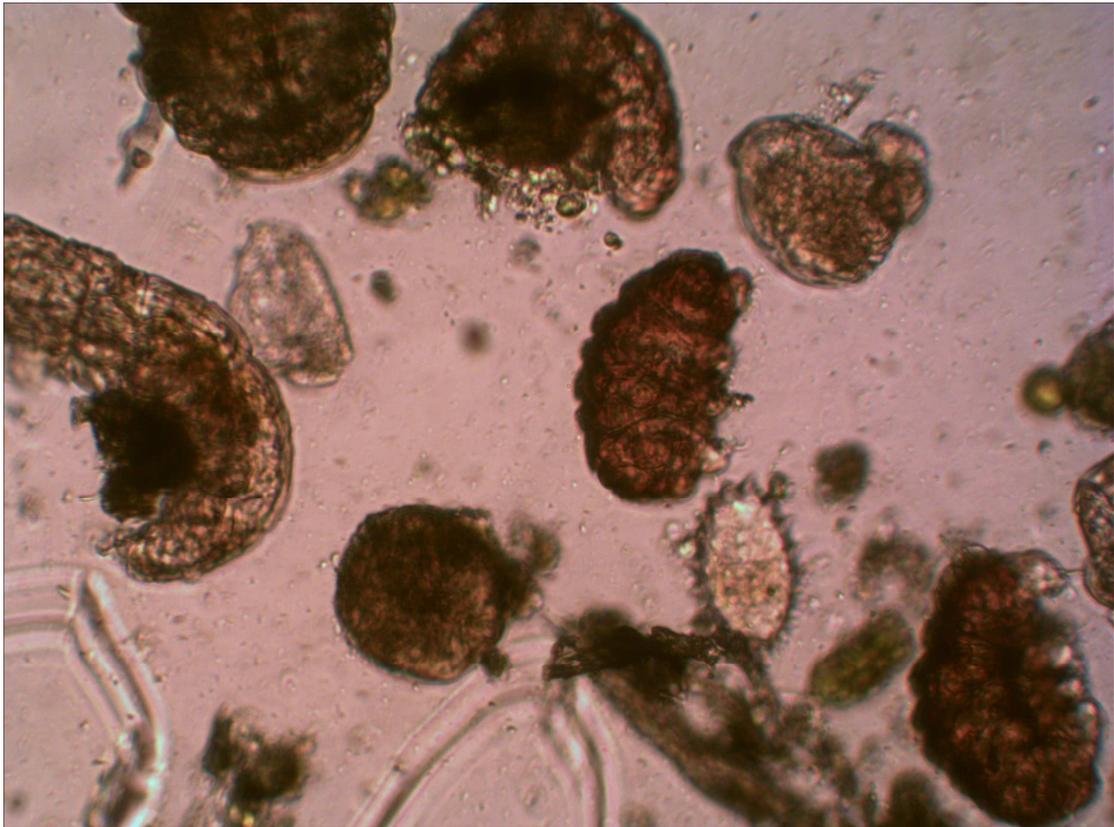


# Untersuchung und Kultivierung von Tardigraden verschiedener Herkunft



**Wettbewerb „Jugend Forscht“ 2012**

**Pia Lübke (17 Jahre)**

**Arbeitsgemeinschaft "Jugend Forscht"  
des Christian- Gymnasiums Hermannsburg**

**Leitung: StD Thomas Biedermann**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLEGENDES ÜBER TARDIGRADEN</b> .....	<b>- 1 -</b>
2.1	Lebensraum und Lebensweise .....	- 1 -
2.2	Körperbau und Systematik .....	- 2 -
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>- 3 -</b>
3.1	Extraktionsmethoden.....	- 3 -
3.2	Untersuchungsmethoden .....	- 4 -
3.2.1	Beobachtungseinrichtung .....	- 4 -
3.2.2	Präparation.....	- 4 -
3.2.3	Dauerpräparation .....	- 4 -
3.3	Kultivieren .....	- 5 -
3.3.1	Kultivieren im Tardigraden- Nährmedium .....	- 5 -
3.3.2	Kultivieren der Algen .....	- 6 -
3.3.3	Kultivieren auf Agarnährböden .....	- 7 -
3.3.4	Kultivieren in Quellwasser .....	- 7 -
<b>4</b>	<b>VORVERSUCHE</b> .....	<b>- 8 -</b>
4.1	Kultivierung der Algen .....	- 8 -
4.2	Kultivierung der Tardigraden .....	- 8 -
<b>5</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER MOOSPROBEN</b> .....	<b>- 9 -</b>
5.1	Herkunft der Proben .....	- 9 -
5.2	Betrachtung der Proben unter dem Mikroskop .....	- 9 -
5.2.1	Betrachtung der Gesamtprobe .....	- 9 -
5.2.2	Untersuchung der Tardigraden.....	- 10 -
<b>6</b>	<b>KULTIVIERUNG DER TARDIGRADEN</b> .....	<b>- 10 -</b>
<b>7</b>	<b>BEOBACHTUNGEN</b> .....	<b>- 10 -</b>
7.1	Vorversuche .....	- 10 -
7.1.1	Kultivierung der Algen .....	- 10 -
7.1.2	Kultivieren der Tardigraden .....	- 11 -
7.2	Untersuchung der Moosproben .....	- 12 -
<b>8</b>	<b>AUSWERTUNG</b> .....	<b>- 12 -</b>
8.1	Vorversuche .....	- 12 -
8.2	Untersuchung der Moosproben .....	- 13 -
8.3	Kultivierung der Tardigraden .....	- 14 -
<b>9</b>	<b>FAZIT UND AUSBLICK</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>10</b>	<b>QUELLENANGABEN</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>- 15 -</b>

# 1 Einleitung

Während ich mich bereits im letzten Jahr mit einem der wahrscheinlich kleinsten Mehrzellern der Erde –den Tardigraden - beschäftigte, stellte ich fest, dass es bisher nur wenig detaillierte Literatur über die Tiere gibt. Obwohl sie weltweit in verschiedenen Moosarten zu finden sind, wurden nur sehr wenige Untersuchungen zur Artenvielfalt, besonders zur deren Vorkommen an unterschiedlichen Standorten der Welt, angestellt. Daher beschaffte ich mir verschiedene Moosproben aus Europa, Asien, Afrika und Amerika, um die enthaltenen Tardigraden zu vergleichen.

Durch ein Praktikum in einem biotechnologischen Institut lernte ich einige Methoden zur Kultivierung von Mikroorganismen kennen, dabei kam mir die Idee, die Kultivierung der Tardigraden mit in meine diesjährige Jugend-forscht Arbeit aufzunehmen. Da ich mich mit der Probenuntersuchung, sowie der Kultivierung beschäftigen wollte, setzte ich mir primär das Ziel, Tardigraden zu kultivieren und später den Zusammenhang zwischen Art, Standort der Probe und der Kultivierbarkeit der Tiere zu untersuchen.

## 2 Grundlegendes über Tardigraden

### 2.1 Lebensraum und Lebensweise

Tardigraden, auch Bärtierchen genannt, sind mikroskopisch kleine, mehrzellige Lebewesen, die Lückensysteme auf der ganzen Welt besiedeln. Die Tiere kommen in marinen und terrestrischen Lebensräumen vor, allerdings werde ich mich in meiner Arbeit ausschließlich mit den landlebigen Arten beschäftigen. Tardigraden besitzen die besondere Eigenschaft, bei extremen Umweltbedingungen wie Wassermangel, Hitze bzw. Kälte oder erhöhtem osmotischem Druck ein Tönnchenstadium einzunehmen, in dem sie jegliche Flüssigkeit aus ihren Zellen pressen und ihrem Stoffwechsel soweit herabsetzen, dass eine Stoffwechselaktivität kaum mehr nachweisbar ist. Daher können die Tiere auch in extrem kalten Gebieten und Lagen bis ca. 6000 Metern Höhe überdauern. Um aktiv leben zu können brauchen Tardigraden eine feuchte Umgebung. Moose, die viel Feuchtigkeit speichern können, bieten einen idealen Lebensraum. Zudem sind in den Moosen häufig Algen enthalten, welche neben Nematoden oder Fadenwürmern ihre Nahrungsgrundlage bilden. Da Bärtierchen, wie oben erwähnt, Lückensysteme besiedeln, haben die Tiere kaum natürliche Fressfeinde. Häufige Todesursachen sind aber der Befall von Pilzen und Bakterien. Sie können in den Herbstmonaten eine Population bis auf die Hälfte reduzieren. Bärtierchen pflanzen sich meistens sexuell fort, Männchen und Weibchen kommen also im Verhältnis 1:1 vor. Einige Arten pflanzen sich allerdings parthenogenetisch fort, dabei reifen unbefruchtete Eizellen zu Weibchen heran. [1], [2]

## 2.2 Körperbau und Systematik

Tardigraden können von 0,2 mm bis zu 1,4 mm groß werden. Charakteristisch für die Tiere ist ihr segmentierter Körper. Bärtierchen besitzen vier Beinpaare, an denen sich Krallen (siehe Abb.1 K) oder Zehen befinden. Die Tiere besitzen eine chitinhaltige Cuticula, die von einer dünnen Schicht, bis zu einem Panzer ausgebildet sein kann. Tardigraden können von 0,2 mm bis zu 1,4 mm groß werden. Charakteristisch für die Tiere ist ihr segmentierter Körper. Bärtierchen besitzen vier Beinpaare, an denen sich Krallen (siehe Abb.1 K) oder Zehen befinden. Die Tiere besitzen eine chitinhaltige Cuticula, die von einer dünnen Schicht, bis zu einem Panzer ausgebildet sein kann. Bärtierchen besitzen ein Strickleiternnervensystem, aber keine Zirkulations- oder Atmungsorgane. Daher findet der Gasaustausch durch Diffusion über die Cuticula statt. Einige Tiere besitzen malphigische Gefäße (VM), welche die Osmoregulation unterstützen. Tardigraden besitzen ein ausgeprägtes Verdauungssystem. Mithilfe des spitzen Stilets (S) stechen die Tiere Zellen an und saugen den Zellinhalt über die Mundröhre (Mr) zum Schlundkopf (Sk), von dort aus über den Oesophagus (Oe) in den Mitteldarm (Md). Über das Rectum (R) bzw. den Anus (A) wird nicht zu verdauendes Material ausgeschieden. Vor dem Rectum liegt der Gonoporus (Ov.), die Geschlechtsöffnung.

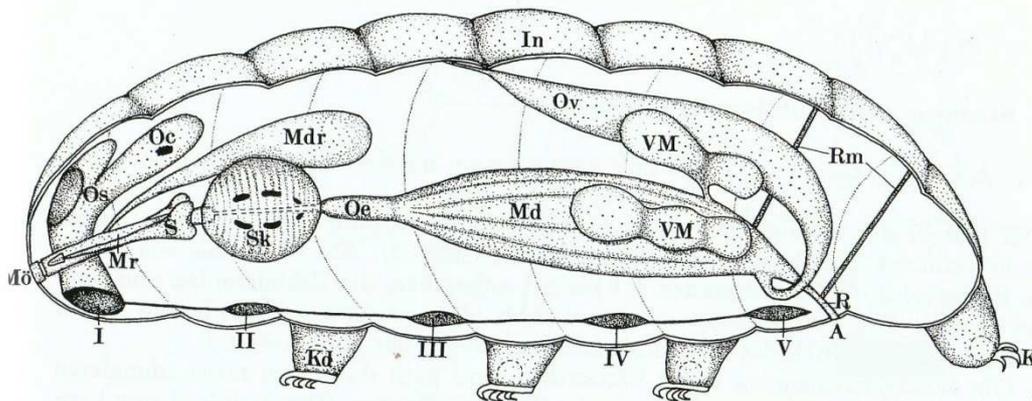


Abb.1: Bau eines Tardigraden [1]

Tardigraden gehören aufgrund ihres Strickleiternnervensystems zu den Articulaten (Gliedertiere). Da man die Tiere weder den Arthropoden (z.B. Krebse) oder den Anneliden (Ringelwürmern), zuordnen kann, wurde der eigene Stamm der Tardigraden eingeführt. Das System der Tardigraden selbst ist sehr komplex. Häufig wird von einer Artenunterscheidung gesprochen, dennoch wird eine Differenzierung in der Literatur<sub>[1]</sub> meist nur bis in die Untergattungen vorgenommen. Ich werde mich in meiner Arbeit lediglich mit der Unterscheidung bis zur Familie befassen, den Schwerpunkt aber auf die Unterscheidung von Eu- und Heterotardigrada legen. Tardigraden können unterschiedliche Ausprägungen der

Beine, des Schlundkopfes haben, oder Kopf- und Körperanhänge besitzen. Diese Merkmale sind wie auch z.B. die Cuticula wichtige Kriterien zur Differenzierung der Tardigraden. Die unten stehende Tabelle verwende ich zur genaueren Untersuchung der Tardigraden (siehe 5.2.2). [1], [2]

Klasse	Heterotardi grada	Eutardigrada	Heterotardi grada	Heterotardi grada	Heterotardi grada	Eutardigrada	Eutardigrada	Eutardigrada
Unterklasse				Echiniscoidae	Echiniscoidae			
Familie			Coronarctidae	Oreelidae	Echiniscidae	Macrobiotidae	Hypsibiidae	Milnesiidae
Körperform			wurmförmig					
Körperanhänge	versch. Anzahl	nein	drei paar					
Kopfanhänge			ja					untersch. Zahl von Kopfpapillen
Cuticula				ohne Panzerung	abgrenzbare Panzerplatten			
Beine	mit Zehen							
Krallen	am Bein ansetzend	Doppelkrallen	groß		vier, mit u. ohne Nebenhaken	sym., gleich lang		
Gonoporus	vor dem Anus							
Kloake		ja						
malph. Gefäße	nein	ja						
Schlundkopf	ja	mit Placoiden				mit Placoiden	mit und ohne Placoiden	keine Placoiden

Abb. 2: vereinfachte Kriterien zur Differenzierung von Tardigradenfamilien [1]

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Extraktionsmethoden

Zur Extraktion der Tardigraden aus den Moosproben verwende ich getrocknetes Moos, welches ich mithilfe einer Pasteurpipette mit einigen Tropfen Wasser beträufele. Nach einigen Minuten presse ich das Wasser aus dem Moos in eine Petri-Schale.

Wie sich schon während meiner Arbeit des letzten Jahres [2] gezeigt hat, eignen sich Moosmengen von maximal einem Gramm (Trockengewicht) und einer maximalen Wassermenge von fünf Milliliter am besten, um zum einen eine ausreichende Tardigradenanzahl zum Betrachten, zum anderen eine übersichtliche Wassermenge zu erhalten, um alle ausgepressten Tardigraden identifizieren zu können. Um die Tiere sauber von Begleitorganismen, Moos und Sand zu trennen, verwende eine Eppendorf-Pipette mit

dem Volumen von 10 µl bzw. eine selbst gezogene Pasteur- Pipette mit ähnlicher Größe der Spitzenöffnung. Die Sogkraft darf weder zu groß sein, damit nicht zu viel Bewegung in der Probe entsteht, noch zu gering sein, damit die im Vergleich zu Sandkörnern relativ schweren Tardigraden in die Pipette gelangen können.

## 3.2 Untersuchungsmethoden

### 3.2.1 Beobachtungseinrichtung

Um die Tiere beobachten zu können, verwende ich ein Trinokular- Durchlichtmikroskop mit einer 40- bis 1000 fache Vergrößerung, wobei zur genauen Betrachtung der Tiere eine 400 - fache Vergrößerung meistens ausreicht. Auf dem dritten Okular befindet sich eine USB-Kamera zur Dokumentation meiner Beobachtungen.

### 3.2.2 Präparation

Um eine gesamte Probe unter dem Mikroskop zu betrachten, reicht es aus, direkt die Petrischale mit dem ausgepressten Wasser auf dem Objektisch zu platzieren. Zum Betrachten eines einzelnen Bärtierchens bei 400- facher Vergrößerung, muss das Tier aus der Petrischale extrahiert werden und mit einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger gegeben werden, da die Lichtbrechung bei einer größeren Menge Wasser zu hoch ist, um ein scharfes Bild sehen zu können. Um die Tardigraden genau untersuchen zu können, ist eine Streckung des Körpers von Vorteil. Eine Streckung erreiche ich, in dem ich die Tardigraden nochmals, mit möglichst wenig Wasser extrahiere und mit wenigen Tropfen Alkohol beträufle. Nach einigen Minuten pipettiere ich die Tiere mit etwas Wasser auf einen Objektträger und lege ein Deckgläschen darüber. Allerdings werden durch den Alkohol einige Tiere getötet, Untersuchungen zur Aktivität sollten daher vorher erfolgen.

### 3.2.3 Dauerpräparation

In der letzten Arbeit verwendete ich zur Dauerpräparation Eukitt, ein Einschussharz, mit dem ich direkt die Probe auf dem Objektträger einschloss. Allerdings sollten die Tiere laut Literatur vorher über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Xylol gegeben und darauf schließlich in Eukitt eingeschlossen werden. <sup>[1]</sup> Da die

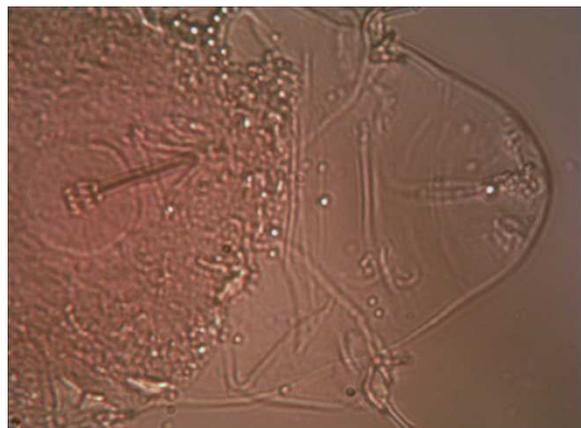


Abb. 3: gestrecktes Bärtierchen

Tardigraden in meinen Dauerpräparaten aus dem letzten Jahr noch gut erkennbar sind, verzichte ich vorerst auf diese recht aufwändige Methode. Um eine optimale Streckung der Tiere zu erreichen verwende ich die Gleiche Methode, wie in 3.2.2. Zusätzlich beträufle ich die Tiere vorher mit siedendem Wasser, da ich feststellte, dass bei der Verwendung von Alkohol die Tiere in einigen Fällen kurzfristig gestreckt waren und danach wieder das Tönnchenstadium einnahmen.

### **3.3 Kultivieren**

Zum Kultivieren von Mikroorganismen und Pflanzen ist es notwendig, optimale Lebensbedingungen zu schaffen. Diese können mit Hilfe von Agarnährböden oder Nährlösungen unter bestimmten Temperaturen und Lichteinflüssen erzeugt werden.

In der Literatur sind bisher nur wenige detaillierte Ansätze beschrieben um Tardigraden zu kultivieren und zum Teil auch nicht zufrieden stellend gelungen. Da Tardigraden sich aber auch unter nur annähernd optimalen Lebensbedingungen reproduzieren können, möchte ich trotzdem einige in der Literatur genannte Methoden als Versuchsgrundlage anwenden und optimieren.

#### **3.3.1 Kultivieren im Tardigraden- Nährmedium**

Zum Kultivieren von Tardigraden der Art *Hibisibius dujardini*, wird das Chalkey's Nährmedium als optimal beschrieben. [3] Da nahezu alle terrestrischen Tardigradenarten ähnliche Lebensbedingungen benötigen, möchte auch ich das Medium für Versuchsreihen mit anderen Tardigradenarten verwenden.

Das Tardigraden- Nährmedium besteht aus Chalkey's Nährlösung, einer einfachen Lösung aus Mineralsalzen, sowie zu 2% aus einem Bodenextrakt.

Das Bodenextrakt (ca. 200 ml) erstelle ich durch das Vermengen von zwei Teilen trockenem, humusreichem Boden (ca. 70 g) und drei Teilen Leitungswasser (ca. 130 ml). Dieses wird autoklaviert. Das Gemisch lasse ich einige Tage stehen und dekantiere den Überstand.

Für die Chalkey's Nährlösung werden zunächst die Stammlösungen erzeugt. Dazu werden 2,0g Natriumchlorid (NaCl), 0,08 g Kaliumchlorid (KCL) und 0,12 g Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) jeweils auf 100 ml (destilliertes Wasser) aufgefüllt.

Um das letztendliche Medium zu erhalten gebe ich 20 ml des Bodenextraktes und je 5 ml der Stammlösungen in einen Erlenmeyerkolben und fülle das Gemisch auf einen Liter auf und autoklaviere es.

Um die Kulturen anzusetzen gebe ich 150 ml des Nährmediums in einen Erlenmeyerkolben (250 ml Volumen). Da Tardigraden sich von dem Zellinhalt von Pflanzen ernähren, pipettiere

ich 3-5 ml Algenextrakt (siehe 3.3.2) in den Kolben und impfe die Lösung mit Tardigraden an. Damit keine Luftkeime in die Kultur gelangen, wird der Kolben verschlossen.

Laut Literatur sollen die Kulturen an einem schattigen Ort bei Raumtemperatur (ca. 10-20°C) platziert werden. Nach ca. vier bis sechs Wochen sollten Subkulturen in einem neuen Medium angesetzt werden. Die alten Kulturen können eingefroren und noch nach Monaten weiterverwendet werden. [3]

### 3.3.2 Kultivieren der Algen

Für die Tardigradenkulturen (siehe 3.3.1) eignen sich einzellige Grünalgen wie Chlorella oder Chlorococcum sehr gut. Generell sind nahezu alle Unterarten geeignet, wobei Chlorella Pyrenoidosa wegen ihrer Schleimschicht von einigen Tardigraden- Arten nicht angestochen werden kann. [1]

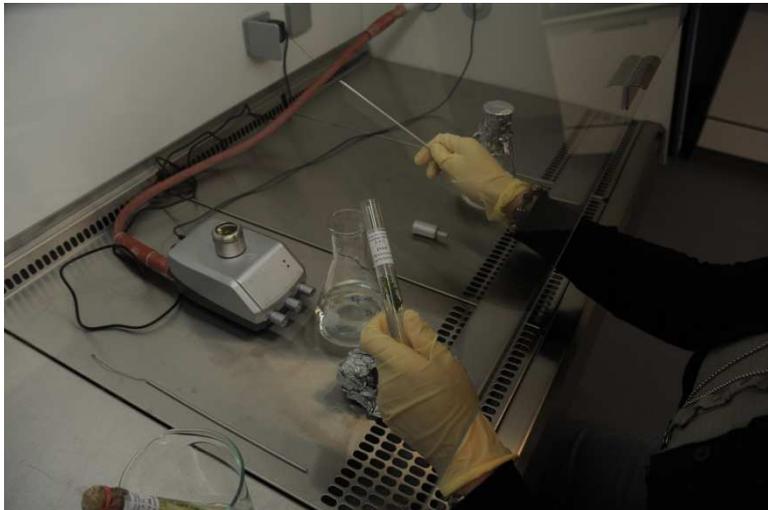


Abb.4: animpfen des Mediums

Um die Algen in ausreichender Menge anziehen und halten zu können, müssen einzelne Zellen kultiviert werden. Damit die Nährmedien nicht mit unerwünschten Keimen kontaminiert werden, sollten auch die Stammkulturen steril angezogen werden. Diese Stammkulturen beziehe ich über die Sammlung von Algenkulturen der Universität

Göttingen. Für meine Arbeit verwende ich Chlorella Mirabilis und Chlorococcum Hypnosporum. Da ich in der Literatur für diese Arten keine speziellen Medien finden konnte, nutze ich verschiedene Nährmedien, die für andere Algenarten verwendet werden. Zum einen verwende ich eine einfache Pflanzennährlösung (nach Knop), die aus Kalziumnitrat, Magnesiumsulfat, Kaliumhydrogenphosphat,

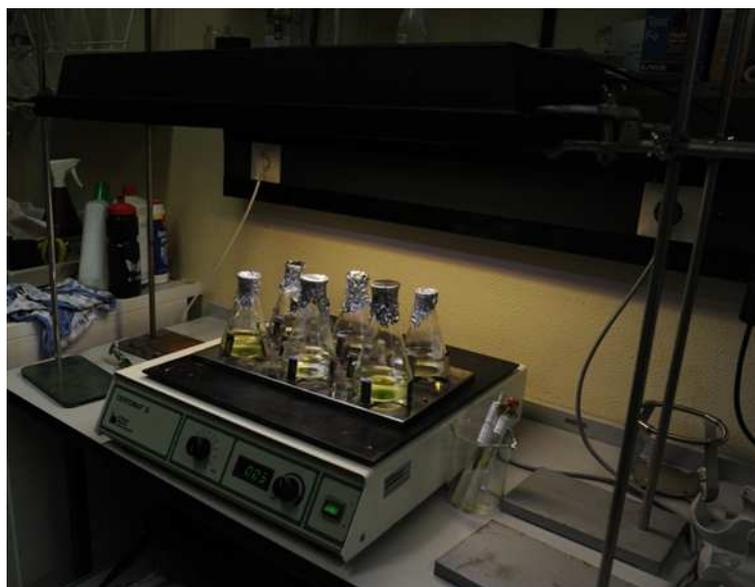


Abb. 5: Algen auf dem Schüttler

Kaliumnitrat, sowie Eisensulfat besteht. [1] Des Weiteren nutze ich das algenspezifisches Bold's Medium, welches ähnliche Salze wie das Knop-Medium, zusätzlich aber wesentlich mehr Spurenelemente, sowie einen pH-Puffer (EDTA) enthält. [4] Ebenso nutze ich das TAP-Medium, welches speziell auf Algen ausgelegt ist, die statt Nitrat- Ionen Ammonium-Ionen benötigen. Wie auch in den anderen Medien sind einige Salze wie Kaliumphosphat und Kalziumchlorid enthalten. Weiterhin besteht das Medium aus einer speziellen Spurenelement-Mischung (Hutner trace elements), sowie Tris(hydroxymethyl)- Aminomethan ( $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ), welches als Puffer dient. [5]

Auf die genaue Zusammensetzungen und Herstellung der Medien möchte ich nicht näher eingehen, da die Arbeitsschritte teilweise sehr komplex sind. Da Algen ein pH- neutrales Milieu bevorzugen, muss der pH-Wert in allen Medien möglichst nahe 7 eingestellt werden (Ermittlung durch eine genau kalibrierte pH- Sonde), bei schwer löslichen Salzen ggf. auch etwas saurer. Die Medien werden anschließend autoklaviert und an der sterilen Arbeitsbank mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse mit sterilen, auf Agar angezogenen Algen angeimpft. Die beimpften Kolben werden auf einen Schüttler gesetzt und sie mit einer herkömmlichen Aquariumbeleuchtung (Schwarzlicht) belichtet.

### 3.3.3 Kultivieren auf Agarnährböden

Zum Kultivieren von Tardigraden auf Agarnährböden habe ich in der Literatur keine Ansätze gefunden, da aber das bestimmen der Populationsgröße auf Agar einfacher ist, möchte ich versuchen, Tardigraden auf Agar zu kultivieren. Dazu löse gebe Agar zum einen in destilliertes Wasser, zum anderen im Tardigraden- Nährmedium (siehe 3.3.1). Zusätzlich gebe ich Algen dazu. Ebenso möchte ich zusätzlich auch Glucose zugeben. Für Tardigraden ist Glucose als Monosaccharid vermutlich durch einen geringeren Energieaufwand als die im Zytoplasma der Algen vorhandenen Lipide, Proteine und Polysaccharide verwertbar. Daher könnte Glucose die Reproduktion der Tardigraden begünstigen.

Die Agargemische werden vor dem Gießen der Platten autoklaviert, wobei Glucose schon vor dem Autoklavieren zugegeben wird. Nach dem Auskühlen der Platten impfe ich die Nährböden an einer sterilen Arbeitsbank mithilfe einer ausgeglühten Impföse in Form eines Verdünnungsausstrichs mit Tardigradenextrakt oder bereits vorhandenen Tardigradenkulturen an und gebe in einigen Ansätze mit einer sterilen Pipette Algen dazu. Die Schalen verschließe ich mit Parafilm, um die Kontamination mit Luftkeimen zu reduzieren. Sie werden wie die Ansätze in Nährlösung bei Raumtemperatur an einem schattigen Ort gelagert.

### 3.3.4 Kultivieren in Quellwasser

Eine weitere Methode bei bereits vorhandenen Kulturen ist das Kultivieren von Tardigraden in Petrischalen mit Quellwasser.

Zum Ansetzen verwende ich kleine Petrischalen (6 cm Durchmesser), die ich mit Quellwasser befülle (Volvic oder ähnliches). Hinzu gebe ich einen Milliliter Tardigradenkulturen und einen Milliliter Algenkulturen (siehe 3.3.2). Nach zehn Tagen sollte frisches Wasser dazugegeben werden, nach ein bis zwei Monaten sollten auch frische Algenkulturen dazugegeben werden. gelagert werden die Schalen wie in 3.3.1 und 3.3.1. [3]

## **4 Vorversuche**

### **4.1 Kultivierung der Algen**

Da Algen die Nahrungsgrundlage für die meisten Tardigradenarten bilden (siehe 2.1), ist es für meine Arbeit wichtig, Algen in ausreichender Menge kultivieren zu können, sowie vorab zu prüfen, ob die gewählten Algenarten generell für Tardigraden geeignet sind. Ich setzte dazu jeweils zwei Kolben TAP-Medium, Knop-Pflanzennährlösung, sowie Bold's- Medium an, die ich mit Chlorella Mirabilis, sowie Chlorococcum Hypnospora beimpfte. Zusätzlich impfte ich zwei Kolben Leitungswasser mit beiden Algenarten an. Die Kolben stellte ich (wie in 3.3.2 beschrieben) auf den Schüttler, belichtete sie und beobachtete das Wachstum über einige Tage. Die Umgebungstemperatur betrug 14°C -1 6°C

### **4.2 Kultivierung der Tardigraden**

Um einordnen zu können, welche Mengen Algen und welches Inokulum an Tardigraden notwendig ist, um die Tiere kultivieren zu können, setzte ich einen Liter Tardigraden-Nährmedium an. Dann beimpfte ich drei 100 ml Kolben Medium, sowie drei Agarnährböden aus dem gleichen Medium mit dem Tardigradenextrakt aus 0,78 g getrocknetem „Dachmoos“. Die verschiedenen Arten berücksichtigte ich dabei zunächst nicht. Um zu überprüfen ob, bzw. welche Wirkung Glucose auf die Reproduktion der Tiere hat, beimpfte ich drei weitere Kolben, zu denen ich 1 g, 0,1g und 0,01g Glucose gab. Ebenso setzte ich drei Agarnährböden ohne und drei Böden mit jeweils ca. 0,1g Glucose an. Zu jedem der Kolben bzw. Agar- Böden gab ich einige kleine Tropfen Chlorella- Suspension hinzu. Die Ansätze lagerte ich schattig bei 18°C.

## 5 Untersuchung der Moosproben

### 5.1 Herkunft der Proben

Vor dem Sammeln der Proben überlegte ich zunächst, welche Standortfaktoren des Mooses einen Einfluss auf die Population der Tardigraden haben können. Dazu erstellte ich eine Tabelle, in die ich nach und nach die gesammelten Proben einordnete. Ich beschränkte meine Auswahl an Standortfaktoren auf den Wachstumsort (z.B. auf einem Stein), den

<u>Probennummer</u>	<u>Datum</u>	<u>Ort</u>	<u>Moosbeschaffenheit</u>	<u>Wetter aktuell</u>	<u>Klima (Monatsdurchschnitt)</u>	<u>Klima(Jahresdurchschnitt)</u>	<u>Wachstumsort</u>	<u>Standort</u>
P 0	Aug. 11	Belsen, NDS, Deutschland	sehr kompakt	trocken, warm (20°C)	August: 17°C, 15 Regentage	9°C, 15 Regentage im Monat	Dach	Wald
K 1	Apr. 11	Meppen, NDS, Deutschland	kompakt	trocken, warm (20°C)	April: 7°C, 15 Regentage	9°C, 16 Regentage im Monat	Stein	Wohngebiet
K 15	Apr. 11	Rorschach, Bodensee, Schweiz	grob	trocken, warm (20°C)	April: 8°C, 14 Regentage	8,5 °C, 14 Regentage im Monat	Boden	Wiese
K 23	Jul. 11	Eau Claire, Winsconsin, USA	grob	trocken, extrem warm (40°C)	Juli: 23°C, 10 Regentage	6°C, 9 Regentage im Monat	Boden	Straßenrand
K 28	Aug. 11	Pigeon River, Wisconsin, USA, Grenze Kanada	sehr kompakt	feucht, extrem warm (40°C)	wie K 11, etwas feuchter	ähnlich wie K 11	Boden	Wiese

Abb. 6: Einordnung der Moosproben [7], [8]

Standort (z.B. im Wald), das durchschnittliche Monats- und Jahresklima und, wenn dokumentiert, das Wetter am Tag der Probenahme. Ebenso betrachtete ich die Beschaffenheit des Mooses. Insgesamt habe ich ca. 60 Moosproben gesammelt, dennoch werde vorerst nur einige der Proben näher betrachten.

### 5.2 Betrachtung der Proben unter dem Mikroskop

#### 5.2.1 Betrachtung der Gesamtprobe

Zur Einordnung der Probe ist es wichtig zunächst grob den Inhalt der Probe zu betrachten. Dazu gehören die Untersuchung auf Organismen (häufig Rädertierchen, Fadenwürmer etc.). Sind viele dieser Organismen enthalten, lassen sie als Begleitorganismen der Bärtierchen auf viele Tardigraden vermuten. Enthält die Probe viel Sand und wenig Pflanzenzellen, ist

generell auf eine schlechte Lebensbedingung am Wachstumsort zu schließen, damit auch auf wenige Tardigraden.

### 5.2.2 Untersuchung der Tardigraden

Ich betrachte zunächst die Anzahl an Individuen und Eiern in einem Gramm Probe, sowie die Zeit bis zum Erwachen aus dem Tönnchenstadium. Darauf nehme ich eine Einordnung der Tiere vor, primär die Unterscheidung in Eu- und Heterotardigrada (siehe 2.2), bzw. Ermittlung der Körpergröße und Färbung der Cuticula. Zuletzt möchte ich versuchen, die Ergebnisse im Blick auf die Standortfaktoren zu deuten und einige Proben zu Kultivierung vorzubereiten.

## 6 Kultivierung der Tardigraden

Ausgehend von den Ergebnissen der Vorversuche erstellte ich zunächst ein Tardigradenextrakt aus 1g Dachmoos. Die Tiere extrahierte ich noch zwei weitere Male, um ein möglichst reines Extrakt zu erhalten. Das Tardigradenextrakt, sowie das Algenextrakt zentrifugierte ich. Die konzentrierten Algen bzw. Tardigraden gab ich mit einer Eppendorf- Pipette auf eine Agarplatte mit ca. 0,1 g Glucose, sowie eine Platte ohne Glucose. Für weitere Platten, sowie Flüssignährmedien wäre das Inokulum einer einzelnen Probe zu gering.



Abb. 7: Tardigradenextrakt, zentrifugiert

## 7 Beobachtungen

### 7.1 Vorversuche

#### 7.1.1 Kultivierung der Algen

In den Kolben mit Leitungswasser sind wenige, kaum erkennbare Algenmengen gewachsen. Die Chlorella ließen sich im TAP-Medium und im Aquariumwasser kultivieren. Nach acht Tagen waren sie auch im Leitungswasser zu erkennen. Die Chlorococcum Hypnospora ließen sich in keinem der Medien ausreichend dicht kultivieren.

<b>Ansatz 1 - 22.12.11</b>				
<b>Probe</b>	<b>Medium</b>	<b>Alge</b>	<b>Bewertung am 27.12.11</b>	<b>Bewertung am 30.12.11</b>
1	Leitungswasser, unsteril	Chlorella Mirabilis	--	-
2	Aquariumwasser, steril	"	0	0
3	TAP-Medium, steril	"	0	0
4	Aquariumwasser, steril	Chlorococcum Hypnosporum	-	-
5	Leitungswasser, unsteril	"	-- / -	--
6	TAP-Medium, steril	"	-- / -	-

#### **Legende**

--	nicht angewachsen
-	wenig angewachsen
0	deutlich angewachsen
+	stark angewachsen
++	maximal angewachsen

Zusätzliche Untersuchungen unter dem Mikroskop zeigten, dass die Kolben auch nach mehreren Tagen kaum Mikroorganismen enthielten, sowie beide Algenarten keine Gallerte besitzen. Ein weiterer Versuch mit stärker durch

*Abb. 8: Bewertung von Algenansatz 1*

Nährsalze angereichertem Aquariumwasser zeigt, dass das Wachstum bei Chlorella begünstigt wurde, Chlorococcum aber auch hier nicht anwuchs. Beide Kolben mit Knop-Medium trübten sich nach einigen Stunden, Algen wuchsen keine. Der pH-Wert lag bei 4. Auch die Ansätze im Bold's- Medium zeigten nur einen geringen Algenwuchs.

### **7.1.2 Kultivierung der Tardigraden**

Nach einer Woche zeigte sich schon durch Betrachten ohne Mikroskop, dass auf drei der Agar-Böden Pilze gewachsen sind, auf einem davon massiv. Auf den anderen Böden war kein Bewuchs zu erkennen. Zwei der leicht pilzbefallenen Böden enthielten Glucose. Der stark befallene Boden, sowie die kaum bewachsenen Böden enthielten keine Glucose. Alle Kolben wiesen gleichermaßen eine leicht grünliche Trübung auf. Um die Ansätze genauer zu untersuchen, nahm ich aus den Ansätzen auf dem Agar mit einer Impföse Pilzkulturen, sowie auch aus den anderen Bereichen der Platten Proben und gab sie mit etwas Wasser auf einen Objektträger. Um den Inhalt der Kolben untersuchen zu können, nahm ich eine Probe und zentrifugierte sie, um die Zellbestandteile untersuchen zu können. Bei allen Proben erkannte ich, dass weder Bärtierchen noch andere Tiere gewachsen sind. Lediglich die Pilzmyzele, sowie einige Pflanzenzellen sind auf dem Agar und im Flüssigmedium angewachsen.

## 7.2 Untersuchung der Moosproben

In Probe P0 waren ca. 20 Tardigraden, sowie 6 Tardigraden- Eier enthalten. Die Tiere erwachten größtenteils nach 10 Minuten aus dem Tönnchenstadium. Durch Betrachtung der Körperanhänge und der Placoiden im Schlundkopf war ein Heterotardigradum sichtbar. Es waren anhand der Cuticulfärbungen und Größen ca. 4 verschiedene Arten erkennbar. In Proben K23 und K28 waren auch nach Stunden keinerlei

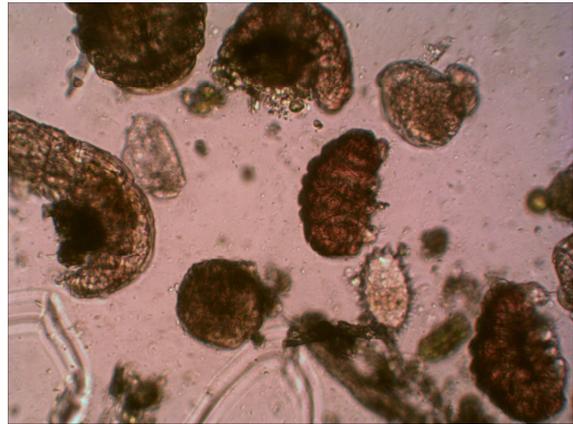


Abb. 9: Probe P0 (5 Tardigraden)

Tiere und wenige Pflanzenzellen zu erkennen. In Probe K1 waren wenige Pflanzenzellen und wenige inaktive Rädertierchen sichtbar, aber keine Tardigraden. Probe K15 hingegen enthielt sehr viele Pflanzenzellen, darunter auch Algen. Ebenso waren sehr viele Rädertierchen erkennbar, dennoch auch inaktiv. Ein Bärtierchen war sichtbar. Dabei handelte es sich um einen Eutardigraden. Vermutlich ist dies die gleiche oder eine sehr eng verwandte Art, von der auch 10 Individuen in Probe P0 vorhanden waren.

## 8 Auswertung

### 8.1 Vorversuche

Aus 7.1.1 folgt, dass in meinen Ansätzen für *Chlorella Mirabilis* das TAP-Medium, Leitungswasser, sowie autoklaviertes Aquariumwasser zum Anwachsen geeignet ist, für *Chlorococcum Hypnospora* ausschließlich das Aquariumwasser. Da *Chlorococcum* in keinen der Medien zufriedenstellend anwuchs, ist vermutlich die Umgebungstemperatur zu niedrig gewesen. Der weiße Bodensatz im Knop-Medium hat sich vermutlich aus Ionen gebildet, die sich aufgrund schlechter Löslichkeit der Salze zu komplexen, schwer löslichen Salzen, verbunden haben und ausgefallen sind. Somit standen den Algen einige Ionen nicht mehr zur Verfügung. Auch wegen des niedrigen pH-Wertes ist der Ansatz im Knop-Medium nicht bewertbar. Vermutlich



Abb. 10: *Chlorella* im TAP-Medium

ist ein Fehler beim Ansetzen unterlaufen, da der pH-Wert nur betrug. Da das BBM-Medium Nitrat-Ionen [4], das TAP-Medium stattdessen Ammonium-Ionen [5] enthält, Chlorella aber nur im TAP-Medium angewachsen, ist davon auszugehen, dass Chlorella Mirabilis Ammonium-Ionen statt Nitrat-Ionen für den Stoffwechsel benötigt. Da Chlorella vorerst nur im TAP-Medium ausreichender Menge für die Tardigraden-Ansätze wuchs, scheint das TAP-Medium mit Chlorella am besten geeignet für die weiteren Ansätze. Aufgrund des schnelleren Wachstums von Chlorella im Aquariumwasser bei höherer Nährsalzkonzentration und gleichem Algen-Inokulum wie im TAP-Medium, scheint das Aquariumwasser ebenso gut geeignet. Da Chlorella Mirabilis keine Gallerte umgeben und somit von Bärtierchen anstechbar sind, kultiviere ich für die weiteren Ansätze Chlorella im TAP-Medium und im Aquariumwasser.

Aus 7.1.2 folgt, dass trotz sterilen Arbeitens, vermutlich über das Bärtierchenextrakt, Pilzsporen in die Proben gelangt sind. Da Pilze (siehe 2.1) für Tardigraden schädlich sein können, verwarf ich die Ansätze. Vermutlich waren auch das Inokulum der Tiere sowie die Konzentration des Algenextraktes zu gering.



Abb. 11: Agar-Böden mit und ohne Pilzbewuchs

## 8.2 Untersuchung der Moosproben

In beiden Proben aus den USA waren kaum Lebewesen enthalten. Die könnte an dem sehr trockenen und heißen Sommer in Wisconsin liegen, da trotz sehr kompaktem Moos und eher feuchterer Wachstums Umgebung am Pigeon River (Probe 28) kaum Lebewesen zu sehen waren. Die Begleitumgebung der Probe K 15 spricht für optimale Lebensbedingungen durch die warme und feuchte Umgebung am Standort. Auch das kompakte Moos ist Ideal für die Wasserspeicherung. Dennoch war nur ein Bärtierchen zu erkennen. In der feuchten- warmen Umgebung kommt es schnell zu Pilzwachstum. Der Befall der Tardigraden mit Pilzen wäre eine Erklärung für die geringe Tardigradenzahl. Der sehr warme und trockene April in Deutschland hat trotz kompaktem Moos zum Wasserverlust der Tiere und zur Reduktion der Population geführt. Die hohe Bärtierchenanzahl in Probe P0 ist vermutlich auf das sehr

kompakte Moos und den Standort auf dem Dach zurückzuführen. Die große Anzahl an Tardigraden zeigt, dass an dem Standort von Probe P0 permanent eine ausreichend hohe Feuchtigkeit vorhanden sein musste.

### **8.3 Kultivierung der Tardigraden**

Bisher war es mir nicht möglich, die Ansätze auszuwerten, sowie Ansätze mit den Tardigraden der Proben verschiedener Standorte zu kultivieren. Da ich bisher keine Tardigraden in ausreichenden Mengen kultivieren konnte, ist das Inokulum für Ansätze in Flüssignährmedien, sowie in Petrischalen mit Quellwasser zu gering.

## **9 Fazit und Ausblick**

Ich konnte mein Ziel, Tardigraden zu kultivieren bisher noch nicht erreichen. Ich stellte fest, dass allein die Methoden zur Kultivierung von Algen sehr zeitaufwändig und komplex sind. Bis zum Wettbewerb möchte ich meine zuletzt erstellten Tardigraden- Ansätze auswerten und meine Methoden so weit optimieren, dass ich Tardigraden in einer so großen Zahl kultivieren kann, dass das Inokulum der Tiere auch für Kulturen in Flüssignährmedien ausreicht. Da in vielen der untersuchten Proben nur wenige Tiere enthalten waren, möchte ich noch mehr Proben untersuchen und mich stärker mit der Artenbestimmung befassen. Trotzdem stellte ich fest, dass eine Eutardigradenart in Probe P0 in großer Zahl vorkam. Da diese Art vermutlich auch in Probe K 15 enthalten war, möchte ich diese wahrscheinlich sehr „robuste“ Art im Vergleich zu weniger vertretenen Arten kultivieren.

## **10 Quellenangaben**

### **Literatur**

- [1] Greven, Hartmut: „Die Bärtierchen“, Die neue Brehm- Bücherei, A. Ziemsen Verlag, Wittenberg, 1980
- [2] Lübke, Pia: „Anpassung von Tardigraden an extreme Umweltbedingungen“, Jugend forscht Hermannsburg, 2011

### **Internet**

- [3] <http://tardigrades.bio.unc.edu/protocols/CollectionCulture.pdf>, letzter Abruf: 03.01.12
- [4] <http://cccryo.fraunhofer.de/sources/files/medien/BBM.pdf>, letzter Abruf: 03.01.12
- [5] <http://cccryo.fraunhofer.de/sources/files/medien/TAP.pdf>, letzter Abruf: 03.01.12

- [6] [http:// www.baertierchen.de/zool\\_sys.html](http://www.baertierchen.de/zool_sys.html), letzter Abruf 03.01.12
- [7] <http://www.urlaubplanen.org/nordamerika/usa/klima>, letzter Abruf: 15.01.12
- [8] <http://www.mappedplanet.com/klima/>, letzter Abruf: 15.01.12

## **11 Danksagung**

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuungslehrer Thomas Biedermann bedanken, der mich die ganze Zeit über geduldig unterstützt und mich bei so manchen Rückschlägen motivieren kann, weiterzuarbeiten. Ein großes Dankeschön auch an Frau Biedermann, die sich immer um das leibliche Wohl der gesamten Jufo- Gruppe kümmert. Ebenso gilt mein Dank Herrn Webel, der mich mit großem Zeiteinsatz bei der Laborarbeit unterstützt und mir jederzeit Material zur Verfügung stellt.