed.), 179—186.
- WEYLAND, H. (1967): Über die Verbreitung von Abwasserbakterien im Sediment des Weserästuars. *Veröff. Inst. f. Meeresforsch. Bremerhaven* **10**, 173—182.