

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Aus dem Institut für Meereskunde an der Universität Kiel

Methodische Probleme bei Untersuchungen zur mikrobiellen Stoffaufnahme in Gewässern

Von KLAUS GÖCKE*

Zusammenfassung: Es wird ein seit einigen Jahren in der Gewässermikrobiologie eingeführtes Verfahren zur Bestimmung des „Heterotrophen Potentials“ beschrieben. Die Vor- und Nachteile dieser Methode werden diskutiert. Ihre vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten werden an Hand einiger Beispiele dargestellt.

Some problems in the investigation of microbial uptake of solutes in aquatic environments (Summary): A method which has been used during the last few years to determine the “relative heterotrophic potential” in aquatic environments is described. The advantages and disadvantages involved are discussed. Some examples of the applications of this method are also given.

1. Einleitung

Seit den Anfängen der Gewässermikrobiologie spielt die Bestimmung der Keimzahl mit dem Koch'schen Plattenverfahren eine wichtige Rolle. Man erhält mit dieser Methode die Anzahl der Saprophyten, d. h. derjenigen Bakterien, die auf einem geeigneten Nährmedium zu einer sichtbaren Kolonie heranzuwachsen vermögen. Das Verfahren ist relativ einfach und ermöglicht z. B. die rasche Erkennung einer Verschmutzungsquelle. Darüberhinaus erlaubt die Methode eine eingehende Untersuchung und Identifizierung der gewachsenen Bakterien; Kriterien, die für manche Fragestellungen von großer Bedeutung sind.

Viele Studien haben jedoch gezeigt, daß mit der Plattenmethode fast immer eine zu geringe Keimzahl ermittelt wird. Besonders die mikroskopischen Untersuchungen von RASUMOV (1932) und JANNASCH und JONES (1959) ergaben, daß die Saprophyten stets nur einen geringen Bruchteil der gesamten Bakterien darstellen. So konnten JANNASCH und JONES (1959) zeigen, daß der relative Anteil der Saprophyten mit dem Verschmutzungsgrad des Gewässers zwar wächst, daß aber selbst in sehr stark verunreinigten Gewässern ihr Anteil kaum über 10% steigt.

Die Bestimmung der Bakterienzahl allein sagt außerdem nur wenig über die Rolle der mit diesem Verfahren ermittelten Keime im Stoffkreislauf des Gewässers aus. Eine Bakterienspore, die auf einem Nährmedium durchaus zu einer Kolonie heranwachsen kann, nimmt in keiner Weise am Abbau organischer Substanzen teil. Das gleiche gilt natürlich auch für viele der Bakterien, die bei der mikroskopischen Zählung erfaßt werden.

In der Gewässermikrobiologie war man deshalb schon seit längerer Zeit bemüht, Methoden zu entwickeln, die über die bloße Ermittlung der Keimzahl hinausgehen und eine quantitative Aussage über die Aktivität der Mikroorganismen in situ, d. h. über die Abbauleistung organischer Substanzen, ermöglichen. PARSONS und STRICKLAND (1962) waren die ersten, die ein Verfahren zur Bestimmung des sogenannten „heterotrophen Potentials“ ausarbeiteten. Sie gingen dabei von dem Gedanken aus, den mikrobiellen Abbau mit einer Methode zu bestimmen, die in den Grundzügen der Methode zur Bestimmung der Primärproduktion, d. h. also des Aufbaus der organischen Substanz, ähnlich ist.

*) Der Autor dankt dem Bundesminister für Forschung und Technologie für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen.

Die Aufnahmegeschwindigkeit v ($\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$) eines Substrates bei einer gegebenen Konzentration läßt sich mit Hilfe folgender Formel bestimmen (PARSONS und STRICKLAND 1962):

$$v = \frac{c}{C\mu t} (S_n + A) \quad \begin{array}{l} \text{(Der Diskriminationsfaktor} \\ \text{soll hier vernachlässigt werden)} \end{array}$$

In dieser Gleichung ist c die Radioaktivität der abfiltrierten Organismen (cpm)*, C die Radioaktivität von 1 Microcurie des C 14-markierten Substrates (cpm) in dem benutzten Zählgerät, μ die Anzahl der Microcuries pro Probengefäß, t die Inkubationszeit in Stunden, S_n die natürliche Konzentration des jeweiligen Substrates in der Probe ($\mu\text{g Kohlenstoff l}^{-1}$) und A die Konzentration des zugegebenen Substrates ($\mu\text{g C l}^{-1}$). Nach dieser Formel läßt sich sowohl die Primärproduktion als auch die Aufnahme einer Substanz durch Bakterien ermitteln.

Bereits eine kurze Überlegung macht deutlich, daß die Geschwindigkeit des Abbaus organischer Substanz durch Bakterien erheblich schwieriger zu bestimmen ist als die des Aufbaus durch autotrophe Algen. Das natürliche Substrat, das von den Algen zur Bildung organischer Substanz aufgenommen wird, läßt sich klar definieren — es handelt sich um anorganischen Kohlenstoff. Den Bakterien steht dagegen ein unübersehbares Gemisch verschiedenartigster organischer Verbindungen zur Verfügung. Man muß sich daher bei den Messungen auf einige ausgewählte Substanzen beschränken. Die zweite Schwierigkeit liegt darin, daß zwar die Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs relativ einfach bestimmt werden kann, daß dagegen die Bestimmung der Menge der organischen Substanzen außerordentlich schwierig ist. Ein drittes Problem bei der Bestimmung des mikrobiellen Abbaus hat seine Ursache in der Aufnahmekinetik der organischen Verbindungen. Der anorganische Kohlenstoff ist in der Regel in so hoher Konzentration vorhanden, daß die geringe Zugabe des radioaktiven Bikarbonates vernachlässigt werden kann. Die einzelnen organischen Verbindungen liegen jedoch nur in verschwindend geringen Mengen vor. Hier macht sich daher die Zufügung selbst geringer Mengen des radioaktiven Substrates bereits in der Weise bemerkbar, daß die Aufnahmegeschwindigkeit der jeweiligen Substanzen durch die eingetretene Konzentrationserhöhung beeinflußt wird.

Bei den Arbeiten von PARSONS und STRICKLAND (1962) stellte sich nämlich heraus daß die Geschwindigkeit der Substrataufnahme, hervorgerufen durch eine natürliche Mischpopulation von heterotrophen Mikroorganismen, keine lineare Funktion der Substratkonzentration ist. Eine graphische Darstellung der Aufnahmegeschwindigkeit ergibt vielmehr eine hyperbolische Kurve, die sogenannte Sättigungskurve (Abb. 1 a), wie sie bei enzymkinetischen Versuchen typisch ist. Sie läßt sich durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_t + S}$$

v ist die Aufnahmegeschwindigkeit bei einer gegebenen Substratkonzentration S , V_{\max} ist die maximale Aufnahmegeschwindigkeit bei Substratsättigung, K_t ist die Michaelis-Konstante, hier Transport-Konstante genannt.

Wie man sieht, ist die Aufnahmegeschwindigkeit abhängig von der Substratkonzentration. Sie nähert sich bei hohen Konzentrationen der maximalen Aufnahmegeschwin-

*) counts per minute.

digkeit. Die tatsächliche Aufnahmegeschwindigkeit eines Substrates läßt sich ohne Kenntnis der natürlichen Substratkonzentration nicht bestimmen.

Man kann jedoch die maximale Aufnahmegeschwindigkeit eines Substrates durch die heterotrophen Mikroorganismenpopulationen einer Wasserprobe ermitteln. Hierzu ist es notwendig, die Aufnahmegeschwindigkeit bei mehreren Konzentrationen des zugeetzten radioaktiven Substrates zu bestimmen. An Hand einer graphischen Darstellung der resultierenden Sättigungskurve ließe sich dann V_{\max} ermitteln. Praktisch geht man jedoch so vor, daß zur Auswertung nicht die graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Kurve gewählt wird, sondern eine ihrer Transformationen, z. B. die Lineweaver-Burk-Modifikation. Hierbei wird die Sättigungskurve in eine Gerade (Abb. 1b) mit folgender Formel umgewandelt (eingehende Erläuterung siehe bei WRIGHT und HOBBIÉ 1966):

$$\frac{C_{\mu t}}{c} = \frac{K_t + S_n}{V_{\max}} + \frac{A}{V_{\max}}$$

Zur Zeichnung der Geraden wird $\frac{C_{\mu t}}{c}$ gegen A aufgetragen. Diese Darstellungsweise hat den Vorteil, daß sich folgende Parameter graphisch oder rechnerisch leicht ermitteln lassen:

1. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit (V_{\max}) einer gelösten organischen Substanz

Hierunter ist die Aufnahmegeschwindigkeit zu verstehen, zu der die heterotrophen Mikroorganismen einer Wasserprobe bei Substratsättigung, d. h. ohne Limitierung der Aufnahmegeschwindigkeit durch zu geringe Substratkonzentrationen, befähigt sind. Sie stellt ein Maß für die potentielle Aktivität der Bakterienpopulationen dar und ist darüberhinaus ein relativer Wert für die Größe derjenigen Mikroorganismenpopulationen, die zum Abbau der jeweiligen untersuchten Substrate befähigt sind (WRIGHT und HOBBIÉ, 1966). Hierin ist eine wichtige Erweiterung gegenüber der Keimzahlbestimmung zu sehen, da für die Größe von V_{\max} nur die Mikroorganismen eine Rolle spielen, die unter den speziellen äußeren Verhältnissen des jeweiligen Gewässers überhaupt aktiv sein können. Mit dieser Methode lassen sich also z. B. der Einfluß der Temperatur oder etwaige fördernde bzw. hemmende Effekte verschiedenartigster Substanzen auf die Aktivität der Bakterienpopulationen bestimmen.

2. Die Turnover Zeit (T_t)

Die Turnover Zeit ist die Zeit, die erforderlich ist, um diejenige Menge einer Substanz, die ihrer natürlichen Konzentration entspricht, einmal umzusetzen. Es ist einleuchtend, daß T_t einen wichtigen Parameter für die Umsetzung der organischen Substanzen im Stoffkreislauf darstellt. Erst bei Kenntnis ihres Wertes läßt sich eine Aussage über die Bedeutung einer speziellen Verbindung machen. So kann eine Substanz, die zwar quantitativ nur in geringer Konzentration vorliegt, andererseits jedoch eine kurze Turnover Zeit aufweist, für das Funktionieren des Stoffkreislaufes eine wichtigere Rolle spielen als eine Verbindung, die in hoher Konzentration vorhanden ist, dagegen nur sehr langsam metabolisiert wird.

3. Eine näherungsweise Größenangabe über die Konzentration des untersuchten Substrates

Es läßt sich mit dieser Methode die Summe der mikrobiellen Aufnahmekonstanten für das jeweilige Substrat und dessen natürlicher Konzentration bestimmen. Da die Aufnahmekonstante in der Regel sehr klein ist, kann man auf diese Weise wenigstens näherungsweise eine Aussage über die Konzentration der untersuchten Verbindung machen.

Methoden

Nachstehend soll ein kurzer Einblick in die Methodik gegeben werden, die im übrigen bei WRIGHT und HOBIE (1966) und ALLEN (1969) ausführlich dargestellt ist.

Alle Arbeitsschritte zur Bestimmung der mikrobiellen Aufnahme von Glukose, Asparaginsäure und Acetat wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um größere Zooplankter und Partikel, die störend wirken können, zu entfernen, wurden die Wasserproben durch ein Edelmetallnetz von 75 μ Maschenweite filtriert. Danach wurden in 7 Fläschchen pro Substrat (100 ml Steilbrustflaschen) je 50 ml Wasserprobe mit Hilfe eines Kippautomaten gegeben. In diese Flaschen wurden vorher steigende Volumina der Lösungen des jeweiligen radioaktiven Substrates (D- [U- ^{14}C] Glukose, L- [U- ^{14}C] Asparaginsäure, [U- ^{14}C] Na-Acetat) mit Eppendorfpipetten pipettiert. Die radioaktiven Lösungen (Amersham) wurden mit destilliertem Wasser so angesetzt, daß sie pro ml Lösung eine Radioaktivität von 5 Microcurie und eine Substratmenge von 2,5 μg Substratkohlenstoff enthielten. Hierzu war es erforderlich, der markierten Substanz die erforderliche Menge an unmarkierter zuzusetzen. Die radioaktiven Lösungen wurden in 5 ml Ampullen abgefüllt, sterilisiert und im Kühlschrank aufbewahrt. In die Probenfläschchen wurden folgende Volumina der markierten Lösungen gegeben: 10, 20, 2×30 , 50, 100 und 200 μl . Bei einem Probenvolumen von 50 ml entspricht dies Substratkonzentrationen von 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 5,0; und 10,0 $\mu\text{g C l}^{-1}$. Das 7. Fläschchen mit 1,5 $\mu\text{g C l}^{-1}$ diente als Blindprobe und wurde deshalb sofort mit 0,15 ml 50% Formol fixiert.

Anschließend wurden die Fläschchen in einem Kühlbrutschrank bei in situ Temperaturen inkubiert. Hierbei richtete sich die Länge der Inkubationszeit nach der Inkubationstemperatur und nach dem „Verschmutzungsgrad“ der Wasserproben. In der Kieler Förde oder in eutrophen Seen (ALLEN 1969) reichten selbst bei winterlichen Wassertemperaturen Bebrütungszeiten von 2—3 Stunden völlig aus. Im Sommer genügte sogar 1 Stunde oder weniger. Diese kurzen Inkubationszeiten haben den Vorteil, daß höchstens geringfügige qualitative und quantitative Veränderungen der Bakterienpopulationen eintreten können (HOBIE und CRAWFORD, 1969).

Sofort nach Beendigung der Inkubation wurde die weitere Substrataufnahme durch Zugabe von 0,15 ml Formol abgestoppt und die Proben möglichst bald durch Membranfilter mit 0,2 μ Porengröße (Cellulosenitrat, Filterdurchmesser 25 mm, Sartorius-Membranfilter GmbH) filtriert. Die Filter wurden mit 25 ml einer NaCl-Lösung nachgewaschen, die in ihrem Salzgehalt in etwa dem Probenwasser entsprach. Anschließend wurden die Filter in Szintillationsfläschchen gegeben und 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugesetzt. Diese Flüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung: 120 g Naphthalin (Merck), 5,5 g Permablend III (Packard) und Dioxan p. a. (Merck) ad 1 l. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Szintillationszählgerät (Betazint 5000, Berthold & Frieseke) bis zu einem vorgegebenen statistischen Zählfehler von $\pm 1\%$.

Die Radioaktivität der Blindprobe wird nach Umrechnung von den Hauptproben subtrahiert. Ihre Aktivität ist in der Regel sehr gering. Sie hängt infolge Adsorption des Substrates an Partikel vom Seston Gehalt der Probe und von der Sorgfältigkeit des Nachwaschens der Filter ab. Die Adsorption ist konzentrationsabhängig. Es ist daher notwendig, einige Male die Form der Adsorptionskurve (in unserem Fall praktisch eine Gerade) zu bestimmen. Für die weiteren Untersuchungen kann die Menge der adsorbierten Radioaktivität bei den einzelnen Substratkonzentrationen rechnerisch an Hand einer einzigen Blindprobe ermittelt werden.

Die Aufnahmekinetik wurde mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Modifikation bestimmt. Die 3 interessierenden Parameter V_{\max} , T_t und $(K_t + S_n)$ der Proben wurden durch Regressionsanalysen ermittelt.

Ergebnisse

Im Folgenden werden einige Untersuchungen beschrieben, die die Verwendbarkeit der geschilderten Methode illustrieren sollen.

Relation zwischen der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit und der Bakterienzahl

Wie bereits erwähnt wurde, besteht nach WRIGHT und HOBIE (1966) eine lineare Relation zwischen der Bakterienzahl und der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit. Dieser Befund wurde an einer Bakterienreinkultur gewonnen. Es stellt sich nun jedoch die Frage, ob die an einer Reinkultur gewonnenen Ergebnisse auf natürliche Gewässer mit ihren heterogenen Bakterienpopulationen übertragen werden können.

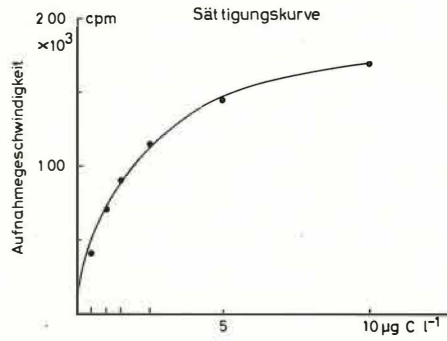
Eine strenge Beziehung zwischen den beiden Parametern ist sicherlich nur dann zu erwarten, wenn zwar die Höhe der Keimzahlen variiert, die Proportionen der einzelnen Populationen untereinander jedoch erhalten bleiben. Um diese Voraussetzung zu gewährleisten, wurde eine Wasserprobe aus der Kieler Innenförde mit steril filtriertem Wasser vom gleichen Standort versetzt. Auf diese Weise wurden die Bakterienpopulationen auf $1/2$, $1/4$ und $1/8$ ihrer ursprünglichen Stärke reduziert. Anschließend wurde die Aktivität in den unverdünnten und verdünnten Proben gemessen. In Abb. 2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Die lineare Relation zwischen der Bakterienzahl und der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit ist eindeutig zu erkennen.

Weiterhin ergab sich, daß $(K_t + S_n)$, d. h. die Summe der Aufnahme konstanten und der natürlichen Substratkonzentration, durch den Verdünnungsvorgang erwartungsgemäß nicht beeinflußt wurde. Die gefundenen Werte (Tabelle 1) liegen (innerhalb der Fehlerbreite der Methode) in gleicher Höhe. Eine Beeinflussung ist aus dem Grunde nicht zu erwarten, weil einerseits S_n durch die Zugabe des steril filtrierten Wassers nicht verändert wurde und andererseits K_t nur von der qualitativen Zusammensetzung der Bakterienflora und nicht von ihrer Menge abhängt.

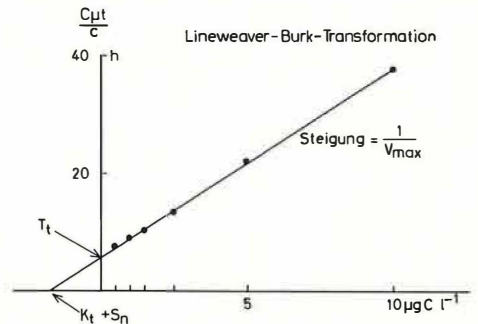
Da im geschilderten Versuch die Konzentration von S_n erhalten bleibt und V_{\max} im Verhältnis der Verdünnung reduziert wird, muß die Turnover Zeit notwendigerweise beeinflußt werden. Nach der Theorie sollte in diesem Falle die T_t umgekehrt proportional der V_{\max} sein. Die Ergebnisse (Tabelle 1) zeigen, daß dies innerhalb der Fehlergrenze der Fall ist.

Tafel 1 (zu K. Gocke)

Abb. 1: Graphische Darstellung der Substrataufnahme durch eine natürliche Mischpopulation aus der Kieler Förde.



1 a: Darstellung der Sättigungskurve.



1 b: Darstellung der Lineweaver-Burk-Transformation.

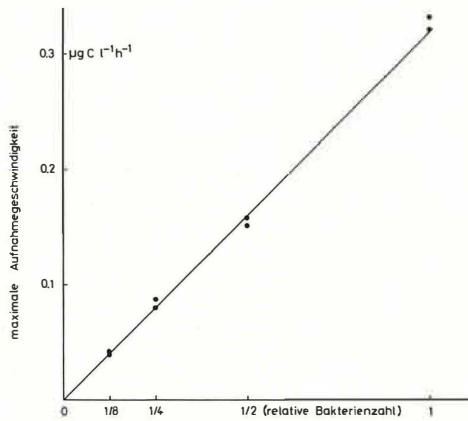


Abb. 2: Beziehung zwischen der relativen Bakterienzahl und der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit.

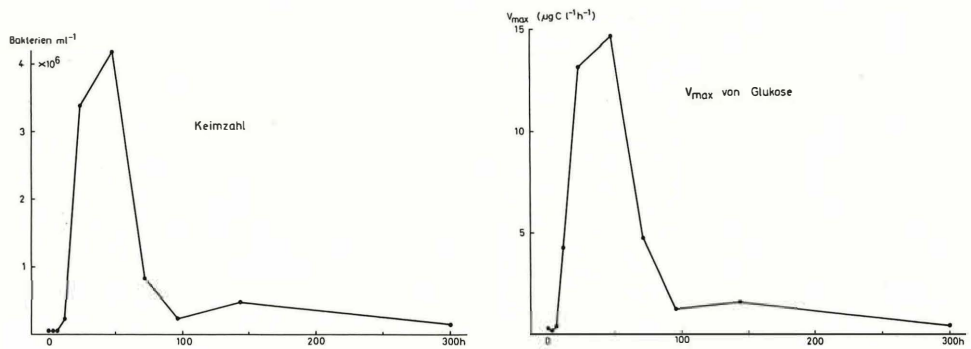


Abb. 3: Beziehung zwischen der Saprophytenzahl und der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit in einem Kulturversuch.

Tafel 2 (zu K. Gocke)

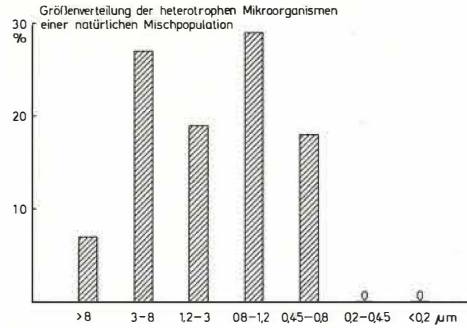


Abb. 4: Größenverteilung der heterotrophen oder potentiell heterotrophen Mikroorganismen einer Wasserprobe aus der Kieler Förde.

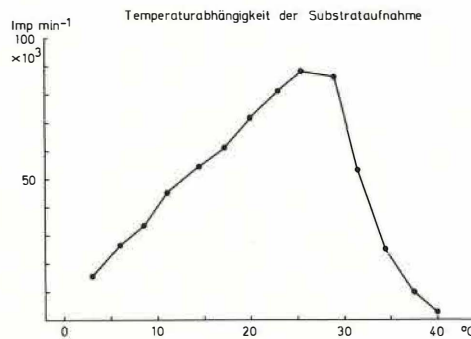


Abb. 5: Aufnahme radioaktiver Substrate durch die heterotrophen Mikroorganismen einer Wasserprobe aus der Kieler Förde (Juni 1973) in Abhängigkeit von der Temperatur.

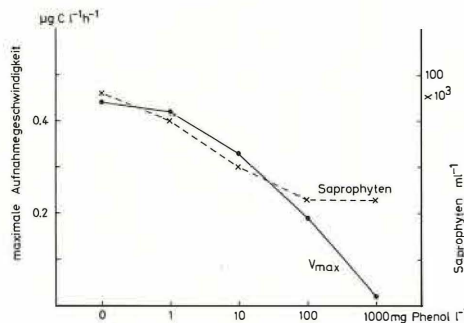


Abb. 6: Beeinträchtigung der mikrobiellen Aktivität durch kurzfristige Einwirkung abgestufter Phenolkonzentrationen in einer mit 1 mg Pepton l⁻¹ angereicherten Wasserprobe aus der Kieler Förde.

Tabelle 1

Beziehungen zwischen der relativen Bakterienzahl, der Summe der Transportkonstanten und der natürlichen Substratkonzentration sowie der Turnover Zeit.

relative Bakterienzahl	$K_t + S_n$ ($\mu\text{g C/l}$)	T_t (Stunden)
1	1,9	5,8
1/2	1,6	9,7
1/4	1,8	20,7
1/8	1,6	40,7

In einer weiteren Untersuchung wurde im Labor der Abbau von stark verdünntem Abwasser (100 ml steriles filtriertes Abwasser auf 10 l Wasser aus der Kieler Innenförde) an Hand der Keimzahl und des heterotrophen Potentials verfolgt. Da sich der Abbau über mehrere Tage erstreckte, ist anzunehmen, daß während dieser Zeit eine qualitative Veränderung der Bakterienflora eintrat. Trotzdem bestand eine signifikante Korrelation ($p < 1\%$) zwischen der Keimzahl und der V_{\max} (Abb. 3).

Die Ergebnisse der beiden Untersuchungen unterstützen die Befunde von WRIGHT und HOBBIÉ (1966) über die signifikante Korrelation zwischen der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit und der gesamten Bakterienzahl. Erstaunlich ist in dieser Hinsicht allerdings, daß auch zwischen der Saprophytenzahl (Plattenmethode) und der V_{\max} ein signifikanter Zusammenhang besteht.

Größenverteilung der heterotrophen Mikroorganismen

Bisher wurde von der Annahme ausgegangen, daß im wesentlichen Bakterien für die Aufnahme gelöster organischer Verbindungen verantwortlich sind. Natürlich sind auch Pilze dazu in der Lage. Über die quantitativen Aspekte ihrer diesbezüglichen Aktivität ist allerdings so gut wie nichts bekannt. Ob dagegen auch Algen befähigt sind, unter natürlichen Bedingungen gewisse organische Substanzen aufzunehmen, ist in der Literatur umstritten. In Kulturversuchen konnte heterotrophes Wachstum einer Reihe von Algen von mehreren Autoren nachgewiesen werden, von denen nur einige hier genannt werden können (LEWIN und LEWIN, 1960; PINTER und PROVASOLI, 1963; PROVASOLI und McLAUGHLIN, 1963). Allerdings war in diesen Kulturen die Substratkonzentration um einige Größenordnungen höher als in natürlichen Gewässern, in denen sie sich im Mikrogrammbereich bewegt. SLOAN und STRICKLAND (1966), HELLEBUST und GUIL-LARD (1967) und ELLBRÄCHTER (1972) vermochten bei verschiedenen planktischen marinen Algenarten keine Aufnahme organischer Substanz im niederen Konzentrationsbereich festzustellen. SAUNDERS (1972) konnte dagegen bei einigen planktischen Blaualgenarten die Fähigkeit zur Aufnahme von Glukose und Acetat unter natürlichen Bedingungen nachweisen.

Zur Klärung der Frage, ob außer Bakterien und Pilzen eventuell auch andere Organismen in größerem Umfang zur heterotrophen Aufnahme niedermolekularer organischer Substanzen beitragen, wurde ein Experiment über die Größenverteilung der heterotrophen Mikroorganismen durchgeführt. Hierzu wurde eine größere, steril entnommene Wasserprobe aus der Kieler Innenförde mit einem Gemisch von C 14-Glukose, C 14-

Asparaginsäure und C 14-Acetat in einer Gesamtkonzentration von ca. $10 \mu\text{C l}^{-1}$ versetzt. Nach einer 1 stündigen Inkubation im Dunkeln wurde die Probe mit Formol fixiert und aliquote Volumina durch Membranfilter (Sartorius) mit folgenden Porenweiten filtriert: 0,2; 0,45; 0,8; 1,2; 3 und 8μ . Anschließend wurde die Radioaktivität der Filter gemessen.

Die Ergebnisse (Abb. 4) zeigen, daß die Organismen, die zur Aufnahme der Substrate befähigt sind, im wesentlichen von sehr geringer Größe sind. Nahezu die Hälfte der Radioaktivität (47%) war mit Organismen, deren Größe unter $1,2 \mu$ lag, assoziiert. Dieses sind sicherlich hauptsächlich Bakterien. Die Größenklasse von $1,2\text{--}3 \mu$ trug weitere 19% zur Aktivität bei. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Bakterien und kleinste Protozoen. Unter den Organismen, die größer als 3μ waren und ebenfalls radioaktives Substrat aufgenommen haben, befanden sich wohl im wesentlichen Protozoen, Algen und sicherlich auch Bakterien auf Detritus. WILLIAMS (1970) kam bei seinen Untersuchungen im englischen Kanal zu ganz ähnlichen Ergebnissen.

Die Daten über die Fraktionierung der markierten Organismen durch Filter mit unterschiedlicher Porengröße können allerdings nur einen groben Anhaltspunkt über die Größenverteilung des heterotrophen und potentiell heterotrophen Planktons liefern. Darauf deutet schon der Befund hin, daß nur ein verschwindend geringer Bruchteil der markierten Organismen $0,8 \mu$ Filter passieren konnte, obwohl viele der marinen Bakterien kleiner als $0,8 \mu$ sind. Diese Tatsache läßt vermuten, daß von den Membranfiltern auch Partikel zurückgehalten werden, die auf Grund ihrer Größe eigentlich in das Filtrat gelangen sollten. Die Gründe hierfür sind mannigfaltiger Art (SHELDON und SUTCLIFF, 1969).

Kritisch muß zu diesem Versuch angemerkt werden, daß über das Problem der eventuellen heterotrophen Substrataufnahme durch Algen bei niedrigsten Substratkonzentrationen nichts ausgesagt werden kann. Es darf jedoch gefolgert werden, daß, selbst wenn die Algen diese Fähigkeit besitzen, diese unter den untersuchten Verhältnissen keine große Rolle spielt. Natürlich können die Ergebnisse nicht ohne weiteres verallgemeinert werden.

Einfluß der Temperatur auf die Substrataufnahme

Die Temperatur ist einer der wichtigsten Faktoren, die die Aktivität der Bakterien steuern. Um ihren Einfluß auf die Mikroorganismen zu untersuchen, wurde die Substrataufnahme durch natürliche Mischpopulationen aus der Kieler Innenförde bestimmt. Dies geschah in der Weise, daß eine größere Probe mit einem Gemisch von markierter Glukose, Asparaginsäure und Essigsäure (Konzentration $10 \mu\text{g C l}^{-1}$) versetzt wurde. Aliquote Teile wurden danach sofort in einem Temperaturblock (s. HOPPE, 1972) bebrütet. Dieses Gerät erlaubt die Inkubation kleinerer Volumina in eng aufeinanderfolgenden Temperaturschritten. Nach 2 stündiger Bebrütung wurden die Proben filtriert und die Radioaktivität der vom Filter zurückgehaltenen Organismen gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 5 dargestellt.

Es zeigte sich, daß eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Substrataufnahme vorliegt. Die Q_{10} -Werte für die Temperaturspannen von $5\text{--}15^\circ\text{C}$ bzw. $15\text{--}25^\circ\text{C}$ beliefen sich auf 2,14 bzw. 1,55. Die Optimaltemperatur betrug ca. 27°C . Sie lag damit um ca. 10°C über der Originaltemperatur der Wasserprobe. Oberhalb des Temperaturoptimums fiel die Aktivität der Organismen sehr schnell ab. Das Ergebnis macht deutlich,

daß für eine Bewertung der in situ Aktivität der Mikroorganismen die Inkubationstemperatur möglichst genau der Temperatur des Gewässers entsprechen muß. Schon relativ geringe Temperaturdifferenzen können zu einer weitgehenden Verfälschung führen.

Beeinträchtigung der mikrobiellen Aktivität durch Einwirkung von Schadstoffen

Die schädigende Wirkung einer Substanz auf die Aktivität der Mikroorganismen läßt sich auf vielfältige Art nachweisen. Die meisten Methoden haben jedoch den Nachteil nicht empfindlich genug zu sein. Aus diesem Grund muß sich die Messung über einen längeren Zeitraum hin erstrecken. Das hat zur Folge, daß während dieser Zeit innerhalb der natürlichen Mischpopulation bereits quantitative und qualitative Veränderungen eintreten können. Die Messung würde also letzten Endes an einer Population durchgeführt, die mit der ursprünglichen nur noch wenig Ähnlichkeit hat. Das kann schließlich so weit führen, daß statt eines hemmenden Effektes eine fördernde Wirkung nachgewiesen wird. Man denke hierbei an die Wirkung des Phenols, das auf die meisten Mikroorganismen eindeutig toxisch wirkt. Einige wenige Arten, die dagegen unter anderem Phenol abzubauen vermögen (ITURRIAGA und RHEINHEIMER, 1972), können sich jedoch in den Versuchsgefäßen anreichern. Schließlich würde also ihre Stoffwechseltätigkeit statt diejenige der ursprünglichen Population gemessen.

Die Bestimmung der bakteriellen Aktivität mit Hilfe der Tracer-Technik ist dagegen außerordentlich empfindlich und ermöglicht daher die Untersuchung der unveränderten Population. Das soll am Beispiel der Phenolhemmung gezeigt werden.

Der Versuchsaufbau sah folgendermaßen aus:

5 sterile 2 l-Flaschen wurden mit steril entnommenem Probenwasser aus der Kieler Innenförde gefüllt. Zusätzlich wurde in jedes Gefäß je 1 mg Pepton l^{-1} gegeben. Außerdem enthielten die Flasche I 1 mg, Flasche II 10 mg, Flasche III 100 mg und Flasche IV 1000 mg Phenol l^{-1} , Flasche V diente als Kontrolle. Nach gutem Mischen wurden aus jedem Gefäß die Saprophytenzahl und die Aufnahmegeschwindigkeit von Glukose bestimmt. Anschließend wurden die Flaschen mit der restlichen Probenflüssigkeit 24 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Bestimmung der Saprophytenzahl und der Glukoseaufnahme. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

Es zeigt sich deutlich, daß die Substrataufnahme bereits durch die kurzfristige Einwirkung des Phenols stärker gehemmt wird, als es die Keimzahlbestimmung vermuten läßt. Das ist darauf zurückzuführen, daß es zwar durch das Phenol zu einer Beeinträchtigung der Stoffwechseltätigkeit der Keime kam, daß jedoch andererseits die Organismen zum großen Teil noch nicht abgetötet waren. Als die Bakterien dann zur Bestimmung ihrer Zahl in ein phenolfreies Medium pipettiert wurden, konnte die Schädigung wieder rückgängig gemacht werden. Diese Mikroorganismen gehen daher in die Höhe der Saprophytenzahl ein, obwohl sie in den vergifteten Proben teilweise kaum noch eine Stoffwechselaktivität zeigen. Die Bestimmung der Substrataufnahmegeschwindigkeit ist also ein bedeutend aussagekräftigerer Indikator für die Schädigung der Bakterien durch Schadstoffe als die Keimzahl.

Die bereits erwähnte Gefahr der qualitativen und quantitativen Veränderung der Bakterienpopulation bei einem zu langen Versuchszeitraum kann durch die weiteren

Ergebnisse dieser Untersuchung verdeutlicht werden (Abb. 7). Hier zeigt sich nach 24 stündiger Bebrütung der Proben in den Flaschen mit Phenolkonzentrationen von 1—100 mg l⁻¹ im Gegensatz zur Sofortuntersuchung keine Beeinträchtigung der Keimzahl oder der Substrataufnahme gegenüber der Kontrolle. Statt dessen konnte sogar bei 1 µ. 10 mg Phenol l⁻¹ eine leichte Förderung nachgewiesen werden. Hier haben sich anscheinend Populationen durchgesetzt, die Phenol zumindest tolerieren und eventuell sogar als Nährsubstrat verwenden können.

Horizontalverteilung der mikrobiellen Aktivität in einem belasteten Gewässer

Wie bereits erwähnt wurde, ist eine der wichtigsten Aufgaben der Gewässermikrobiologie die schnelle Lokalisierung hoher mikrobieller Aktivitäten. Dieses Problem stellt sich besonders in der angewandten Wissenschaft, wenn es z. B. um die Auffindung von Abwassereinleitungen geht. Untersuchungen dieser Art lassen sich gut mit der geschilderten Methode durchführen. Hierbei ist als besonders vorteilhaft anzusehen, daß die Ergebnisse noch am Tag der Probenentnahme erhalten werden können, während z. B. zur Bestimmung der Saprophytenzahl mehrere Tage erforderlich sind.

In Abb. 8 ist die Lage der Stationen eines Längsschnittes durch die Kieler Förde dargestellt. Sie wurde so gewählt, daß sowohl relativ saubere (Außenförde) als auch stärker belastete Gebiete (Innenförde) erfaßt wurden. Die Abwässer der Stadt Kiel werden am nördlichsten Ausgang der Kieler Förde in die Bülder Bucht eingeleitet. Besondere hydrographische Faktoren am Tag der Probenentnahme bzw. an den vorangegangenen Tagen bewirkten, daß sich der Abwassereinfluß in einer schmalen Zunge noch mitten in der Außenförde stark bemerkbar machte. Abb. 9 zeigt, daß sämtliche untersuchten Parameter auf diesen Abwassereinfluß durch ihre extrem hohen Werte bei Station III (querab Laboe) hinweisen. Abgesehen von Station III zeigt sich generell ein Anstieg der Werte in Richtung Innenförde. Dies ist besonders deutlich bei der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit und der Saprophytenzahl zu sehen.

Ohne daß näher auf die weiteren bei dieser Fahrt gewonnenen Ergebnisse eingegangen werden soll, demonstriert die Horizontaluntersuchung der Kieler Förde die gute Verwendbarkeit der Bestimmung des heterotrophen Potentials bei mikrobiologischen Gewässeruntersuchungen.

Kritische Schlußbemerkungen

Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß die geschilderte Methode natürlich auch ihre Mängel hat. So wurde bereits gesagt, daß nur die maximale und nicht die tatsächliche Substrataufnahmegeschwindigkeit bestimmt werden kann. Wenn aber die Substratkonzentration bekannt ist, läßt sich auch die in situ Aktivität der Mikroorganismen einer Wasserprobe ermitteln. Hierzu muß jedoch zusätzlich außer der Netto-Substrataufnahme auch die Brutto-Aufnahme bestimmt werden. Dieses ist ohne allzu große Schwierigkeit durch Messung des aus den Substraten freigesetzten ¹⁴CO₂ möglich (HOBBIÉ und CRAWFORD, 1969). Natürlich bedeutet dieser Arbeitsschritt eine weitere Komplizierung der Methode.

Nach Angabe einiger Autoren führt die Bestimmung des heterotrophen Potentials in bestimmten Fällen nicht zum Erfolg. So gelangten HAMILTON und PRESLAN (1970) auf der Eastropac-Expedition nur bei einem Teil der Analysen bis zur Bestimmung von V_{max},

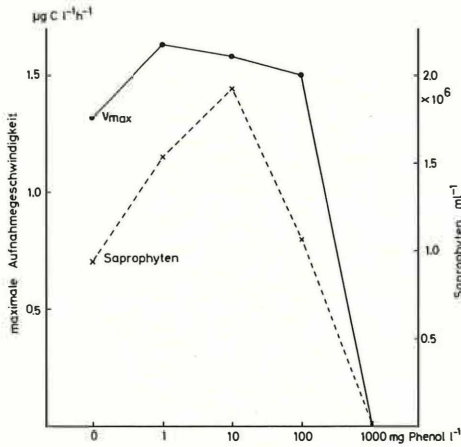
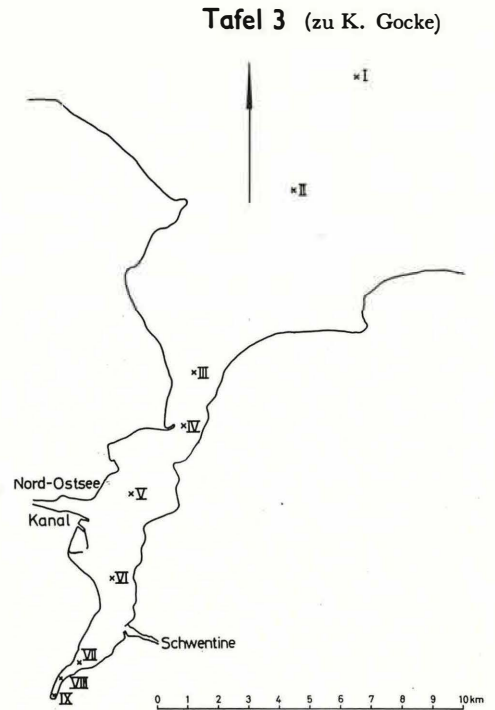


Abb. 7: Die mikrobielle Aktivität in einer mit 1 mg Pepton l⁻¹ angereicherten Wasserprobe aus der Kieler Förde nach 24 stündiger Einwirkung abgestufter Phenolkonzentrationen.

Abb. 8: Die Lage der Untersuchungsstationen in der Kieler Förde.



Kieler Förde am 18.7.1972

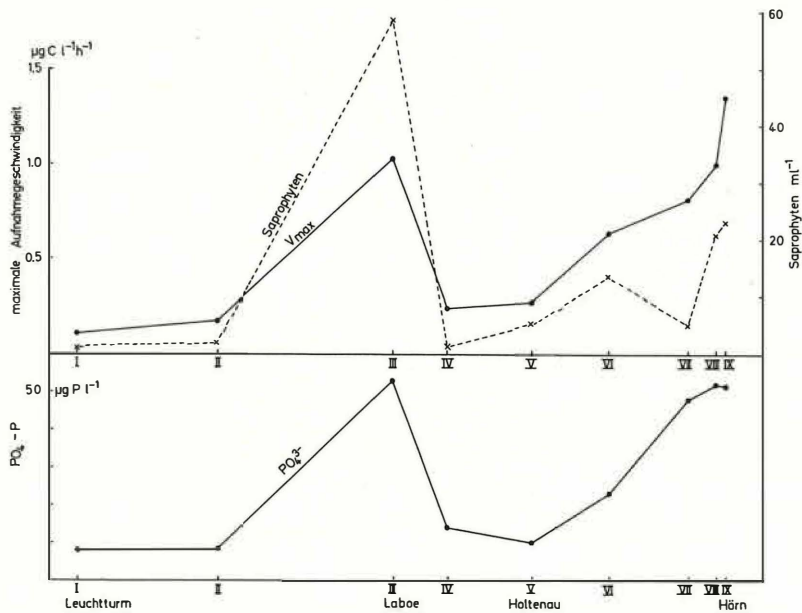


Abb. 9: Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit von Glukose und ihre Beziehungen zur Saprophytenzahl und PO₄³⁻ Konzentration auf einem Längsschnitt durch die Kieler Förde.

T_t und $(K_t + S_n)$. Auch VACCARO und JANNASCH (1967) kamen zu teilweise nicht interpretierbaren Meßwerten vor der Küste von Peru, während ihre Untersuchungen im Atlantik zu besseren Ergebnissen führten. Sie führten diese Erscheinungen auf eine zu große Heterogenität der Bakterienpopulationen der Wasserproben zurück. WILLIAMS (1973) kommt dagegen auf Grund theoretischer Betrachtungen zu dem Schluß, daß eine Populationsheterogenität nicht die von VACCARO und JANNASCH (1967) beschriebenen Diskrepanzen der Aufnahmekinetik bewirkt. Nach WILLIAMS (1973) bringt jedoch eine große Artenmannigfaltigkeit auf Grund von Variationen der Aufnahmekonstanten K_t der verschiedenen Bakterienpopulationen eine Verfälschung der Ergebnisse mit sich, die bis zu 25% betragen kann.

Zum Problem der irregulären Aufnahmekinetik läßt sich aus unserer Sicht sagen, daß von den bisher untersuchten ca. 1000 Proben mehr als 95% „enzymkinetisch“ zu deuten waren. Die aufgetretenen Abweichungen sind eher zufallsbedingte Fehler. Möglicherweise liegt dies daran, daß wir eutrophierte Gewässer mit ihren anders zusammengesetzten Bakterienpopulationen untersucht haben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Methode zur Bestimmung des heterotrophen Potentials trotz ihrer Problematik und des erforderlichen hohen Aufwandes eine gute Möglichkeit bietet, die Aktivität der Mikroorganismen in Gewässern zu bestimmen.

Frl. Flittiger und Herrn Deger danke ich für die sorgfältige Durchführung der Analysen.

Literaturverzeichnis

- ALLEN, H. L. (1969): Chemo-organotrophic utilization of dissolved organic compounds by planktic algae and bacteria in a pond. — *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 54, 1—33.
- ELLBRÄCHTER, M. (1972): Begrenzte Heterotrophie bei *Amphidinium* (Dinoflagellata). — *Kieler Meeresforsch.* 28, 84—91.
- HAMILTON, R. D. und J. E. PRESLAN (1970): Observations on heterotrophic activity in the eastern tropical pacific. — *Limnol. Oceanogr.* 15, 395—401.
- HOPPE, H.-G. (1972): Untersuchungen zur Ökologie der Hefen im Bereich der westlichen Ostsee. — *Kieler Meeresforsch.* 28, 54—77.
- HELLEBUST, J. A. und R. R. L. GUILLARD (1967): Uptake specificity for organic substrates by the marine diatom *Melosira nummuloides*. — *J. Physiol.* 3, 132—136.
- HOBBIE, J. E. und C. C. CRAWFORD (1969): Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. — *Limnol. Oceanogr.* 14, 528—532.
- ITURRIAGA, R. und G. RHEINHEIMER (1972): Untersuchungen über das Vorkommen von phenolabbauenden Mikroorganismen in Gewässern und Sedimenten. — *Kieler Meeresforsch.* 28, 213—218.
- JANNASCH, H. W. und G. E. JONES (1959): Bacterial populations in sea-water as determined by different methods of enumeration. — *Limnol. Oceanogr.* 4, 128—139.
- LEWIN, J. C. und R. A. LEWIN (1960): Auxotrophy and heterotrophy in marine littoral diatoms. — *Can. J. Microbiol.* 6, 127—133.
- PARSONS, T. R. und J. D. H. STRICKLAND (1962): On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in the sea. — *Deep-Sea Res.* 8, 211—222.
- PINTER, J. J. und L. PROVASOLI (1963): Nutritional characteristics of some chrysomonads. 114—121. — In: C. H. OPPENHEIMER (Ed.): *Symp. Mar. Microbiol.*
- PROVASOLI, L. und J. J. A. McLAUGHLIN (1963): Limited heterotrophy of some photosynthetic dinoflagellates. 105—113. — In: C. H. OPPENHEIMER (Ed.): *Symp. Mar. Microbiol.*
- RASUMOV, A. S. (1932): Eine direkte Methode der Zählung von Wasserbakterien. Ihr Vergleich mit der Koch'schen Methode. — Nach KUSNEZOW, S. I. (1959): *Die der Mikroorganismen im Stoffkreislauf der Seen*. Berlin, Deutscher Verlag der Wissenschaften, 301 S.
- SAUNDERS, G. W. (1972): Potential heterotrophy in a natural population of *Oscillatoria agardhii* Var. *isothrix* skuja. — *Limnol. Oceanogr.* 17, 704—711.
- SHELDON, R. W. und W. H. SUTCLIFF (1969): Retention of marine particles by screen and filters. — *Limnol. Oceanogr.* 14, 441—444.
- SLOAN, P. R. und J. D. H. STRICKLAND (1966): Heterotrophy of four marine phytoplankters at low substrate concentrations. — *J. Phycol.* 2, 29—32.

- VACCARO, R. F. und H. W. JANNASCH (1967): Variations in uptake kinetics for glucose by natural populations in sea-water. — *Limnol. Oceanogr.* 12, 540—542.
- WILLIAMS, P. J. leB. (1970): Heterotrophic utilization of dissolved organic compounds in the sea. I. Size distribution of population and relationship between respiration and incorporation of growth substrates. — *J. mar. biol. Ass. U. K.* 50, 859—870.
- WILLIAMS, P. J. leB. (1973): The validity of the application of simple kinetic analysis to heterogenous microbial populations. — *Limnol. Oceanogr.* 18, 159—165.
- WRIGHT, R. T. und J. E. HOBIE (1966): Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. — *Ecology* 47, 447—464.