

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 299 23 276
UBA-FB 000568



Mikrobiologische Methoden zur Beschreibung und Bewertung des Grundwasserzustandes

von

Prof. Dr. Christian G. Gliesche

Institut für Ökologie der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei

Vorauszahlung von 10,00 €

durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 432 765-104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Wolframstraße 95-96,
12105 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet II 2.1
Ellen Six

Berlin, Juni 2004

Berichts – Kennblatt

Berichtsnummer 1. UBA-FB	2.	3.
4. Titel des Berichts Mikrobiologische Methoden zur Beschreibung und Bewertung des Grundwasserzustandes		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Gliesche, Christian, Prof. Dr.		8. Abschlussdatum 15.9.2003
		9. Veröffentlichungsdatum
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Institut für Ökologie Schwedenhagen 6 18565 Kloster / Insel Hiddensee		10. UFOPLAN-Nr. / Förderkennzeichen (FKZ) 299 23 276
		11. Seitenzahl 98 + 23 (Anhang)
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin		12. Literaturangaben 85
		13. Tabellen und Diagramme 14
		14. Abbildungen 33
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung In diesem Vorhaben wurde die Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaften einerseits des freien Grundwassers und anderseits des Grundwassersedimentes anthropogen unbeeinflusster Grundwasserleiter vergleichend untersucht. Dabei wurden besonders molekularbiologische Methoden für die Identifizierung der Mikroorganismen verwendet. Es wurde jeweils das Sediment und in gleicher Tiefe das Grundwasser eines Tiefengrundwasserleiters (84 – 94 m unter Geländeoberkante) und eines oberflächennahen Aquifers (5,5 - 15,6 m unter GOK) beprobt. Zur Gewinnung der Grundwassersedimente wurden zwei verschiedene Bohrverfahren miteinander verglichen. Einerseits wurde eine Trockenbohrung, gekoppelt mit der Entnahme von Sediment mittels einer Rammkernsonde, und andererseits eine speziell entwickelte Drucksonde (FROSTAP 35) genutzt. Diese Drucksonde lieferte ungestörte und kontaminationsfreie Proben. Die phylogenetische Analyse der Zusammensetzung der untersuchten mikrobiellen Lebensgemeinschaften zeigte einen deutlichen Unterschied in der Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Sedimentes und des freien Grundwassers eines Aquifers. Grundsätzlich konnte im Aquifersediment eine wesentlich größere Diversität von Mikroorganismen nachgewiesen werden, und bestimmte Bakterien wurden ausschließlich im Sediment nachgewiesen. Bakterielle Isolate, die in beiden Habitaten gefunden wurden, könnten als Indikatororganismen für ökotoxikologische Untersuchungen dienen.		
17. Schlagwörter Grundwasser, Mikrobielle Lebensgemeinschaften des Grundwassers, Mikrobiologie des Grundwassers, Indikatororganismen, Molekularbiologische Methoden, Beprobung von Aquifersedimenten		
18. Preis	19.	20.

Report - Data Sheet

1. Report No.: UBA-FB	2.	3.
4. Report Title Microbiological methods for the investigation and evaluation of the groundwater quality		
5. Author(s), Family Name(s), First Name(s) Gliesche, Christian, Prof. Dr.		8. Report Date 15.9.2003
		9. Publication Date
6. Performing Organisation (Name, Address) Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Institut für Ökologie Schwedenhagen 6 D-18565 Kloster / Hiddensee		10. UFOPLAN–Ref. No. (FKZ) 299 23 276
		11. No. of Pages 98 + 23 (Appendix)
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, D-14191 Berlin		12. No. of References 85
		13. No. of Tables and Diagrams 14
		14. No. of Figures 33
15. Supplementary Notes		
16. Abstract In this study the diversity of the attached microbial community on the subsurface sediment was compared with the unattached bacterial community structure of groundwater pumped from a well in the same aquifer. Sediment and groundwater samples were obtained from a deep (84 - 94 m below surface) and a shallow (5,5 - 15,6 m below surface) aquifer. Furthermore, two sampling technologies (dry drilling combined with hollow-stem auger coring and cone penetration technology) have been compared. The new developed cone penetration technology (FROSTAP 35) resulted in undisturbed and not contaminated sediment samples. Especially molecular methods were used for the identification of the microorganism in the pristine subsurface environments. The unattached groundwater bacteria represent only a small part of the microbial diversity found in the subsurface environment. Distinct bacterial groups were exclusively present in the sediment sample. Bacterial isolates found both in the well water as well as in the sediment could be defined as indicator organisms for the microbial community of the specific pristine aquifer investigated.		
17. Key Words Groundwater, microbiology of groundwater, indicator organisms, molecular biological methods, microbial community of subsurface environments, groundwater sampling		
18. Price	19.	20.

Ausführliche Zusammenfassung

Die Lebensgemeinschaften des Grundwassers bestehen im wesentlichen aus Bakterien, Pilzen, Protozoen und niederen Metazoen. Eukaryonten (Pilze, Protozoen und niedere Metazoen) kommen nur in den oberen Metern des Grundwassers vor. Lebensformen größer als Bakterien sind in größerer Tiefe nicht mehr zu finden. Die Diversität und die Ökologie der Grundwasser-Mikroorganismen ist noch weitgehend unbekannt.

In diesem Vorhaben wurde die Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaften einerseits des freien Grundwassers und andererseits des Grundwassersedimentes anthropogen unbeeinflusster Grundwasserleiter vergleichend untersucht. Dabei wurden besonders molekularbiologische Methoden für die Identifizierung der Mikroorganismen und zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität genutzt.

In dieser Studie wurden jeweils das Sediment und das Grundwasser eines Tiefengrundwasserleiters und eines oberflächennahen Grundwasserleiters beprobt, die beide anthropogen unbeeinflusst sind.

Der untersuchte Tiefengrundwasserleiter liegt im Bereich der Bornhöveder Seenkette etwa 30 km südlich von Kiel (Schleswig-Holstein) in einer eiszeitlichen Rinne, ca. 70 bis 130 m unter Geländeoberkante. Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführte Bohrung zur Gewinnung von Sedimentproben aus dem Grundwasserleiter II erreichte eine Teufe von 94 m und wurde im Trockenbohrverfahren abgeteuft. Die Bohrung wurde zu einer Grundwassermessstelle (DN 115) ausgebaut (Filterstrecke zwischen 94,0 und 84,0 m unter Geländeoberkante).

Im Zuge dieser Probennahme erwies sich die Nutzung einer Trockenbohrung, gekoppelt mit der Entnahme von Sediment mittels einer Rammkernsonde hinsichtlich der Störung der Sedimente als unzureichend. Deshalb wurde zum Vergleich eine in diesem Projekt entwickelte spezielle Drucksonde (FROSTAP 35) der FUGRO Consulting GmbH (Berlin) in einem oberflächennahen Grundwasserleiter getestet, die ungestörte und kontaminationsfreie Proben lieferte.

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführte Drucksondierung im Segeberger Forst im Bereich Heidmühlen erreichte eine Teufe von 20 m. Die Gewinnung von Proben aus den Lockersedimenten dieser Teufe erfolgte aus geologischer und mikrobiologischer Sicht grundsätzlich in der erforderlichen Qualität. Eine Kontamination der erhaltenen Sedimentkerne mit den fluoreszierenden Tracer-Partikeln konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Die Sedimentkerne waren mechanisch nicht gestört und konnten steril

ohne Kontaminationen entnommen werden. Damit waren sie für die mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen bestens geeignet.

Der untersuchte, oberflächennahe Grundwasserleiter liegt im nordwestlichen Randbereich des Segeberger Forstes (Ortsteil Klint des Ortes Heidmühlen, Schleswig-Holstein). Der obere Grundwasserleiter, welcher bis zu einer Tiefe von 15,6 m beprobt wurde, ist aus gut sortierten Grobsanden aufgebaut, welcher im Liegenden durch einen Geschiebemergel bei 30 bis 33 m unter GOK begrenzt wird. Es wurden insgesamt 6,3 m Sedimentkernmaterial im Bereich von 5,5 bis 15,6 m gewonnen. Zusätzlich wurde an der Stelle der Entnahme dieser Sedimentkerne die Bohrung zu einer Grundwassermessstelle (DN 115) ausgebaut (20 m), deren Filterstrecke sich zwischen 13,3 und 14,3 m unter Geländeoberkante befindet.

Zum Vergleich der sessilen mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Grundwasserraumes mit der des freien Grundwassers wurden Wasserproben aus dem freien Grundwasser der beiden Grundwasserleiter entnommen. Dabei fand die Probennahme bei den in diesem Projekt abgeteuften Brunnen 13 bzw. 15 Monate nach dem Abteufen statt, um keine durch die Bohrung und den Brunnenbau bedingten Artefakte abzubilden.

Zusätzlich zur Gewinnung von Sediment- und Wasserproben aus den oben genannten Grundwasserleitern wurde Grundwasser von oberflächennahen Grundwasserleitern auf der Insel Föhr (Schleswig-Holstein), auf der Insel Hiddensee (Mecklenburg-Vorpommern) sowie ein oberflächennaher Grundwasserleiter bei Löcknitz (Mecklenburg-Vorpommern) beprobt.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurde versucht, die Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaften der beprobten Grundwasserleiter zu untersuchen.

Von den Mikroorganismen des freien Grundwassers und von den gewonnenen Grundwassersedimenten wurde versucht, mit Hilfe verschiedener Methoden die Gesamt-DNA zu isolieren. Nach intensivem Vergleich zahlreicher DNA-Isolierungsmethoden für bakterielle DNA und zusätzlicher Verbesserung einzelner Schritte wurde ein optimiertes Protokoll entwickelt. Die Ausbeuten an isolierter Gesamt-DNA waren immer sehr gering und in fast allen Fällen war diese DNA nicht PCR-fähig. Lediglich vom Aquifer Löcknitz konnte ausreichend hoch konzentrierte und gereinigte DNA erhalten werden und nur hier gelang die Vervielfältigung des Gens für die bakterielle 16S rRNA.

Da insbesondere aus den Aquifersedimenten nicht ausreichend DNA für die molekularbiologische Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft gewonnen werden konnte, konzentrierten sich die weiteren Arbeiten zum Vergleich der mikrobiellen Populationsstruktur des Grundwassers mit der des Grundwassersedimentes auf die Untersuchung bakterieller Reinkulturen. Diese wurden von den Platten isoliert, die sofort

nach der Probennahme zur Bestimmung der Lebendkeimzahlen dienten. Insgesamt wurden 1000 bakterielle Reinkulturen isoliert.

Diese Bakterienreinkulturen wurden unter geeigneten Bedingungen vermehrt, aufgeschlossen und aus ihnen eine hochmolekulare und PCR-fähige DNA isoliert. Dann wurde das Gen für die 16S rDNA über die Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Diese Amplifikate wurden in einer RFLP-Analyse miteinander verglichen und nur Amplifikate mit einem spezifischen Bandenmuster wurden dann sequenziert. Die taxonomische Zugehörigkeit dieser Isolate wurde dann über die phylogenetische Sequenzanalyse dieses Gens durchgeführt.

Grundsätzlich konnte im Aquifersediment des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf eine wesentlich größere Diversität von Mikroorganismen nachgewiesen werden. Bestimmte Gruppen wie die „Alphaproteobacteria“, *Bacteroidetes* und *Firmicutes* waren ausschließlich nur im Grundwassersediment zu finden. Während die Gruppen „Betaproteobacteria“, „Gammaproteobacteria“ und *Actinobacteria* sowohl im Aquifersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle vertreten waren. Aber auch innerhalb dieser Gruppen zeichnete sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Sedimentes des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf durch eine höhere Diversität aus. Charakteristisch für die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Grundwassersedimentes des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf waren das Vorkommen folgender 19 Organismengruppen mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Paracraurococcus ruber</i> , (2) <i>Sphingomonas suberifaciens</i> , (3) <i>Rhizobium huaulense</i> , (4) <i>Mycoplana bullata</i> , (5) bisher unbekannte Bakterien (Isolate 99 und 144)
„Betaproteobacteria“	(6) <i>Janthinobacterium lividum</i> und (7) <i>Variovorax paradoxus</i>
„Gammaproteobacteria“	(8) <i>Shewanella putrefaciens</i> , (9) <i>Pseudomonas mandelii</i> , (10) <i>Pseudomonas azotoformans</i> und (11) <i>Pseudomonas gessardii</i>
<i>Bacteroidetes</i>	(12) bisher nicht gültig beschriebene Gattung „ <i>Taxeobacter</i> “
<i>Firmicutes</i>	(13) <i>Staphylococcus warneri</i> und (14) <i>Lactosphaera pasteurii</i>
<i>Actinobacteria</i>	(15) <i>Cellulomonas fermentans</i> , (16) <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> , (17) <i>Arthrobacter oxidans</i> und bisher unbekannte Bakterien (18) Isolate 29/66/175 und (19) Isolate 90-92/142/159

Sowohl im Grundwassersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf waren

Vertreter folgender drei Organismengruppen verbreitet mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Betaproteobacteria“	(1) <i>Acidovorax facilis</i> / <i>Acidovorax defluvii</i>
„Gammaproteobacteria“	(2) <i>Pseudomonas veronii</i>
<i>Actinobacteria</i>	(3) <i>Rhodococcus fascians</i>

Zudem waren unter den Isolaten des Grundwassers und des Grundwassersedimentes die Organismen mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Acidovorax facilis* / *Acidovorax defluvii* und (2) *Pseudomonas veronii* auch quantitativ dominierend. Deshalb könnten bakterielle Isolate dieser beiden Gruppen, die in diesem Projekt gewonnen wurden, als Indikatororganismen für die mikrobielle Lebensgemeinschaft des anthropogen unbeeinflussten Grundwasserraumes des Tiefengrundwasserleiters II (Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf) definiert werden. Sie wären zum Beispiel für ökotoxikologische Untersuchungen geeignet, da sie sowohl im Sediment als auch im freien Grundwasser verbreitet sind und hier einen wesentlichen Anteil an der mikrobiellen Lebensgemeinschaft bilden. Sie sind leicht zu kultivieren und unter Einsatz molekularbiologischer Nachweisverfahren (Nukleinsäuresonden, Fingerprinting-Techniken) vermutlich auch gut und reproduzierbar nachzuweisen.

Mit Hilfe der angewendeten Kombination von klassischen Kulturtechniken und molekularbiologischen Methoden ließ sich also im Tiefengrundwasserleiter II (Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf) ein deutlicher Unterschied in der Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Sedimentes dieses Aquifers und des Brunnenwassers nachweisen.

Im Aquifersediment des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst konnte eine vergleichbar große Diversität von Mikroorganismen wie im Wasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen werden.

Die Klassen „Alphaproteobacteria“, „Betaproteobacteria“, „Gammaproteobacteria“ und der Stamm *Actinobacteria* waren sowohl im Aquifersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst vertreten. Dagegen fanden sich Bakterien des Stammes *Firmicutes* nur im Aquifersediment und Bakterien des Stammes *Bacteroidetes* nur im Grundwasser der Grundwassermessstelle.

Innerhalb des Stammes der *Actinobacteria* zeichnete sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Sedimentes insgesamt durch eine etwas größere Diversität aus. Dies Bild einer größeren Vielfalt der angehefteten Bakterien wurde dagegen nicht bei den „Alpha“- , „Beta-“, und

„Gamma-Proteobacteria“ gefunden. Möglicherweise bilden sich größere Unterschiede in der Diversität beider Lebensgemeinschaften, wie im Aquifer Wankendorf gefunden, erst mit zunehmender Tiefe aus.

Beide Lebensgemeinschaften sind, bezogen auf das Vorkommen spezifischer Organismen, deutlich voneinander verschieden, zeigen aber bei einigen Gruppen interessante Überlappungen.

Charakteristisch für die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Grundwassersedimentes des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst war das Vorkommen folgender **12 Organismengruppen** mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Rhizobium huautlense</i>
„Betaproteobacteria“	(2) <i>Burkholderia cariophyllii</i>
Actinobacteria	(3) <i>Curtobacterium citreum</i> , (4) <i>Nocardioides albus</i> , (5) <i>Microbacterium oxidans</i> und zahlreiche, bisher unbekannte Bakterien: (6) das Cluster um die Isolate K7-8 und K7-103 (7) das Cluster um die Isolate K7-111 und K7-95, (8) Isolat K7-109, (9) Isolat K7-16 und (10) Isolat K7-123.
Firmicutes	(11) <i>Bacillus agri</i> und (12) <i>Bacillus pseudomegaterium</i>

In beiden Habitaten, also sowohl im Grundwassersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst, waren fünf Organismengruppen verbreitet mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Sphingomonas suberifaciens</i>
„Gammaproteobacteria“	(2) <i>Frateuria aurantia</i> , (3) <i>Pseudomonas veronii</i> / <i>Pseudomonas gingeri</i>
Actinobacteria	(4) <i>Rhodococcus koreeniensis</i> und (5) <i>Microbacterium terregens</i>

Für den Aquifer Segeberger Forst können Isolate dieser Gruppen, die in diesem Projekt gewonnen wurden, als **Indikatororganismus** für die mikrobielle Lebensgemeinschaft dieses anthropogen unbeeinflussten Grundwasserraumes definiert werden. Sie wären ebenfalls für ökotoxikologische Untersuchungen geeignet, da sie sowohl im Sediment als auch im freien Grundwasser verbreitet sind und hier einen nicht unwesentlichen Anteil an der mikrobiellen Lebensgemeinschaft bilden. Sie sind leicht zu kultivieren und unter Einsatz molekularbiologischer Nachweisverfahren (Nukleinsäuresonden, Fingerprinting-Techniken) vermutlich auch gut und reproduzierbar nachzuweisen.

Pseudomonas veronii wurde im Brunnenwasser und Sediment des Tiefengrundwasserleiters und im Brunnenwasser des oberflächennahen Grundwasserleiters nachgewiesen und

Organismen mit einer sehr nahen Verwandtschaft zum Cluster *Pseudomonas veronii* / *Pseudomonas gingerii* und *Pseudomonas veronii* / *Pseudomonas lundensis* wurden in den Sedimentkernen K7 bzw. K4 des oberflächennahen Grundwasserleiters gefunden. Eingehendere taxonomische und physiologische Untersuchungen dieser Isolate sind allerdings zur Bestätigung notwendig. Aber die vorliegenden Ergebnisse legen sehr eine weite Verbreitung von ***Pseudomonas veronii*** in anthropogen unbeeinflussten Grundwasserhabitaten nahe und nominieren diese Bakterienart als möglichen Kandidaten für einen Indikatororganismus.

Die bisherigen Ergebnisse des Vergleiches der Populationsstrukturen der in diesem Vorhaben untersuchten Grundwasserleiter legen den Schluss nahe, dass es möglich ist, bakterielle Indikatororganismen für einen Grundwasserleiter einer spezifischen Region mit seiner spezifischen Geologie und Geochemie zu definieren, die für den anthropogen unbeeinflussten Grundzustand charakteristisch sind. Die deutlichen Unterschiede in der mikrobiellen Populationsstruktur des untersuchten Tiefengrundwasserleiters und des oberflächennahen Grundwasserleiters, verdeutlichen aber, dass es bislang, basierend auf dem bisherigen Datenmaterial, nur begrenzt möglich ist, Indikatororganismen für den anthropogen unbeeinflussten Grundzustand ganz allgemein zu definieren. Offensichtlich hat die spezifische Geologie und Geochemie des Aquifers einen wesentlichen Einfluss auf die jeweilige Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft, und die vertikale und horizontale Heterogenität des Sedimentmaterials und die Heterogenität der Nährstoffzufuhr wirken sich erheblich auf die Besiedelung durch Mikroorganismen in einem Aquifer aus.

Comprehensive Summary

The biotic community of subsurface environments consists mainly of bacteria, fungi, protozoa and small metazoa. Eucaryotes (fungi, protozoa and metazoa) were found only in the upper zone of the groundwater. Cells bigger than bacteria could not be detected in a greater depth. The diversity and the ecology of groundwater microorganisms are not yet well known.

In this study the diversity of the attached microbial community on the sediment surface was compared with the unattached bacterial community of the groundwater pumped from a well. Especially molecular methods were used for the identification of the microorganism and the description of their diversity in pristine aquifers.

In this investigation the sediment and the free groundwater of pristine shallow and deep aquifers have been sampled. The deep aquifer is located close to the village „Wankendorf“ in the area „Bornhöveder Seenkette“ about 30 km south of Kiel (Schleswig-Holstein) in a glacial groove ca. 70 - 130 m below surface. A depth of 94 m below surface was reached by drilling combined with hollow-stem auger coring for obtaining sediment samples from this deep pristine aquifer. After sampling a well has been installed at the same place. The filter of this well was located between 84 and 94 m below surface. However, this kind of sampling (hollow-stem auger coring) resulted in disturbed sediment cores in all cases.

Therefore a special cone penetration technology (FROSTAP 35) has been developed by the FUGRO Consulting GmbH (Berlin) in this project. In the field the use of this new sampling system resulted in undisturbed and not contaminated sediment samples. The drilling with this system in the shallow sandy aquifer in the area of the „Segeberger Forst (in a little spot in Klint near the village „Heidmühlen“, Schleswig-Holstein) reached a depth of 20 m below surface. This shallow aquifer was sampled to a depth of 15.6 m. Totally 6.3 m sediment core material has been obtained in the range of 5.5 to 15.6 m below surface. At the same place a well (DN 115) has also been set up to a depth of 15.5 m below surface. The filter of this well was located between 13.3 and 14.3 m below surface. The microbiological and geological quality of the sediment samples obtained was always very satisfying. A contamination of the sediment cores with fluorescent particles could not be proved in any cases. The sediment cores were mechanically not disturbed and could be taken without contamination under sterile conditions. So they were best qualified for microbiological and molecular investigations.

Well water samples have also been taken to compare the sessile microbial community with the community structure of the unattached bacteria of the groundwater. At both sites this sampling took place 13 or 15 months after the installation of these wells to avoid disturbances

and artefacts caused by the drilling process. Furthermore, groundwater samples were taken from different shallow aquifers from northern Germany (island „Föhr“ [Schleswig-Holstein], island „Hiddensee“ [Mecklenburg-Vorpommern]) and Löcknitz [Mecklenburg-Vorpommern]).

Using molecular techniques the diversity of the bacterial community from the sampled subsurface environments has been investigated. Total DNA was extracted from groundwater and sediment samples with the help of different procedures. After intensive comparative studies a new optimized protocol for the DNA isolation has been established. However, the yield of extracted DNA was always very low and in most cases this DNA was not fit for the polymerase chain reaction (PCR). Only from the aquifer in „Löcknitz“ a high enough concentrated and pure DNA preparation could be received, so that the bacterial 16S rRNA gene could be amplified successfully. Since not enough DNA especially from the sediment samples could be extracted the further work concentrated on the comparison of the bacterial pure cultures obtained from these two habitats (groundwater and aquifer sediment). These pure cultures were isolated directly from the plates used for the determination of the total viable cells counts. Totally, 1000 pure cultures have been obtained. These pure cultures were cultivated under optimal conditions, lysed and a high molecular and PCR-suitable DNA was isolated. Then the gene for the bacterial 16S rRNA was amplified with the PCR. These PCR products were compared by a restriction fragment length polymorphism analysis. Only unique 16S rDNA PCR fragments were sequenced. The taxonomic identification of these isolates was carried out by a phylogenetic sequence analyses for this gene.

The unattached groundwater bacteria represent only a small part of the microbial diversity found on the subsurface environment. In the sediment of the aquifer „Wankendorf“ a greater bacterial diversity could be detected. Distinct bacterial groups like the „Alphaproteobacteria“, *Bacteroidetes* and the *Firmicutes* were exclusively present in the sediment sample. Whereas the groups „Betaproteobacteria“, „Gammaproteobacteria“ and *Actinobacteria* were found both in the free groundwater and in the sediment. But also among these groups the sediment isolates showed a significant higher diversity. Bacteria related to the following 19 groups were specifically characteristic for the microbial community in the sediment of the aquifer „Wankendorf“:

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Paracraurococcus ruber</i> , (2) <i>Sphingomonas suberifaciens</i> , (3) <i>Rhizobium huautlense</i> , (4) <i>Mycoplana bullata</i> , (5) so far unknown bacteria (isolates 99 and 144)
„Betaproteobacteria“	(6) <i>Janthinobacterium lividum</i> and (7) <i>Variovorax paradoxus</i>
„Gammaproteobacteria“	(8) <i>Shewanella putrefaciens</i> , (9) <i>Pseudomonas mandelii</i> , (10) <i>Pseudomonas azotoformans</i> and (11) <i>Pseudomonas gessardii</i>
<i>Bacteroidetes</i>	(12) not validly described genus „ <i>Taxeobacter</i> “
<i>Firmicutes</i>	(13) <i>Staphylococcus warneri</i> and (14) <i>Lactosphaera pasteurii</i>
<i>Actinobacteria</i>	(15) <i>Cellulomonas fermentans</i> , (16) <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> , (17) <i>Arthrobacter oxidans</i> and so far unknown bacteria (18) isolates 29/66/175 and (19) isolates 90-92/142/159

Both, in the sediment and in the groundwater of the aquifer „Wankendorf“ the following three groups were present:

„Betaproteobacteria“	(1) <i>Acidovorax facilis</i> / <i>Acidovorax defluvii</i>
„Gammaproteobacteria“	(2) <i>Pseudomonas veronii</i>
<i>Actinobacteria</i>	(3) <i>Rhodococcus fascians</i>

It is generally noticed that isolates related to (1) *Pseudomonas veronii* and (2) *Acidovorax facilis* / *Acidovorax defluvii* dominated both in the well water and in the aquifer sediment. Therefore isolates of these three groups, which have been obtained in this study, can be defined as indicator organisms for the microbial community of the pristine deep aquifer „Wankendorf“. For example they were suitable for ecotoxicological investigations since they are dominantly present in the sediment as well as in the well water. They are easy to cultivate and by using molecular methods (nucleic acid probes, DNA-fingerprinting) they can be well recorded.

Water and sediment samples from the aquifer “Segeberger Forst” showed a comparable great microbial diversity. However, each habitat was characterized by the presence of specific bacterial organisms. Distinct bacterial groups like the „Alphaproteobacteria“, „Betaproteobacteria“, „Gammaproteobacteria“ and *Actinobacteria* were present in the sediment and also in the water samples. Whereas the group *Firmicutes* was exclusively found in the sediment. On the other hand, the group *Bacteroidetes* has been detected only in the well water from the aquifer “Segeberger Forst”. Bacteria related to the following 12 groups were specifically characteristic for the microbial community in the sediment of the aquifer “Segeberger Forst”.

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Rhizobium huautlense</i>
------------------------------	---------------------------------

„Betaproteobacteria“	(2) <i>Burkholderia caryophyllii</i>
<i>Actinobacteria</i>	(3) <i>Curtobacterium citreum</i> , (4) <i>Nocardioides albus</i> , (5) <i>Microbacterium oxidans</i> and so far unknown bacteria: (6) cluster K7-8 / K7-103 (7) cluster K7-111 / K7-95, (8) isolate K7-109, (9) isolate K7-16 and (10) isolate K7-123.
<i>Firmicutes</i>	(11) <i>Bacillus agri</i> und (12) <i>Bacillus pseudomegaterium</i>

Both, in the sediment and in the well water of the aquifer „Segeberger Forst“ the following groups was present:

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Sphingomonas suberifaciens</i>
„Gammaproteobacteria“	(2) <i>Frateuria aurantia</i> , (3) <i>Pseudomonas veronii</i> / <i>Pseudomonas gingeri</i>
<i>Actinobacteria</i>	(4) <i>Rhodococcus koreniensis</i> and (5) <i>Microbacterium terregens</i>

Therefore, isolates of the groups which have been obtained in this study, can be defined as indicator organisms for the microbial community of the pristine shallow aquifer „Segeberger Forst“ and are also suitable for ecotoxicological investigations.

Isolates related to *Pseudomonas veronii* were found in all aquifer samples investigated. Therefore, this bacterial species could be regarded as an indicator organism for pristine groundwater habitats.

INHALTSVERZEICHNIS

Ausführliche Zusammenfassung	I
Comprehensive summary	VII
Inhaltsverzeichnis	XI
Verzeichnis der Abbildungen	XII
Verzeichnis der Tabellen	XIII
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 Lage der Untersuchungsgebiete und geologische Charakterisierung der untersuchten Aquifere	4
2.1.1 Grundwasserleiter bei Wankendorf (Bornhöveder Seenkette, Westufer des Belauer Sees)	5
2.1.2 Grundwasserleiter im Segeberger Forst	7
2.1.3 Grundwasserleiter auf der Insel Föhr	9
2.1.4 Grundwasserleiter auf der Insel Hiddensee	9
2.1.5 Grundwasserleiter in Löcknitz	10
2.2 Probennahme	11
2.2.1 Entnahme von Grundwassersedimenten	11
2.2.1.1 Grundwassersediment aus dem Aquifer II im Bereich der Bornhöveder Seenplatte	12
2.2.1.2 Grundwassersediment aus oberflächennahen Grundwasserleiter im Bereich des Segeberger Forstes	17
2.2.2 Entnahme von Grundwasser	23
2.3 Bestimmung ausgewählter Kat- und Anionen und ausgewählter Randparameter	28
2.4 Mikrobiologische Methoden	28
2.4.1 Medien	28
2.4.2 Isolierung bakterieller Reinkulturen	31
2.5 Molekularbiologische Methoden	31
2.5.1 DNA-Isolierung	31
2.5.1.1 Puffer für die DNA-Isolierung und weitere molekularbiologische Methoden	31
2.5.1.2 Methoden der DNA-Isolierung	34
2.5.2 Amplifizierung des Gens für die 16S rDNA	43
2.5.3 RFLP-Analyse des Gens für die 16S rDNA	45
2.5.4 Sequenzierung der PCR-Produkte und phylogenetische Analyse	46
3. Ergebnisse und Diskussion	47
3.1 Probennahme von Grundwasser	47
3.2 Probennahme von Grundwassersedimenten	48
3.3 Wasserinhaltsstoffe und Randparameter der untersuchten Grundwasserleiter	54
3.4 Bakterielle Gesamt- und Lebendkeimzahlen	56
3.5 Isolierung von Gesamt-DNA aus Grundwasser und Grundwassersedimenten	60
3.6 Vergleich der mikrobiellen Populationsstruktur des Grundwassers mit der des Grundwassersedimentes	62
3.6.1 Aquifer II Wankendorf (Bornhöveder Seenkette)	64
3.6.2 Aquifer Segeberger Forst	72
3.6.3 Vergleich Aquifer II Wankendorf und Aquifer Segeberger Forst	87
4. Schlussfolgerungen	88
5. Literatur	92
6. Danksagung	97

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1. Lage des Probennahmepunktes im Bereich der Bornhöveder Seenkette.	6
Abb. 2. Geologischer Schnitt im Bereich der Bornhöveder Seenkette.	6
Abb. 3. Lage des Probennahmepunktes im nordwestlichen Randbereich des Segeberger Forstes (Schleswig-Holstein).	8
Abb. 4. Liner in der Rammkernbohrsonde (mit Deckel) mit Schneidschuh und Kernfänger.	15
Abb. 5. Rammkernbohrsonde mit Tracer-Beutel am Schneidschuh.	15
Abb. 6. Ausbauskizze der in diesem Projekt errichteten Grundwassermessstelle im Bereich Wankendorf.	16
Abb. 7. Drucksonde FROSTAP 35: Sondenspitze.	18
Abb. 8. Drucksonde FROSTAP 35: Sondenspitze in Einzelteilen.	19
Abb. 9. Drucksonde FROSTAP 35: Sondenspitze mit Peltierelement.	20
Abb. 10. Drucksonde FROSTAP 35: Zusammenbau der Einheit Sondenspitze / Peltierelement mit dem Gestänge.	20
Abb. 11. Drucksonde FROSTAP 35: Gestänge mit Liner und Stromkabel für das Peltierelement.	20
Abb. 12. Drucksonde FROSTAP 35: Sonde im Einsatz – Einführung in den Boden.	21
Abb. 13. Drucksonde FROSTAP 35: Sonde im Einsatz – Vortrieb des Gestänges.	21
Abb. 14. Drucksonde FROSTAP 35: Sonde im Einsatz – Wagen im Gelände.	22
Abb. 15. Ausbauskizze der in diesem Projekt errichteten Grundwassermessstelle im Segeberger Forst.	22
Abb. 16. Schematische Darstellung der in diesem Projekt entwickelten Filtrationsanlage für Grundwasser.	23
Abb. 17. Filtrationsanlage und Entnahmeverrichtung in einer Glove-Box mit Argonatmosphäre.	26
Abb. 17. Grundwassermessstelle im Untersuchungsgebiet Wankendorf.	27
Abb. 19. Grundwassermessstelle im Untersuchungsgebiet Segeberger Forst.	27
Abb. 20. WTW-Messelektroden in der Durchfluss-Messzelle zur kontinuierlichen Messung der Randparameter.	29
Abb. 21. Bohrprofil der Grundwassermessstelle im Tiefengrundwasserleiter II im Bereich der Bornhöveder Seenkette in Schleswig-Holstein.	49/50
Abb. 22. Bohrprofil der Grundwassermessstelle im oberflächennahen Grundwasserleiter II im Bereich des Segeberger Forstes bei Heidmühlen.	52
Abb. 23. Grundwassersediment gefärbt mit Acridinorange.	59
Abb. 24. Bakterien des Grundwassers gefärbt mit Acridinorange.	59
Abb. 25. Amplifizierung eines Fragments des 16S rDNA-Gens.	61
Abb. 26. Restriktionsverdau von PCR-Produkten des 16S rRNA-Gens verschiedener bakterieller Reinkulturen.	63
Abb. 27. Phylogenetische Analyse der 16S rDNA der bakteriellen Isolate (Stämme 1 - 200) aus dem Aquifersediment (Wankendorf).	66
Abb. 28. Phylogenetische Analyse der 16S rDNA der bakteriellen Isolate (Stämme 600 - 805) aus dem Grundwasser (Wankendorf).	67
Abb. 29. Phylogenetische Analyse der 16S rDNA der bakteriellen Isolate aus dem Aquifersediment Kern K7 (Segeberger Forst).	76
Abb. 30. Phylogenetische Analyse der 16S rDNA der bakteriellen Isolate aus dem Brunnenwasser der Grundwassermessstelle (Segeberger Forst).	77

Abb. 31. Phylogenetische Analyse der 16S rDNA der bakteriellen Isolate aus dem Brunnenwasser der Grundwassermessstelle (Segeberger Forst).	78
Abb. 32. Phylogenetische Analyse der 16S rDNA der bakteriellen Isolate aus dem Aquifersediment Kern K4 (Segeberger Forst).	79
Abb. 33. Phylogenetische Analyse der 16S rDNA der bakteriellen Isolate aus dem Aquifersediment Kern K4 (Segeberger Forst).	80

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1. Oligonukleotide für die Amplifizierung des Gens für die 16S rDNA.	44
Tab. 2. Sedimentkerne, gewonnen aus dem Grundwasserleiter II Wankendorf im Bereich der Bornhöveder Seenkette.	51
Tab. 3. Sedimentkerne, gewonnen aus dem Grundwasserleiter II Segeberger Forst im Bereich Heidmühlen.	53
Tab. 4. Ausgewählte Wasserinhaltsstoffe und Randparameter der beprobten Aquifere während der Probenentnahmen.	57
Tab. 5. Bakterielle Gesamtzellzahl und Lebendkeimzahl (Koloniebildende Einheiten auf Medium PYGV) der untersuchten Grundwasser- und Grundwassersedimentproben.	58
Tab. 6. Ausbeute an Gesamt-DNA, isoliert aus den auf Filter konzentrierten Mikroorganismen bzw. aus den Sedimentproben der untersuchten Grundwasser- und Grundwassersedimentproben.	61
Tab. 7. Bezeichnung der bakteriellen Reinkulturen, die zum Vergleich der mikrobiellen Populationsstruktur des Grundwassers mit der des Grundwassersedimentes verwendet wurden.	62
Tab. 8. Typisierung der RFLP-Analyse (<i>RsaI</i> bzw. <i>Bsh1236I</i>) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Wankendorfer Grundwassers.	64
Tab. 9. Typisierung der RFLP-Analyse (<i>RsaI</i> bzw. <i>Bsh1236I</i>) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Wankendorfer Aquifersedimentes.	65
Tab. 10. Bakterielle Referenzstämme der Abb. 27 bis 28.	68
Tab. 11. Typisierung der RFLP-Analyse (<i>RsaI</i> bzw. <i>Bsh1236I</i>) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate aus dem Aquifersediment SK7 des Segeberger Forstes.	73
Tab. 12. Typisierung der RFLP-Analyse (<i>RsaI</i> bzw. <i>Bsh1236I</i>) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Grundwassers aus dem Segeberger Forst.	74
Tab. 13. Typisierung der RFLP-Analyse (<i>RsaI</i> bzw. <i>Bsh1236I</i>) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate aus dem Aquifersediment SK4 des Segeberger Forstes.	75
Tab. 14. Bakterielle Referenzstämme der Abb. 29 bis 33.	81

1. Einleitung

In diesem Vorhaben wurde die Diversität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften einerseits des freien Grundwassers und andererseits des Grundwassersedimentes anthropogen unbeeinflusster Grundwasserleiter vergleichend untersucht. Dabei wurden besonders molekularbiologische Methoden für die Identifizierung der Mikroorganismen und zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität genutzt.

Die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen, die Art der landwirtschaftlichen Nutzung und anthropogene Kontaminationen beeinflussen erheblich die Zusammensetzung und Aktivität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften der ungesättigten Zone und des oberflächennahen Grundwassers (GHORSE & WILSON, 1988). Über die spezifischen Auswirkungen dieser Parameter auf die Diversität und Aktivität der Mikroorganismen der ungesättigten Zone und des oberflächennahen Grundwasserraumes liegen bisher nur geringe Kenntnisse vor (MADSEN, 1995; MADSEN & GHORSE, 1993). Nach den bisherigen wenig systematischen Untersuchungen sind auch in der Dränzone viele unterschiedliche Arten von Mikroorganismen nachgewiesen worden (KIEFT & BROCKMAN, 2001).

Die Lebensgemeinschaften des Grundwassers bestehen im wesentlichen aus Bakterien, Pilzen, Protozoen und niederen Metazoen. Eukaryonten (Pilze, Protozoen und niedere Metazoen) kommen nur in den oberen Metern des Grundwassers vor. Niedere Metazoen leben nur in den Hohlräumen von Kluft- und Karstgesteinen und in den interstitiellen Hohlräumen von Sanden und Kiesen der oberen Grundwasserzone. Für diese Fauna ist jedoch ein intensiver Kontakt mit Oberflächenwasser notwendig, der einen konstanten Nachschub an organischem Detritus sicherstellt. Lebensformen größer als Mikroorganismen sind in größerer Tiefe nicht mehr zu finden. Durch den Ausschluss des Sonnenlichtes erfolgt keine Photosynthese im Grundwasserbereich und damit keine photosynthetisch bedingte Primärproduktion organischer Substanz. Kürzlich wurden jedoch in sehr tiefen Grundwasserleitern spektakuläre Hinweise für die Existenz eines chemolithoautotrophen mikrobiellen Ökosystems gefunden (STEVENS, 1997), deren Interpretation allerdings umstritten ist (ANDERSON *et al.*, 1998).

Die Diversität und die Ökologie der Grundwasser-Mikroorganismen ist noch weitgehend unbekannt. Bislang sind nur Aussagen über die großräumige Verteilung der Mikroorganismen des Grundwassers möglich. Die kleinräumige Verteilung der verschiedenen Organismen und ihre Sukzession wurden bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht (FREDRICKSON & ONSTOTT, 2001).

Der Anteil an Mikroorganismen, die mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden noch nicht kultiviert werden können, ist im Grundwasser besonders hoch (90% bis 99,9%) (GLIESCHE, 1996). Durch Einsatz molekularbiologischer Methoden ist es jedoch möglich, die Diversität dieser bisher noch nicht kultivierbaren Mikroorganismen besser zu beschreiben (CHANDLER & BROCKMAN, 2001).

Das Grundwasser ist ein empfindliches Ökosystem, dessen Sensibilität und Pufferkapazität hinsichtlich des Eintrages von anthropogenen Schadstoffen bisher kaum untersucht wurde. Es gibt derzeit also nur lückenhafte Kenntnisse sowohl über den anthropogen unbeeinflussten mikrobiellen Grundzustand als auch über die Veränderungen nach einer Kontamination. Besonders die Populationsanalyse kontaminierter Grundwasserleiter wurde weitgehend vernachlässigt. Spezifische Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften wurden selten dokumentiert (GLIESCHE, 1996).

Obere Bodenschichten weisen einen durchschnittlichen Gehalt von 10^8 - 10^9 aeroben Bakterien/g Boden-Trockengewicht (Lebendzellzahl) auf. Absteigend vom A- zum C-Horizont nimmt der Nährstoffgehalt kontinuierlich ab, und damit verbunden ist die Abnahme der Häufigkeit von Bakterien. Mit zunehmender Tiefe sinkt im Bereich des C-Horizontes die Lebendzellzahl bis auf etwa 10^2 - 10^3 Bakterien/g Boden-Trockengewicht ab. Auf der Höhe des Grundwasserspiegels und des Kapillarsaums steigt die Lebendzellzahl jedoch wieder sprunghaft an und erreicht Werte zwischen 10^4 - 10^7 aerobe Bakterien/g Boden-Trockengewicht (MADSEN & GHIORE, 1993). Bedingt durch den horizontalen hydrologischen Fluss und durch saisonale Schwankungen des Grundwasserspiegels kommt es in diesem Bereich zu einer dynamischen Einmischung von Sauerstoff und Nährstoffen aus der ungesättigten Zone in das Grundwasser. In der gesättigten Zone bleibt die Zahl der Bakterien längere Zeit relativ hoch im Vergleich

zur ungesättigten Zone. Doch nicht die Tiefe an sich bestimmt die Abnahme der Bakterienhäufigkeit und die bakterielle Aktivität, sondern die hydrologischen, physikalischen und geochemischen Einflüsse steuern wesentlich die Biosphäre der gesättigten Zone. Mit zunehmender Tiefe nimmt dann die Lebendzellzahl sehr langsam wieder bis auf Werte von 10^2 - 10^3 Bakterien/g Boden-Trockengewicht und darunter ab. Diese Abnahme ist jedoch in Abhängigkeit von der geologischen Stratifizierung diskontinuierlich. So weisen sandige Schichten in oberflächennahen Grundwässern immer höhere Zellzahlen auf als tonige Schichten und Felsgestein. Hier kann es bei einer entsprechenden Schichtung zu einem erneuten Anstieg der Zellzahlen in tieferen sandigen Schichten bis zu 10^5 Bakterien/g Boden-Trockengewicht kommen.

Die verschiedenen Aspekte der Mikrobiologie des Grundwassers sind Gegenstand zahlreicher **Übersichtsartikel** (BALKWILL & GHORSE, 1986; COATES & ACHENBACH, 2002; FREDRICKSON & ONSTOTT, 1996; GHORSE, 1996; GHORSE & BALKWILL, 1983; GHORSE & WILSON, 1988; GLIESCHE, 1996; GOLD, 1992; GOUNOT, 1991; GROSSMAN, 2002; HARVEY *et al.*, 2002; HARVEY & HARMS, 2002; HILGER & BARLAZ, 2002; HIRSCH, 1992a,b; HIRSCH & RADES-ROHKOHL, 1983a,b; 1988a,b; 1990; 1992; HIRSCH *et al.*, 1992a,b; HURST, 2002; LOVLEY & CHAPELLE, 1995; MARGOLIN, 2002; MADSEN, 1995; MADSEN & GHORSE, 1993; MCINERNE & SUBLETTE, 2002; PEDERSEN, 1993; PHELPS & FREDRICKSON, 2002; SCHAEFER III, 2002; SMITH, 2002; TORANZOS *et al.*, 2002; YATES, 2002), **Sonderhefte internationaler Fachzeitschriften** (FEMS Microbiology Reviews 20 (3/4):179-638 [1997]; Geomicrobiology 7 (1/2):1-130 [1989]; Microbial Ecology 16:1-115 [1988]; Journal of Microbiological Methods 21 (3):225-328 [1995]; Water Science and Technology 20 [1988]), **Druckschriften** (DVWK Schriften 35 [1983], 80 [1988]; GLIESCHE, 1999; GRIEBLER *et al.*, 2001; KUHLMANN & PREUß, 2000; Proceedings of the First International Symposium on Microbiology of the Deep Subsurface [1990]; SCHÖTTLER & PREUß, 1997; WEIGERT, 1996) oder **Bücher** (AMY & HALDEMAN, 1997; CHAPELLE, 1993; CULLIMORE, 1993; FREDRICKSON & FLETCHER, 2001; GIBERT *et al.*, 1994; GRIEBLER & MÖSSLACHER, 2003; MATTHES *et al.*, 1992).

Bei der Strukturanalyse bakterieller Populationen verschiedener Lebensräume wurden in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte erzielt. Besonders die Einführung der vielfältigen molekularbiologischen Techniken zum spezifischen Nachweis von Mikroorganismen und die Verwendung neuer Anreicherungstechniken führten zu einer enormen Entwicklung in der mikrobiellen Ökologie. Die Mehrheit der Untersuchungen nutzten sehr erfolgreich die 16S oder 23S rRNA, Strukturbestandteile der Ribosomen, bzw. die entsprechende rDNA als Zielsequenz für die Differenzierung von Bakterien und zur Entwicklung von spezifischen Sonden für deren Nachweis. Diese neuen molekularen Methoden eröffnen die Möglichkeit der Reinkultur-unabhängigen Untersuchung der Diversität der Mikroorganismen im Grundwasserraum. Hierzu wird anstelle der Bakterien die Gesamt-DNA des Grundwasserraumes isoliert. In dieser DNA-Präparation werden dann die Gene nachgewiesen, die spezifisch für Bakterienarten oder -gattungen sind. Hierdurch kann erstmals die Vielfalt des Anteils der bakteriellen Lebensgemeinschaft untersucht werden, der bisher mit den bekannten Techniken nicht kultivierbar ist (AMANN *et al.*, 1997; BRUNS & BUCKLEY, 2002; CHANDLER & BROCKMAN, 2001; LIU & STAHL, 2002,; OGRAM & SHARMA, 2002).

2. Material und Methoden

2.1 Lage der Untersuchungsgebiete und geologische Charakterisierung der untersuchten Aquifere

Der anfängliche Kernbereich dieses Forschungsvorhabens war die Untersuchung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften eines anthropogen unbeeinflussten Grundwasserleiters im Bereich der Bornhöveder Seenkette in Schleswig-Holstein. Dieser Tiefengrundwasserleiter II wurde im Rahmen des Projektes "Ökosystemforschung im Bereich der Bornhöveder Seenkette" hydrologisch und geochemisch intensiv an der Universität Kiel untersucht und deshalb für dieses Vorhaben ausgewählt (PIOTROWSKI, 1991).

Im Zuge dieser Probennahme erwies sich die Nutzung einer Trockenbohrung, gekoppelt mit der Entnahme von Sediment mittels einer Rammkernsonde hinsichtlich der Störung

der Sedimente und der mikrobiellen Kontamination der Proben als unzureichend. Deshalb wurde zum Vergleich eine in diesem Projekt entwickelte, spezielle Drucksonde der FUGRO Consulting GmbH in einem oberflächennahen Grundwasserleiter im Segeberger Forst getestet, die ungestörte und kontaminationsfreie Proben lieferte. Zusätzlich zur Gewinnung von Sediment- und Wasserproben aus den oben genannten Grundwasserleitern wurde Grundwasser von oberflächennahen Grundwasserleitern auf der Insel Föhr (Schleswig-Holstein), auf der Insel Hiddensee (Mecklenburg-Vorpommern) sowie ein oberflächennaher Grundwasserleiter bei Löcknitz (Mecklenburg-Vorpommern) beprobt.

2.1.1 Grundwasserleiter bei Wankendorf (Bornhöveder Seenkette, Westufer des Belauer Sees)

Der untersuchte Grundwasserleiter liegt im Bereich der Bornhöveder Seenkette etwa 30 km südlich der Landeshauptstadt Kiel in Schleswig-Holstein (Abb. 1). Es lassen sich zwei quartäre Grundwasserstockwerke unterscheiden (PIOTROWSKI, 1991). Der tiefer liegende Grundwasserleiter II ist aus Rückschmelzsanden der Elstervereisung aufgebaut und wird durch einen saaleeiszeitlichen Till-Komplex von mindestens 20 m Mächtigkeit abgedeckt. Somit wird der Grundwasserleiter II hydraulisch vom höher gelegenen Grundwasserleiter I getrennt (Abb. 2).

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführte Bohrung in der Bornhöveder Seenkette zur Gewinnung von Sedimentproben aus dem Grundwasserleiter II hat eine Teufe von 94 m erreicht und wurde im Trockenbohrverfahren abgeteuft.

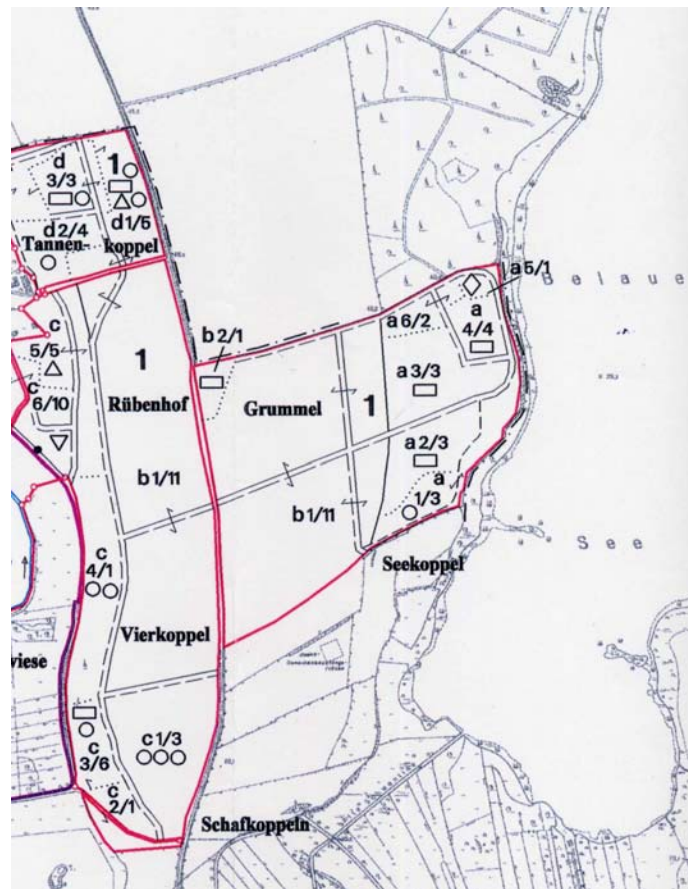


Abb. 1. Lage des Probennahmepunktes im Bereich der Bornhöveder Seenkette.

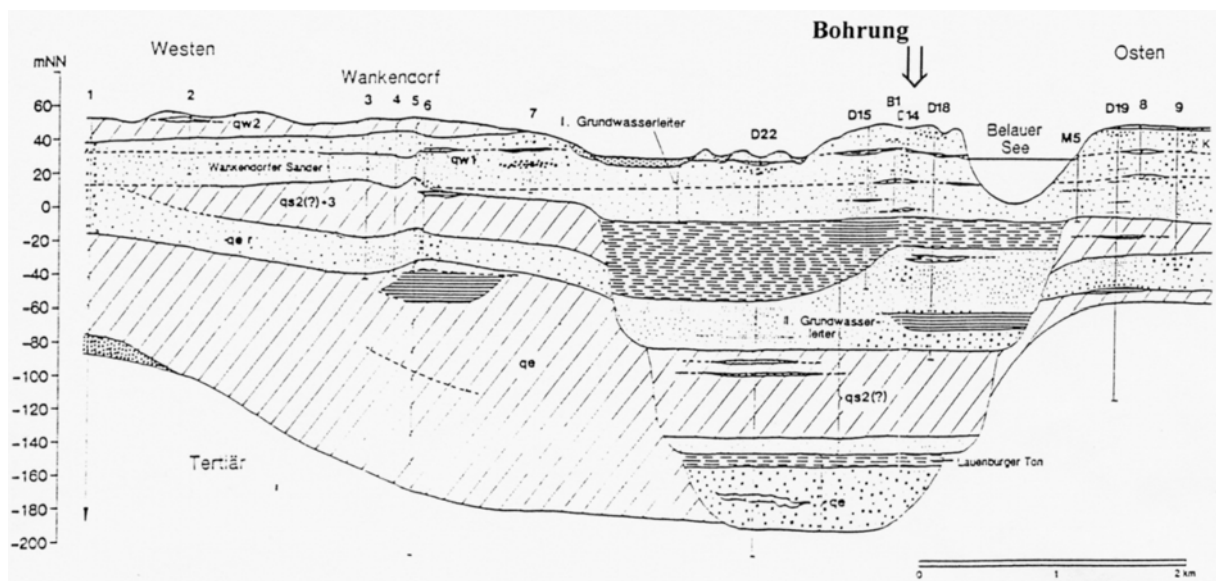


Abb. 2. Geologischer Schnitt im Bereich der Bornhöveder Seenkette (PIOTROWSKI, 1991).

2.1.2 Grundwasserleiter im Segeberger Forst

Der untersuchte oberflächennahe Grundwasserleiter liegt im nordwestlichen Randbereich des Segeberger Forstes (Ortsteil Klint des Ortes Heidmühlen, Schleswig-Holstein) (Abb. 3). Es handelt sich um eine flache, uhrglasförmig gewölbte Hügellandschaft mit einzelnen abflusslosen Senken. Größere Ansiedlungen oder eine landwirtschaftliche Nutzung fehlen im weiteren Umfeld, so dass das Untersuchungsgebiet von direktem Schadstoffeintrag frei ist (RIEMER, 1983).

Der Untergrund im Segeberger Forst wird durch saaleeiszeitliche Schmelzwassersande aufgebaut. In den randlichen Lagen werden diese von geringmächtigen weichseleiszeitlichen Schmelzwassersedimenten überdeckt. Im direkten Umfeld des Untersuchungsgebiets ist die Grenze zwischen den beiden eiszeitlichen Sedimenten bei ca. 12 m unter Geländeoberkante (GOK) durch einen Aufarbeitungshorizont zu ziehen. Der obere Grundwasserleiter, welcher bis zu einer Tiefe von 15,6 m beprobt wurde, ist aus gut sortierten Grobsanden aufgebaut, welcher im Liegenden durch einen Geschiebemergel bei 30 bis 33 m unter GOK begrenzt wird (RIEMER, 1983).

(Anfahrt: Autobahn **A21** bis **Abfahrt 12** [Bad Segeberg-Nord] oder Autobahn **A7** bis **Abfahrt 17** [Itzehoe, Bad Bramstedt], weiter auf der **B206** bis zur Abzweigung in Richtung Heidmühlen / Wildpark Eckholt, noch vor Heidmühlen im **Ort Heidmühlen / Ortsteil Klint** vom „Hartenholmer Damm“ der Ausschilderung „Wildpark Eekholt“ folgend in die Straße „**Am Klint**“, vorbei am „Seminar - und Ferienhof Klint“, weiter links haltend in den Segeberger Forst, die Teerstraße im Winkel ca. 145° von nach links verlassen, auf der relativ breiten unbefestigten Straße, nach etwa 100 m kommt links ein mit einem Schlagbaum gesperrter Waldweg, dieser Waldweg biegt nach etwa 75 m nach rechts ab, etwa 40 m nach dieser Rechtskurve befindet sich links im Wald das Brunnenfeld der CAU Kiel, etwa 30 m oberhalb dieses Brunnenfeldes verläuft ein weiterer Waldweg, an dessen oberen Rand sich die in diesem Projekt abgeteufte Grundwassermessstelle [Abb. 19]) befindet.



Abb. 3. Lage des Probennahmepunktes im nordwestlichen Randbereich des Segeberger Forstes (Schleswig-Holstein).

2.1.3 Grundwasserleiter auf der Insel Föhr

Untersucht wurde der Brunnen 12 (Wasserbeschaffungsverband Föhr; Schleswig-Holstein) im Grundwasserleiter auf der Insel Föhr am 04. Juli 2000. Die Filterstrecke des Brunnens befindet sich zwischen 23 und 37 m unter Flur. Der Grundwasserleiter ist ein Feinsand, sehr schwach mittelsandig bis mittelsandig. Im Hangenden der Filterstrecke befindet sich ein fein- bis mittelkiesiger Grobsand mit einer Mächtigkeit von fünf Metern. Abgedeckt wird der Aquifer durch eine drei Meter mächtige Schicht aus Geschiebelehm. Bis zur Geländeoberkante ist ein mittelsandiger, teilweise schwach grobsandiger Feinsand anzutreffen.

Es herrschten in dem geförderten Wasser oxidierende Bedingungen. Die deutliche landwirtschaftliche Nutzung wird aus dem Verhältnis der sehr hohen Nitrat- ($57,4 \text{ mg NO}_3^- \text{ l}^{-1}$) zu den geringen Sulfatkonzentrationen ($35,5 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ l}^{-1}$) deutlich (Tab. 2). Die Denitrifikation ist in dem Grundwasser noch nicht abgeschlossen. Eine Interpretation des Genesetyps in einem Valjaschko-Diagramm ist aufgrund des zu hohen Ionenbilanzfehlers nicht möglich.

2.1.4 Grundwasserleiter auf der Insel Hiddensee

Der Brunnen 11 des Grundwasserleiters auf der Insel Hiddensee (Mecklenburg-Vorpommern; SHW Hölter Wassertechnik Betriebsgesellschaft) wurde am 04. Oktober 2000 beprobt. Der ca. sieben Meter mächtige Grundwasserleiter weist eine vom Liegenden (Kies) zum Hangenden (Feinsand mit Schlufflagen) abnehmende Korngröße auf und kann demnach als Abschmelzsand, für den im allgemeinen eine Abnahme der hydrodynamischen Energie mit dem Bildungsalter kennzeichnend ist, charakterisiert werden (MÖBUS, 1991). Abgedeckt wird der Grundwasserleiter durch einen 16,8 m mächtigen Geschiebemergel. Die hohe Eisenkonzentration deutete auf reduzierende Bedingungen hin. Das Wasser befindet sich im Gleichgewicht (Verhältnis Nitrat/Eisen). Auffällig ist die hohe Chloridkonzentration, welche aber nicht auf einen marinen Einfluss durch das Eindringen von Salzwasser aus den Boddengewässern zu erklären ist. Vielmehr sind wahrscheinlich durch den Wind eingetragene Aerosole als Ursache für die erhöhten Chloridkonzentrationen zu sehen.

2.1.5 Grundwasserleiter in Löcknitz

Im Rahmen des Projektes war im Antrag vorgesehen, den Kontakt des Grundwassers mit kretazischen Sedimenten im Bereich Rügens im Messprogramm zu erfassen. Die bei den Vorbesprechungen im Jahre 1998 noch verfügbaren Brunnen wurden nach Auskunft der Betreibergesellschaft (Zweckverband Wasserversorgung und Abwasserbehandlung Rügen) Ende 1999 außer Betrieb gesetzt, demontiert und verfüllt. Auch eine Recherche beim geologischen Landesamt von Mecklenburg-Vorpommern und den entsprechenden Gemeinden zeigten keine Möglichkeit auf, einen Grundwasserleiter mit einem Pegel oder Brunnen zu finden, der die entsprechenden gewünschten geologischen Verhältnisse aufwies. Deshalb wurde als Ausweichgebiet der Raum Löcknitz gewählt, wo Kreide kurz unterhalb des Grundwasserleiters ansteht.

Untersucht wurde der Brunnen 7 (Grundwasserleiter in Löcknitz, Mecklenburg-Vorpommern; Trink- und Abwasserzweckverband Uecker-Randow Süd-Ost) am 18. Oktober 2000. Das Bohrprofil des Brunnens zeigte keinen unmittelbaren Kontakt des Grundwasserleiters mit anstehender Kreide. Der beprobte Brunnen in Löcknitz war zwischen 7,8 und 11,8 sowie zwischen 14,8 m und 18,8 m unter Geländeoberkante verfiltert. Zwischen diesen beiden Filterstrecken befindet sich laut Schichtenverzeichnis eine drei Meter mächtige Schluff- und Mergelschicht. Der obere nicht abgedeckte Aquifer ist aus einem kiesigen Mittel- und Grobsand aufgebaut. Der untere Grundwasserleiter besteht im Hangenden aus einer Geröllschicht (15-16 m unter Flur). Im Liegenden ist er aus einem kiesigen Mittelsand aufgebaut. Das Bohrprofil der 21,8 m tiefen Bohrung zeigte an der Basis einen steinigen Mergel. Das Schichtenverzeichnis eines 30 m entfernten, bereits still gelegten Brunnens wies diesen Mergel bis zu einer Tiefe von 40 m auf. Der Mergel ging im Liegenden in eine zwei Meter mächtige Tonschicht über. Unter dem Ton wurde Kreide erbohrt.

Die hohen Natrium- und Kaliumkonzentrationen deuten neben dem Nitrat auf einen landwirtschaftlichen Einfluss hin. Das Wasser befindet sich nicht im Gleichgewicht (Nitrat/Eisen). Wahrscheinlich ist die Denitrifikation noch nicht abgeschlossen. Die reduzierenden Bedingungen deuten sich mit leicht erhöhten Eisenkonzentrationen an. Es handelt sich aufgrund der sehr hohen Chlorid- und Sulfatkonzentrationen

wahrscheinlich um aufsteigendes Grundwasser. Ein Einfluss des nahen Oderhaffs ist eher unwahrscheinlich.

2.2 Probennahme

2.2.1 Entnahme von Grundwassersedimenten

Für die Erstellung der Ausschreibungsunterlagen für die notwendigen Bohrungen war es notwendig, sich grundlegend mit den geologischen Verhältnissen der jeweiligen Untersuchungsgebiete vertraut zu machen. Weiterhin waren die technischen Belange für eine Bohrung zu berücksichtigen, die dem Ziel der Untersuchung entsprechen. Es erfolgte eine Ausschreibung an insgesamt 10 Bohrfirmen, die sich nach erstem Kontakt zur Erstellung eines Angebotes bereit erklärt hatten. Die Firma „Schwedter Brunnenbau und Umwelttechnik GmbH“ (Berliner Allee 1, 16303 Schwedt/O.) unterbreitete das günstigste Angebot für die Bohrung im Bereich der Bornhöveder Seenkette und erhielt folglich den Zuschlag. In der Zeit vom 19.3. bis 13.4.2000 wurde eine Bohrung in der Bornhöveder Seenkette - am Westufer des Belauer Sees - niedergebracht.

Für die Durchführung dieser Bohrung waren verschiedene Genehmigungen notwendig. Neben der Zustimmung des Landeigentümers (Bundesvermögensamt) waren auch Genehmigungen durch die zuständige Forstbehörde, das Landesamt für Natur und Umwelt Schleswig-Holstein (Abt. Geologie/Boden) und des Projektzentrums Ökosystemforschung in Kiel erforderlich. Die erforderlichen Kontakte wurden hergestellt und die entsprechenden Genehmigungen konnten problemlos erhalten werden.

Für die Absicherung der Probengewinnung wurden Gespräche mit PD Dr. T. Scheytt (TU Berlin) aufgenommen, welcher umfangreiche Erfahrungen bei Probenentnahmen dieser Art und im Gebiet der Bornhöveder Seenkette besitzt. Im Rahmen dieser äußerst konstruktiven Zusammenarbeit war es möglich, technische Geräte, die für die Durchführung der Probenentnahmen notwendig waren, aber in diesem Projekt nicht gekauft werden konnten, zu leihen und eine Strategie für die zu bestimmenden Randparameter zu erarbeiten.

Die zweite Bohrung in diesem Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Firma FUGRO Consulting GmbH (Wolfener Straße 36 K, 12681 Berlin) durchgeführt. Eine erfolgreiche Erprobung des Systems FROSTAP 35 konnte wegen der Anpassungsentwicklung des Systems an die gestellten Erfordernisse erst am 23. August 2001 in Berlin erfolgen. Die mit diesem System geplante Probenentnahme von Grundwasser-Sedimentkernen im Bereich des Segeberger Forstes fand deshalb erst in der Zeit vom 30.8. bis zum 1.9. 2001 statt.

2.2.1.1 Grundwassersediment aus dem Aquifer II im Bereich der Bornhöveder Seenplatte

Die Probenentnahme vom 19.3. bis 13.4.2000 gliederte sich in zwei verschiedene Abschnitte. Zum einen musste im Bereich der Bornhöveder Seenkette eine geologische Bohrung niedergebracht werden und zum anderen wurde nach Erreichen der Endteufe die Bohrung zu einer Grundwassermessstelle ausgebaut.

Der zu untersuchende Grundwasserleiter befindet sich in einer eiszeitlichen Rinne, ca. 70 bis 130 m unter Geländeoberkante (GOK) (Abb. 2).

Die im Rahmen des Projektes durchgeführte Bohrung in der Bornhöveder Seenkette zur Gewinnung von Sedimentproben aus dem Grundwasserleiter II erreichte eine Teufe von 94 m und wurde im Trockenbohrverfahren abgeteuft. Im wasserungesättigten Bereich wurde mit einer Schnecke (Durchmesser 419 mm) gebohrt. Im wassergesättigten Bereich, welcher in einer Teufe von 17,7 m begann, erfolgte der Bohrfortschritt durch einen Ventilbohrer, wobei das Bohrloch fortlaufend mit dem Bohrfortschritt verrohrt wurde. Im Teleskopier-Verfahren wurde bei einer Teufe von 29,0 m unter Geländeoberkante die Rohrtour von 419 mm abgesetzt und mit einem Durchmesser von 324 mm, ebenfalls mit einem Ventilbohrer, gebohrt. Bei 55,0 m erfolgte ein weiterer Wechsel der Rohrtour auf 273 mm, welche bis zu einer Teufe von 83,0 m Verwendung fand. Unterhalb dieser Teufe wurde mit dem Enddurchmesser von 219 mm gearbeitet.

Während der Bohrarbeiten wurden von jedem Bohrmeter und zusätzlich bei jedem erkennbaren Schichtwechsel Sedimentproben ausgelegt, die petrographische Beschaffenheit vor Ort aufgenommen und detailliert ausgewertet. Sedimentart,

Korngröße und Sortierung wurden mittels Fingerprobe bestimmt, der Kalkgehalt mit Salzsäure (10%) geprüft. Von jeder Sedimentprobe wurde eine Unterprobe (0,15 l) in Probendosen abgefüllt. Ein detailliertes Schichtenverzeichnis ist im Anhang 1 dargestellt.

Die Entnahme der Sedimentproben aus dem Grundwasserleiter II erfolgte unterhalb einer Teufe von 84,8 m mittels einer Rammkernbohrsonde mit einem Schlaggewicht von 300 kg. Der Hub für einen Schlag betrug 40 cm. Zum Erreichen der jeweiligen Probenentnahmetiefe unterhalb der Bohrlochsohle waren zwischen 203 und 305 Schläge notwendig. Nach dem Vortrieb von jeweils 1 m wurde mit einem Ventilbohrer auf 219 mm nachgebohrt und die Verrohrung nachgesetzt. In der geplanten Probenentnahmestrecke von 10 Metern konnten insgesamt 4 Kerne erfolgreich entnommen werden. Bei 6 Kernen war, bedingt durch die Korngrößenzusammensetzung der Sedimente im Zusammenhang mit der großen Entnahmetiefe, ein vollständiger Kernverlust zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme lag der Wasserpegel im Bohrloch bei durchschnittlich 4,5 m unter Geländeoberkante.

Nach dem Erreichen der Endteufe von 94,0 m wurde die Bohrung zu einer Grundwassermessstelle (DN 115) ausgebaut (Abb. 18). Die Filterstrecke des Brunnens befindet sich zwischen 84,0 und 94,0 m unter Geländeoberkante, wobei ein Kiesbelagsfilter, Schlitzweite 0,3 mm, verwendet wurde (Abb. 6).

Der weitere Bereich im zu untersuchenden Grundwasserleiter wurde mit Bohrgut aus diesem Grundwasserleiter verfüllt, welches während des Bohrvorganges gewonnen und separat auf Folie gelagert wurde. Zwischen 55,0 und 65,0 m unter GOK erfolgte der Einbau einer Tonabdichtung, um einen hydrogeologischen Kurzschluss zu vermeiden. Eine weitere Tonsperre wurde zwischen 3,0 und 2,0 m unter GOK angelegt.

Der obere Abschluss der Grundwassermessstelle erfolgte durch den Einbau eines verzinkten Stahlrohres (DN 125), welches frostsicher einbetoniert und mit einer 5 Zoll „Seba“-Kappe verschlossen wurde. Die Ausbauskitze ist in Abb. 6 dargestellt. Die erforderliche Zugabe von Wasser während des Bohrvorganges konnte durch die Verwendung eines Pegels in unmittelbarer Nähe aus dem gleichen Grundwasserleiter gewährleistet werden.

Die Rammkernbohrsonde und die in diesem enthaltenen Liner (PVC) (Abb. 4) wurden vor dem Einsatz mit Alkohol (70%) desinfiziert. Eine Desinfektion der gesamten Verrohrung und der anderen Bohrwerkzeuge war nicht möglich. Zwar wurde die Bohrsonde im Vortrieb in das Sediment geschlagen, so dass eine Kontamination nicht zu vermuten ist, jedoch handelt es sich bei der verwendeten Technik um ein nicht geschlossenes System. Die Rammkernbohrsonde muss nach der Probenentnahme durch 80 m Wassersäule gezogen werden, wobei das erbohrte Sediment über den Kernfänger mit dem Wasser in Kontakt kommt.

Um eine Kontrolle über die Störungen während des Bohrvorganges an den Sedimentproben zu erlangen, wurde am Schneidschuh des Entnahmegerätes ein Kunststoffbeutel befestigt, welcher zur Kontrolle einer Diffusion flüssiger Phasen in die Probe 10 ml 4,2 M KBr und mikrobiologische Tracer in Form fluoreszierender Partikel (SilicaRed, Micromod, Durchmesser 800 nm) in einer Anzahl von ca. 70 Mrd. Partikeln enthielt (Abb. 5).

Nach der Entnahme des Inliners mit dem Sediment aus der Rammkernbohrsonde wurde dieser in eine Glove-Box mit Argon-Atmosphäre überführt. Dort wurden die Liner zersägt und das Sediment in 0,5 bzw. 1,0 l Dosen aus Polypropylen (PP, Nalgene®) überführt. Ein Teil des Sedimentes aus dem zentralen Bereich wurde in Sarstedt-Zentrifugen-Röhrchen (50 ml) übertragen. Alle zum Einsatz kommenden Geräte und Verpackungen, welche mit dem Sediment in Kontakt kamen, wurden vor dem Einsatz autoklaviert bzw. desinfiziert. Anschließend wurden die Behälter mit dem Sediment unter Argon-Atmosphäre in PE-Folie eingeschweißt und auf Eis transportiert und anschließend bei -70°C eingefroren.

Der vordere Teil der Rammkernbohrsonde sowie die Liner wurden mit Alkohol desinfiziert. Der Rest der Bohrsonde wurde mit Alkohol abgerieben.



Abb. 4. Liner in der Rammkernbohrsonde (mit Deckel) mit Schneidschuh und Kernfänger (Foto: I. Stodian).



Abb. 5. Rammkernbohrsonde mit Tracer-Beutel am Schneidschuh (Foto: I. Stodian).

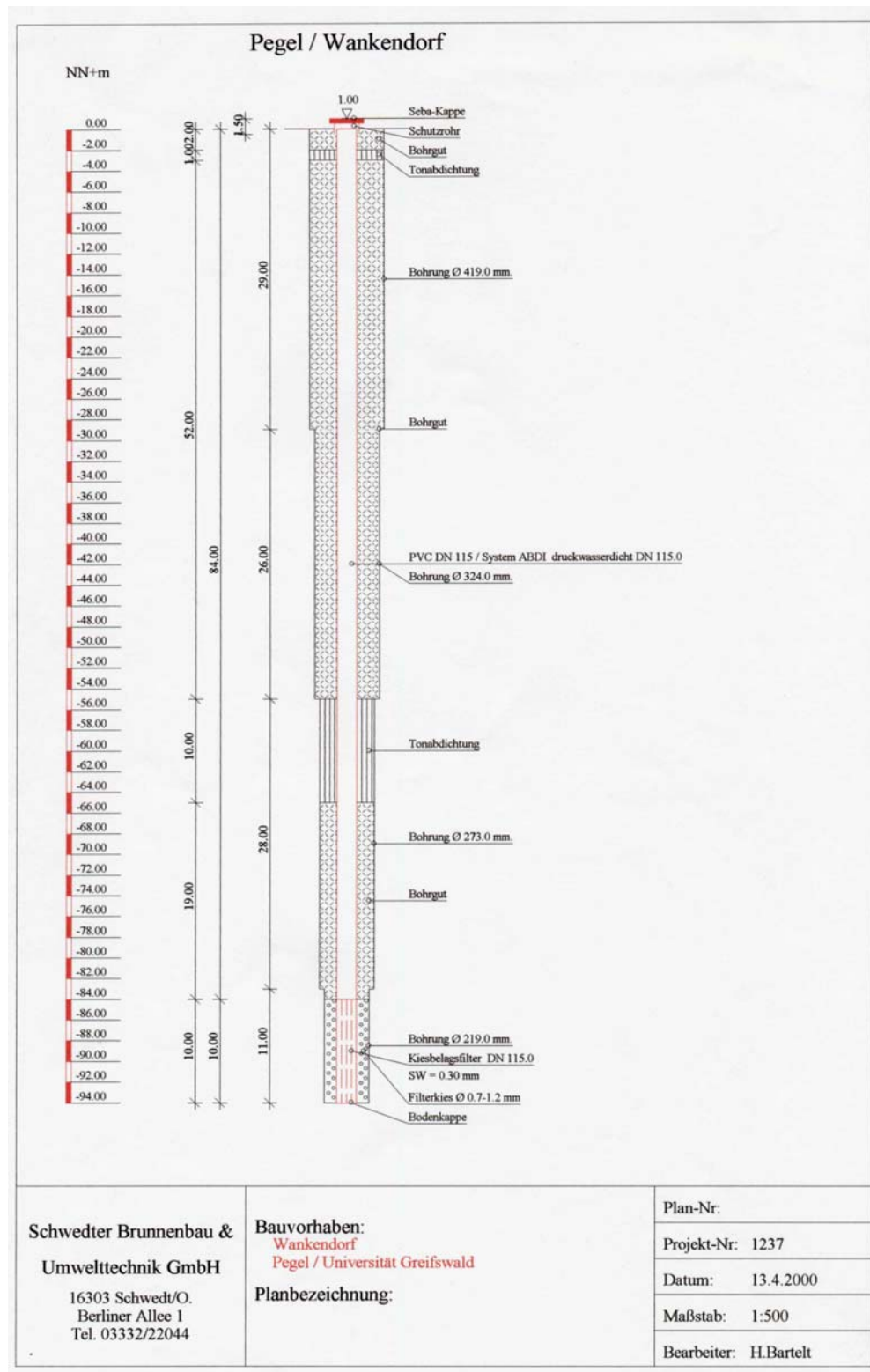


Abb. 6. Ausbauskizze der in diesem Projekt errichteten Grundwassermessstelle im Bereich Wankendorf (Quelle: Schwedter Brunnenbau & Umwelttechnik GmbH, Schwedt).

2.2.1.2 Grundwassersediment aus oberflächennahen Grundwasserleiter im Bereich des Segeberger Forstes

Für die sterile Entnahme von Grundwassersediment aus dem oberflächennahen Grundwasserleiter im Bereich des Segeberger Forstes wurde das System FROSTAP 35 (Firma FUGRO Consulting GmbH, Berlin) verwendet. Das System FROSTAP 35 ist eine Drucksonde, welche einen PP-Liner (Durchmesser 35 mm) enthält. Die geschlossene Sonde wird erst nach dem Erreichen der entsprechenden Teufe mechanisch geöffnet und dann mit einem maximalen Druck von 200 kN hydraulisch durch ein Gestänge in das Sediment gedrückt. Zur Verminderung der Reibung zwischen dem Sediment und der Innenwandung des PP-Liners ist es aus technischen Gründen erforderlich, einen Gazestrumpf mitzuführen, der das Sediment umhüllt (Abb. 7 - 14).

Für die Gewährleistung einer sterilen Entnahme von Grundwassersediment mit diesem System wurden die PP-Liner und der Gazemantel durch Autoklavieren sterilisiert. Alle übrigen Teile wurden durch 3-maliges Abflammen mit Alkohol (70%) bei jedem Einsatz vor Ort sterilisiert. Zur Vermeidung der Verschleppung der Sedimente des Oberbodens in den Grundwasserbereich wurde am Entnahmepunkt bis zu einer Tiefe von 2 m vorgeschachtet.

Um eine Kontrolle über die Störungen während der Entnahme des Grundwassersedimentkernes zu erhalten, wurde die geschlossene Spitze des Bohrgerätes mit einem „mikrobiologischen„ Tracer in Form fluoreszierender Partikel (SilicaRed, Micromod, Durchmesser 800 nm) in einer Anzahl von ca. 70 Mrd. Partikeln versehen. Zu diesem Zweck wurden die Partikel in sterile Tonmasse gegeben, mit der die Spitze der Drucksonde umhüllt wurde. Nach dem Auszählen eventuell vorhandener Tracer-Partikel in der Probe kann man damit Rückschlüsse auf Sedimentverschleppungen von höher gelegenen Schichten bis zur jeweiligen Entnahmetiefe ziehen.

Nach dem Erreichen der Endteufe wurde durch ein Peltierelement, welches sich zwischen der Spitze der Drucksonde und dem PP-Liner befindet, der sich dort befindliche Sedimentbereich vereist. Um zu gewährleisten, dass die Eisbarriere nicht vor dem Abschluss des Ausbaus der Drucksonde schmilzt und es dadurch zu einer Kontamination mit ortsfremden Material kommt, wurde unter Aufrechterhaltung der

Stromversorgung die Drucksonde ausgebaut (Anpassungsentwicklung der FUGRO Consulting GmbH). Nach dem Ausbau der Drucksonde wurde der Liner aus der Drucksonde entnommen und mit sterilen Kappen verschlossen.

Einige Kerne wurden sofort *in-situ* bei -80°C in Trockeneis eingefroren, andere Kerne wurden in einer mitgeführten Glove-Box, welche mit sterilem Argon gefüllt war, geschlachtet und in sterile PP-Dosen überführt. Diese Proben wurden teilweise eingefroren (-80°C), ein weiterer Teil dieser Sedimentkerne wurde für die Untersuchungen der kultivierbaren Bakterien kühl (ca. 4°C) gelagert und ins Labor transportiert.

Es wurden insgesamt 6,3 m Sedimentkernmaterial im Bereich von 5,5 bis 15,6 m gewonnen. Zusätzlich wurde an der Stelle der Entnahme dieser Sedimentkerne ein Brunnen ausgebaut, der die Entnahme von Grundwasser erlaubt. Nach dem Erreichen der Endteufe von 20,0 m wurde die Bohrung zu einer Grundwassermessstelle (DN 115) ausgebaut. Die Filterstrecke des Brunnens befindet sich zwischen 13,3 und 14,3 m unter Geländeoberkante (Abb. 15).



Abb. 7. Drucksonde FROSTAP 35: Sondenspitze (Foto: I. Stodian).



Abb. 8. Drucksonde FROSTAP 35: Sondenspitze in Einzelteilen (Fotos: I. Stodian).

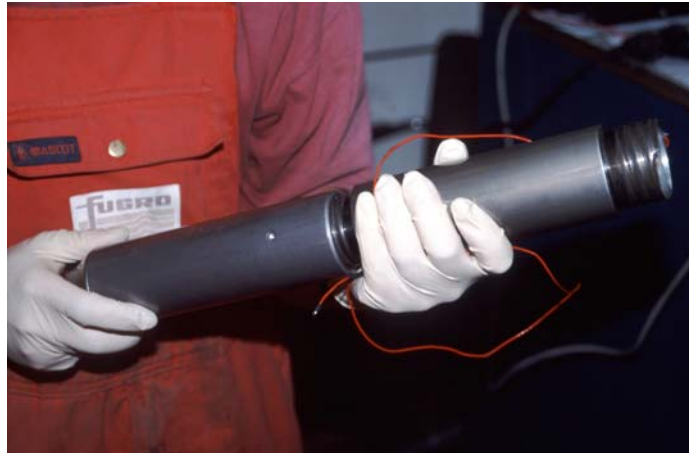


Abb. 9. Drucksonde FROSTAP 35: Sondenspitze mit Peltierelement (Foto: I. Stodian).



Abb. 10. Drucksonde FROSTAP 35: Zusammenbau der Einheit Sondenspitze / Peltierelement mit dem Gestänge (Foto: I. Stodian).



Abb. 11. Drucksonde FROSTAP 35: Gestänge mit Liner und Stromkabel für das Peltierelement (Foto: I. Stodian).



Abb. 12. Drucksonde FROSTAP 35: Sonde im Einsatz – Einführung in den Boden (Foto: I. Stodian).



Abb. 13. Drucksonde FROSTAP 35: Sonde im Einsatz – Vortrieb des Gestänges (Foto: I. Stodian).



Abb. 14. Drucksonde FROSTAP 35: Sonde im Einsatz - Wagen im Gelände (Foto: I. Stodian).

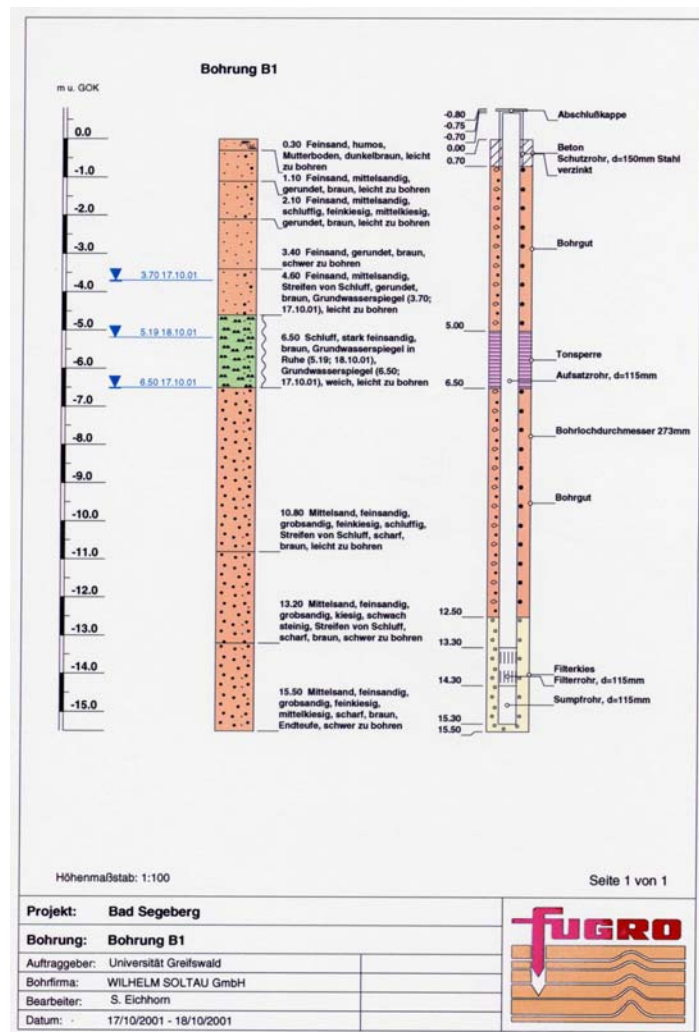


Abb. 15. Ausbauskizze der in diesem Projekt errichteten Grundwassermessstelle im Segeberger Forst (Quelle: FUGRO CONSULT GmbH, Berlin).

2.2.2 Entnahme von Grundwasser

Zum Vergleich der sessilen mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Grundwasserraumes mit der des freien Grundwassers wurden Wasserproben aus dem freien Grundwasser verschiedener Grundwasserleiter entnommen. Dabei fand die Probennahme bei den in diesem Projekt abgeteufte Brunnen 13 bzw. 15 Monate nach dem Abteufen statt, um keine durch die Bohrung und den Brunnenbau bedingten Artefakte abzubilden. Die notwendigen Anforderungen, die sich an die kontaminationsfreie Gewinnung der Mikroorganismen aus dem Grundwasser stellten, machten eine sorgfältige und zeitaufwendige Planung und die Konstruktion einer speziell angepassten Filtrationsanlage erforderlich (Abb. 16).

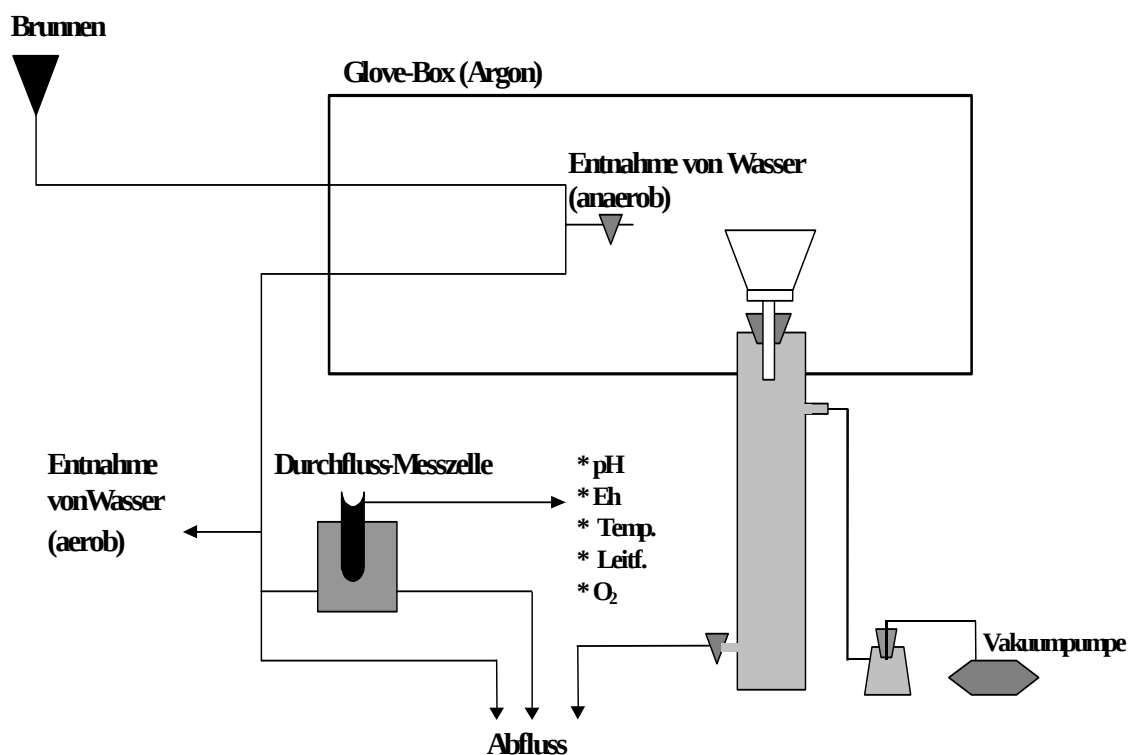


Abb. 16. Schematische Darstellung der in diesem Projekt entwickelten Filtrationsanlage für Grundwasser.

Grundwasser aus Brunnen der verschiedenen Standorte und Tiefen wurde mit einem speziellen Versuchsaufbau steril filtriert (Abb. 16 und 17). Die Entnahme der Grundwasserproben erfolgte an den für die Wasseruntersuchung der Rohwässer vorgesehenen Wasserhähnen in den Brunnenstuben direkt aus der Förderstrecke. Die Brunnen förderten während der gesamten Zeit der Probenentnahme und speisten das Wasser in das jeweilige lokale Netz ein.

Weiterhin wurden aus den Brunnen an den Standorten, an denen eine Entnahme von Sediment erfolgte, Wasserproben gewonnen. Dort erfolgte die Entnahme des Wassers mit einer Pumpe (SQ3-40; Grundfos, Groß Machnow) aus dem Brunnen.

Das Wasser wurde durch einen Schlauch von der Brunnenstube bzw. der Pumpe in die mit Alkohol (70 %) desinfizierte Glove-Box (Mecaplex AG, Grenchen, Schweiz) geführt.

Das verwendete Schlauchmaterial bestand aus Silikon und wurde, ebenso wie sämtliche Wasserhähne, Schellen, Schlauchanschlüsse, Unterlegscheiben, Messkolben, Bechergläser, Pinzetten und Filter, vor Gebrauch autoklaviert.

Die Qualität des Grundwassers machte es erforderlich, unter anaeroben Bedingungen zu arbeiten. Die zumeist sauerstoffarmen Grundwässer wiesen teilweise einen sehr hohen Gehalt an gelöstem Eisen auf (Insel Hiddensee $1,26 \text{ mg l}^{-1}$, Löcknitz $0,46 \text{ mg l}^{-1}$), welcher beim Kontakt mit dem Luftsauerstoff während der Filtration oxidieren würde und als amorphes $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bzw. FeOOH ausfallen und die Poren des Filters nach sehr kurzer Zeit verstopfen würde. Daher wurde die Glove-Box permanent mit Argon begast, um ein Ausfällen von Eisenoxihydroxid (FeOOH) aus dem Grundwasser während der Entnahme und Filtration zu vermeiden. Anaerobes Arbeiten im Argon-Durchstrom schloss weiterhin eine Kontamination der Proben durch Bakterien der Luft aus. Weiterhin wurde das Argon vor dem Eintritt in die Glove-Box steril filtriert.

Für die Filtration des Wassers wurden Cellulose-Acetat-Filter verwendet (Porengröße: $0,2 \mu\text{m}$, $\varnothing$: 100 mm oder 47 mm; Sartorius, Göttingen). Das entnommene Grundwasser wurde in der Glove-Box in einen Messkolben von einem Liter überführt und durch Vakuumfiltration (KNF Aero Mat, Neuberger, Freiburg) mit einem Unterdruck von 80 kPa abfiltriert (Abb. 17).

Zur Erhöhung der Filterleistung wurde ein Druckrohr konstruiert, welches durch eine spezielle Schleuse luftdicht in die Glove-Box eingearbeitet wurde. Der Anschluss der Vakuumpumpe und das Entleerungsventil befanden sich außerhalb der Box. Damit war ein zeitaufwendiges Ausschleusen des abfiltrierten Wassers nicht erforderlich. Nach Gewinnung der einzelnen Filter wurden diese in eine sterile Petrischale überführt, mit Parafilm verschlossen und auf Trockeneis bei -80°C gelagert. Der Transport des Probenmaterials in das Labor erfolgte umgehend nach abgeschlossener Probenentnahme. Dort wurden die Filter bis zur Isolierung der DNA bei -70°C gelagert. Das im Durchstrom entnommene Wasser wurde von der Entnahmestelle in der Glove-Box durch einen Silikonschlauch in eine Durchfluss-Messzelle (M. Honold, Umweltmesstechnik, Hürth) geführt, welche sich außerhalb der Glove-Box befand. Dort erfolgte während einer Dauermessung die Bestimmung relevanter Randparameter wie Eh- und pH-Wert, Leitfähigkeit, Temperatur, Sauerstoffkonzentration sowie Sauerstoffsättigung. Unmittelbar vor dieser Durchflussmesszelle befand sich eine Entnahmestelle für die Gewinnung steriler Wasserproben, die zur Kultivierung von Bakterien, Untersuchung des Wassers auf Protozoen, zur Bestimmung ausgewählter Kat- und Anionen sowie zur sofortigen Messung von Nährstoffen dienten. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abb. 16. Der Durchfluss von Grundwasser an den einzelnen Entnahmestellen betrug ca. 600 l h^{-1} .

Für die zusätzlich untersuchten Grundwasserleiter konnten die Brunnen der jeweils ansässigen Wasserversorger genutzt werden. In der zeitlichen Reihenfolge wurden folgende Brunnen beprobt:

- 1. Grundwasserleiter auf der Insel Föhr, Brunnen 12**
(Wasserbeschaffungsverband Föhr, 04. Juli 2000)
- 2. Grundwasserleiter auf der Insel Hiddensee, Brunnen 11**
(SHW Hölter Wassertechnik Betriebsgesellschaft, 04. Oktober 2000)
- 3. Grundwasserleiter in Löcknitz, Brunnen 7**
(Trink- und Abwasserzweckverband Uecker-Randow Süd-Ost, 18. Oktober 2000)
- 4. Grundwasserleiter II in Wankendorf, Brunnen dieses Vorhabens (Abb. 18)**
(19. Juli 2001)
- 5. Grundwasserleiter im Segeberger Forst, Brunnen dieses Vorhabens (Abb. 19)**
(20. Oktober 2002)



Abb. 17. Filtrationsanlage und Entnahmeverrichtung in einer Glove-Box mit Argonatmosphäre (Fotos: I. Stodian).



Abb. 18. Grundwassermessstelle im Untersuchungsgebiet Wankendorf (Foto: I. Stodian).



Abb. 19. Grundwassermessstelle im Untersuchungsgebiet Segeberger Forst (D. Thiele-Gliesche).

2.3 Bestimmung ausgewählter Kat- und Anionen und ausgewählter Randparameter

Die Bestimmung ausgewählter Kat- und Anionen erfolgte durch das Institut für Angewandte Geowissenschaften II, Fachgebiet Hydrogeologie der TU Berlin. Zu diesem Zweck wurden Proben in 100 ml Flaschen aus PET (Polyethylenterephthalat) gefüllt, konserviert (Anionen: TTE (Trichlortrifluorethan), Kationen: konz. HNO_3) und bis zur Messung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die Bestimmung von ortho-Phosphat und Ammonium erfolgte photometrisch nach GRASSHOFF *et al.* (1983). Die Messung von Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential, Leitfähigkeit, Sauerstoffkonzentration und Sauerstoffsättigung des Grundwassers wurde mittels WTW-Elektroden (WTW-SenTix81 mit externem Temperaturfühler, SenTix ORP-Redoxmesskette, Leitfähigkeits-Messzelle TetraCon und Sauerstoffsensor CellOx 325, Wissenschaftlich Technische Werkstätten (WTW), Weilheim) in einer Durchfluss-Messzelle bestimmt (Abb. 20).

2.4 Mikrobiologische Methoden

Zur Beschreibung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften des untersuchten Grundwasserleiters wurden zuerst die Gesamtzellzahlen durch Anfärbung der Bakterienzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange und die Zellzahlen kultivierbarer Bakterien auf verschiedenen Medien (PYGV, PYGV/10, PYGV/100, PYGV/1000) ermittelt.

2.4.1 Medien

Alle Medien wurden mit Grundwasser des jeweiligen Standortes angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von festen Nährmedien wurde 1,5% Agar (Roth, Karlsruhe) verwendet.



Abb. 20. WTW-Messelektroden in der Durchfluss-Messzelle zur kontinuierlichen Messung der Randparameter (Foto: I. Stodian).

Medium PYGV (Schlesner, 1994)

HBM (Hutner`s basal medium)	20 ml
Bacto-Pepton	0,25 g
Bacto-Yeast Extract	0,25 g
Glucose	0,25 g
Vitamin-Lösung "Nr. 6" (2-fach konzentriert)	5,0 ml
mit Grundwasser auf 1000 ml aufgefüllt, pH 7,5	

HBM

Nitrilotriessigsäure	10,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	29,9 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3,34 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	9,25 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	99,0 mg
Metallösung "44"	50,0 ml
Aqua bidest.	950,0 ml

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH 7,2 eingestellt.

Metallösung "44"

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA = Titriplex III)	0,250 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,095 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,500 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,154 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,0392 g
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,0248 g
(or CoCl ₂ x 6 H ₂ O: 0.0203 g)	
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	0,0177 g
mit aqua bidest.auf 100,0 ml auffüllen	

Vitamin-Lösung „Nr. 6“

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin x HCl	10,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Thiamin x HCl	5,0 mg
Nicotinamid (Niacinamid)	5,0 mg
D-Pantothersäure (Hemicalcium Salz)	5,0 mg
Vitamin B12	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg

mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen, pH 7,5 (sterilfiltriert).

2.4.2 Isolierung bakterieller Reinkulturen

Zur Isolierung aerober chemoorganoheterotropher Bakterien wurde einerseits das Grundwasser bzw. die abzentrifugierten Grundwassersediment-Proben auf die entsprechenden Medien ausplattiert und für 8 Wochen bei 9°C inkubiert. Hierdurch wurde zum einen die Lebendkeimzahl bestimmt und zum anderen wurden aus der Vielfalt der entstandenen Kolonien zufällig 200 ausgewählt. Diese wurden über 3 Reinigungsausstriche gereinigt und in Schrägagar- und Glycerinkulturen konserviert. Die Reinigung erfolgte bei 30°C.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Techniken zur Beschreibung der Diversität bzw. Aktivität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Grundwasser basieren darauf, dass anstelle der kultivierbaren Mikroorganismen ihre DNA aus dem Grundwassersediment isoliert werden. Diese Isolierung der Nukleinsäuren muss folglich möglichst effizient sein. Neben einer hohen quantitativen Ausbeute ist die biochemische Reinheit der Nukleinsäure-Präparation von großer Bedeutung. Der Erfolg der molekularbiologischen Techniken hängt entscheidend von diesem Arbeitsschritt ab. Deshalb wurden die bisher beschriebenen Methoden (Methoden 2 bis 16) zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Grundwassersedimenten miteinander verglichen und für die vorliegenden Grundwasser- und Sedimentproben getestet. Außerdem wurden die gewonnenen bakteriellen Reinkulturen vermehrt (25-ml Kulturen; 30°C) und daraus die DNA mit Methode 1 isoliert.

2.5.1 DNA-Isolierung

2.5.1.1 Puffer für die DNA-Isolierung, Gelelektrophorese und PCR

Puffer für die DNA-Isolierung:

Die Puffer wurden nach dem Ansetzen mit *aqua bidest.* 20 min bei 121°C autoklaviert. Den Puffern die SDS enthalten, wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte SDS-Lösung zugefügt, da SDS beim Erhitzen häufig ausfiel und einen weißen, unlöslichen Niederschlag bildete.

Puffer (HURT *et al.*, 2001)

100 mM NaPO₄

	100 mM Tris-HCl (pH 7,0) 1% (w/v) CTAB 2% (w/v) SDS 100 mM EDTA (pH 8,0) 1,5 M NaCl
Extraktionspuffer (PURDY <i>et al.</i> , 1996)	120 mM NaPO ₄ 1% (w/v) PVPP 10% (w/v) SDS
Puffer (WEINBAUER <i>et al.</i> , 2002)	50 mM Natriumacetat 0,5% (w/v) SLS 10 mM EDTA
Puffer (YEATES <i>et al.</i> , 1998)	1,5 M NaCl 100 mM Tris-HCl [pH 8,0] 100 mM EDTA
TENS-Puffer (DUNBAR <i>et al.</i> , 1999)	100 mM NaCl 50 mM Tris [pH 8,0] 20 mM EDTA 1% (w/v) SDS
PVPP-Puffer (BERTHELET <i>et al.</i> , 1996)	0,1 M NaCl 0,5 M Tris-HCL (pH 8,0) 10% (w/v) SDS
Extraktionspuffer (STACH <i>et al.</i> , 2001)	1 M NaCl 250 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10% (w/v) CTAB 1% (w/v) PVPP
Puffer (MILLER <i>et al.</i> , 1999)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM Tris-HCl (pH 8,0) 5% (w/v) SDS 50 mM NaCl
CTAB-Puffer (GRIFFITH <i>et al.</i> , 2000)	10% (w/v) CTAB 700 mM NaCl 120 mM KH ₂ PO ₄

Extraktionspuffer (ZHOU <i>et al.</i> , 1996)	1% (w/v) CTAB 100 mM Tris-HCl [pH 8,0] 100 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl 100 mM EDTA
Extraktionspuffer (KRAMER & SINGLETON, 1993)	100 mM LiCl ₂ 50 mM Tris [pH 7,5] 30 mM EDTA 2% (w/v) SDS
Extraktionspuffer (MARTIN-LAURENT <i>et al.</i> , 2001)	100 mM Tris (pH 8,0) 100 mM EDTA 100 mM NaCl 2% (w/v) SDS 1% (w/v) PVPP
SET-Puffer (GLIESCHE <i>et al.</i> , 1997)	50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 50 mM EDTA 5% (w/v) Saccharose
SSC-Extraktionspuffer (diese Arbeit)	1 x SSC 1,5% (w/v) SDS
Extraktionspuffer 1 (SCHALLA, 2001)	50 mM Tris [pH 7,5] 1 mM EDTA
Extraktionspuffer 2 (SCHALLA, 2001)	10 mM Tris [pH 7,5] 1 mM EDTA

Puffer für die Agarosegelelektrophorese:

10 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)	0,89 M Tris 14,4 ml Eisessig 2 M EDTA
Tris-Borat-Puffer, 10 x TBE (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989)	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 0,2 M EDTA

DNA-Auftragspuffer
(SAMBROOK & Russel, 2001)

50% (w/v) Glycerin
0,05% (w/v) Bromphenolblau
0,05% (w/v) Xylencyanol

PCR-Puffer:

10 x Promega Reaktionspuffer (Madison) mit MgCl_2 (15 mM)

2.5.1.2 Methoden der DNA-Isolierung

Die Beschaffenheit der jeweiligen Umweltprobe beeinflusst maßgeblich die Ausbeute und Qualität einer DNA-Extraktionsmethode. Entscheidend ist die Anzahl und der physiologische Zustand der Mikroorganismen und die Konzentration PCR-inhibierender Substanzen in der Probe (z.B. Huminsäuren). Zahlreiche verschiedene Methoden zur direkten Isolierung von Nukleinsäuren aus Umweltproben wurden bereits beschrieben (DUNBAR *et al.*, 1999; GRIFFITH *et al.*, 2000; HURT *et al.*, 2001; GLIESCHE *et al.*, 1997; WEINBAUER *et al.*, 2002; STACH *et al.*, 2001; YEATES *et al.*, 1998; BERTHELET *et al.*, 1996; PURDY *et al.*, 1996; GRIFFITH *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 1996), doch sind vergleichende Arbeiten selten, die verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Umweltproben getestet haben (Hurt *et al.*, 2001). So liegt bisher auch keine optimierte Methode zur Isolierung von DNA aus Grundwasser und Grundwassersedimenten vor. Die meisten Veröffentlichungen über DNA-Extraktionen aus Bodenproben konzentrieren sich auf bakterienreicheren Oberboden (A-Horizont) oder aquatische Sedimente.

Zur Inaktivierung von DNasen wurden alle Lösungen und Plastikgefäße 20 min bei 121°C autoklaviert. Bei allen getesteten Methoden erfolgte die Ablösung der Zellen von den Bodenpartikeln und der Zellaufschluss mit Hilfe eines Glasperlengemisches ($\emptyset$: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1). In einem Schüttelgerät (Micro-Dismembrator U, Braun Biotechnology, Melsungen oder FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA oder Mini Bead Beater, BioSpec Products, Bartlesville, Oklahoma) wird die Probe in einem Puffer zusammen mit den Glasperlen stark geschüttelt. Durch die Reibung der Bodenpartikeloberflächen und

Glasperlen aneinander werden die Zellen von den Oberflächen abgelöst und die Zellwände zerstört.

Nur bei einigen Methoden (5: YEATES *et al.*, 1998; 14: GLIESCHE *et al.*, 1997; 16: SCHALLA, 001) wurde zusätzlich auch eine Ultraschallbehandlung mit Hilfe des Ultraschallbades Bransonic 220 (Branson Sonic Power Company, Danbury, USA) durchgeführt. Dazu wurde bei Methode 14, 15 und 16 in einem weiteren Ansatz die Probe im Puffer aufgenommen, dreimal 3 min im Ultraschallbad (Bransonic 220, Branson) beschallt und zwischendurch je 2 min auf Eis gekühlt. Die weitere Verarbeitung erfolgte dann nach der angegebenen Vorschrift. Bei Methode 5 wurde für die Ultraschallbehandlung nach der unten angegebenen Vorschrift verfahren.

Folgende Puffergemische wurden mit jeweils 0,5 g Sediment bzw. ¼ Filter und 0,25 g Glasperlengemisch in einem 2-ml Eppendorf-Schraubdeckelröhrchen für 30 s bei Schüttelstärke 5,5 m sec⁻¹ geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA) und anschließend zentrifugiert (1000 x g, 1 min, 4°C). Eine Ausnahme bildete die Variante 4 modifiziert nach YEATES *et al.* (1998). Hier wurde das Puffergemisch zunächst 30 s bei 4,5 m/sec geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA), dann 50 µl 20% (w/v) SDS dazugegeben und nochmals bei 5,5 m/sec geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA).

Methode 1: DNA-Isolierung aus Reinkulturen (modifiziert nach Gliesche *et al.*, 1997)

Jeweils 25 ml der Reinkulturen wurden in einem 50-ml Sarstedt-Zentrifugenröhrchen bei 6000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz bei -70°C eingefroren. Die Pellets wurden geteilt und in zwei parallelen Ansätzen weiter verarbeitet. Dann erfolgten Zellaufschluss und DNA-Extraktion der Ansätze mit heißem Phenol. Hierzu wurde das Pellet in 200 µl eiskaltem TE-Puffer [pH 8,0] resuspendiert, 350 µl SSC, 60 µl SDS-Stammlösung (10% [w/v]) und 250 mg Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm ; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) wurden zugegeben und bei 200 x g für 30 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Zu der Suspension wurden 1 ml Phenol (pH 7,5; 65°C) zugegeben, gevortext und 10 - 15 min bei 65°C inkubiert. Dabei wurde durch mehrmaliges Schütteln und Vortexen die organische und wässrige Phase in Mischung gehalten. Nach Zentrifugation (16000 x g, 4°C, 15 min) wurde der wässrige Überstand in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2 Vol. Phenol/Chloroform-Gemisch (pH 7,5) zugegeben, gevortext und 5 - 10 min auf Eis unter regelmäßigem

Mischen inkubiert. Nach Zentrifugation (16000 x g, 4°C, 15 min) wurde dem wässrigen Überstand in einem neuen 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol zugesetzt, 5 - 10 min auf Eis unter regelmäßigem Mischen inkubiert und dann zentrifugiert (16000 x g, 4°C, 15 min). Aus der wässrigen Phase wurde über Nacht die DNA durch Ethanolfällung gewonnen und in 200 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

Dann wurden 20 µl RNase A (10 mg ml⁻¹ TE) zugegeben, 45 min bei 37°C inkubiert und nochmalig gereinigt. Dazu wurden wieder 2 Vol Phenol/Chloroform-Gemisch [pH 7,5] zugegeben, gevortext und 5 - 10 min auf Eis unter regelmäßigem Mischen inkubiert. Nach Zentrifugation (16000 x g, 4°C, 15 min) wurden dem wässrigen Überstand in einem weiteren 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben, 5 - 10 min auf Eis unter regelmäßigem Mischen inkubiert und dann zentrifugiert (16000 x g, 4°C, 15 min). Danach erfolgte eine weitere Ethanolfällung der DNA aus der wässrigen Phase und Aufnahme in 200 µl *aqua bidest.*

Methode 2: (modifiziert nach HURT *et al.*, 2001)

Die Sedimentprobe (0,5 g) bzw. der Filter wurde in einem 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 250 µg sterilem Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm ; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) und 1 ml Extraktionspuffer (4 M Guanidinisothiocyanat; 10 mM Tris-HCl [pH 7,0]; 1 mM EDTA; 0,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) aufgenommen, gevortext und bei -70°C für mindestens 20 min eingefroren. Dieses Gemisch wurde 2 min auf Stufe 4,5 bis zum Auftauen geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA) und nochmals eingefroren. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Proben in 50 ml Sarstedt-Zentrifugenröhrchen überführt und bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. 9 ml Extraktionspuffer (100 mM NaPO₄; 100 mM Tris-HCl [pH 7,0]; 1% [w/v] CTAB; 2% [w/v] SDS; 100 mM EDTA [pH 8,0]; 1,5 M NaCl) zugegeben und 30 min bei 65°C und gelegentlichem Vortexen (3 - 5 mal) inkubiert. Die wässrige Phase wurde von der Phenolphase durch Zentrifugation (1800 x g; 10 min; 4°C) getrennt und vorsichtig, ohne die Interphase aufzuwirbeln, in ein neues 50-ml Sarstedt-Zentrifugenröhrchen gegeben, der Rest mit 5 ml des Extraktionspuffers gemischt und nochmals 10 min bei 65°C inkubiert und wie zuvor zentrifugiert. Die Überstände wurden zusammengeführt und mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 5 min auf Eis mit gelegentlichem Vortexen inkubiert und anschließend zentrifugiert (6000 x g; 10 min; 4°C). Es folgte die Ethanolfällung der wässrigen Phase und Aufnahme in 100 µl *aqua bidest.*

Methode 3: (modifiziert nach PURDY *et al.*, 1996)

Zu der Sedimentprobe (0,5 g) bzw. dem Filter (Ø 47 mm, 4 l Wasser) wurden 250 mg autoklaviertes Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1), 0,7 ml Extraktionspuffer (120 mM NaPO₄ [pH 8,0]; 1% [w/v] PVPP; 10% [w/v] SDS) und 5 ml Tris-gepuffertes Phenol (pH 8,0) gegeben und 3 mal für 20 s mit 4,5 m/sec geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA). Zwischen den FastPrep®-Behandlungen wurden die Proben auf Eis gekühlt. Das Gemisch wurde zentrifugiert (16000 x g, 4°C, 10 min), der Überstand in ein neues 2-ml

Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Rest unter nochmaliger Zugabe von Extraktionspuffer nochmals im Fastprep geschüttelt. Die Überstände wurden zusammengeführt und mit einem Volumen Phenol:Chloroform (4:1) extrahiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis und gelegentlichem Vortexen wurde zentrifugiert (16000 x g, 4°C, 10 min). Es folgte die Ethanol-fällung der DNA aus der wässrigen Phase und Aufnahme in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Anschließend wurde erneut mit Ethanol (96%) gefällt und in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

Methode 4: (modifiziert nach WEINBAUER *et al.*, 2002)

Das Sediment (0,5 g) bzw. der Filter wurden mit 250 mg Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1), 0,5 ml saurem Extraktionspuffer (50 mM Natriumacetat, 5% [w/v] SLS, 10 mM EDTA [pH 4,2]) und 0,5 ml Phenol in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 4,5 m/sec geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA). Das Gemisch wurde danach zentrifugiert (7200 x g, 4°C, 20 min) der Überstand verworfen und die DNA aus der organischen Phase eluiert. Dazu wurde die organische Phase in 0,5 ml basischen Tris-Puffer (1M Tris [pH 10,5]) aufgenommen und gevortext. Nach 40 min Inkubation bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln wurde zentrifugiert (2000 x g, 4°C, 15 min), der Überstand in einem neuen 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) versetzt, für 30 s gevortext und nochmals zentrifugiert (10000 x g, 4°C, 15 min), dann wurde die DNA aus der wässrigen Phase gefällt (Ethanol).

Methode 5: (nach YEATES *et al.*, 1998)

Die Sedimentprobe (0,5 g) bzw. der Filter wurden in 0,5 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM EDTA, 1,5 M NaCl) aufgenommen, mit 250 mg Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) versetzt und bei 4,5 m/sec für 30 s geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA). Dann wurde 50 µl SDS (20% [w/v]) dazugegeben, nochmals bei 4,5 für 10 s geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA) und für 1 h bei 65°C inkubiert. Nach Zentrifugation des Gemisches bei 6000 x g und 10°C für 10 min wurde der Überstand in ein frisches 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde erneut in Extraktionspuffer aufgenommen, im FastPrep bei 4,5 für 30 s geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA), für 1 h bei 65°C inkubiert und zentrifugiert wie vorher. Die Überstände wurden vereinigt und jeweils zu 500 µl in 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, mit 300 µl Polyethylenglycol (30% [w/v]) / NaCl [1,6 M]) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch bei 10000 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert und das entstandene Nukleinsäurepellet in 0,2 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl Kaliumacetat (7,5 M) wurden die Proben auf Eis 5 min lang inkubiert, zentrifugiert (16000 x g, 4°C, 30 min) und die wässrige Phase dann in ein sauberes 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Ethanol-fällung der DNA aus der wässrigen Phase und Aufnahme in 100 µl *aqua bidest.* Dabei wurden jeweils 10 Proben zusammengeführt.

In einem zweiten Aufschluß wurde Ultraschall benutzt. Dazu wurden 50 g Proben in einem sterilen Plastikgefäß mit 100 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM EDTA, 1,5 M NaCl) dreimal 3 min im Ultraschallbad Bransonic 220 (Branson, Danbury, USA) beschallt und zwischendurch je 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 10 ml steriles SDS (20% [w/v]) zugegeben, für 1 h bei 65°C inkubiert und dann die Probe in 50 ml Sarstedt-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Zentrifugiert wurde bei 6000 x g bei 4°C für 15 min und die Überstände gesammelt. Das Pellet wurde noch einmal mit 50-ml Extraktionspuffer versetzt und wie vorher für 1 h bei 65°C inkubiert, in 50 ml Sarstedt-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und zentrifugiert. Die gesammelten Überstände wurden zusammengeführt und in 10 ml Portionen in 50 ml Sarstedt-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Dann erfolgte die Ethanolfällung der DNA.

Methode 6: (modifiziert nach DUNBAR *et al.*, 1999)

20 Proben mit je 0,5 g Sediment wurde in 500 µl TENS-Puffer (50 mM Tris [pH 8,0]; 20 mM EDTA; 100 mM NaCl, 1% [w/v] SDS) resuspendiert und bei 70°C 30 min inkubiert. Danach wurden die Proben in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 250 µg Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) überführt und zwei mal 20 s mit 4,5 m sec⁻¹ geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA). Die Zellsuspensionen wurden nun dreimal für 20 min bei -70°C eingefroren und 10 min bei 50°C unter gelegentlichem Invertieren aufgetaut. Nach Zentrifugation (10000 x g, 4°C, 15 min) wurde die wässrige Phase vorsichtig, ohne die Interphase aufzuwirbeln, in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Es folgte die Ethanolfällung der DNA aus der wässrigen Phase und Aufnahme in 200 µl *aqua bidest.* Dabei wurden jeweils 10 Proben vereint.

Methode 7: (modifiziert nach BERTHELET *et al.*, 1996)

0,5 ml Natriumphosphat-Puffer (0,1 M Natriumphosphat [pH 8,0]) und 250 µg Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm ; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) wurden zu 0,5 g Sedimentprobe bzw. zu dem Viertel eines Filters gegeben und gut gevortext. Danach wurde noch 0,25 ml Extraktionspuffer (0,1 M NaCl; 0,5 M Tris; 10% [w/v] SDS) zu den Proben gegeben und diese dreimal 30 s bei 4,5 m sec⁻¹ geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA). Zwischen den Schüttelschritten wurden die Proben auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 5 min) wurde der Überstand mit 0,4 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M) versetzt und 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben nochmals bei 4°C und 12000 x g für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden bei 4°C zur Reinigung durch Säulchen mit 0,25 ml säuregewaschenem PVPP zentrifugiert (1000 x g für 1,5 Minuten). Die Säulchen wurden schon vorher mit 0,25 g PVPP (gelöst in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) gefüllt und mit destilliertem Wasser fünfmal gespült und abzentrifugiert (1200 x g, 4°C, 3 min). Es folgte eine Ethanolfällung der DNA aus dem Filtrat und Aufnahme in 100 µl *aqua bidest.*

Methode 8: (modifiziert nach STACH *et al.*, 2001)

0,5 g Sedimentprobe bzw. 1/4 Filter (Ø 47 mm, 4 l Wasser) wurden in 1 ml Extraktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl [pH 8,0], 10% [w/v]

CTAB, 1% [w/v] Polyvinylpyrrolidon) aufgenommen und in ein steriles 2-ml Schraubdeckelröhrchen mit 250 mg Glasperlengemisch ($\varnothing$: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) gegeben. Die Proben wurden 30 s bei 3,0 m/sec geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA), für 15 min bei 70°C inkubiert und danach ein weiteres mal 30 s bei 3,0 m sec⁻¹ geschüttelt. Nach 1 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10000 x g, 20°C, 2 min). Der Überstand wurde in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in 1 ml Extraktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl [pH 8,0], 10% [w/v] CTAB, 1% [w/v] Polyvinylpyrrolidon) resuspendiert, für 15 min bei 70°C inkubiert und danach nochmals 30 s bei 3,0 m sec⁻¹ geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA) und zentrifugiert (10000 x g, 20°C, 2 min). Die Überstände wurden vereint und die DNA durch Ethanol-fällung gewonnen und in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

Methode 9: (modifiziert nach MILLER *et al.*, 1999)

0,5 g Sedimentprobe bzw. 1/4 Filter wurden in 0,6 ml Extraktionspuffer (50 mM NaH₂PO₄ [pH 8,0], 50 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl [pH 8,0], 5% [w/v] SDS) aufgenommen und in ein steriles 2-ml Schraubdeckelröhrchen mit 250 mg Glasperlengemisch ($\varnothing$: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) gegeben. Dazu kamen noch 0,3 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol(25:24:1). Die Proben wurden 30 s bei 3,0 m sec⁻¹ geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA) und nach 1 min Kühlen auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10000 x g, 20°C, 2 min). Der Überstand wurde in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die DNA durch Ethanol-fällung gewonnen und in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

Methode 10: (modifiziert nach GRIFFITH *et al.*, 2000)

0,5 g Sedimentprobe bzw. 1/4 Filter wurden mit 0,5 ml CTAB-Puffer (10% [w/v] CTAB; 0,7 M NaCl; 120 mM Kaliumhydrogenphosphat) in ein 2-ml Schraubdeckelröhrchen mit 500 µg Glasperlengemisch ($\varnothing$: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) gefüllt. 0,5 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden hinzugegeben und die Probe 30 s bei 3,0 m sec⁻¹ geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA). Nach 1 min Kühlen auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10000 x g, 20°C, 2 min) und die DNA aus der aquatischen Phase durch Ethanol-fällung gewonnen und in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

Methode 11: (modifiziert nach ZHOU *et al.*, 1996)

Die Sedimentprobe (0,5 g) bzw. ¼ eines Filters wurde in 1,35 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 100 mM EDTA [pH 8,0], 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1% [w/v] CTAB) resuspendiert und 10 µl Proteinase K (20 mg ml⁻¹) zugegeben. Nach 25 min Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln (220 rpm) im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) wurden 150 µl SDS (20% [w/v]) hinzugefügt und bei 65°C 2 Stunden unter gelegentlichem invertieren inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 20 min) wurde die wässrige Phase vorsichtig, ohne die Interphase aufzuwirbeln, in

ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Es folgte die Ethanolfällung der DNA aus der wässrigen Phase und Aufnahme in 200 µl *aqua bidest.*

Method 12: (modifiziert nach KRAMER & SINGLETON, 1993)

Eine 0,5 g Sedimentprobe oder ¼ eines Filters wurde in 1 ml Extraktionspuffer (0,1 M LiCl, 0,05 M Tris [pH 7,5], 0,03 M EDTA, 2% [w/v] SDS) aufgenommen, gevortext und bei -70°C für 20 min eingefroren. Dann wurde das Gemisch bei 65°C schnell aufgetaut, 2 min gevortext und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Phenol (pH 8,0) zugegeben und 5 min auf Eis bei gelegentlichem Vortexen inkubiert. Die wässrige Phase wurde von der organischen Phase durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4°C) getrennt und vorsichtig in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben, 10 min auf Eis mit gelegentlichem Vortexen inkubiert und anschließend zentrifugiert (16000 x g, 10 min, 4°C). Danach erfolgte die Fällung DNA mit Ethanol aus der wässrigen Phase und Aufnahme in 100 µl *aqua bidest.*

Method 13: (modifiziert nach MARTIN-LAURENT *et al.*, 2001)

1 ml Extraktionspuffer (0,1 M Tris [pH 7,5], 0,1 M EDTA, 0,1 M NaCl, 1% [w/v] Polyvinylpyrrolidon, 2% [w/v] SDS) wurde mit 250 mg Sedimentprobe bzw. einem Viertel Filter in ein Schraubdeckelröhrchen mit 0,5 g Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) gefüllt. Die Proben wurden dann 30 s bei 3,0 m sec⁻¹ geschüttelt (FastPrep® Cell Disrupter, Bio101, Carlsbad, USA). Nach 1 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (16000 x g, 20°C, 1 min). Der Überstand wurde in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen Natriumacetat (5 M) 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgte die Fällung der DNA mit 2,5 Vol. Ethanol (98% [v/v]).

Method 14: (modifiziert nach GLIESCHE *et al.*, 1997)

Jeweils ½ Filter oder 1 g Sedimentprobe wurden mit SET-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,6], 50 mM EDTA, 5% [w/v] Saccharose) in einem 50 ml Sarstedt-Zentrifugenröhrchen 10 min gevortext, dann 750 µl Lysozymlösung (20 mg ml⁻¹) zugegeben und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Dann wurden 100 µl SDS (20% [w/v]) hinzugefügt und bei Raumtemperatur weitere 1,5 h unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Nun wurden noch 25 µl Proteinase K (20 mg ml⁻¹) dazugegeben und das Gemisch nochmals 3,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (16000 x g, 20°C, 1 min). Der Überstand wurde in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen Natriumacetat (5 M) 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgte die Fällung der DNA mit 2,5 Vol. Ethanol (96% [v/v]).

Method 15: (diese Arbeit)

Jeweils 1/4 Filter oder 0,5 g Sedimentprobe wurden mit dem Puffer (0,5 ml SSC, 1,5% [w/v] SDS) in ein 2-ml Schraubdeckelreaktionsgefäß mit 250 mg Glasperlengemisch (Ø: 0,71 - 1,18 mm; 0,21 - 0,3 mm und 0,1 - 0,11 mm in den Anteilen 2/2/1) gefüllt und bei Raumtemperatur für 30 min in einem Tischrotationsschüttler (Eppendorf, Hamburg)

bei 1400 Upm geschüttelt. Dann wurde 1 ml heißes Phenol (65°C) zugegeben und zwei min vorsichtig geschüttelt oder gevortext. Die Proben wurden zentrifugiert (20 min, 16000 x g, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dann erfolgte die Fällung der DNA mit 2,5 Vol. Ethanol (96% [v/v]) aus der wässrigen Phase.

Methode 16: (modifiziert nach Schalla , 2001)

1/4 Filter oder 0,5 g Sedimentprobe wurden mit 750 µl Puffer 1 (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) und in einem weiteren Ansatz mit Puffer 2 (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) in ein 2-ml Schraubdeckelreaktionsgefäß mit 3,75 mg Lysozym überführt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Dabei wurde alle 5 min einmal invertiert. Die Ansätze wurde auf 5 min Eis gestellt und 45 µl SDS (20% [w/v]) zugegeben. Nach kurzem vortexen wurden die Ansätze 20 min bei -70°C eingefroren und anschließend 30 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) bei 50°C aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Dann wurde 1 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) dazu gegeben und eine Minute vorsichtig geschüttelt oder gevortext. Die Proben wurden zentrifugiert (20 min, 16000 x g, 4°C) und noch eine Reinigung mit 1 ml Chloroform: Isoamylalkohol (25: 1) durchgeführt. Die Proben wurden wieder zentrifugiert (20 min, 16000 x g, 4°C), der Überstand wurde in ein neues 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dann die DNA mit 2,5 Vol. Ethanol (96% [v/v]) gefällt und in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

Ethanolfällung der DNA

Bei allen Methoden erfolgte die abschließende Fällung der DNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat oder Natriumchlorid, Vortexen und Zugabe von 2 Volumen eiskaltem Ethanol (96% [v/v]). Die in Lösung befindliche DNA fiel über Nacht bei -20°C aus. Alternativ wurde auch für 30 - 40 min bei -70°C gefällt. Parallele Tests zeigten keinen Einfluss der verschiedenen Fällungen (-20°C oder -70°C) auf die DNA-Ausbeute. Die DNA wurde durch Zentrifugation (16000 x g, 4°C, 15 min) pelletiert. Anschließend wurde das Pellet unter der Cleanbench getrocknet und in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

RNase-Behandlung

Um die DNA von mitextrahierter RNA zu reinigen, wurde an die DNA-Extraktion eine RNase-Behandlung angeschlossen. 20 µl in TE-Puffer gelöster RNase A (1 mg ml⁻¹) wurden pro 1 ml Probe zugesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine übliche Phenol/Chloroform-Behandlung durchgeführt, um die enzymatische Reaktion zu stoppen und die RNase zu entfernen. Nach 5 min Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen wurde bei 16000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext, 5 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (16000 x g, 4°C), und eine anschließende Fällung mit Ethanol (96%) durchgeführt. Die Probe wurde anschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Reinigung der DNA

Die isolierte DNA war stark mit Huminstoffen kontaminiert und dadurch nicht PCR-fähig. Die folgenden Methoden zur Reinigung der Nukleinsäuren von Huminstoffen und Proteinen wurden getestet.

Fällung mit Hexadecyltrimethylammoniumbromid (ZHOU *et al.* 1996)

Die DNA-Präparation wurde mit 2 ml CTAB-Puffer (0,1 M Tris, 0,1 M EDTA, 0,1 M Natriumphosphat, 1,5 M NaCl, 1% [w/v] CTAB) aufgefüllt und 2 Stunden bei Raumtemperatur und 225 rpm geschüttelt. Es folgte eine Ethanol-fällung.

Fällung mit Kaliumacetat (MISKIN *et al.* 1999)

Die DNA-Präparation wurde mit DMPC-behandeltem *aqua bidest.* auf 1 ml aufgefüllt und mit 400 µl Kaliumacetat (7,5 M) für 5 min auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert (10000 x g, 4°C, 5 min), um die gefällten Huminsäuren und ähnliche Stoffe zu sedimentieren. Der Überstand wurde mit Ethanol und Natriumacetat über Nacht bei -20°C gefällt.

Reinigung mit dem Fast-DNA spinKit (Bio 101, Inc., USA)

Die DNA-Präparation wurde mit DMPC-behandeltem *aqua bidest.* auf 1 ml aufgefüllt, mit 250 µl NaJ (6 M) und 1 ml Binding Matrix (spinKit) versetzt und weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren. In einem zweiten Ansatz wurde die DNA-Präparation mit Natriumphosphat-Puffer auf 1 ml aufgefüllt, mit 100 µl „MT-Buffer“ des spinKit versetzt und weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Reinigung mit dem RNeasy Mini Clean up Kit (Qiagen, Hilden)

Die DNA-Präparation wurde mit *aqua bidest.* auf 100 µl aufgefüllt, mit 350 µl RLT-Puffer (Qiagen Kit) versetzt und gevortext. 250 µl Ethanol wurden zu dem Gemisch gegeben, vermischt und auf eine RNeasy-Mini-Säule gegeben. Es wurde weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden)

Zu 50 µl DNA-Präparation wurden 250 µl PB-Puffer (Qiaquick Kit) gegeben, gevortext und das Gemisch auf eine Qiaquick Spinsäule gegeben. Es wurde weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Abtrennen der Huminstoffe mit Sephadex-Säulen (MORAN *et al.*, 1993)

1 ml über Nacht in DMPC-behandeltem *aqua bidest.* equilibriertes Sephadex G75 wurden auf eine leere Polypropylen Zentrifugensäule (Whatman, Maidstone, UK, 10 µm Maschenweite) gegeben und in einem Swingout-Rotor (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert (1400 x g, 4°C, 4 min). Die Säule wurde zweimal mit DMPC-behandeltem *aqua bidest.* gewaschen, mit der DNA-Präparation beladen und zentrifugiert (1400 x g, 4°C, 4 min).

Abtrennen der Huminstoffe mit PVPP-Säulen (MENDUM *et al.*, 1998)

Zuerst musste das PVPP mit Säure gewaschen werden. Hierzu wurden 300 g PVPP unter Rühren langsam zu 4 Liter 3 M HCl gegeben. Das Gefäß wurde abgedeckt und über Nacht weiter gerührt. Die Suspension wurde durch grobe Papierfilter filtriert und das PVPP in 4 Liter *aqua bidest.* resuspendiert. Nach einer Stunde Rühren wurde erneut das PVPP abfiltriert und in 4 Liter 20 mM Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert. Nach 1 bis 2 Stunden rühren wurde das PVPP abfiltriert und wieder in 4 Liter 20 mM Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert. Nach dem Abfiltrieren wurde das PVPP auf Laborpapier ausgebreitet und über Nacht getrocknet.

Die DNA-Reinigung über PVPP-Säulen erfolgte folgendermaßen: 0,8 ml mit Säure gewaschenes PVPP in *aqua bidest.* (1:1) wurden auf eine Polypropylen-Zentrifugensäule (Whatman, 10 µm Maschenweite) gegeben und in einem Swingout-Rotor (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert (1200 x g, 4°C, 3 min). Die Säule wurde zweimal mit DMPC-behandeltem *aqua bidest.* gewaschen, anschließend mit der DNA-Präparation beladen und zentrifugiert (1200 x g, 4°C, 3 min).

DNA Wizard™ Purification Kit (Promega, Mannheim)

Nach der DNA-Isolierung wurde das DNA-Reinigungs-kit von Promega angewandt und eine Entfernung von Proteinen sowie Kohlenhydraten durchgeführt. Dazu wurde die Probe in die vorgesehenen kit-internen Wizard® Microsäulchen gegeben, 1 ml Wizard® DNA-Reinigungslösung dazugegeben und weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.5.2 Amplifizierung des Gens für die 16S rDNA

Von den gewonnenen bakteriellen Reinkulturen wurde die DNA isoliert und das Gen für die 16S rDNA über die Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Die taxonomische Zugehörigkeit der Isolate wird dann nach einer RFLP-Analyse über die Sequenzbestimmung dieses Gens durchgeführt.

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies (Karlsruhe) hergestellt und im lyophilisierten Zustand geliefert. Die Primer wurden in 100 µl *aqua bidest.* gelöst und in Verdünnungen mit einer Konzentration von 50 pmol µl⁻¹ DNA bei -20 °C gelagert (Tab. 1).

Tab. 1. Oligonukleotide für die Amplifizierung des Gens für die 16S rDNA.

Primer ¹	Position ²	Primersequenz (5`-3`) ³	Referenz
16S F	9-27	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G	BRAKER (1999)
16S F	515-533	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	BRAKER (1999)
16S R	536-557	GTA TTA CCG CGG CKG CTG GCA C	BRAKER (1999)
16S R	1392-1405	CGG GCG GTG TGT RC	BRAKER (1999)
16S R	1492-1510	GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	BRAKER (1999)

¹F, forward; R, reverse

²Die Positionen beziehen sich bei der 16S rDNA auf *Escherichia coli* K12 DSM 498.

³K, T + G; M, A + C; R, A + G; Y, C + T

Amplifizierung des Gens für die 16S rDNA

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird mit Hilfe der DNA-Polymerase (Promega, Madison) die aus Reinkulturen isolierte DNA vervielfältigt. In einem speziellen Magnesiumchlorid enthaltenden PCR-Puffer wurden zusammen mit den Nukleotiden und den Primern die Reaktionen durchgeführt. Es wurde der PCR-Thermocycler Gene Amp PCR-System 2400 bzw. 9700 (Perkin Elmer, USA) verwendet. Die Länge der *extension* richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments (Richtwert 800 bp min⁻¹).

Alle PCR-Produkte (10 µl) wurden später durch eine Agarosegelelektrophorese neben einem Größenstandard kontrolliert. Bei allen PCR-Amplifizierungen wurde eine negative Kontrolle (ohne DNA im Reaktionsmix) mitgeführt, bei der kein PCR-Produkt auftreten darf, um Kontaminationen mit Nukleinsäuren aus Bakterien der Raumluft usw. auszuschließen. Ebenso wurde eine positive Kontrolle mit bekannter DNA im Reaktionsmix mitgeführt, welche zu einem definierten PCR-Produkt führte. Soweit es möglich war, folgten die Amplifizierungen einem Standardprotokoll.

Alle Ansätze wurden steril in der Sicherheitswerkbank Cleanbench Hera safe (Kendro, Hanau) auf Eis angesetzt. Sämtliche PCR-Reaktionen wurden in einem speziellen, dünnwandigen 200-µl Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) mit einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Ein solches Eppendorf-Reaktionsgefäß für eine typische PCR-Amplifizierung mit einem Volumen von 50 µl enthielt folgende Bestandteile:

dNTPs (10 mM)

0,25 µl

Taq-DNA-Polymerase Puffer (10 x)	5 µl
Primer R (50 pM)	1 µl
Primer F (50 pM)	1 µl
Matrize (DNA) (0,1-50 µg ml ⁻¹)	0,25-5 µl
Taq-DNA-Polymerase 5 U	0,2 µl
<i>aqua bidest</i>	ad 50 µl

Von den dNTP`s, dem Puffer und der Polymerase wurde ein Mastermix in einem 0,5-ml Eppendorf Gefäß angesetzt. Da so weniger Arbeitsschritte mit dem geöffneten Reaktionsgefäß erfolgen müssen, diente dieses Vorgehen der Vermeidung von Kontaminationen. Die PCR-Produkte (Gesamtvolumen 10 µl: 8 µl PCR-Produkt + 2 µl Auftragspuffer) wurden auf einem Agarosegel (1% [w/v]) aufgetragen und analysiert.

Reaktionsprotokoll nach BRAKER (1999)

Die Amplifizierungsreaktion für die 16S rDNA wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	<u>Amplifizierungsschritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
1.	Denaturierung der DNA	5 min	95°C
2.	35 Zyklen:		
	Denaturierung der DNA	30 s	95°C
	<i>Primer annealing</i>	40 s	55°C
	<i>Extension</i>	40 s	72°C
3.	Weitere Inkubation	7 min	72°C
	Herunterkühlen bei		4°C

2.5.3 RFLP-Analyse des Gens für die 16S rDNA

Bei einem Restriktionsverdau wird das erzeugte PCR-Produkt durch bestimmte Enzyme, die Restriktionsendonukleasen in kleinere Fragmente zerschnitten. Dabei schneidet jedes verwendete Enzym an ganz spezifischen Stellen die DNA, so dass sich bei jeder Probe ein unterschiedliches DNA-Bandenmuster ergibt. Um sicherzugehen, dass es sich bei gleichen DNA-Bandenmustern eines Restriktionsverdaus (mit dem Enzym *BsH1236I* [Puffer R⁺]) nicht doch um unterschiedliche Organismen handelte, wurde noch ein zweiter Verdau mit einem weiteren Enzym (*RsaI* [Puffer Y⁺/ TangoTM]) durchgeführt.

2.5.4 Sequenzierung der PCR-Produkte und phylogenetische Analyse

Die Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte erfolgte durch die Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH. Die Sequenzen wurden als Elektropherogramme geliefert und mit dem Computer-Programm CHROMAS 1.62 (Technelysium Pty. Ltd., Queensland, Australien) ausgewertet.

Die phylogenetischen Analysen wurden mit den Programmen Clustalw 1.7 (Alignmentberechnung) und dem Phylip Programmpacket Version 3.5 durchgeführt. In Phylip wurden DNADIST (Distanzmatrixberechnung) und FITCH (Stammbaumberechnung) mit der Global Rearrangement Option und Random Input Order der Sequenzen bei 5 Jumbles (Wiederholungen) verwendet. Bootstrap Analysen wurden mit Fitch mit 100 Einzelbäumen berechnet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Probennahme von Grundwasser

Die in diesem Projekt entwickelte Filtrationsanlage (Abb. 16 und 17) zur Gewinnung von Proben der mikrobiellen Lebensgemeinschaft unter anaeroben Bedingungen und unter Einhaltung höchster Reinheitskriterien hat sich bei verschiedenen Einsätzen im Feld äußerst bewährt und wurde hier ständig weiter entwickelt und optimiert. Sie ist geeignet, zur Entnahme von physisch und chemisch ungestörten Proben unter sterilen Bedingungen von (1) Grundwasser bzw. der (2) auf bakteriendichten Filtern konzentrierten mikrobiellen Lebensgemeinschaft des freien Grundwassers. Insbesondere die bei der Filtration größerer Wasservolumina äußerst störende Ausfällung von oxidiertem Eisen, das zur raschen Undurchlässigkeit der verwendeten Filter führt, konnte durch den Einsatz eines sterilen Argon-Durchstromes vermieden werden. So konnten an einem durchschnittlichen Arbeitstag im Feld etwa drei Filter gewonnen werden, durch die zwischen 75 und 120 Liter Grundwasser filtriert wurden. Die Kombination der Filtration mit einer parallel laufenden Durchflussmesszelle erlaubte die simultane Erfassung der Schwankungsbreite der Randparameter während der Probennahme. Die entwickelte Filtrationsanlage kann im Feld mit zwei Personen in etwa in drei Stunden aufgebaut, in zirka zwei Stunden wieder demontiert und die gesamten Einzelteile problemlos in einem PKW transportiert werden. In Verbindung mit einem Notstromaggregat wird damit eine Entnahme von Grundwasser auch in entlegenen Brunnenfeldern möglich.

In diesem Vorhaben wurden von den untersuchten Grundwasserstandorten folgende Proben genommen und für die Versuche zur Isolierung von Gesamt-DNA genutzt:

1. Grundwasserleiter auf der Insel Föhr, Brunnen 12:

Drei Filter (filtriertes Wasservolumen: 80, 80 bzw. 150 Liter)

2. Grundwasserleiter auf der Insel Hiddensee, Brunnen 11:

Drei Filter (filtriertes Wasservolumen: 75, 75 bzw. 100 Liter)

3. Grundwasserleiter in Löcknitz, Brunnen 7

Drei Filter (filtriertes Wasservolumen: 60, 90 bzw. 120 Liter)

4. Grundwasserleiter II in Wankendorf, Brunnen dieses Vorhabens.

Neun Filter (filtriertes Wasservolumen: dreimal 10, 11,7, 12,8 bzw. viermal 2 Liter)

5. Grundwasserleiter im Segeberger Forst, Brunnen dieses Vorhabens

Acht Filter (filtriertes Wasservolumen: sechsmal 2, einmal x 10 bzw. 40 Liter)

3.2 Probennahme von Grundwassersedimenten

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführte Bohrung in den Grundwasserleiter II im Bereich der Bornhöveder Seenkette bei Wankendorf erreichte Teufe von 94 m (Abb. 21). Die Gewinnung von Proben aus Lockersedimenten dieser Teufe erfolgte mit dem verwendeten Verfahren nach dem heutigen Stand der Technik. Die Bohrfirma arbeitete sehr gewissenhaft und sehr sauber. Aus geologischer und mikrobiologischer Sicht sind die Proben grundsätzlich in der erforderlichen Qualität gewonnen worden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung konnten allerdings die zur Markierung und Kontrolle verwendeten fluoreszierenden Partikel in allen gewonnenen Sedimentproben, auch im zentralen Bereich der Sedimentkerne, in der eingebrachten Konzentration nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass zwar vermutlich keine wesentlichen Kontaminationen aus den oberen Bodenschichten eingedrungen sind, dass aber die gewonnenen Sedimentproben nicht mehr ungestört vorlagen, sondern durch die Art der Entnahme erheblich mechanisch verändert wurden. Die für den Bohrvorgang erforderliche Zugabe von Wasser wurde durch die Entnahme aus einem benachbarten Pegel, welcher ebenfalls im Grundwasserleiter II angelegt ist, gewährleistet. Eine Kontamination der Proben mit dem an der Bohrlochsohle sich befindenden Wassers kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, würde aber die mikrobiologische Aussage nicht wesentlich beeinflussen, da dieses Wasser ja aus dem gleichen Grundwasserleiter und einer nur wenige Meter entfernten Grundwassermessstelle stammte.

Anfänglich war in diesem Projekt geplant, mit der angewendeten Rammkernbohrtechnik insgesamt zehn Sedimentkerne aus den Tiefen absteigend von 84 m bis 94 m unter GOK zu entnehmen. Unter den gegebenen geologischen Bedingungen war jedoch, bedingt durch die in diesen Tiefen herrschenden Druckbedingungen, diese Probenentnahme nicht möglich. Es kam leider zu zahlreichen Kernverlusten und nur die 4 Sedimentkerne konnten aus den jeweiligen Tiefen des Grundwasserleiters II Wankendorf erhalten werden (Tab. 2). Diese Sedimentkerne wurden alle mikrobiologisch untersucht und für die Versuche zur Gewinnung von Gesamt-DNA verwendet.

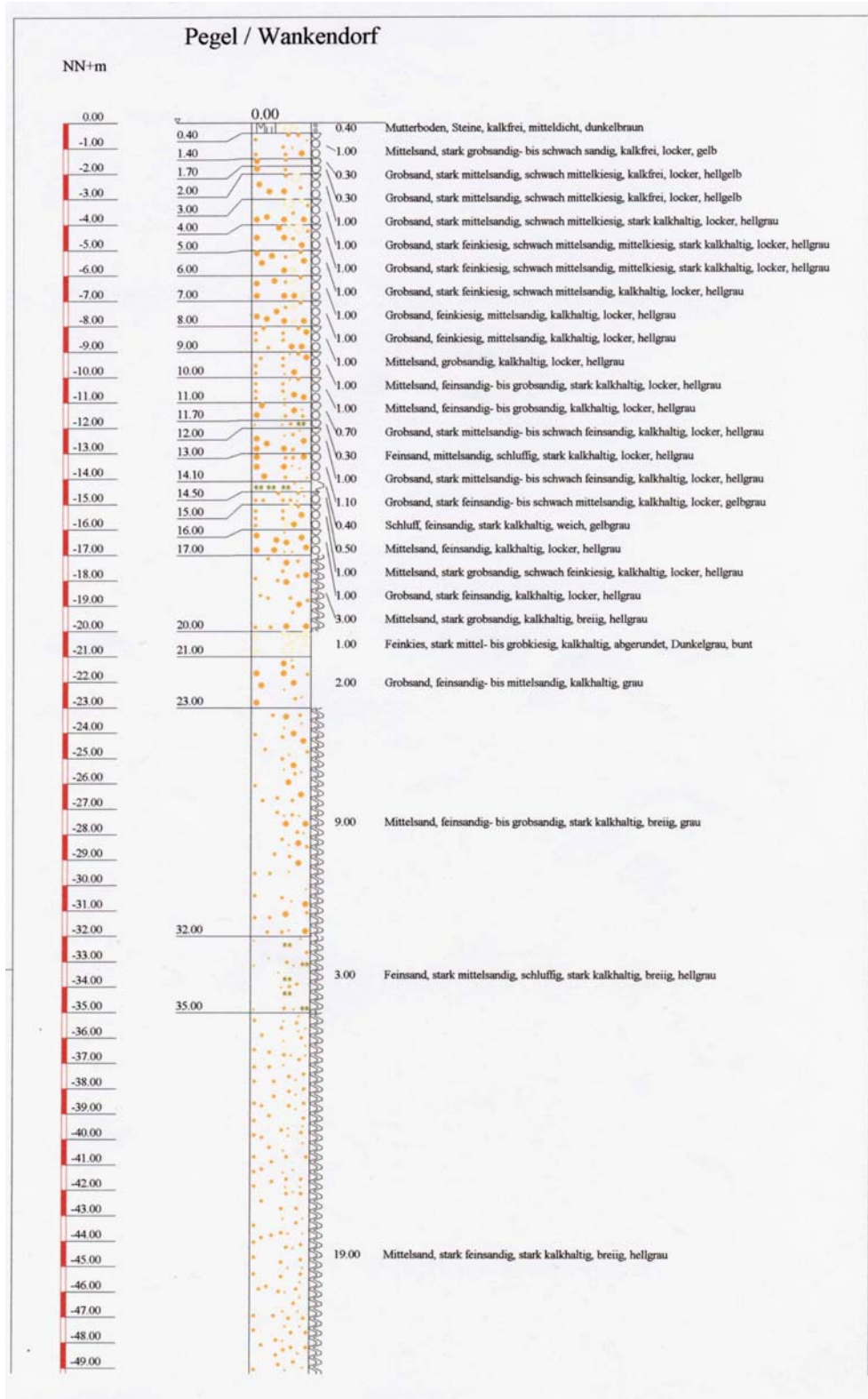


Abb. 21. Bohrprofil der Grundwassermessstelle im Tiefengrundwasserleiter II im Bereich der Bornhöveder Seenkette in Schleswig-Holstein (Quelle: Schwedter Brunnenbau & Umwelttechnik GmbH, Schwedt).

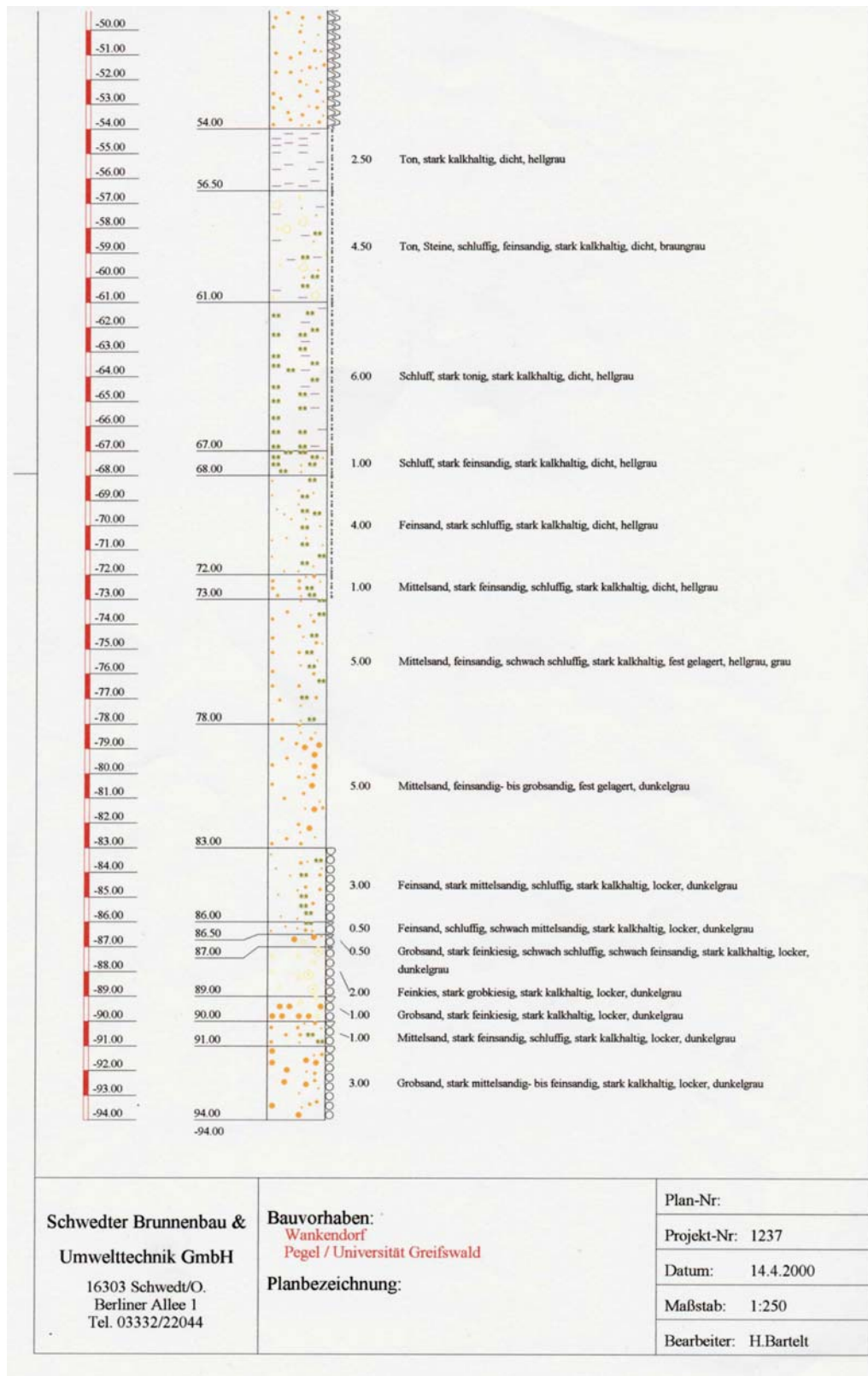


Abb. 21. Fortsetzung

Tab. 2. Sedimentkerne, gewonnen aus dem Grundwasserleiter II Wankendorf im Bereich der Bornhöveder Seenkette.

Bezeichnung des Sedimentkernes	Entnahme Tiefe [m] unter GOK	Menge [l]
K1	84,8 - 85,8	5,0
K2	86,8 - 87,8	4,5
K3	87,8 - 88,8	2,0
K4	90,8 - 91,8	6,5

Eine andere Art der Probengewinnung aus Grundwasserleitern wurde durch die FUGRO Consulting GmbH entwickelt. MOSTAP 35 ist eine Drucksonde, welche einen PVC-Liner (Durchmesser 35 mm) enthält. Die geschlossene Sonde wird erst nach dem Erreichen der entsprechenden Teufe mechanisch geöffnet und dann mit einem maximalen Druck von 200 kN hydraulisch durch ein Gestänge in das Sediment gedrückt. Aus der Drucksonde MOSTAP 35 wurde wegen zu hoher Kernverluste im wassergesättigten Bereich ein Probennehmer mit *In-situ*-Frostung konstruiert (FROSTAP). Dazu wurde im unteren Teil der Sonde ein Peltierelement eingebaut, welches einen schmalen Bereich der Proben in der Nähe der Spitze vereist und somit vor einer Kontamination bzw. einem Kernverlust schützt. Von diesem System gab es vor Projektbeginn nur ein Entwicklungsmuster. Bedingt durch die Konstruktion ist ein Einsatz nur bis maximal 30 m möglich, da bei der Öffnung des Systems in der entsprechenden Teufe der Druck der Wassersäule überwunden werden muss. Außerdem würde in größeren Teufen die vereiste Zone schneller schmelzen als die Sonde aus dem Bohrloch ausgebaut werden kann.

Das FROSTAP-System wurde für das vorliegende Projekt weiterentwickelt, um den spezifischen Anforderungen einer mikrobiologisch einwandfreien Probennahme zu genügen. Folgende Teile wurden konstruktiv verändert:

- (1) Die elektrischen Bestandteile wurden gekapselt, so dass das Gesamtsystem sterilisiert werden konnte.
- (2) Die Stromzuführung wurde konstruktiv so verändert, dass auch während des Ausbaus die Kühlung aufrechterhalten werden konnte.
- (3) Das System wurde so optimiert, dass die Kältezuführung und die Wärmeabführung die Bildung des Eispropfens und seine Erhaltung während des Ausbaus aus Teufen bis zu 20 m gewährleisten.

Mit diesem System war es möglich, eine Störung und Kontamination der Sedimentprobe auszuschließen.

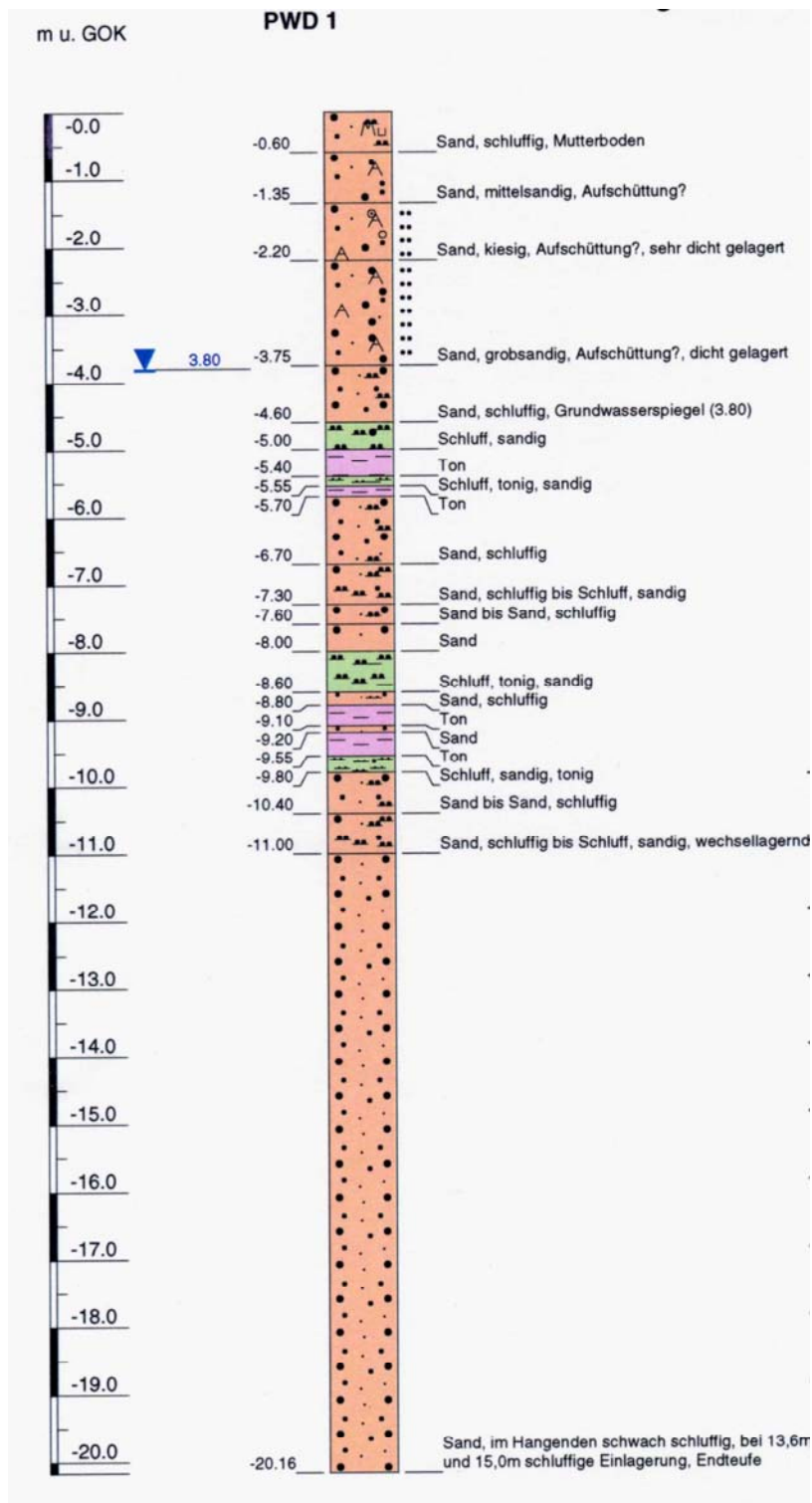


Abb. 22. Bohrprofil der Grundwassermessstelle im oberflächennahen Grundwasserleiter II im Bereich des Segeberger Forstes bei Heidmühlen (Quelle: FUGRO CONSULT GmbH, Berlin).

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführte Drucksondierung Bohrung im Segeberger Forst im Bereich Heidmühlen erreichte eine Teufe von 20 m (Abb. 22) und die Grundwassermessstelle wurde bis 15,5m ausgebaut (Abb. 10). Die Gewinnung von Proben aus den Lockersedimenten dieser Teufe erfolgte aus geologischer und mikrobiologischer Sicht grundsätzlich in der erforderlichen Qualität. Eine Kontamination der erhaltenen Sedimentkerne mit den fluoreszierenden Tracer-Partikeln konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Die Sedimentkerne waren mechanisch nicht gestört und konnten steril ohne Kontaminationen entnommen werden. Damit waren sie für die mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen bestens geeignet.

Für die Beprobung oberflächennaher, sandiger Grundwasserleiter ist das in diesem Projekt entwickelte System FROSTAP 35 der Fugro Consulting GmbH hervorragend geeignet.

Folgende Sedimentkerne (K1 – K8) konnten aus den jeweiligen Tiefen des Grundwasserleiters II Segeberger Forst im Bereich Heidmühlen am 31.8.2001 erhalten werden. Die Sedimentkerne K9 und K10 wurden in einer zweiten, 40 cm südlich benachbarten Drucksondierung im Aquifer II am 1.9.2001 erhalten (Tab. 3):

Tab. 3. Sedimentkerne, gewonnen aus dem Grundwasserleiter II Segeberger Forst im Bereich Heidmühlen.

Bezeichnung des Sedimentkernes	Entnahme Tiefe [m] unter GOK	Menge [m]
K1	5,5 - 6,5	0,3
K2	6,8 - 7,8	0,5
K3	8,1 - 9,1	0,3
K4	9,4 - 10,4	0,4
K5	10,7 - 11,7	0,8
K6	12,0 - 13,0	1,0
K7	13,3 - 14,3	1,0
K8	14,6 - 15,6	0,8
K9	10,0 - 11,0	1,0
K10	11,6 – 12,6	1,0

Die Sedimentkerne K4 und K7 wurden mikrobiologisch untersucht und für die Versuche zur Gewinnung von Gesamt-DNA verwendet.

Im Zuge der Durchführung von Probenahmen mit der Entnahme von Sedimentproben aus Grundwasserleitern wurde der heutige Stand der technischen Möglichkeiten erkundet und genutzt. Für Bohrungen in Teufen von mehr als 70 m ist die Trockenbohrung mit einer Entnahme von Sediment mittels Rammkernbohrsonde der einzige Weg der Gewinnung von Sedimentproben, welche jedoch nach Auswertung der Tracerkontrollen nicht den Anforderungen für eine spätere molekularbiologische Bearbeitung entsprachen. Diese Anforderungen wären mit dem FROSTAP 35 System der Fugro Consulting GmbH eher gegeben. Dieses System hat jedoch derzeit noch eine technisch bedingte maximale Entnahmetiefe, so dass der Einsatz in deutlich größeren Teufen als 20 m nicht möglich ist.

In der Zukunft sollten verstärkte Anstrengungen in der Entwicklungsarbeit für geeignete Probennahmesysteme unternommen werden, welche eine kontaminationsfreie Entnahme von Sedimenten aus Grundwasserleitern in größeren Teufen ermöglicht. Erste Lösungsansätze werden derzeit an der TU Berlin (Prof. Amann) für ein derartiges System entwickelt, welches jedoch speziell für den Einsatz in marinen Sedimenten angepasst ist.

3.3 Wasserinhaltsstoffe und Randparameter der untersuchten Grundwasserleiter

Die Einzeldaten zu den gemessenen Wasserinhaltsstoffen und den Randparametern sind in Tab. 4 dargestellt.

Der unterschiedliche Charakter der untersuchten drei Grundwasserstandorte spiegelte sich in deutlichen Konzentrationsunterschieden der Kationen und Anionen sowie der Randparameter wider. Bei den Kationen traten vor allem die Ca^{2+} -, Na^+ - und Fe^{2+} -Konzentrationen hervor. Die Ca^{2+} -Werte lagen beim Standort Löcknitz mit 134 mg l^{-1} um das 6,5-fache und auf Hiddensee mit $84,3 \text{ mg l}^{-1}$ um das 4-fache höher als beim Standort Föhr. Die Na^+ -Werte betrugen beim Standort Löcknitz $28,0 \text{ mg l}^{-1}$ und lagen auf Föhr mit $18,0 \text{ mg l}^{-1}$ doppelt so hoch wie auf Hiddensee mit $9,0 \text{ mg l}^{-1}$. Der Fe^{2+} -

Gehalt war auf Hiddensee mit $1,26 \text{ mg l}^{-1}$ am höchsten. Beim Standort Löcknitz lag der Fe^{2+} -Gehalt mit $0,46 \text{ mg l}^{-1}$ und auf Föhr im Minimalbereich von unter $0,05 \text{ mg l}^{-1}$.

Bei den Anionen waren die SO_4^{2-} -Werte bei dem Standort Löcknitz mit 177 mg l^{-1} deutlich höher als an den beiden anderen Standorten. Die Cl^- -Konzentration wies bei dem Standort Löcknitz $72,4 \text{ mg l}^{-1}$ auf, und war hier am höchsten. Im Gegensatz dazu war sie auf Hiddensee um die Hälfte geringer, auf Föhr betrug sie $42,3 \text{ mg l}^{-1}$. Der Gehalt an NO_3^- war auf Föhr mit $57,4 \text{ mg l}^{-1}$ wesentlich höher als bei den Standorten Löcknitz und Hiddensee mit $6,35 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $0,82 \text{ mg l}^{-1}$. Die höchsten Eh-Werte wies der Grundwasserleiter auf Föhr mit $502 - 531 \text{ mV}$ auf. In Grundwasserleitern bei Löcknitz lagen sie zwischen $153 - 160 \text{ mV}$, in dem von Hiddensee zwischen $63 - 97 \text{ mV}$. Die Leitfähigkeit war bei Löcknitz mit Werten von $1022 - 1026 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ am höchsten. Auf Hiddensee betrug sie $582 - 588 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ und auf Föhr $335 - 380 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$. Die Werte der O_2 -Sättigung waren auf Föhr mit $38,4 - 41,6 \%$ am höchsten, und betrugen bei Löcknitz $5,1 - 5,6 \%$ und auf Hiddensee nur $0 - 1,3 \%$.

Bei den Grundwasserstandorten, aus denen zusätzlich die Sedimentproben entnommen wurden, zeigten die Werte der Wasserinhaltsstoffe und Randparameter ebenfalls deutliche Unterschiede.

Der Eh-Wert in Wankendorf war mit -150 und -181 mV deutlich negativ und vom Segeberger Forst (75 und 94 mV) völlig verschieden. Ebenso war die O_2 -Sättigung im Segeberger Forst mit $38,1 - 40,2 \%$ wesentlich höher als in Wankendorf. Die Leitfähigkeit war hingegen in Wankendorf dreimal so hoch wie im Aquifer Segeberger Forst.

Der unterschiedliche Charakter der beprobten Grundwasserstandorte spiegelte sich aber auch in den deutlichen Konzentrationsunterschieden der Kationen und Anionen wider. Bei den Kationen traten vor allem die K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen hervor.

Das Grundwasser in Wankendorf enthielt eine fünffach höhere Na^+ -Konzentration als in Segeberg. Dagegen wies der Grundwasserleiter im Segeberger Forst einen fast 30fach höheren K^+ -Gehalt und einen zweifach höheren Ca^{2+} -Wert auf. Der Brunnen in Wankendorf enthielt nur $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ und im Segeberg Forst wurde gar kein Eisen nachgewiesen.

Bei den Anionen waren die SO_4^{2-} -Werte im Segeberger Forst viermal höher und die Nitrat-Konzentration mit $37,9 \text{ mg l}^{-1}$ auffällig hoch.

3.4 Bakterielle Gesamt- und Lebendkeimzahlen

Bei den untersuchten Grundwasser- und Grundwassersedimentproben wurden die bakterielle Gesamtzellzahl durch Anfärbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange bzw. die bakterielle Lebendkeimzahl (= Koloniebildende Einheiten = KBE) auf dem Medium PYGV bestimmt (Tab. 5). Die Gesamtzellzahlen der Grundwassersedimentproben konnten nur mit großer Unsicherheit bestimmt werden, da die Bakterienzellen sehr häufig nicht eindeutig von den Sedimentpartikeln unterschieden werden konnten (Abb. 23). In den Grundwasserproben hingegen konnten die Bakterienzellen durch diese Anfärbung sehr gut dargestellt werden (Abb. 24).

Sehr auffällig ist, dass der oberflächennahe Grundwasserleiter im Segeberger Forst in einer Tiefe von 13,3 – 14,3 m unter GOK sowohl im Brunnenwasser als auch im Aquifersediment eine deutlich geringere Bakterienkonzentration aufweist als der Grundwasserleiter II im Bereich Wankendorf in einer Tiefe von 84,0 – 93,0 m. Die ermittelten Zellzahlen liegen aber in einer Größenordnung, wie sie auch in anderen vergleichbaren Aquiferen nachgewiesen wurde (MADSEN & GHIORE, 1993).

Die Lebendkeimzahl auf den Medien PYGV/10, PYGV/100 und PYGV/1000 waren in allen Fällen geringer (bis zu einem Faktor von 2) als auf dem unverdünnten Medium PYGV. Nur beim Kern SK 7 aus dem Segeberger Forst verhielt es sich umgekehrt (PYGV: $1,5 \times 10^2 \text{ cm}^{-3}$, PYGV/100: $1,8 \times 10^2 \text{ cm}^{-3}$).

Tab. 4. Ausgewählte Wasserinhaltsstoffe und Randparameter der beprobten Aquifere während der Probenentnahmen.

Parameter	Hiddensee (Brunnen 11) 04.10.2000	Löcknitz (Brunnen 7) 18.10.2000	Föhr (Brunnen 12) 04.7.2000	Wankendorf 19.07.2001	Segeberger Forst ¹ 27.06.2001
Kationen [mg l⁻¹]					
Ca ²⁺	84,3	134	20,3	15,2	31,7
Mg ²⁺	10,1	13,1	7,65	1,46	0,90
Mn ²⁺	0,1	0,2	0,04		n.n.
Fe ²⁺	1,26	0,46	<0,05	0,20	n.n.
Na ⁺	9,0	28,0	18,0	56,1	12,5
K ⁺	1,14	2,56	7,78	1,80	76,0
Anionen [mg l⁻¹]					
F ⁻	0,27	0,23	n.n.	0,49	n.n.
Cl ⁻	31,7	72,4	42,3	15,5	20,9
Br ⁻	0,16	0,16	0,46		
NO ₃ ⁻	0,82	6,35	57,4	3,93	37,9
SO ₄ ²⁻	65,0	177	35,5	9,60	36,2
NH ₄ ⁺	0,126	0,209	0,001		
PO ₄ ³⁻	0,249	0,355	0,452	0,62	n.n.
Randparameter					
pH-Wert	7,48 - 7,51	7,24 - 7,26	5,97 - 6,02	8,00-8,04	6,91-6,95
Eh-Wert [mV]	63 - 97	153 - 160	502 – 531	(-181)-(-150)	75-94
Leitfähigkeit [μS cm ⁻¹]	582 – 588	1022 - 1026	335 – 380	991-993	319-328
O ₂ [mg l ⁻¹]	0,0 - 0,15	0,58 - 0,64	4,35 - 4,72	0,01-0,02	4,40-4,63
O ₂ -Sättigung [%]	0 - 1,3	5,1 - 5,6	38,4 - 41,6	0,1-0,2	38,1-40,2
Temperatur [°C]	10,0 – 10,1	10,1 - 10,3	9,4 - 9,5	9,4	7,7-8,7

¹, n.n., nicht nachweisbar

Tab. 5. Bakterielle Gesamtzellzahl und Lebendkeimzahl (Koloniebildende Einheiten auf Medium PYGV) der untersuchten Grundwasser- und Grundwassersedimentproben.

Probe¹	Bakterielle Gesamtzellzahl [Zellen ml⁻¹]²	Bakterielle Lebendkeimzellzahl [KBE, ml⁻¹ bzw. g⁻¹ Trockengewicht (bzw. cm⁻³)]³
Aquifer II Wankendorf (Bornhöveder Seenkette)		
Grundwasser (gefordert aus: 84,0 - 94,0 m unter GOK)	1,0 x 10 ⁵	4,0 x 10 ³
Grundwassersediment: Kern K1 : 84,8 - 85,8 m unter GOK, Kern K2 : 86,8 - 87,8 m unter GOK, Kern K3 : 87,8 - 88,8 m unter GOK, Kern K4 : 90,8 - 91,8 m unter GOK	1,3 x 10 ⁷ 0,8 x 10 ⁷ 1,0 x 10 ⁷ 0,2 x 10 ⁷	7,2 x 10 ⁵ (9,8 x 10 ⁵) n.b. 1,9 x 10 ⁵ (9,8 x 10 ⁴) 9,5 x 10 ⁵ (n.b.)
Aquifer Segeberger Forst		
Grundwasser (gefordert aus: 13,3 – 14,3 m unter GOK)	5,1 x 10 ⁴	1,8 x 10 ²
Grundwassersediment: Kern K4 : 9,4 - 9,8 m unter GOK) Kern K7 : 13,3 - 14,3 m unter GOK)	n.b. n.b.	(7,4 x 10 ⁴) (1,8 x 10 ²)
Aquifer Löcknitz (Grundwasser)	1,1 x 10 ⁷	n.b.
Aquifer Föhr (Grundwasser)	1,0 x 10 ⁷	n.b.
Aquifer Hiddensee (Grundwasser)	1,0 x 10 ⁷	1,1 x 10 ¹

¹, GOK, Geländeoberkante

², n.b., nicht bestimmbar

³, KBE, Koloniebildende Einheiten (KBE)

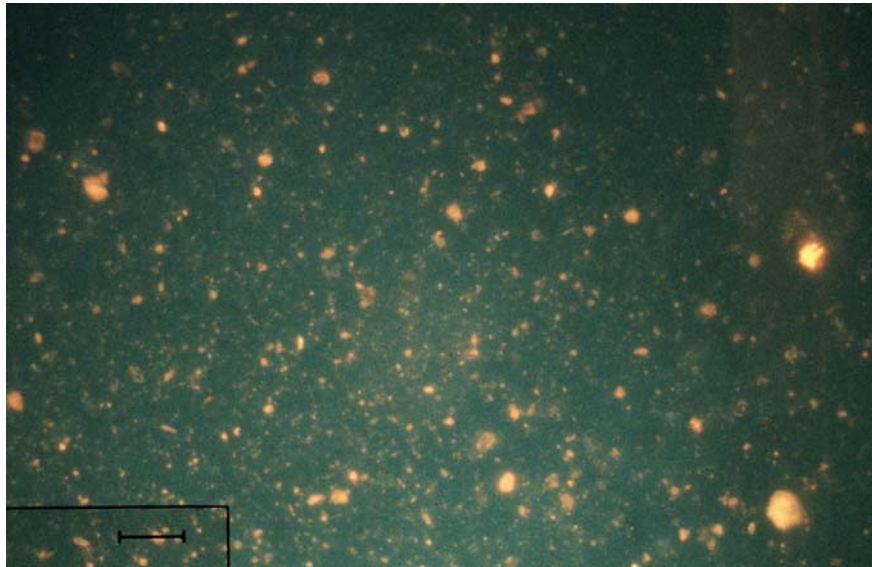


Abb. 23. Grundwassersediment gefärbt mit Acridinorange. Bakterienzellen lassen sich nur schwerlich von den Sedimentpartikeln unterscheiden (Sedimentprobe aus 91 m unter GOK vom Tiefengrundwasserleiter II im Bereich der Bornhöveder Seenkette in Schleswig-Holstein; Messbalken, 10 µm; Foto: M. Köster).

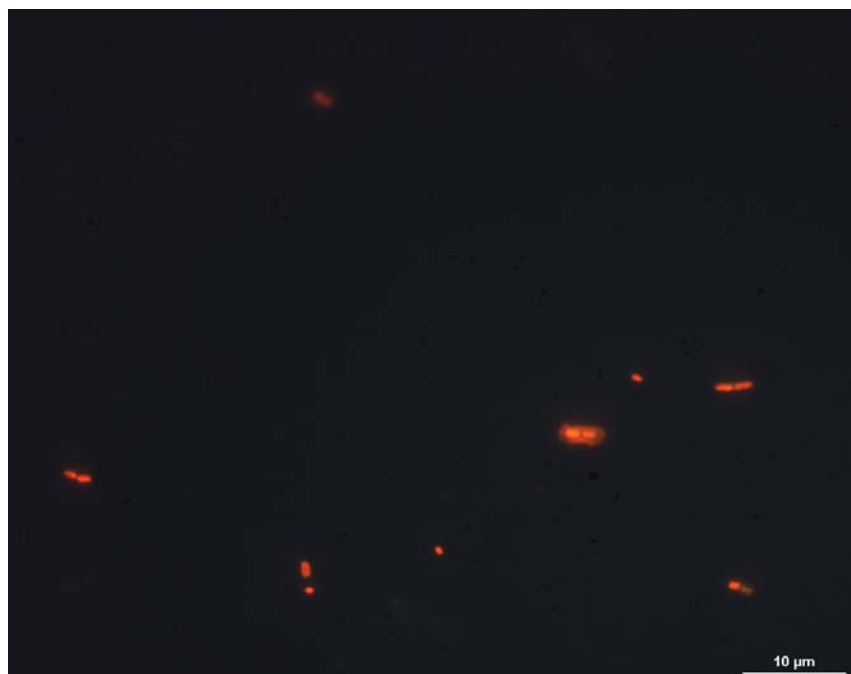


Abb. 24. Bakterien des Grundwassers gefärbt mit Acridinorange. Angefärbte Bakterienzellen lassen sich sehr gut erkennen (Grundwasserprobe aus 13,3 - 14,3 m unter GOK vom oberflächennahen Grundwasserleiter Segeberger Forst in Schleswig-Holstein; Messbalken, 10 µm; Foto: J. Dietrich).

3.5 Isolierung von Gesamt-DNA aus Grundwasser und Grundwasser-sedimenten

Von den Mikroorganismen des freien Grundwassers der verschiedenen Standorte, die auf den Filtern konzentriert wurden, und den mikrobiellen Lebensgemeinschaften der gewonnenen Grundwassersedimente wurde versucht, mit Hilfe verschiedener Methoden die Gesamt-DNA zu isolieren. Nach intensivem Vergleich zahlreicher DNA-Isolierungsmethoden für bakterielle DNA und zusätzlicher Optimierung einzelner Schritte haben sich für die Bearbeitung dieser Filter die Methoden 14 und 15 als optimal erwiesen.

Die Ausbeute an isolierter Gesamt-DNA aus den auf Filter konzentrierten Mikroorganismen bzw. aus den Sedimentproben ist in Tabelle 6 dargestellt. Dabei wurden für die DNA-Extraktion aus Aquifersedimenten schon 50 g Sediment eingesetzt um die angegebenen Ausbeuten zu erreichen. In allen Fällen war diese DNA jedoch nicht PCR-fähig. Deshalb wurden verschiedene Verfahren zur Reinigung der DNA von PCR-Inhibitoren getestet. Hier zeigte der Vergleich der angewendeten Verfahren, bezogen auf die Entfernung der Huminstoffe bei gleichzeitig möglichst geringen DNA-Verlusten, die Verwendung einer Kombination von PVPP-Säulen und dem Qiaquick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) die besten Ergebnisse. In keinem Fall, selbst wenn auch die gesamte DNA von maximal 41 ng, die aus 50 g Aquifersediment gewonnen und gereinigt werden konnte, als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt wurde, konnte die Vervielfältigung des für die Identifizierung gewählten Genfragmentes der 16S rDNA erreicht werden. Auch eine nachfolgende Nested-PCR war hier nicht erfolgreich.

Lediglich vom Aquifer Löcknitz konnte ausreichend hoch konzentrierte und gereinigte DNA von den Filtern, auf denen die Bakterien des Brunnenwassers konzentriert wurden, gewonnen werden. Diese DNA war PCR-fähig und nur hier gelang die Vervielfältigung der verschiedenen Genfragmente der 16S rDNA (Abb. 25).

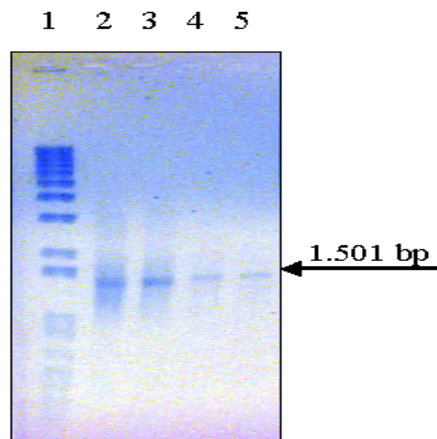


Abb. 25. Amplifizierung eines Fragments des 16S rDNA-Gens (Länge: 1.501 bp; Primer 16S F 9-27 / 16S R 1492-1510) in Gesamt-DNA-Präparationen gewonnen aus dem Aquifer Löcknitz und bakteriellen Reinkulturen mit den (Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel (1 % [w/v]), Auftragsvolumen 10 µl, Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 110 min bei 80 V [Vorlauf für 10 min bei 50 V]). Spur 1, DNA Größenstandard (1 Kb Plus DNA Ladder™, Gibco BRL®); Spuren 2, 3, 4 und 5, Chromosomale DNA von Löcknitz, gewonnen durch DNA-Isolierung nach Methode 15.

Tab. 6. Ausbeute an Gesamt-DNA, isoliert aus den auf Filter konzentrierten Mikroorganismen bzw. aus den Sedimentproben der untersuchten Grundwasser- und Grundwassersedimentproben.

Probe ¹	Maximale Ausbeute an Gesamt-DNA vor der weiteren Reinigung isoliert mit Methode 14 bzw. 15 [ng DNA l ⁻¹ filtriertes Grundwasser bzw. g ⁻¹ Sediment]
Aquifer II Wankendorf (Bornhöveder Seenkette)	
Grundwasser (gefordert aus: 84,0 - 94,0 m unter GOK)	5,5
Grundwassersediment: Kern K1: 84,8 - 85,8 m unter GOK	2,5
Aquifer Segeberger Forst	
Grundwasser (gefordert aus: 13,3 - 14,3 m unter GOK)	2,5
Grundwassersediment: Kern K4: 9,4 - 9,8 m unter GOK) Kern K7: 13,3 - 14,3 m unter GOK)	1,0 4,4
Aquifer Löcknitz (Grundwasser)	28
Aquifer Föhr (Grundwasser)	11
Aquifer Hiddensee (Grundwasser)	0,2

¹, GOK, Geländeoberkante

3.6 Vergleich der mikrobiellen Populationsstruktur des Grundwassers mit der des Grundwassersedimentes

Da insbesondere aus den Aquifersedimenten nicht ausreichend DNA für die molekularbiologische Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft gewonnen werden konnte, konzentrierten sich die weiteren Arbeiten zum Vergleich der mikrobiellen Populationsstruktur des Grundwassers mit der des Grundwassersedimentes auf die Untersuchung bakterieller Reinkulturen. Diese wurden von den Platten isoliert, die sofort nach der Probennahme zur Bestimmung der Lebendkeimzahlen dienten. Insgesamt wurden 1000 bakterielle Reinkulturen isoliert (Tab. 7).

Tab. 7. Bezeichnung der bakteriellen Reinkulturen, die zum Vergleich der mikrobiellen Populationsstruktur des Grundwassers mit der des Grundwassersedimentes verwendet wurden.

Probe ¹	Anzahl und Bezeichnung der isolierten bakteriellen Reinkulturen
Aquifer II Wankendorf (Bornhöveder Seenkette)	
Grundwasser (gefordert aus: 84,0 – 94,0 m unter GOK)	200 (Stämme 601 - 805)
Grundwassersediment: Kern K1 : 84,8 - 85,8 m unter GOK	200 (Stämme 1 - 200)
Aquifer Segeberger Forst	
Grundwasser (gefordert aus: 13,3 - 14,3 m unter GOK)	200 (Stämme WSF 1 - WSF 200)
Grundwassersediment: Kern K4 : 9,4 - 9,8 m unter GOK) Kern K7 : 13,3 - 14,3 m unter GOK)	200 Stämme (SK4 301 - 500) 200 Stämme (SK7 1 - SK7 200)

Diese Bakterienreinkulturen wurden unter geeigneten Bedingungen vermehrt, aufgeschlossen und aus ihnen eine hochmolekulare und PCR-fähige DNA isoliert. Dann wurde das Gen für die 16S rDNA über die Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Diese Amplifikate wurden in einer RFLP-Analyse (Abb. 26) miteinander verglichen und nur Amplifikate mit einem spezifischen Bandenmuster wurden dann sequenziert. Die taxonomische Zugehörigkeit dieser Isolate wurde dann über die phylogenetische Sequenzanalyse dieses Gens durchgeführt.

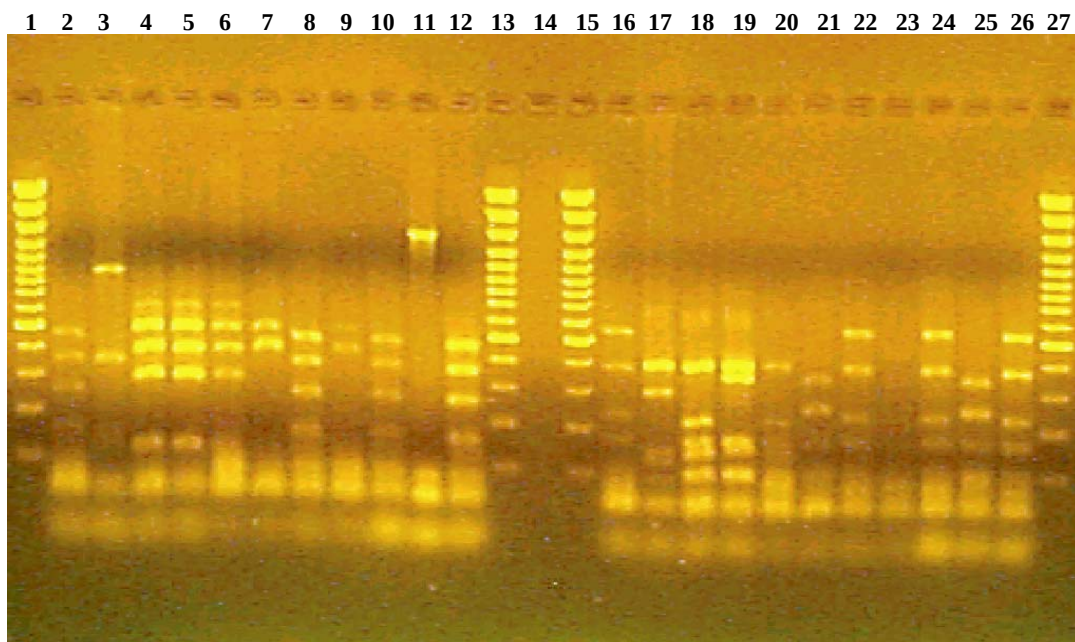


Abb. 26. Restriktionsverdau von PCR-Produkten des 16S rRNA-Gens verschiedener bakterieller Reinkulturen mit den Enzymen *RsaI* (links) und *Bsh1236I* (rechts). Ethidiumbromid gefärbtes Seakem-Agarosegel (Biozym, Hameln) (2% [w/v]), Laufpuffer TAE, Auftragsvolumen 10 µl, Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 90 min bei 90 V (Vorlauf für 10 min bei 50 V). Spuren 1, 13, 15 und 27, DNA-Längenstandard: 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Litauen); Spuren 2 - 12, und 16 – 26 PCR, PCR-Produkte des 16S rRNA-Gens verschiedener Isolate aus dem Aquifer Segeberger Forst.

3.6.1 Aquifer II Wankendorf (Bornhöveder Seenkette)

Die Bandenmuster des Restriktionsverdaus (*RsaI* bzw. *Bsh1236I*) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Wankendorfer Grundwassers konnten in 17 und die der Isolate des Aquifersedimentes in 33 spezifische Typen differenziert werden, von denen dann die für die Gruppe repräsentativen Stämme ausgewählt und sequenziert wurden (Tab. 8 und 9).

Die erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen der Isolate der Wankendorfer Grundwassers bzw. des Grundwassersedimentes wurden dann phylogenetisch analysiert (Abb. 27 und 28).

Tab. 8. Typisierung der RFLP-Analyse (*RsaI* bzw. *Bsh1236I*) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Wankendorfer Grundwassers.

Typ	Prozentualer Anteil dieses Bandenmuster-Typs an der Gesamtheit der Isolate [%]	Representatives, sequenziertes Isolat
I	45,0	604, 619, 626, 794
II	31,5	601
III	15,5	653, 795
IV	1,0	644
V	1,0	602
VI	0,5	606
VII	0,5	628
VIII	0,5	646
IX	0,5	686
X	0,5	752
XI	0,5	754
XII	0,5	782
XIII	0,5	790
XIV	0,5	791
XV	0,5	792
XVI	0,5	800
XVII	0,5	805

Tab. 9. Typisierung der RFLP-Analyse (*RsaI* bzw. *Bsh1236I*) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Wankendorfer Aquifersedimentes.

Typ	Prozentualer Anteil dieses Bandenmuster-Typs an der Gesamtheit der Isolate [%]	Representatives, sequenziertes Isolat
I	30,0	2, 3, 68, 95, 105, 135, 148, 161
II	14,5	96, 113, 151, 158
III	8,0	60, 79, 86, 97
IV	6,5	59, 134, 146, 157
V	6,5	90, 91, 92, 173
VI	5,0	1, 9, 116
VII	4,0	56, 67
VIII	3,0	29, 66, 175
IX	3,0	54, 75, 162
X	3,0	120, 147, 176
XI	1,5	49, 107
XII	1,0	31, 132
XIII	1,0	4, 108
XIV	1,0	51, 102
XV	1,0	70, 76
XVI	1,0	85, 103
XVII	1,0	99, 144
XVIII	1,0	111, 131
IXX	1,0	142, 159
XX	0,5	6
XXI	0,5	20
XXII	0,5	26
XXIII	0,5	30
XXIV	0,5	32
XXV	0,5	47
XXVI	0,5	73
XXVII	0,5	83
XXVIII	0,5	94
XXIX	0,5	117
XXX	0,5	122
XXXI	0,5	126
XXXII	0,5	138
XXXIII	0,5	155

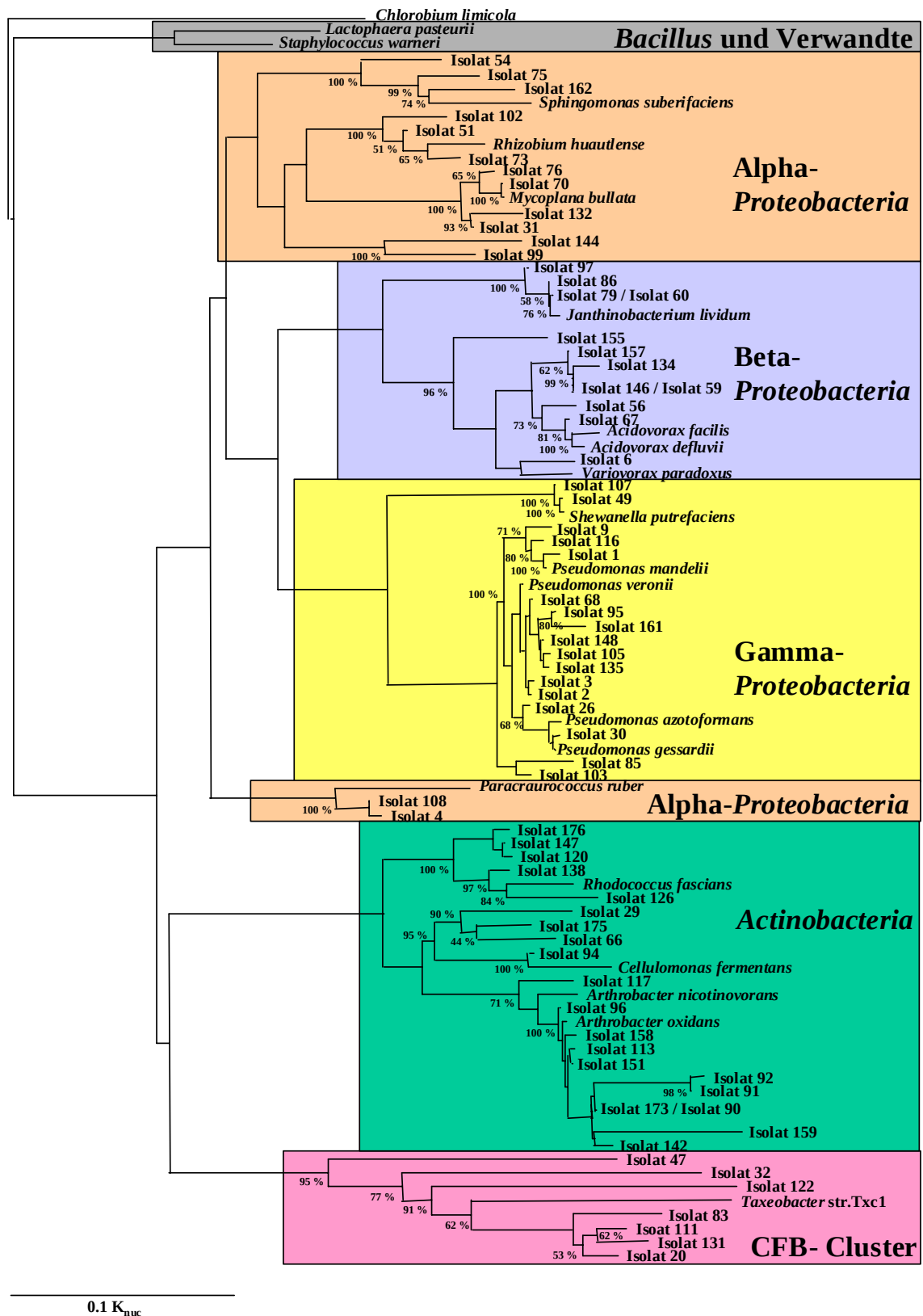


Abb. 27. Phylogenetische Analyse (Neighbor joining) der 16S rDNA (Alignmentposition: 9 - 558 nach *Escherichia coli* K12) der bakteriellen Isolate (Stämme 1 - 200) aus dem Aquifersediment der Sedimentkerns K1 (84,8 - 85,8 m unter GOK) des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf.

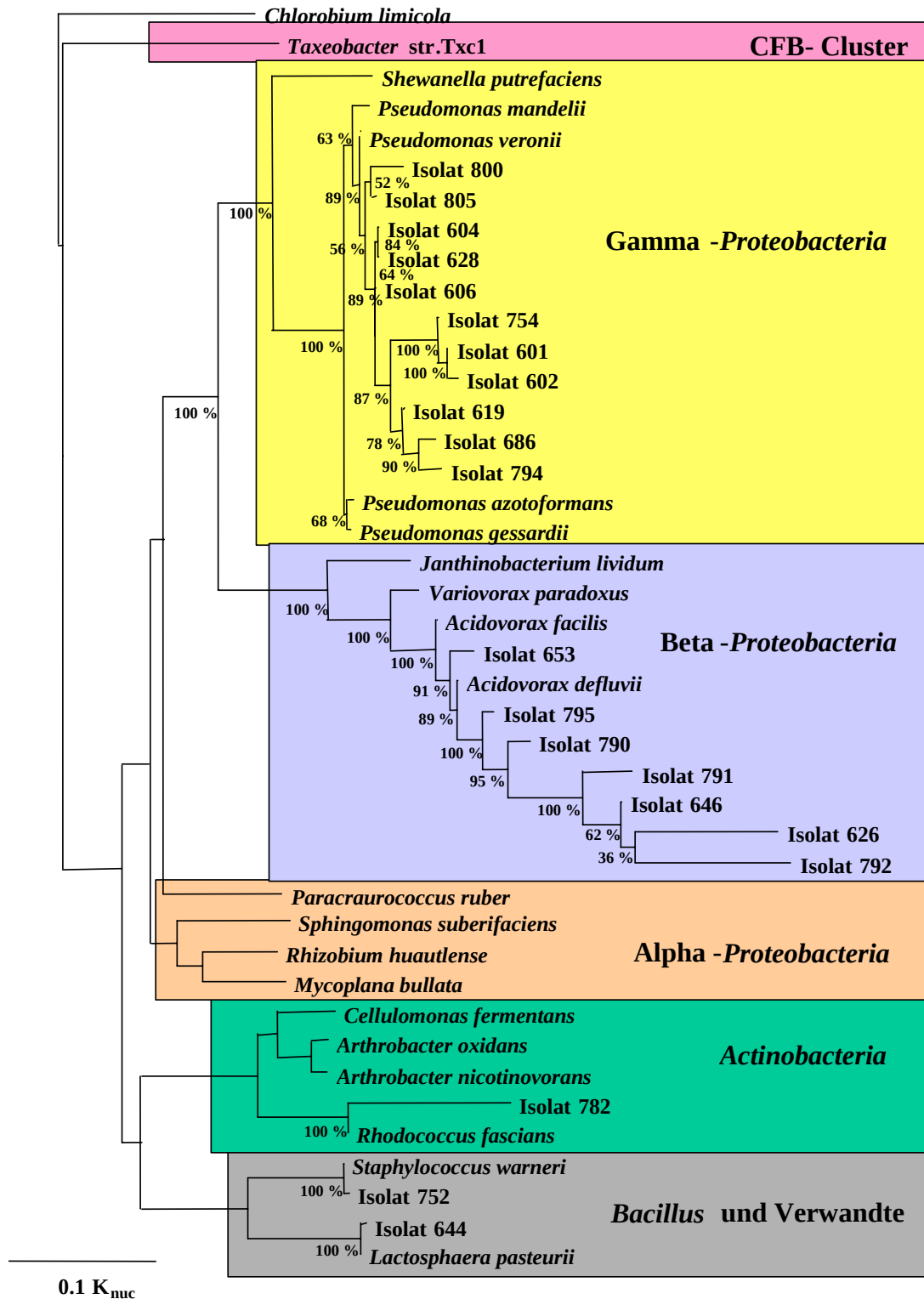


Abb. 28. Phylogenetische Analyse (Neighbor joining) der 16S rDNA (Alignmentposition: 9 - 558 nach *Escherichia coli* K12) der bakteriellen Isolate (Stämme 600 - 805) aus dem Grundwasser gefördert aus der in diesem Projekt abgeteufte Grundwassermessstelle (84,0 - 94,0 m unter GOK) des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf.

Tab. 10. Bakterielle Referenzstämme der Abb. 27 bis 28.

Stamm	Stamm- sammlung	Accession- number
<i>Pseudomonas veronii</i> str. CFML92-134	CIP 104663 (T)	AB021411
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603 (T)	D84009
<i>Pseudomonas gessardii</i>	CIP 105469	AF074384
<i>Pseudomonas mandelii</i>	CIP 105273	AF058286
<i>Acidovorax defluvii</i> str.BSB411		Y18616
<i>Acidovorax facilis</i>	CCUG 2113 (T)	AF078765
<i>Janthinobacterium lividum</i> str. H-24	DSM 1522 (T)	Y08846
<i>Variovorax paradoxus</i>	IAM 12373 (T)	D88006
<i>Taxeobacter</i> str. Txc1		Y18837
<i>Arthrobacter oxidans</i>	DSM 20119 (T)	X83408
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	DSM 420 (T)	X80743
<i>Cellulomonas fermentans</i>	DSM 3133 (T)	X79458
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC 12974 (T)	X81930
<i>Lactosphaera pasteurii</i> str. KoTa2	DSM 2381 (T)	X87150
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836 (T)	L37603
<i>Sphingomonas suberifaciens</i>	IFO 15211 (T)	D13737
<i>Rhizobium huautlense</i> str. SO2		AF025852
<i>Paracraurococcus ruber</i> str.NS89		D85827
<i>Mycoplana bullata</i>	IAM 13153 (T)	D12785
<i>Shewanella putrefaciens</i>	LMG 26268 (T)	X81623
<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 246	AJ290824

Ein Vergleich des Aquifersedimentes (Sedimentkern K1; 84,8 - 85,8 m unter GOK) und des Grundwassers, gefördert aus der in diesem Projekt abgeteuften Grundwassermessstelle (84,0 - 94,0 m unter GOK) des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf, zeigt Gemeinsamkeiten aber auch deutliche Unterschiede in der mikrobiellen Populationsstruktur, die nachfolgend zusammenfassend dargestellt werden (Bezeichnung der Stämme nach BOONE *et al.*, 2001):

1. Im Stamm der *Proteobacteria* konnte die Klasse I der „Alphaproteobacteria“ nur im Aquifersediment, und hier mit einer größeren Diversität, nicht aber im Grundwasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen werden. Die Isolate aus dem Sediment zeigten eine nähere bzw. weitere Verwandtschaft zu (1) *Paracraurococcus ruber*, (2) *Sphingomonas suberifaciens*, (3) *Rhizobium huautlense*, (4) *Mycoplana bullata*. Es wurden aber auch bisher unbekannte Bakterien gefunden (Isolate 99 und 144).
2. Im Stamm der *Proteobacteria* wurden Vertreter der Klasse II der „Betaproteobacteria“ sowohl im Aquifersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen. Dabei zeigte diese Gruppe im Sediment eine deutlich größere Diversität. Sowohl im Sediment als auch im Grundwasser fanden sich Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu *Acidovorax facilis* / *Acidovorax defluvii*. Im Sediment wurden aber zusätzlich Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Janthinobacterium lividum* und (2) *Variovorax paradoxus* gefunden.
3. Im Stamm der *Proteobacteria* wurden ebenfalls Vertreter der Klasse III der „Gammaproteobacteria“ sowohl im Aquifersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle gefunden. Auch hier zeigte diese Gruppe im Sediment eine deutlich größere Diversität. Sowohl im Sediment als auch im Grundwasser konnten Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu *Pseudomonas veronii* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden aber im Sediment Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Shewanella putrefaciens*, (2) *Pseudomonas mandelii*, (3) *Pseudomonas azotoformans* und (4) *Pseudomonas gessardii* gefunden.

4. Der Stamm der *Bacteroidetes* wurde mit zahlreichen Isolaten nur im Aquifersediment, und hier mit einer großen Diversität, nicht aber im Grundwasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen. Einige Isolate gruppierten in der Nähe der bisher nicht gültig beschriebenen Gattung „*Taxeobacter*“.
5. Der Stamm der *Firmicutes* wurde ebenfalls nur im Aquifersediment nicht aber im Grundwasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen. Die Isolate gruppierten in der Nähe von (1) *Staphylococcus warneri* und (2) *Lactosphaera pasteurii*.
6. Der Stamm der *Actinobacteria* wurde sowohl im Aquifersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen. Dabei zeigte diese Gruppe im Sediment wiederum eine wesentlich größere Diversität. Sowohl im Sediment als auch im Grundwasser konnten Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu *Rhodococcus fascians* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden aber im Sediment Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Cellulomonas fermentans*, (2) *Arthrobacter nicotinovorans* und (3) *Arthrobacter oxidans* gefunden. Auch in dieser Gruppe fanden sich im Aquifersediment zahlreiche, bisher unbekannte, Bakterien (Isolate 29/66/175 und 90-92/142/159).

Grundsätzlich konnte also im Aquifersediment des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf eine wesentlich größere Diversität von Mikroorganismen nachgewiesen werden. Bestimmte Gruppen, wie die „Alphaproteobacteria“, *Bacteroidetes* und *Firmicutes*, waren ausschließlich nur im Grundwassersediment zu finden. Während die Gruppen „Betaproteobacteria“, „Gammaproteobacteria“ und *Actinobacteria* sowohl im Aquifersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle vertreten waren. Aber auch innerhalb dieser Gruppen zeichnete sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Sedimentes des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf durch eine höhere Diversität aus. Charakteristisch für die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Grundwassersedimentes des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf war das Vorkommen folgender **19 Organismengruppen** mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Paracraurococcus ruber</i> , (2) <i>Sphingomonas suberifaciens</i> , (3) <i>Rhizobium huautlense</i> , (4) <i>Mycoplana bullata</i> , (5) bisher unbekannte Bakterien (Isolate 99 und 144)
„Betaproteobacteria“	(6) <i>Janthinobacterium lividum</i> und (7) <i>Variovorax paradoxus</i>
„Gammaproteobacteria“	(8) <i>Shewanella putrefaciens</i> , (9) <i>Pseudomonas mandelii</i> , (10) <i>Pseudomonas azotoformans</i> und (11) <i>Pseudomonas gessardii</i>
<i>Bacteroidetes</i>	(12) bisher nicht gültig beschriebene Gattung „ <i>Taxeobacter</i> “
<i>Firmicutes</i>	(13) <i>Staphylococcus warneri</i> und (14) <i>Lactosphaera pasteurii</i>
<i>Actinobacteria</i>	(15) <i>Cellulomonas fermentans</i> , (16) <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> , (17) <i>Arthrobacter oxidans</i> und bisher unbekannte Bakterien (18) Isolate 29/66/175 und (19) Isolate 90-92/142/159

Sowohl im Grundwassersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle des Tiefengrundwasserleiters II der Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf waren Vertreter folgender **3 Organismengruppen** verbreitet mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Betaproteobacteria“	(1) <i>Acidovorax facilis</i> / <i>Acidovorax defluvii</i>
„Gammaproteobacteria“	(2) <i>Pseudomonas veronii</i>
<i>Actinobacteria</i>	(3) <i>Rhodococcus fascians</i>

Zudem waren unter den Isolaten des Grundwassers und des Sedimentes die Gruppen um (1) *Pseudomonas veronii* und (2) *Acidovorax facilis* / *Acidovorax defluvii* auch

quantitativ dominierend. Deshalb könnten Isolate dieser beiden Gruppen, die in diesem Projekt gewonnen wurden, als **Indikatororganismen** für die mikrobielle Lebensgemeinschaft des anthropogen unbeeinflussten Grundwasserraumes des Tiefengrundwasserleiters II (Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf) definiert werden. Sie wären zum Beispiel für ökotoxikologische Untersuchungen geeignet, da sie sowohl im Sediment als auch im freien Grundwasser verbreitet sind und hier einen wesentlichen Anteil an der mikrobiellen Lebensgemeinschaft bilden. Sie sind leicht zu kultivieren und unter Einsatz molekularbiologischer Nachweisverfahren (Nukleinsäuresonden, Fingerprinting-Techniken) vermutlich auch gut und reproduzierbar nachzuweisen.

Mit Hilfe der angewendeten Kombination von klassischen Kulturtechniken und molekularbiologischen Methoden ließ sich also im Tiefengrundwasserleiter II (Bornhöveder Seenkette im Bereich Wankendorf) ein deutlicher Unterschied in der Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Sedimentes dieses Aquifers und des Grundwassers nachweisen.

3.6.2 Aquifer Segeberger Forst

Die Bandenmuster des Restriktionsverdau (Rsal bzw. Bsh1236I) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Grundwassers des Segeberger Forstes konnten in 27 und die der Isolate des Aquifersedimentes in 29 (Kern K7) bzw. 21 (Kern K4) spezifische Typen differenziert werden, von denen dann die für die Gruppe repräsentativen Stämme ausgewählt und sequenziert wurden (Tab. 10 und 11).

Die erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen der Isolate des Grundwassers bzw. des Grundwassersedimentes des Segeberger Forstes wurden dann phylogenetisch analysiert (Abb. 29 - 33).

Tab. 11. Typisierung der RFLP-Analyse (*RsaI* bzw. *Bsh1236I*) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Aquifersedimentes SK7 aus dem Segeberger Forst.

Typ	Prozentualer Anteil dieses Bandenmuster-Typs an der Gesamtheit der Isolate [%]	Representatives, sequenziertes Isolat
I	26,5	12
II	17,0	9
III	15,0	134
IV	9,5	106
V	6,5	16
VI	4,0	103
VII	3,5	133
VIII	2,5	93
IX	2,0	95
X	2,0	99
XI	2,0	100
XII	1,0	107
XIII	1,0	240
XIV	0,5	8
XV	0,5	26
XVI	0,5	42
XVII	0,5	55
XVIII	0,5	66
XIX	0,5	67
XX	0,5	79
XXI	0,5	90
XXII	0,5	109
XXIII	0,5	111
XXIV	0,5	112
XXV	0,5	113
XXVI	0,5	136
XXVII	0,5	123
XXIX	0,5	140

Tab. 12. Typisierung der RFLP-Analyse (*RsaI* bzw. *Bsh1236I*) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Grundwassers des Segeberger Forstes.

Typ	Prozentualer Anteil dieses Bandenmuster-Typs an der Gesamtheit der Isolate [%]	Representatives, sequenziertes Isolat
I	50,0	1
II	17,0	86
III	6,0	195
IV	5,0	161
V	4,5	28
VI	4,0	59
VII	1,0	2
VIII	1,0	38
IX	1,0	91
X	1,0	200
XI	0,5	3
XII	0,5	5
XIII	0,5	7
XIV	0,5	19
XV	0,5	57
XVI	0,5	58
XVII	0,5	64
XVIII	0,5	78
XIX	0,5	79
XX	0,5	80
XXI	0,5	108
XXII	0,5	109
XXIII	0,5	114
XXIV	0,5	127
XXV	0,5	128
XXVI	0,5	186
XXVII	0,5	197

Tab. 13. Typisierung der RFLP-Analyse (*RsaI* bzw. *Bsh1236I*) der amplifizierten 16S rRNA-Gene der Isolate des Aquifersedimentes SK4 aus dem Segeberger Forst.

Typ	Prozentualer Anteil dieses Bandenmuster-Typs an der Gesamtheit der Isolate [%]	Representatives, sequenziertes Isolat
I	48,5	323
II	31,0	326
III	8,0	335
IV	2,0	358
V	1,5	305
VI	1,0	341
VII	1,0	428
VIII	0,5	304
IX	0,5	317
X	0,5	325
XI	0,5	329
XII	0,5	330
XIII	0,5	331
XIV	0,5	334
XV	0,5	337
XVI	0,5	339
XVII	0,5	352
XVIII	0,5	360
IXX	0,5	406
XX	0,5	446
XXI	0,5	473

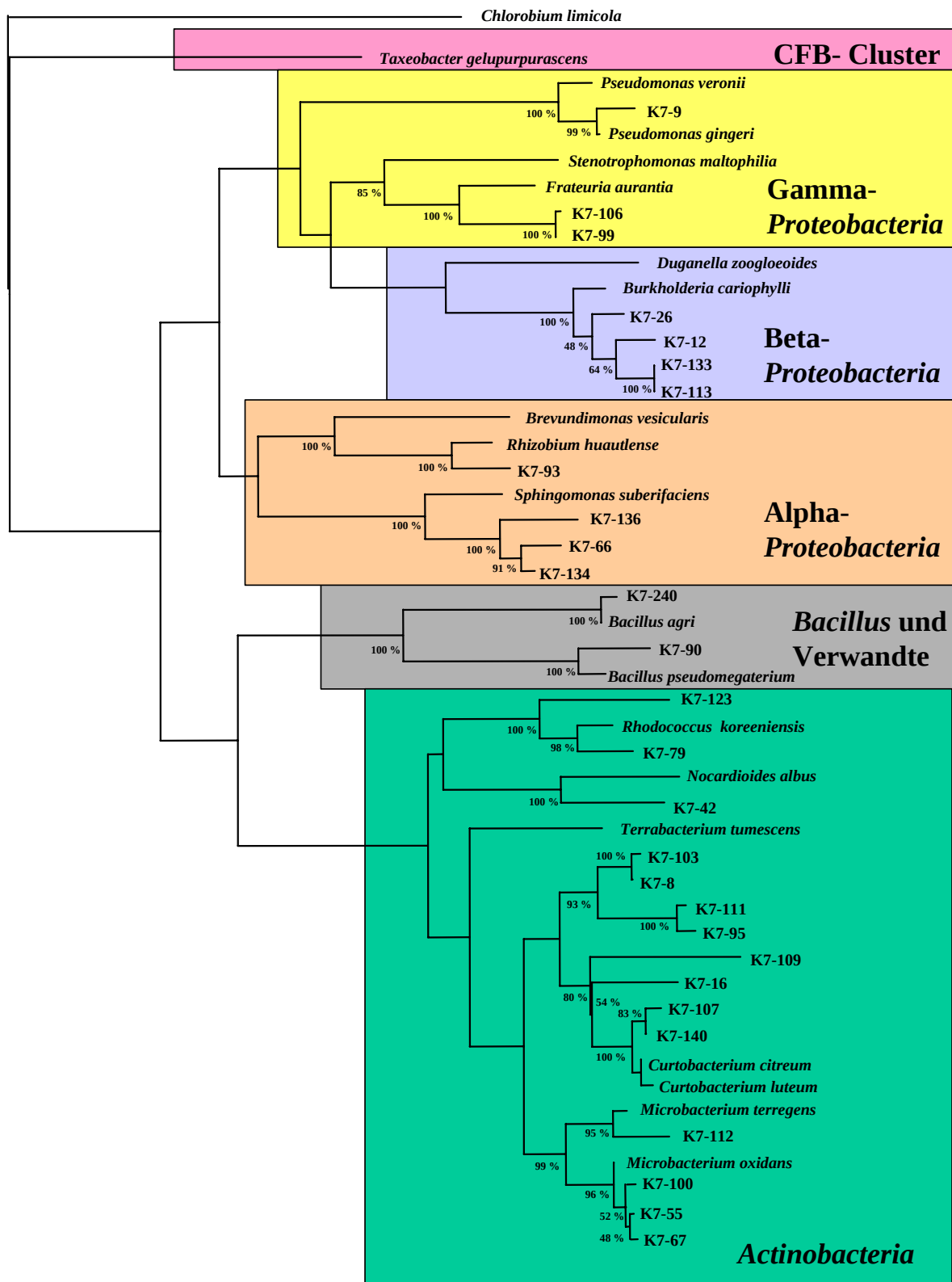


Abb. 29. Phylogenetische Analyse (Neighbor joining) der 16S rDNA (Alignmentposition: 9 - 558 nach *Escherichia coli* K12) der bakteriellen Isolate (Stämme SK7-1 bis 243) aus dem Aquifersediment des Sedimentkerns K7 (13,3 - 14,3 m unter GOK) des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst.

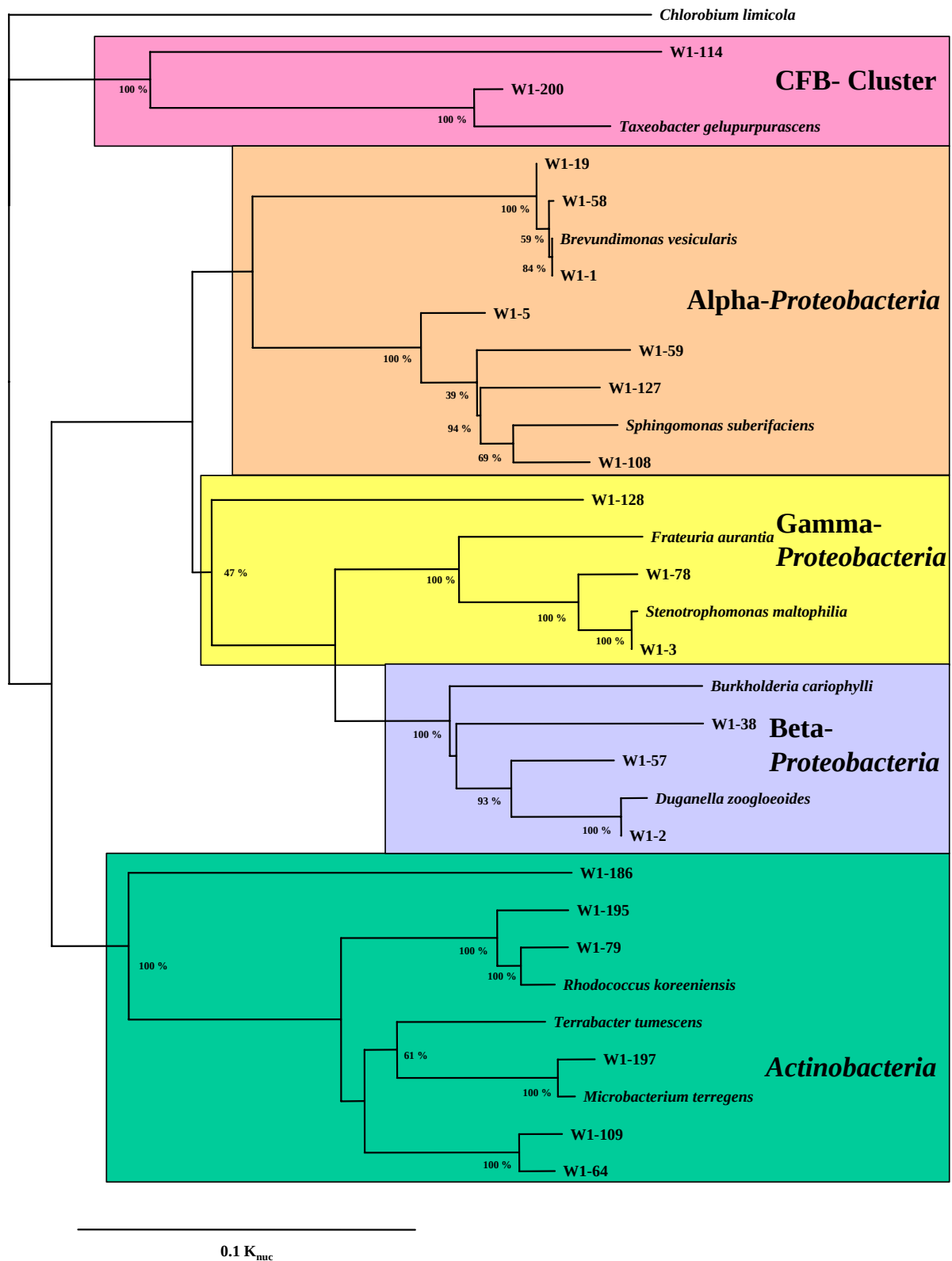


Abb. 30. Phylogenetische Analyse (Neighbor joining) der 16S rDNA (Alignmentposition: 9 - 558 nach *Escherichia coli* K12) der bakteriellen Isolate (Stämme W1-1 bis 200) vom Wasser aus der in diesem Projekt abgeteufte Grundwassermessstelle (13,3 und 14,3 m unter GOK) des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst.

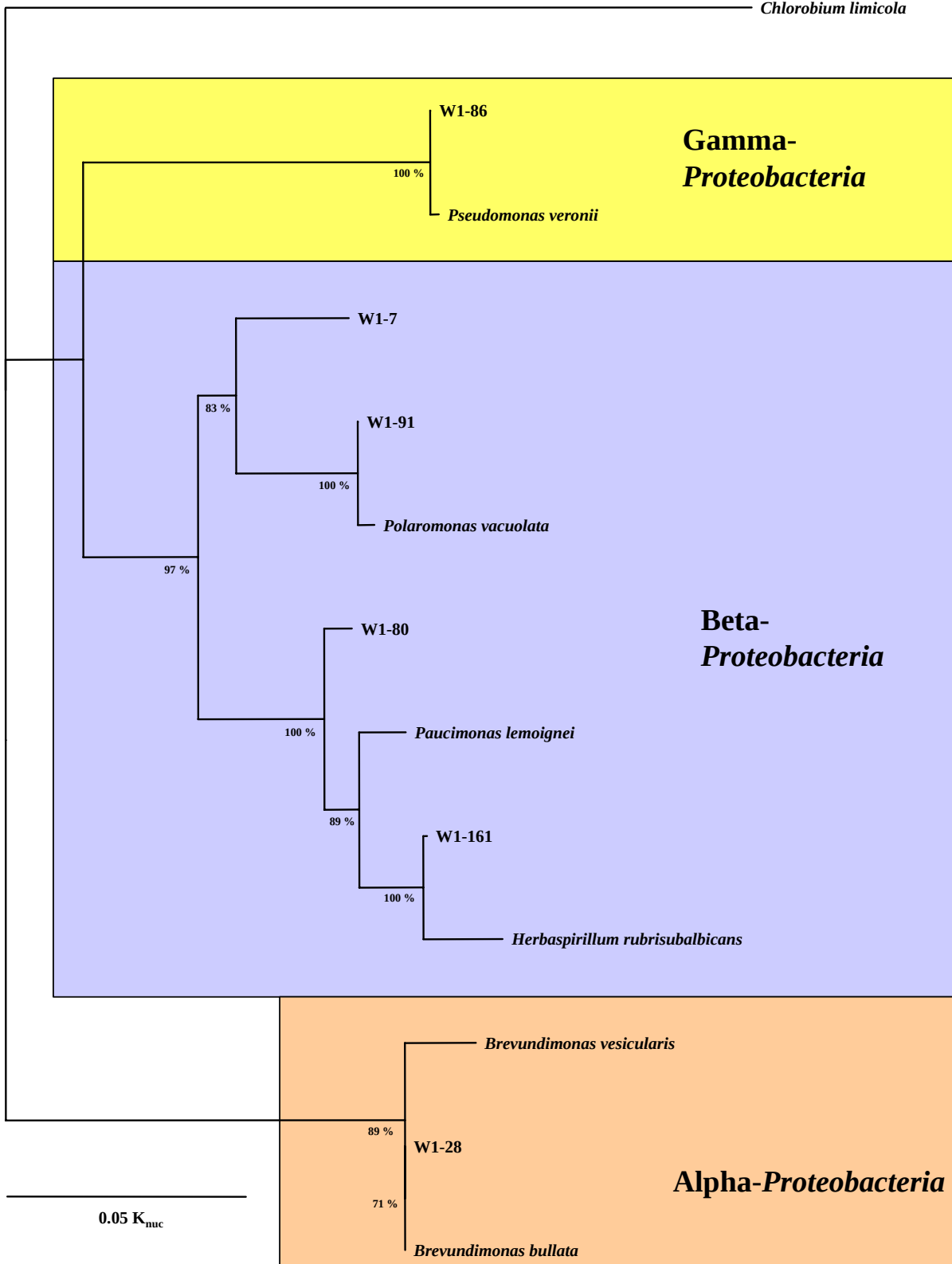


Abb. 31. Phylogenetische Analyse (Neighbor joining) der 16S rDNA (Alignmentposition: 960 - 1510 nach *Escherichia coli* K12) der bakteriellen Isolate (Stämme W1-1 bis 200) vom Wasser aus der in diesem Projekt abgeteufte Grundwassermessstelle (13,3 und 14,3 m unter GOK) des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst.

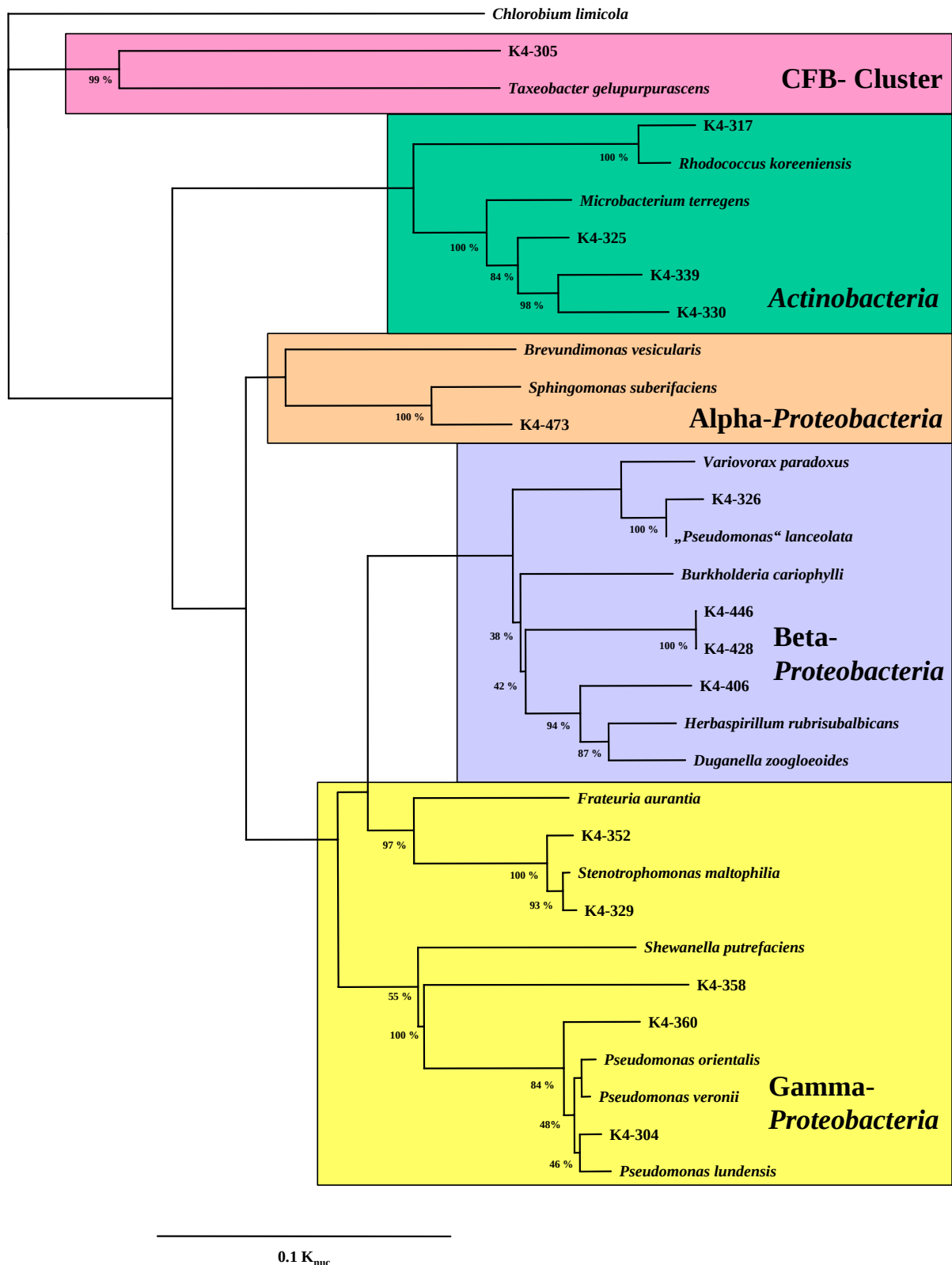


Abb. 32. Phylogenetische Analyse (Neighbor joining) der 16S rDNA (Alignmentposition: 9 - 558 nach *Escherichia coli* K12) der bakteriellen Isolate (Stämme K4-301 bis 500) aus dem Aquifersediment des Sedimentkerns K4 (9,4 - 9,8 m unter GOK) des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst.

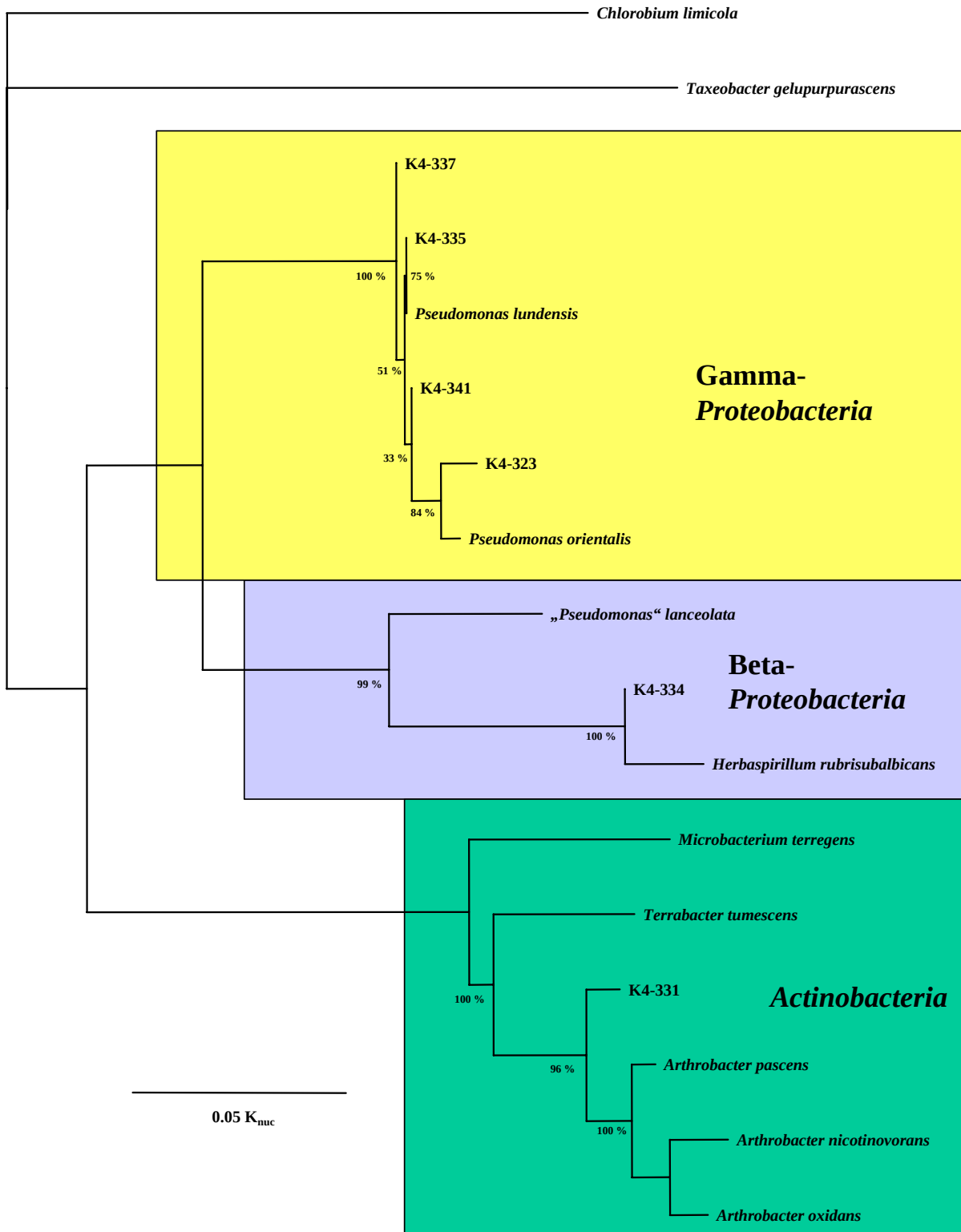


Abb. 33. Phylogenetische Analyse (Neighbor joining) der 16S rDNA (Alignmentposition: 960 - 1510 nach *Escherichia coli* K12) der bakteriellen Isolate (Stämme K4-301 bis 500) aus dem Aquifersediment des Sedimentkerns K4 (9,4 - 9,8 m unter GOK) des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst.

Tab. 14. Bakterielle Referenzstämme der Abbildungen 29 bis 33.

Stamm	Stamm-sammlung	Accession-number
<i>Acidovorax defluvii</i> str.BSB411		Y18616
<i>Acidovorax facilis</i>	CCUG 2113 (T)	AF078765
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	DSM 420 (T)	X80743
<i>Arthrobacter oxidans</i>	DSM 20119 (T)	X83408
<i>Arthrobacter pascens</i>	DSM 20545 (T)	X80740
<i>Bacillus agri</i>		U65892
<i>Bacillus pseudomegaterium</i>	ATCC 49866	X77791
<i>Brevundimonas bullata</i>	ATCC 4278	AJ294364
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	LMG 11141	AJ227781
<i>Burkholderia cariophylli</i>		U91570
<i>Cellulomonas fermentans</i>	DSM 3133 (T)	X79458
<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 246	AJ290824
<i>Curtobacterium citreum</i>	DSM 20528 (T)	X77436
<i>Curtobacterium luteum</i>	DSM 20542 (T)	X77437
<i>Duganella zoogloeoides</i>	IAM 12670	D14256
<i>Frateuria aurantia</i>	IFO3245 (T)	AJ010481
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	ICMP 5777	AF137508
<i>Janthinobacterium lividum</i> str. H-24	DSM 1522 (T)	Y08846
<i>Lactosphaera pasteurii</i> str. KoTa2	DSM 2381 (T)	X87150
<i>Microbacterium oxidans</i>	DSM 20578	Y17227
<i>Microbacterium terregens</i> str.88	IFO 12961 (T)	AB004721
<i>Mycoplana bullata</i>	IAM 13153 (T)	D12785
<i>Nocardioides albus</i>	DSM 43109 (T)	X53211
<i>Paracraurococcus ruber</i> str.NS89		D85827
<i>Polaromonas vacuolata</i>		U14585
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603 (T)	D84009
<i>Pseudomonas gessardii</i>	CIP 105469	AF074384
<i>Pseudomonas gingeri</i>		AF320991
<i>Pseudomonas lanceolata</i>	ATCC 14669	AB021390
<i>Pseudomonas lemoignei</i>	LMG 16480	X92554
<i>Pseudomonas lundensis</i>	ATCC 49968	AB021395
<i>Pseudomonas mandelii</i>	CIP 105273	AF058286
<i>Pseudomonas orientalis</i>		AF064457
<i>Pseudomonas veronii</i> str. CFML92-134	CIP 104663 (T)	AB021411
<i>Rhizobium huautlense</i> str. SO2		AF025852
<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC 12974 (T)	X81930
<i>Rhodococcus koreniensis</i> str.DNP505	IFO 16253	AB023374
<i>Shewanella putrefaciens</i>	LMG 26268 (T)	X81623
<i>Sphingomonas suberifaciens</i>	IFO 15211 (T)	D13737
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836 (T)	L37603
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	LMG10857	AJ131117
<i>Taxeobacter gelupurpurascens</i>		Y18836
<i>Taxeobacter</i> str. Txc1		Y18837
<i>Terrabacterium tumescens</i>		AF008564
<i>Variovorax paradoxus</i>	IAM 12373 (T)	D88006

Ein Vergleich des Aquifersedimentes (Sedimentkern K7; 13,3 - 14,3 m unter GOK) und des Grundwassers, gefördert aus der in diesem Projekt abgeteuften Grundwassermessstelle (verfiltert in gleicher Tiefe: 13,3 - 14,3 m unter GOK) des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst, zeigt deutliche Gemeinsamkeiten aber auch einige Unterschiede in der mikrobiellen Populationsstruktur (Abb. 29 - 31), die nachfolgend zusammenfassend dargestellt werden (Bezeichnung der Stämme nach BOONE *et al.*, 2001):

1. Im Stamm der *Proteobacteria* konnte die Klasse I der „Alphaproteobacteria“ sowohl im Aquifersediment und als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle, und hier mit einer etwas größeren Diversität, nachgewiesen werden. Sowohl im Sediment als auch im Grundwasser wurden Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu *Sphingomonas suberifaciens* gefunden. Zusätzlich traten aber im Grundwasser Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Brevundimonas vesicularis* und (2) *Brevundimonas bullata* auf. Im Brunnenwasser wurden aber auch bisher unbekannte Bakterien gefunden: (3) das Isolat W1-5, (4) das Isolat W1-59 und (6) das Isolat W1-127. Charakteristisch für das Sediment war das Vorkommen von Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu *Rhizobium huautlense*.
2. Im Stamm der *Proteobacteria* wurden jeweils völlig verschiedene Vertreter der Klasse II der „Betaproteobacteria“ im Aquifersediment und im Grundwasser der Grundwassermessstelle, hier aber mit einer deutlich größeren Diversität, nachgewiesen. Im Sediment wurden Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu *Burkholderia caryophyllii* und im Wasser Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Duganella zoogloides* (2) *Polaromonas vacuolata*, (3) *Pseudomonas lemoignei*, (4) *Herbaspirillum rubrisubalbicans* und die bisher unbekannten Bakterien (5) Isolat W1-38, (6) W1-57 und (7) W1-7 gefunden.
3. Im Stamm der *Proteobacteria* wurden ebenfalls Vertreter der Klasse III der „Gammaproteobacteria“ sowohl im Aquifersediment als auch im Wasser der Grundwassermessstelle, hier mit einer etwas größeren Diversität gefunden. Sowohl im Sediment als auch im Wasser der Messstelle traten Bakterien mit einer näheren

Verwandtschaft zu (1) *Frateriia aurantia* (2) *Pseudomonas veronii* / *Pseudomonas gingeri* auf. Nur im Grundwasser konnten Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu (1) *Stenotrophomonas maltophilia* und das bisher unbekannte Bakterium (2) W1-128 nachgewiesen werden.

4. Der Stamm der *Actinobacteria* wurde mit zahlreichen Isolaten ebenfalls im Aquifersediment und im Brunnenwasser nachgewiesen. Hier fand sich aber eine deutlich größere Diversität im Sediment. Im Wasser der Messstelle und im Sediment wurden Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Rhodococcus koreniensis* und (2) *Microbacterium terregens* nachgewiesen.

Im Sediment wurden Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu (1) *Curtobacterium citreum*, (2) *Nocardioides albus*, (3) *Microbacterium oxidans* und zahlreiche, bisher unbekannte Bakterien gefunden: (4) das Cluster um die Isolate K7-8 und K7-103 (5) das Cluster um die Isolate K7-111 und K7-95, (6) Isolat K7-109, (7) Isolat K7-16, (8) Isolat K7-123.

Ausschließlich im Wasser wurden folgende bisher unbekannte Bakterien gefunden: (1) das Cluster um die Isolate W1-109 und W1-64 und (2) Isolat W1-168.

5. Der Stamm der *Bacteroidetes* wurde nur im Grundwasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen. Hier fanden sich Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Taxeobacter gelupurpurascens* und das bisher unbekannte Bakterium (2) Isolat W1-114.
6. Der Stamm der *Firmicutes* wurde nur im Aquifersediment nicht aber im Grundwasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen. Die Isolate gruppierten in der Nähe von (1) *Bacillus agri* und (2) *Bacillus pseudomegaterium*.

Grundsätzlich konnte also im Aquifersediment des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst eine etwa gleich große Diversität von Mikroorganismen wie im Wasser der Grundwassermessstelle nachgewiesen werden.

Die Klassen „Alphaproteobacteria“, „Betaproteobacteria“, „Gammaproteobacteria“ und der Stamm *Actinobacteria* waren sowohl im Aquifersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle vertreten. Dagegen fanden sich Bakterien des Stammes

Firmicutes nur im Aquifersediment und Bakterien des Stammes *Bacteroidetes* nur im Grundwasser der Grundwassermessstelle.

Innerhalb des Stammes der *Actinobacteria* zeichnete sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Sedimentes insgesamt durch eine etwas größere Diversität aus. Dies Bild einer größeren Vielfalt der angehefteten Bakterien wurde dagegen nicht bei den „Alpha“- , „Beta-“, und „Gamma-Proteobacteria“ gefunden. Möglicherweise bilden sich größere Unterschiede in der Diversität beider Lebensgemeinschaften, wie im Aquifer Wankendorf gefunden, erst mit zunehmender Tiefe aus.

Beide Lebensgemeinschaften sind, bezogen auf das Vorkommen spezifischer Organismen, deutlich voneinander verschieden, zeigen aber bei einigen Gruppen interessante Überlappungen. Charakteristisch für die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Grundwassersedimentes des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst war das Vorkommen folgender **12 Organismengruppen** mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

- | | |
|------------------------------|--|
| „Alphaproteobacteria“ | (1) <i>Rhizobium huautlense</i> |
| „Betaproteobacteria“ | (2) <i>Burkholderia caryophyllii</i> |
| <i>Actinobacteria</i> | (3) <i>Curtobacterium citreum</i> , (4) <i>Nocardioides albus</i> , (5) <i>Microbacterium oxidans</i> und zahlreiche, bisher unbekannte Bakterien: (6) das Cluster um die Isolate K7-8 und K7-103 (7) das Cluster um die Isolate K7-111 und K7-95, (8) Isolat K7-109, (9) Isolat K7-16 und (10) Isolat K7-123. |
| <i>Firmicutes</i> | (11) <i>Bacillus agri</i> und (12) <i>Bacillus pseudomegaterium</i> |

In beiden Habitaten, also sowohl im Grundwassersediment als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst, waren fünf Organismengruppen verbreitet mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Alphaproteobacteria“	(1) <i>Sphingomonas suberifaciens</i>
„Gammaproteobacteria“	(2) <i>Frateriella aurantia</i>, (3) <i>Pseudomonas veronii</i> / <i>Pseudomonas gingeri</i>
<i>Actinobacteria</i>	(4) <i>Rhodococcus koreniensis</i> und (5) <i>Microbacterium terregens</i>

Um eine Vorstellung von der Heterogenität der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Sediment des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst zu erhalten, wurde zusätzlich die Diversität der Mikroorganismen in einem weiteren Sedimentkern untersucht, der aus einer anderen Tiefe gewonnen wurde. Hierfür wurde der Sedimentkern K4 (9,4 - 10,4 unter GOK) ausgewählt und in gleicher Weise wie schon der Kern K7 (13,3 - 14,3 m unter GOK) bearbeitet (Tab. 12, Abb. 32, 33). Die mikrobielle Populationsstruktur des Sedimentkerns K4 des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst, wie sie unter Verwendung der ausgewählten Methoden erfassen lässt, ist nachfolgend zusammenfassend dargestellt (Bezeichnung der Stämme nach BOONE *et al.*, 2001):

1. Im Stamm der *Proteobacteria* konnte die Klasse I der „Alphaproteobacteria“ im Kern K4 mit einer geringeren Diversität als im Kern K7 nachgewiesen werden. Wie bereits im Kern K7 wurden auch im Sedimentkern K4 Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu *Sphingomonas suberifaciens* nachgewiesen.
2. Im Stamm der *Proteobacteria* wurden Vertreter der Klasse II der „Betaproteobacteria“ im Aquifersediment K4 mit einer deutlich größeren Diversität als im Kern K7 nachgewiesen. Im Sedimentkern K4 wurden Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, die bereits im Wasser der Messstelle nicht aber im Kern K7 nachgewiesen wurden, und (2) „*Pseudomonas*“ *lanceolata* gefunden. Auffallend war jedoch das Vorkommen von bisher unbekannten Bakterien: (1) Isolate K4-428 und K4-446 und (2) Isolat K4-406.
3. Im Stamm der *Proteobacteria* wurden ebenfalls Vertreter der Klasse III der „Gammaproteobacteria“ im Aquifersediment K4 mit einer größeren Vielfalt als im

Kern K7 nachgewiesen. In beiden Sedimentkernen, wie auch schon im Brunnenwasser der Messstelle, fanden sich Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Pseudomonas veronii* und zu (2) *Frateria aurantia*. Zudem wurden im Kern K4 Bakterien mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu (1) *Stenotrophomonas maltophilia* gefunden, die wiederum bereits im Brunnenwasser (13,3 - 14,3 m unter GOK) der Grundwassermessstelle nachgewiesen werden konnten, aber im Sedimentkern K7 fehlten. Zudem wurden im Kern K4 Bakterien mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Pseudomonas lundensis*, (2) *Pseudomonas orientalis* und die bisher unbekannten Bakterien (3) Isolat K4-358, (4) K4-360 nachgewiesen.

4. Der Stamm der *Actinobacteria* wurde mit einigen Isolaten ebenfalls im Aquifersediment des Kerns K4 nachgewiesen. Hier fand sich aber eine deutlich geringere Diversität als im Sedimentkern K7. Es wurden Bakterien gefunden ebenfalls mit einer näheren Verwandtschaft zu (1) *Rhodococcus koreaniensis*, (2) *Microbacterium terregens*, (3) *Arthrobacter pascens* und darüber hinaus ein bisher unbekanntes Bakterium: (4) Cluster um Isolat K4-339.
5. Der Stamm der *Bacteroidetes* wurde im Sedimentkern K4 und im Grundwasser der Grundwassermessstelle nicht aber im Kern K7 nachgewiesen. Hier fanden sich Bakterien mit einer weiteren Verwandtschaft zu *Taxobacter gelupurpurascens*.

Grundsätzlich fanden sich also im Aquifersediment der Sedimentkerne K7 und K4 aus unterschiedlicher Tiefe des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst bei Verwendung des gleichen Kulturmediums ähnliche Organismen. Auffallend war jedoch, dass mehrere Gruppen von Mikroorganismen sowohl im Sedimentkern K4 als auch im Grundwasser der Messstelle nachgewiesen werden konnten, die jedoch nicht im Aquifersediment K7 aus gleicher Tiefe gefunden wurden. Möglicherweise spielen hier Transportprozesse von Mikroorganismen im sandigen Aquifersediment eine wichtige Rolle.

Die vergleichende Untersuchung des Sedimentkernes K4 des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst bestätigte im Wesentlichen das Bild des

Vorkommens einer etwa gleich großen Diversität von Mikroorganismen im Aquifersediment wie im Wasser der Grundwassermessstelle verbunden mit deutlichen Unterschieden beim Auftreten spezifischer Organismen und Überlappungen bei einzelnen Gruppen.

In allen drei untersuchten Habitaten, also sowohl in den Grundwassersedimenten K4 und K7 als auch im Grundwasser der Grundwassermessstelle des oberflächennahen Grundwasserleiters Segeberger Forst, waren folglich fünf Organismengruppen verbreitet mit einer näheren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Alphaproteobacteria“ (1) *Sphingomonas suberifaciens*

„Gammaproteobacteria“ (2) *Frateuria aurantia* (3) *Pseudomonas veronii* /
Pseudomonas gingeri

Actinobacteria (4) *Rhodococcus koreeniensis* und (5) *Microbacterium terregens*

Für den Aquifer Segeberger Forst könnten die Isolate dieser Gruppen, die in diesem Projekt gewonnen wurden, als **Indikatororganismen** für die mikrobielle Lebensgemeinschaft dieses anthropogen unbeeinflussten Grundwasserraumes definiert werden. Sie wären ebenfalls für ökotoxikologische Untersuchungen geeignet, da sie sowohl im Sediment als auch im freien Grundwasser verbreitet und hier einen nicht unwesentlichen Anteil an der mikrobiellen Lebensgemeinschaft bilden. Sie sind ebenfalls leicht zu kultivieren und unter Einsatz molekularbiologischer Nachweisverfahren (Nukleinsäuresonden, Fingerprinting-Techniken) vermutlich auch gut und reproduzierbar nachzuweisen.

3.6.3 Vergleich Aquifer II Wankendorf und Aquifer Segeberger Forst

Ein Vergleich der mikrobiellen Lebensgemeinschaften des in diesem Projekt untersuchten Tiefengrundwasserleiters und eines oberflächennahen Aquifers zeigt deutliche Unterschiede in der Populationsstruktur beider Grundwasserleiter. Der oberflächennahe Grundwasserleiter ist in diesem Fall charakterisiert durch das Fehlen

der Nachweisbarkeit der Gruppe *Firmicutes* im Wasser der Grundwassermessstelle, die im Brunnenwasser des Tiefengrundwasserleiters, hier aber vertreten durch völlig andere Organismen, nicht aber im Sediment gefunden wurden. Andererseits war die Gruppe der *Bacteroidetes* im Brunnenwasser des oberflächennahen Grundwasserleiter nachweisbar, während sie im Brunnenwasser des Tiefengrundwasserleiters fehlte, aber in dessen Sediment nachgewiesen werden konnte. Die Gruppe der *Proteobacteria* („Alphaproteobacteria“, „Betaproteobacteria“ und „Gammaproteobacteria“) und der *Actinobacteria* hingegen waren sowohl in der Tiefe als auch an der Oberfläche vertreten. Innerhalb dieser Gruppen waren jedoch deutlich andere Bakteriengattungen vertreten und die Populationsstruktur beider Standorte war deutlich verschieden.

Es gab nur eine Bakterienart bzw. deren nähere Verwandte, die sowohl im Tiefengrundwasserleiter als auch im oberflächennahen Grundwasserleiter nachgewiesen werden konnten. Hierbei handelt es sich um die Pseudomonaden mit einer näheren Verwandtschaft zu *Pseudomonas veronii* / *Pseudomonas gingerii* / *Pseudomonas lundensis*. *Pseudomonas veronii* wurde im Brunnenwasser und Sediment des Tiefengrundwasserleiters und im Brunnenwasser des oberflächennahen Grundwasserleiters nachgewiesen und Organismen mit einer sehr nahen Verwandtschaft zum Cluster *Pseudomonas veronii* / *Pseudomonas gingerii* und *Pseudomonas veronii* / *Pseudomonas lundensis* wurden in den Sedimentkernen K7 bzw. K4 des oberflächennahen Grundwasserleiters gefunden. Eingehendere taxonomische und physiologische Untersuchungen dieser Isolate sind allerdings zur Bestätigung notwendig. Aber die vorliegenden Ergebnisse legen eine weite Verbreitung von *Pseudomonas veronii* in anthropogen unbeeinflussten Grundwasserhabitaten nahe und nominieren diese Bakterienart als möglichen Kandidaten für einen Indikatororganismus.

4. Schlussfolgerungen

In diesem Vorhaben wurde die mikrobielle Diversität von zwei grundsätzlich sehr verschiedenen, anthropogen unbeeinflussten Grundwasserleitern einer Region (oberflächennaher Grundwasserleiter, Tiefengrundwasserleiter) untersucht und, unter

Verwendung identischer Methoden, in beiden Fällen die mikrobielle Populationsstruktur der Aquifersedimentproben mit der von Brunnenwasser des gleichen Aquifers verglichen. Hierbei wurde das jeweils untersuchte Brunnenwasser aus einer Grundwassermessstelle gewonnen, die in der gleichen Tiefe verfiltert war, aus der das untersuchte Sediment erhalten wurde. Folgende Verallgemeinerungen und Schlussfolgerungen lassen sich aus den Ergebnissen und Erfahrungen dieses Projektes ziehen:

1. Die in diesem Projekt entwickelte Drucksonde FROSTAP 35 (FUGRO, Berlin) ist für eine mikrobiologisch einwandfreie Beprobung von sandigen, oberflächennahen Grundwassersedimenten (bis zu 15 m unter GOK) geeignet.
2. Der Einsatz einer Rammkernbohrung zur Gewinnung von Aquifersedimenten für eine mikrobiologische Untersuchung ist störungsfrei nur oberflächennah einsetzbar und erfordert konsolidierte und kompaktierte Aquifersedimente.
3. Der Einsatz molekularer Methoden zur Identifizierung der Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Aquifersedimenten über die Extraktion von Gesamt-DNA ist limitiert durch die geringe bakterielle Zellzahl und die geringe Zellgröße. Dies kann nur kompensiert werden durch den Einsatz großer Sedimentvolumina von bis zu 1000 ml, die mit den in diesem Vorhaben eingesetzten Probennahmetechniken jedoch nicht gewonnen werden konnten (FROSTAP 35) oder aber nicht störungsfrei waren (Rammkernbohrung).
4. Die bisherigen Ergebnisse des Vergleiches der Populationsstrukturen der in diesem Vorhaben untersuchten Grundwasserleiter legen den Schluss nahe, dass es möglich ist, bakterielle Indikatororganismen für einen Grundwasserleiter einer spezifischen Region mit seiner spezifischen Geologie und Geochemie zu definieren, die für den anthropogen unbeeinflussten Grundzustand charakteristisch sind. Die deutlichen Unterschiede in der mikrobiellen Populationsstruktur des untersuchten Tiefengrundwasserleiters und des oberflächennahen Grundwasserleiters verdeutlichen aber, dass es bislang, basierend auf dem bisherigen Datenmaterial, nicht möglich ist, Indikatororganismen für den anthropogen unbeeinflussten

Grundzustand ganz allgemein zu definieren. Offensichtlich hat die spezifische Geologie und Geochemie des Aquifers einen wesentlichen Einfluss auf die jeweilige Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft, und die vertikale und horizontale Heterogenität des Sedimentmaterials und die Heterogenität der Nährstoffzufuhr wirken sich erheblich auf die Besiedelung durch Mikroorganismen in einem Aquifer aus.

Gleichwohl unterstützt die in der vorliegenden Untersuchung gefundene weite Verbreitung von Bakterien mit sehr naher Verwandtschaft zu *Pseudomonas veronii* sowohl in Sediment- als auch in Brunnenwasserproben eines Tiefengrundwasserleiters und eines oberflächennahen Grundwasserleiters die Möglichkeit, diesen Organismus als geeigneten Kandidaten für die Definition eines Indikatororganismus anthropogen unbeeinflusster Grundwasserleiter anzusehen. Hierzu sind aber noch zahlreiche vergleichende Untersuchungen kontaminierter Standorte und anderer Regionen unbedingt erforderlich.

5. Nach vorangegangener standortspezifischer Überprüfung lassen sich sehr wohl Überlappungen zwischen der bakteriellen Lebensgemeinschaft des freien Grundwassers und der angehefteten Lebensgemeinschaft finden. Deshalb können Brunnenwasserproben, bezogen auf diese standortspezifischen Organismengruppen, durchaus als repräsentativ für den Aquifer angesehen und diese Organismen für ökotoxikologische Untersuchungen genutzt werden, oder nach Entwicklung eines spezifischen Nachweises auch zur Überwachung eingesetzt werden.

Die in beiden Grundwasserleitern gefundene höhere Biodiversität der angehefteten lebenden Mikroorganismen bestätigt vergleichbare Untersuchungen in wassergesättigten Sedimenten. Das Auftreten bisher völlig unbekannter Organismen kann erst nach eingehender taxonomischer und physiologischer Untersuchung dieser Isolate bewertet werden.

6. Ein Vergleich der mikrobiellen Lebensgemeinschaften anthropogen unbeeinflusster Grundwasserleiter mit Lebensgemeinschaften belasteter Aquifere unter Verwendung gleicher Methoden konnte in diesem Vorhaben aus Kapazitätsgründen nicht mehr durchgeführt werden. Auch die verfügbaren Messstellen waren zur Beantwortung

dieser Fragestellung vermutlich nicht optimal. Eine Berücksichtigung anderer publizierter Untersuchungen der Populationsstruktur belasteter Aquifere jedoch zeigt deutliche Verschiebungen in der Populationsstruktur, die aber einerseits standortspezifisch sind und andererseits ganz wesentlich beeinflusst werden durch die Konzentration der jeweiligen Kontaminanten und deren hydrologischer Beweglichkeit.

Indikatororganismen zur Erkennung einer spezifischen Belastung eines Aquifers müssen (1) standortspezifisch definiert werden und sollten, wenn möglich, (2) über die Kombination mehrerer Gene (z.B. rRNA-Gene und spezifische metabolische Gene) nachgewiesen werden. Das neue Auftreten von Genen, die zum Abbau oder zur Modifizierung eines Schadstoffes genutzt werden, könnten vermutlich durchaus als Hinweis für das Verhandensein eines Schadstoffes oder einer Stoffgruppe genutzt werden. Vielversprechend sind hier zwar Nukleinsäuretechnologien, die die Expression dieser Gene *in situ* nachweisen (RNA-Technologien). Doch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten zeigen, dass es bereits sehr schwierig ist, ausreichend DNA aus dem gewonnenen Sedimentmaterial zu extrahieren. Die Veränderungen der spezifischen zellulären RNA, die beim Schadstoffabbau oder Schadstoffumbau eintreten, werden vermutlich jedoch quantitativ nicht ausreichen, um sie mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden nachzuweisen.

7. Aufgrund der Probleme bei der Isolierung von Gesamt-DNA aus der gewonnenen Menge Sedimentmaterial war es nicht möglich, die bisher nichtkultivierbaren Mikroorganismen zu charakterisieren. Deshalb ist das in dieser Arbeit entworfene Bild von der mikrobiellen Populationsstruktur natürlich unvollständig. Zudem bedingt die Verwendung eines bestimmten Mediums und die ausschließliche Konzentration auf aerobe Mikroorganismen eine weitere Einschränkung.

5. Literatur

- 1) **Amann, R., F.-O. Glöckner, and A. Neef.** 1997. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:191-200.
- 2) **Amy, P. S., and D. L. Haldeman.** 1997. *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface.* Lewis Publishers, Boca Raton. 356 p.
- 3) **Anderson, R. T., F. H. Chapelle, and D. R. Lovley.** 1998. Evidence Against Hydrogen-Based Microbial Ecosystems in Basalt Aquifers. *Science.* **281**: 978-980.
- 4) **Balkwill, D. L., and W. C. Ghiorse.** 1986. *In situ* characterization of microorganisms indigenous to water-table aquifers. *Proc. 6th JSEB, Sta Fe.* 399-408.
- 5) **Berthelet, M., L. Whyte, and C. Greer.** 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**:17-22.
- 6) **Boone, D. R., R. W. Castenholz, and G. M. Garrity.** 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I, Second Edition.* Springer-Verlag, New York. 721 p.
- 7) **Braker, G.** 1999. Studies on the structure and function of denitrifying bacterial communities in natural aquatic habitats. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel. 105 S.
- 8) **Bruns, M. A., and D. H. Buckley.** 2002. Isolation and Purification of Microbial Community Nucleic Acids from Environmental Samples, pp. 564-572. *In* C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology.* ASM Press, Washington.
- 9) **Chandler, D. P., and F. J. Brockman.** 2001. Nucleic acid analysis of subsurface microbial communities: pitfalls, possibilities, and biogeochemical implications, pp. 281-313. *In* J. K. Fredrickson, and M. Fletcher (eds.), *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry.* Wiley & Sons, New York.
- 10) **Chapelle, F. H.** 1993. *Groundwater Microbiology and Geochemistry.* John Wiley and Sons, New York, NY.
- 11) **Coates, J. D., and L. A. Achenbach.** 2002. The Biogeochemistry of Aquifer Systems, pp. 719-727. *In* C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology.* ASM Press, Washington.
- 12) **Cullimore, D. R.** 1993. *Practical Manual of Groundwater Microbiology.* Lewis Publishers, Boca Raton. 412 p.
- 13) **Dunbar, J., S. Takala, S. M. Barns, J. A. Davis, and C. R. Kuske.** 1999. Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4162-4167.
- 14) **DVGW-Schriftenreihe.** 1983. Forum Mikroorganismen und Viren in Grundwasserleitern, München 1983. ZfGW-Verlag GmbH, Frankfurt/Main. Wasser **35**, 176 S.
- 15) **DVWK Schriften.** 1988. Bedeutung biologischer Vorgänge für die Beschaffenheit des Grundwassers. Verlag Paul Parey, Hamburg. **80**, 322 S.
- 16) **Fredrickson, J. K., and M. Fletcher.** 2001. *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry,* Wiley & Sons, New York. 341 p.
- 17) **Fredrickson, J. K., and T. C. Onstott.** 1996. Microbes deep inside the earth. *Sci. Am.* **275**:68.
- 18) **Fredrickson, J. K., and T. C. Onstott.** 2001. Biogeochemical and geological significance of subsurface microbiology, pp. 3-37. *In* J. K. Fredrickson, and M. Fletcher (eds.), *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry.* Wiley & Sons, New York.
- 19) **Ghiorse, W. C.** 1996. Subterranean life. *Science* **275**:789-790.
- 20) **Ghiorse, W. C., and D. L. Balkwill.** 1983. Enumeration and morphological characterization of bacteria indigenous to subsurface environments. *Dev. Ind. Microbiol.* **24**:213-224.
- 21) **Ghiorse, W. C., and J. T. Wilson.** 1988. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Adv. Appl. Microbiol.* **33**:107-172.
- 22) **Ghiorse, W. C., and F. J. Wobber.** 1989. Introductory comments. *Geomicrobiol. J.* **7**:1-2.
- 23) **Gibert, J., D. L. Danielopol, and J. A. Stanford.** 1994. *Groundwater Ecology.* Academic Press, San Diego. 571 p.

- 24) **Gliesche, C. G.** 1996. Mikrobielle Ökologie im Grundwasser-Bereich, pp. 21-34. In B. Weigert (ed.), *Mikrobiologie des Grund- und Trinkwassers*, Schriftenreihe Wasserforschung, Band 1. Interdisziplinärer Forschungsverbund Wasserforschung, Berlin.
- 25) **Gliesche, C. G.**, 1999. Die Mikrobiologie des Grundwasserraumes und der Einfluß anthropogener Veränderungen auf die mikrobiellen Lebensgemeinschaften (Ökologische Belastungsgrenzen Grundwasser). Forschungsbericht, Hrsg. Umweltbundesamt Berlin, 102 S.
- 26) **Gliesche, C. G., M. Menzel, and A. Fesefeldt.** 1997. A rapid method for creating species-specific gene probes for methylotrophic bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **28**:25-34.
- 27) **Gold, T.** 1992. The deep hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:6045-6049.
- 28) **Gounot, A. M.** 1991. Écologie microbienne des eaux et sédiments souterrains. *Hydrogéologie* **3**:239-248.
- 29) **Grasshoff, K., M. Ehrhardt, and K. Kremling.** 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim. 419 S.
- 30) **Griebler, C. und F. Mösslacher.** 2003. *Grundwasserökologie. Eine Einführung*. UTB, Stuttgart. Ca. 495 S.
- 31) **Griebler, C., D. L. Danielopol, J. Gibert, H. P. Nachtnebel, and J. Notenboom.** 2001. *Groundwater ecology. A tool for management of water resources*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 413 p.
- 32) **Griffith, R., A. Whiteley, and A. O'Donnell.** (2000): Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and RNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5488-5491.
- 33) **Grossman, E. L.** 2002. Stable Carbon Isotopes as Indicators of Microbial Activity in Aquifers, pp. 728-742. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 34) **Harvey, R. W., and H. Harms.** 2002. Transport of Microorganisms in the Terrestrial Subsurface: In Situ and Laboratory Methods, pp. 753-776. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 35) **Harvey, R. W., J. M. Suflita, and M. J. McInerney.** 2002. Overview of Issues in Subsurface and Landfill Microbiology, pp. 675-678. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 36) **Hilger, H. H., and M. A. Barlaz.** 2002. Anaerobic Decomposition of Refuse in Landfills and Methane Oxidation in Landfill Cover Soils, pp. 696-718. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 37) **Hirsch, P.** 1992a. 5.0 Introduction, pp. 308-311. In G. Matthess, F. Frimmel, P. Hirsch, H.C. Schulz, and H.-E. Usdowsky (eds.), *Progress in Hydrogeochemistry*. Springer, New York.
- 38) **Hirsch, P.** 1992b. 5.2.1 Observations on the physiology of microorganisms from pristine ground water environments, pp. 344-347. In G. Matthess, F. Frimmel, P. Hirsch, H.C. Schulz, and H.-E. Usdowsky (eds.), *Progress in Hydrogeochemistry*. Springer, New York.
- 39) **Hirsch, P., and E. Rades-Rohkohl.** 1983a. Microbial diversity in a groundwater aquifer in northern Germany. *Dev. Ind. Microbiol.* **24**:183-200.
- 40) **Hirsch, P., and E. Rades-Rohkohl.** 1983b. Die Zusammensetzung der natürlichen Grundwasser-Mikroflora und Untersuchungen über ihre Wechselbeziehungen mit Fäkalbakterien. *DVWG Schriftenreihe Wasser* **35**:59-80.
- 41) **Hirsch, P., and E. Rades-Rohkohl.** 1988a. Die Vielfalt mikrobieller Morphotypen im Grundwasserbereich des Segeberger Forstes. *Z. Dt. Geol. Ges.* **139**:343-353.
- 42) **Hirsch, P., and E. Rades-Rohkohl.** 1988b. Some special problems in the determination of viable counts of groundwater microorganisms. *Microb. Ecol.* **16**:99-113.
- 43) **Hirsch, P., and E. Rades-Rohkohl.** 1990. Microbial colonization of aquifer sediment exposed in a groundwater well in northern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2963-2966.

- 44) **Hirsch, P., and E. Rades-Rohkohl.** 1992. 5.3.3 The natural microflora of the Segeberger Forst aquifer system, pp. 390-412. *In* G. Matthes, F. Frimmel, P. Hirsch, H. C. Schulz, and H.-E. Usdowsky (eds.), *Progress in Hydrogeochemistry*. Springer, New York.
- 45) **Hirsch, P., E. Rades-Rohkohl, J. Kölbel-Boelke, and A. Nehrkorn.** 1992a. 5.1.1 Morphological and taxonomic diversity of ground water microorganisms, pp. 311-325. *In* G. Matthes, F. Frimmel, P. Hirsch, H.C. Schulz, and H.-E. Usdowsky (eds.), *Progress in Hydrogeochemistry*. Springer, New York.
- 46) **Hirsch, P., E. Rades-Rohkohl, J. Kölbel-Boelke, A. Nehrkorn, R. Schweisfurth, F. Selenka, and A. Hack.** 1992b. 5.1.2 Methods of studying ground water microbiology: critical evaluation and method suggestions, pp. 325-333. *In* G. Matthes, F. Frimmel, P. Hirsch, H. C. Schulz, and H.-E. Usdowsky (eds.), *Progress in Hydrogeochemistry*. Springer, New York.
- 47) **Hurt, R. A., X. Qiu, I. Wu, Y. Roh, A. V. Palumbo, J. M. Tiedje, and J. Zhou.** 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4495-4503.
- 48) **Hurst, C. J.** 2002. Estimating the Risk of Infectious Disease Associated with Pathogens in Drinking Water, pp. 309-319. *In* C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 49) **Kieft, T. L., and F. J. Brockman.** 2001. Vadose zone microbiology., pp. 141-169. *In* Fredrickson, J. K., and M. Fletcher (eds.), *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry*. Wiley & Sons, New York.
- 50) **Kramer, J., and F. Singleton.** 1993. Measurement of rRNA variations in natural communities of microorganisms on the Southeastern U.S. Continental Shelf. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2430-2436.
- 51) **Kuhlmann, B. und G. Preuß.** 2000. Anwendung molekularbiologischer Verfahren in der Grund- und Trinkwasseranalytik. Fachgespräche zur Wasserforschung. Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung **60**, 113 S.
- 52) **Liu, W.-T., and D. A. Stahl.** 2002. Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity, and Phylogeny, pp.114-134. *In* C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 53) **Lovley, D. R., and F. H. Chapelle.** 1995. Deep subsurface microbial processes. *Rev. Geophysics* **33**:365-381.
- 54) **Madsen, E. L.** 1995. Impacts of agricultural practices on subsurface microbial ecology. *Adv. Agron.* **54**:1-67.
- 55) **Madsen, E. L., and W. C. Ghiorse.** 1993. Groundwater microbiology: subsurface ecosystem processes, pp. 167-213. *In* T. Ford (ed.), *Aquatic Microbiology*. Blackwell Scientific Publ., Boston, MA.
- 56) **Margolin, A. B.** 2002. Control of Microorganisms in Source Water and Drinking Water, pp. 277-284. *In* C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 57) **Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J. Germon, G. Soulas, and G. Catroux.** 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2345-2359.
- 58) **Matthes, G., F. Frimmel, P. Hirsch, H. D. Schulz, and H.-E. Usdowski.** 1992. *Progress in Hydrogeochemistry. Organics – Carbonate Systems – Silicate Systems – Microbiology – Models*. Springer-Verlag, Berlin. 544 p.
- 59) **McInerney, M. J., and K. L. Sublette.** 2002. Oil Field Microbiology, pp. 777-787. *In* C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 60) **Mendum, T., E. Sockett, and P. Hirsch.** 1998. The detection of Gram-negative bacterial mRNA from soil by RT-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**:369-373.
- 61) **Miller, D. N., J. E. Bryant, E. L. Madsen, and W. C. Ghiorse.** 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4715-4724.

- 62) **Miskin, P., P. Farrimond, and I. Head.** 1999. Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. *Microbiol.* **145**:1977-1987.
- 63) **Möbus, G.** 1991. Geologische Grundlagen für eine erweiterte Nutzung und für eine Neuerschließung von Grundwasservorkommen im Pleistozän der Insel Hiddensee. 54 S.
- 64) **Moran, M., V. Torsvik, T. Torsvik, and R. Hodson.** 1993. Direct extraktion and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:915-918.
- 65) **Ogram, A., and K. Sharma.** 2002. Methods of Soil Microbial Community Analysis, pp.554-563. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 66) **Pedersen, K.** 1993. The deep subterranean biosphere. *Earth-Science Rev.* **34**:243-260.
- 67) **Phelps, T. J., and J. K. Fredrickson.** 2002. Drilling, Coring, and Sampling Subsurface Environments, pp. 679-695. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 68) **Piotrowski, J. A.** 1991. Quartär- und hydrogeologische Untersuchungen im Bereich der Bornhöveder Seenkette, Schleswig-Holstein. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel. 194 S.
- 69) **Purdy, K., T. Embley, S. Takii, and D. Nedwell.** 1996. Rapid Extraction of DNA and RNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3905-3907.
- 70) **Riemer, R.** 1983. Untersuchungen zum Transportverhalten von Bakterien in sandigen und kiesigen Filtermedien. Dissertation, Universität Kiel. 147 S.
- 71) **Sambrook, J. E., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 72) **Sambrook, J. E., F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 73) **Schaefer III, F. W.** 2002. Detection of Protozoan Parasites in Source and Finished Drinking Waters, pp. 220-233. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 74) **Schalla S.** 2001. Molekularbiologische Charakterisierung von Mikroorganismen anthropogen unbeeinflusster und kontaminierter aquatischer Ökosysteme. Diplomarbeit der Universität Greifswald, 84 S.
- 75) **Schlesner, H.** 1994. The development of media suitable for the microorganisms morphology resembling Planctomycetales from various aquatic habitats using dilute media. *System. Appl. Microbiol.* **17**:135-145.
- 76) **Schöttler, U. und G. Preuß.** 1997. Charakterisierung und Klassifizierung des mikrobiologischen Zustandes von Grundwässern und Grundwasserleitern. DFG-Fachgespräch 26.-27.11.1996 in Bonn. Institut für Wasserforschung, Schwerte. 121 S.
- 77) **Smith, R. L.** 2002. Determining the Terminal Electron-Accepting Reaction in the Saturated Subsurface, pp. 743-752. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 78) **Stach, J., S. Bathe, J. Clapp, and R. Burns.** 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**:139-151.
- 79) **Stevens, T. O.** 1997. Lithoautotrophy in the subsurface. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:327-337.
- 80) **Toranzos, G. A., G. A. McFeters, and J. J. Borrego.** 2002. Detection of Microorganisms in Environmental Freshwaters and Drinking Waters, pp. 205-219. In C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 81) **Weigert, B.** 1996. Mikrobiologie des Grund- und Trinkwassers. Workshop der Fachgruppe Wasser/Abwasser der VAAM an der TU Berlin, 12. bis 13. Oktober 1995. Schriftenreihe Wasserforschung 1. Papyrus-Druck, Berlin. 242 S.
- 82) **Weinbauer, M., I. Fritz, D. F. Wenderoth, and M. G. Höfle.** 2002. Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1082-1087.

- 83) **Yates, M. V.** 2002. Placement of Drinking Water Wells and Their Protection, pp. 788-797. *In* C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington.
- 84) **Yeates, C., M. R. Gillings, A. D. Davison, N. Altavilla, D. A. Veal.** 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online* 1: 40-47 <http://129.100.142.116/arts/1/6/m6abst.htm>.
- 85) **Zhou, J., M. A. Bruns and J. M. Tiedje** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:316-322.

6. Danksagung

Diese Studie wurde im Auftrag des Umweltbundesamtes im Rahmen des Umweltforschungsplanes Förderungskennzeichen FKZ 299 23 276 erstellt und mit Bundesmitteln finanziert.

Folgende Personen haben zum Erfolg des Projektes wesentlich beigetragen:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Ingolf Stodian, der ganz wesentlich die Entwicklung, Planung, Organisation und die Leitung der Probennahmen gestaltete. Zudem danke ich ihm für Teile der experimentellen Arbeiten und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieses Manuskriptes.

Frau Dr. rer. nat. Dagmar Thiele-Gliesche danke ich für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten.

Herrn Dr. rer. nat. Rüdiger Stöhr danke ich für die Unterstützung bei der phylogenetischen Analyse der Sequenzdaten.

Herrn Dipl.-Biol. Sven Schalla und Herrn Dipl.-Biol. Stefan Bock danke ich für die Durchführung von Teilen der experimentellen Arbeiten.

Frau Angelika Spengler und Frau Kathrin Bünger danke ich für die technische Unterstützung der praktischen Arbeiten.

Den Firmen Schwedter Brunnenbau und Umwelttechnik GmbH und FUGRO Consulting GmbH (Berlin) gilt ein besonderer Dank für die geologisch und mikrobiologisch einwandfreie Durchführung der Probennahmen. Der Firma FUGRO Consulting GmbH (Berlin) wird zudem für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Entwicklung und Erprobung des Systems FROSTAP 35 gedankt. Der Firma SEQLAB (Göttingen) danke ich für die Durchführung der Sequenzierungsarbeiten.

Herrn PD Dr. rer. nat. Traugott Scheytt (TU Berlin) wird besonders für die Nutzung von technischen Geräten gedankt, die für die Durchführung der Probenentnahmen notwendig waren, aber in diesem Projekt nicht gekauft werden konnten. Außerdem führte er im Rahmen dieser äußerst konstruktiven Zusammenarbeit die Analyse der zu bestimmenden Randparameter durch.

Ich danke allen Behördenvertretern, Ämtern und betroffenen Grundstückseigentümern für die großzügige Unterstützung dieses Vorhabens.

Frau Dr. Marion Köster und Frau stud. rer. nat. Jana Dietrich (Institut für Ökologie, EMAU Greifswald) danke ich für die Unterstützung bei den Fluoreszenzfärbungen und deren Dokumentation.

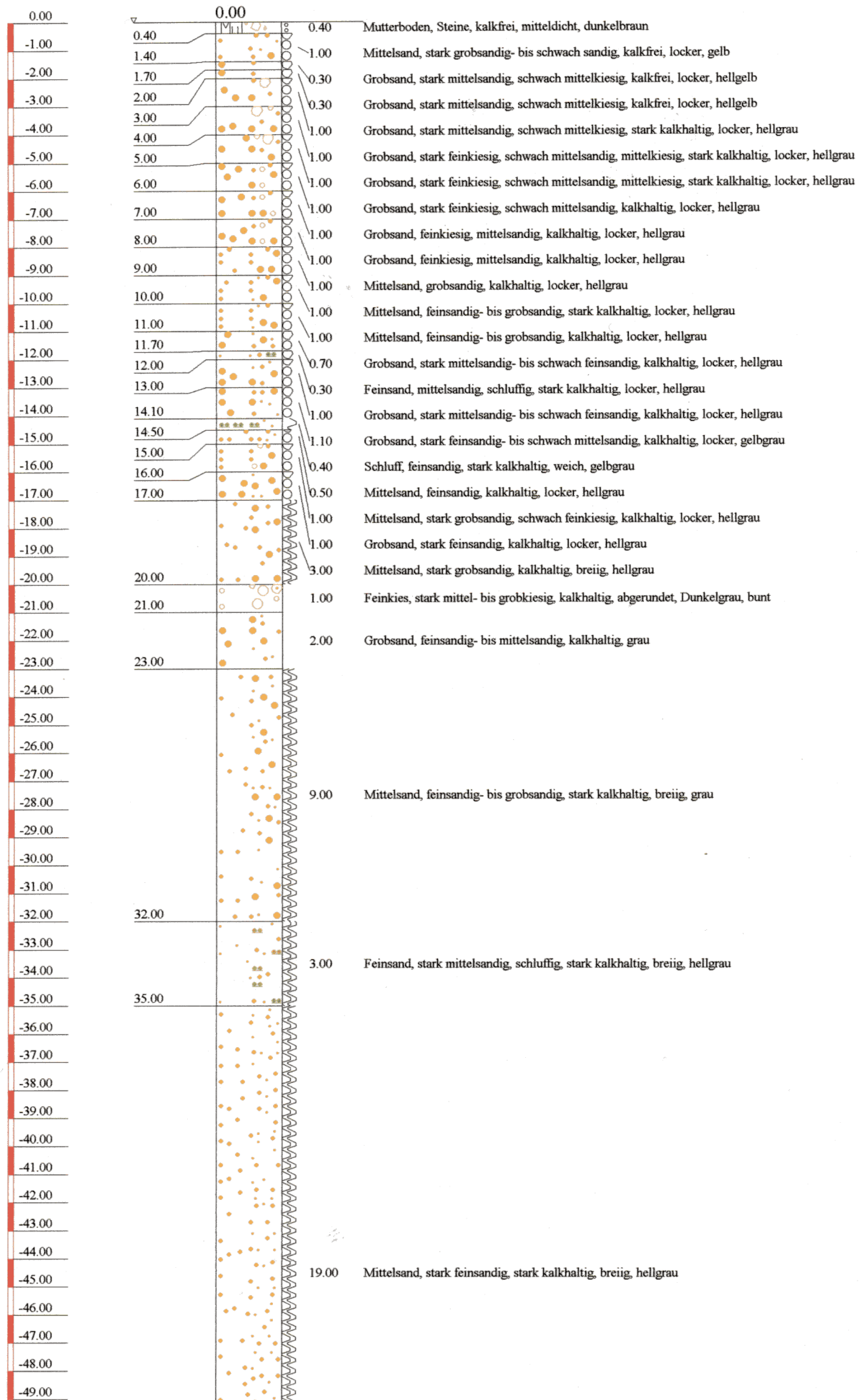
Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Ökologie. Ihre große Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre am Institut haben mir die Arbeit sehr erleichtert. Besonders sei hier Herrn Dr. rer. nat. Sven Dahlke für die Hilfe bei jeglichen Computerproblemen und deren schneller Lösung gedankt. Frau Erika Podschun danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und die Erstellung des Literaturverzeichnisses. Dem Umweltbundesamt Berlin (Abteilung Wasser) danke ich für die Gewährung dieses Forschungsvorhabens. Insbesondere aber möchte ich Frau Dr. Carola Hoffmann und Frau Ellen Six für die Unterstützung und Begleitung dieser Studie und die Geduld bei der Auswertung der Daten danken.

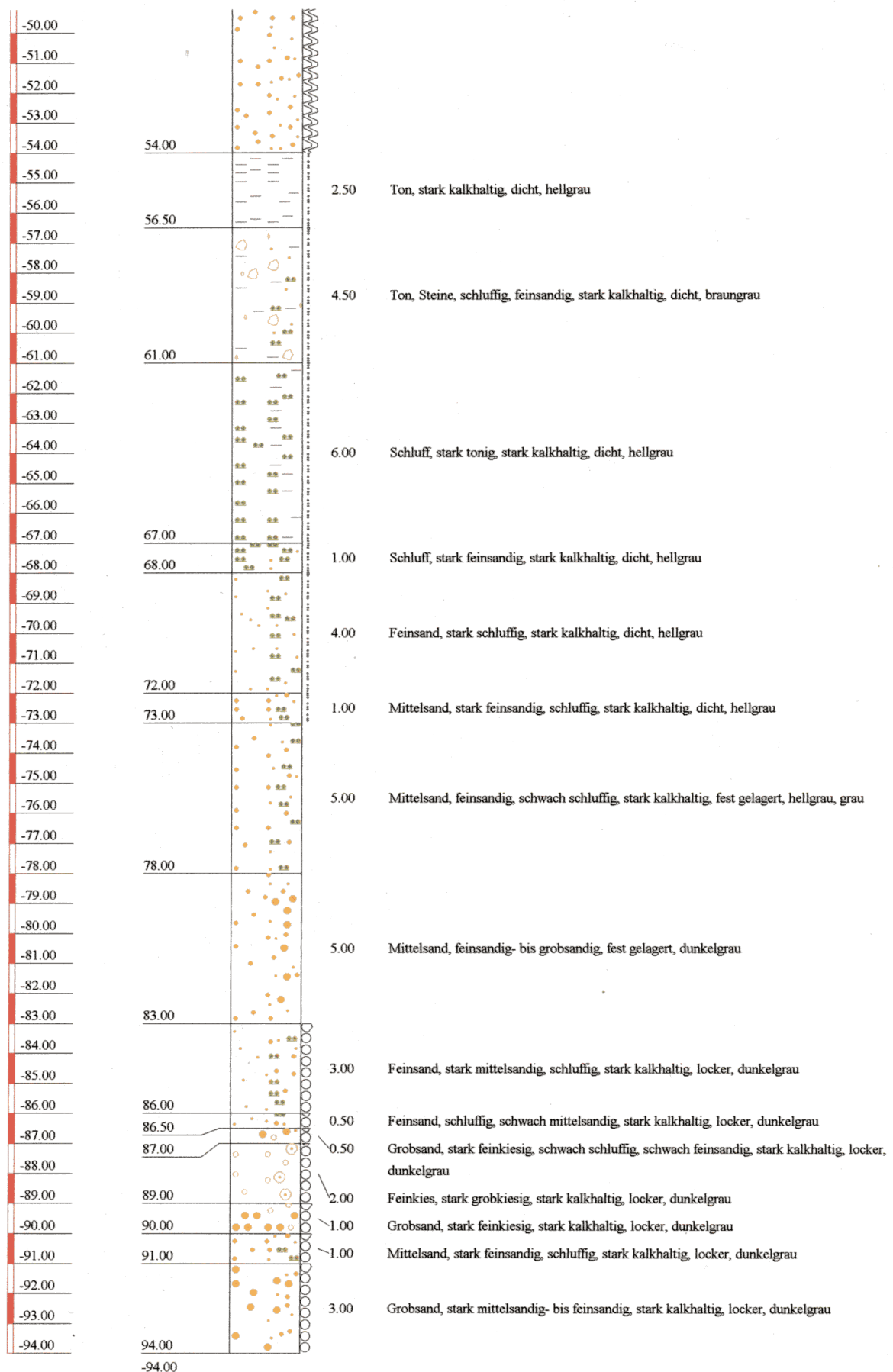
Anhang 1

Detailliertes Schichtenverzeichnis der Bohrung in Wankendorf

Pegel / Wankendorf

NN+m





**Schwedter Brunnenbau &
Umwelttechnik GmbH**

16303 Schwedt/O.
Berliner Allee 1
Tel. 03332/22044

Bauvorhaben:
Wankendorf
Pegel / Universität Greifswald

Planbezeichnung:

Plan-Nr:

Projekt-Nr: 1237

Datum: 14.4.2000

Maßstab: 1:250

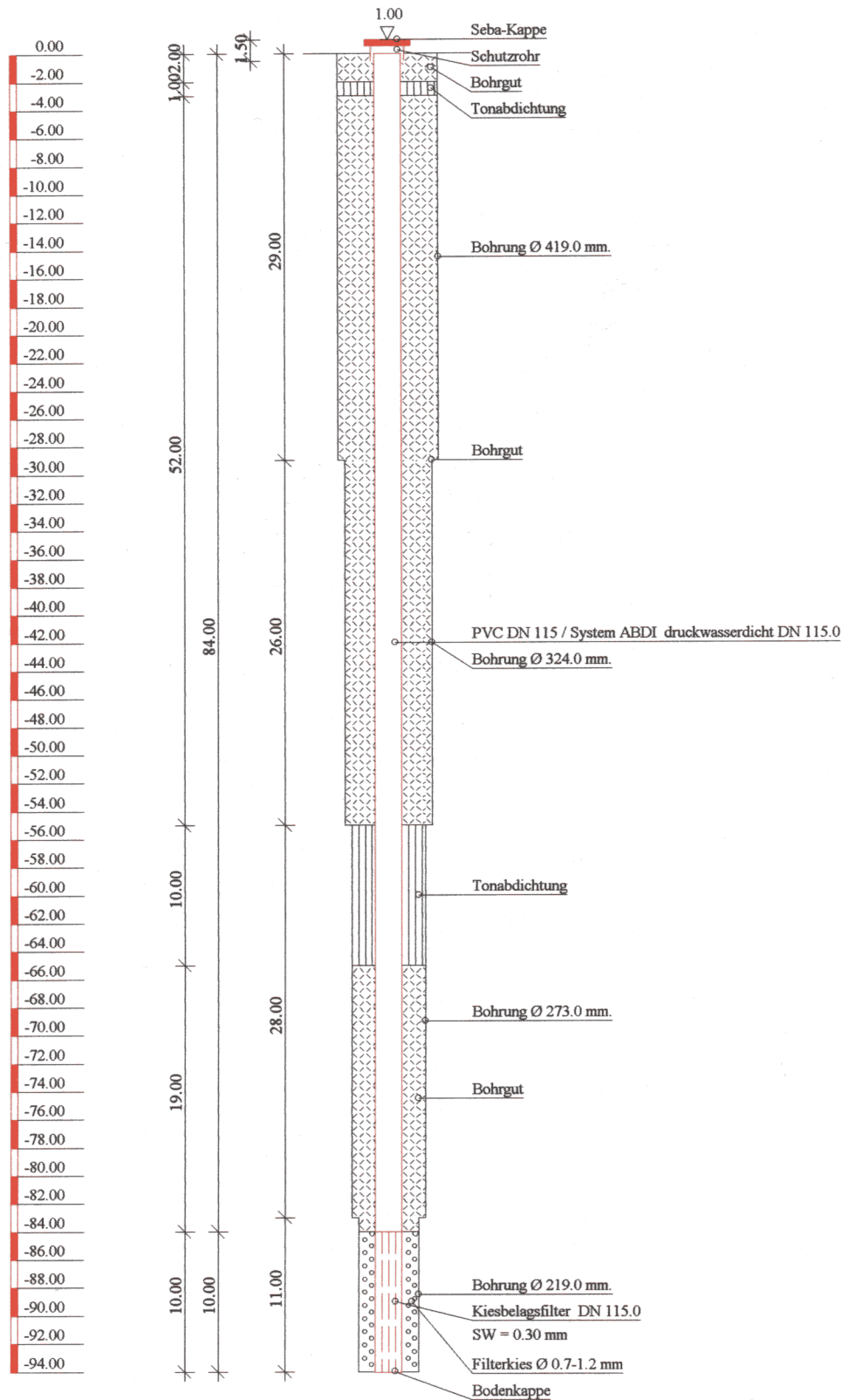
Bearbeiter: H.Bartelt

Anhang 2

Ausbauskizze der Grundwassermessstelle in Wankendorf

Pegel / Wankendorf

NN+m



Schwedter Brunnenbau &

Umwelttechnik GmbH

16303 Schwedt/O.
Berliner Allee 1
Tel. 03332/22044

Bauvorhaben:

Wankendorf
Pegel / Universität Greifswald

Planbezeichnung:

Plan-Nr:

Projekt-Nr: 1237

Datum: 13.4.2000

Maßstab: 1:500

Bearbeiter: H.Bartelt

Anhang 3

Abschlußbericht der Firma FUGRO CONSULT GmbH

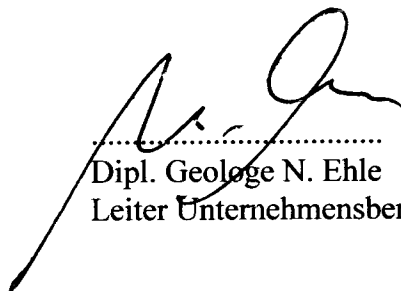
Technischer Bericht
Drucksondierung im Objekt Bad Segeberg
und Sonderprobenahme mit FROSTAP-System

Auftraggeber: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Ökologie
Prof. Dr. Christian Gliesche

Auftragnehmer: FUGRO CONSULT GMBH
Unternehmensbereich Geotechnik
Wolfener Straße 36 K
12681 Berlin

Tel.: 030 93651 351
Fax : 030 93651 350
e-mail : n.ehle@fugro.de

Bearbeiter:

A handwritten signature in black ink, appearing to be "N. Ehle", written over a dotted line.

Dipl. Geologe N. Ehle
Leiter Unternehmensbereich Geotechnik

Ort, Datum: Berlin, den 26.10.01

Inhaltsverzeichnis

Anlagenverzeichnis	2
1. VERANLASSUNG	3
2. DURCHGEFÜHRTE UNTERSUCHUNGEN	3
2.1 Kurzcharakteristik der eingesetzten Verfahren	3
Die Porenwasserdrucksonde	4
FROSTAP Bodenprobenahmegerät	5
2..2 Durchführung der Arbeiten	6
3.0 ERGEBNISSE	7

Anlagenverzeichnis

Anlage 1	Tagesbericht und Aufmaß
Anlage 2	Feldprotokolle CPT und FROSTAP-Probenahme
Anlage 3	CPT-Ergebnisse mit lithologischer Interpretation
Anlage 4	Meßstellenausbau

1. Veranlassung

Das Institut für Ökologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Prof. Dr. Christian Gliesche, beauftragte die FUGRO CONSULT GMBH am 05.04.2001 mit der Erstellung einer Grundwassermeßstelle sowie der Sonderprobenahme mit Drucksondiertechnik zur Gewinnung von 9 lfd. m Probematerial aus der gesättigten Zone des oberflächennahen Grundwasserleiters entsprechend dem Angebot 511116 vom 05. April 2001.

2. Durchgeführte Untersuchungen

2.1 Kurzcharakteristik der eingesetzten Verfahren

FUGRO CONSULT GMBH hat die Feldarbeiten mit der elektrischen Drucksonde durchgeführt. Die elektrische Drucksonde ist ein mobiles Gerät zur Untergrunderkundung in Lockersedimenten. Beim Drucksondiervorgang wird eine Meßsonde oder ein Probenahmewerkzeug mit einer Geschwindigkeit von bis zu 2 cm/sec und einer Druckkraft von max. 200 kN hydraulisch in den Untergrund gedrückt. Die erforderliche Reaktionskraft wird durch das Eigengewicht des Sondierfahrzeuges aufgebracht. Die von der Sonde gemessenen Daten werden elektrisch über im Hohlgestänge gezogene Kabel zu Datenaufnehmern im Sondiergerät übertragen, dort auf einem Bildschirm dargestellt und digital gespeichert. Zur Messung der Untergrunddaten stehen verschiedene Sonden zur Verfügung. Im vorliegenden Fall kamen die **Porenwasserdrucksonde** F7.5CKEW2 und der Bodenprobenehmer **FROSTAP** zum Einsatz.

Die Porenwasserdrucksonde

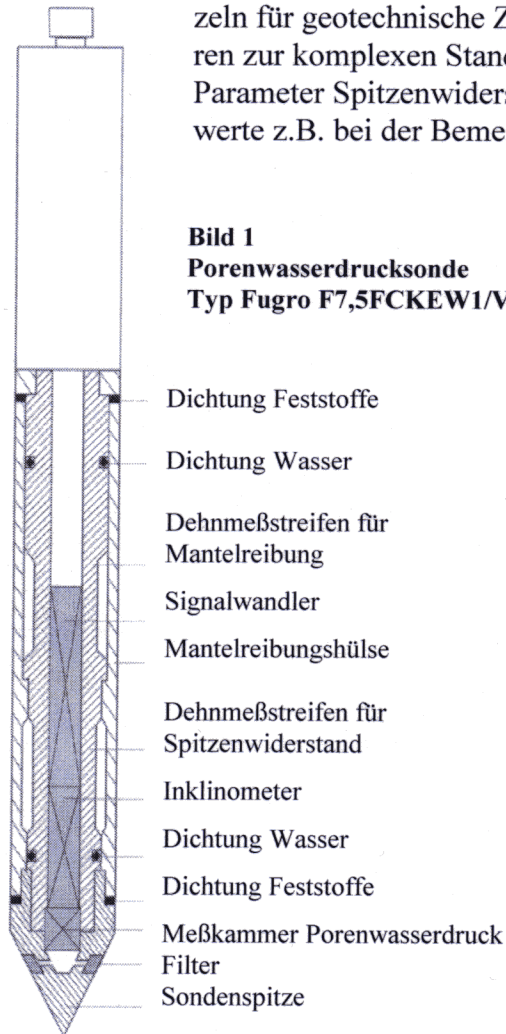


Bild 1
Porenwasserdrucksonde
Typ Fugro F7,5FCKEW1/V

Bild 1 zeigt einen Schnitt durch die Porenwasserdrucksonde, die sowohl einzeln für geotechnische Zielstellungen oder in Kombination mit anderen Sensoren zur komplexen Standortuntersuchung eingesetzt wird. Die gemessenen Parameter Spitzenwiderstand und Mantelreibung gehen direkt als Rechenwerte z.B. bei der Bemessung von Pfahlgründungen ein, ebenso können Bodenart, Zustandsform und weitere Rechenwerte (Reibungswinkel) daraus abgeleitet werden. Für die Standortuntersuchung ist wichtig, daß aus dem Reibungsverhältnis sicher Sande, Schluffe, Tone und organische Ablagerungen unterschieden werden können. Ist am Standort ein Direktaufschluß vorhanden, kann diese lithologische Grobgliederung weiter verfeinert werden, so daß die Schichtenfolge über das gesamte Untersuchungsgebiet mit hoher Genauigkeit (Tiefenauflösung 5 cm) verfolgt und objektiv belegt werden kann. Gegenüber der Standardsonde ist die Porenwasserdrucksonde in der Spitze zusätzlich mit einer Druckmeßkammer ausgerüstet, die über einen Filterring mit der Umgebung verbunden ist. Änderungen des Porenwasserdruckes während des Sondierens werden in elektrische Signale umgewandelt und als Diagramm des dynamischen Porenwasserdruckes aufgezeichnet, der je nach Durchlässigkeit der Bodenschichten mehr oder weniger stark vom hydrostatischen Druck abweicht und damit Zusatzinformation über die durchteuften Bodenarten und die genaue Lage von Schichtgrenzen liefert. Der hydrostatische Druck kann durch

einen Dissipationstest (Messung während der Abklingzeit bis zum Ruhezustand) bei Stillstand der Sonde bestimmt werden. Mit der Porenwasserdrucksonde können folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

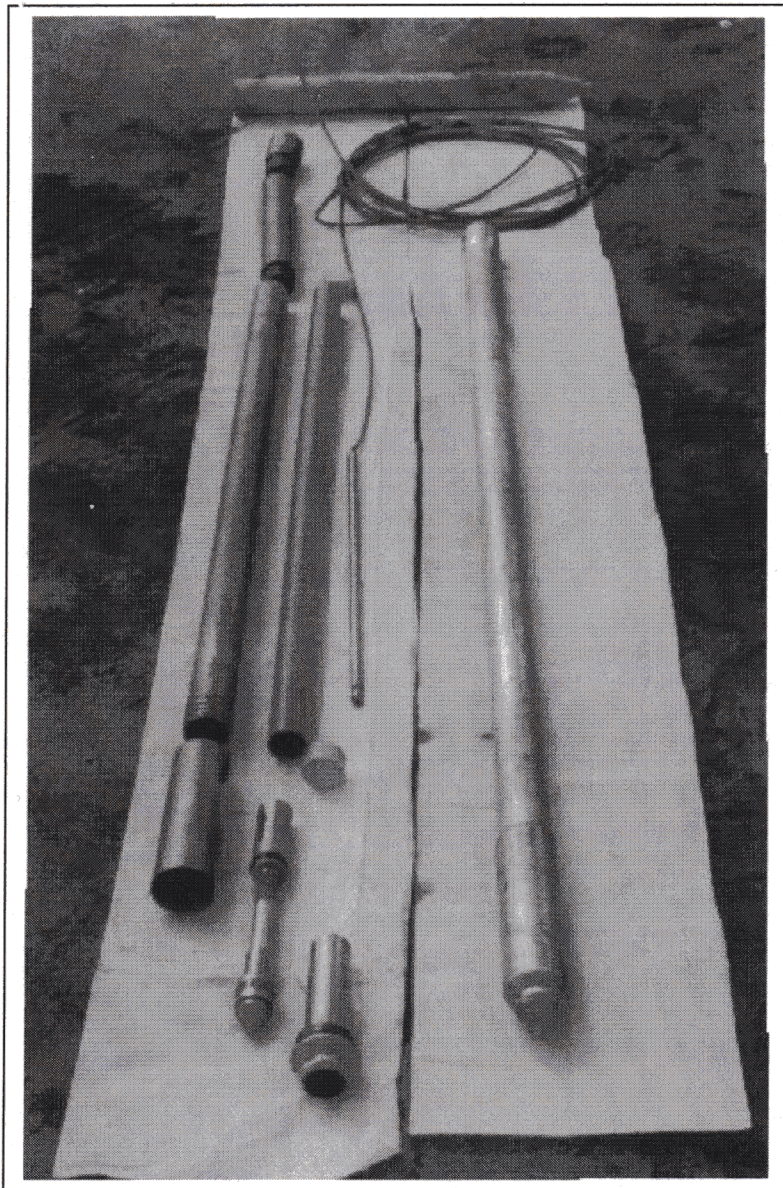
- Lokalisierung von Schichtgrenzen und dünnen Zwischenlagen hydraulischer Hindernisse
- Lokalisierung der Grundwasserdruckfläche und Klärung der Druckverhältnisse in verschiedenen Grundwasserleitern
- Abschätzung des Durchlässigkeitsbeiwertes (kf-Wert) in bindigen Schichten.

Bei der komplexen Standortuntersuchung werden andere Sonden mit der Standardsonde oder der Porenwasserdrucksonde kombiniert, um die jeweils gemessenen Parameter unmittelbar dem geologischen Schichtenaufbau zuordnen zu können.

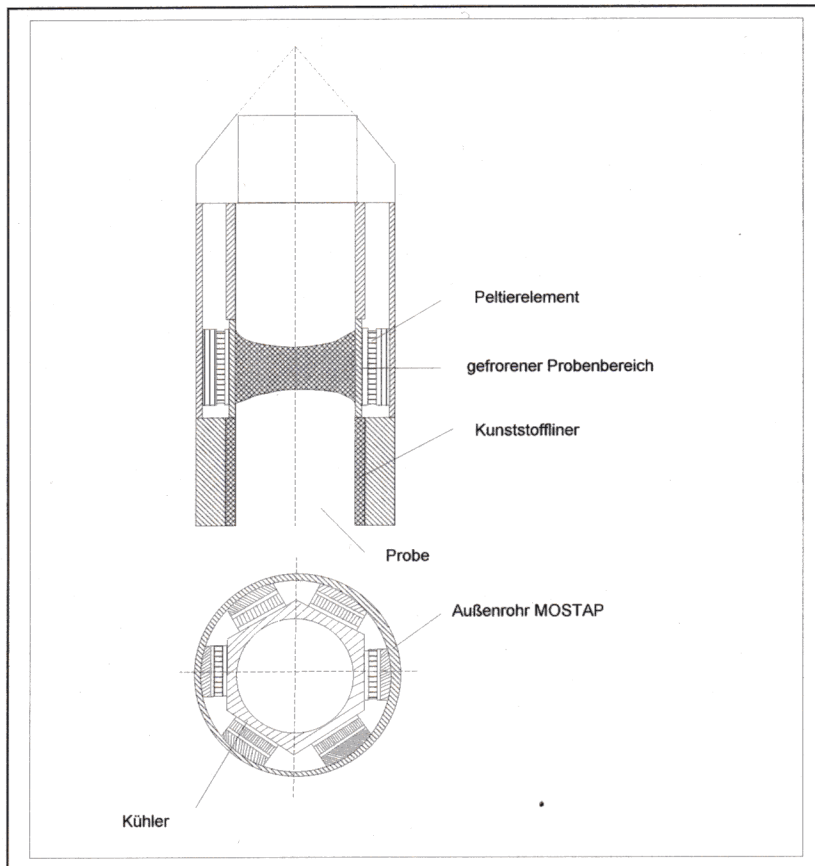
FROSTAP Bodenprobenahmegerät

Das FROSTAP-Bodenprobenahmegerät basiert auf dem MOSTAP®-System (Siehe Bild 2) der

Firma A.P. van den Berg, das zur Gewinnung von unverfälscht horizontgerechten 35 mm Linerproben im Drucksondierv erfahren entwickelt wurde. Es besteht im wesentlichen aus einem verschließbaren Schneidmund und einem Kernrohr mit Innenliner, zwischen denen ein Aufnahmemagazin für einen Reibungsminderer (Nylonstrumpf) angeordnet ist. Das MOSTAP® wird mit der Drucksonde geschlossen durch die Deckschichten bis zum Hangenden des Zielhorizontes geführt und erst dort geöffnet, indem die Sondenspitze mit einem Seilzug entriegelt und mit dem Probenehmer überfahren wird. Diese Verfahrensweise verhindert, daß Material aus den überlagernden Schichten in die Probe gelangt. Die Bodenprobe wird beim weiteren Eindrücken der Sonde bis zur Unterkante des Zielhorizontes in einem Nylonstrumpf als Reibungsminderer in einen Plasteliner gepreßt. Nach dem Ausbau des Probenehmers



wird der Plasteliner an der Oberfläche entnommen und wasser- und gasdicht versiegelt, so daß auch flüssige und flüchtige Komponenten bis zur Laboruntersuchung bewahrt bleiben.



Von FUGRO wurde das MOSTAP®-System mit Peltierelementen zwischen Schneidmund und Liner ergänzt. Nach der Aufnahme der Bodenprobe in den Liner wird damit die Spitze des Probennehmers eingefroren (siehe Bild 3). Der Eispfropfen schließt die Bodenprobe nach unten dicht ab. Eine FROSTAP-Probe enthält also ungetrennt und tiefengerecht die flüssige und die feste Phase aus dem Probenahmehorizont. Das FROSTAP-System wurde für das vorliegende Projekt aus der ursprünglichen Version weiterentwickelt um den spezifischen Anforderungen zu

entsprechen. Insbesondere wurden

- die elektrischen Bestandteile gekapselt, so daß das Gesamtsystem sterilisiert werden kann,
- die Stromzuführung konstruktiv geändert, um auch während des Ausbaus die Kühlung aufrechtzuerhalten und
- das System so optimiert, daß Kältezuführung und Wärmeabführung die Bildung des Eispfropfens und seine Erhaltung während des Ausbaus aus Teufen bis 20 m gewährleisten.

Die weiterentwickelte Variante wurde am 16.08.2001 nach einem erfolgreichen Praxistest im Beisein des Auftraggebers für den Feldeinsatz freigegeben.

2.2 Durchführung der Arbeiten

Die Feldarbeiten wurden vom 30.08. bis 01.09. 2001 (Drucksondierungen und Sonderprobenahme) und 17./18.10.2001 (Errichtung der Meßstelle) in Bad Segeberg durchgeführt. Die erbrachten Leistungen sind im Tagesbericht und Aufmaß (Anlage 1) dokumentiert.

Am vom Auftraggeber vorgegebenen Standort wurde eine Drucksondierung bis 20,15 m unter Gelände mit Messung von Spitzendruck, lokaler Mantelreibung und Porenwasserdruck ausgeführt. Im Ergebnis konnten die Schichtenfolge, der Grundwasserspiegel und die Lagerungsdichte als Ausgangsparameter für die Festlegung des Probenahmeregimes bestimmt werden. Bis etwa 3,50 m unter Gelände wurden sehr dicht gelagerte Sande mit einem Spitzenwiderstand von 35 –

45 MN/m² angetroffen. Darunter folgen Schichten mit Spitzenwiderständen unter 20 MN/m², in denen das FROSTAP erfolversprechend eingesetzt werden kann. Dementsprechend wurde am Probenahmepunkt (ca. 1 m seitlich vom Sondierpunkt) der Bereich bis 3,50 m durch eine Vorbohrung aufgelockert und beginnend bei 5,50 m unter GOK unterhalb einer Schluffschicht in Meterintervallen beprobt (genaue Probenahmeintervalle siehe Aufmaß, Anlage 1). Die Probenahmegarnitur wurde vor jedem Einbau zur Probenahme durch den Auftraggeber sterilisiert. Die gewonnenen Proben (Liner und Eiskern) wurden sofort dem Auftraggeber zur Weiterbehandlung übergeben. Am gewählten Ansatzpunkt wurde bis in eine Tiefe von 17 m unter Gelände beprobt. Drei weitere Intervalle zur Gewinnung zusätzlichen Probematerials wurden an einem weiteren, wiederum um 1 m versetzten Ansatzpunkt beprobt.

Die Grundwassermessstelle wurde im Trockenbohrverfahren mit einem Bohrdurchmesser von 273 mm errichtet und im Durchmesser 115 mm mit PVC-Material ausgebaut. Zur Konstruktion der Meßstelle siehe Anlage 4

3.0 Ergebnisse

Die Meßwerte Spitzendruck, Mantelreibung, Porenwasserdruck der Drucksondierung sind im Feldprotokollen (Anlage 2) graphisch dokumentiert.

Aus dem Reibungsverhältnis (lokale Mantelreibung/Spitzenwiderstand x 100%) und dem Spitzendruck wurde das lithologische Profil der durchteuften Schichten nach Robertson interpretiert. Die Porenwasserdruckwerte unterstützen dabei die Bestimmung der Schichtgrenzen. Die Sondier- und Interpretationsergebnisse wurden mit dem von FUGRO CONSULT GMBH entwickelten modularen EDV-Programm GeODIN 2.0 synoptisch dargestellt. Das Ergebnisdiagramm findet sich in Anlage 3 zu diesem Bericht. Der Grundwasseranschnitt wurde aus dem Verlauf der Porenwasserdruckkurve (Einsetzen positiver Meßwerte) bei 3,80 m unter Gelände interpretiert. Für den Grundwasserleiter zwischen 5,70 m und 8,00 m unter Gelände wurde ein hydrostatisches Niveau von 3,20 m unter GOK und für den Grundwasserleiter unterhalb 9,80 m ein Niveau von 4,35 m unter GOK gemessen.



Anlage 1

Tagesbericht und Aufmaß

Tagesbericht

Namen		Std.	Arbeitsablauf	
			Uhrzeit	Art der durchgeführten Arbeiten
Wißbach, A. Tillner, Th.			0 - 1	Anfahrt
			1 - 2	Umrüsten FROSTAP
			2 - 3	Probenehmer 5.00 - 6.00 Uhr
			3 - 4	Testparameter: 15 V; 2.5A
			4 - 5	30 Min.
			5 - 6	Umgebung Bedingungen: Außentemp. 34 °C
			6 - 7	Besondere Umst.: Während des Gestänge ausbaus
Temperatur / Wetter			7 - 8	weiter Kühlen bis sich weiter
Morgens:			8 - 9	Spannung (12V; 2.0A)
Mittags:			9 - 10	Resultat: am Kühlelement ein 3 cm
Abends:			10 - 11	langer komplett durchgef. neuer
Fahrkilometer: Gerät			11 - 12	Pfropfen
Lkw			12 - 13	mit einer 70% Probengewinn,
Wasserstand			13 - 14	Rest Wasser
Morgens:			14 - 15	
Abends:			15 - 16	Rückfahrt
Stück gestörte Proben			16 - 17	
von	bis	Nr.	17 - 18	
			18 - 19	
			19 - 20	
Stück ungestörte Proben			20 - 21	
von	bis	cm	21 - 22	
			22 - 23	
			23 - 24	

Unterschrift des Bohrmeisters



Sitz der Gesellschaft: Wolfener Straße 36 K 12681 Berlin Tel.: 030/93 651 0 Fax: 030/93 651 200
Geotechnik: Wolfener Straße 36 K 12681 Berlin Tel.: 030/93 651 353 Fax: 030/93 651 350

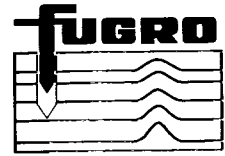
Tagesbericht

Geräte-Nr.: _____ Datum: 30.08.2001 Auftrag-Nr.: 511116
Lkw-Nr.: _____ Auftraggeber: _____ DS-/Bohrloch-Nr.: Baul. Segeberg

Namen		Std.	Arbeitsablauf	
			Uhrzeit	Art der durchgeführten Arbeiten
Hoppenz, M Dijkman R			0 - 1	
			1 - 2	Anfahrt Drucksonde + Bohrgerät
			2 - 3	
			3 - 4	Vorsondierung PWD 1 20,15 m
			4 - 5	Umsetzen auf Frostaprobenaufnahmepunkt
			5 - 6	Vorbohrung bis 3,5 m aufgrund hoher
			6 - 7	Lagerungsdichte
			7 - 8	
			8 - 9	Frostaprobenaufnahme
			9 - 10	
Temperatur / Wetter			10 - 11	5,5 m - 6,5 m
Morgens:			11 - 12	6,8 m - 7,8 m
Mittags:			12 - 13	
Abends:			13 - 14	Vor jedem Einbau 20 min Wartezeit für
			14 - 15	Desinfektion
Stück gestörte Proben			15 - 16	
von	bis	Nr.	16 - 17	
			17 - 18	
			18 - 19	
			19 - 20	
Stück ungestörte Proben			20 - 21	
von	bis	cm	21 - 22	
			22 - 23	
			23 - 24	

Unterschrift des Auftraggebers

M. Hoppenz
Unterschrift des Bohrmeisters



Sitz der Gesellschaft: Wolfener Straße 36 K 12681 Berlin Tel.: 030/93 651 0 Fax: 030/93 651 200
Geotechnik: Wolfener Straße 36 K 12681 Berlin Tel.: 030/93 651 353 Fax: 030/93 651 350

Tagesbericht

Geräte-Nr.: Datum: 31.08.2001 Auftrag-Nr.: 511118
Lkw-Nr.: Auftraggeber: DS-/Bohrloch-Nr.: BauSegeberg

Arbeitsablauf		
Namen	Std.	Uhrzeit Art der durchgeführten Arbeiten
Hoppenz, M Dijkman, R		0 - 1
		1 - 2
		2 - 3 Frostaprobennahme
		3 - 4 8,1 - 9,1 m
		4 - 5 9,4 - 10,4 m
		5 - 6 10,7 - 11,7 m - Kurzschluss, kein Eis Kern +
		6 - 7 daher Kern für Auftraggeber nicht nutzbar
		7 - 8 12,0 - 13,0 m
		8 - 9 13,3 - 14,3 m
		9 - 10 14,6 - 15,6 m - Spitzen nicht geöffnet kein Kern
Temperatur / Wetter		10 - 11 16,0 - 17,0 m
Morgens:		11 - 12
Mittags:		12 - 13 Vor jedem Einbau 20min Wartezeit für
Abends:		13 - 14 Desinfektion
Fahrkilometer: Gerät		14 - 15
Lkw		15 - 16
Wasserstand		16 - 17
Morgens:		17 - 18
Abends:		18 - 19
Stück gestörte Proben		19 - 20
von	bis	Nr.
		20 - 21
		21 - 22
		22 - 23
		23 - 24
Stück ungestörte Proben		
von	bis	cm

Unterschrift des Auftraggebers

Hoppenz
Unterschrift des Bohrmeisters



Sitz der Gesellschaft: Wolfener Straße 36 K 12681 Berlin Tel.: 030/93 651 0 Fax: 030/93 651 200
Geotechnik: Wolfener Straße 36 K 12681 Berlin Tel.: 030/93 651 353 Fax: 030/93 651 350

Tagesbericht

Geräte-Nr.: Datum: 1.09.2001 Auftrag-Nr.: 511116
Lkw-Nr.: Auftraggeber: DS-/Bohrloch-Nr.: Bod. Segeberg

Namen			Std.	Arbeitsablauf	
				Uhrzeit	Art der durchgeführten Arbeiten
Hoppenz, M Dijkman, R				0 - 1	
				1 - 2	
				2 - 3	Verbohrung 2. Punkt bis 3,5 m
				3 - 4	Ansehen auf Punkt
				4 - 5	
				5 - 6	Frostapptabehahme
				6 - 7	10,0 - 11,0 m
Temperatur / Wetter				7 - 8	Einbau bis 11,30 m → Spitze nicht geöffnet Ausbau
Morgens:				8 - 9	11,6 - 12,6 m
Mittags:				9 - 10	Vor jedem Einbau 20 min Wartezeit auf Desinfektion
Abends:				10 - 11	Rückfahrt
Fahrkilometer: Gerät				11 - 12	
Lkw				12 - 13	
Wasserstand				13 - 14	Eiskette + Frostapptabehahme sind beim
Morgens:				14 - 15	AG verblieben (sofort nach jeweiliger
Abends:				15 - 16	Entnahme)
Stück gestörte Proben				16 - 17	
von	bis	Nr.		17 - 18	
				18 - 19	
				19 - 20	
Stück ungestörte Proben				20 - 21	
von	bis	cm		21 - 22	
				22 - 23	
				23 - 24	

Unterschrift des Auftraggebers

Hoppenz
Unterschrift des Bohrmeisters

Aufmaßblatt

Auftragnehmer: FUGRO CONSULT GmbH		Auftraggeber: Ernst - Moritz-Arndt -Universität Greifswald		Auftrag: Errichten Grundwassermeßstelle in Bad Segeberg		Auftrag vom: 05.04.01 Angebot vom: 05.04.01 Seiten: 1	
---	--	--	--	---	--	---	--

Sonderprobenahme mit FROSTAP - Probenehmer in Bad Segeberg

lfd. Nr.	Mast	AN/AB	Ansetzen	CPT	PWD	Interpr.	Desinf.	Umsetzen	Einbautiefe	Entnahmetiefe bis	Kern-gewinn	Vorbohren	Bemerkung
							Std.	m	m	m	m		
1	1	1	1	20	1	20	0,2	1	5,50	6,80	0,30	1	
2	1						0,2		6,80	8,10	0,50		
3	1						0,2		8,10	9,40	0,30		
4	1						0,2		9,40	10,70	0,40		
5	1						0,2		10,70	11,70	0,00		Kurzschluß, kein Eiskern
6	1						0,2		12,00	13,30	0,95		
7	1						0,2		13,30	14,60	0,99		
8	1						0,2		0,00	0,00	0,00		Spitze nicht geöffnet
9	1						0,2		16,00	17,30	0,80		
10	2						0,2	1	10,00	11,30	1,00	1	
11	2						0,2		0,00	0,00	0,00		Spitze nicht geöffnet
12	2						0,2		11,60	12,90	1,00		
Summe:		1	1	20	1	20	2,4	2	103,40	116,10	6,24	2	

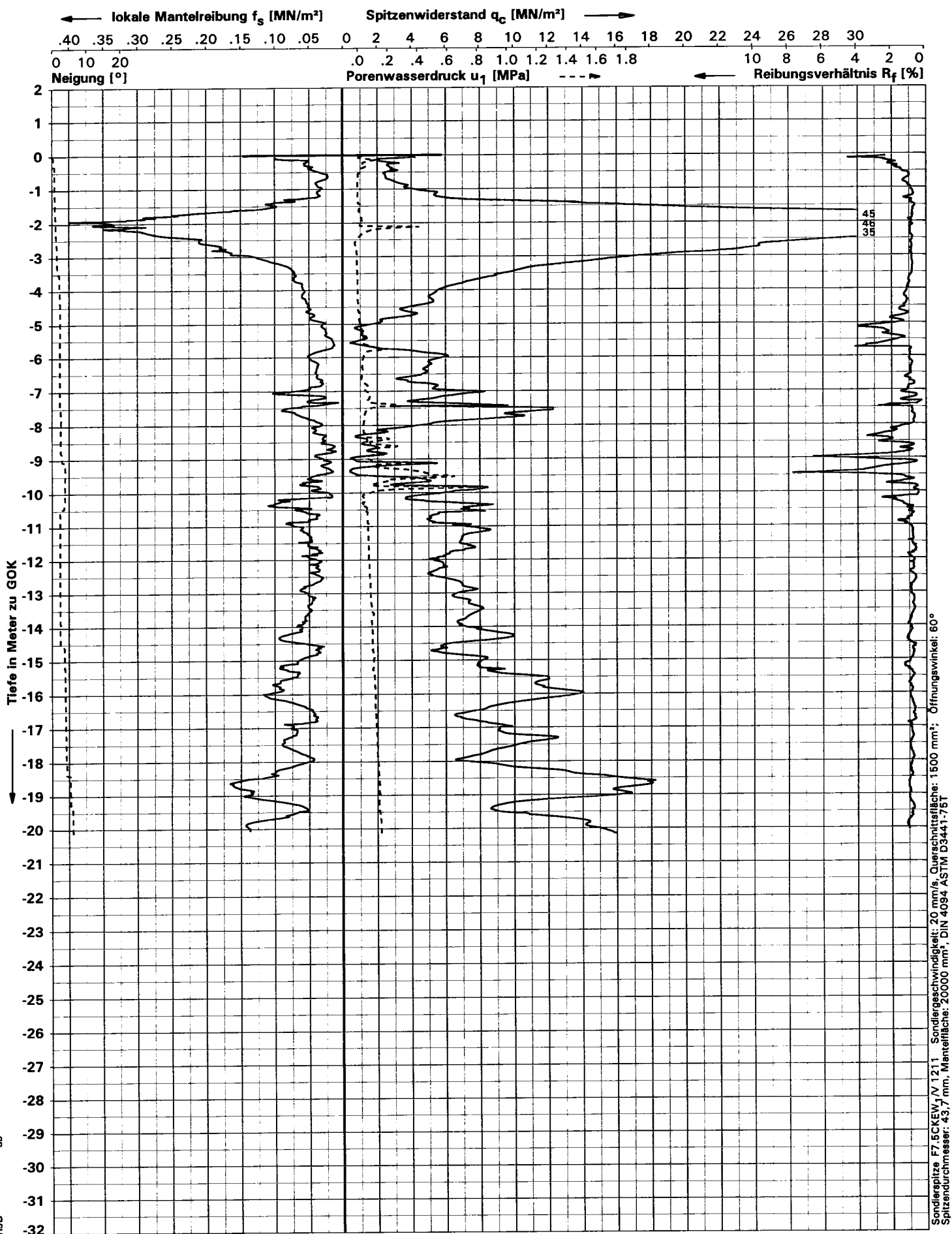
Für den Auftragnehmer:
FUGRO CONSULT GmbH

Herr Behrens
Berlin, den 26.10.2001

FUGRO CONSULT GMBH für den Auftraggeber:
Umwelt - Geotechnik - Analytik
Wolfener Straße 36 K, 12681 Berlin



Anlage 2
Feldprotokolle CPT, Probenahmeprotokolle



DRUCKSONDIERUNG MIT PORENWASSERDRUCKMESSUNG

Bad Segeberg
Universität Greifswald



FUGRO CONSULT GMBH
Umwelt - Geotechnik - Analytik
Wolfener Straße 36 K, 12681 Berlin
Tel: (030)93651352 Fax: 93651350

Datum : 30-Aug-2001
Sondierende :
Gelände : .00 m zu GOK
Endteufe : -20.16 m zu GOK

Projekt: 511116
Sondierung : **PWD1**

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 30.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 16.15
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 5,50 m bis: 6,80 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 2 MPa

Liner: von: 5,50 m bis: 6,50 m Kerngewinn: 30%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 6,50 m bis: 6,80 m

Stutzenprobenbezeichnung:

Probenansprache im Stutzen:

Material : fS,u,ms2
Wassergehalt : wf5
Farbe : gr
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 30.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 18.00
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 6,80 m bis: 8,10 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 2 MPa

Liner: von: 6,80 m bis: 7,80 m Kerngewinn: 50%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 7,80 m bis: 8,10 m

Stutzenprobenbezeichnung:

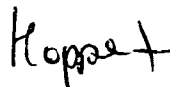
Probenansprache im Stutzen:

Material : mS,u,gs-fg
Wassergehalt : wf5
Farbe : grbn
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift



Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 31.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 8.15
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 8,10 m bis: 9,40 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 4 MPa

Liner: von: 8,10 m bis: 9,10 m Kerngewinn: 30%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 9,10 m bis: 9,40 m

Stutzenprobenbezeichnung:

Probenansprache im Stutzen:

Material : gS,ms mit Tonlage
Wassergehalt : wf5
Farbe : gr
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 31.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 9.45
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 9,40 m bis: 10,70 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 4 MPa

Liner: von: 9,40 m bis: 10,40 m Kerngewinn: 40%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 10,40 m bis: 10,70 m

Stutzenprobenbezeichnung:

Probenansprache im Stutzen:

Material : S,gs,fg, mit Mg-Lagen
Wassergehalt : wf5
Farbe : bn-gegr
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 31.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 11.30
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 10,70 m bis: 12,00 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 4 MPa

Liner: von: 10,70 m bis: 11,70 m Kerngewinn: 85%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 11,70 m bis: 12,00 m

Stutzenprobenbezeichnung:

Probenansprache im Stutzen:

Material : S,g4
Wassergehalt : wf5
Farbe : grge
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Kurzschluß, keine Eispfropfen !
Linerprobe für AG unbrauchbar

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 31.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 14.00
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 12,00 m bis: 13,30 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 2 MPa

Liner: von: 12,00 m bis: 13,00 m Kerngewinn: 95%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 13,00 m bis: 13,30 m

Stutzenprobenbezeichnung:

Probenansprache im Stutzen:

Material : mS,gs,fg
Wassergehalt : wf5
Farbe : grge
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 31.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 15.20
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 13,30 m bis: 14,60 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 2-4 MPa

Liner: von: 13,30 m bis: 14,30 m Kerngewinn: 99%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 14,30 m bis: 14,60 m

Stutzenprobenbezeichnung:

Probenansprache im Stutzen:

Material :
Wassergehalt :
Farbe :
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 31.08.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 19.00
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 1

Teufe: von: 16,00 m bis: 17,30 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 4 MPa

Liner: von: 16,00 m bis: 17,00 m Kerngewinn: 80%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 17,00 m bis: 17,30 m (incl. Eiskern)

Stutzenprobenbezeichnung:

Probenansprache im Stutzen:

Material : mS, mit gs, fg, wechsellagernd
Wassergehalt : wf5
Farbe : bn/gr
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 01.09.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 8.45
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 2

Teufe: von: 10,00 m bis: 11,30 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 4 MPa

Liner: von: 10,00 m bis: 11,00 m Kerngewinn: 100%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 11,00 m bis: 11,30 m

Stutzenprobenbezeichnung: leer, nur Eiskern

Probenansprache im Stutzen:

Material :
Wassergehalt :
Farbe :
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

Unterschrift 

Protokoll FROSTAP-Probenahme

Objekt : Bad Segeberg Datum 01.09.01
Auftraggeber : E.M.Arndt Uni Greifswald/Inst. f. Ökologie Uhrzeit 11.40
Untersuchungslabor:

Entnahmepunkt: 2

Teufe: 11,60 m bis: 12,90 m

Randbedingungen bei der Probenahme

Technik : 200 kN Drucksonde, 35 mm FROSTAP, 100 cm Kunststoffliner mit Nylonstrumpf
Druckkraft am Spanntisch: 3 MPa

Liner: von: 11,60 m bis: 12,60 m Kerngewinn: 100%

Linerbezeichnung:

Stutzen: von: 12,60 m bis: 12,90 m

Stutzenprobenbezeichnung: leer, nur Eiskern

Probenansprache im Stutzen:

Material : mS,gs,fs2
Wassergehalt : wf5
Farbe : gebn
Geruch :
Phase :

Übergabe am: sofort
an: AG

Probenehmer: Hoppenz

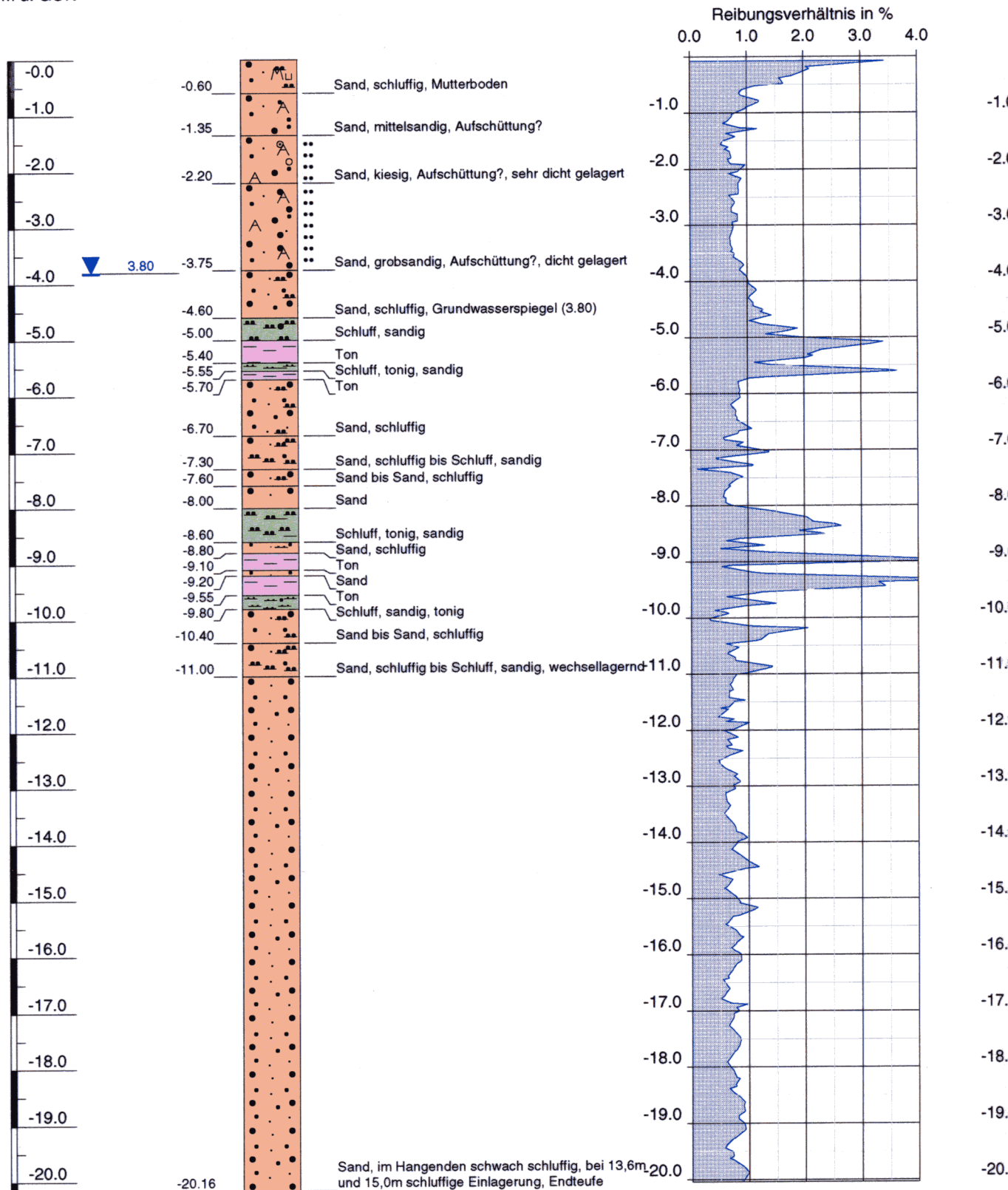
Unterschrift *Kappe 2*

Anlage 3
CPT-Ergebnisse mit lithologischer Interpretation

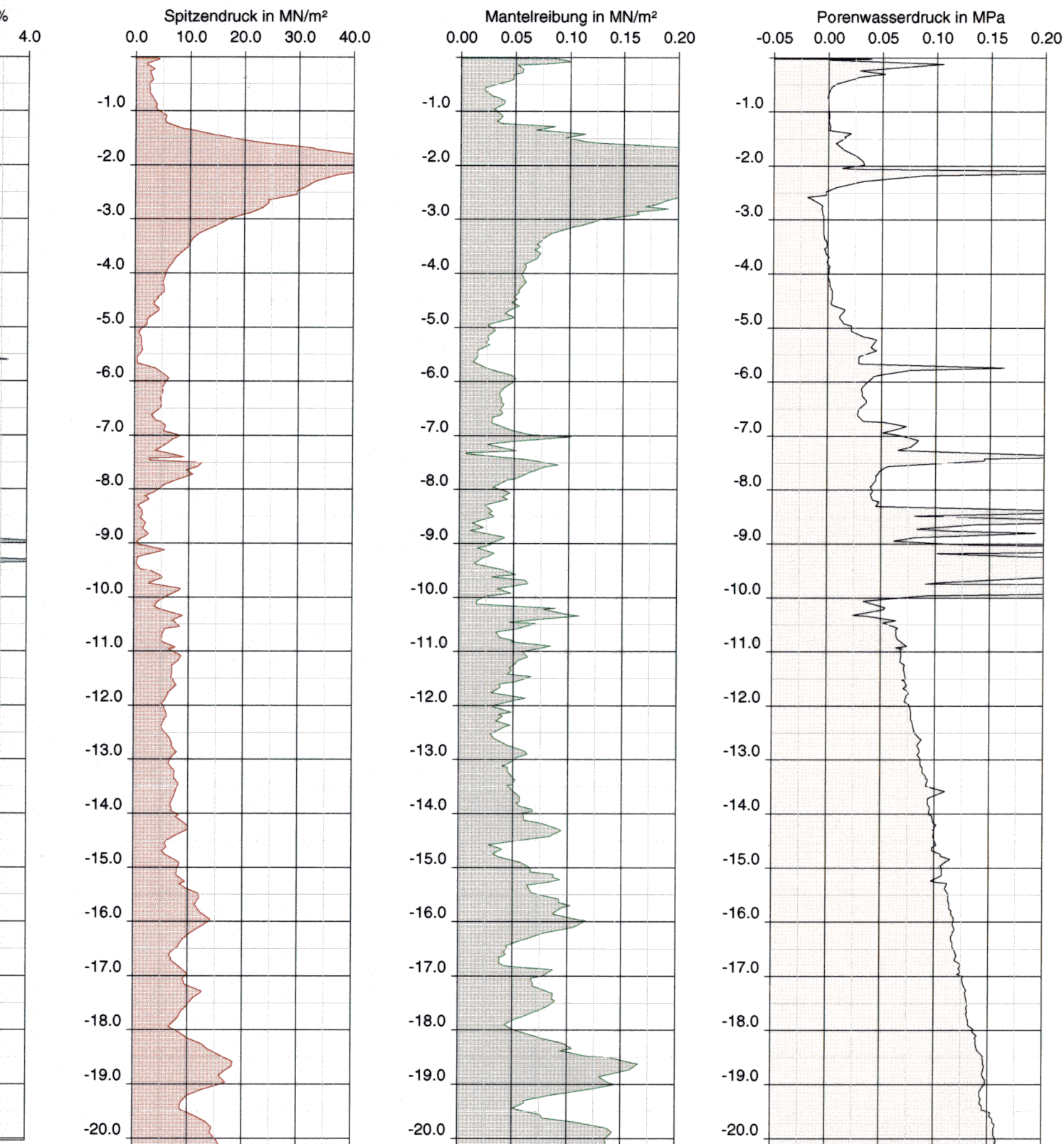
Ergebnisse der Drucksondierung und litholo

m u. GOK

PWD 1



und lithologische Interpretation



Projekt: Bad Segeberg

Bohrung: Drucksondierung PWD 1

Auftraggeber: Universität Greifswald

Bohrfirma: FUGRO CONSULT GMBH

Bearbeiter: S. Eichhorn

Höhenmaßstab: 1:100

Datum: 30/08/2001

Anlage : 3

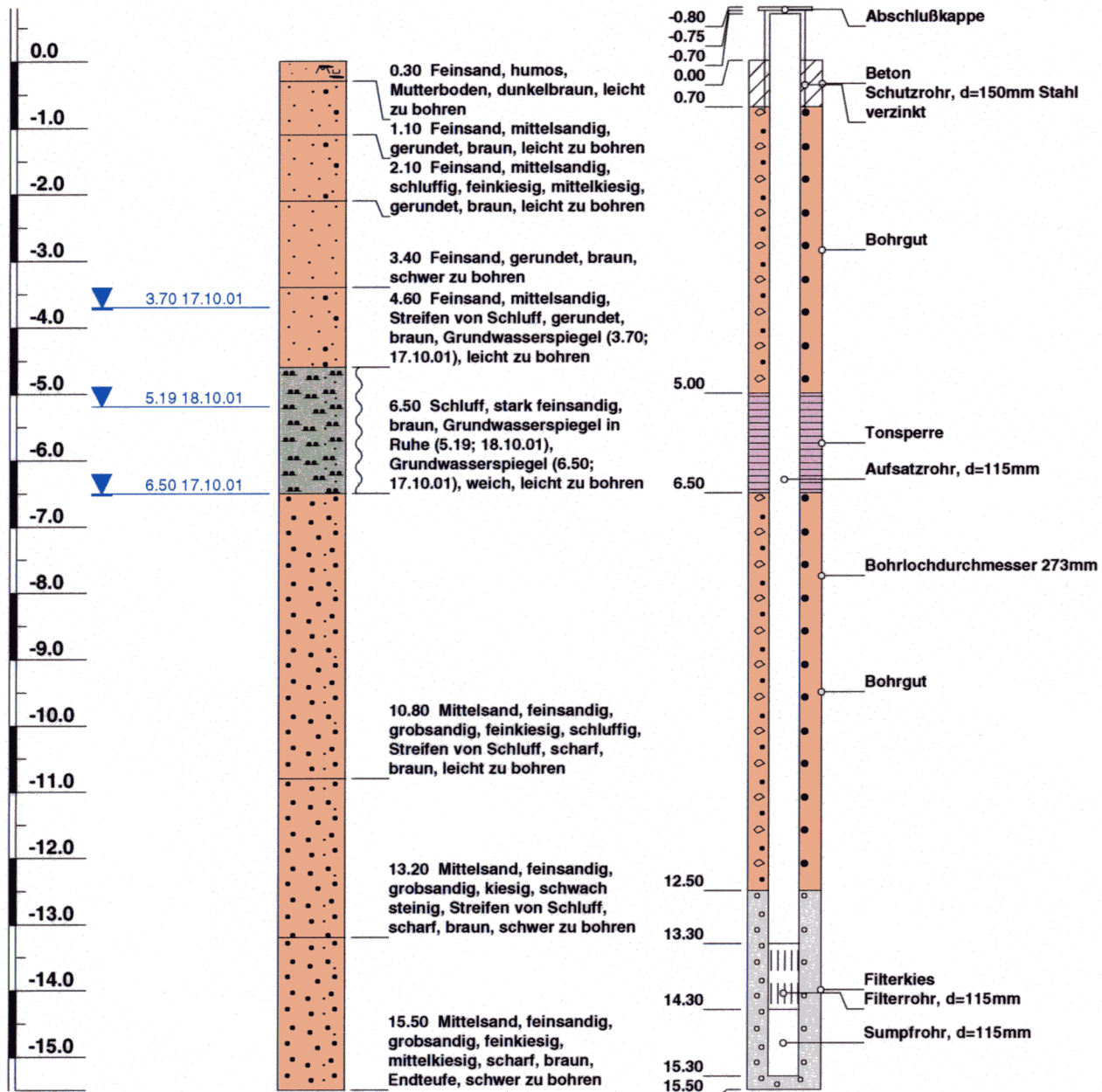


Anlage 4

Ausbau der Grundwassermeßstelle

Bohrung B1

m u. GOK



Höhenmaßstab: 1:100

Seite 1 von 1

Projekt: Bad Segeberg

Bohrung: Bohrung B1

Auftraggeber: Universität Greifswald

Bohrfirma: WILHELM SOLTAU GmbH

Bearbeiter: S. Eichhorn

Datum: 17/10/2001 - 18/10/2001

