

DIE ROLLE DER BAKTERIEN BEI DER REGENERATION
VON NÄHRSTOFFEN
AUS ALGENEXKRETEN UND AUTOLYSEPRODUKTEN
EXPERIMENTE MIT GEKOPPELTEN, KONTINUIERLICHEN KULTUREN

ABHANDLUNG

ZUR ERLANGUNG DES TITELS EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
DER
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

VORGELEGT VON
ARNO PAUL STÖCKLI
DIPL. NATW. ETH
GEBOREN AM 19. NOVEMBER 1951
VON LUTHERN (LUZERN)

ANGENOMMEN AUF ANTRAG VON
PROF. DR. H. AMBÜHL, REFERENT
DR. R. GÄCHTER, KORREFERENT

6 ZUSAMMENFASSUNG

1) Problemstellung

Im Epilimnion von Seen sind die Bakterien überwiegend verantwortlich für die Mineralisation des organischen Kohlenstoffes. Ihre Rolle in der Nährstoffregeneration im sog. "Kleinen Kreislauf" ist jedoch umstritten. Diese Arbeit untersucht daher an der Basis der trophischen Pyramide die Beteiligung der Bakterien an der Mineralisation von komplexen Exkretions- und Autolyseprodukten zu Stickstoff- und Phosphorverbindungen, welche von Algen wiederverwertet werden können. Dabei werden die bakteriellen Nährstoffumsätze mit jenem Anteil der Nährstoffregeneration verglichen, welchen die Algen allein (d.h. ohne Bakterien) oder unter Mitwirkung freigesetzter Enzyme (insbesondere Phosphatasen) bewerkstelligen.

2) Versuchskonzept

Infolge der Schwierigkeiten, die Stoffflüsse zwischen Algen und Bakterien im Seewasser direkt zu analysieren, wurde mit bakterienfreien Kulturen der Alge Chlamydomonas reinhardtii und Mischpopulationen von Seebakterien gearbeitet. Die Übertragbarkeit der gewonnenen Resultate auf die dynamische Situation im Epilimnion, wo die ständige Nachlieferung von Substraten und Nährstoffen ein fortgesetztes Wachstum der Bakterien ermöglicht, wurde einerseits durch die Wahl von kontinuierlichen Versuchsanordnungen gewährleistet; andererseits wurden die Kulturen so gefahren, dass die Konzentrationen der gelösten Nährstoffe ungefähr im Epilimnion meso- bis eutropher Seen vorgefundenen Bereich lagen.

Die Beziehung zwischen der Stöchiometrie der Alge und der Nährstoffexkretion Exkreten wurde mit N- und P-limitierten Chemostaten untersucht.

Die Untersuchung der Mineralisation von autolysierendem Algenmaterial erfolgte in parallelen Chemostaten mit und ohne Bakterien, denen kontinuierlich durch Hitze (1h, 60 °C) abgetötete bakterienfreie C. reinhardtii zugesetzt wurden. In separaten Algenbioassays wurde die Verwertbarkeit der gelösten Nährstoffkomponenten getestet.

Der bakterielle Einfluss auf die Nährstoffregeneration aus organischen Exkreten von C. rheinhardii wurde mit separaten Algen- und Bakterienchemostaten untersucht, die durch einen kontinuierlichen Filtrattransfer kreuzweise gekoppelt waren. Die Algen lieferten freigesetzte, organische Nährstoffe und Substrat für die Bakterien, während durch Bakterien regenerierte oder refraktäre Nährstoffe rezirkuliert wurden. Die Rezirkulation von gelösten Stoffen im System bewirkte unterschiedliche Verdünnungsraten für die Organismen und ihre Freisetzungsprodukte. Mit diesem Versuchssystem gelang eine weitgehende Simulation der Epilimnion-Situation, wo Algen und Bakterien (durch Sedimentation und Frass) rascher eliminiert, als gelöste Substanzen ausgewaschen werden.

Neben der analytisch-chemischen Bestimmung von freigesetztem, organischen Kohlenstoff (DOC), Stickstoff (DON) und Phosphor (DOP), separat als Phosphorsäuremonoester (COP-P) und kondensierte Phosphate (POP-P), wurden niedermolekulare und makromolekulare Komponenten durch Ultrafiltration (mit Trenngrenzen von $M_r=1000$ bzw. 5000) oder durch Gelfiltration (mit Sephadex G25) unterschieden.

Die Algen- und Bakterienbiomassen wurden über Zellzahlen und dem partikulären organischen Kohlenstoff (POC) bestimmt. Die Charakterisierung der protozoenfreien Bakterienmischpopulationen erfolgte mit Plattenkeimzahlen (zymogene Bakterien) und MPN-Tests (Phosphatase bildende, proteolytische, ammonifizierende und Polysaccharid verwertende Bakterien). Die Aktivität partikulärer und gelöster Phosphatasen wurde mit p-Nitrophenylphosphat als Enzymsubstrat erfasst.

3) Nährstofffreisetzung durch C. rheinhardii und ihre Beziehung zur Algenstöchiometrie

In den bakterienfreien Algenchemostaten und in den gekoppelten Algen-Bakterien-Kulturen vor Impfung mit Bakterien setzte C. rheinhardii 9% - 31% des produzierten POC (10 - 46 $\mu\text{g C}/(1.\text{h})$) als DOC netto frei. Die DOC-Freisetzung war bei geringen Algenbiomassen relativ zur Algenproduktion erhöht und erfolgte überwiegend (zu 12% - 25%) in Form niedermolekularer Verbindungen. Relativ zur Produktion von PN wurden von der Alge netto 2.5% - 6% (0.6 - 1.7 $\mu\text{g N}/(1.\text{h})$) als DON freigesetzt. Durchschnittlich lag dabei der freigesetzte DON zu 30% mit $M_r > 5000$, zu 25% mit $M_r = 1000$ - 5000 und zu 45% mit $M_r < 1000$ vor. Die Nettofreisetzung von

DOP lag in P-limitierten Kulturen, wo aufgrund des minimalen P-Gehaltes der Algen Phosphatasen gebildet wurden, bei rund 1% des produzierten PP (rund $0.01 \mu\text{g P}/(1.\text{h})$). Ohne aktive Phosphatasen (N-limitierte und lichtlimitierte Algen) war die DOP-Freisetzung erhöht. C. reinhardii setzte wenig makromolekularen P ($M_r > 5000$) und insbesondere keinen kolloidalen P frei.

Die Wechselwirkung von N und P auf die Wachstumslimitierung von C. reinhardii folgte einem Threshold-Konzept mit einem optimalen, intrazellulären N:P-Verhältnis von molar 40:1. Bei variierter N:P-Stöchiometrie der Algen war das Verhältnis des freigesetzten DON bzw. DOP zum freigesetzten DOC proportional zum C:N- bzw. C:P-Verhältnis der Algen, wobei die Exkrete viel nährstoffärmer waren als die Algen selbst.

Durch den Vergleich von gekoppelten Kulturen, mit gleichen Wachstumsbedingungen für die Algen, aber unterschiedlicher Verdünnungsrate für gelöste Verbindungen, wurde gezeigt, dass ohne Bakterien der freigesetzte DON und DOP nur zu einem Viertel, der DOC aber weitgehend refraktär war.

Unter P-Limitierung gebildete Phosphatasen, welche je nach Wachstumsrate der Algen zu 3.5% - 58% freigesetzt wurden, waren ohne Bakterien in Lösung vollständig persistent. Trotz hohen potentiellen Enzymaktivitäten betrug die geschätzte, durch Phosphatasen katalysierte Hydrolyse von DOP nur wenige Prozent des gleichzeitig durch die Algen aufgenommenen Phosphats. Unter P-Limitierung lagen die von Phosphatasen hydrolysierbaren P-Verbindungen im ng/l -Bereich, die Konzentrationen des tatsächlich gemessenen DOP dagegen im $\mu\text{g/l}$ -Bereich.

4) Wachstum der Bakterien unter kontinuierlichen Bedingungen

Im Gegensatz zum Wachstumsverlauf von Bakterien in Batchkulturen, wo nach Aufbrauchen der Substrate die Bakteriendichte wieder abnimmt, erreichten die Bakterien in kontinuierlicher Kultur auf Algenexkreten und -autolysat innert wenigen Tagen konstante Dichten, da die Nachlieferung von frischem Substrat und Nährstoffen ein fortgesetztes Bakterienwachstum ermöglichte. Dabei fand eine qualitative Verschiebung von den anfänglich dominierenden, zymogenen Bakterien statt zu Bakterien, welche an niedrige Substratkonzentrationen angepasst waren. Nach rund 3 Wochen

und bei nahezu Steady state lag die Bakteriendichte und die qualitative Zusammensetzung der Bakterienmischpopulationen auf Algenautolysat und -filtrat im Epilimnion meso- bis eutropher Seen vorgefundenen Bereich. Die Bakterien bauten zwar partikuläres, totes Algenmaterial mit einer Rate von 3 d^{-1} rasch ab. Rund 90% des von C. reinhardii exkretierten DOC verhielt sich aber auch mit Bakterien refraktär. Darüber hinaus nutzten die Bakterien mit der Belüftung eingetragene, flüchtige Substrate.

Die Stöchiometrie der auf Autolysat wachsenden Bakterien betrug molar $378\text{C} : 16\text{N} : \text{P}$. Mit Algenfiltrat und Phosphat, gezehrt oder im Überschuss, war die Bakterienstöchiometrie durchschnittlich $177\text{C} : \text{P}$. Die Bakterien waren daher nicht durch P sondern durch die energieliefernden Substrate limitiert.

5) Nährstoffaufnahme und Freisetzung durch Bakterien

Die den Bakterien angebotenen Substrate waren bereits so nährstoffarm (Algenautolysat: $950\text{C} : 27\text{N} : \text{P}$ bis $1750 \text{C} : 50\text{N} : \text{P}$, Algenexkrete: $1430\text{C} : 74\text{N} : \text{P}$ bis $2450\text{C} : 208\text{N} : \text{P}$), dass die Bakterien zusätzlich verfügbares NO_3 , NH_4 und PO_4 aufnahmen. Unter kontinuierlichen Wachstumsbedingungen fand netto somit keine Mineralisation von N und P statt. Dies steht im Gegensatz zur Nährstoffdynamik in Batchkulturen, wo mit abnehmender Bakteriendichte infolge Substratmangels N und P in anorganischer Form netto freigesetzt werden.

Bakterien nahmen autolytisch freigesetzten DON und DOP nur unvollständig auf und setzten makromolekularen P frei. Der von Bakterien nicht verwertete DOP war auch für Algen refraktär.

In den gekoppelten Algen-Bakterien-Experimenten musste für die Berechnung der Freisetzung bzw. Aufnahme von gelösten organischen Stoffen ein Transfer von Bakterien zwischen den Subsystemen berücksichtigt werden, da die verwendeten Nucleoporefilter im kontinuierlichen Betrieb Bakterien nicht vollständig zurückhielten. In den Experimenten mit Phosphatasen setzten die Bakterien netto durchschnittlich $0.045 \mu\text{g DOP}/(1.\text{h})$ frei. Davon verwerteten die Algen rund die Hälfte. Die Bakterien erhöhten damit die Konzentrationen refraktärer P-Verbindungen im System um durchschnittlich $0.55 \mu\text{g DOP}/1$, $0.35 \mu\text{g Phosphorsäuremonöster-P}/1$ und $0.23 \mu\text{g makromolekularen P}/1$.

Bei Fehlen von Phosphatasen nahmen die Bakterien hingegen mehr algenbürtigen DOP auf als sie ihrerseits freisetzen. Die Reduktion der Aktivität freigesetzter algenbürtiger Phosphatasen durch Bakterien verminderte zudem die Möglichkeit der Algen bakteriellen DOP zu verwerten.

Der exkretierte DON wird von den Bakterien wesentlich weniger verwertet als von den Algen.

Gesamthaft gesehen beträgt die Freisetzung und Verwertung von organischen N- und P-Verbindungen nur wenige Prozente der unter kontinuierlichen Bedingungen aufgenommenen anorganischen Nährstoffe.

6) Die Rolle der Bakterien in der intrabiozönotischen Nährstoffregeneration im Epilimnion

Da kontinuierliche Kulturen die dynamische Situation im Epilimnion besser widerspiegeln als Batchexperimente, kann aus den beschriebenen Experimenten gefolgert werden, dass (im Gegensatz zu klassischen Vorstellungen) die Bakterien in der trophogenen Zone netto keinen organischen N und P mineralisieren, sondern diese Nährstoffe immobilisieren. Unter P-limitierten Bedingungen konkurrenzieren sie dadurch die Algen um verfügbaren P. Zudem erhöhen sie das refraktäre, gelöste P-Kompartiment im See und hemmen die Aktivität algenbürtiger, freigesetzter Phosphatasen.

Die bakterielle Mineralisation der an Partikel gebundenen Nährstoffe ist infolge ihrer Sedimentation in tiefere Wasserschichten oder gar in die Sedimente verlagert.

Da die Bakterien im Epilimnion kurze Generationszeiten aufweisen und keinen P mineralisieren, müssen effiziente Eliminationsmechanismen wirksam sein, welche den von Bakterien aufgenommenen P verwerten. Hierfür kommen die Filtrier- bzw. die Frassaktivität des Mikrozooplanktons, die Koagulation und Sedimentation mit Partikeln oder die Autolyse der Bakterien in Frage.