

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

Untersuchungen zur Analyse mariner Bakterienpopulationen mit einer autoradiographischen Methode

VON HANS-GEORG HOPPE¹⁾

Zusammenfassung: Untersuchungen über die Zusammensetzung aquatischer Bakterienpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen sind bisher wenig durchgeführt worden, da es an adäquaten Methoden mangelt. Es wird eine kombinierte Methode mit ¹⁴C-markierten Substraten, Nährkartonscheiben, Membranfiltern und Autoradiographie beschrieben, mit der verschiedene physiologische Gruppen erfaßt werden können. Kolonien mit besonderen Eigenschaften (z. B. Phenol oder DDT-Abbauer) können leicht identifiziert und isoliert werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß einige der getesteten Substrate (Glucose, Asparaginsäure, Acetat) stets von fast allen Saprophyten aufgenommen werden können, während die Aufnahme anderer (z. B. Xylose, Lactose, Harnsäure, Phenol, Riboflavin, Fett) sowohl jahreszeitlich bedingte als auch von der Verschmutzung und Küstenentfernung abhängige Fluktuationen aufweist. Von dem größeren Spektrum der Nährstoffverwertung durch Bakterien in Küstengewässern kann eine schnelle Adaptation an Abwasserinhaltsstoffe erwartet werden, während in küstenferneren Gebieten entsprechende Populationen nur sehr schwach vertreten sind.

Investigations on the analysis of marine bacterial populations by means of autoradiography (Summary): Investigations on the composition of aquatic bacterial populations in respect of their nutritional requirements have been rarely made because of the lack of adequate methods. A combined method using ¹⁴C-marked substrates, nutrient pads, membrane filters and autoradiography is described, which enables one to differentiate the physiological groups of bacteria. Colonies with special properties (e.g. degradation of phenol or DDT) can easily be identified and isolated. The preliminary results show that some of the test substrates (glucose, aspartic acid, acetate) can always be taken up by most of the bacteria. Others (e.g. xylose, lactose, uric acid, phenol, riboflavin, fat) show seasonal and environmental fluctuations. The wide spectrum of nutritional requirements of bacterial populations in coastal regions may lead to a quick adaptation to sewage compounds, while in offshore regions the corresponding populations are rather small.

Einleitung

Heterotrophe Bakterien sind als Destruenten maßgeblich an der Aufnahme und Remineralisation organischer Substanzen im Meerwasser beteiligt. Dieser Prozeß bewirkt eine Selbstreinigung der Gewässer, durch die sowohl wasserlösliche organische Stoffe (z. B. Zucker, organische Karbonsäuren, Aminosäuren) als auch suspendierte Substanzen (z.B. Proteine, Stärke, Zellulose, Fette) unter aeroben Bedingungen auf ihre Ausgangskomponenten CO₂, Wasser und Mineralien zurückgeführt werden. Die Zersetzung der organischen Substrate kann in ihrem temporären Verlauf und Katabolismus durch abiotische Faktoren (Temperatur, Salzgehalt, Sauerstoffgehalt) und biotische Faktoren (z.B. Nahrungskonkurrenz) beeinflußt werden. Organische Verbindungen spielen dabei als Wirkstoffe (Vitamine) und Hemmstoffe (z.B. Phenol) eine wichtige Rolle.

Die Remineralisierung wird von Mikroorganismenpopulationen bewirkt, deren Größe und Artenkombination von den genannten Faktoren und von der Konzentration und Zusammensetzung der vorhandenen Nährstoffe abhängt (RHEINHEIMER 1971). Neben den jeweils dominierenden Arten werden jedoch stets auch einige Bakterien anzutreffen sein, die gerade keine geeigneten Vermehrungsmöglichkeiten finden. Populations-

¹⁾ Der Autor dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Untersuchungen durch finanzielle Unterstützung.

änderungen können durch die Veränderung äußerer Bedingungen, zum Beispiel der Nährstoffzusammensetzung durch Abwassereinfluß, hervorgerufen werden. Die Adaptation der Mikroorganismenpopulation an das neue Substrat kann in Abhängigkeit von der Generationszeit durch bisher relativ inaktive Bakterien und durch die Induktion der Bildung notwendiger Enzyme erfolgen. Eine Änderung der Bakterienpopulation kann auch dadurch eintreten, daß im Verlauf des Selbstreinigungsprozesses zunächst leicht abbaubare Stoffe wie Eiweiß, Zucker und Stärke, später aber überwiegend schwerer zersetzliche Verbindungen wie Fette, Wachse und Lignin verwertet werden (Sukzession). Wenn neben dem Nährstoffangebot auch andere Faktoren geändert werden (z.B. NaCl-Konzentration), kann eine Populationsänderung von der Kombination dieser Faktoren oder überwiegend von einem Faktor abhängen. Während der Einfluß einiger leicht meßbarer Parameter (z.B. Temperatur, Salzgehalt) auf die Zusammensetzung der marinen Bakterienflora schon genauer untersucht worden ist (SIEBURTH 1967, RHEINHEIMER 1968, MEYER-REIL 1974), gibt es nur wenige Ansätze, die sich mit der Differenzierung von Saprophytenpopulationen hinsichtlich deren Möglichkeit zur Verwertung verschiedener Nährstoffe befassen.

SIEBURTH (1971) versucht die Bakterienflora verschiedener Wasserkörper durch Bestimmung ihrer „biochemischen Aktivität“ zu charakterisieren. Dazu werden die Bakterien mit der „Agar roll tube“-Methode kultiviert und auf Selektivnährböden die Zahlen der proteolytischen, amylolytischen und lipolytischen Kolonien ermittelt. Bei dem Vergleich der Relationen der prozentualen Anteile der verschiedenen physiologischen Gruppen an der gesamten Population, werden Unterschiede sichtbar, die auf eine unterschiedliche „biochemische Aktivität“ zum Beispiel im Oberflächen- und im Tiefenwasser schließen lassen. Da jedoch auf den Selektivmedien häufig Kolonien auftraten, die von supplementären Substanzen (z. B. Hefeextrakt) leben, müssen repräsentative Kolonien isoliert und erneut auf ihre substratassimilatorischen Fähigkeiten geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine autoradiographische Methode eingeführt, mit der es gelingt, das Wachstum von Saprophytenpopulationen auf einer Vielzahl wasserlöslicher oder fein suspendierbarer radioaktiv markierter Substrate (Nährstoffe, Schadstoffe, Wirkstoffe) zu ermitteln. Dabei werden Nachteile bisheriger Methoden, die Schwierigkeit der Auswahl dominierender Keime und die Unsicherheit bei dem Nachweis der Substrataufnahme, vermieden. Die Möglichkeit zur Isolierung von Bakterien mit bestimmten Eigenschaften bleibt gegenüber mikroskopischen Verfahren erhalten. Es können sowohl die Nährstoffansprüche von Reinkulturen und verschiedenen Bakterienpopulationen als auch jahreszeitlich oder durch andere Faktoren bedingte Populationsänderungen festgestellt werden. Ähnliche methodische Ansätze, jedoch mit anderer Zielsetzung, finden sich bei PERONI (1969, 1970, 1971), der sich um die Zählung aktiver Bakterien mit Hilfe von ^{32}P markiertem Phosphat bemüht, und bei KOKKE (1970 a, b, 1973), KLEEF et al. (1969), KOKKE et al. (1969). Die zuletzt genannten Autoren konzentrierten sich auf den Nachweis der Akkumulation von Metall-Isotopen sowie den Abbau von Pestiziden und Herbiziden durch Bakterien- und Pilzkolonien mit Hilfe des Agar-Plattenverfahrens und der Autoradiographie. Insbesondere die Anwendung des Plattenverfahrens läßt einige Nachteile erwarten (Hintergrundstrahlung), die bei der Benutzung von Membranfiltern vermeidbar sind.

Es werden einige Ergebnisse mitgeteilt, die mit der beschriebenen Methode an Bakterienpopulationen aus der westlichen Ostsee (Kieler Förde) gewonnen wurden. Neben der Möglichkeit zur Isolierung von Nahrungsspezialisten und der Charakterisierung von Bakterienflore nach ihren Nahrungsansprüchen, ergibt sich eine ökologische Bedeutung und Interpretationsmöglichkeit der Ergebnisse auch dadurch, daß eine lineare Relation

zwischen der Bakterienzahl und der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit von Substraten besteht, wenn andere Parameter nicht wesentlich verändert werden. WRIGHT und HOBBI (1966) fanden eine signifikante Korrelation zwischen V_{\max} und der Bakterienzahl an einer Reinkultur, während GOCHE (1974) gleiche Zusammenhänge für natürliche Bakterienpopulationen (Gesamtkeimzahl, Saprophytenzahl nach der Plattenmethode) nachwies. Die Technik der Autoradiographie ist bisher relativ selten in der mikrobiellen Ökologie angewandt worden, um die Anerkennung und Verbreitung der Methode für derartige Untersuchungen hat sich neben anderen insbesondere BROCK bemüht (BROCK 1967, BROCK und BROCK 1966).

Methode

Autoradiographie kann, je nach der Größe des abzubildenden Objektes, nach drei Verfahren durchgeführt werden:

- a) mit normalem Röntgenfilm und Lupenbetrachtung für makroskopische Objekte,
- b) mit „stripping-film“ und mikroskopischer Auswertung für kleine Objekte (z. B. Bakterienzellen),
- c) mit Emulsion (oder „stripping film“) und elektronenmikroskopischer Auswertung zur Ermittlung der Lagerung radioaktiver Substanz innerhalb von Zellen und Geweben.

Weil in diesem Fall nur Bakterienkolonien abzubilden waren, kam die erste Möglichkeit zur Anwendung. Die Durchführung der Methode kann in vier Teilschritten erfolgen, von denen die ersten beiden sterile Arbeitsbedingungen erfordern.

1. Vorinkubation: Von der zu untersuchenden Wasser- oder Sedimentprobe wird eine Verdünnungsreihe angelegt. Jeweils 10 ml einer geeigneten Konzentration (20—200 Saprophyten/¹⁰ ml) werden durch ein Membranfilter von 0,2 μ Porenweite und 5 cm Durchmesser (Firma Sartorius) gesaugt. Es wurden so viele Parallelen angelegt, wie die Zahl der radioaktiven Testsubstrate betrug. Die Membranfilter werden blasenfrei auf Kartonscheiben (Firma Macherey und Nagel, MN 866, \varnothing 5 cm) gelegt, die in einem Nährmedium (ZoBell-Medium 2216 E mit 15⁰/₀₀ Salzgehalt) autoklaviert worden sind. Es folgt eine etwa 5 tägige Inkubation bei 20°C; die heranwachsenden Bakterienkolonien dürfen für die anschließende ¹⁴C-Inkubation nicht zu groß werden und nicht ineinander verlaufen.

2. Inkubation auf ¹⁴C-Substrat: Die bewachsenen Filter wurden nun auf Chromatographie-Papierscheiben (\varnothing 5 cm) gelegt, die gleichmäßig mit je einem bestimmten ¹⁴C-Substrat (z. B. Glucose, Xylose, Phenol usw.) getränkt sind. Für eine Papierscheibe werden ca. 0,75 ml Testlösung benötigt. Diese enthält 0,5 μ Ci ¹⁴C-Substrat und 0,5 mg unmarkiertes Substrat in 0,75 ml Seewassergemisch von 15⁰/₀₀ S. Durch die Zugabe des unmarkierten Supplementes soll die Schwellenkonzentration der Substrataufnahme überschritten werden. Die Bebrütung dauert 2 Tage bei 20°C.

3. Kontaktautoradiographie: Die bewachsenen Filter werden dann auf Fließpapier liegend über einer schiefen Ebene mit Leitungswasser ca. 30 Minuten gespült um adsorbiertes ¹⁴C-Substrat zu entfernen. Anschließend werden die Filter bei 40°C im Trockenschrank getrocknet. In lichtdichten Kassetten (Abb. 1 a) werden die Filter mit 5 \times 5 cm großen Röntgenfilmstückchen (Agfa Osray T 4) bedeckt und zwei Tage in einem trockenen, temperaturkonstanten Raum „belichtet“. Die Entwicklung (Agfa G 150) und Fixierung (Agfa G 334) muß wie der gesamte Prozeß standardisiert werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Sehr kleine Kolonien werden auf den Membranfiltern häufig übersehen, es empfiehlt sich daher, die Filter nach dem autoradio-

graphischen Vorgang mit phenolischer Erythrosinlösung zu färben und überschüssigen Farbstoff auszuwaschen.

4. Auswertung: Die gefärbten Kolonien auf den Membranfiltern und die „spots“ auf den dazugehörigen Filmen werden parallel in Auflicht bzw. Durchlicht auf einer besonderen Zählapparatur (Abb. 1 b) ausgezählt. Man erhält dadurch eine Gesamt-Saprophytenzahl auf den Filtern, die mit der Saprophytenzahl nach der Plattenmethode verglichen werden kann. Aus der Zahl der Kolonien und der spots kann zuverlässig der prozentuale Anteil einer Population ermittelt werden, der zur Akkumulation eines gegebenen Substrates in der Lage ist (Abb. 2 a, b, c, 3 a, b, c). Der Einsatz automatischer Bildanalysatoren nach dem Fernseh-Raster-Prinzip könnte die Auswertung sehr erleichtern. Häufig können spots mit starker und schwacher Schwärzung unterschieden werden, dadurch ist eine weitere Differenzierung der Bakterienkolonien möglich. Stets sollten zur Bewertung einige Blindproben herangezogen werden, deren Kolonien nach der Vorinkubation durch Formol (40%ig) fixiert wurden.

Variationen: Besonders bei Populationsanalysen empfiehlt es sich, nicht von Parallelfiltrationen auszugehen, sondern nach der Vorinkubation von einem Filter mit guter Kolonieverteilung ausgehend Duplikate nach der Lederberg-Technik oder durch Überimpfen aller Kolonien herzustellen. Man geht damit von einer repräsentativen Population aus, die bei hoher Verdünnung des filtrierten Wassers mit großer Wahrscheinlichkeit nur die wirklich häufigen Bakterien enthält. Für den Nachweis seltener Bakterien, denen ein schwer abbaubares Substrat als Nahrungsquelle dienen kann, wird jedoch stets die Filtration eines größeren Wasservolumens erforderlich sein.

Durch das Anlegen von Duplikaten der bewachsenen Filter, die nicht für die Autoradiographie verwertet werden, können nach Vergleich mit den spots der Autoradiographie solche Kolonien identifiziert und isoliert werden, die ein bestimmtes Substrat aufnehmen. Diese Möglichkeit ist besonders interessant für die Isolierung von Stoffwechselspezialisten (z. B. DDT-, Phenol-, Harnsäureabbau), von denen nach den üblichen Methoden häufig nur tolerante und mit supplementären Substanzen wachsende Kolonien gewählt werden.

Die Methode kann auch dazu benutzt werden, die assimilatorischen Fähigkeiten von Reinkulturen zu bestimmen. Diese werden bei Bakterien gewöhnlich von dem Säurebildungsvermögen abgeleitet; bei Hefen wird ein Auxanogramm angefertigt oder das Wachstum in flüssigen Medien beurteilt. Die Ergebnisse nach der autoradiographischen Methode sind in der Regel eindeutiger und nach Einarbeitung weniger aufwendig zu erzielen. Auf einem Membranfilter können etwa 10 Reinkulturen auf das Wachstum mit einer bestimmten Substanz geprüft werden, wenn diese mit einer Impföse an gekennzeichneten Stellen aufgetragen werden. Die beimpften Filter werden nach dem beschriebenen Verfahren bearbeitet.

Die Verwendung von Membranfiltern zur Vorkultur bringt gegenüber der Kultivierung der Bakterien auf Agarplatten für die Autoradiographie einige Vorteile: a) Anwendbarkeit in Gebieten sehr geringer Bakterienbesiedlung, b) Verminderung der Hintergrundstrahlung durch Auswaschen der Filter, c) Möglichkeit zur Färbung der Kolonien und Anwendung des Mikrokolonieverfahrens, d) Vermeidung des Einbringens einer feuchtigkeitsundurchlässigen Plastikfolie zwischen Objekt und Film, durch die Effektivität und Auflösung herabgesetzt werden. Zur Technik der Autoradiographie sowie deren theoretischen Grundlagen, der Einwirkung von β -Strahlung auf Silberhalogenid-Kristalle, gibt ROGERS (1967) eine umfassende Übersicht. Eine verwandte kontaktautoradiographische Methode zur Bestimmung der Radioaktivität von Schweb-

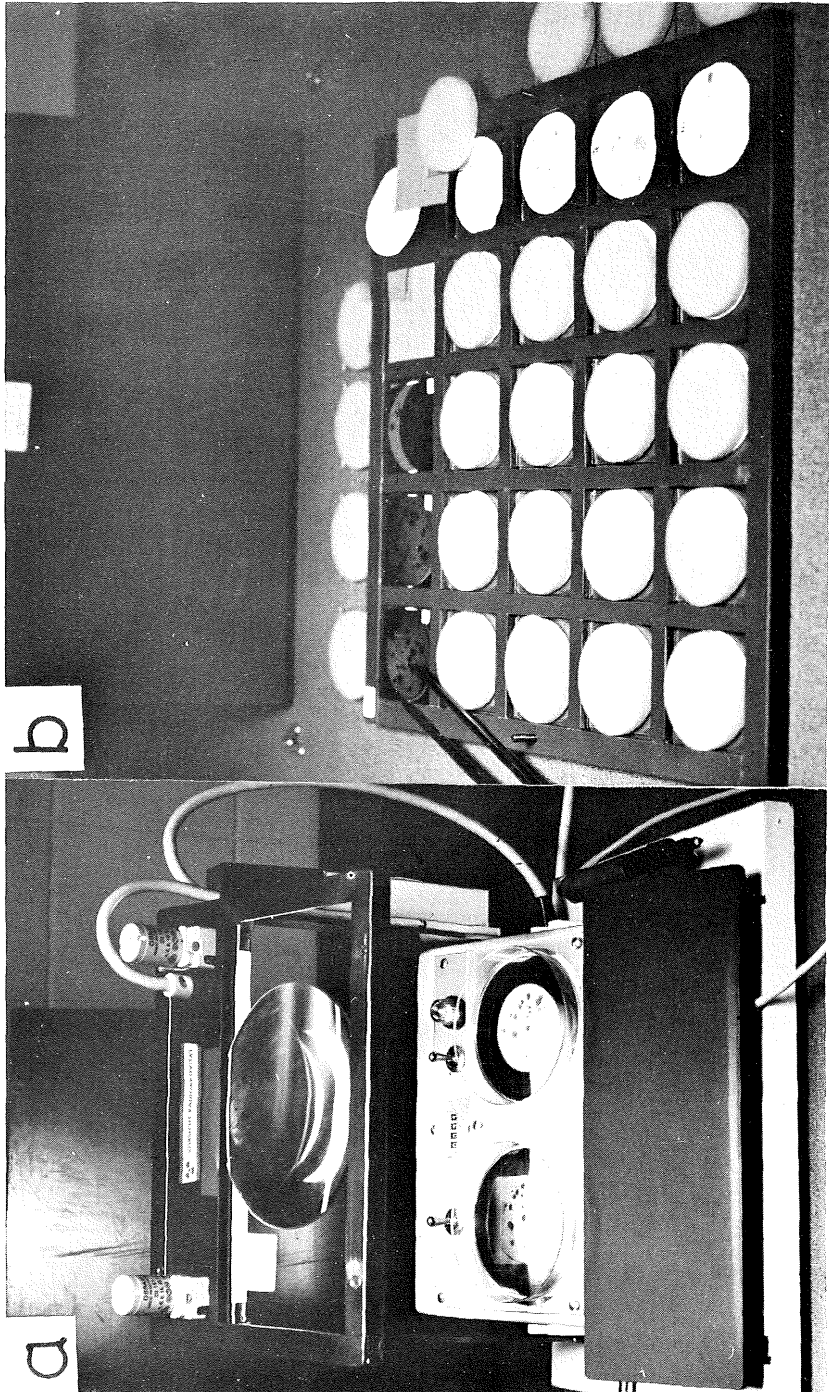


Abb. 1: Für die Kontaktradiographie benutzte Geräte.
a) „Belichtungskassette“ für 25 Filter; Anordnung von unten nach oben: Glasplatte, Membranfilter, Röntgenfilm, Glasplatte mit Schaumgummi zum Andrücken durch einen lichtdichten Deckel.
b) Apparat zum Auszählen der Filme (links) im Durchlicht und der gefärbten Filter (rechts) im Auflicht.

Tafel 2 (zu H.-G. Hoppe)

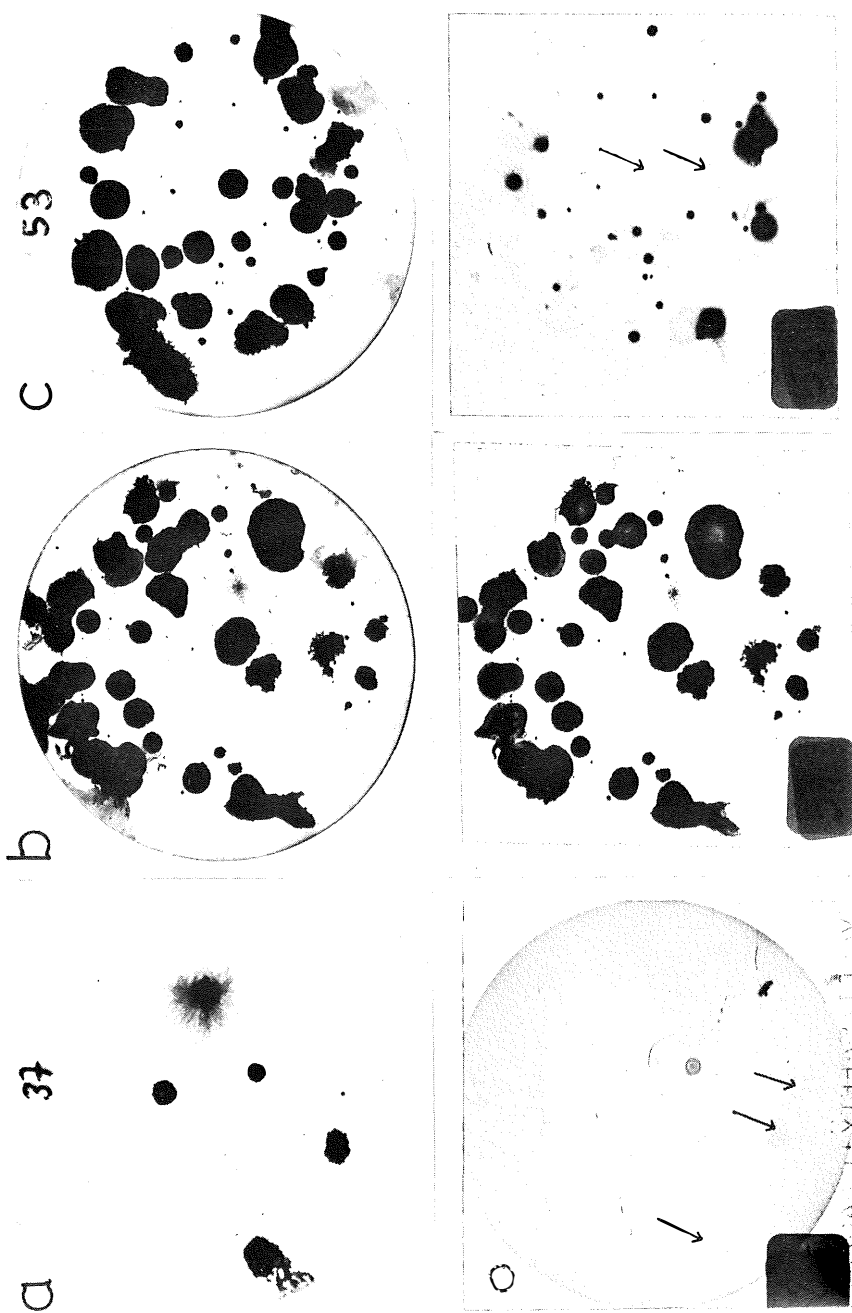


Abb. 2: Gefärbte Bakterienkolonien auf Filtern (oben) und die dazugehörigen Abbildungen der markierten Kolonien (unten) Markierung durch:
a) DCFA b) Glucose c) Xylose.
Die Pfeile deuten auf einige nicht markierte Kolonien hin.

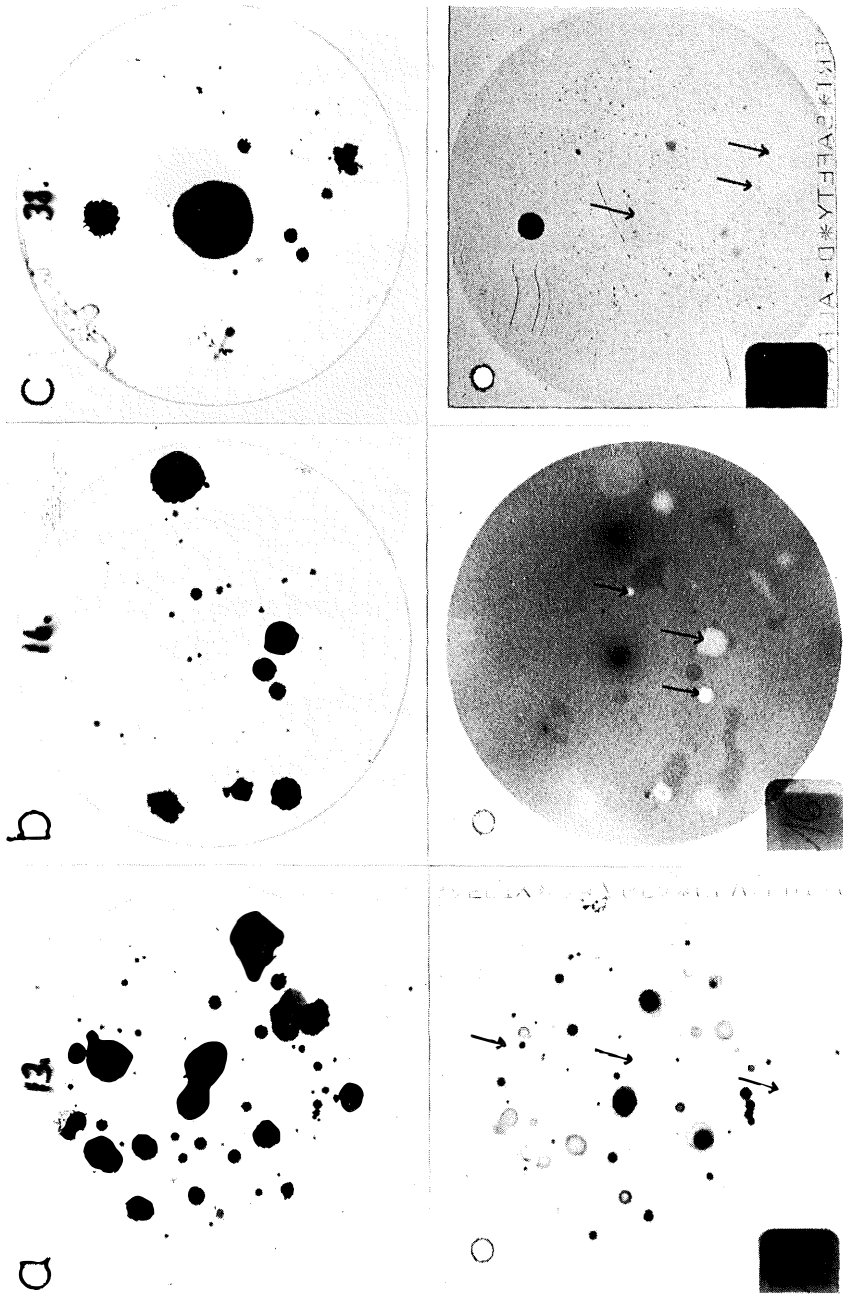


Abb. 3: Gefärbte Bakterienkolonien auf Filtern (oben) und die dazugehörigen Röntgenfilm-Abbildungen der markierten Kolonien (unten). Markierung durch:
a) Lactose b) Riboflavin c) Harnsäure.

Tafel 4 (zu H.-G. Hoppe)

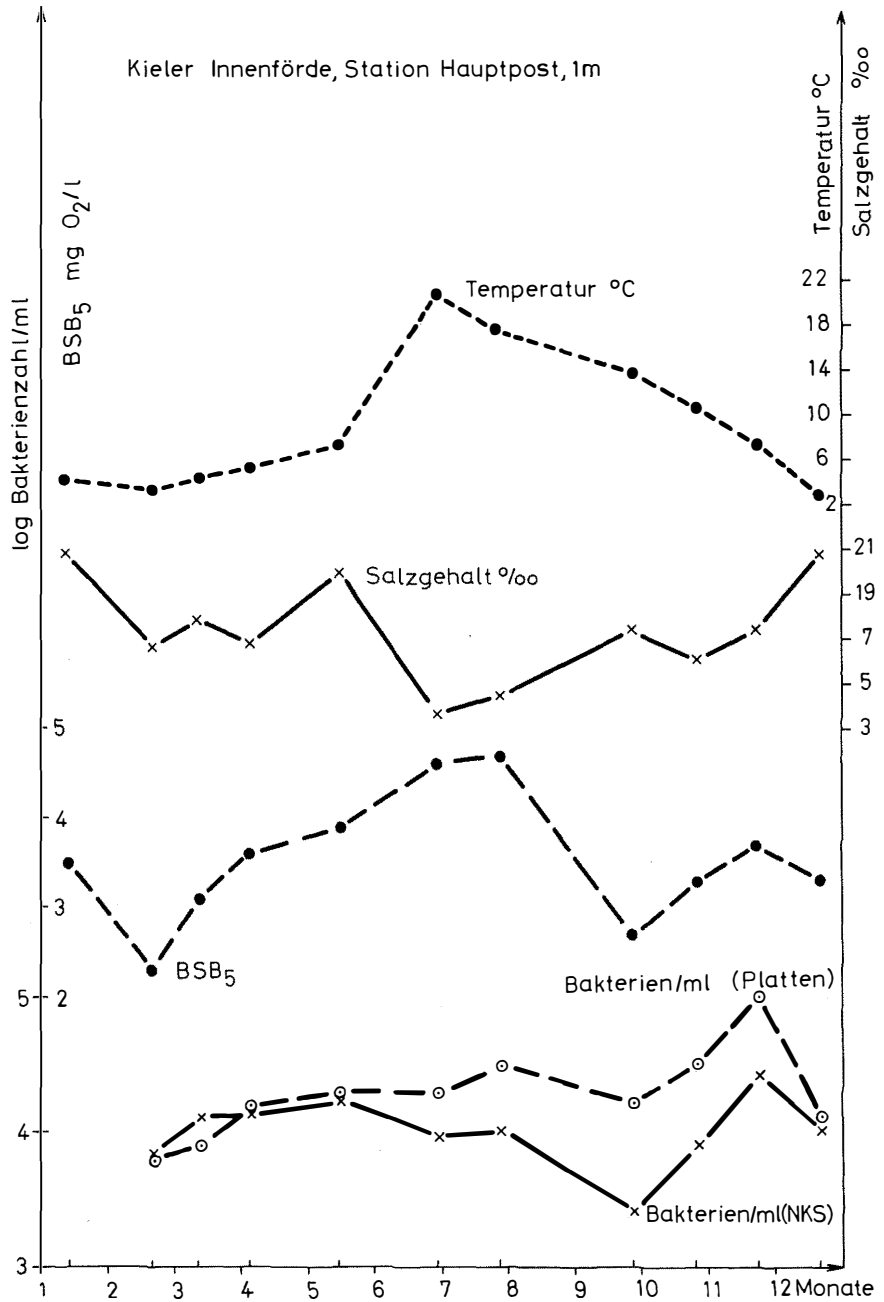


Abb. 4: Charakterisierung des untersuchten Wasserkörpers. Jahrgänge der Temperatur, des Salzgehaltes und BSB₅ sowie der Saprophytenzahl/ml (nach dem Plattenverfahren und mit Nährkortonscheiben = NKS) bei einer Station der Kieler Innenförde.

stoffteilchen in der Luft (BURNETT 1952) wird in einer Veröffentlichung der Firma Millipore dargestellt.

Ergebnisse

Die Untersuchungen zur Analyse von Bakterienpopulation wurden an Wasserproben von monatlichen Schiffsfahrten im Jahr 1973 in der Kieler Bucht vorgenommen. Dabei wurden drei Stationen (Hauptpost, Holtenau, Feuerschiff) mit zwei Tiefen (1 m, 10 m) mit abnehmendem Verschmutzungsgrad und zunehmender Küstenentfernung bearbeitet. Durchgehend wurde das Vorkommen der Bakterien ermittelt, die folgende Substrate aufnehmen: U-¹⁴C Asparaginsäure, U-¹⁴C Na-Acetat, U-¹⁴C-Xylose, (D-Glucose-1-¹⁴C)-Lactose, 1-¹⁴C Glycerintripalmitat, U-¹⁴C-Phenol, 2-¹⁴C-Harnsäure, 2-¹⁴C-Riboflavin, außerdem seltener U-¹⁴C-Maltose, U-¹⁴C-Saccharose, U-¹⁴C-Glucosamin, U-¹⁴C-Glycerin, löslicher Anteil von 1-¹⁴C-Stärke, ¹⁴C-DDT, ¹⁴C-Carbonat (alle Substrate wurden von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen).

Der jahreszeitliche Verlauf einiger physikalisch-chemischer und mikrobiologischer Parameter im Untersuchungsgebiet. Der Jahresgang der Temperatur des Oberflächenwassers zeigt einen für die westliche Ostsee typischen Verlauf mit starkem Anstieg im Frühjahr und allmählichem Abfall im Herbst (Abb. 4). Beim Tiefenwasser kommt es dagegen besonders bei geringer Wasserdurchmischung häufig zu einer zeitlich verzögerten Angleichung an die Oberflächentemperatur. Die Salzgehaltskurve weist auf eine starke Durchmischung mit Nordseewasser während der kalten Jahreszeit hin, während in den relativ windstillen Sommermonaten der Salzgehalt stark abnimmt. Die auf den Membranfiltern ermittelte Saprophytenzahl steigt während des Frühjahrs an, sinkt bis zum Herbstbeginn ab und nimmt dann wieder kräftig zu. Der Kurvenverlauf der auf ZoBell-Agar mit 15⁰/₀₀ Salzgehalt ermittelten Keimzahlen zeigt eine ähnliche Tendenz. Während die beiden Saprophytenzählungen bei niedrigen Wassertemperaturen relativ gut übereinstimmen, treten mit ansteigender Temperatur größere Differenzen auf. Die Keimzahlen weisen eine tendenzielle Gegenläufigkeit zum Salzgehalt auf, dieses deutet auf eine starke Beeinflussung der inneren Förde durch die hydrographische Situation und bakterielle Kontamination vom Lande hin.

Der Anteil verschiedener physiologischer Bakteriengruppen an der Gesamtzahl der saprophytischen Bakterien. In der Tabelle 1 sind die Schwankungsbreiten sowie die durchschnittlichen Prozentwerte der Bakterien, die ein bestimmtes Substrat verwerten können, dargestellt. Glucose (nicht in der Tabelle angeführt) und Asparaginsäure werden unabhängig von der Jahreszeit und der Entnahmestelle von fast allen Saprophyten im Wasser des Untersuchungsgebietes aufgenommen. Acetat wird ebenfalls von der überwiegenden Zahl der saprophytischen Bakterien verwertet, es deutet sich jedoch ein geringfügiger Rückgang dieser Fähigkeit mit zunehmender Küstenentfernung an. Wichtige wasserlösliche Bestandteile von verbreiteten Nährstoffen, Glycerin (Fett), lösliche Stärke (Stärke) und Glucosamin (Chitin), können fast allen isolierten Bakterien als Nahrung dienen, das läßt jedoch keine Schlüsse auf die Zersetzung der Ausgangsstoffe zu. Die beiden im Pflanzenreich sehr häufig vorkommenden Disaccharide Saccharose und Maltose werden durchschnittlich von 74—98% bzw. 63—89% aller Bakterienkolonien verwertet. Bei den Zahlen der Xylose abbauenden Bakterien (wichtiger Pentose-Baustein der verbreiteten „Hemizellulosen“ = Xylane) ist gegenüber den bisher betrachteten Gruppen ein deutlicher Rückgang festzustellen (durchschnittlich 64—71%). Neben den registrierten stark akkumulierenden Kolonien treten jedoch stets auch zahlreiche Kolonien mit schwacher Substrataufnahme auf. Dieses könnte damit in Zusammenhang stehen, daß Xylanasen sowohl konstitutiv als auch induktiv gebildet werden (SCHLEGEL 1969), so daß auch ein substratinduzierter

Tabelle 1

Größe der Bakterienpopulation, die ein bestimmtes Substrat als Nährstoff verwenden kann, bezogen auf die Gesamtzahl der Saprophyten. Die Zahl der Ausfahrten, aus denen die Werte ermittelt wurden, sind neben dem Substrat in Klammern () angegeben. Während die jeweils oberen Zahlen die Schwankungsbreite wiedergeben, wird durch die untere Prozentzahl der Durchschnitt dargestellt.

¹⁴ C-markiertes Substrat	Hauptpost		Holtenau		Feuerschiff	
	10 m	1 m	10 m	1 m	10 m	1 m
Asparaginsäure (5)	93—100% 97	94—100% 97	93—100% 98	90—100% 94	95—100% 98	91—100% 97
Na-Acetat (6)	86—100% 96	86—100% 96	96—100% 98	83—100% 92	66—100% 80	86—100% 94
lösl. Stärke (1)	100%	90%	93%	95%	91%	97%
Glucosamin (1)	94%	90%	89%	95%		
Glycerin (1)	97%	83%	98%	100%	98%	93%
Saccharose (4)	50—99% 74	79—97% 89	93—100% 98	88—100% 97	76—100% 87	77—100% 90
Maltose (2)	81—96% 89	77—94% 86	78—100% 89	76—95% 86	35—91% 63	65—92% 79
Xylose (9)	38—91% 69	43—99% 69	26—100% 64	25—100% 69	44—100% (79)	25—96% 71
Lactose (7)	44—100% 70	25—98% 66	33—76% 56	47—98% 67	25—100% 69	17—97% 57
Fett (7)	6—36% 21	5—24% 13	2—22% 10	5—34% 8	0—28% 19	0—21% 11
Phenol (8)	0—34% 13	0—35% 11	0—11% 5	0—33% 7	0—7% 3	0—12% 4
Harnsäure (7)	0—27% 18	0—39% 12	0—11% (1)	0—23% 15	0—26% 7	0—11% 4
Riboflavin (5)	(0)—92% 47	(0)—73% 31	(0)—50% 33	1—64% 23	1—80% 24	0—25% 9

Xylose-Abbau möglich erscheint. Das hauptsächlich in der tierischen Milch vorkommende Disaccharid Lactose wird durchschnittlich von einer etwas geringeren Bakterienzahl aufgenommen (56—70%). Auch in diesem Fall treten neben stark markierten häufig bis zu 100% schwach markierte Kolonien auf, was auf eine induzierte β -Galactosidase Bildung durch viele Bakterien nach längerem Wachstum auf Lactose hindeutet. Für *Escherichia coli* wird eine solche Induktion bei SCHLEGEL (1969) beschrieben. Die fettähnliche Substanz Glycerintripalmitat, suspendiert in Tween 80, wurde stets von weniger als 40% der Saprophyten aufgenommen. Der Nachweis des Fettabbaus ist wegen der Schwierigkeiten bei der gleichmäßigen Verteilung und Auswaschbarkeit aus dem Filter weniger zuverlässig. Häufig ist nur der äußere Rand oder die Umgebung einer Kolonie markiert. Während für den Fettabbau in der Wassersäule keine eindeutige Präferenz festzustellen war, zeigten die Neustonproben aus dem Limfjord eine deutliche Erhöhung des Anteils der lipolytischen Bakterien (HOPPE, unveröff.). Phenol und phenolhaltige Verbindungen sind Bestandteile vieler Abwässer sowie der Humusstoffe. Phenolabbauer können mit der Autoradiographie eindeutig nachgewiesen und isoliert werden, tolerante Bakterien werden nicht markiert. Der Anteil der phenolaufnehmenden Bakterien zeigt von Fahrt zu Fahrt große Schwankungen, steht jedoch mit dem Grad der Verunreini-

Tafel 5 (zu H.-G. Hoppe)

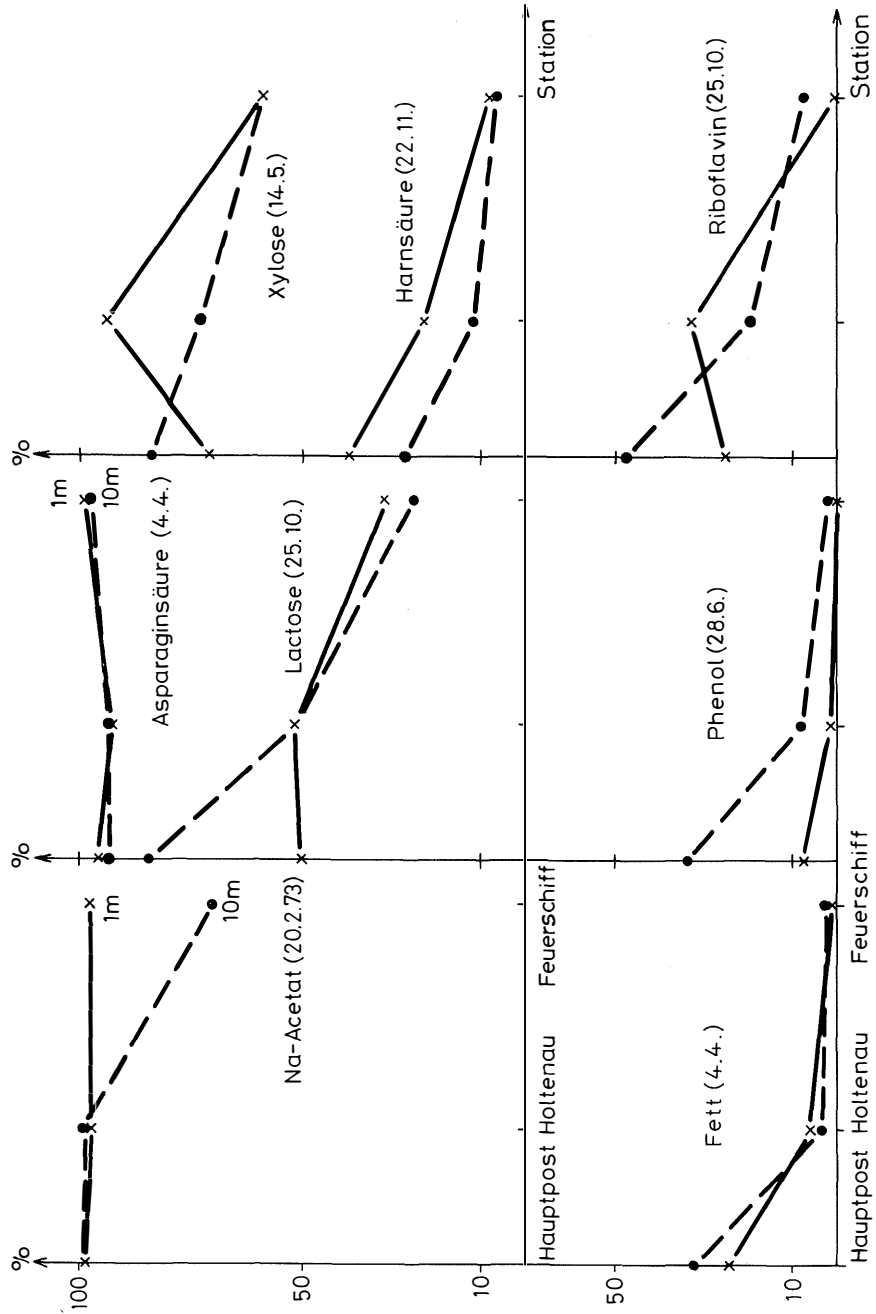


Abb. 5: Veränderungen des Anteils verschiedener physiologischer Bakteriengruppen in % der Gesamtzahl der Saprophyten mit zunehmender Küstenentfernung.

Tafel 6 (zu H.-G. Hoppe)

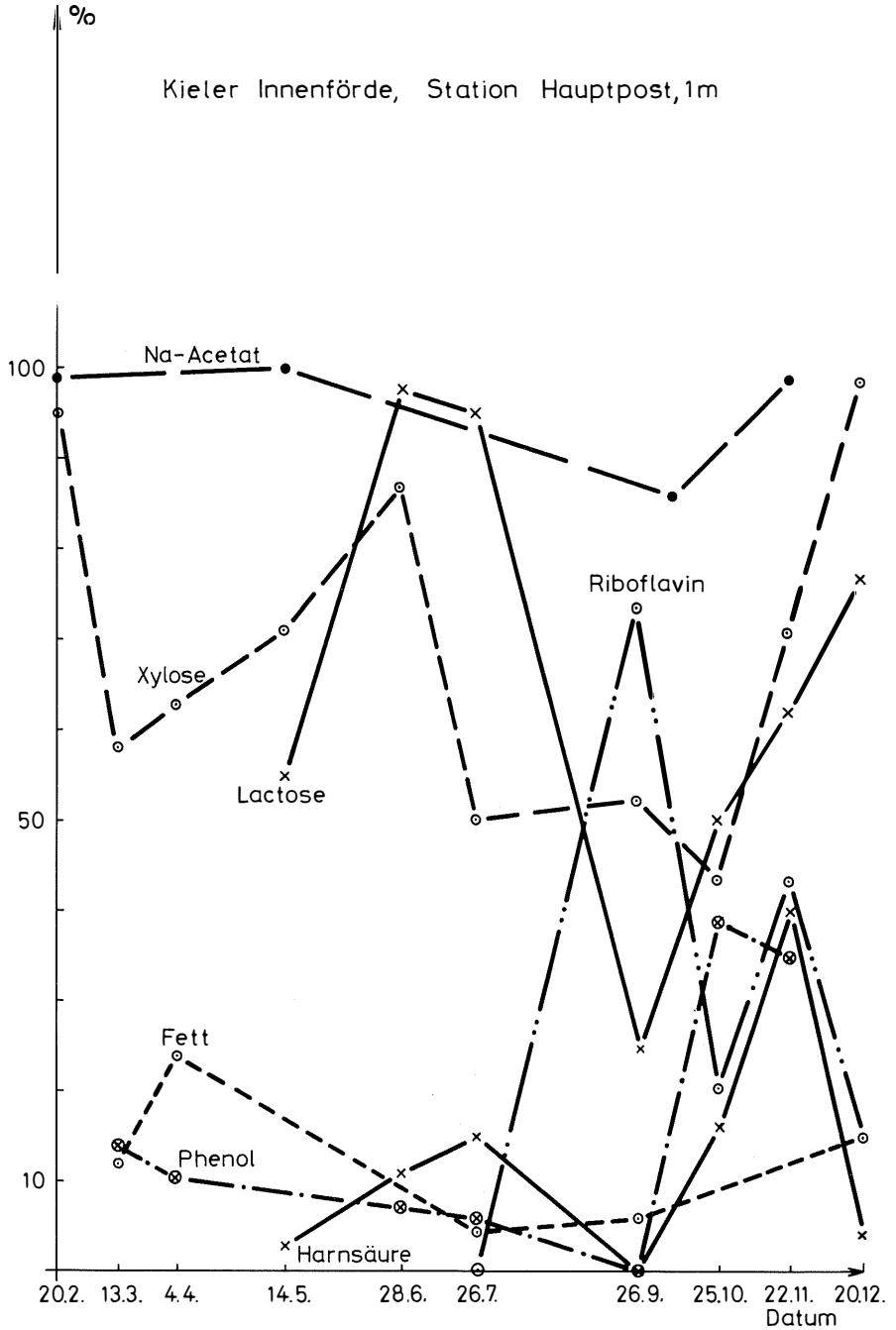


Abb. 6: Änderungen der Größe verschiedener physiologischer Bakteriengruppen in % der Saprophytenzahl im Laufe des Jahres 1973 bei der Station Hauptpost (1m, Kieler Innenförde).

gung des Untersuchungsareals im Zusammenhang. Besonders im Hafengebiet können bis $\frac{1}{3}$ der Saprophytenpopulation zur Zersetzung von Phenol in der Lage sein. Einige Ergebnisse deuten eine Zunahme der Phenolabbauer mit abnehmender Temperatur und sinkendem Salzgehalt an. In küstenfernen Gebieten sind meist unter 10% der Bakterien zur Phenolverwertung befähigt, es sei denn, Wasser aus der Innenförde (oder von der Abwassereinleitung bei Bülk) gelangt mit der Strömung dorthin. Untersuchungen aus dem Sediment des Limfjords (HOPPE, unveröff.) zeigen, daß die schwerabbaubaren phenolhaltigen Verbindungen offenbar bevorzugt in der oberflächennahen Schicht des Sediments zersetzt werden. Ergebnisse von Potenzbestimmungen des Phenolabbaus, die von ITURRIAGA und RHEINHEIMER (1973) veröffentlicht wurden, lassen sich mit den genannten Beobachtungen vereinbaren. Zur Gruppe der Substanzen, deren Aufnahme eine deutliche Abhängigkeit von der Küstenentfernung aufweist, gehören auch Harnsäure (N-haltiges Endprodukt des Eiweißstoffwechsels bei Reptilien, und Vögeln, in geringen Mengen auch bei Säugetieren) und Riboflavin (Vitamin B₂, wichtiger Wachstumsfaktor für viele Tiere und Mikroorganismen). Die ermittelten Prozentwerte für Harnsäure (durchschnittlich 4—18%) finden eine Bestätigung durch die qualitativen Untersuchungen von STEINMANN (1974) über den Harnsäureabbau. Ein Bedarf an Riboflavin scheint für die vielfach durch allochthone, terrestrische Bakterien kontaminierte Bakterienpopulation der Innenförde charakteristisch zu sein (33—47%), während von der überwiegend autochthonen Flora küstenferner Gebiete wesentlich weniger Kolonien (9—24%) einen nachweisbaren Vitamin B₂-Bedarf hatten. DDT wurde bei der geringen filtrierten Wassermenge nur vereinzelt von einigen Kolonien aufgenommen, so daß keine Berechnungen möglich waren.

Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakterienpopulationen mit zunehmender Küstenentfernung. Aus Tabelle 1 läßt sich entnehmen, daß einige Substrate (Glucose, Asparaginsäure, lösl. Stärke, Glucosamin, Glycerin, Saccharose) von einem relativ hohen und gleichbleibenden Prozentsatz aller Saprophyten sowohl in der Innenförde als auch in der Kieler Bucht aufgenommen wird. Die Xylose-Verwertung weist einen relativ gleichbleibenden Durchschnittswert, jedoch eine große Schwankungsbreite auf, während für die übrigen Substrate eine abnehmende Tendenz mit zunehmender Küstenentfernung bei großer Schwankungsbreite festzustellen ist. Einige Beispiele sind in der Abb. 5 dargestellt. Mit abnehmender Saprophytenzahl in größerer Küstenentfernung nimmt also auch die Zahl der zur Verwertung vieler Substrate befähigten Organismen ab. Dies deutet darauf hin, daß von der Vielzahl der Bakterienarten in verunreinigten Küstengewässern nur einige bis in die offene See gelangen und dort überleben. Viele durch Substratinduktion erworbene Fähigkeiten werden der geringen Konzentration dieser Nährstoffe im Meerwasser abgebaut. Bakterien mit sehr speziellem Nahrungs- und Vitaminbedarf können nicht überleben. Bekanntlich nimmt der Anteil der saprophytischen (=auf Nährboden wachsenden) Bakterien an der gesamten Bakterienflora (ermittelt mit der Fluoreszenzfärbung oder der Mikroautoradiographie, HOPPE unveröff.) von verunreinigten Küstengebieten zu relativ sauberen Seegebieten ab. Möglicherweise kommt daher den auf Agarplatten nicht erfaßten Bakterien beim Abbau von sehr gering konzentrierten Nährstoffen im offenen Meer eine besondere Bedeutung zu.

Änderungen der physiologischen Fähigkeiten der Bakterienpopulationen im Laufe des Jahres. Aus Abbildung 6 wird deutlich, daß neben der gleichbleibend starken Aufnahme von Glucose, Asparaginsäure (nicht dargestellt) und Acetat, erhebliche Schwankungen in der Stärke der physiologischen Gruppen auftraten. In einem Meeresgebiet mit unterschiedlichen hydrographischen Einflüssen und Verunreinigungsursachen ist dafür kaum eine einfache Erklärung zu finden. Auffallend ist der

Rückgang der meisten physiologischen Bakteriengruppen zu einem Zeitpunkt, da auch die gesamte Population stark abnimmt (September, Abb. 4). Dagegen wurde ein Vitamin B₂-Bedarf für über 70% der Kolonien registriert. Bei starker Bakterienentwicklung (z. B. November) scheint auch die Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Substrate anzusteigen. Für die Zahl der Fett- und Phenolabbauer läßt sich eine Erhöhung des Anteils während der kalten Jahreszeit nachweisen. Dieses könnte auf das längere Überleben von Fremdbakterien im Seewasser bei niedrigen Wassertemperaturen zurückgeführt werden, eine Beobachtung, die auch für Hefen gilt (HOPPE 1972). Als Ursache für die Fluktuationen können neben der Verlagerung von Wasserkörpern durch Strömungen auch Änderungen im Nährstoffangebot angesehen werden, auf die die Population durch Induktion von Enzymen oder die Vermehrung von Bakterien mit entsprechenden konstitutiven Enzymen reagiert.

Da von den bisher gegebenen %-Werten nur relative Änderungen der Bakterienpopulationen angezeigt werden, aus denen die absolute Größe der physiologischen Gruppen nicht hervorgeht, werden in der Tabelle 2 einige Keimzahlen von Bakteriengruppen dargestellt, die zur Verwertung eines bestimmten Substrates in der Lage sind,

Tabelle 2

Größe der Bakterienpopulation, die ein bestimmtes Substrat als Nährstoff verwerten kann. Die Zahl der Ausfahrten, aus denen die Zahlenwerte ermittelt wurden, sind neben dem Substrat in Klammern () angegeben. Während die jeweils oberen Keimzahlen (pro ml) die Schwankungsbreite wiedergeben, stellen die unteren den Durchschnittswert dar.

¹⁴ C-markiertes Substrat	Hauptpost		Holtenu		Feuerschiff	
	10 m	1 m	10 m	1 m	10 m	1 m
Asparaginsäure (3)	(300)—11050 7283	2900—14430 9219	50—7110 3881	200—7970 4001	6— 810 424	40—1028 601
Na-Acetat (4)	1025—21650 14225	9500—21500 13130	1960—7025 3464	2400—11875 4587	246— 495 391	141— 521 279
Xylose (9)	300—20250 6975	1000—23150 9725	50—4500 1897	100—6725 3339	100— 756 372	34— 738 297
Lactose (6)	600—17000 7533	300—11550 6533	475—2070 844	150—8000 3554	5— 168 79	5— 225 109
Fett (6)	100—4850 2540	150—2450 1029	30—1560 314	(0)— 850 461	0— 69 23	0— 165 37
Phenol (7)	0—3650 950	0—7850 1743	0— 190 85	0—1070 232	1— 8 4	0— 25 9
Harnsäure (6)	0—3400 1725	0—1400 860	0— 470 224	0—2350 901	0— 80 24	0— 113 22
Riboflavin (4)	(0)—21000 7875	(0)—12250 3220	150— 710 408	100—1460 446	2— 13 5	1— 45 14

Diskussion

Die dargestellte Methode und die angeführten Ergebnisse zeigen erstmals eine Möglichkeit auf, die Größe verschiedener physiologischer Bakteriengruppen innerhalb einer Saprophytenpopulation sowie die Gesamtzahl der Saprophyten gleichzeitig zu bestimmen und einzelne Kolonien mit besonderen Eigenschaften zu isolieren. Da alle auf einem Membranfilter wachsenden Kolonien erfaßt werden, erübrigt sich die stets

subjektive Auswahl repräsentativer Kolonien zur Charakterisierung der Population. Auch bei der Verwendung von Hemmstoffen kann durch die Vorinkubation auf Nährkartonscheiben zunächst die Gesamtzahl der Saprophyten ermittelt werden.

Die Substrataufnahme bedeutet nicht nur eine Akkumulation, sondern führt in den meisten Fällen unter den gegebenen Umständen auch zu Zellvermehrungen, was durch das Wachstum der Kolonien und teilweise eine besonders starke Markierung der wachstumsaktiven Randbezirke der Kolonien nachgewiesen werden kann. Einer sekundären Markierung von Kolonien, die das zu prüfende Substrat nicht aufnehmen, durch veratmetes $^{14}\text{CO}_2$, wie sie bei КОККЕ (1973) diskutiert wird, kommt keine Bedeutung zu, da CO_2 nur in geringem Maße (6% der Biomasseproduktion der Bakterien nach SOROKIN 1965) von Bakterien aufgenommen wird und daher schon unter der Nachweisschwelle der Methode liegt. Natürlich können die gewonnenen Ergebnisse nicht kritiklos auf die Verhältnisse in einem aquatischen Ökosystem übertragen werden. Durch die relativ hohe Konzentration des zugegebenen Substrates (ca. 0,67 mg C/ml) kann eine Stimulation zum Wachstum oder Enzyminduktion erfolgen. Außerdem entfallen Effekte der Nahrungskonkurrenz und Antibiotikahemmung auf einem Membranfilter mit guter Verteilung der Kolonien, während z. B. das Wachstum auf einer festen Unterlage ein neues artifizielles Kriterium darstellt. Es werden daher in unserem Laboratorium auch Untersuchungen mit einer mikroautoradiographischen Methode zur Identifizierung aktiver Bakterien durchgeführt, die der Stoffaufnahme unter natürlichen Bedingungen besser entsprechen.

Für die Bewertung der Ergebnisse wäre die Ermittlung der Konzentration der gewählten Substrate in situ sehr aufschlußreich, dieses ist aber wegen der meist sehr niedrigen Konzentration nicht möglich. Deshalb sind Laborversuche zum Studium von Populationsänderungen mit bekannten Substratkonzentrationen unentbehrlich. In einem Versuch dieser Art mit stark verunreinigtem Fördewasser und einer Zugabe von 62 bzw. 125 mg Phenol/250 ml konnte eine Zunahme der Phenolabbauer von 20 auf etwa 90% der gesamten Saprophytenpopulation in 5 Tagen registriert werden. Die Anpassungsfähigkeit der Mikroflora, auch an assimilierbare Schadstoffe, dürfte bei dem Selbstreinigungsprozeß eine wichtige Rolle spielen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Küstenregion zu, die auf Grund ihres reichhaltigen und vielfältigen Nahrungsangebotes und der ständigen Kontamination durch das Festland, eine sehr artenreiche und damit anpassungsfähige Bakterienpopulation aufweist. Orte, an denen bestimmte Substanzen gehäuft und ständig anfallen, z. B. Fette im Neuston und phenolhaltige Verbindungen im Sediment, weisen auch eine darauf eingestellte Bakterienflora auf.

Auf welche Weise sich die Nährstoffansprüche der Bakterienpopulationen verschiedener Gewässer unterscheiden, müssen weitere Untersuchungen, unter Berücksichtigung noch weiterer Testsubstrate, erbringen. Desgleichen ist nicht geklärt, ob Änderungen der physiologischen Gruppen auf Induktionen oder Verschiebungen des Artenspektrums zurückzuführen sind. Neben den saprophytischen Bakterien spielen in Gewässern aber auch die vielen bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismen eine Rolle, deren Nährstoffansprüche ebenfalls mit Hilfe der Autoradiographie ermittelt werden können.

Mein Dank gilt Fräulein V. Meister und Fräulein E. Nietz für die gewissenhafte Ausführung der Untersuchungen sowie Herrn K. Bach für die Anfertigung der benötigten Geräte.

Literaturverzeichnis

- BROCK, T. D. (1967): Bacterial growth rate in the sea: Direct analysis by Thymidine Autoradiography. — *Science* **155**: 81—83.
- BROCK, T. D. u. M. L. BROCK (1966): Autoradiography as a tool in microbial ecology. — *Nature* **209**: 734—736.
- BURNETT, T. J. (1952): Sampling methods and refinements for estimating airborne particulate hazards. — ORNL CF **52**: 1—11. Zitiert aus der Millipore-Veröffentlichung ADM JO X/67: Methoden der Mikrochemie und Instrumentalanalyse.
- GOCKE, K. (1974): Methodische Probleme bei Untersuchungen zur mikrobiellen Stoffaufnahme in Gewässern. — *Kieler Meeresforsch.* **30** (im Druck).
- HOPPE, H.-G. (1972): Untersuchungen zur Ökologie der Hefen im Bereich der westlichen Ostsee. — *Kieler Meeresforsch.* **28**: 54—77.
- ITURRIAGA, R. und G. RHEINHEIMER (1972): Untersuchungen über das Vorkommen von phenolabbauenden Mikroorganismen in Gewässern und Sediment. — *Kieler Meeresforsch.* **28**: 213—218.
- KLEEFF, van B. H. A., R. KOKKE und P. J. NIEUWDORP (1969): Radioisotope uptake by and localization in yeasts. — *Ant. v. Leeuwenhoek* **35**, Suppl.: G 9—G 10.
- KOKKE, R. (1970): Autoradiography as a tool for the detection and isolation of microbes. — *Ant. v. Leeuwenhoek* **36**: 189.
- KOKKE, R. (1970): DDT: its Action and Degradation in Bacterial Populations. — *Nature* **226**: 577—978.
- KOKKE, R. (1973): Detection of Mikropollutant-Accumulating Microbes by Autoradiography. — *Bull. Ecol. Res. Comm, (Stockholm)* **17**: 467—469.
- KOKKE, R., B. H. A., van KLEEFF, P. J. NIEUWDORP und J. T. van ZUJLEKOM (1969): Accumulation of radionuclides by bacteria and yeasts. — *Actes Symp. Int. Radioecol.* **1**: 637—653.
- MEYER-REIL, L.-A. (1974): Untersuchungen über die Salzansprüche von Ostseebakterien: Temperatureinflüsse und Adaptation. — *Botanica marina* **17**: 1—15.
- PERONI, C. (1969, 1970, 1971): Heterotrophic level of microorganisms. In: Studies on the radioactive contamination of the sea, annal report, CNEN-EURATOM, Fiascherino, La Spezia, Italy.
- RHEINHEIMER, G. (1968): Beobachtungen über den Einfluß von Salzgehaltsschwankungen auf die Bakterienflora der westlichen Ostsee. — *Sarsia* **34**: 253—262.
- RHEINHEIMER, G. (1971): Mikrobiologie der Gewässer. — VEB Gustav Fischer Verlag, Jena: 180 p.
- ROGERS, A. W. (1967): Techniques of Autoradiography, — Elsevier Publ. Co., London.
- SCHLEGEL, H. G. (1969): Allgemeine Mikrobiologie. — Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- SIEBURTH, J. McN. (1967): Seasonal selection of estuarine bacteria by water temperature. — *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **1**: 98—121.
- SIEBURTH, J. McN. (1971): Distribution and activity of oceanic bacteria. *Deep-Sea Research* **18**: 1111—1121.
- SOROKIN, J. J. (1965): On the trophic role chemosynthesis and bacterial biosynthesis in water bodies. — *Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Suppl.* **18**: 187—205.
- STEINMANN, J. (1974): Ökologische Untersuchungen zum bakteriellen Abbau von Harnstoff und Harnsäure in Gewässern. — Dissertation, Universität Kiel.
- WRIGHT, R. T. und J. E. HOBBI (1966): Use of Glucose and acetate by bacteria and alga in aquatic ecosystems. — *Ecology*, **47**: 447—464.