

Christian Griebler, Katrin Hug, Lucas Fillinger, Astrid Meyer und Maria Avramov

Der B-A-E Index – Ein mikrobiologisch-ökologisches Konzept zur Bewertung und Überwachung von Grundwasser

The B-A-E Index – a microbiological-ecological concept for the assessment and monitoring of groundwater

Grundwasser ist wichtiger Rohstoff und Lebensraum für eine vielfältige Organismengemeinschaft. Zur Bewertung und Überwachung von Grundwasserökosystemen bedarf es daher, ähnlich wie für Oberflächengewässer, geeigneter Bioindikatoren und innovativer Konzepte. Indikatorgrößen sind im Idealfall einfach und kostengünstig zu messen, bei maximaler Sensitivität gegenüber der Vielfalt von Störungen und Belastungen, die auf Grundwasserökosysteme einwirken. Im Grundwasser bieten sich als Bioindikatoren vor allem die zahlreich und ubiquitär vorhandenen Mikroorganismen an. Aufgrund der enormen Diversität innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften und in Hinblick auf eine breite Anwendung, empfiehlt es sich, den Fokus auf integrierende Messgrößen wie etwa die „Abundanz und Aktivität der Gemeinschaft“ an Stelle einer taxonomisch orientierten Analyse zu setzen, wie dies für höhere Organismen üblich ist. Bestehende Grundwassermessstellennetze können dafür meist problemlos genutzt werden. Als geeignete Messgrößen werden die Bakteriengesamtzellzahl (GZZ) als Maß für die Biomasse und der zellinterne Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP-Gehalt) als Maß für die Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft vorgeschlagen. Ergänzend kann die Konzentration an assimilierbarem gelösten organischen Kohlenstoff (AOC) als Maß für die mikrobiell schnellverfügbare Energie im Ökosystem herangezogen werden. An verschiedenen Beispielen innerhalb Deutschlands wird dargestellt, dass jeder Grundwasserkörper seinen charakteristischen mikrobiologischen B-A bzw. B-A-E Fingerabdruck hat und unbelastete Grundwässer von organisch belasteten und von Oberflächenwässern durch Kombinieren von GZZ-, ATP- und AOC-Messungen verlässlich unterschieden werden können. Die Anwendbarkeit dieses Bewertungs- und Monitoringkonzepts für spezifische Belastungsszenarien und die damit verbundenen Grenzen der Einsetzbarkeit werden diskutiert.

Schlagwörter: Grundwasser, Monitoring, Ökosystembewertung, Bioindikation

Groundwater is an essential resource and habitat of diverse organismic communities. As a consequence, the assessment and monitoring of groundwater require the same routine as for surface waters, i.e. the application of appropriate bioindicators, ecological criteria and innovative concepts. Indicators are, in the best case, easy to measure, with analysis low in price, and highly sensitive to a multitude of disturbances that act at an ecosystem. Here, groundwater ecosystem microorganisms, that are abundant and ubiquitously distributed, serve as promising bioindicators. Because of the immense biodiversity within microbial communities and with respect to a broad routine application, the focus on integrating microbial measures, such as microbial biomass and activity, is recommended, instead of a taxonomic-phylogenetic approach as generally applied for metazoa. It is of advantage that existing groundwater monitoring networks may be used for sampling. The microbial measures we propose are total prokaryotic cell counts (GZZ) as biomass measure, and cellular ATP as activity measure. Additionally, the concentration of assimilable dissolved organic carbon (AOC) can be determined as measure of energy ready available to microbes. By means of different examples, we show that a characteristic B-A or B-A-E fingerprint can be assigned to individual aquifers or groundwater bodies. Such a fingerprint, i.e. the B-A-E Index, allows to distinguish natural (non- or only moderately contaminated) from polluted groundwater or surface water. The pros and cons of this new microbiological-ecological sound assessment and monitoring scheme are discussed.

Keywords: groundwater, monitoring, ecosystem assessment, bioindicators

1. Einleitung

Spätestens seit Inkrafttreten der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (EG-WRRL, 2000) ist die Erfassung des ökologischen Zustands der meisten Oberflächengewässer in der EU obligatorisch. Auch für grundwasser-abhängige Ökosysteme (z. B. Feuchtgebiete) sind bindende ökologische Vorgaben in Vorbereitung (EC, 2012; EC, 2015). Für Grundwasserökosysteme selbst gibt es bisher keine gesetzlich festgelegten Vorgaben zur Berücksichtigung ökologischer Kriterien (HAHN et al., 2018). Auch international gibt es dafür bislang nur wenige Beispiele. Ein viel zitiertes ist die Schweizer Gewässerschutzverordnung (GSCHV, 1998). Für die Biozönosen in unterirdischen Gewässern wird darin festgehalten, dass diese naturnah und standortgerecht, sowie typisch für nicht oder nur schwach belastete Gewässer sein sollen (GSCHV, 1998). Ähnliche Vorgaben finden sich in der

wasser-bezogenen Gesetzgebung mancher Staaten Australiens (z. B. die „New South Wales State Groundwater Dependent Ecosystems Policy“ [NSW-SGDEP, 2002], die „Guideline of the Western Australian Environmental Protection Authority“ [EPA, 2003] und die modernen „Water Sharing Plans“), die das gemeinsame Ziel haben, den Wasserbedarf für die Gesellschaft, Ökonomie und Umwelt gleichermaßen in einem integrativen Ansatz zu regeln. Im Zuge der Ausformulierung der Europäischen Grundwasser-richtlinie (EG-GWRL, 2006), einer Tochterrichtlinie der EG-WRRL, gab es im Vorfeld intensive Bemühungen und Forderungen von Seiten der Wissenschaft und Nichtregierungsorganisationen (NGO's), ökologische Kriterien auch für Grundwässer festzulegen (DANIELOPOL et al., 2004; KEPPNER, 2005; DANIELOPOL et al., 2006; 2007). Im Jahr 2006 veröffentlicht, hält die EG-GWRL in ihrem einleitenden Abschnitt fest, dass Grundwasser nicht nur Ressource sondern auch Lebensraum ist, Schutzmaßnahmen

wichtig sind und weitere Forschung notwendig ist, um geeignete Kriterien für die Gewährleistung einer besseren Grundwasserqualität zu entwickeln. Demzufolge ist die Entwicklung geeigneter Bewertungs- und Überwachungskonzepte der im Moment wichtigste Schritt für die zukünftige Berücksichtigung ökologischer Aspekte in der Bewirtschaftung und zum Schutz unserer Grundwasserressourcen.

Es finden sich in der Literatur bereits viele Beispiele, die den möglichen Einsatz von Mikroorganismen (BRIELMANN et al., 2009; Pronk et al., 2009; STEUBE et al., 2009; STEIN et al., 2012; GRIEBLER et al., 2010) oder verschiedener Grundwasser-Metazoen (Fauna) (MALARD et al., 1996; MÖSSLACHER, 1998; DUMAS et al., 2001; HAHN, 2006; SCHMIDT et al., 2007; BERKHOFF et al., 2009; BORK et al., 2009; STEIN et al., 2012) als sensitive Zeiger (Bioindikatoren) für anthropogene Störungen und Belastungen in Grundwasserökosystemen nahelegen. Erste Vorschläge für ein integratives Grundwasserbewertungskonzept – unter Verwendung von mikrobiellen und faunistischen Kriterien – kommen aus Australien (KORBEL & HOSE, 2011; 2017) und Deutschland (GRIEBLER et al., 2014a). Das vom Deutschen Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) in der Fördermaßnahme „Regionales Wassermanagement“ (ReWaM) geförderte Projektekonsortium „GroundCare“ hat sich den zukünftigen Einsatz ökologischer Bewertungs- und Überwachungskriterien im Grundwasser zum Ziel gesetzt und entwickelt dafür eine flexibel einsetzbare Tool-Box. Ein wichtiges „Tool“ ist der hier vorgestellte B-A-E Index.

Grundwässer und Aquifere sind immer von Mikroorganismen besiedelt (GRIEBLER & LUEDERS, 2009). Diese ubiquitäre Präsenz macht sie zu idealen Kandidaten für eine ökologische Bewertung und auch für ein langfristiges Monitoring. Da es wegen der immensen Diversität in den mikrobiellen Gemeinschaften und der enormen funktionellen Redundanz, trotz moderner molekularer Methoden, schwierig ist, einzelne Mikroorganismen bzw. phylogenetische Gruppen als Indikatoren anzuwenden, wird vorgeschlagen, sich auf integrierende mikrobielle Messgrößen zu konzentrieren. Im Folgenden wird dazu das sogenannte B-A-E Konzept vorgestellt. Die Buchstaben B-A-E stehen für Biomasse, Aktivität und Energie, drei Schlüsselgrößen in jedem Ökosystem. Hinter dem Begriff Biomasse steht die Gesamtzahl an prokaryotischen Zellen (Bakterien und Archeen). Die Konzentration an zellinternem Adenosintriphosphat (ATP) in einer Wasserprobe steht für die mikrobielle Aktivität, und als für Mikroorganismen unmittelbar verfügbare Energie wird die Konzentration des assimilierbaren organischen Kohlenstoffs (AOC) bestimmt. Mit Hilfe der B-A-E Parameter, die standardisiert, einfach und kostengünstig zu messen sind, können Grundwässer mikrobiologisch-ökologisch charakterisiert und Grundwasserleitern bzw. einzelnen Grundwasserkörpern ein mikrobiologischer Fingerabdruck zugeordnet werden. Im Folgenden wird an verschiedenen Beispielen aufgezeigt, dass bei einer Beeinträchtigung der Grundwasserqualität – beispielsweise bei einer organischen Belastung – rasch eine Veränderung des ursprünglichen mikrobiologischen Fingerabdrucks eintritt. Auf diese Weise können unbelastete und naturnahe Grundwässer schnell und zuverlässig von belasteten Grundwässern oder auch von Oberflächenwässern abgegrenzt werden. Eine breite Anwendbarkeit dieses mikrobiologisch orientierten Bewertungs- und Monitoringkonzepts für weitere Belastungsszenarien wird eingehend diskutiert.

2. Material & Methoden

2.1 Herkunft und Art der Grundwasserproben

Im Rahmen der Entwicklung des B-A-E Konzepts wurden mikrobiologische Daten zu Grundwässern unterschiedlicher Herkunft und Qualität ausgewertet, die verschiedenen Forschungsprojekten entstammen. Die alleinige Voraussetzung war das Vorliegen von GZZ-, ATP- und AOC-Daten, welche mittels einer einheitlichen und zumindest für den wissenschaftlichen Bereich standardisierten Methode ermittelt wurden. Der Großteil der ausgewählten Daten entstammt dem vom Umweltbundesamt (UBA) geförderten Projekt „Entwicklung biologischer Bewertungsmethoden und -kriterien für Grundwasserökosysteme“ (UFO-Plan Nr. 3708 23 200; GRIEBLER et al., 2014a). In die Auswertung eingeschlossen wurden hier 165 Grundwasserproben, die auf Basis physikalisch-chemischer Analysen keine offensichtliche Belastung zeigten und für die GZZ- und ATP-Werte vorlagen. Nitrat wurde dabei als Belastungszeiger aufgrund seiner ubiquitären Präsenz nicht berücksichtigt. Für 78 der Proben lagen auch AOC-Werte vor. Die im UBA-Projekt gesammelten Grundwasserproben entstammten verschiedenen Grundwasserleitertypen (Locker-, Kluft- und Karstleiter), verschiedenen hydrogeologischen Bezugseinheiten (KUNKEL et al., 2004), und verschiedenen geografischen Regionen Deutschlands (Abb. 1; für weitere Details siehe GRIEBLER et al., 2014a). Dieser UBA-Datensatz bildete in der folgenden Auswertung die Grundwasser-Referenzgruppe. Organisch belastetes Grundwasser wurde im Rahmen mehrerer vom BMBF (Förderschienen KORA; Vorhaben 02WN0462) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG – FOR 525; GR 2107/1-2 und GR 2107/3-1) geförderter Projekte an einem ehemaligen Gaswerksstandort in Düsseldorf-Flingern gesammelt. Diese 66 Grundwasserproben waren alle anoxisch und wiesen eine variierende Belastung (gering bis stark) mit aromatischen Kohlenwasserstoffen (z. B. Toluol, Benzol, Naphthalin), Sulfid und reduziertem Eisen (Fe(II)) auf (ANNESER et al., 2008; 2010; JOBELIUS et al., 2011). Die Oberflächenwasserproben wurden in dem vom BMBF geförderten GroundCare-Projekt („Parametrisierung und Quantifizierung von Grundwasser-Ökosystemdienstleistungen als Grundlage für eine nachhaltige Bewirtschaftung“, Förderkennzahl 033W037A) gesammelt und analysiert. Diese Proben entstammen der Isar (Mittenwald), dem Lech (Augsburg), der Isar und der Würm (München), dem Main (Würzburg), und dem Tegelsee (Berlin) (Abb. 1). Weitere Oberflächenwasserproben wurden im Rahmen des Helmholtz POF 3-Programms (Erde und Umwelt) im Längsverlauf der Holtemme (Bode-Einzugsgebiet) genommen.

2.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl (Komponente „Biomasse“)

Für die Gesamtzellzahlbestimmung wurden 500 µL Wasserprobe mit 6 µL SYBR-Green I Arbeitslösung (10 µL SYBR Green I nucleic acid stain [10000x, Invitrogen-Thermo Scientific, MA] + 990 µL Tris Puffer [10 mM; pH 8.0]) versetzt und gevortext. Die Proben wurden anschließend für 13 min bei 37 °C im Dunkeln auf einem Thermomixer inkubiert. Der Inkubation folgte die Zugabe von 100 µL einer Referenz-Bead-Lösung (Trucount Tubes, Becton Dickinson, NJ) als interner Standard und erneutes Mischen. Messungen wurden in einem FC500 CYTOMICS Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Brea, CA) durchgeführt. Das Gerät war mit einem Blaulichtlaser ausgestattet (488 nm).

Über die beiden Kanäle „Sidewards Scatter“ und „Fluoreszenz“ (FL1 569±15 nm) wurden die prokaryotischen Zellen von etwa-

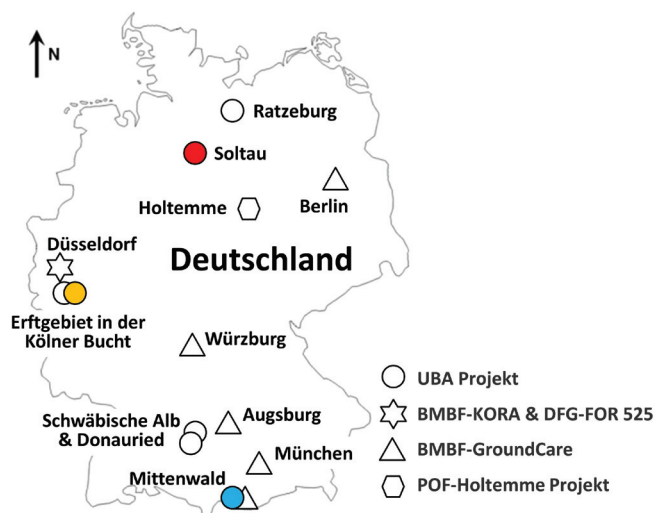


Abbildung 1

Lageplan zur Herkunft der gesammelten Grundwasser- und Oberflächenwasserproben. Die farbigen Symbole beziehen sich auf die drei Beispielstandorte Mittenwald, Erftgebiet und Soltau, die in Abbildung 3 miteinander verglichen werden.

Location and origin of groundwater and surface water samples included in this study. The coloured symbols refer to the three sites Mittenwald, Erftgebiet and Soltau which are compared with each other in more detail in Figure 3.

igen anorganischen und anderen organischen Partikeln abgetrennt und quantifiziert (BAYER et al., 2016). Die Flussrate während der Messung betrug etwa $30 \mu\text{L min}^{-1}$ bei einer Messzeit von 60 sec. Es wurden in allen Fällen 3 biologische mit je 2 technischen Replikaten gemessen. Für eventuell notwendige Verdünnungen als auch für die Negativkontrolle (Blank) wurde gefiltertes $0.1 \mu\text{m}$ Reinstwasser (MQ, Merck, Kenilworth, NJ) verwendet. Weitere Details zur Messung und Berechnung finden sich in HAMMES et al. (2008), PREST et al. (2013), und BAYER et al. (2016).

2.3 Bestimmung des ATP Gehalts (Komponente „Aktivität“)

Zur ATP-Quantifizierung wurde der BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega Corp., Madison, WI) mit geringen Modifikationen nach Anleitung des Herstellers verwendet. Jede Messreihe wurde durch eine Serie an Standards (Verdünnungsreihe einer ATP-Stammlösung in sterilem ATP-freiem Gibco Wasser; Fisher Scientific, Waltham, MA) begleitet. Als Blindwert diente 1 mL steriles ATP-freies Gibco Wasser. Für die Bestimmung der Gesamt- ATP-Konzentration in einer Wasserprobe wurde 1 mL Probe/Standard/Blindwert und das Reagenz BacTiter-Glo für mindestens zwei Minuten auf einem Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) auf 38°C erwärmt. Anschließend wurden $50 \mu\text{L}$ des Reagenz zu 1 mL Probe/Standard/Blindwert gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit (1 min bei 38°C) wurde die Lumineszenz im GloMax 20/20 Luminometer (Promega Corp., Madison, WI) gemessen. Um zwischen extrazellulärem und intrazellulärem ATP unterscheiden zu können wurde eine Parallelprobe zuerst durch einen sterilen $0.1 \mu\text{m}$ Spritzenfilter (Merck, Kenilworth, NJ) filtriert (mit mindestens 5 mL Probenwasser vorspülen) bevor wie zuvor beschrieben der ATP Wert bestimmt wurde (= extrazelluläres ATP). Die Menge an intrazellulärem ATP wurde aus der Differenz von Gesamt-ATP und extrazellulärem ATP berechnet. Die im Luminometer ermittelten RLU (relative light unit) Werte wurden mit Hilfe der Standardkurve in pM ATP umgerechnet. Für

alle Wasserproben wurden biologische Triplikate gemessen. Weitere Details zur ATP-Bestimmung im Grundwasser finden sich bei EYDAL et al. (2007) und HAMMES et al. (2010b).

2.4 Bestimmung des assimilierbaren organischen Kohlenstoffs (Komponente „Energie“)

Für die Bestimmung des AOC wurden drei Parallelproben von je 80 mL Probe in gemuffelte (450°C für 4 h) Glasflaschen (100 mL Schott, Mainz, Deutschland) überführt. Die dazugehörigen Schraubdeckel (PTFE mit Teflonseptum) wurden in einer Natriumpersulfat-Lösung (100 g L^{-1} , 1 h, 60°C) eingelegt und anschließend mit Laborreinstwasser (MQ) mehrfach gespült. Die Wasserproben wurden anschließend für den Zeitraum von 30 Tagen bei in situ-Temperatur auf einem Schüttler (100 rpm) im Dunkeln inkubiert. Zu Beginn und zu Ende der Inkubationszeit (t_0 und t_{30}) wurde die Gesamtzellzahl (GZZ) mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe oben). Abschließend wurde die Zunahme an Zellen (ΔGZZ) über die Zeit – entspricht der Menge an assimilierten organischen Kohlenstoff – in Kohlenstoff umgerechnet. Für Grundwasserproben wurde ein Umrechnungsfaktor von 20 fg C_{org} pro Zelle (GRIEBLER et al., 2002), für Oberflächenwasserproben ein Faktor von $1 \mu\text{g AOC L}^{-1} = 1 \times 10^7$ Zellen (VITAL et al., 2007) verwendet.

2.5 Der mikrobiologische Fingerabdruck - Statistische Auswertung

Mit Hilfe statistischer Verfahren (z. B. Mahalanobis-Distanz) können die drei ausgewählten Kenngrößen GZZ, ATP und AOC zu einem gemeinsamen Wert, einem B-A-E Indexwert verrechnet werden. Im Grundsatz basiert der mikrobiologische Fingerabdruck auf der Verteilung von Datenpunkten in einem multivariaten, dreidimensionalen Raum, der durch die drei Größen GZZ, ATP und AOC definiert ist. Diese Verteilung wird nicht nur von der Varianz der einzelnen Variablen bestimmt, sondern zusätzlich von möglichen Korrelationen der Variablen untereinander. Dementsprechend ist es wichtig alle drei Kenngrößen gleichzeitig, d. h. multivariat zu berücksichtigen, da bei einzelner Betrachtung der jeweiligen Parameter, z. B. in Form von Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, mögliche Korrelationen außeracht gelassen werden und B-A-E Signatures nicht ausreichend beschrieben werden können. Die Mahalanobis-Distanz ist ein Maß für die Streuung von Datenpunkten in einem multivariaten Raum, welche die Entfernung eines einzelnen Punktes zum Zentrum der multivariaten Verteilung angibt. Sie berechnet sich wie folgt:

$$D = \sqrt{(X - \mu)' \times S^{-1} \times (X - \mu)},$$

wobei der Zufallsvektor X die Koordinaten eines Datenpunktes, d. h. der einzelnen Werte zu jeder Variable, beinhaltet, der Erwartungswertvektor μ die Koordinaten für den Mittelpunkt einer Datengruppe angibt, der sich aus den Mittelwerten der jeweiligen Variablen zusammensetzt, und S die Varianz-Kovarianz-Matrix darstellt, wodurch also mittels der Kovarianz Korrelationen zwischen Variablen in der Berechnung mit berücksichtigt werden.

Für die Berechnung des B-A-E Index folgt daraus:

$$X = \begin{bmatrix} B_i \\ E_i \\ A_i \end{bmatrix}; \mu = \begin{bmatrix} \bar{B}_{Ref} \\ \bar{A}_{Ref} \\ \bar{E}_{Ref} \end{bmatrix}; S = \begin{bmatrix} \text{var}(B_{Ref}) & \text{cov}(B_{Ref}, E_{Ref}) & \text{cov}(B_{Ref}, A_{Ref}) \\ \text{cov}(B_{Ref}, E_{Ref}) & \text{var}(E_{Ref}) & \text{cov}(A_{Ref}, E_{Ref}) \\ \text{cov}(B_{Ref}, A_{Ref}) & \text{cov}(A_{Ref}, E_{Ref}) & \text{var}(A_{Ref}) \end{bmatrix}$$

X = Vektor mit individuellen B-A-E Werte zu einem beliebigen Datenpunkt; μ = Vektor mit B-A-E Mittelwerten der Referenzgruppe;

S = Kovarianzmatrix der Referenzgruppe (var = Varianz; cov = Kovarianz).

3. Ergebnisse

Die im Rahmen des UBA-Projekts gesammelten und mikrobiologisch charakterisierten naturnahen Grundwasserproben bilden für unseren B-A-E Ansatz die Referenzgruppe. Sie vereint Grundwässer aus verschiedenen Grundwasserleertypen, hydrogeologischen Bezugseinheiten und geografischen Regionen in Deutschland. Trägt man die Werte für GZZ (X-Achse) gegen die ATP-Werte (Y-Achse) für alle natürlichen und naturnahen Grundwässer auf, bilden diese eine in sich geschlossene Punktwolke, mit Ausnahme zweier sehr sauberer Grundwässer, die sich durch eine sehr niedrige GZZ auszeichnen (Abb. 2A). Innerhalb der Referenzgruppe bilden alle sauerstofffreien (anoxischen) Grundwässer eine in sich geschlossene Untergruppe, die vor allem durch eine erhöhte GZZ charakterisiert ist (Abb. 2B). Oberflächenwässer, die im Vergleich zum natürlichen und naturnahen Grundwasser, generell mehr und aktivere Bakterien enthalten, trennen sich im B-A Plot signifikant von den Grundwässern ab ($p < 0.0001$; MANOVA; Abb. 2B). Der fließende Übergang ist vor allem dadurch bedingt, dass extrem sauberes und oligotrophes Oberflächenwasser (z. B. die alpine Isar bei Mittenwald) und na-

turnahes, anoxisches Grundwasser aus der deutschen Tiefebene sich in manchen mikrobiologischen Eigenschaften (z. B. GZZ) überschneiden. Dennoch ist auch hier mittels MANOVA zwischen diesen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Verteilung gegeben ($p < 0.0001$).

Ähnlich wie die Oberflächenwässer können die organisch belasteten Grundwässer vom ehemaligen Gaswerksgelände in Düsseldorf von der Grundwasser-Referenzgruppe signifikant abgetrennt werden (MANOVA; $p < 0.0001$; Abb. 2C). Die organisch belasteten Grundwässer zeichnen sich im Vergleich durch erhöhte GZZ- und/oder ATP-Werte aus. Der Übergang zwischen den anoxischen Grundwässern aus Ratzeburg und Soltau in der Norddeutschen Tiefebene und den nur gering organisch verunreinigten Grundwässern aus Düsseldorf ist erneut fließend (Abb. 2C) aber dennoch signifikant (MANOVA; $p < 0.0001$). Stellt man den kontaminierten Grundwässern aus Düsseldorf jedoch ausschließlich die naturnahen Grundwässer aus der geographischen Region bzw. derselben hydrogeologischen Bezugseinheit gegenüber, trennen sich diese noch deutlicher voneinander ab (MANOVA; $p < 0.0001$; Abb. 2D). An diesem Beispiel zeigt sich bereits, dass einzelne hydrogeologische Bezugseinheiten, Aquifere und mehr noch Grundwasserkörper, in der Regel gut definierte Untergruppen (Sub-Populationen) im deutschlandweiten Referenzdatensatz bilden und sich dadurch noch besser von belasteten Grundwässern und Oberflächengewässern aus derselben Region abtrennen lassen.

Wie solche Sub-Populationen aussehen ist im Folgenden für die Standorte Mittenwald, das Erftgebiet und Soltau im Vergleich zum bereits oben dargestellten Referenzdatensatz gezeigt (Abb. 3). Neben den Daten zu GZZ und ATP, wurden hier auch AOC-Werte berücksichtigt. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, bildet der sehr oligotrophe und kaum anthropogen beeinflusste Aquifer in Mittenwald (alpiner Raum, Nördliche Kalkalpen, Talfüllung, Lockergesteinsleiter) eine Untergruppe, deren Grundwasser sich vor allem durch eine sehr niedrige GZZ auszeichnet. Das natürlicherweise sauerstofffreie Grundwasser im Aquifer bei Soltau (Norddeutsche Tiefebene, Sande und Kiese Norddeutschlands, Lockergesteinsleiter) trennt sich davon, mit seinen deutlich höheren GZZ, sowie etwas erhöhten ATP-Werten und einem sehr viel breiteren AOC-Spektrum, deutlich ab. Die durchwegs oxischen, teilweise aber auch hypoxischen Grundwässer aus den beiden Aquifern der Erft- und Rurscholle (Schotter und Kiese des Niederrheins, Lockergesteinsleiter) liegen, vor allem in Bezug auf ihre GZZ- und AOC-Werte, dazwischen (Abb. 3). An diesen Beispielen wird gezeigt, dass Grundwasserproben aus einem Grundwasserleiter eine signifikant geringere Streuung für die ausgewählten Kenngrößen B-A-E zeigen als der deutschlandweite Referenzdatensatz ($p = 0.0002$). Es kann somit einzelnen hydrogeologischen Bezugseinheiten bzw. Aquifern oder Grundwasserkörpern, unter Berücksichtigung der drei ausgewählten Messgrößen GZZ, ATP und AOC ein mikrobiologisch-ökologischer B-A-E Fingerabdruck zugewiesen werden.

Anhand der Verwendung von Daten aus unbelasteten naturnahen Grundwässern lässt sich ein B-A-E Referenzzustand definieren und Abweichungen davon einfach ermitteln. Zur Veranschaulichung wurde für Abbildung 4 eine Referenzgruppe aus allen unbelasteten Grundwasserproben erstellt. Der Referenzzustand errechnet sich aus der Verteilung der B-A-E Werte im dreidimensionalen Raum (Abb. 4A). Die Mahalanobis-Distanz gibt an, wie

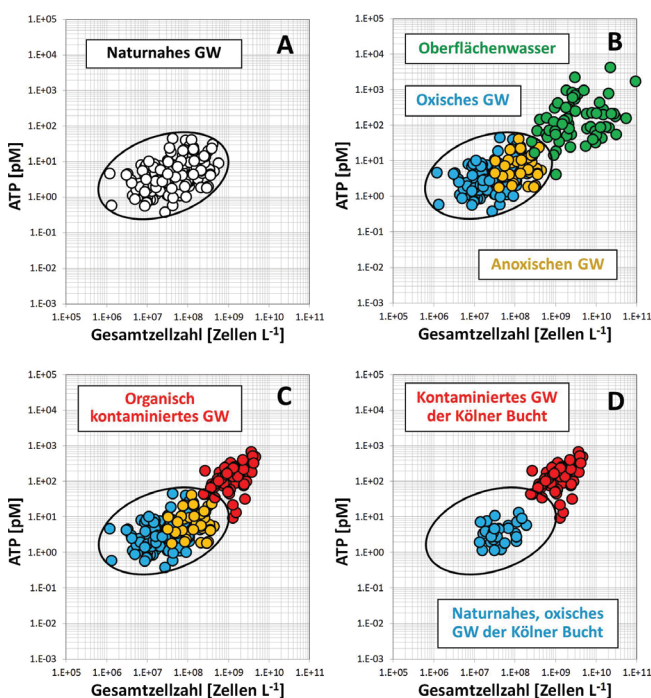


Abbildung 2

GZZ-ATP Plots für naturnahe Grundwässer (A) im Vergleich zu verschiedenen Oberflächengewässern (B) und organisch kontaminierten Grundwasserproben (C). In (D) werden die kontaminierten Grundwässer aus Düsseldorf den naturnahen Grundwasserproben aus der Region (Erftgebiet) gegenübergestellt. Innerhalb der naturnahen Grundwässer sind oxische und anoxische in (B) und (C) farblich (blau und gelb) unterschieden.

GZZ-ATP Plots for natural or near-natural groundwaters (A) in comparison to different surface waters (B) and organically contaminated groundwaters (C). In (D) the contaminated groundwater from a former gas works site in the city of Düsseldorf is compared to near-natural groundwater of this region (Erftgebiet). Within the group of groundwater reference samples, oxic and anoxic samples are presented in blue and yellow, respectively.

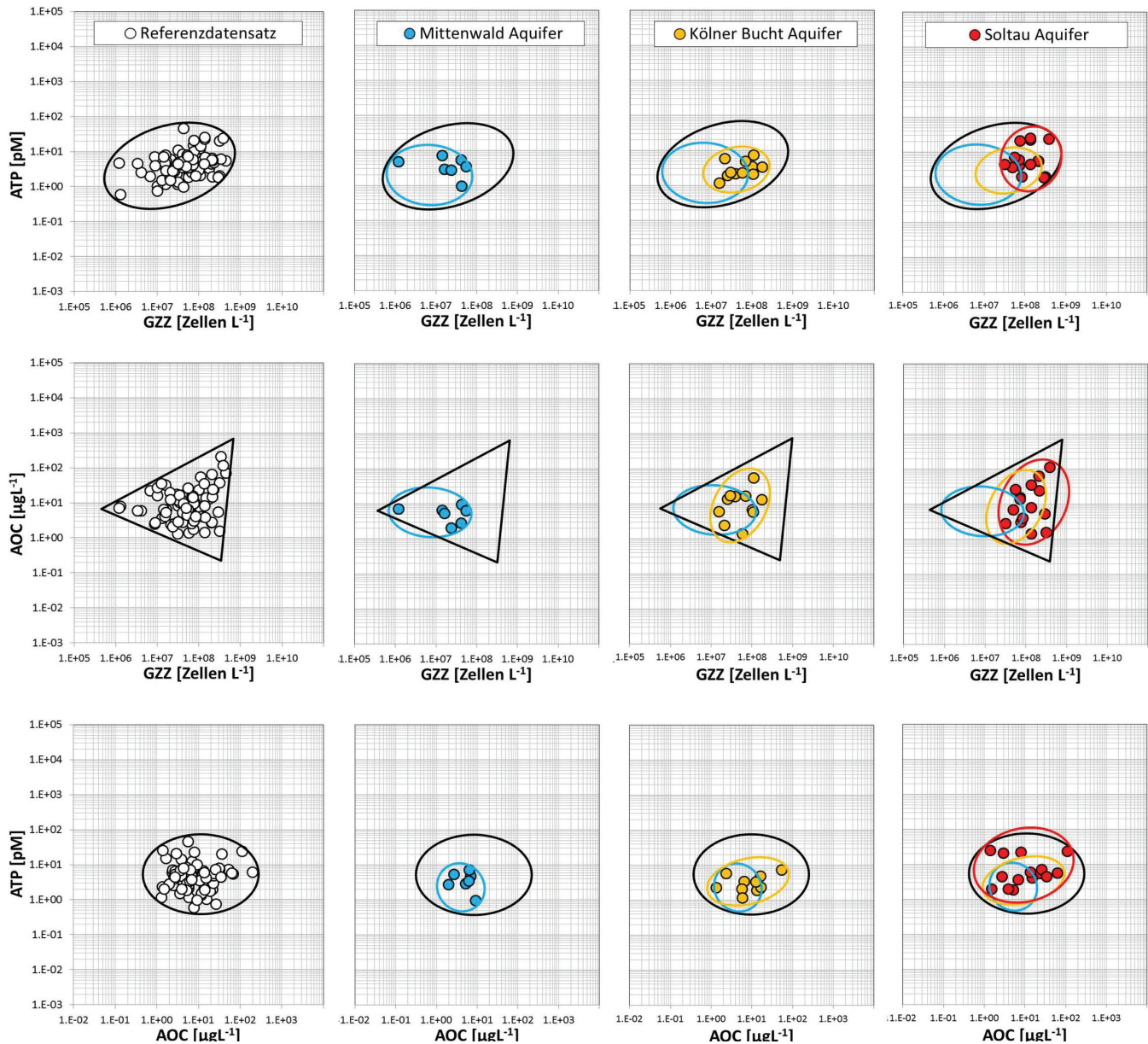


Abbildung 3

Charakterisierung einzelner Grundwasserleiter anhand ihrer GZZ-ATP-AOC Verteilung. Zur Erläuterung siehe Text.
Characterization of individual aquifers by means of the GZZ-ATP-AOC data distribution. For further explanation see text.

weit ein einzelner Datenpunkt vom Mittelpunkt der Verteilung der Referenzgruppe in einem mehrdimensionalen Raum entfernt liegt. Sie eignet sich daher bestens als Indikator für Abweichungen vom Referenzzustand. Als Beispiel für „abweichende“ Wässer dienen hier verschiedene Proben aus Oberflächengewässern.

In Abbildung 4B ist deutlich zu erkennen, dass die für die Oberflächengewässer ermittelten Mahalanobis-Distanz-Werte deutlich außerhalb des Wertebereichs der Referenz-Grundwässer liegen. Der Vorteil des B-A-E Index besteht darin, dass drei Messgrößen in einem einzelnen Wert zusammengefasst werden unter Berücksichtigung von möglichen Korrelationen. Besonders mit zunehmender Datendichte und Überlappungen von Datenpunkten ist eine visuelle Beurteilung von Unterschieden zwischen einzelnen Datengruppen im dreidimensionalen Raum nicht mehr möglich.

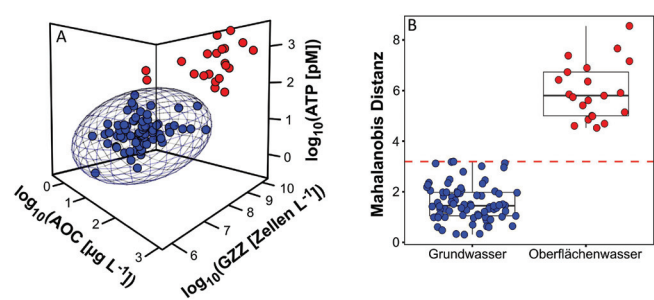


Abbildung 4

Der mikrobiologische Fingerabdruck von Wasserproben dargestellt als Mahalanobis-Distanz (= B-A-E Index) am Beispiel von naturnahen Grundwässern vs. verschiedenen Oberflächengewässern.
The microbial fingerprint (The B-A-E Index) of natural and near-natural groundwater samples vs. surface waters.

4. Diskussion

Grundwasser ist in Deutschland die wichtigste Trinkwasserressource. Zudem ist das Grundwasser der größte und älteste kontinentale Lebensraum mit einer sehr vielfältigen Mikroflora und Fauna (GRIEBLER et al., 2014b). Obwohl in der EG-GWRL vor mehr als 10 Jahren festgeschrieben wurde, dass (1) Grundwasser Lebensraum ist, (2) es geeignete Schutzmaßnahmen benötigt und (3) weitere Forschung notwendig ist, um geeignete Kriterien für die Gewährleistung einer besseren Grundwasserqualität zu entwickeln (EG-GWRL, 2006), finden ökologische Aspekte in der Grundwasserüberwachung bislang kaum Berücksichtigung (HAHN et al., 2018). Ein dafür wiederholt verantwortlich gemachter Umstand ist das Fehlen geeigneter Bewertungs- und Überwachungstools. Im Rahmen verschiedener Forschungsprojekte wurden daher in den vergangenen Jahren erste Schritte unternommen, diese Lücke zu füllen (STEUBE et al., 2009; GRIEBLER et al., 2010; GRIEBLER et al., 2014a). Der hier vorgestellte B-A-E Index ist ein erster, vielversprechender Ansatz zur Charakterisierung, Bewertung und Überwachung von Grundwässern hinsichtlich ihres mikrobiologisch-ökologischen Zustands.

Für die Auswahl der mikrobiologischen Kenngrößen gab es mehrere Gründe. Zum einen repräsentieren Biomasse, Aktivität und Energie wichtige Schlüsselgrößen eines Ökosystems bzw. einer Gemeinschaft in einem Ökosystem, die zweifelsohne eng mit dem Ökosystemzustand zusammenhängen. Zum anderen sind Grundwässer im natürlichen oder naturnahen Zustand sehr energie- und nährstoffarm (HUNKELER et al., 2006; GRIEBLER et al., 2014b). Sie lassen sich daher mittels der Messgrößen GZZ, ATP und AOC einfach von Oberflächenwässern und organisch belasteten Grundwässern unterscheiden. Die GZZ-Konzentration im Grundwasser ist dabei in der Regel 1 bis 2 Größenordnungen niedriger (GRIEBLER & LUEDERS, 2009). Ähnliches gilt für die Konzentrationen von AOC und ATP (GOODDY & HINSBY, 2008; GRIEBLER, 2012). Bringt eine organische Belastung Energie ins zuvor oligotrophe System ein, löst dies in der Regel eine erhöhte mikrobielle Aktivität aus, die mittelfristig zu einer erhöhten Biomasse („standing stock“) führt. Basierend auf der enormen mikrobiellen Biodiversität und metabolischen Flexibilität, sind solche integrierenden Kenngrößen gute Zeiger für Störungen. Und obwohl es einen engen Zusammenhang zwischen GZZ, AOC und ATP gibt, erlaubt ihre Kombination, im Gegensatz zur Einzelbetrachtung, Übergangssituationen, die oftmals typisch für eine beginnende Belastung sind schneller zu erfassen.

Beispielsweise, reagieren Bakterien im oligotrophen Aquifer auf einen Eintrag von zusätzlichen Nährstoffen oft erst verzögert durch erhöhtes Wachstum (FOULQUIER et al., 2011). Der interne ATP-Gehalt der Zellen kann sich dazu im Gegensatz unmittelbar erhöhen (HOFMANN & GRIEBLER, 2018). In einem anderen Fall werden Bakterien aus einem Oberflächenwasser ins Grundwasser eingetragen, was unmittelbar zu einer erhöhten GZZ führt, die eingetragenen Zellen sind jedoch aufgrund der sehr viel nährstoffärmeren Bedingungen wenig oder nicht aktiv. Ein hoher AOC-Gehalt, als weiteres Beispiel, kann auch bei noch fehlender Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft, ein sogenanntes Verkeimungspotenzial anzeigen. Die Kombination der B-A-E-Komponenten erhöht daher nicht nur die Sensitivität der Bewertung und Abtrennung von naturnahen zu beeinträchtigten Grundwässern, sondern erlaubt in manchen Fällen auch die Art der Belastung zu identifizieren und ihre zukünftige Auswirkung zu

interpretieren – vor allem im Zusammenhang mit begleitenden physikalisch-chemischen Analysen.

Ein weiteres wichtiges Argument für die Auswahl von B-A-E liefert die Verfügbarkeit von vergleichsweise einfachen, kostengünstigen und standardisierten Messmethoden. Die Bestimmung von GZZ und AOC basieren beide auf der Quantifizierung von prokaryotischen Zellen im Wasser, vorzugsweise mittels Durchflusszytometrie. Die ATP-Messung basiert auf einem seit vielen Jahren erhältlichen, einfach zu handhabenden Labor-Kit. Zusammenfassend heißt das, die ausgewählten Messgrößen können von mittlerweile sehr vielen Laboren analysiert werden. Abschließend muss erwähnt werden, dass die Parameter GZZ, ATP und AOC in der Vergangenheit bereits für die Qualitätsüberwachung von Trinkwasser in Versorgungsleitungen erfolgreich eingesetzt wurden (KÖTZSCH et al., 2012; KÖTZSCH & EGLI, 2012; VITAL et al., 2012). Eine Adaption dieses Ansatzes für die Bewertung und Überwachung von Grundwasser bietet sich daher an.

Dank multivariater statistischer Verfahren können Ergebnisse zu verschiedenen Kenngrößen, auch unter Berücksichtigung einer möglichen Korrelation, zu einem integrativen Indexwert verrechnet werden. Die Mahalanobis-Distanz, die hier eingesetzt wurde, wird unter anderem im Bereich der Qualitätskontrolle, z. B. zur Überwachung von Produktionsprozessen angewendet, um Abweichungen von Normzuständen anzuzeigen (COHEN FREUE et al., 2007; CUDNEY et al., 2009; GHASEMI & AAGHAIE, 2015). In vorliegendem Fall dienen natürliche bzw. naturnahe Grundwässer als Referenz, die eine gewisse Datenstreuung entlang der B-A-E Komponenten aufweisen. Abweichungen werden durch eine im Vergleich zur Referenzgruppe erhöhte Mahalanobis Distanz angezeigt. Tabelle 1 fasst alle Eckdaten noch einmal übersichtlich zusammen.

Wie in diesem Beitrag anhand erster Datensätze beispielhaft vorgestellt, eignet sich der B-A-E Ansatz sehr gut, um verschiedene Grundwässer in ihren mikrobiologischen Eigenschaften zu charakterisieren und für unterschiedliche räumliche Bezugseinheiten einen natürlichen bzw. naturnahen ökologisch-mikrobiologischen Referenzzustand zu definieren (Tab. 1). Im Vergleich dazu können Veränderungen in einem Grundwasserleiter oder -körper, beispielsweise verursacht durch eine organische Belastung, detektiert und überwacht werden. Das Spektrum der durch den B-A-E Index erfassbaren Störungen und Belastungen wird derzeit noch evaluiert. Neben einer organischen Belastung und dem direkten Einfluss von Oberflächenwasser werden im Rahmen von GroundCare momentan auch Grundwässer an verschiedenen Altlastenstandorten, in intensiv landwirtschaftlich genutzten Gebieten, in Grundwasserleitern, die einer Erwärmung durch geothermische Nutzung ausgesetzt sind, sowie in Trinkwassergewinnungsanlagen, die Uferfiltration nutzen untersucht. Kritisch betrachtet ist zu erwarten, dass der B-A-E Index natürlich nur für Schadstoffe und Belastungen einsetzbar ist, die sich unmittelbar auf die ausgewählten mikrobiologischen Messgrößen (GZZ, ATP, AOC) auswirken. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass dieses Tool Belastungen durch Spurenschadstoffe nicht sehr sensitiv anzeigt, da diese, wie der Name schon sagt, nur in sehr geringen Konzentrationen im Grundwasser auftreten, die keinen maßgeblichen Einfluss auf die B-A-E-Komponenten erwarten lassen. Auch bei erhöhten Nitratwerten ist eine signifikante Veränderung des B-A-E Fingerabdrucks nicht zu erwarten (sofern keine organische Kontamination vorliegt), da Nitrat in

Tabelle 1
B-A-E Einzel- und Indexwerte für Beispieldatensätze.
Individual B-A-E and index values for example data sets.

	GZZ (Zellen/L) ($\times 10^6$)		ATP (pM)		AOC ($\mu\text{g/L}$)		B-A-E Index ^(a)	
	x (min ; max)	SD	x (min ; max)	SD	x (min ; max)	SD	x (min ; max)	SD
Deutschlandweiter Referenzdatensatz	88 (1 ; 450)	98	6,2 (0,6 ; 44,7)	6,8	16,3 (1,3 ; 202,6)	27,8	3,0 (0,1 ; 10,2)	2,5
Organisch kontaminiertes Grundwasser	1500 (250 ; 4600)	1100	160 (9,2 ; 670,7)	127,1	NA	NA	17,8 (4,3 ; 37,2)	7,3
Oberflächenwasser	3500 (350 ; 23000)	4900	729 (69,9 ; 4267,6)	993,7	224,4 (0,6 ; 1015,7)	247,8	26,8 (20,5 ; 73,2)	14,1
Mittenwald	28 (1 ; 560)	19	3,8 (1,0 ; 7,0)	2,0	5,6 (2,0 ; 9,3)	2,5	2,8 (0,2 ; 10,2)	3,4
Kölner Bucht	70 (16 ; 180)	51	3,3 (1,1 ; 7,2)	1,9	13,9 (1,4 ; 54,3)	15	1,8 (0,4 ; 4,0)	1,1
Soltau	190 (33 ; 450)	124	8,6 (1,8 ; 24,9)	7,7	30,8 (1,4 ; 20,3)	47,3	3,8 (0,1 ; 9,8)	3,0

SD: Standardabweichung

NA: nicht verfügbar

^(a) Der B-A-E Index (= Mahalanobis-Distanz) wurde relativ zum deutschlandweiten Referenzdatensatz errechnet basierend auf logarithmisch ($\log_{10}$) transformierten Werten zu GZZ, ATP und AOC. Für Proben aus organisch kontaminierten Grundwässern basiert die Mahalanobis-Distanz relativ zum deutschlandweiten Referenzdatensatz ausschließlich auf GZZ und ATP Werten, da hierzu keine AOC Daten vorlagen.

Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff und geringer organischer Belastung nicht mikrobiologisch umgesetzt wird und auch in den auftretenden Konzentrationen nicht für Mikroorganismen toxisch ist.

Die in bestimmten Fällen mögliche unzureichende Sensitivität der ausgewählten mikrobiologischen Kenngrößen kann durch die Berücksichtigung weiterer Messgrößen in Zukunft weiter verbessert werden. Beispielsweise kann die Bestimmung der „Biomasse“ mittels GZZ über Durchflusszytometrie einfach durch weitere, bei der Messung bereits automatisch miterfasste, Parameter verbessert und ergänzt werden. Beispiele sind (1) die Größenverteilung der Zellen um die GZZ auch tatsächlich in Biomasse umzurechnen, (2) der Anteil an phototrophen Zellen, oder (3) das Verhältnis von Zellen mit hohem (HNA; high nucleic acid) und niedrigem (LNA; low nucleic acid) Nukleinsäuregehalt (HAMMES & EGLI, 2010; WANG et al., 2010). Letzteres steht für den Anteil an aktiven und wenig aktiven Zellen. Weitere Messungen im Durchflusszytometer erlauben zudem die Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien oder von Zellen mit und ohne Membranpotential (HAMMES et al., 2010a). Denkbar ist für die Grundwasserüberwachung in Zukunft auch die Erfassung und Überwachung des sogenannten „Community-Fingerprints“ im Durchflusszytometer wie dies bereits vielfach für Abwässer eingesetzt wird (WANG et al., 2010; KOCH et al., 2013a; 2013b).

5. Zusammenfassung

In Grundwasserleitern sind die mikrobielle Biomasse, deren Aktivität und die für Mikroorganismen unmittelbar verfügbare Energie wichtige ökologische Kenngrößen, die den Lebensraum, aber auch den Rohstoff Grundwasser in seinen mikrobiologischen Eigenschaften charakterisieren. Sie bilden die Basis für den B-A-E Bewertungsansatz. Den Platzhaltern Biomasse, Energie, und Aktivität liegen einfach und kostengünstig messbare Mess-

größen zugrunde, für die es standardisierte Messverfahren gibt. Wie beispielhaft gezeigt wird, kann in beliebiger räumlicher Auflösung jeder Grundwasser-Bezugseinheit ein mikrobiologischer B-A-E Fingerabdruck zugewiesen werden. Je höher die räumliche Auflösung (lokal < regional < überregional < kontinental) und je homogener die ausgewählte räumliche Bezugseinheit (Messstelle > Grundwasserkörper > Grundwasserleiter > hydrogeologische Bezugseinheit) ist, desto präziser und spezifischer ist dieser Fingerabdruck. Das B-A-E Bewertungskonzept steht damit ab sofort für eine erste Charakterisierung und dem anschließenden Monitoring von Grundwasserressourcen auf nationaler und internationaler Ebene zur Verfügung.

Summary

The microbial biomass, its activity and the amount of energy ready available to microorganisms are important measures in groundwater ecosystems that allow the characterization of the microbiological-ecological status as well as groundwater quality. The B-A-E Index, introduced here, is based on simple and comparable cheap integrative microbial measures, i.e. total cell counts (GZZ), cellular ATP, and assimilable organic carbon (AOC). As shown above, a characteristic B-A-E fingerprint – an index values calculated from the three variables analyzed – can be assigned to natural and near-natural groundwater (= reference) at any spatial resolution, from regional to local, from the aquifer to the groundwater body and to the individual well. The B-A-E assessment and monitoring concept is now ready for use and is currently applied and tested at the national and international scale.

Danksagung

GroundCare (033W037A) ist Teil der BMBF-Fördermaßnahme „Regionales Wasser-Ressourcen-Management für den nachhaltigen Gewässerschutz in Deutschland“ (ReWaM) im Förderschwerpunkt „Nachhaltiges Wassermanagement“ (NaWaM).

Anschriften der Verfasser

PD Dr. Christian Griebler
 Dr. Katrin Hug
 Lucas Fillinger
 Dr. Astrid Meyer
 Dr. Maria Avramov
 Helmholtz Zentrum München, Institut für Grundwasserökologie,
 Ingolstädter Landstraße 1
 85764 Neuherberg, Deutschland
 griebler@helmholtz-muenchen.de

Literaturverzeichnis

- ANNESER, B., F. EINSIEDL, R.U. MECKENSTOCK, L. RICHTERS, F. WISOTZKY & C. GRIEBLER (2008): High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. – *Applied Geochemistry* 23, 1715-1730.
- ANNESER, B., G. PILLONI, A. BAYER, T. LUEDERS, C. GRIEBLER, F. EINSIEDL & L. RICHTERS (2010): High resolution analysis of contaminated aquifer sediments and groundwater – what can be learned in terms of natural attenuation? – *Geomicrobiology Journal* 27, 130-142.
- BERKHOFF, S.E., J. BORK & H. J. HAHN (2009): Grundwasserfauna als Indikator für Oberflächenwasser-Grundwasser-Interaktionen im Bereich einer Uferfiltrationsanlage. – *Grundwasser* 14, 3-20.
- BORK, J., S. E. BERKHOFF, S. BORK & H. J. HAHN (2009): Using subsurface metazoanfauna to indicate groundwater – surface water interactions in the Nakdong River floodplain, South Korea. – *Hydrogeology Journal* 17, 61-75.
- BRIELMANN, H., C. GRIEBLER, S. I. SCHMIDT, R. MICHEL & T. LUEDERS (2009): Effects of thermal energy discharge on shallow groundwater ecosystems. – *FEMS Microbiology Ecology* 68, 273-286.
- COHEN FREUE, G.V., Z. HOLLANDER, E. SHEN, R. H. ZAMAR, R. BALSHAW, A. SCHERER, B. MCMANUS, P. KEOWN, W. R. MCMASTER & R. T. NG (2007): MDQC: a new quality assessment method for microarrays based on quality control reports. – *Bioinformatics* 23(23), 3162-3169.
- CUDNEY, E.A., D. DRAIN, K. PARYANI & N. SHARMA (2009): A Comparison of the Mahalanobis-Taguchi System to A Standard Statistical Method for Defect Detection. – *Journal of Industrial and Systems Engineering* 2(4), 250-258.
- DANIELOPOL, D.L., J. GIBERT, C. GRIEBLER, A. GUNATILAKA, H.J. HAHN, G. MESSANA, J. NOTENBOOM & B. SKET (2004): Incorporating ecological perspectives in European groundwater management policy. – *Environmental Conservation* 31, 1-5.
- DANIELOPOL, D.L., J. GIBERT & C. GRIEBLER (2006): Efforts of the European Commission to improve communication between environmental scientists and policy-makers. – *Environmental Science and Pollution Research* 13, 138-139.
- DANIELOPOL, D.L., C. GRIEBLER, A. GUNATILAKA, H.J. HAHN, J. GIBERT, G. MERMILLOD-BLONDIN, G. MESSANA, J. NOTENBOOM & B. SKET (2007): Incorporation of groundwater ecology in environmental policy, in: P. Quevauviller [Hrsg.]: *Groundwater Science & Policy*, The Royal Society of Chemistry – RSC Publishing, London, S. 671-689.
- DUMAS, P., C. BOU & J. GIBERT (2001): Groundwater Macrocrustaceans as Natural Indicators of the Ariège Alluvial Aquifer. – *International Review of Hydrobiology* 86 (6), 619-633.
- EPA (2003): Guidance for the assessment of environmental factors: consideration of subterranean fauna in groundwater and caves during environmental impact assessment in Western Australia. Environmental Protection Authority, Perth, Australia.
- EC (2012): Technical Report on Groundwater Dependent Terrestrial Ecosystems. Technical Report No. 6, ISBN 978-92-79-21692-3, European Communities, Luxembourg.
- EC (2015): Technical Report on Groundwater Associated Aquatic Ecosystems. Technical Report No. 9, ISBN 978-92-79-53895-7, European Communities, Luxembourg.
- EG-GWRL (Europäische Grundwasserrahmenrichtlinie): Richtlinie 2006 / 118 / EG des Europäischen Parlaments und des Rates, Amtsblatt der Europäischen Union L 372 (19) vom 27.12.2006
- EG-WRRL (Europäische Wasserrahmenrichtlinie): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, Amtsblatt der Europäischen Union L327(1) vom 22.12.2000
- EYDAL, H.S.C. & K. PEDERSEN (2007): Use of an ATP assay to determine viable microbial biomass in Fennoscandian Shield groundwater from depths of 3–1000 m. – *Journal of Microbiological Methods* 70(2), 363-373.
- FOULQUIER, A., F. MERMILLOD-BLONDIN, F. MALARD & J. GIBERT (2011): Response of sediment biofilm to increased dissolved organic carbon supply in groundwater artificially recharged with stormwater. – *Journal of Soil and Sediments* 11, 382-393.
- GHASEMI, E. & A. AAGHAIE (2015): Mahalanobis Taguchi system: a review. – *International Journal of Quality & Reliability Management* 32(3), 291-307.
- GOODDY, D.C. & K. HINSBY (2008): Organic quality of ground – water, in: W.M. & P. Shand [Hrsg.]: *Natural groundwater quality*, Edmunds, Blackwell, Oxford, p 59-70
- GRIEBLER, C., B. MINDL, D. SLEZAK & M. GEIGER-KAISER (2002): Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. – *Aquatic Microbial Ecology* 28, 117-129.
- GRIEBLER, C. & T. LUEDERS (2009): Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. – *Freshwater Biology* 54, 649-677.
- GRIEBLER, C., H. STEIN, C. KELLERMANN, S. BERKHOFF, H. BRIELMANN, S.I. SCHMIDT, D. SELESI, C. STEUBE, A. FUCHS & H.J. HAHN (2010): Ecological assessment of groundwater ecosystems – Vision or illusion? – *Ecological Engineering* 36 (9), 1174-1190.
- GRIEBLER, C. (2012): Bakterien in Grundwasserökosystemen, in Thiem, A., H. Arndt, B. Bendinger, M. Gierig, C. Griebler, I. Guderitz, H.J. Hahn, J. Marxsen, G. Preuß, S. Richter & D. Schlosser [Hrsg.]: *Grundwasserbiologie – Grundlagen und Anwendungen*, Kapt. 4, DWA / DVGW Themenband T5, S. 39-49.
- GRIEBLER, C., H.J. HAHN, H. STEIN, C. KELLERMANN, A. FUCHS, C. STEUBE, S. BERKHOFF & H. BRIELMANN (2014a): Entwicklung biologischer Bewertungsmethoden und -kriterien für Grundwasserökosysteme. UFOPLAN, FKZ 3708 23 200, 153 S., ISSN: 1862-4804
- GRIEBLER, C., F. MALARD & T. LEFEBURE (2014b): Current developments in groundwater ecology – from biodiversity to ecosystem function and services. – *Current Opinion in Microbiology* 27, 159-167.
- GSchV (1998): Gewässerschutzverordnung (Swiss Water Ordinance) 814.201. Der Schweizer Bundesrat, Bern, Switzerland.
- HAHN, H. J. (2006): A first approach to a quantitative ecological assessment of groundwater habitats: The GW-Fauna-Index. – *Limnologica* 36 (2), 119-137. HAMMES, F., M. BERNEY, Y. WANG, M. VITAL, O. KÖSTER, T. EGLI (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*, 42(1), 269-277.
- HAHN, H.J., C. SCHWEER & C. GRIEBLER (2018): Grundwasserökosysteme im Recht? – 10 Jahre Europäische Grundwasserrichtlinie. Eine kritische Betrachtung zur rechtlichen Stellung der Grundwasserökosysteme in Deutschland und in der EU. – *Grundwasser*, DOI: 10.1007/s00767-018-0394-3.
- HAMMES, F.H. & EGLI, T. (2005): New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. – *Environmental Science and Technology* 39, 3289-3294.

- HAMMES, F.A., M. BERNEY, W. YINGYING, M. VITAL, O. KÖSTER & T. EGLI (2008): Flowcytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. – *Water Research* 42, 269-277.
- HAMMES, F. & T. EGLI (2010): Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. – *Analytical and Bio-analytical Chemistry* 397, 1083-1095.
- HAMMES, F., M. Berney, M. & T. Egli (2010a): Cultivation-independent assessment of bacterial viability, in Müller, S. & T. BLEY [Hrsg.]: *High resolution microbial single cell analytics*, Springer, Berlin, S. 123-150.
- HAMMES, F., F. GOLDSCHMIDT, M. VITAL, Y. WANG, T. EGLI (2010b): Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. – *Water Research* 44(13), 3915-3923.
- HOFMANN, R. & C. GRIEBLER (2018): DOM and bacterial growth efficiency in oligotrophic groundwater – absence of priming and co-limitation by organic carbon and phosphorus. – *Aquatic Microbial Ecology*, 81, 55-71.
- HUNKELER, D., N. GOLDSCHIEDER, P. ROSSI & C. BURN (2006): *Biozönosen im Grundwasser – Grundlagen und Methoden der Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften*. – Bundesamt für Umwelt, Bern, 113 S.
- JOBELIUS, C., B. RUTH, C. GRIEBLER, R.U. MECKENSTOCK, J. HOLLENDER, A. REINEKE, F.H. FRIMMEL & C. ZWIENER (2011): Metabolites indicate hot spots of biodegradation and biochemical gradients in a high-resolution monitoring well. – *Environmental Science and Technology* 45, 474-481.
- KEPPNER, L. (2005): Der Lebensraum Grundwasser braucht eine Lobby. – *GWF Wasser Abwasser* 146, 527.
- KÖTZSCH, S., S. ALISCH & T. EGLI (2012): Durchflussszytometrische Analyse von Wasserproben. Schweizerisches Bundesamt für Gesundheit (BAG), 46 S.
- KÖTZSCH, S., & T. EGLI (2012): Entwicklung, Anwendung und Etablierung durchflussszytometrischer Methoden zur schnellen Bestimmung der Mikrobiologie von Trinkwasserverteilnetzen und Hausinstallations-systemen und Evaluierung des Migrations- und Biofilmbildungspotentials bei der Epoxidharz-Sanierung von Trinkwasserleitungen. KTI-Projekt 12121.1 PFIW-IW.
- KOCH, C., I. FETZER, H. HARMS & S. MÜLLER (2013a): CHIC - An Automated Approach for the Detection of Dynamic Variations in Complex Microbial Communities. – *Cytometry Part A*, 83A, 561-567.
- KOCH, C., S. GÜNTHER, A.F. DESTA, T. HÜBSCHMANN & S. MÜLLER (2013b): Cytometric fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity function. – *Nature Protocols* 8, 190-202.
- KORBEL, K. L. & G.C. HOSE (2011): A tiered framework for assessing groundwater ecosystem health. – *Hydrobiologia* 661,329-49.
- KORBEL, K. L. & G.C. HOSE (2017): The weighted groundwater health index: Improving the monitoring and management of groundwater resources. – *Ecological Indicators* 75, 164-191
- KUNKEL, R., F. WENDLAND, H.-J. VOIGT, & S. HANNAPPEL (2004): Die natürliche, ubiquitär überprägte Grundwasserbeschaffenheit in Deutschland. *Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Umwelt*, 47.
- MALARD, F., S. PLENET & J. GIBERT (1996): The use of invertebrates in ground water monitoring: A rising research field. – *Ground Water Monitoring and Remediation* 16, 103-113.
- MÖSSLACHER, F. (1998): Subsurface dwelling Crustaceans as indicators of hydrological conditions, oxygen concentrations, and sediment structure in an alluvial aquifer. – *International Review of Hydrobiology* 83, 349-364.
- NSW-SGDEP (2002): The NSW State Groundwater Dependent Ecosystems Policy: A component policy of the NSW State Groundwater Policy Framework Document. Department of Land and Water Conservation, NSW Government, ISBN 0 7347 5225 3, 40 S.
- PREST E.L., F. HAMMES, S. KÖTZSCH, M.C.VAN LOODSDRECHT & J.S. VROUWENVELDER (2013): Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Research* 47, 7131-7142.
- PRONK, M., N. GOLDSCHIEDER & J. ZOPFI (2009): Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. – *Hydrogeology Journal* 17, 37-48.
- SCHMIDT, S.I., H. J. HAHN, T. HATTON & W. F. HUMPHREYS (2007): Do faunal assemblages reflect the exchange intensity in groundwater zones? – *Hydrobiologia* 583, 1-19.
- STEIN, H., C. GRIEBLER, S.E. BERKHOFF, D. MATZKE, A. FUCHS & H.J. HAHN (2012): Stygoregions – a promising approach to a bioregional classification of groundwater systems. – *Scientific Reports* 2, 673, DOI: 10.1038/srep00673.
- STEUBE, C., S. RICHTER & C. GRIEBLER (2009): First attempts towards an integrative concept for the ecological assessment of groundwater ecosystems. – *Hydrogeology Journal* 17, 23-35.
- VITAL, M., H.P. FÜCHSLIN, F. HAMMES, T. EGLI (2007): Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater. *Microbiology*, 153(7), pp.1993-2001.
- VITAL, M., M. DIGNUM, A. MAGIC-KNEZEV, P. ROSS, L. RIETVELD & F. HAMMES (2012): Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. – *Water Research* 46, 4665-4676.
- WANG, Y., F. HAMMES, K. DE ROY, W. VERSTRAETE & N. BOON (2010): Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. – *Trends in Biotechnology* 28, 416-424