

TEXTE 29/2004

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

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 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 drei Organismengruppen verbreitet mit einer nähren bzw. weiteren Verwandtschaft zu:

„Betaproteobacteria“	(1) <i>Acidovorax facilis</i> / <i>Acidovorax defluvii</i>
-----------------------------	--

„**Gammaproteobacteria**“ (2) *Pseudomonas veronii*
Actinobacteria (3) *Rhodococcus fascians*

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) *Rhizobium huautlense*
 „**Betaproteobacteria**“ (2) *Burkholderia caryophyllii*
Actinobacteria (3) *Curtobacterium citreum*, (4) *Nocardioideus albus*, (5) *Microbacterium oxidans* 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) *Bacillus agri* und (12) *Bacillus pseudomergasterium*

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) *Sphingomonas suberifaciens*

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

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

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 huaulense</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 koreeniensis</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.