

Stickstoff-Ausscheidung durch N₂-fixierende Blaualgen, II

Wachstum und Stickstoff-Ausscheidung von *Anabaena solitaria* bei Züchtung in Süßwasser bzw. in Mischungen aus Süß- und Seewasser sowie unter Zusatz von Fe, Mn und Mo

Nitrogen Excretion by Nitrogen Fixing Blue-green Algae, II

Growth and Nitrogen Excretion of *Anabaena solitaria* Grown in Freshwater and in Mixtures of Freshwater and Seawater, as Well as with Fe, Mn, and Mo Added to the Nutrient Medium

P. Pohl und G. Drath

Institut für Pharmazeutische Biologie, Kiel

(Z. Naturforsch. 30 c, 219—222 [1975]; eingegangen am 24. Oktober/19. November 1974)

Nitrogen Excretion, Nitrogen Fixing Blue-green Algae, *Anabaena solitaria*, Blue-green Algae

The nitrogen fixing blue-green alga, *Anabaena solitaria*, was grown in freshwater and in mixtures of freshwater and seawater. Freshwater and a 5% mixture (95 volumes of freshwater and 5 volumes of seawater) proved to be most suitable: Growth (as expressed by the formation of chlorophylls; approx. 1.9 µg chlorophyll/ml) was comparatively high. The nitrogen content of the nutrient medium was increased to 750–760 µmol N/l. Upon addition of appropriate amounts of FeCl₃, MnCl₂, and Na₂MoO₄, the nitrogen content reached 1060–1080 µmol N/l, whereas the chlorophyll formation remained at approximately the same level. Thus Fe, Mn, and Mo appear to have a stimulating effect on nitrogen excretion by *Anabaena solitaria*. Under the conditions described, this organism may be suitable for the mass production of algae.

Einleitung

N₂-fixierende Blaualgen fixieren molekularen Luftstickstoff^{1–3} und scheiden außerdem N-haltige organische Verbindungen wie z. B. Peptide und andere mehr in die Nährlösungen aus^{4–10}. Diese Organismen können also in ursprünglich völlig stickstoff-freien Nährmedien gezüchtet werden. Einige Arten entwickeln dann ein gutes Wachstum und reichern darüberhinaus die Nährlösung mit N-haltigen Verbindungen an. So steigt z. B. bei Züchtung von *Anabaena cylindrica* der Stickstoff-Spiegel der Nährlösung im Verlauf von 3–4 Wochen von 0 auf etwa 800 µmol N/l an und bleibt danach bei noch längerer Züchtung ziemlich konstant¹¹.

Trotz des guten Wachstums in solchen Nährmedien sind N₂-fixierende Blaualgen im allgemeinen hinsichtlich ihres Nahrungsbedarfs sehr genügsam. Sie kommen nicht nur ohne Stickstoffverbindungen wie z. B. Nitrate, Ammoniumsalze u. ä. (s. o.) aus, sondern benötigen außer den üblichen anorganischen Ionen keine weiteren Zusätze wie z. B. Vitamine oder anderes mehr. Wie in Vorversuchen (unveröffentlicht) von uns geklärt wurde, lassen sich

verschiedene N₂-fixierende Blaualgen gleich gut unter unsterilen Bedingungen züchten, d. h. ohne daß Unterschiede im Wachstum und in der Stickstoff-Ausscheidung festzustellen waren.

Aus den genannten Gründen könnten N₂-fixierende Blaualgen u. U. für eine kostensparende Massenzucht in Frage kommen. Da aber in solch einem Fall eine künstlich zusammengesetzte Nährlösung größere Kosten verursachen würde, wurden Versuche unternommen, N₂-fixierende Blaualgen unter unsterilen Bedingungen in reinem Süßwasser bzw. in Mischungen aus Süß- und Seewasser zu züchten. Das Seewasser sollte dabei einen Teil der erforderlichen anorganischen Salze liefern.

Die Ausscheidung N-haltiger Verbindungen durch N₂-fixierende Blaualgen ist ein Sekundär-Vorgang. Der in diesen Verbindungen enthaltene chemisch gebundene Stickstoff wird durch einen Primär-Vorgang, die Fixierung von N₂ aus der Luft, geliefert. Diese N₂-Fixierung wird durch Zugabe von Fe und Mo zur Nährlösung gefördert, weil die beiden Spurenelemente zum Aufbau der Proteinkomponenten des N₂-bindenden Enzymsystems (Nitrogenase) benötigt werden^{12, 13}. Es sollte in dieser Arbeit deshalb ebenfalls geklärt werden, ob auch die Stickstoff-Ausscheidung durch Fe, Mo und weitere Spurenelemente gefördert wird.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. P. Pohl, Institut für Pharmazeutische Biologie, D-2300 Kiel, Grasweg 9.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Material und Methoden

Algen

Anabaena solitaria Kleb. wurde aus einer Brunnenwasserprobe isoliert.

Nährlösungen

Als Süßwasser diente Leitungswasser der Stadtwerke München. Das Seewasser wurde in 50-l-Plastiktanks von der Biologischen Anstalt Helgoland bezogen. Süß- und Seewasser wurden nach Volumen zu einem Gesamtvolumen von 500 ml (s. Tabn. I–V) gemischt. Bei Bedarf wurden die in den Tabn. II–V) angegebenen Mengen FeCl₃·6 H₂O, MnCl₂·4 H₂O und Na₂MoO₄·2 H₂O zugefügt. Der pH-Wert der Nährlösungen betrug 7,4–7,8.

Züchtung der Algen

Jede Züchtungsreihe wurde in zwei Parallelversuchen durchgeführt, deren Mittelwerte in den Tabn. I–V angegeben sind. Die Blaualgen wurden unsteril bei 23 °C und bei einer Belichtung von 400 lx bis zur Erreichung der stationären Wachstumsphase gezüchtet (26–28 Tage). Die Kulturen wurden durch regelmäßiges Schütteln belüftet. Als Maß für das Wachstum diente der Gehalt an Chlorophyll pro ml Algensuspension. Die Chlorophyll-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Arnon¹⁴. Die Beleuchtungsstärke wurde mit einem Uva-Lux Beleuchtungsmesser (Fa. Gossen) bestimmt.

Stickstoff-Bestimmungen

Ca. 15 ml Algensuspension wurden 5 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Aus 10,0 ml der überstehenden Lösung wurde der Gesamtstickstoff auf herkömmliche Weise mit einer Mikro-Kjeldahl-Apparatur bestimmt. Bei Verwendung eines Selen-Katalysators genügte eine Aufschlußzeit von 3 Stunden.

Resultate und Diskussion

I. Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses von Süß- und Seewasser

Anabaena solitaria wurde in 500-ml-Kulturen unter regelmäßigem Schütteln in Süßwasser bzw. in Süßwasser-Seewasser-Mischungen (5–40%) gezüchtet. Als optimal erwies sich eine 5-prozentige Mischung (s. Tab. I). Bei vergleichsweise gutem Wachstum (1,93 µg Chlorophyll/ml) erreichte der Stickstoffgehalt der Nährlösung nach 28 Tagen 760 µmol N/l. Beide Werte entsprachen etwa denen, die von uns bei Züchtung von *Anabaena cylindrica* in einer künstlichen Nährlösung erzielt worden waren (2,5–2,8 µg Chlorophyll/ml und 700–800 µmol N/l)¹¹.

Unter Zugrundelegung des ursprünglich in der Nährlösung bereits vorhandenen Stickstoffs (Blindwert, ca. 300 µmol N/l) (s. Tab. I) ergibt sich aber

Tab. I. Stickstoff-Ausscheidung und Chlorophyllbildung durch *Anabaena solitaria* bei Züchtung (28 Tage) in Süßwasser bzw. in Mischungen aus Süßwasser und Seewasser. [Stickstoffgehalt der Nährlösungen vor dem Beimpfen (Blindwert): 300 µmol N/l.]

Nährmedium		Stickstoffgehalt der Nährlösung [µmol N/l]	Chlorophyll [µg/ml]
Süßwasser [ml]	+ Seewasser [ml]		
500	—	750	1,45
475	25	760	1,93
450	50	710	1,33
400	100	640	2,07
350	150	640	1,07
300	200	620	1,61

nur eine relativ geringe Stickstoffzunahme von etwa 460 µmol N/l. Der Grund hierfür war möglicherweise, daß die bei den früheren Untersuchungen¹¹ verwendete künstliche Nährlösung mehr Spurenelemente enthalten hatte, nämlich pro Liter 6 mg FeCl₃·6 H₂O, 10 mg MnCl₂·4 H₂O, 1 mg H₃BO₃, 0,4 mg ZnSO₄·7 H₂O, 0,4 mg CoSO₄·7 H₂O, 0,4 mg Na₂MoO₄·2 H₂O und 0,03 mg CuSO₄·5 H₂O. In eigenen Versuchen (unveröffentlicht) erwies sich, daß nur Fe, Mn und Mo, nicht aber Co, Zn, B und Cu einen meßbaren Einfluß auf die Stickstoff-Ausscheidung in verschiedenen Blaualgen haben. Nachfolgend wird deshalb der Einfluß von Fe, Mn und Mo auf Wachstum und Stickstoff-Ausscheidung von *Anabaena solitaria* beschrieben.

II. Einfluß von Fe, Mn und Mo auf die Stickstoff-Ausscheidung

Zur Untersuchung des Einflusses von Fe, Mn und Mo wurde *Anabaena solitaria* jeweils 28 Tage bis zur stationären Wachstumsphase in einer 5-prozentigen Süßwasser-Seewasser-Mischung gezüchtet, weil sich diese Nährlösung in den vorangegangenen Untersuchungen als optimal erwiesen hatte (s. Tab. I).

Einfluß von Fe: 6 Kulturen von *Anabaena solitaria* wurden in der obigen Nährlösung unter Zusatz unterschiedlicher Mengen FeCl₃ gezüchtet (s. Tab II). Der Stickstoffgehalt der Nährlösung stieg im Verlauf der Züchtung bei einem Zusatz von 12 mg FeCl₃·6 H₂O auf 910 µmol N/l.

Tab. II. Einfluß von Fe: Stickstoff-Ausscheidung und Chlorophyllbildung durch *Anabaena solitaria* bei Züchtung (28 Tage) in einer 5-prozentigen Süßwasser-Seewasser-Mischung unter Zufügung von unterschiedlichen Mengen $FeCl_3$. [Stickstoffgehalt der Nährlösungen vor dem Beimpfen (Blindwert): 300 $\mu\text{mol N/l}$]

Nährmedium: 5-prozentige Süßwasser-Seewasser-Mischung (475 ml Süßwasser + 25 ml Seewasser)		
$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ [mg/l]	Stickstoffgehalt der Nährlösung [$\mu\text{mol N/l}$]	Chlorophyll [$\mu\text{g/ml}$]
0	730	1,33
2	770	0,93
4	750	1,05
6	780	1,43
12	910	2,21
24	890	1,87

Einfluß von Mn: Anschließend wurden 6 Kulturen in der gleichen Nährlösung, nun aber unter Zusatz von 12 mg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ und mit unterschiedlichen Mengen $MnCl_2$ gezüchtet (s. Tab. III). Am günstigsten erwies sich ein Zusatz von 2 mg $MnCl_2 \cdot 4 H_2O/l$, wobei ein Stickstoffgehalt von 1000 $\mu\text{mol N/l}$ erreicht wurde.

Tab. III. Einfluß von Mn: Stickstoff-Ausscheidung und Chlorophyllbildung durch *Anabaena solitaria* bei Züchtung (28 Tage) in einer 5-prozentigen Süßwasser-Seewasser-Mischung (mit Zusatz von $FeCl_3$) unter Zufügung von unterschiedlichen Mengen $MnCl_2$. [Stickstoffgehalt der Nährlösungen vor dem Beimpfen (Blindwert): 300 $\mu\text{mol N/l}$]

Nährmedium: 5-prozentige Süßwasser-Seewasser-Mischung (475 ml Süßwasser + 25 ml Seewasser + 12 mg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O/l$)		
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ [mg/l]	Stickstoffgehalt der Nährlösung [$\mu\text{mol N/l}$]	Chlorophyll [$\mu\text{g/ml}$]
0	945	1,49
2	1000	1,78
4	900	1,53
10	710	1,36
20	830	1,58
40	830	1,58

Einfluß von Mo: Anschließend wurden wiederum 6 Kulturen in der gleichen Nährlösung (mit Zusatz von 12 mg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ und 2 mg $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ pro Liter) und mit unterschiedlichen Mengen $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ gezüchtet (s. Tab. IV). Bei einem Zusatz von 0,4 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O/l$ stieg der Stickstoffgehalt der Nährlösung auf 1060 $\mu\text{mol N/l}$.

Tab. IV. Einfluß von Mo: Stickstoff-Ausscheidung und Chlorophyllbildung durch *Anabaena solitaria* bei Züchtung (28 Tage) in einer 5-prozentigen Süßwasser-Seewasser-Mischung (mit Zusatz von $FeCl_3$ und $MnCl_2$) unter Zufügung von unterschiedlichen Mengen Na_2MoO_4 . [Stickstoffgehalt der Nährlösungen vor dem Beimpfen (Blindwert): 300 $\mu\text{mol N/l}$]

Nährmedium: 5-prozentige Süßwasser-Seewasser-Mischung (475 ml Süßwasser + 25 ml Seewasser + 12 mg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ + 2 mg $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ pro Liter)		
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ [mg/l]	Stickstoffgehalt der Nährlösung [$\mu\text{mol N/l}$]	Chlorophyll [$\mu\text{g/ml}$]
0	890	1,61
0.1	930	1,49
0.2	920	1,43
0.4	1060	2,05
1.0	1040	1,68
2.0	820	1,45

Nochmalige Kontrolle des Mischungsverhältnisses

Nachdem auf die obige Weise die optimalen Mengen von Fe (12 mg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$), Mn (2 mg $MnCl_2 \cdot 4 H_2O/l$) und Mo (0,4 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O/l$) ermittelt worden waren, wurde nochmals die günstigste Süßwasser-Seewasser-Mischung bestimmt, dieses Mal aber unter Zusatz der obigen Fe-, Mn- und Mo-Mengen. Diese Versuche ergaben, daß die geeignetste Nährlösung Süßwasser bzw. Süßwasser mit nur geringen Seewasserzusätzen (bis etwa 5%) ist.

Wie in den Tabn. I–IV angegeben ist, hatten die verwendeten Nährlösungen vor dem Beimpfen mit *Anabaena solitaria* bereits einen Stickstoffgehalt („Blindwert“) von etwa 300 $\mu\text{mol N/l}$. Dieser Stickstoffgehalt wurde dann im Verlauf der Züchtung durch die Stickstoff-Ausscheidung der Blaualgen weiter erhöht. Unsere Versuche geben keine Auskunft darüber, was mit dem ursprünglich vorhandenen Stickstoff (Blindwert) im Verlaufe der Züchtung geschah, ob also dieser Stickstoff von den Blaualgen ganz oder nur z. T. verbraucht wurde. Dementsprechend läßt sich auch nicht sagen, wie hoch die tatsächliche Stickstoff-Ausscheidung der Blaualgen bei Züchtung in den Süß-Seewasser-Mischungen ist. So erhielten wir z. B. bei Züchtung von *Anabaena solitaria* in einer 5-prozentigen Mischung (s. Tab. V) unter Zusatz von Fe, Mn und Mo einen Stickstoffgehalt von 1060 $\mu\text{mol N/l}$. Der Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Beimpfen betrug 300 $\mu\text{mol N/l}$ (Blindwert). Je nachdem, wie weit dieser Stickstoff von *Anabaena solitaria* verbraucht wurde, würde die tatsächliche Stickstoff-Ausscheidung dieser Blaualge zwischen 760 und 1060 $\mu\text{mol N/l}$ liegen. Genaue

Angaben können erst gemacht werden, wenn es gelingt, alle Stickstoffverbindungen in der Nährlösung quantitativ zu bestimmen. Im großen und ganzen entsprechen die hier erreichten Stickstoffwerte denen, die von uns in einer früheren Arbeit¹¹ bei Züchtung von *Anabaena cylindrica* in einer künstlichen Nährlösung erreicht worden waren (700–800 µmol N/l).

Durch den Zusatz der angegebenen Fe-, Mn- und Mo-Mengen ließ sich bei Züchtung von *Anabaena solitaria* der Stickstoffgehalt der Nährlösungen von 750–760 (s. Tab. I) auf 1060–1080 µmol N/l (s. Tab. V) steigern, also um etwa 42%. Im Gegen-

Tab. V. Nochmalige Kontrolle des Mischungsverhältnisses. Stickstoff-Ausscheidung und Chlorophyllbildung durch *Anabaena solitaria* bei Züchtung (28 Tage) in Süßwasser bzw. in Mischungen aus Süß- und Seewasser unter Zusatz von 12 mg FeCl₃·6 H₂O, 2 mg MnCl₂·4 H₂O und 0,4 mg Na₂MoO₄ pro Liter. [Stickstoffgehalt der Nährlösungen vor dem Beimpfen (Blindwert): 300 µmol N/l.]

Nährmedium Süßwasser + Seewasser (+FeCl ₃ +MnCl ₂ +Na ₂ MoO ₄) [ml] [ml]		Stickstoff- gehalt der Nährlösung [µmol N/l]	Chlorophyll [µg/ml]
500	—	1080	2,07
475	25	1060	1,98
450	50	940	1,64
400	100	940	1,55
350	150	950	1,52
300	200	950	1,60

satz dazu wurde aber das Wachstum der Blaualgen (ausgedrückt durch die Chlorophyllbildung) nicht nennenswert erhöht. Die ermittelten höchsten Chlorophyllwerte lagen trotz einiger Schwankungen in der Regel zwischen etwa 1,8 und 2,1 µg Chlorophyll/ml Algensuspension und waren damit kaum höher als bei Züchtung ohne Zusatz von Fe, Mn und Mo. Das läßt den Schluß zu, daß die bei Zugabe von Fe,

Mn und Mo beobachtete Erhöhung der Stickstoff-Ausscheidung bei *Anabaena solitaria* nicht die Folge verstärkten Wachstums ist, sondern direkt auf die Einwirkung der obigen drei Spurenelemente zurückzuführen ist. Von den beiden Spurenelementen Fe und Mo ist bekannt, daß sie von den Blaualgen zur N₂-Fixierung benötigt werden^{12, 13}, so daß hier die gesteigerte Stickstoff-Ausscheidung vermutlich die Folge einer durch diese Elemente erhöhten N₂-Fixierungsrate ist. Die doppelt durchgeführten Versuchsreihen zeigten außerdem übereinstimmend, daß auch durch Zusatz von etwa 2 mg MnCl₂/l eine Steigerung der N-Ausscheidung erreicht wird, während bei höheren Zusätzen niedrigere N-Werte erreicht wurden. Eine ähnliche Beobachtung wurde mit Mo gemacht. Es soll in weiteren Versuchsreihen geklärt werden, ob und ab welcher Konzentration die einzelnen Spurenelemente auch einen Hemmeffekt auf die Stickstoff-Ausscheidung ausüben können. Die Resultate unserer Untersuchungen ergeben, daß *Anabaena solitaria* in zweierlei Hinsicht interessant ist: Zum einen gelangt diese Blaualge in den oben angegebenen Nährmedien und unter unsterilen Bedingungen zu einer beträchtlichen Wachstumsdichte (bis etwa 2 µg Chlorophyll/ml), weshalb sie sich u. U. für eine kostensparende Massenzucht eignet. Zum anderen erreicht man mit dieser Alge eine starke Anreicherung der Nährlösung mit N-haltigen Verbindungen, die sich möglicherweise als Stickstoffquelle für andere Algen verwenden lassen. Diese Möglichkeit wird in der nachfolgenden Veröffentlichung untersucht.

Unser Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Dr. H. O. Glenk, Botanisches Institut Erlangen, sind wir für die botanische Bestimmung von *Anabaena solitaria* zu Dank verpflichtet.

¹ G. E. Fogg, Ann. Rev. Plant Physiol. **7**, 51 [1956].

² W. D. P. Stewart, Nitrogen Fixation in Plants, The Athlone Press, University of London 1966.

³ O. Holm-Hansen, Ann. Rev. Microbiol. **22**, 47 [1968].

⁴ A. Watanabe, Arch. Biochem. Biophys. **34**, 50 [1951].

⁵ G. E. Fogg, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B **139**, 372 [1952].

⁶ W. D. P. Stewart, Nature **200**, 1020 [1963].

⁷ B. A. Whitton, J. Gen. Microbiol. **40**, 1 [1965].

⁸ A. E. Walsby, Brit. Phycol. Bull. **2**, 514 [1965].

⁹ G. E. Fogg u. H. Pattaik, Phykos **5**, 58 [1968].

¹⁰ W. D. P. Stewart, Plant and Soil, Special Vol. 1971, p. 377.

¹¹ P. Pohl u. G. Draht, Z. Naturforsch. **28 c**, 285 [1973].

¹² R. W. F. Hardy u. E. Knight, jr., Progr. in Phytochemistry, (ed. L. Reinhold u. Y. Liwischitz), Interscience Publ., London, New York, Sidney 1968.

¹³ H. Rüdiger, Chemie in unserer Zeit **6**, 59 [1972].

¹⁴ D. I. Arnon, Plant Physiol. **24**, 1 [1949].