

Bodenbiologische Untersuchungen in Rutschungsbereichen

B. LUKAS & K. STUNDL (Graz)

Einleitung

Bei Untersuchungen in Rutschungsbereichen zeigte sich, daß in tieferen Bodenschichten, in denen eine Störung der natürlichen Schichtung auftrat, unerwartet hohe Keimzahlen (ähnliche Größenordnungen wie in Oberflächenbereichen) nachgewiesen werden konnten. Dies war Anlaß, eingehende Untersuchungen solcher Bodenbereiche vorzunehmen. Die dazu notwendigen mikrobiologischen Untersuchungen wurden in einigen Schächten und an mehreren Erdwürfeln im Labor durchgeführt, um die vertikale und horizontale Verteilung der Mikroorganismen im Boden und ihre Anhäufungen in Gleitschichten zu ergründen; dies war nur in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bodenmechanik an der technischen Hochschule Graz möglich.

Das Erscheinungsbild eines Rutschungsgebietes charakterisiert Ch. VEDER (1966, 1972) wie folgt:

„Auf einer liegenden unteren Schichte aus blauem, unverwittertem Ton oder Mergel befindet sich eine Schichte braunen, schluffigen Tones. Chemisch-physikalische Vorgänge scheinen auf den Lebensprozeß von Mikroorganismen zurückzuführen zu sein“ (1972, S. 80, 81).

Ch. VEDER nimmt an, daß diese Keime eine Oxidation des in der blauen Schichte vorhandenen Fe(II)-Oxids in das in der braunen häufiger vorhandene Fe(III)-Oxid hervorrufen und somit auch eine Veränderung der Farbe von Blaugrau zu Braunrot bewirken.

Zwischen beiden Schichten ist eine Potentialdifferenz vorhanden, die wahrscheinlich durch diese Mikroorganismen-tätigkeit erhalten bleibt, da sonst bei Berührung beider Schichten ein Ladungsausgleich hätte stattfinden müssen.

An der Kontaktzone verschiedener Bodenarten können elektrische Potentialdifferenzen gemessen werden, die in erster Linie elektroosmotische Bewegungen des Porenwassers erzeugen. Diese Wasserbewegungen führen zu Rutschungen. Zwischen zwei Bodenschichten mit verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften kann sich also ein elektrisches Potential aufbauen, das zu einem Wasserfluß von der

einen zur anderen Schichte (z. B. Sand zu Ton) führt. Zwischen zwei sich berührenden Schichten, die sich hauptsächlich in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden, gehen Oxidations- und Reduktionsprozesse vor sich (Ch. VEDER, 1968).

Über diese Charakteristik orientiert Fig. 1 (nach Ch. VEDER, 1972, p. 80).

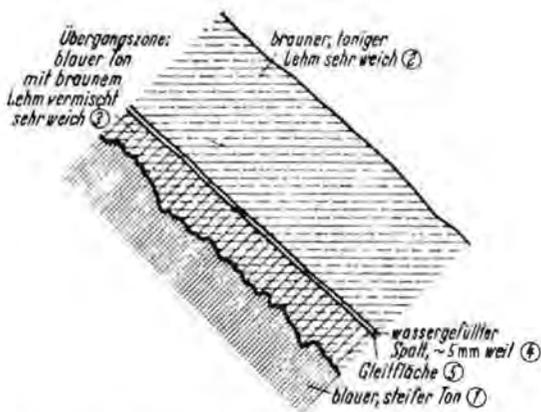


Fig. 1: Charakteristischer Schnitt durch ein typisches Rutschungsgelände. 1 = blauer steifer Ton, 2 = brauner, toniger Lehm, sehr weich, 3 = Übergangszone: Blauer Ton mit braunem Lehm vermischt, sehr weich, 4 = Wassergefüllter Spalt, ~ 5 mm weit, 5 = Gleitfläche.

Nach F. SCHEFFER & P. SCHACHTSCHABEL (1966) weist ein ungestörter Boden in der Rhizosphäre, dem Einflußbereich der Pflanzenwurzeln, eine höhere Organismendichte als unmittelbar unter der Erdoberfläche auf, wo die Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse zu rasch wechseln. Da die Mikroorganismen in der Rhizosphäre mit den Pflanzenwurzeln in einer Art Stoffwechselfgemeinschaft leben, finden sie hier auch bessere Existenzbedingungen vor. In größerer Bodentiefe — von der Art und der Bearbeitung des Bodens abhängig — sind im normalen Verteilungsbild wenige bis keine Mikroorganismen nachweisbar. Dies kann nicht nur auf eine Verschlechterung der Lebensbedingungen, sondern auch auf verschiedene veränderte ökologische Faktoren (Filtration, Auswaschung, Verfügbarkeit der Nährstoffe) zurückzuführen sein. Die Nutzungsmöglichkeit des Lebensraumes wird auch für die Bodenkeime durch die strukturellen Bodeneigenschaften bestimmt.

Den Mikroorganismen stehen neben ihrem Vorkommen im Bodenwasser auch an der inneren Oberfläche der Bodenteilchen bestimmte „Ansatzpunkte“ zur Verfügung. Sind diese Oberflächen allseits besetzt, spricht Th. BECK (1968) von einer „Mikrobensättigung“.

Dementsprechend wurden ab einer bestimmten Keimdichte auch durch weitere Zugaben von Bakteriensuspension nicht immer nennenswerte Keimzahlzunahmen erzielt.

Treten aber abweichend von dem eben geschilderten normalen vertikalen Verteilungsbild plötzliche Keimanstiege in der Tiefe auf, wie dies in untersuchten Schächten der Rutschungsgebiete der Fall war, so kommen hierfür verschiedene Ursachen in Frage:

Da das Vorhandensein des Wassers im Boden für die Mikroorganismen von großer Bedeutung ist, ergeben sich folgende Überlegungen:

- a) Der Keimanstieg in der Tiefe kann durch den Transport der Mikroorganismen von der Oberfläche in größere Tiefen mit dem Sickerwasser erfolgen. Da aber größere Keimanhäufungen nur in ganz bestimmten Bodenschichten gefunden werden, besteht wahrscheinlich ein enger Zusammenhang mit der Bodenformation bzw. der Schichtenfolge.
- b) Versickerndes Wasser und darin gelöste Nährstoffe könnten zu einer gesteigerten Vermehrung bereits vorhandener Keime in tieferen Bodenbereichen führen. So sind auch die besseren Ernährungsbedingungen in der Rhizosphäre nach Th. BECK (1968) entscheidend für die Zunahme der Mikroorganismen. Im wesentlichen hängt der Gehalt an Mineralstoffen in der Bodenlösung von der geologischen Beschaffenheit ab.

Über die Bedeutung und Verteilung des Wassers im Boden liegen zahlreiche Arbeiten vor.

Nach Kenneth v. THIMANN (1964) ist der Raum zwischen den Bodenteilchen zum Teil mit Luft, zum Teil mit Wasser gefüllt. Vom Verhältnis dieser beiden Zustände wird die Entwicklung der Bakterien weitgehend bestimmt. Je nach der Beschaffenheit des Bodens haftet das Wasser in verschiedenem Ausmaß an der Oberfläche der Bodenteilchen. Bei abnehmender Teilchengröße nimmt die Menge des Wassers zu, da eine größere Oberfläche entsteht, an der das Kapillarwasser festgehalten werden kann. Die Entwicklung der verschiedenen Bakterienarten wird auch durch die vorhandene Luftmenge beeinflusst, wobei die Aktivität der Mikroorganismen in weitem Umfang von der Stärke der Kapillarwasserschicht abhängt.

Nach G. MÜLLER (1965) wird das eingedrungene Wasser vom Boden, je nach der Menge und Größe der bodeneigenen Bindungskräfte entweder restlos oder nur zum Teil gegen die Schwerkraft als Haftwasser (Adsorptions- oder Kapillarwasser) zurückgehalten. Das nicht zurückgehaltene Sickerwasser folgt der Schwerkraft und fließt durch die Makroporen zum Grund- oder Stauwasser ab. Der Einfluß des Bodenvassers auf die Mikroorganismen beruht aber nicht nur auf der Menge, Bindungsart und Verfügbarkeit, sondern auch auf seiner chemischen Zusammensetzung. Wie groß die Durchtrittsgeschwindigkeit des Sicker-

wassers ist, welche Wechselwirkungen zwischen dem Haft- und Sickerwasser bestehen und ähnliche Fragen sind noch ungeklärt.

I. POCHON und H. BARJAC (1958) stellten fest, daß sich bei Feuchtigkeitsanstieg im Boden die Aktivität aller aeroben Organismen ebenfalls bis zu einem bestimmten prozentuellen Feuchtigkeitsoptimum erhöht. Von diesem Punkt an hat jede weitere Erhöhung des Wassergehaltes eine Herabsetzung der mikrobiellen Aktivität zur Folge.

Auswahl der Entnahmestellen und der Verfahren zur Probengewinnung

1. Um Gleitflächen, die sich stets in größeren Tiefen befinden, mikrobiologisch untersuchen zu können, ist es zunächst notwendig, Probenmaterial in ungestörter Lagerung und steril zu entnehmen. Aus diesen Gründen war für mikrobiologische Untersuchungen die Zusammenarbeit mit dem Institut für Bodenmechanik besonders wertvoll, da vor allem aus größeren Tiefen durch verschiedene Einrichtungen dieses Instituts oftmals ungestörte Bodenproben gewonnen werden konnten.

Für die Entnahme von Bodenproben kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

- a) Die „Naßbohrung“ ist für mikrobiologische Untersuchungen ungeeignet, da durch den Kontakt der Proben mit dem Spülwasser Keime eingeschwemmt werden.
- b) Die „Trockenbohrung“ ermöglicht nur bei bestimmten Bodenarten (mit geringem Wassergehalt) die Entnahme eines ungestörten Bodenausschnittes. Kommt es nämlich beim Ausbohrvorgang zu Verschmierungen, so ist das Probenmaterial bereits vor jedem weiteren Eingriff in das Bodengefüge stark verändert und das ursprüngliche Verteilungsbild der Bodenkeime ist nicht mehr vorhanden.
- c) Dagegen sind Untersuchungsschächte, die auch mehrmalige Probeentnahmen zulassen, günstiger. Auch hier findet eine Veränderung an der „neuen Oberfläche“ statt. Aus diesen Überlegungen heraus wurden sowohl Proben aus der Oberfläche der Schachtfenster als auch Proben, die sich etwa 5 cm dahinter befanden, entnommen und verglichen. Die Ergebnisse aus diesen Gegenüberstellungen differierten in einigen Fällen.

Die Probeentnahmen aus Aussparungen der Untersuchungsschächte (siehe Fig 2) wurden mit einem Entnahmezylinder durchgeführt, dessen Größe vom jeweiligen Bedarf an Probenmaterial abhing.

Ein größerer Ausstechzylinder ermöglichte mehrere Probeentnahmen aus einem Bohrkern. Für die Untersuchung ausgewählte Proben wurden mit einem sterilen Korkbohrer aus dem Zentrum des Bohrkerns entnommen.

Neben Untersuchungen von Proben aus natürlicher Lagerung (Schächte) erfolgten auch solche an Erdwürfeln im Labor.

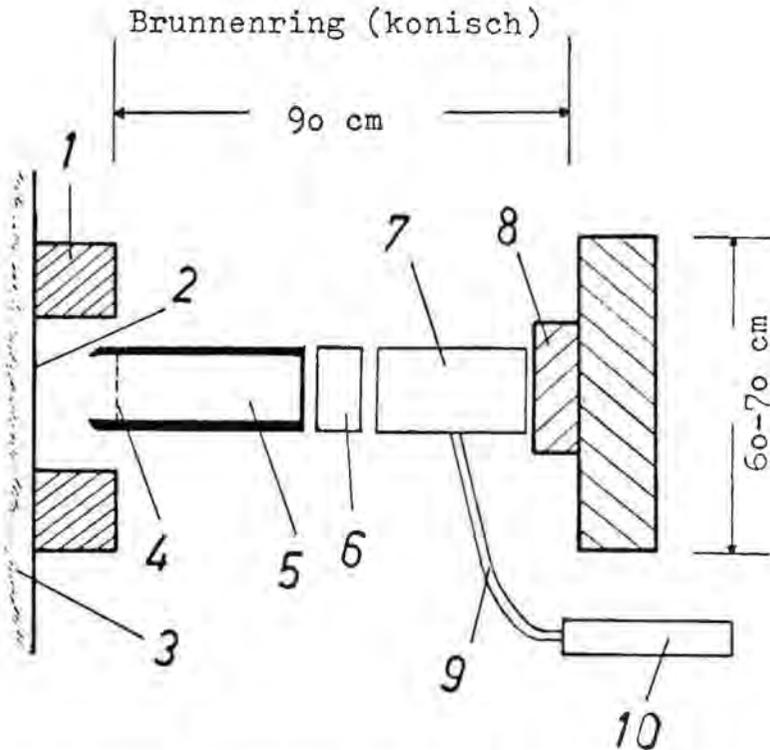


Fig. 2: Probeentnahmeverrichtung mit großem Ausstechzylinder an einer Aussparung der Schachtwand. 1 = Ortbeton, 2 = Schachtfenster (20 X 20 cm), 3 = Boden, 4 = Abschneidevorrichtung, 5 = Entnahmezylinder, 6 = Auflager, 7 = hydraulische Presse, 8 = Abstützung, 9 = Schlauch, 10 = Handpumpe.

Die Überlegung war dabei, an diesem Material Untersuchungen vorzunehmen, die am natürlichen Standort nicht durchführbar waren. So konnten in mehrere Erdwürfel gezielt aqua dest. bzw. Bakterien-suspensionen eingebracht und die Folgen dieser Einbringungen über einen längeren Zeitraum hin beobachtet werden.

2. Probeentnahmen aus den Laborerdwürfeln wurden mit einem Ausstechzylinder, dessen Länge der jeweiligen Höhe des Erdwürfels entsprach, vorgenommen.

Um einen Einfluß der Temperatur, der sich besonders auf oberflächennahe Schichten bemerkbar machen könnte, zu vermeiden, wurde eine Versuchseinteilung in der Weise getroffen, daß in der kälteren Jahreszeit hauptsächlich die Laborerdwürfel behandelt wurden, während in der wärmeren Zeit Proben aus verschiedenen Schächten ent-

nommen und untersucht wurden. Hier sollten auch nicht jahreszeitliche Schwankungen im Mikroorganismengehalt festgestellt werden, sondern es ging lediglich darum, die vertikale Keimverteilung im Boden zu ermitteln.

Geologische Charakterisierung der Entnahmestellen¹

1. Entnahmestellen der Erdwürfel, die im Labor untersucht wurden:
 - a) R i e s : Pannon, Gebiet feinkörniger Tertiärsedimente, Sande, Lehme, Schotter (nach der baugelologischen Karte von H. FLÜGEL)
 - b) S c h e m m i n g (nahe bei St. Anna am Aigen): Obersarmat, Tonmergel, Tonsand, Feinschotter, Kohle
2. Natürliche Entnahmestellen:
 - a) I l z : Mittelpannon, pleistozäne Terrassen, Gehängelehme, tiefes Pannon : Tonmergel, Tonsand (Geologische Karte der zentralen Teile des steirischen Tertiärbeckens von K. KOLLMANN)
 - b) „S a u m g a s s e 20“ (Graz-Rosenberg): Sarmat

Bei der Gewinnung und Lagerung der Erdwürfel und der Probenentnahmen aus diesen ergaben sich viele Schwierigkeiten². Da ein Erdwürfel mit den Abmessungen 35 x 35 x 42 cm etwa 100 kg wog, gestaltete sich sein Transport an die Oberfläche recht schwierig. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die ausgestochenen und in ihrer natürlichen Lagerung völlig erhaltenen Erdwürfel sofort mit einer Paraffinschicht isoliert und mit Holz ummantelt, um das Eindringen von Luft zu verhindern.

Eine schematische Darstellung dieser Erdwürfel zeigt Fig. 3.

Die Erdwürfel erhielten in eine (siehe Fig. 3) bzw. zwei waagrechte Würfelhorizonte Injektionen mit starken, 20 cm langen Impfnadeln. Durch 10 bzw. 11 vorgebohrte Löcher der Holzumrandung der Erdwürfel wurden Injektionen mit je 2ml destilliertem Wasser bzw. der gleichen Menge Bakteriensuspension je Erdfläche und Würfelseite verabreicht. Der Abstand zwischen den Impflöchern betrug 2 cm. Nach erfolgter Injektion wurde jedes Impfloch mit einem Plastikkörper luftdicht verschlossen.

Die Würfelversuche sollten zeigen, ob eine Wasserzugabe allein oder erst eine Zufuhr von Bodenkeimsuspensionen ausreicht, um eine höhere Teilungsrate der Mikroorganismen hervorzurufen.

¹ Nach Auskünften von Prof. Dr. H. SEELMEIER und Dr. P. PÖLSLER am Institut für Baugelologie (Vorstand Prof. Dr. H. SEELMEIER).

² Bei der Beschaffung der Erdwürfel (3 Würfel von der Ries, 6 Würfel von Schemming) und der ständigen Probenentnahmen daraus wurden wir von Mitarbeitern des Instituts für Bodenmechanik (Vorstand Prof. Ch. VEDER) an der Technischen Hochschule in Graz unterstützt, wofür wir an dieser Stelle bestens danken.

Um das horizontale Verteilungsbild der Bodenkeime im Bodengefüge zu untersuchen, erfolgten Probeentnahmen auch in waagrechter Würfelebene aus schon mehrmals untersuchten Würfeln.

Ob und inwieweit versickerndes Oberflächenwasser ein Transportmittel für Bodenkeime darstellt, sollten Versuche mit Laborerdwürfeln aus dem blaugrauen und rotbraunen Ton — dem eigentlichen Rutschungsbereich — zeigen, der zentral von oben mit einer konzentrierten Bakteriensuspension und Wasser versehen wurde.

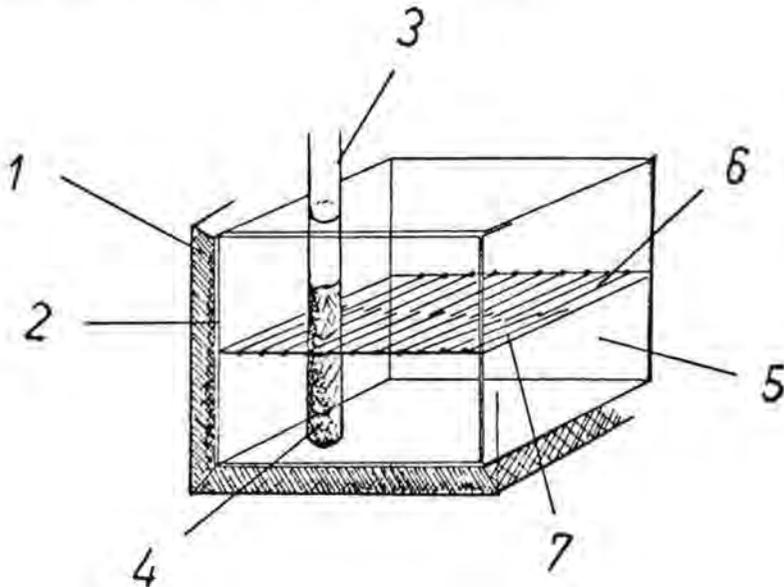


Fig. 3: Schematische Darstellung eines Erdwürfels mit einem Impfhorizont.
 1 = Holzummantelung, 2 = Paraffinisolierung, 3 = Ausstechzylinder,
 4 = Bohrkern, 5 = Erdmaterial, 6 = beimpfte Fläche (Impfhorizont),
 7 = Impfkanal.

Untersuchungsmethodik

Um hier Aussagen machen zu können und um einigermaßen stichhaltige Unterlagen zu bekommen, war es notwendig, die üblichen Untersuchungsmethoden miteinander zu vergleichen.

Bei Untersuchungen kleinerer Probenmengen ($0,5 \text{ cm}^3$) treten auch im Mikrobenbestand eng benachbarter Entnahmeräume mehr oder weniger große Schwankungen auf.

Nach W. OBERZILL (1967) findet man bei einer entsprechend hohen Zahl von Untersuchungen, daß die einem bestimmten mittleren Wert

am nächsten kommenden Beobachtungswerte am häufigsten und, je weiter sie von diesem abweichen, um so seltener anzutreffen sind. Daraus ergibt sich eine Häufigkeitsverteilung, die mit hinreichender Annäherung ermittelt werden kann.

Verhältnisse der Mikroorganismenbesiedlung eines großflächigen Areals lassen sich daher nur durch zahlreiche Untersuchungen kennzeichnen.

Mikrobiologische Untersuchungen und Beobachtungen zeigen, verglichen mit chemischen und physikalischen Versuchen, eine viel größere Schwankungsbreite der Einzelergebnisse.

Besonders bei quantitativen Keimzahlbestimmungen, die im Boden vorgenommen werden, muß mit größeren Streuungswerten gerechnet werden. Die Zusammensetzung des Bodengefüges aus Bodenteilchen verschiedenster Beschaffenheit bietet dementsprechend sehr unterschiedliche Entwicklungsmöglichkeiten für Mikroorganismen. So ist es auch erklärlich, daß Stellen besonders hoher Keimdichte mit Orten geringeren Mikrobenbesatzes in kleinen Abständen wechseln. Dazu kommt, daß Angaben über die Zuverlässigkeit eines Mittelwertes nur dann gelten, wenn bei allen Untersuchungen die Versuchsbedingungen eingehalten werden.

Untersuchungsverfahren

Experimenteller Teil:

Da alle bisherigen Untersuchungsverfahren voneinander differierende Ergebnisse lieferten, galt es, eine geeignete Untersuchungsmethode zu entwickeln.

Bei der quantitativen Ermittlung der Keimzahlen kamen drei Methoden vergleichend zur Anwendung.

1. Gußplatten aus Bodensuspension auf Nähragar.
2. Verdünnungsmethode (Zehntelungsverfahren) im flüssigen Nährboden (Glucose-Pepton mit Bromthymolblau als Indikator).
3. Direktbeobachtung hitzefixierter Ausstriche im UV- bzw. Blaulicht (Fluoreszenzmikroskopie).

Mit dem Korkbohrer, der im wesentlichen aus einem massiven Stössel und einem genau darüberpassenden Rohr gleicher Länge besteht, wird unter Einhaltung steriler Bedingungen eine bestimmte Erdprobenmenge (0,5 ml) aufgenommen und in Verdünnungsflaschen gedrückt. Die Verdünnungsflaschen (= Schüttelflaschen mit 200 ml = V) enthalten als Verdünnungswasser je 45 ml destilliertes mit NaHCO_3 gepuffertes Wasser.

Fluoreszenzmikroskopische Methode:

Bei diesem Verfahren wird die Bodensuspension nach erfolgter Hitzefixierung mit einer bestimmten Farbstofflösung fluorochromiert. Auf Grund der viel größeren adsorptiven Fähigkeit der hitzefixierten

Mikroorganismen für Acridinorange ist es möglich, die Mikroben von den Bodenpartikelchen im UV-Fluoreszenzmikroskop zu unterscheiden. Die Wahl der Konzentration der Acridinorange-Lösungen richtet sich nach der adsorptiven Fähigkeit der jeweiligen Bodenart. Eine bestimmte Menge der Suspension (0,05 ml) wird auf einen Objektträger innerhalb einer exakten Umgrenzung (1 cm² in quadratischer Fläche) aufgetragen. Diese 0,05 ml Bodensuspension werden bis zum völligen Verdunsten dieser Flüssigkeit schonend hitzefixiert und anschließend mit einer Acridinorange-Lösung bestimmter Konzentration (meist 1 : 10³) je nach Erfordernis 10 bis 30 Sekunden lang kalt angefärbt und gewaschen. Anregungen für diese Methode wurden aus den Arbeiten von S. STRUGGER (1949), A. LEHNER & W. NOWAK (1957, 1959) und M. HAITINGER (1959) entnommen.

Für die fluoreszenzmikroskopische Keimzählermittlung wurde im allgemeinen das aus durchschnittlich 20 Gesichtsfeldern errechnete Mittel mit einem bestimmten Umrechnungsfaktor, der sich aus der Gesamtfläche, der verwendeten Vergrößerung (100 Obj. × 15 Ok.) und der Ausgangsverdünnung der aufgetragenen Suspension ergab, multipliziert.

Kочн'sches Plattengußverfahren:

Mit einer sterilen Pipette wird 1 ml der Endverdünnung der Bodensuspension in einer Petrischale ausgegossen und mit etwa 10 ml Agar vermischt.

Die Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte in Schüttelflaschen. Ausgang: 5 Teile der Bodenprobe = 0,5 ml / 45 ml Verdünnungswasser; 5 : 45 = 10fache Verdünnung. 5 ml dieser Suspension wurden jeweils in 45 ml Verdünnungswasser weiterverdünnt, was einer 10²-fachen Verdünnung entspricht.

Die Ermittlung der auf festen Nährböden gewachsenen Kolonien ist nach 24 bzw. 48 Stunden möglich.

Verdünnungs- bzw. Zehntelungsverfahren:

Je 9 ml Bromthymolblau-Glucose-Peptonwasser werden in sterile Epruvetten abgefüllt. Die Übertragung eines ml der Bodensuspension (10⁴-fach verdünnt) in die erste Epruvette ergibt nun eine 10²-fache Verdünnung. Bei jeder weiteren Übertragung von einem ml steigt die Verdünnung um 10¹.

Die Auswertung nach eingetretener Trübung und Verfärbung des flüssigen Nährbodens ist bereits nach 2 bis 4 Tagen möglich, soll aber mindestens durch eine Beobachtung nach einer weiteren Woche korrigiert werden.

Weder mit der Plattenguß- noch mit der Zehntelungsmethode können alle Keime erfaßt werden, da es keinen Universalnährboden gibt,

der allen Bakterienarten gleiche optimale Entwicklungsmöglichkeiten bietet.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Direktbetrachtung hitzefixierter Präparate werden auch die vor dem Eingriff abgestorbenen Zellen mitgezählt. Diese stellen aber nur einen geringen Prozentsatz dar, da nach ihrem Absterben rasch eine Autolyse eintritt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Zählungen ergaben daher stets viel höhere Mikroorganismenzahlen als die Zählungen mit den beiden anderen herkömmlichen Methoden.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse der drei angewandten quantitativen Keimzahlbestimmungsmethoden wurde beim fluoreszenzmikroskopischen stets die geringste Abweichung vom Mittelwert erhalten.

Eine eindeutige Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Bodenpartikeln und Bakterienzellen war im Fluoreszenzmikroskop in manchen Fällen trotzdem nicht möglich.

Als Vergleich zu diesen Methoden wurde außerdem eine elektronenoptische Untersuchung mit dem Rastermikroskop durchgeführt. Die elektronenoptischen Bilder gewährten Einblick in die Verteilung von Bakterienzellen im Bodengefüge und bestätigten wiederum die Annahme einer Inhomogenität des Bodens, die bereits bei der fluoreszenzmikroskopischen Methode zu beobachten war.

Untersuchungen mit dem Rastermikroskop waren aber für laufende vergleichende Untersuchungen nicht möglich.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse der elektronenoptischen und der fluoreszenzmikroskopischen Methode wurden ähnlich hohe Keimzahlen erhalten (gleiche Zehnerpotenzen).

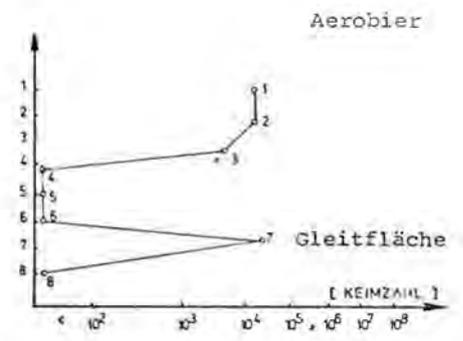
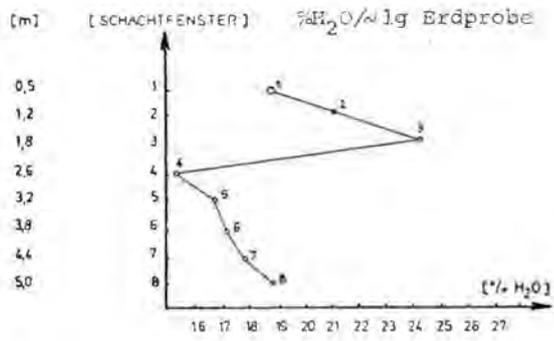
Da aber bei der Lyophilisation der Tonproben tiefe Risse und schattenwerfende Erhebungen entstehen, wodurch viele Keime der Zählung entgehen, wird die Gewinnung exakter Ergebnisse erschwert.

A. Untersuchungen am natürlichen Standort

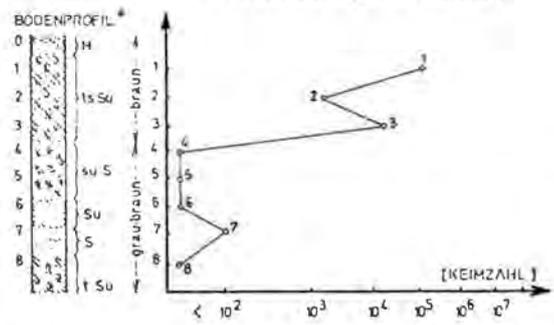
Die in Rutschungsbereichen errichteten und auf ihren Keimgehalt über einen längeren Zeitraum untersuchten Schächte zeigten eine stets vom Normalfall abweichende, vertikale Keimverteilung.

Nach einer anfänglichen Abnahme der Keimzahlen gegen die Tiefe zu trat nach einigen Bodenschichten, in denen der Keimnachweis mit allen hier angeführten Methoden der Keimzählung negativ verlief, unerwartet eine Schichte höheren Keimgehaltes (= Gleitschichte) auf.

Von fünf Untersuchungen des Ilzer Schachtes (Oststeiermark) und insgesamt acht Untersuchungen des Schachtes in der „Saumgasse 20“ (Graz, Rosenberg) illustriert dies ein ausgewähltes Beispiel:



Verdünnungsverfahren



UV-Fluoreszenzmikroskopie

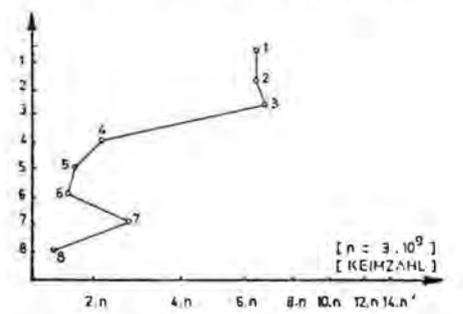


Fig. 4: Schacht bei Ilz mit einer Gleitfläche bei Schachtfenster 7 (Kornverteilung entnommen aus Ch. VEDER, 1972).

Die Entnahmestelle Itz mit einer Gleitfläche in 4,4 m Tiefe zeigt Fig. 4.

Bei einem Vergleich aller im Ilzer Schacht vorgenommenen Untersuchungen ist ein übereinstimmender Verlauf der gesamten Kurvenbilder mit allen angewandten Zählungsmethoden wie folgt festzustellen:

Die hohen Keimzahlen der oberen Horizonte ($\sim 4 \cdot 10^4$ Keime/0,5 ml Probenmaterial) finden sich nur bis zu einer Tiefe von etwa 2 m. Von hier abwärts konnten keine Mikroorganismen mehr nachgewiesen werden. Bei Schachtfenster 7 (4,4 m Tiefe) ist wieder eine starke Mikroorganismenzunahme zu beobachten ($\sim 2 \cdot 10^4$ Keime/0,5 ml Erde).

In einer Gleitfläche ist ein größerer Keimgehalt auch meist mit einem erhöhten Wassergehalt verbunden. Der Kurvenverlauf der Wassergehalte dieses Schachtes zeigt jedoch bei allen Untersuchungen kein ausgesprochenes Maximum in der Gleitfläche (Probenstelle 7), da diese aus sandigem Material besteht.

Nach F. SCHEFFER & P. SCHACHTSCHABEL (1966) ist die gleiche Wassermenge im Boden um so stärker gebunden, je höher der Tongehalt ist. Die Abhängigkeit äußert sich darin, daß bei gleichem Wassergehalt die Wasserspannung der Böden in der Reihenfolge von Sand zu Ton steigt.

Jahreszeitliche Unterschiede konnten vernachlässigt werden, da die aus oberflächennahen Bereichen stammenden Proben erst ab einer Tiefe von 0,5 m entnommen wurden und außerdem während der Frostperiode keine Freilandentnahmen erfolgten.

Für Mikroorganismenzunahmen wie sie auch z. B. in 5,5 m und 8,5 m Tiefe gefunden wurden, gibt es zwei Annahmen:

1. „Ruhende“ Mikroorganismen, die in größerer Tiefe bereits vorhanden sind, könnten durch versickerndes Wasser aktiviert werden.
2. Mikroorganismen der Oberflächenbereiche gelangen mit Hilfe des Wassers als Transportmittel in tiefere Bodenschichten.

Zur Klärung der ersten Frage sollten Würfelversuche im Labor beitragen.

B. Versuchsergebnisse der Erdwürfel im Labor

Zunächst wurden drei mit destilliertem Wasser bzw. mit Bakterien-suspension beimpfte und zwei unbeimpfte Erdwürfel je vier Mal in bestimmten Untersuchungsintervallen innerhalb eines halben Jahres auf ihre vertikale Keimverteilung überprüft. Jedem Bohrkern wurden in 11 gleichen Abständen (je 2 cm) Proben entnommen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden tabellarisch zusammengefaßt und in 216 graphische Darstellungen in der Dissertation von B. LUKAS (1973) mit dem Titel „Untersuchungen des Vorkommens und der Verteilung von Bodenmikroorganismen in Gleitflächen“ behandelt.

Diese Versuche ergaben allgemein, daß nach Injektionen mit destilliertem Wasser bei Tonwürfeln große Keimzahlabnahmen eintraten. Toniges Material besitzt eine schlechte Wasserdurchlässigkeit, so daß eine Wasserzufuhr eine schlechte Belüftung und somit ein stärker reduzierendes Milieu schafft.

Dagegen zeigten Würfel aus sandigem, fest gelagertem Tonmergel bei gleichartigen Injektionen nach etwa vier Monaten eine vorübergehende Zunahme der Keimzahlen. Diese Zunahme dauerte offenbar nur solange an, als das Wasser und die aus den Bodenpartikelchen gelösten Nahrungsstoffe ausreichten.

Injektionen von Bakteriensuspensionen in Erdwürfel aus 4 m Tiefe aus sandigem, sehr fest gelagertem Tonmergel brachten innerhalb von fünf Monaten keine wesentliche Änderung in der Mikroorganismenzahl. Infolge der Zufuhr von Bakteriensuspensionen könnte es nach Th. BECK (1968) zu einer „Mikrobensättigung“ gekommen sein. Für jede Bakterienzelle muß ein sog. Haftpunkt an der inneren Oberfläche der Bodenteilchen vorhanden sein. Dies bedeutet, daß ein gewisses Maximum der Keimzahl nie überschritten wird.

Im Erdwürfel aus 1,50 m Tiefe (festgelagerter Ton) konnte nach vier Monate nach der Beimpfung mit Bakteriensuspension ein steiler Anstieg der Keimzahl festgestellt werden; nach weiteren zwei Monaten nahmen die Keimzahlen ab.

In Proben aus dem rotbraunen Tonbereich waren hingegen laufend Zunahmen der Mikroorganismenzahlen zu beobachten. Anaerobe Mikroorganismen wurden in größerer Zahl ausschließlich in Proben des blaugrauen Tonbereichs — also der Zone mit geringem Sauerstoffgehalt — nachgewiesen.

Keimverteilung in horizontaler Schichtung

Waagrechte Entnahmen von Bohrkernen aus verschiedenen Würfeln und deren Untersuchung in möglichst kleinen Abständen sollten ein Bild der Mikroorganismenverteilung im Boden vermitteln.

In horizontaler Schichtung ermittelte Streuungswerte von z. B. $1 \cdot 10^2$ und $30 \cdot 10^2$ liegen im normalen Fehlerbereich.

Differierende Werte von z. B. $3 \cdot 10^2$ und $3 \cdot 10^6$, die in vertikaler Schichtung festgestellt wurden, bedeuten dagegen echte Zunahmen und sind keine Zufallsergebnisse.

Von insgesamt 41 Laborerdwürfelversuchen [mit einer Wassergehaltsbestimmung für eine dem Probenmaterial äquivalente (~ 1 g) und einer größeren (~ 40 g) Menge und vier quantitativen Keimzahlbestimmungsmethoden à 11 Proben] wurde aus 246 Kurvenbildern ein Versuch ausgewählt.

Fig. 5 zeigt die Ergebnisse aus einem Laborerdwürfel, der in einem Impfhorizont mit Bakteriensuspension beimpft wurde.

[PROBENSTELLE]

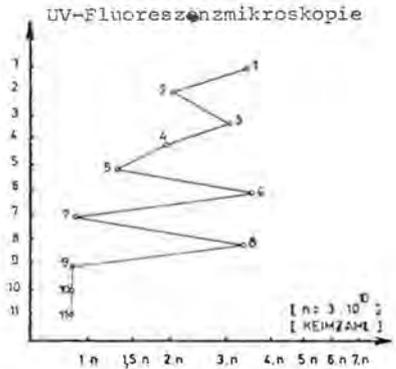
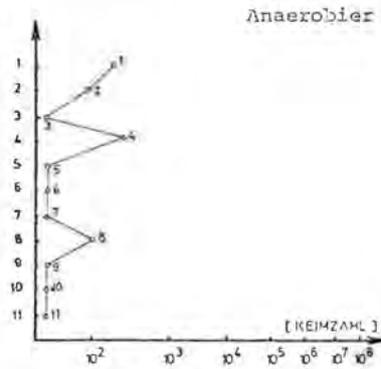
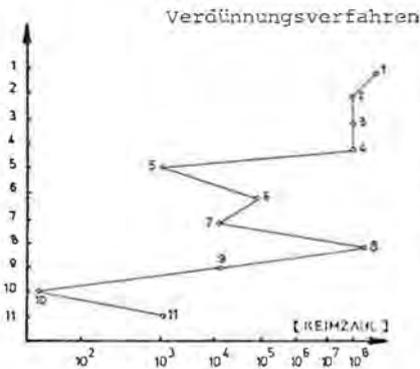
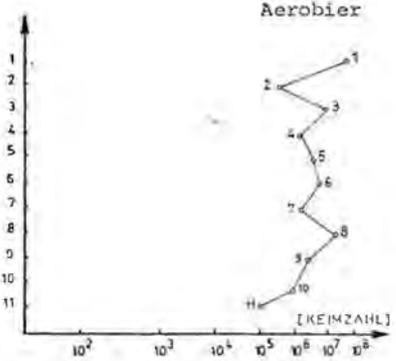
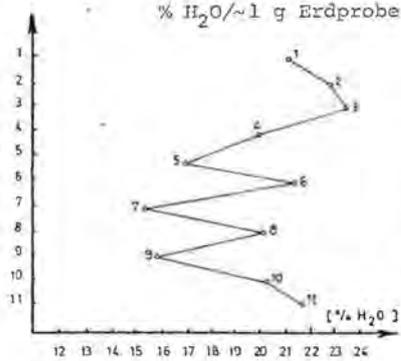
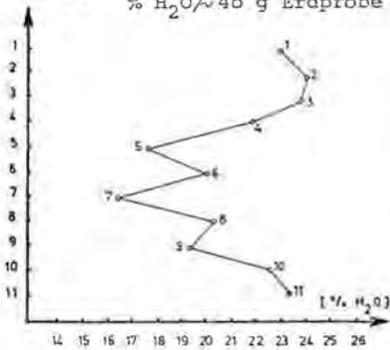


Fig. 5: Laborerdwürfel: Untersuchung 14 Wochen nach der Beimpfung mit Bakteriensuspension. Erdwürfel der Ries aus 1,10—1,50 m Tiefe (Ton, festgelagert), 1 Impfhorizont.

Der Impfhorizont ist im Bereich der Probenstelle 8 gelegen. Die in diesem Bereich zu erwartende Zunahme des Wassergehaltes kommt bei dieser graphischen Darstellung, wegen der bereits erwähnten Abhängigkeit vom Tongehalt, nicht zur Geltung.

Durchsatzversuche mit Keimsuspensionen

Zur Klärung der Organismenverteilung nach zentraler Beimpfung von oben erfolgten Untersuchungen in folgender Weise:

Ein unbeimpfter Würfel aus dem blaugrauen und einer aus dem rotbraunen Bereich wurde als Kontrolle zu den übrigen beimpften Würfeln vier Mal innerhalb von fünf Monaten untersucht. Nach einem Zeitraum von drei Monaten wurden diese Tonwürfel mit 20 ml einer hochkonzentrierten Bakteriensuspension und anschließend mit 50 ml sterilem Wasser behandelt. Die Bakteriensuspension bestand aus Bakterienkulturen, die auf Agarplatten aus dem Erdmaterial dieses Würfels herangezüchtet und in physiologische Kochsalzlösungen eingebracht wurden.

Zunächst wurden 20 ml dieser Bakteriensuspension in einen in das Erdreich ragenden und nach außen abgeschlossenen Mikrotrichter ausgegossen. Nach etwa zwei Tagen war diese Flüssigkeit versickert, und es wurden noch 50 ml sterilen Wassers zugetropft. Bis zum völligen Versickern vergingen beim rotbraunen Ton etwa sieben Tage, beim blaugrauen zehn Tage. Einen Monat nach Impfbeginn wurde dieses so behandelte Tonmaterial auf Veränderungen untersucht.

Zwischen der letzten Untersuchung des noch unbeimpften blaugrauen Würfels vor drei Monaten und diesem Versuch nach oben beschriebener Behandlung ist ein Absinken des Wasser- und Keimgehaltes (mit Ausnahme der oberen Probenstellen) festzustellen (Fig. 6).

Während die aeroben und anaeroben Keimzahlen im Bereich der ersten drei Probenstellen deutlich erkennbare Anhäufungen zeigten, war nach unten zu kein Einfluß dieser Beimpfung nachzuweisen. Der ständig nach dem unteren Würfelbereich zunehmende Wassergehalt erreichte bei Probenstelle 6 den höchsten Wert.

Das Wasser scheint also das Bodenmaterial leichter zu durchdringen, während die Mikroorganismen infolge des geringen Porendurchmessers zurückgehalten werden.

Parallel zu dem eben behandelten Versuch wurde auch eine Untersuchung an einem Tonwürfel des rotbraunen Bereiches durchgeführt. Auch dieser war bereits vorher vier Mal untersucht worden. Drei Monate nach Beendigung dieser Untersuchungen erfuhr er dieselbe Behandlung. Diese Versuchsergebnisse stimmten mit jenen des blaugrauen Tonwürfels vollkommen überein. Anaerobier aber konnten in Proben des rotbraunen Tones nie nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der Möglichkeit der Einbringung von Mikroorganismen durch versickerndes Oberflächenwasser in die Tiefe wurden

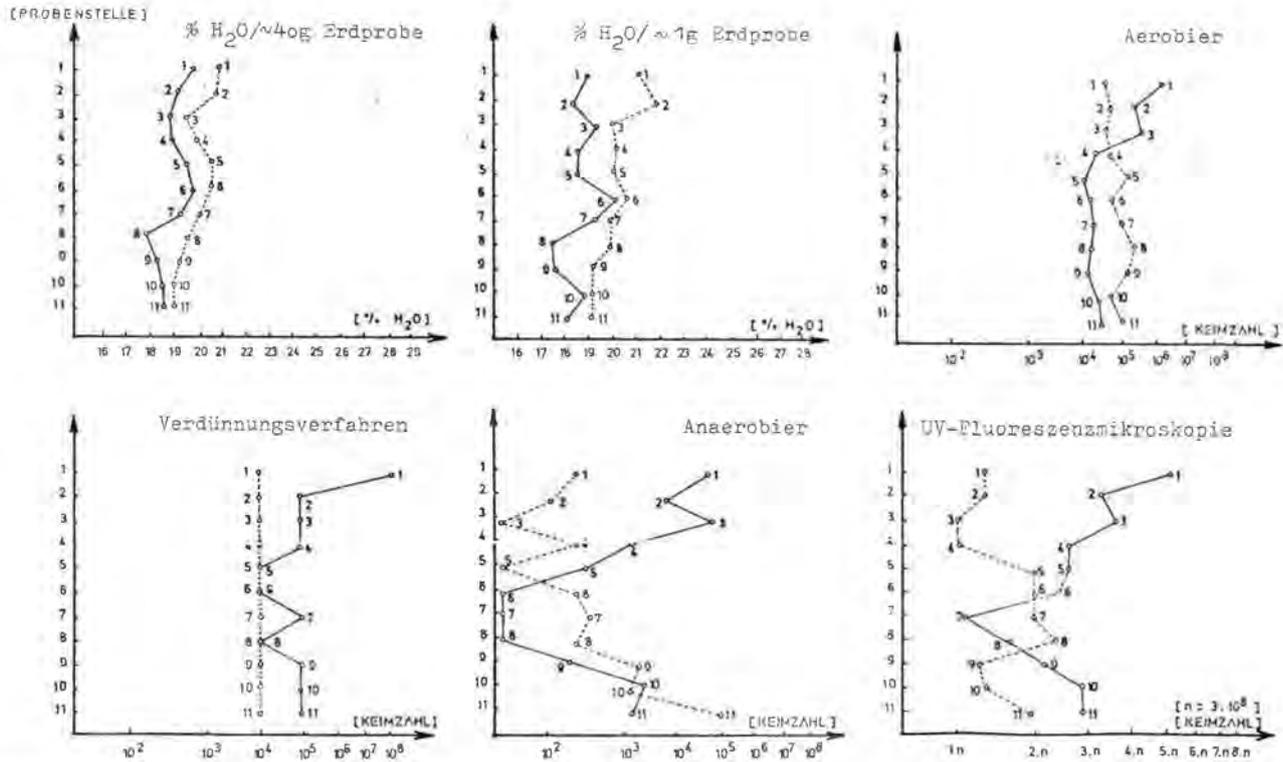


Fig. 6: Laborerdwürfel aus dem blaugrauen Tonbereich. Erdwürfel aus Schemming aus 2,30—2,60 m Tiefe (blauer Schluff bis Ton). Voller Strich Ergebnis der Untersuchung des Erdwürfels 4 Wochen nach der Behandlung mit Bakteriensuspension. Strichlierte Linie Ergebnis der Untersuchung des noch unbeimpften Würfels vor 4 Monaten.

Bakterienstämme aus Oberflächenbereichen mit solchen aus den Rutschungszonen verglichen.

Bei vergleichenden Untersuchungen von Bakterienstämmen der oberflächennahen Bereiche und denen der Rutschungsbereiche kamen physiologische Nachweisverfahren einer „bunten Reihe“ zur Anwendung. Die „bunte Reihe“ wird beim routinemäßigen Nachweis von *Escherichia coli* (siehe L. ACKER et al., 1969, p. 1099) angewendet.

Tabelle 1:

Enzymatische Reaktionen:

Stamm	1V _{2a}	1V _{2b}	1H ₁	1H _{3a}	1H _{3b}	7V ₁	7V ₂	7V ₃	7H _{2a}	7H _{2b}
NO ₃ -Reduktase	+	±	+	—	—	—	—	+	±	±
Methylenblau-reduktase	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
Gelatinase	±	+	+	±	+	+	±	+	+	±
Urease	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Katalase	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
Cytochrom-oxydase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zellulase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Amylase	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+

Färberisches Verhalten:

Gramfärbung	+	+	+	—	+	±	±	+	—	+
Sporenfärbung	+	±	—	+	±	+	+	+	+	+
Neisserfärbung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ziehl Neelson	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Zeichenerklärung zur Tabelle 1:

Bakterienstämme mit der Vorzahl 7 stammen aus dem Schachtfenster 7 des Ilzer Schachtes;

Bakterienstämme mit der Vorzahl 1 stammen aus dem Schachtfenster 2.

Der hinter der Zahl 7 bzw. 1 angegebene Buchstabe H bzw. V gibt an, ob die Probe aus dem vorderen oder dem etwa 20 cm dahinter befindlichen Bereich entnommen wurde.

Enzymatische Reaktionen:

+ = gute Reaktion
 — = keine Reaktion
 ± = schwache Reaktion

Färberisches Verhalten:

+ = gram-positiv
 — = gram-negativ
 ± = gram-labil

Im physiologischen Verhalten und in den Färbungen der Bakterienreinkulturen zeigten sich viele Übereinstimmungen (siehe Tabelle 1), dagegen gab es Unterschiede in der Größe der Kolonien.

Auf festen Nährböden gedeihen aus dem Rutschungsbereich isolierte Bakterienstämme kümmerlich, dagegen entwickeln sich die aus oberflächennahen Bereichen isolierten Reinkulturen sehr gut.

Dieses Verhalten könnte auf Änderungen des Milieus (und mechanischer Komponenten) in der Tiefe zurückzuführen sein.

Einige Reinkulturen aus dem Rutschungsbereich wiesen eine besonders gute Beweglichkeit auf Schwärmagar (wasserhaltiger Agar) auf; der Umschlag des pH-Wertes in der Lackmusmilch zeigte stark zunehmende Alkalität an. Auf Stärkeagar entwickelten sich auch nur Bakterienkolonien der tieferen Bereiche.

Versuche mit farbstoffbildenden Bakterien wurden nicht angesetzt.

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse stellt offenbar das Wasser das Transportmittel der Keime im Boden dar.

Das versickernde Wasser durchdringt das Bodengefüge relativ leicht, während mitgeführte Teilchen, wie Mikroorganismen zum größten Teil zurückgehalten werden, möglicherweise durch adsorptive Wirkungen der Bodenpartikelchen. Diese Bodenfilterwirkung steht sicherlich in einer gewissen Abhängigkeit von der Bodenstruktur, im besonderen vom Porendurchmesser, der Größe der Bodenteilchen selbst und von der Wasserleitfähigkeit im wassergesättigten Zustand.

Von den ursprünglich angenommenen Ursachen der Zunahme des Mikroorganismenvorkommens in tieferen Bodenhorizonten — 1. der Keimaktivierung durch Wasserzufuhr allein; 2. der Einschwemmung von Keimen mit Oberflächenwasser — scheint die zweitgenannte Annahme auf Grund der Ergebnisse der Versuchsreihen mit Erdwürfeln im Labor eher zuzutreffen.

Diese Untersuchungen könnten Hinweise auf die Bewegung des Wassers im Boden liefern.

Bei entsprechender Ausdehnung dieser Studien könnte man auch daran denken, anstelle der Verwendung farbstoffbildender Mikroorganismen durch Anwendung einer „bunten Reihe“, die Mikroorganismen oberflächlicher Bereiche an bestimmten Austrittsstellen nachzuweisen.

Literatur

- ACKER, L. et al.: Handbuch der Lebensmittelchemie. Wasser und Luft, VIII/2, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York 1969.
BECK, Th.: Mikrobiologie des Bodens. Bayr. Landw. Verlag, München—Basel—Wien 1968.
HAJTINGER, M.: Fluoreszenzmikroskopie. Akademische Verlagsgesellsch. Geest & Portig, Leipzig 1959.

- LEHNER, A. & W. NOWAK: Fluoreszenzmikroskopie im Dienste der Bodenbakteriologie. Photographie und Forschung, 7, München 1957.
- LEHNER, A. & W. NOWAK: Neuere Ergebnisse des Direktnachweises von Bakterien im Boden mittels der kombinierten Aufwuchs-Fluorochromierungsmethode. Zbl. f. Bakt., Paras.-kunde, Infek.-krh. und Hygiene, II Abt. 113, Jena 1959.
- LUKAS, B.: Untersuchungen des Vorkommens und der Verteilung von Bodenmikroorganismen in Gleitflächen. Dissertation, Universität Graz 1973.
- MÜLLER, G.: Bodenbiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena 1965.
- OBERZILL, W.: Mikrobiologische Analytik. Hans Carl Verlag, Nürnberg 1967.
- POCHON, J. & H. BARJAC: Traité de Microbiologie des Sols. Paris 1958 (in G. MÜLLER, 1965).
- SCHAEFFER, F. & P. SCHACHTSCHABEL: Lehrbuch der Bodenkunde. Friedrich Enke Verlag, Stuttgart 1966.
- STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1949.
- THIMANN, Kenneth, V.: Das Leben der Bakterien. VEB G. Fischer, Jena 1964.
- VEDER, Ch.: Bericht über die Hauptversammlung der Forschungsgesellschaft für das Straßenwesen, Forschungsgesellschaft für das Straßenwesen im österr. Ing. u. Architekten-Verein, 44, Wien 1966.
- VEDER, Ch.: Bodenstabilisierung durch Ausfall von Grenzflächenerscheinungen. Felsmechanik u. Ingenieurgeol. Suppl. IV, Wien 1968.
- VEDER, Ch.: Grenzflächenerscheinungen in der Bodenmechanik. „Der Bauingenieur“, 47, 3, Berlin 1972.

Summary

On the basis of results obtained from this experiment it may be concluded that water is evidently the transport medium for bacteria in the soil. The seeping water itself penetrates the soil strata with relative ease, while those particles which are carried along with the water, such as microorganisms, are to a great extent held back, possibly because of an adsorptive effect of the soil particles. The soil-filtering effect must be dependent to a certain degree on the soil structure, especially on pore diameter, on the size of soil particles themselves and on the water's conductivity in a water-saturated area.

Of the factors which were originally assumed to be responsible for the increase in the number of microorganisms found in lower soil strata — 1) bacterial activation resulting from the water transport alone; 2) introduction of bacteria by surface water laboratory tests made with earth cubes indicate that the second assumption is the more plausible.

This research might provide suggestive information in helping to explain water movement in the soil. In a logical extension of this study one might also consider using, instead of colorproducing microorganisms, a "colored row" which would identify the sites in surface areas at which the microorganisms emerge.

Anschrift der Verfasser: Professor Dr. K. STUNDL und Dr. B. LUKAS, Institut für Mikrobiologie, Wasser- und Abfalltechnologie, Technische Hochschule Graz, Technikerstraße 4, A-8010 Graz.