

Einfache Übungen zur mikrobiellen Ökologie  
Institut für Mikrobiologie FML-Weihenstephan

**Einleitung:**

Grundsätzlich wurde an der FML-Weihenstephan (ZIEL) bei Professor Dr. Siegfried Scherer in dem dreiwöchigen Praktikum über die ökologische Bedeutung von Mikroorganismen mit begleitender Vorlesung am Mikroskop gearbeitet und verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Letztere werden in diesem Protokoll tabellarisch und in Diagrammen dargestellt und diskutiert.

**1. Isolation von Mikroorganismen aus Wasserproben**

Die Probe (eigener Versuch) wurde am 7. Jun.1997 aus dem Teich der Universität Freising entnommen und die Stammlösung verdünnt. Die entsprechenden Verdünnungsstufen  $10^0$  bis  $10^{-3}$  wurden jeweils auf einem PC-Vollmedium und auf einem hefeselektiven Medium YGC (= Yeast Extract, Glucose, Carbonate –Medium) inkubiert. Die Platten wurden im Kühlschrank bis zur Auswertung 3 Wochen lang aufbewahrt. Dann wurden die Nährböden ausgezählt. Da man davon ausgeht, dass eine Kolonie von einem Keim (Bakterium, Hefepilz) gebildet wird, zählt man die Kolonien oder ermittelt die CFU (Colony Forming Units = Kolonienzahl).

**Tabelle 1:** Eigener Versuch Uniteich

Verdünnungsstufe	PC-Vollmedium (Bakterien)		YGC-Medium (Hefepilze)	
	Kolonienzahl	Keime / ml	Kolonienzahl	Keime / ml
$10^0$	328	3280	124	1240
$10^{-1}$	44	4400	(6)	(600)
$10^{-2}$	(6)	(6000)	0	0
$10^{-3}$	0	0	(1)	(1000)
Mittelwert $\bar{x}$	-	3840	-	1240
%-Anteil Gram-negativer Bakterien	-	100 %	-	-

**Tabelle 2:** Übersicht über alle Wasserproben

+BGII = mit Mineralmedium, o = ohne Stickstoffquelle, N = mit Stickstoffquelle

- = keine Kolonien

Keime pro ml	Uniteich frisch	Uniteich 1 Monat alt	Uniteich ohne BGII	Uniteich +BGII /o	Uniteich +BGII /N	Moo-sach frisch	Moo-sach alt	Isar	Aquarium	Saline
PC (Voll)	2365	3840	780	10200	8193	4000	200	1593	49500	2920
YGC (Pilze)	-	1240	60	950	-	110	-	280	680	-

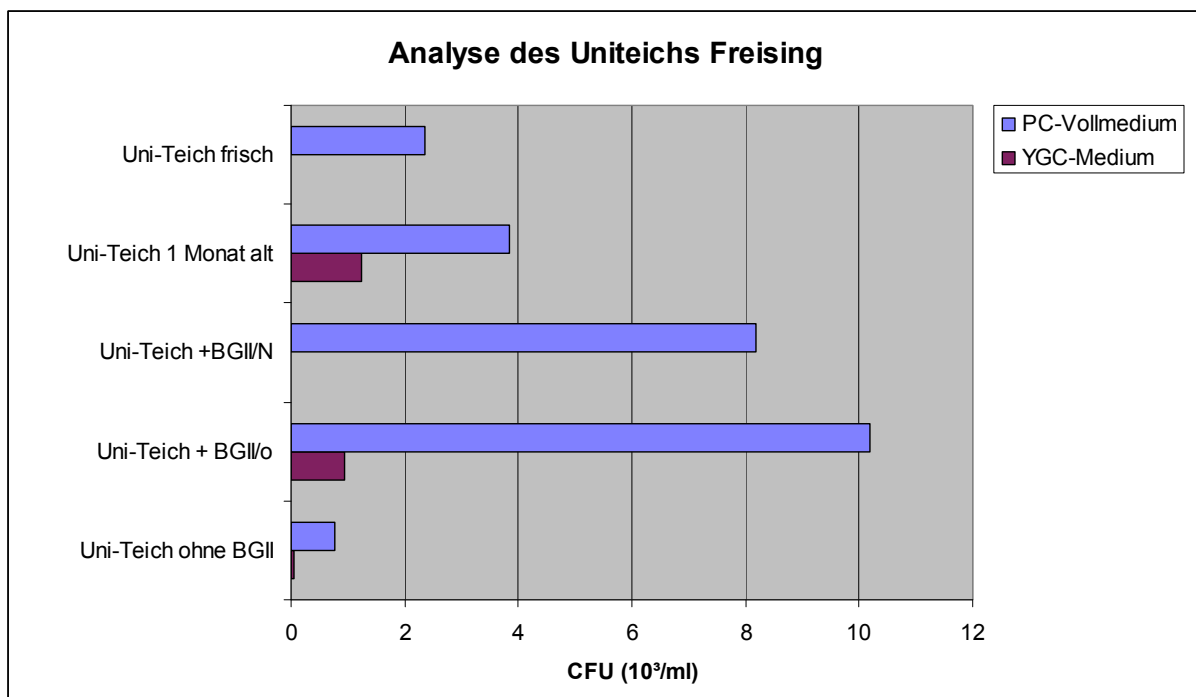
### Ergebnis:

Im Aquarium befindet sich die höchste Bakterienkeimzahl (PC-Medium), im alten Moosachwasser die geringste.

Die höchste Pilz/Hefekolonienzahl (YGC-Medium) befand sich im 1 Monat lang gelagerten Uniteichwasser. In vier Proben konnten keine Pilze oder Hefen nachgewiesen werden (siehe Tabelle).

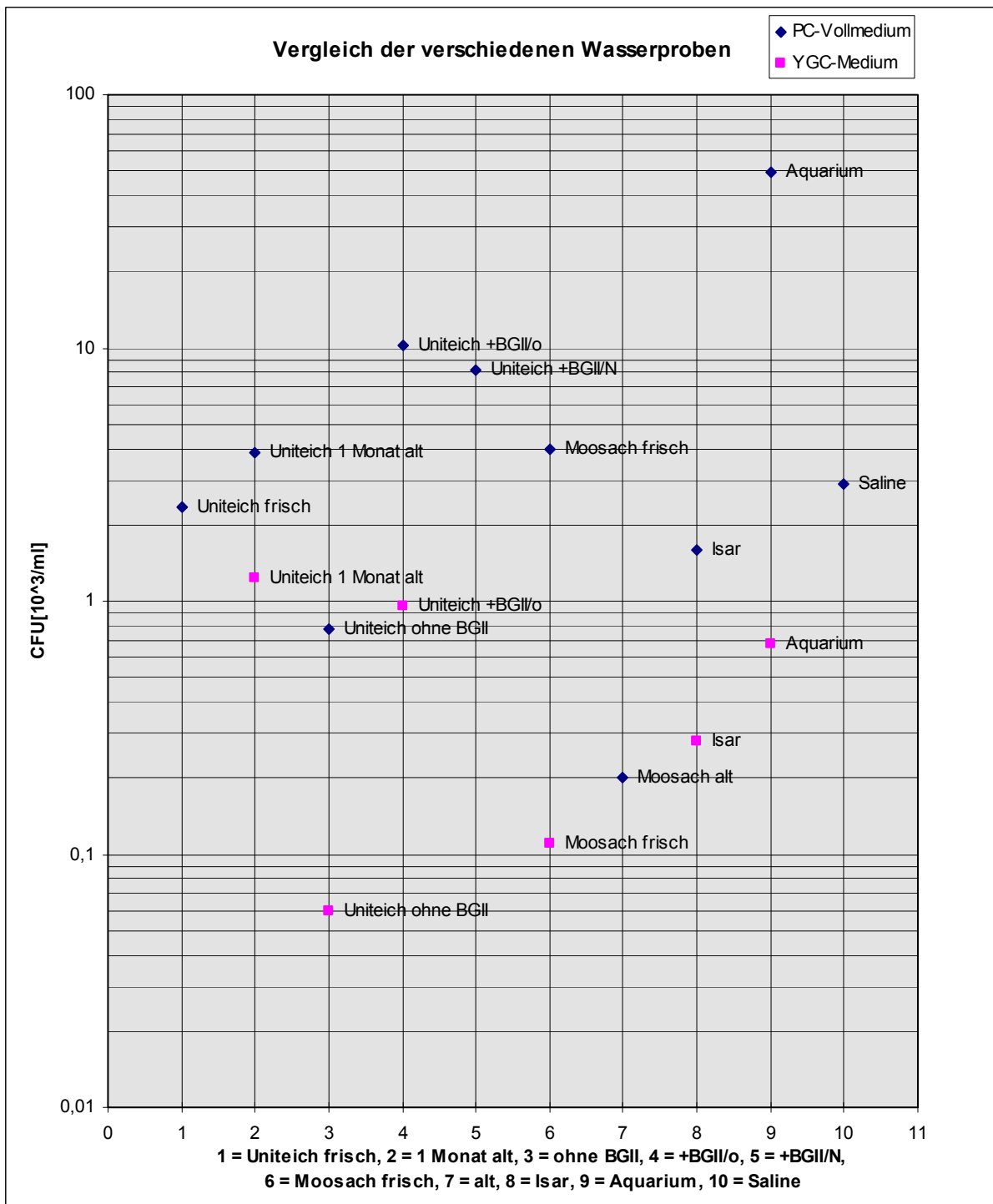
Die Bakterien sind nach dem KOH-Test gramnegativ. Bei diesem Test wird eine Nadel durch die Bakteriensuspension mit der Lauge gezogen. Die Zellen von gramnegativen Bakterien brechen hingegen auf, und die DNA wird freigesetzt, was zu einer Fadenbildung führt. Es handelt sich nach dem Mikroskopbild um *Staphylococcus aureus* und Diplokokken.

Die Hefen sind im Mikroskopbild häufiger als Pilzhyphen. Im Vollmedium (PC) sind mehr Mikroorganismen als im Hefe/Pilzmedium (YGC).



**Diagramm 1:** Analyse des Uniteichs Freising

Bei der Analyse des Wassers vom Freisinger Uniteich fällt auf, dass das frische Wasser weniger Mikroorganismen hat als das einen Monat alte Wasser. Im letzteren wurden am meisten Pilze/Hefen gefunden. Die meisten Bakterien fanden sich im Mineralmedium ohne Stickstoff (BGII/o). Da hier die stickstofffixierenden Bakterien einen Selektionsvorteil haben, sind in dem stickstoffhaltigen Mineralmedium (BGII/N) weniger Bakterien (Konkurrenz). Ohne das Mineralmedium (BGII) wachsen am wenigsten Keime.



**Diagramm 2:** Vergleich der verschiedenen Wasserproben

Vergleicht man die frischen Wasserproben miteinander, dann fällt auf, dass in der Isar im Uniteich und in der Saline die geringste Bakterienzahl gefunden wurde. In den Flüssen sind weniger Pilze/Hefen als im Standgewässer (Uniteich). Im Isarwasser befinden sich im Vergleich zur Moosach mehr Pilze/Hefen.

### Diskussion:

Die Keimzahlen von Moosach und Isar unterscheiden sich vielleicht deshalb, weil die Gewässer unterschiedlich belastet (eutrophiert) sind. Die hohe Bakterienzahl der Moosach müsste mit deren Nährstoffbelastung (N, P) korrelierbar sein.

Dadurch kann sich vielleicht auch der unterschiedliche Gehalt an Pilzen/Hefen erklären. Die Isar fließt schneller und ist durch Stromschnellen stärker mit Sauerstoff angereichert und hat als Gebirgsfluss eine geringere Temperatur. Pilze benötigen diesen Sauerstoff. Dies wird auch durch das Vorkommen einer großen Zahl von Pilzen/Hefen im Aquarium bestätigt, dessen Wasser künstlich mit Sauerstoff angereichert wird.

Normal sind  $10^6$  bis  $10^8$  Bakterien pro Milliliter Wasser enthalten. Davon sind nicht alle Bakterienarten kultivierbar, etwa 90-95 % der dominanten Flora sind erfassbar, das sind ca. 1000 verschiedene Stämme.

Bakterien oder deren Kolonien kommen in verschiedensten Organisationsformen (Diplokokken, Haufen, Ketten, Filamenten) vor.

## 2. Isolation von Mikroorganismen aus Bodenproben

Die eigene Probe stammt aus einer Fichtenwaldbodenaufgabe.

**Tabelle 3:** Eigener Versuch mit Fichtenwaldbodenaufgabe

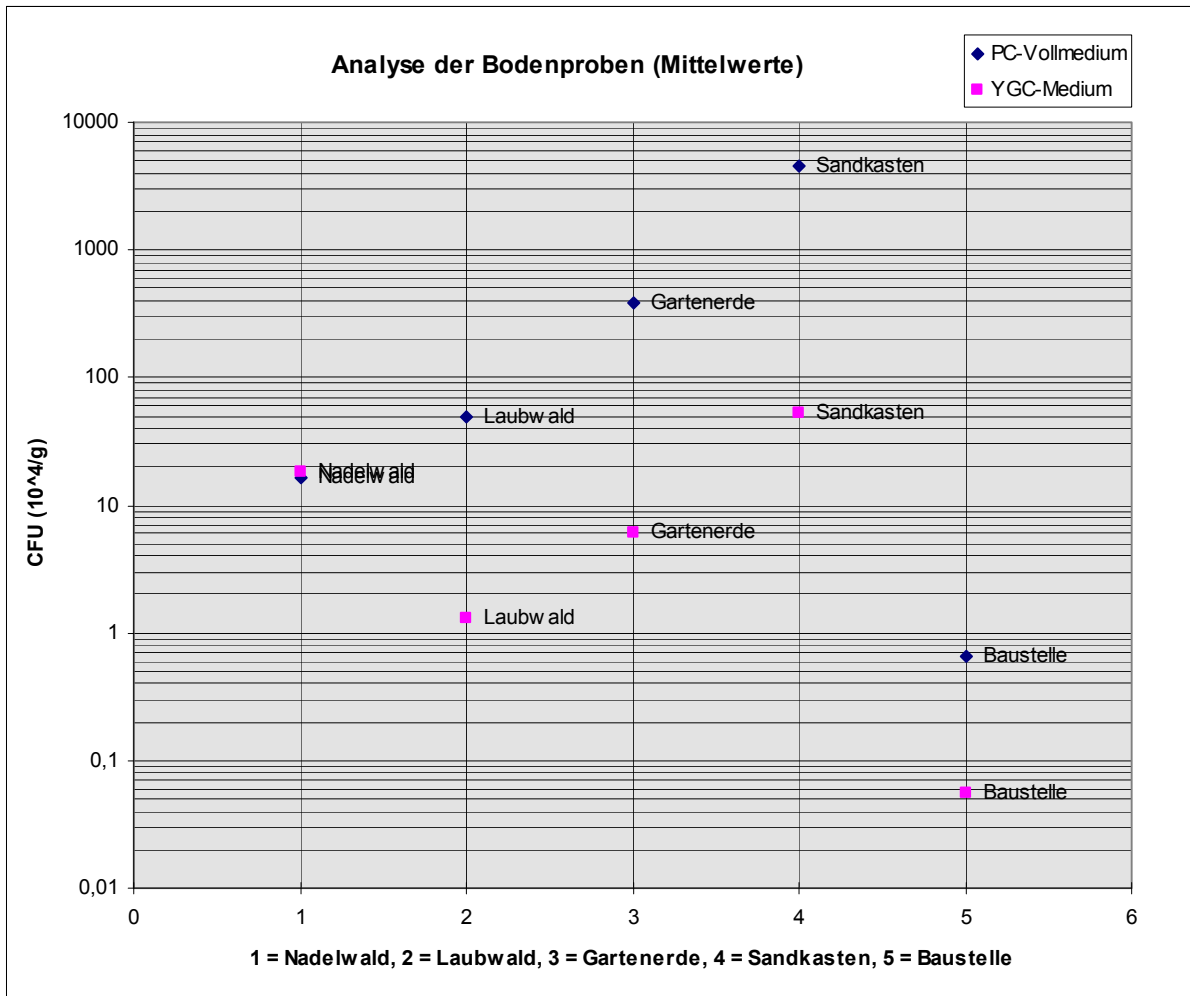
Verdünnungsstufe	PC-Vollmedium (Bakterien)		YGC-Medium (Hefepilze)	
	Kolonienzahl	Keime / ml	Kolonienzahl	Keime / ml
$10^{-3}$	800	80000	zu viele	-
$10^{-4}$	61	61000	8	8000
$10^{-5}$	6	60000	9	90000
$10^{-6}$	1	100000	3	300000
Mittelwert $\bar{\varnothing}$	-	75250	-	132666
%-Anteil Gram-negativer Bakterien	-	50 %	-	-

**Tabelle 4:** Übersicht über alle Bodenproben

Keime pro g Boden	Nadelwald	Nadelwald	Laubwald	Laubwald	Gartenerde	Gartenerde	Sandkasten	Sandkasten	Baustelle	Baustelle
PC-(Voll)	$7,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	-	$2,8 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$
YGC (Pilze)	$1,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^4$	-	$5 \cdot 10^4$	$7,1 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^3$

### Ergebnis:

Im Boden befinden sich mehr Mikroorganismen als im Wasser. Es gibt 10- bis 100-mal mehr Bakterien als Hefen im Boden. Die Wald- und Gartenerden haben hohe Bakterienzahlen ( $10^4$  bis  $10^6$ ). Die höchsten Zahlen für Hefen und Pilze finden sich in der Sandkastenprobe ( $10^7$ ). Die geringsten Zahlen wurden in der Baustellenprobe gefunden ( $10^3$ ). In der Nadelwalderde sind die Keimzahlen für beide Medien fast identisch. Grampositive waren insgesamt häufiger als gramnegative Bakterien.



**Diagramm 3:** Analyse der Bodenproben (Mittelwerte)

**Diskussion:**

Da die Baustellenprobe von einer frisch freigelegten Stelle genommen wurde, konnte sich hier noch keine große Zahl von Mikroorganismen ansiedeln.

Der Unterschied zwischen Nadelwald-, Laubwald- und Gartenerde könnte mit sekundären Pflanzenstoffen (Antimycotika) mit Herkunft aus der Laubschüttung zusammenhängen. Die Mykorrhiza wird besonders von höheren Pflanzen (Laubwald) gesteuert, was sich in der Keimzahl widerspiegelt.

Die Sandkästen sind stark verunreinigt, was durch die Benutzung von Kindergartenkindern erklärt werden kann. Das PC-Medium ist deswegen gut für menschlich pathogene Mikroorganismen einsetzbar.

Böden haben eine große Artenvielfalt, weil sich in der Bodenstruktur eine Vielzahl von Mikronischen befindet. Von der mikrobiellen Bodenflora ist 95 % kultivierbar.

### 3. Isolation von Mikroorganismen von Blättern

Es werden 10 g eines Blattes mit 200 ml Ringer-Lösung (= Natrium-, Kalium- und Kalziumchlorid Lösung) und verdünnt (1:20).

**Tabelle 5:** Eigener Versuch mit Maisblättern

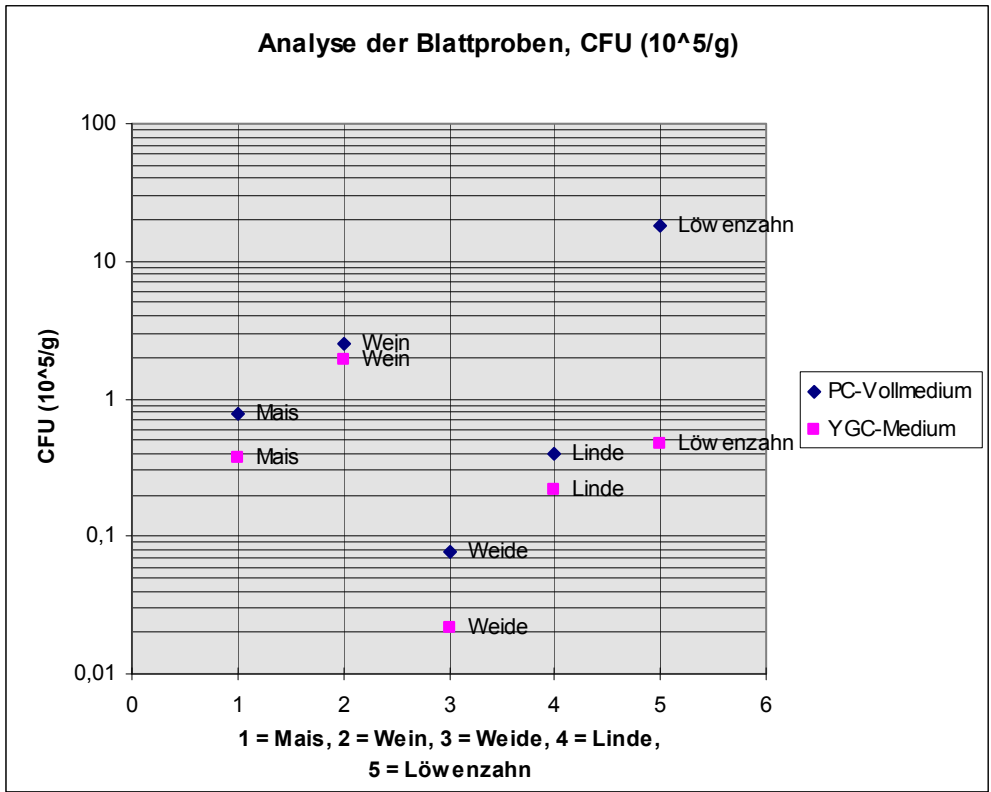
Verdün- nungstufe	PC-Vollmedium (Bakterien)			YGC-Medium (Hefepilze)		
	Kolonien- zahl	Keime /ml (Blattsus- pension)	Keime /g (Blätter)	Kolonien- zahl	Keime /ml (Blattsus- pension)	Keime /g (Blätter)
10 <sup>-1</sup>	-	-	-	500	100000	50000
10 <sup>-2</sup>	1600	32·10 <sup>6</sup>	160000	161	322000	16100
10 <sup>-3</sup>	744	148,8·10 <sup>6</sup>	744000	18	36000	18000
10 <sup>-4</sup>	83	166·10 <sup>6</sup>	830000	3	6000	30000
10 <sup>-5</sup>	10	200·10 <sup>6</sup>	100000	0	-	-
Mittelwert Ø	-	-	683000	-	-	34000
%-Anteil Gramnegativer Bakterien	-	-	<50 %	-	-	-

**Tabelle 6:** Übersicht über alle Blätterarten

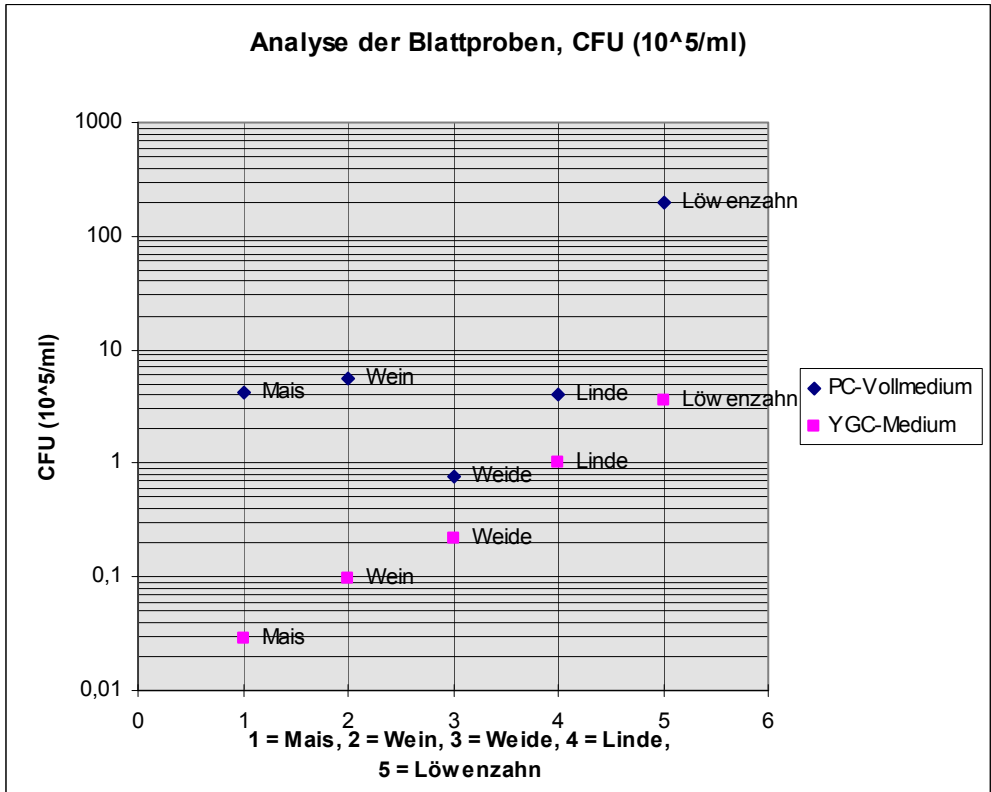
Medi- um, Grup- pe A und B	Mais ( <i>Zea mays</i> )		Wein ( <i>Vitis vinifera</i> )		Weide ( <i>Salix spec.</i> )		Linde ( <i>Tilia spec.</i> )		Löwenzahn ( <i>Taraxacum officinale</i> )	
	CFU/g (Blatt)	CFU / ml	CFU /g (Blatt)	CFU / ml	CFU /g (Blatt)	CFU / ml	CFU /g (Blatt)	CFU / ml	CFU /g (Blatt)	CFU / ml
PC- (Voll) A	1,3· 10 <sup>6</sup>	1,3· 10 <sup>5</sup>	2,9· 10 <sup>5</sup>	1,4· 10 <sup>4</sup>	8,3· 10 <sup>3</sup>	8,3· 10 <sup>4</sup>	3,8· 10 <sup>4</sup>	3,8· 10 <sup>5</sup>	1,7· 10 <sup>6</sup>	8,5· 10 <sup>4</sup>
PC (Voll) B	1,4· 10 <sup>7</sup>	7· 10 <sup>5</sup>	2,2· 10 <sup>5</sup>	1,1· 10 <sup>7</sup>	7,2· 10 <sup>3</sup>	7,2· 10 <sup>4</sup>	4,2· 10 <sup>4</sup>	4,2· 10 <sup>5</sup>	1,9· 10 <sup>6</sup>	3,9· 10 <sup>7</sup>
YGC (Pilze) A	4· 10 <sup>4</sup>	4· 10 <sup>3</sup>	3,2· 10 <sup>5</sup>	1,6· 10 <sup>4</sup>	3,3· 10 <sup>3</sup>	3,3· 10 <sup>4</sup>	1· 10 <sup>4</sup>	1· 10 <sup>5</sup>	5,6· 10 <sup>4</sup>	2,8· 10 <sup>3</sup>
YGC- (Pilze) B	3,5· 10 <sup>4</sup>	1,7· 10 <sup>3</sup>	6,7· 10 <sup>4</sup>	3,3· 10 <sup>3</sup>	1· 10 <sup>3</sup>	1· 10 <sup>4</sup>	1· 10 <sup>4</sup>	1· 10 <sup>5</sup>	3,7· 10 <sup>4</sup>	7,2· 10 <sup>5</sup>

#### **Ergebnis:**

Auf Blättern befinden sich mehr Pilze/Hefen als im Wasser oder im Boden. Es gibt auf den Blättern mehr Grampositive als Gramnegative. Die Bakterien müssen sich auf Blättern gegen Austrocknung (Wind) und Strahlung (Sonne) schützen (vgl. Gramnegative: Wasser 100 %, Boden 50 %). Als zusätzlichen Schutz sind die Bakterienmembranen pigmentiert. In Weide und Linde sind die Keimzahlen pro Gramm Blatt am niedrigsten, was mit antibakteriellen Substanzen (Acetylsalicylsäure) zusammenhängt. Die Löwenzahnblätter haben die höchste Bakterienzahl und größte Anzahl von Pilzen/Hefen pro Gramm Frischgewicht. Die in der Pflanzensuspension gefundenen Keimzahlen für Hefen/Pilze nehmen in der Folge Mais, Wein, Weide, Linde und Löwenzahn zu.



**Diagramm 4:** Analyse der Blattproben, CFU ( $10^5/g$ )



**Diagramm 5:** Analyse der Blattproben, CFU ( $10^5/ml$ )

### Diskussion:

Da die Blattoberfläche bzw. die Mikrohabitate für Mikroorganismen (Zell-junctions) nicht vom Blattgewicht abhängig sind, sind die Ergebnisse der Keimzahlen für Blätter und deren Suspension nur annähernd korrelierbar. Will man die Dichte ( $\zeta^*$ ) [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] der Keime verschiedener Pflanzen vergleichend betrachten, dann muss man den Quotienten zwischen Keimzahl/g (Blatt) und Keimzahl/ml (Suspension) bestimmen. Die CFU-Dichte ist ein relativer Wert, der zum Vergleich verwendet werden kann. Nach Berechnung des Dichtequotienten wird klar, dass Mais und Wein eine hohe Zahl von Pilzen auf ihrer Blattoberfläche tolerieren. Da beide Pflanzen eher dem subtropischen Klima angepasst sind, sind sie vielleicht weniger gut gegen feuchtebedingte Pilze/Hefen geschützt oder beherbergen diese, um Vitamine und Antibiotika synthetisieren zu lassen. Die drei einheimischen Pflanzenarten (Weide, Linde, Löwenzahn) haben hingegen eine ausgeglichene Dichte an Keimzahlen bei Bakterien und Pilze/Hefen.

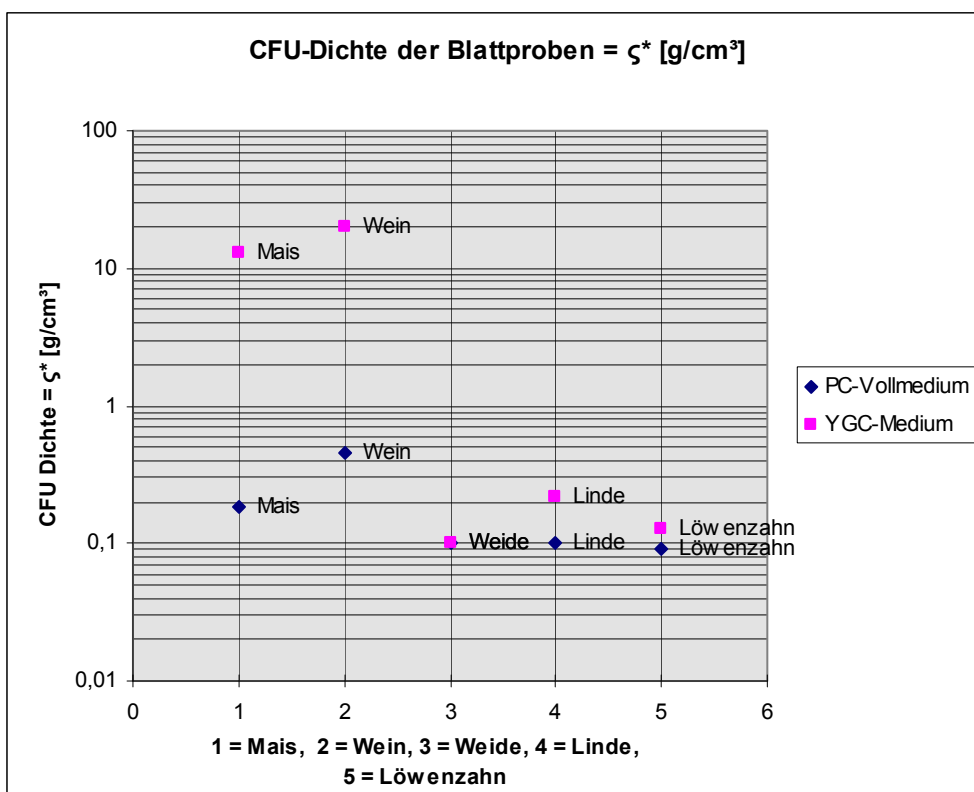


Diagramm 6: CFU-Dichte der Blattproben =  $\zeta^*$  [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]