

Stickstoff-Ausscheidung durch N₂-fixierende Blaualgen, III

Verwertung des ausgeschiedenen Stickstoffs durch Grünalgen

Nitrogen Excretion by Nitrogen Fixing Blue-green Algae, III

Utilization of the Excreted Nitrogen by Green Algae

P. Pohl und G. Drath

Institut für Pharmazeutische Biologie, Kiel

(Z. Naturforsch. 30 c, 223–226 [1975]; eingegangen am 24. Oktober/19. November 1974)

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

The total combined nitrogen ($850 \mu\text{mol N/l}$) excreted by the nitrogen fixing blue-green alga, *Anabaena cylindrica*, during growth in an artificial nutrient medium, was subsequently utilized to a different degree by various green algae. Two species of filamentous green algae, *Chlorhormidium* spec. (strain I) and *Chlorhormidium* spec. (strain II), proved to be most suitable: When grown in the above nitrogen-enriched medium after removal of *Anabaena cylindrica*, they lowered the nitrogen level in the medium from 850 to 460 – $600 \mu\text{mol N/l}$ within 29 days. When another nitrogen fixing blue-green alga, *Anabaena solitaria*, was grown under unsterile conditions in mixtures of freshwater and seawater with trace elements (Fe, Mn, and Mo) added, nitrogen levels of 1000 – $1060 \mu\text{mol N/l}$ were obtained. These levels were subsequently lowered to 530 – $570 \mu\text{mol N/l}$ by the two species of *Chlorhormidium*. Under appropriate growth conditions, the combined nitrogen excreted by *Anabaena solitaria* can possibly be utilized as a nitrogen source for green algae.

Einleitung

Der Stickstoffgehalt (NO_3^- , NH_4^+ etc.) des Nährmediums ist für Algen ein wichtiger und meistens wachstumsbegrenzender Faktor. Wie in früheren Arbeiten von uns festgestellt worden war, benötigen z. B. *Chlorella vulgaris* und *Bracteacoccus minor* (Chlorophyceae)¹, *Euglena gracilis* (Euglenophyceae)² sowie *Scenedesmus obliquus* und *Porphyridium cruentum* (Chlorophyceae bzw. Rhodophyceae, unveröffentlicht) einen Mindestgehalt von etwa $0,001$ – $0,002\%$ NH_4Cl bzw. KNO_3 in der Nährlösung, entsprechend etwa 200 – $400 \mu\text{mol N/l}$. Bei N-Werten unterhalb dieser Grenzen werden z. B. nur noch geringe Mengen an höher-ungesättigten Fettsäuren (16:2, 16:3, 16:4, 18:3) und an Chlorophyllen gebildet. Die absolute Wachstumsgrenze dürfte für die meisten Algen bei etwa 20 – $50 \mu\text{mol N/l}$ liegen.

Wie aus den vorangegangenen Arbeiten^{3, 4} hervorgeht, scheiden N₂-fixierende Blaualgen beträchtliche Mengen an chemisch gebundenem Stickstoff

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

(z. B. Peptide u. a. m.) in die Nährösung aus. Unter geeigneten Versuchsbedingungen werden dabei Gesamtwerte von etwa $1000 \mu\text{mol N/l}$ erreicht. Das Ziel dieser Arbeit war es nachzuprüfen, ob sich dieser von N₂-fixierenden Blaualgen in die Nährösung ausgeschiedene Stickstoff („Blaualgen-Stickstoff“) als N-Quelle für Grünalgen verwenden lässt. Außerdem sollten geeignete Grünalgen ausgesucht werden, die einen möglichst hohen Anteil dieses Blaualgen-Stickstoffs verwerten können.

Material und Methoden

Algen

Anabaena cylindrica Lemmermann, *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Krüger, *Chlorhormidium barlowi* (*Hormidium barlowi*) Pringsheim nom. prov., *Chlorhormidium flaccidum* (*Hormidium flaccidum*) (Kütz.) Fott, *Chlorhormidium stoechidum* (*Hormidium stoechidum*) Pringsheim, *Ulothrix subtilissima* Rabenhorst und *Uronema barlowi* Pringsheim nom. prov. wurden als bakterienfreie Agarkulturen von der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts, 34 Göttingen, Nikolausberger Weg 18 bezogen.



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 digitized 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.

Anabaena solitaria Kleb. und *Chlorhormidium spec.* (Stamm I)* wurden miteinander vergesellschaftet in einer Brunnenwasserprobe gefunden und daraus isoliert.

Chlorhormidium spec. (Stamm II)* wurde aus einer weiteren Wasserprobe isoliert.

Nährösungen

Zu Tab. I: Als Nährmedium für diesen Versuch diente die früher von uns beschriebene künstliche Nährösung³. Wie in der vorangegangenen Arbeit⁴ beschrieben, wurde *Anabaena cylindrica* in dieser Nährösung (7 l) zuerst 28 Tage bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase gezüchtet und dann durch Abzentrifugieren und anschließendes Sterilisieren der Nährösung vollständig aus der Nährösung entfernt. Der Stickstoffgehalt der Nährösung betrug danach 850 µmol N/l. Jeweils 500 ml der so erhaltenen Nährösung wurden dann unter unsterilen Bedingungen mit den in Tab. I aufgeführten Grünalgen beimpft. Es wurden jeweils zwei Parallelversuche durchgeführt.

Zu den Tabn. II – V: Als Nährösungen dienten die in der vorangegangenen Arbeit⁴ beschriebenen Mischungen aus Süß- und Seewasser (5%) unter Zusatz der in den Tab. II – V angegebenen Mengen an FeCl₃·6 H₂O, MnCl₂·4 H₂O und Na₂MoO₄·2 H₂O. Wie vorher beschrieben⁴, wurde *Anabaena solitaria* zuerst 28 Tage in diesen Nährösungen gezüchtet und dann durch Abzentrifugieren und anschließendes Sterilisieren der Nährösungen vollständig aus den Nährösungen entfernt. Jeweils 250 ml der so erhaltenen Nährösungen (Stickstoffgehalte 760 – 1060 µmol N/l, s. Tab. II – V) wurden unter unsterilen Bedingungen mit *Chlorhormidium spec.* (Stamm I) bzw. mit *Chlorhormidium spec.* (Stamm II) beimpft. Alle Grünalgen wurden bei 23 °C unter unsterilen Bedingungen, unter regelmäßigm Schütteln und bei einer Dauerbeleuchtung von ca. 400 lx bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase gezüchtet.

Die Bestimmung des Stickstoffgehalts der Nährösungen und weitere Methodiken erfolgen wie in der vorangegangenen Arbeit⁴.

* Während der Veröffentlichung dieser Arbeit wurde uns von Herrn Dr. H. O. Glenk, Botanisches Institut Erlangen, mitgeteilt, daß es sich bei den beiden *Chlorhormidium*-Arten (*Chlorhormidium spec.*, Stamm I und Stamm II) lt. Auskunft von Prof. B. Fott, Prag, um *Chlorhormidium flaccidum* (Kütz.) Fott handelt. Diese Art ist nach Fott eine Sammelart. Wie in dieser Arbeit beschrieben wird (s. Tab. I), wurde von uns auch ein Stamm von *Chlorhormidium flaccidum* untersucht. Dieser Stamm unterschied sich jedoch in seiner Stickstoff-Verwertung deutlich von den beiden obigen *Chlorhormidium*-Stämmen.

Resultate und Diskussion

I. Auswahl geeigneter Grünalgen auf Grund ihrer Verwertung des von *Anabaena cylindrica* ausgeschiedenen Stickstoffs (s. Tab. I)

Anabaena cylindrica wurde zuerst als 7 l-Kultur 28 Tage in einer künstlichen Nährösung gezüchtet, wobei in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen³ ein Stickstoff-Spiegel von 850 µmol N/l in der Nährösung erreicht wurde. Nach vollständiger Entfernung von *Anabaena cylindrica* wurden jeweils 500 ml der so erhaltenen Nährösung mit verschiedenen Grünalgen beimpft. Wie aus Tab. I

Tab. I. Verwertung des von *Anabaena cylindrica* in die Nährösung ausgeschiedenen Stickstoffs durch verschiedene Grünalgen. Nährmedium: Künstliche Nährösung³. *Anabaena cylindrica* wurde zuerst 28 Tage in dieser Nährösung gezüchtet und dann entfernt. Stickstoffgehalt der Nährösung nach Entfernung von *Anabaena cylindrica*: 850 µmol N/l.

Züchtungsdauer [Tage]	0	11	15	20	29
Grünalge:	Stickstoffgehalt der Nährösung: [µmol N/l]				
<i>Chlorella vulgaris</i>	850	820	750	710	710
<i>Scenedesmus obliquus</i>	850	820	600	560	550
<i>Chlorhormidium barlowi</i>	850	830	780	780	760
<i>Chlorhormidium flaccidum</i>	850	820	800	790	790
<i>Chlorhormidium stoechidum</i>	850	830	780	760	—
<i>Chlorhormidium I</i>	850	810	720	660	600
<i>Chlorhormidium II</i>	850	770	570	460	460
<i>Ulothrix subtilissima</i>	850	840	750	—	—
<i>Uronema barlowi</i>	850	820	780	—	—

hervorgeht, wurde der Stickstoff-Spiegel der Nährösung im Verlauf der weiteren Züchtung durch die meisten Grünalgen (*Chlorella vulgaris*, *Chlorhormidium flaccidum*, *Chlorhormidium stoechidum*, *Ulothrix subtilissima* und *Uronema barlowi*) nur bis auf etwa 790 – 710 µmol N/l gesenkt. D. h., diese Algen konnten nur etwa 7 – 16% des in der Nährösung vorhandenen Blaualgen-Stickstoffs verbrauchen.

Als besser geeignet erwiesen sich die zwei aus Wasserproben isolierten *Chlorhormidium*-Arten (Stamm I und Stamm II) sowie *Scenedesmus obliquus*. Diese Algen senkten den Stickstoff-Spiegel auf 460 – 600 µmol N/l ab, d. h. um etwa 30 – 42%.

II. Verwertung des von *Anabaena solitaria* ausgeschiedenen Stickstoffs durch *Chlorhormidium spec.* (Stamm I und II) (s. Tabn. II – V)

Für die weiteren Untersuchungen wurden nur *Chlorhormidium spec.* (Stamm I) und *Chlorhormi-*

dium spec. (Stamm II) eingesetzt, weil sie als vielzellige fädige Algen gegenüber *Scenedesmus obliquus* (einzelzellig) den Vorteil besitzen, sich wesentlich besser abzentrifugieren bzw. filtrieren zu lassen.

Als Nährmedium wurden die in der vorangegangenen Arbeit⁴ beschriebenen Süßwasser-Seewasser-Mischungen (5-prozentige Mischungen mit Zusatz optimaler Mengen an Fe, Mn und Mo) verwendet, die durch Züchtung von *Anabaena solitaria* mit Blaualgen-Stickstoff angereichert worden waren. Die Züchtung der Grünalgen erfolgte im Hinblick auf die Züchtungsbedingungen bei einer eventuellen Massenzucht unsteril. Eigene Untersuchungen und Beobachtungen (unveröffentlicht) zeigten keine nennenswerten Unterschiede im Wachstum und Stickstoff-Abbau bei Züchtung der Grünalgen unter sterilen und unsterilen Bedingungen. Stärkeres Bakterienwachstum wurde bei unsterilen Bedingungen nicht beobachtet.

Tab. II. Verwertung des von *Anabaena solitaria* in die Nährösung ausgeschiedenen Stickstoffs durch *Chlorhormidium spec.* (Stamm I) und *Chlorhormidium spec.* (Stamm II). Nährmedium: 5-prozentige Süßwasser-Seewasser-Mischung⁴. *Anabaena solitaria* wurde zuerst 28 Tage in dieser Nährösung gezüchtet und dann entfernt. Stickstoffgehalt der Nährösung nach Entfernung von *Anabaena solitaria*: 760 µmol N/l.

Züchtungsdauer [Tage]	0	21	33
Grünalge	Stickstoffgehalt der Nährösung: [µmol N/l]		
<i>Chlorhormidium I</i>	760	690	680
<i>Chlorhormidium II</i>	760	710	700

Tab. III. Verwertung des von *Anabaena solitaria* in die Nährösung ausgeschiedenen Stickstoffs durch *Chlorhormidium spec.* (Stamm I) und *Chlorhormidium spec.* (Stamm II). Nährmedium: 5-prozentige Süßwasser-Seewasser-Mischung mit Zusatz von 12 mg FeCl₃·6 H₂O/l⁴. *Anabaena solitaria* wurde zuerst 28 Tage in dieser Nährösung gezüchtet und dann entfernt. Stickstoffgehalt der Nährösung nach Entfernung von *Anabaena solitaria*: 910 µmol N/l.

Züchtungsdauer [Tage]	0	14	36	42
Grünalge:	Stickstoffgehalt der Nährösung: [µmol N/l]			
<i>Chlorhormidium I</i>	910	830	780	780
<i>Chlorhormidium II</i>	910	860	850	850

Wie aus Tab. II hervorgeht, wurde der durch *Anabaena solitaria* bei Züchtung in einer 5-prozentigen Süß-Seewasser-Mischung (ohne Zusatz von Fe, Mn und Mo) ausgeschiedene Stickstoff (760 µmol

N/l) durch *Chlorhormidium* (Stamm I und II) nur bis auf 700 bzw. 680 µmol N/l abgesenkt, also um 8–10%. Bei Zusatz von FeCl₃ (s. Tab. II) hatte sich der Stickstoffgehalt der Nährösung beträchtlich erhöht (910 µmol N/l). Der Abbau durch die beiden *Chlorhormidium*-Arten betrug 6–14% (auf 850 bzw. 780 µmol N/l). Bei Zusatz von FeCl₃ und MnCl₂ (s. Tab. IV) war ein abermals erhöhter

Tab. IV. Verwertung des von *Anabaena solitaria* in die Nährösung ausgeschiedenen Stickstoffs durch *Chlorhormidium spec.* (Stamm I) und *Chlorhormidium spec.* (Stamm II). Nährmedium: 5-prozentige Süßwasser-Seewasser-Mischung mit Zusatz von 12 mg FeCl₃·6 H₂O und 2 mg MnCl₂·4 H₂O pro Liter⁴. *Anabaena solitaria* wurde zuerst 28 Tage in dieser Nährösung gezüchtet und dann entfernt. Stickstoffgehalt der Nährösung nach Entfernung von *Anabaena solitaria*: 1000 µmol N/l.

Züchtungsdauer [Tage]	0	14	35	42
Grünalge:				
Stickstoffgehalt der Nährösung: [µmol N/l]				
<i>Chlorhormidium I</i>	1000	790	640	640
<i>Chlorhormidium II</i>	1000	720	590	580

Stickstoffspiegel erreicht worden (1000 µmol N/l), von dem ein großer Teil durch die beiden *Chlorhormidium*-Arten verwendet werden konnte (Abbau auf 640 bzw. 580 µmol N/l entsprechend 36–42%). Die besten Resultate wurden bei Zusatz von FeCl₃, MnCl₂ und Na₂MoO₄ erzielt (s. Ta. V). Der in die Nährösung ausgeschiedene Stickstoff (1060 µmol N/l) wurde auf 570 bzw. 530 µmol N/l abgebaut (46–50%).

Tab. V. Verwertung des von *Anabaena solitaria* in die Nährösung ausgeschiedenen Stickstoffs durch *Chlorhormidium spec.* (Stamm I) und *Chlorhormidium spec.* (Stamm II). Nährmedium: 5-prozentige Süßwasser-Seewasser-Mischung mit Zusatz von 12 mg FeCl₃·6 H₂O, 2 mg MnCl₂·4 H₂O und 0,4 mg Na₂MoO₄·2 H₂O pro Liter⁴. *Anabaena solitaria* wurde zuerst 28 Tage in dieser Nährösung gezüchtet und dann entfernt. Stickstoffgehalt der Nährösung nach Entfernung von *Anabaena solitaria*: 1060 µmol N/l.

Züchtungsdauer [Tage]	0	8	15	18
Grünalge:				
Stickstoffgehalt der Nährösung: [µmol N/l]				
<i>Chlorhormidium I</i>	1060	810	570	570
<i>Chlorhormidium II</i>	1060	850	540	530

Die relativ schlechte Stickstoff-Verwertung durch die zwei *Chlorhormidium*-Arten in Süßwasser-Seewasser-Mischungen ohne Spurenelementzusatz bzw.

bei Fe-Zusatz, und die gute Verwertung bei Hinzufügung von Mn und Mo könnten darauf hindeuten, daß der von *Anabaena solitaria* ausgeschiedene Stickstoff eine je nach Spurenelementzusatz unterschiedliche Zusammensetzung hat, etwa in dem Sinne, daß bei Zusatz von Mn und Mo ein größerer Anteil an kleinmolekulären Stickstoffverbindungen gebildet wird, die von den Grünalgen besser aufgenommen bzw. abgebaut werden können. Eine andere Erklärung könnte sein, daß die Grünalgen durch den Zusatz von Mn und Mo zu einer besseren Stickstoffverwertung angeregt werden. Diese Möglichkeiten müssen durch weitere Untersuchungen erst noch geprüft werden.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß sich unter geeigneten Bedingungen der von *Anabaena solitaria* ausgeschiedene Stickstoff als N-Quelle für die beiden *Chlorhormidium*-Arten verwenden läßt. Der Abbau beträgt je nach Versuchsbedingungen bis zu 50%. Möglicherweise ist dies der Grund dafür, daß *Anabaena solitaria* und *Chlorhormidium spec.* (Stamm I) ursprünglich in der Natur miteinander vergesellschaftet vorgefunden wurden und von uns aus derselben Brunnenwasserprobe isoliert werden konnten.

Der obige Stickstoff-Abbau (bis 50%) durch die beiden *Chlorhormidium*-Arten erfolgte jedoch nicht einheitlich: In den Nährösungen, die keinen Zusatz von Fe, Mn und Mo bzw. nur einen Zusatz von Fe hatten (s. Tabn. II und III), baute *Chlorhormidium* (Stamm I) den Blaualgenstickstoff besser ab als *Chlorhormidium* (Stamm II), in den Nährösungen mit Zusatz von Fe, Mn und Mo (s. Tabn. IV und V) war es umgekehrt. Auf Grund der hier gewählten Versuchsbedingungen (250-ml-Kulturen) läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, ob diese Unterschiede zwischen den beiden *Chlorhormidium*-Stämmen signifikant sind. Exakte Angaben lassen sich erst bei Züchtung der Algen in größeren Laborkulturen (71) bzw. in Züchtungsbecken auf Grund der Stickstoffwerte und der erhaltenen Algenmengen (Trockengewichte) machen. Diese Arbeiten werden z. Zt. vorbereitet.

Unser Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit. Außerdem danken wir Herrn Dr. H. O. Glenk vom Botanischen Institut Erlangen für die Identifizierung der beiden *Chlorhormidium*-Arten.

¹ P. Pohl, T. Passig u. H. Wagner, Phytochemistry **10**, 1505 [1971].

² P. Pohl u. H. Wagner, Z. Naturforsch. **27b**, 53 [1972].

³ P. Pohl u. G. Draht, Z. Naturforsch. **28c**, 285 [1973].

⁴ P. Pohl u. G. Draht, Z. Naturforsch. **30c**, 219 [1975].