

Phosphataseaktivität in drei Seen unterschiedlichen Trophiegrades

Birte Hantke und Arnulf Melzer

Synopsis

Phosphatase activity was studied in three bavarian lakes of different trophie. Cellbound algal, cellbound bacterial and free dissolved phosphatases of freshwater samples were fractionated by different size-filtrations. Phosphatase kinetic values and the determined natural substrate concentrations were used to calculate the rate of hydrolyzed phosphate in the different fractions. With increasing trophy, the phosphatase activity was marked higher. Moreover, the portion of cellbound algal phosphatases rose whereas in the oligotrophic lake, only bacterial cellbound and free dissolved phosphatases were active.

exoenzyme, phosphatase activity, size fraction filtration, bacteria, algae, free dissolved phosphatases, trophy

1. Einleitung

In Seen stellt sehr häufig Phosphor den wachstumsbegrenzenden Faktor dar. Mikroorganismen und Makrophyten nehmen das Element schnell in Form von gelöstem anorganischen ortho-Phosphat auf. Der Großteil des Phosphors liegt im Sommer im Epilimnion jedoch in organisch gebundener Form vor (CHROST & al. 1984).

Viele Algen und Bakterien besitzen hydrolytische Exoenzyme, die aus im Wasser gelösten organischen Phosphatestern und einigen anorganischen Polyphosphaten ortho-Phosphat freisetzen. Sie können zellgebunden an der Zelloberfläche der Organismen lokalisiert sein wie im Plasmalemma von Algen oder im periplasmatischen Raum bei Bakterien (CARILLO-CASTANEDA & ORTEGA 1967, AARONSON & PATNI 1976). In diesem Fall wird das regenerierte Phosphat direkt an der Zelloberfläche freigesetzt und der Phosphataseproduzent kann es von dort aus direkt aufnehmen. Die Phosphatasen bieten dadurch dem entsprechenden Organismus einen Selektionsvorteil.

Manche Algen, Bakterien und Zooplankter dagegen exkretieren Phosphatasen (WYNNE & GOPHEN 1981), die dann im Wasser gelöst ihre Aktivität entfalten. Das wieder verfügbare ortho-Phosphat kann in diesem Fall auch von anderen Organismen als dem Phosphataseproduzenten selbst aufgenommen werden. Die freien gelösten Phosphatasen haben dadurch eher eine ökologische Funktion für das gesamte Ökosystem.

Die Temperatur, der pH-Wert und die Ionenzusammensetzung des Mediums beeinflussen die Aktivität der verschiedenen Phosphatasen unterschiedlich. Außerdem zeigen die meisten Phosphatasen eine für Enzyme typische Abhängigkeit ihrer Aktivität von der vorhandenen Substratkonzentration. Diese Abhängigkeit läßt sich mit der Michaelis-Menten-Gleichung für Enzymkinetik beschreiben.

Michaelis-Menten-Gleichung für Enzymkinetiken:

$$v_i = v_{\max} \cdot [\text{Substratkonz}_i] / (K_M + [\text{Substratkonz}_i])$$

mit:

v_i : Umsatzgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration i

v_{\max} : maximale Umsatzgeschwindigkeit bei Substratsättigung

K_M : Michaelis-Menten-Konstante (die Substratkonzentration, mit der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird)

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Seen unterschiedlichen Trophiegrades miteinander verglichen. Aus der Osterseenkette wurden dabei der Herrensee als oligotropher und der Bräuhaussee als mesotropher See gewählt. Der Thaler See der Eggstätt-Hemhofer-Seenplatte wurde als polytropher See hinzugenommen.

In allen Seen wurden Phosphatasekinetiken in drei Größenfraktionen gemessen. In den Wasserproben erfolgten außerdem chemische Analysen. Eine Gesamt-Phosphor-Bestimmung in einem 0,2 μm -Filtrat lieferte nach Abzug des Gehaltes an gelöstem reaktivem Phosphor die Menge der im Wasser gelösten organischen Phosphorverbindungen. Da verschiedene Substrate von Phosphatasen unterschiedlich schnell umgesetzt werden (FLINT & HOPTON 1977), wurden nur 60 % der organischen Phosphorverbindungen als "natürliche Substratkonzentration" angenommen.

Am Ende wurden die Umsatzraten der zellgebundenen Algen- und Bakterienphosphatasen sowie die der gelösten Phosphatasen mit den ermittelten Werten für K_M , v_{\max} sowie der natürlichen Substratkonzentration mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet.

2. Probenahme

Die Probenahme erfolgte in einem 2-Wochen-Rhythmus für jeden See. Über der tiefsten Stelle wurden Proben aus jeder Meterstufe mit dem Ruttenschöpfer gezogen und Mischproben aus jeweils zwei Meterstufen hergestellt.

Im Rahmen dieser Veröffentlichung werden nur die Ergebnisse der Mischproben aus 2 m und 3 m Tiefe exemplarisch für das Epilimnion dargestellt.

3. Methodik

3.1 Filtrationen

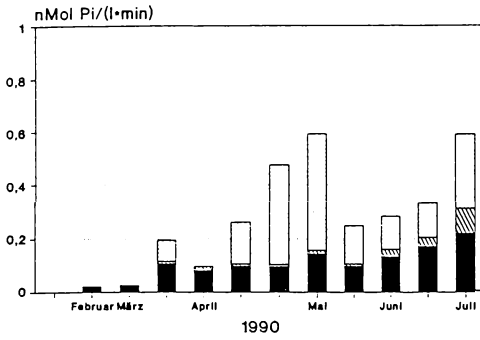
Um die Algen von Bakterien möglichst quantitativ abzutrennen, wurden Polycarbonat-Filter (Nuclepore) mit 1,0 μm Porenweite verwendet. Die Fraktion der gelösten Phosphatasen wurde durch eine Filtration über einen 0,2 μm -Polycarbonatfilter erhalten.

3.2 Messung der Phosphataseaktivität

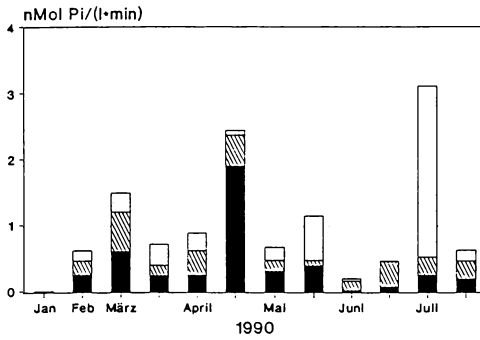
Die Phosphataseaktivität wurde durch Zugabe des künstlichen Substrates 4-Methylumbelliferyl-Phosphat (MUF-P) bestimmt. Nach der Hydrolyse der Phosphatesterbindung entsteht das fluoreszierende Produkt 4-Methylumbelliferon (MUF). Die Umsatzrate wurde über die zeitliche Zunahme der Fluoreszenz mit der Anregungswellenlänge von 365 nm und der Emissionswellenlänge von 460 nm mit einem Fluorometer (Kontron SFM 25) bestimmt.

Für die kinetischen Messungen wurden die Endkonzentrationen von 50, 100, 250, 500, 740, 980, 2.480 und 4.950 nM MUF-P eingesetzt. Die Eichung des Fluorometers erfolgte mit der Endkonzentration von 50 oder 100 nM MUF in Probenwasser, da die Fluoreszenz stark vom pH-Wert, der Temperatur und der Zusammensetzung des Probenwassers beeinflusst wurde. Ein meßbarer Fluoreszenzanstieg konnte bereits nach zwei bis sieben Minuten festgestellt werden. Die Inkubation erfolgte ohne Pufferzugabe, da die Seen über ausreichende natürliche Pufferkapazität verfügten. Die Inkubations- und Meßtemperatur entsprach der Seetemperatur in der entsprechenden Tiefe bei der Probenahme.

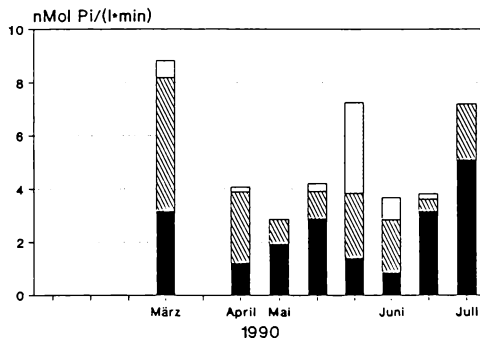
Herrensee



Bräuhaussee



Thaler See



- 1.0 µm > Bakterien > 0.2 µm
- Algen > 1.0 µm
- 0.2 µm > gelöste Fraktion

Abb. 1: Der zeitliche Verlauf der berechneten Phosphataseaktivität in den Mischproben aus 2 m und 3 m Tiefe

Die Phosphataseaktivität wurde in der unfiltrierten Probe sowie dem 1,0 μm - und dem 0,2 μm -Filtrat bestimmt. Die Umsätze der gelösten Fraktion konnten so direkt bestimmt werden, während die Algen- und Bakterienfraktion über Differenzbildung berechnet wurden (Algen = Gesamt - 1,0 μm ; Bakterien = 1,0 μm -0,2 μm). Die K_M - und v_{max} -Werte wurden mit dem Enzfitter-Programm (Elsevier Biosoft) berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Der oligotrophe Herrensee

Im Epilimnion des Herrensees waren vor allem zellgebundene Bakterienphosphatasen sowie die freien gelösten Phosphatasen aktiv (Abb. 1).

Die zellgebundenen Phosphatasen der Bakterien besaßen wesentlich niedrigere K_M -Werte als die der Algenfraktion. Da die natürlichen Substratkonzentrationen im Herrensee mit durchschnittlich 97 nMol P/l sehr niedrig waren, konnten die Algen deshalb trotz ihrer oft höheren v_{max} -Werte nicht mit den Bakterien konkurrieren. Die gelösten Phosphatasen besaßen meist K_M -Werte, die zwischen denen der Algen- und Bakterienfraktion lagen. Ihre v_{max} -Werte waren jedoch um eine Größenordnung höher als die der Bakterien (vgl. Tab. 1 und Tab. 2). Bei den Substratbedingungen im See konnten sie dadurch eine ähnliche Aktivität erreichen wie die zellgebundenen Bakterienphosphatasen.

Tab. 1: Berechnete K_M -Werte der Phosphatasen (Ps) in den Mischproben aus 2 m und 3 m Tiefe

Fraktion	kleinster	größter	mittlerer
	K_M [nMol MUFP/l]	K_M [nMol MUFP/l]	K_M [nMol MUFP/l]
Herrensee			
gelöste Ps	434	1371	788
zellgeb. Bakterien-Ps	10	182	58
zellgeb. Algen-Ps	901	4113	2275
Bräuhaussee			
gelöste Ps	141	2192	616
zellgeb. Bakterien-Ps	4	554	110
zellgeb. Algen-Ps	11	866	220
Thaler See			
gelöste Ps	67	1891	512
zellgeb. Bakterien-Ps	10	2041	383
zellgeb. Algen-Ps	51	3491	692

Tab. 2: Berechnete maximale Umsatzrate (v_{\max}) der Phosphatasen (Ps) in den Mischproben aus 2 m und 3 m Tiefe

Fraktion	geringste	höchste	mittlere
	v_{\max} [nMol P/(l*min)]	v_{\max} [nMol P/(l*min)]	v_{\max} [nMol P/(l*min)]
Herrensee			
gelöste Ps	0,8642	2,8491	1,8385
zellgeb. Bakterien-Ps	0	1,1424	0,4433
zellgeb. Algen-Ps	0,1853	2,9947	0,9836
Bräuhaussee			
gelöste Ps	0,7055	4,6506	2,3070
zellgeb. Bakterien-Ps	0,1437	2,7667	0,6230
zellgeb. Algen-Ps	0,2500	2,9928	1,1253
Thaler See			
gelöste Ps	2,4959	11,3460	8,1065
zellgeb. Bakterien-Ps	0	6,1890	2,1887
zellgeb. Algen-Ps	3,4979	25,2169	8,3515

4.2 Der mesotrophe Bräuhaussee

Die Gesamtphosphataseaktivität im Epilimnion des Bräuhaussees war trotz ähnlicher natürlicher Substratkonzentrationen deutlich höher als im oligotrophen Herrensee (man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe in Abb. 2 !). Außerdem nahm der Anteil der Algenfraktion stark zu.

Die Kinetiken der zellgebundenen Phosphatasen von Algen- und Bakterienfraktion unterschieden sich im Bräuhaussee nicht so deutlich wie im Herrensee (Abb. 2). Die Phosphatasen der Algenfraktion besaßen hier deutlich niedrigere K_M -Werte als im Herrensee. Die zellgebundenen Bakterienphosphatasen dagegen wiesen oft höhere K_M -Werte auf als die Bakterienfraktion des Herrensees (Tab. 1). Bei stets etwas höheren v_{\max} -Werten der zellgebundenen Algenphosphatasen näherte sich dadurch die Leistungsfähigkeit der beiden Organismenfraktionen an (Abb. 1).

Die K_M -Werte der gelösten Phosphatasen lagen meistens über denen der zellgebundenen Phosphatasen. Da in dieser Fraktion jedoch meistens doppelt so hohe v_{\max} -Werte erreicht wurden wie in Bakterien- und Algenfraktion (Tab. 2), wurden die ungünstigeren K_M -Werte ausgeglichen und vergleichbare Umsatzraten erzielt wie in den beiden anderen Fraktionen.

4.3 Der polytrophe Thaler See

Das Epilimnion des Thaler Sees wies die höchste Gesamtphosphataseaktivität auf. Die zellgebundenen Algenphosphatasen machten hier einen noch größeren Anteil aus als im Bräuhaussee (Abb. 1).

In allen Fraktionen wurden hier wesentlich höhere v_{\max} -Werte erreicht als in den beiden anderen Seen (Tab. 2), während die K_M -Werte in der gleichen Größenordnung lagen wie im Bräuhaussee (Tab. 1). Die Bakterienfraktion besaß auch hier meistens die empfindlichsten Phosphatasen mit den niedrigsten K_M -Werten. Da die natürliche Substratkonzentration mit durchschnittlich 370 nM P/l jedoch eher hoch war, konnte die Algenfraktion durch ihre erheblich höheren v_{\max} -Werte vergleichbare Umsatzraten erzielen wie die Bakterienfraktion.

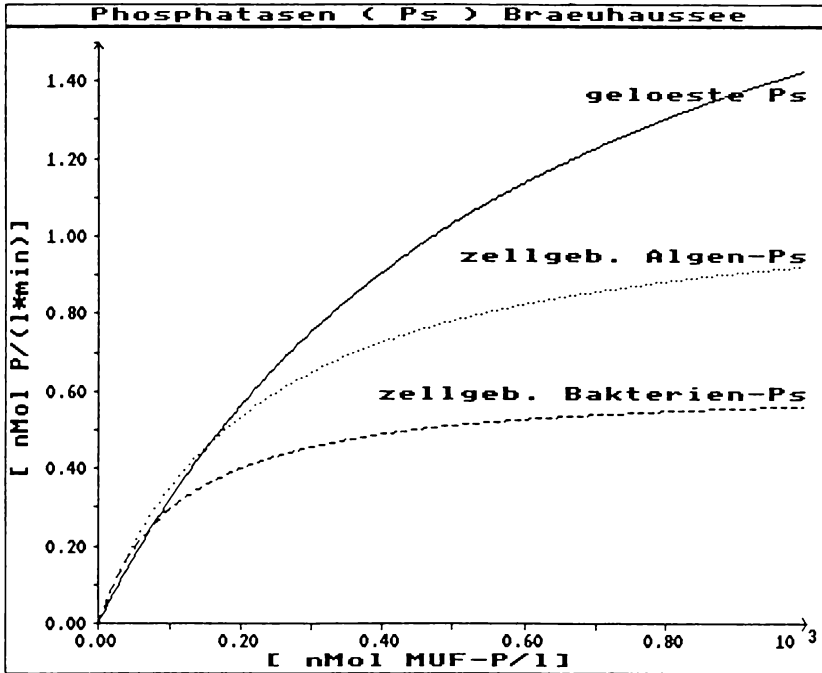
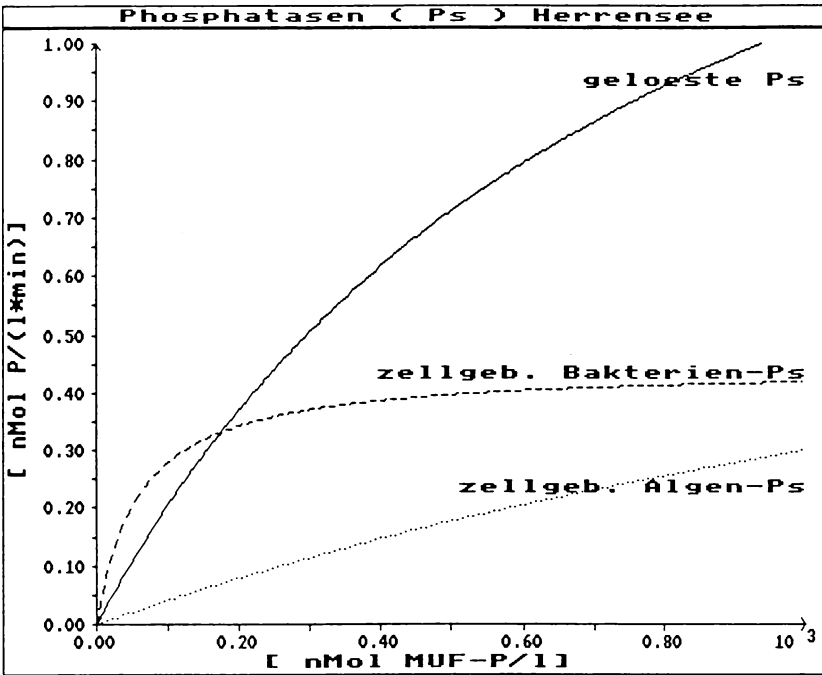


Abb. 2: Typische Verläufe der Kinetiken der gelösten Phosphatasen sowie der zellgebundenen Bakterien- und Algenphosphatasen in den drei Seen

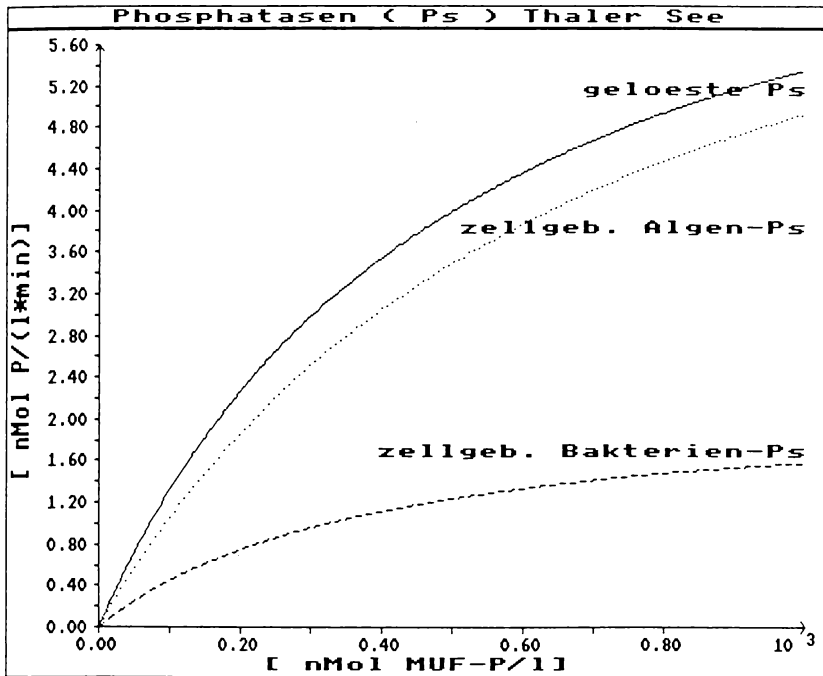


Abb. 2: Fortsetzung

Die gelösten Phosphatasen besaßen ähnliche kinetische Werte wie die zellgebundenen Algenphosphatasen und erreichten dadurch auch entsprechende Umsatzraten.

Der Verlauf der Kinetiken, die mit den durchschnittlichen Werten für v_{max} und K_M für die verschiedenen Fraktionen berechnet wurden (Tab. 1 und Tab. 2), ist in Abb. 2 für die drei Seen zusammengestellt.

5. Zusammenfassung

Mit zunehmendem Trophiegrad stieg die Gesamtphosphataseaktivität stark an. Der Anteil der zellgebundenen Algenphosphatasen nahm ebenfalls zu. Dies wurde zum einen durch niedrigere K_M -Werte der Algenfraktion in den höher trophierten Seen erreicht, zum anderen jedoch vor allem durch höhere maximale Umsatzraten.

6. Diskussion

In allen Seen waren im Epilimnion stets nur sehr geringe Mengen an gelöstem reaktivem Phosphat meßbar. Dies spricht für eine schnelle Aufnahme des durch die Phosphataseaktivität hydrolysierten ortho-Phosphats vor allem im polytropheren Thaler See.

Eine hohe Phosphataseaktivität kann durch wenige sehr leistungsfähige Phosphatasen oder durch die Summe der Aktivität vieler langsamerer Phosphatasen verursacht werden. Spezifische Phosphataseaktivitäten, z. B. bezogen auf das Trockengewicht, die Zellzahl oder den Chlorophyllgehalt, können Auskunft über die Leistungsfähigkeit bestimmter Organismen geben. In Wasserproben ist jedoch stets ein Gemisch verschiedenster Organismen vorhanden. Welche Or-

ganismen Phosphatasen bilden und ob diese unter den jeweiligen Versuchsbedingungen aktiv sind, wurde hier nicht untersucht. Aus diesem Grund können auch keine sinnvollen spezifischen Phosphataseaktivitäten angegeben werden.

Ob die hohen Umsatzraten im Thaler See nun allein durch die höhere Organismendichte und damit einer größeren Zahl von Phosphatasen bedingt sind, oder ob einige Organismen dort besonders leistungsfähige Phosphatasen besitzen, soll in Kulturversuchen untersucht werden.

Literatur

- AARONSON, S. & N. J. PATNI, 1976: The role of surface and extracellular phosphatases in the phosphorus requirement of *Ochromonas*. *Limnol. Oceanogr.* 21: 838-845.
- CARILLO-CASTANEDA, G. & M. V. ORTEGA, 1967: Effect of inorganic phosphate upon *Salmonella thymimurium* phosphatase activities: non-repressible alkaline phosphatase and non-inhibited acid phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 146: 535-543.
- CHROST, R. J., SIUDA, W. & G. Z. HALEMEJKO, 1984: Longterm studies on alkaline phosphatase activity (APA) in a lake with fish-aquaculture in relation to lake eutrophication and phosphorus cycle. *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 70: 1-32.
- FLINT, K. P. & J. W. HOPTON, 1977: Substrate specificity and ion inhibition of bacterial and particle associated alkaline phosphatases of waters and sewage sludges. *Europ. J. Appl. Microbiol.* 4: 195-204.
- WYNNE, D. & M. GOPHEN, 1981: Phosphatase activity in freshwater zooplankton. *Oikos* 37: 369-376.

Adresse

Prof. Dr. Arnulf Melzer
Dipl.-Biol. Birte Hantke
Limnologische Station der TU München
Hofmark 3

W - 8127 Iffeldorf

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie](#)

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: [20_2_1991](#)

Autor(en)/Author(s): Melzer Arnulf, Hantke Birte

Artikel/Article: [Phosphataseaktivität in drei Seen unterschiedlichen Trophiegrades 513-520](#)