

Greifswalder Geographische Arbeiten	16	341 - 369	Greifswald 1998
-------------------------------------	----	-----------	-----------------

### ***Hefen und Myzelpilze als Destruenten im marinen Ökosystem***

*F. Schauer, H. Kreisel, B. Heideck*

Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie  
F.-L.-Jahn-Straße 15a, 17487 Greifswald

#### **Einleitung**

Erst in den 60er Jahren begann man, den Meeresraum hinsichtlich des Vorkommens von Hefen zu untersuchen. Arbeiten zur Bedeutung mariner Hefen verdanken wir vor allem VAN UDEN (1968), FELL (1960, 1969), AHAERN et al. (1968) und SIEBURTH (1979). Bis in die 80er Jahre erschienen mehrere Publikationen zum Vorkommen von Hefen in den Ozeanen. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen organischer Belastung der Gewässer und einem vermehrten Auftreten von Hefepilzen wahrscheinlich gemacht werden (ROTH et al. 1962, MEYERS et al. 1967). Jedoch sind viele marine Hefen bis heute nicht exakt taxonomisch zugeordnet worden. Es fehlt sowohl ein Bezug zur modernen Taxonomie der Hefen (BARNETT et al. 1990), die in den letzten Jahren drastische Veränderungen erfuhr, als auch ein Überblick über die beteiligten Arten und die möglicherweise spezifischen Eigenschaften mariner Hefen (Salztoleranz, Neutrophilie u.a.). Für einige Teile der Ostsee und das Kattegat liegen vereinzelt Untersuchungen zur Ökologie von Hefepilzen vor (NORKRANS 1966 a, b; HOPPE 1972 a, b). Die Rolle der Hefen als mögliche Destruenten in marinen Ökosystemen wurde bisher allerdings nicht näher studiert. Im Rahmen des Forschungsprojektes GOAP war es erstmals möglich, das Vorkommen von Hefepilzen in Boddengewässern im jahreszeitlichen Verlauf sowie die ökologische Relevanz der Hefen und ihren Bezug zu Stoffaustauschprozessen zu untersuchen.

Die myzelbildenden (= filamentösen) mikroskopischen Pilze mariner Habitate sind seit den klassischen Monographien von BARGHOORN & LINDER 1944, JOHNSON & SPARROW 1961, KOHLMAYER & KOHLMAYER 1963 ff, 1980 sowie KOHLMAYER & VOLKMANN-KOHLMAYER 1991 in bedeutendem Maße hinsichtlich ihrer Taxonomie,

horizontalen und vertikalen Verbreitung untersucht worden, namentlich an den Küsten Nordamerikas und der Nordsee sowie in zahlreichen tropischen und subtropischen Gebieten (ALEEM 1953, RITCHIE 1954, GOLD 1959, SIEPMANN 1959, KOHLMAYER 1963, 1968, 1969, 1972, SCHAUMANN 1969, HUGHES 1974, REES et al. 1979, ROTH 1964 u.v.a.). Aus dem Brackwassermeer Ostsee liegen dagegen nur wenige Untersuchungen vor (DDR: SCHMIDT 1974 und kleinere Arbeiten 1967 bis 1985; Schweden: HENNINGSSON 1974; Dänemark: REES et al. 1979, FARRANT et al. 1985). Diese Arbeiten aus dem Ostseegebiet betreffen fast ausschließlich lignicole Arten, während epiphytische und parasitische Pilze der Algen und tierischen Substrate sowie der Sedimente bisher nur sehr sporadisch in der Ostsee und in den Boddengewässern studiert wurden.

Die physiologischen Leistungen mariner Myzelpilze sind bisher noch kaum untersucht worden; lediglich MOLITORIS und Mitarbeiter an der Universität Regensburg sowie JONES und Mitarbeiter in Southampton arbeiten in Ergänzung zu den klassischen Arbeiten von GUSTAFSSON & FRIES (1956, Uppsala) und KOHLMAYER (1969) an entsprechenden Forschungsprogrammen.

### **Fragestellung und Ziele des Teilprojektes**

Das Ziel dieses Teilthemas war es, Koloniezahlen und Artenspektren der marinen Pilzflora sowie mögliche Abhängigkeiten der jahreszeitlich variierenden Keimgehalte von den im Greifswalder Bodden und Oderästuar vorhandenen ökologischen Faktoren erstmalig zu erfassen, um deren Relevanz für ablaufende Stoffaustauschprozesse einzuschätzen.

Im einzelnen wurden in den 3 Untersuchungsjahren folgende Schwerpunkte bearbeitet:

1. Erarbeitung der Methodik (u.a. Membranfilter- Technik) sowie Erprobung geeigneter Nährmedien zur quantitativen Erfassung der monatlichen pilzlichen Keimgehalte
2. Optimierung von Bebrütungszeiten und -temperaturen
3. Koloniezahlbestimmungen in horizontalen (8 Meßstationen) und vertikalen Kompartimenten (8 Tiefen an einer Repräsentanzstation)
4. Isolation ausgewählter Hefen und Myzelpilze, Herstellung von Reinkulturen und Stammhaltung

5. Charakterisierung morphologisch auffälliger und häufig isolierter, ähnlicher Stämme zur Einschätzung des marinen Artenspektrums
6. Testungen zur Rolle mariner Pilze im Nahrungsgefüge der Boddengewässer
7. Analyse des Substratspektrums isolierter Pilzstämme
8. Beurteilung der physiologischen Aktivität mariner Hefen (Bestimmung der Umsatzraten verschiedener organischer Verbindungen bei unterschiedlichen Temperaturen)
9. Korrelationen pilzlicher Keimgehalte zu den Stoffaustauschprozessen im Greifswalder Bodden und Oderästuar (Korrelationsanalysen mit allen in der Datenbank verfügbaren Meßdaten der anderen Teilprojekte)

Die Rolle von Hefen und Myzelpilzen als Destruenten sollte mittels der sehr unterschiedlich ausgerichteten Fragestellungen von mehreren Seiten beleuchtet werden, um eine umfassende Analyse zu ermöglichen.

### **Methodik**

Im Untersuchungsgebiet Greifswalder Bodden, Peenestrom und Oderhaff wurden 1994 die acht Meßstationen festgelegt: Station 1 - Tonne Greifswald, Station 2 - Tonne Ariadne, Station 3 - Tonne Hollendorf, Station 4 - Tonne Achterwasser, Station 5 - Tonne Rankwitz, Station 6 - Tonne Zecheriner Brücke, Station 7 - Tonne H 3 und Station 8 - Tonne Haff .

An den einzelnen Stationen wurden Wasserproben jeweils aus einer Wassertiefe von 1 m mit einem Hydrobios-Wasserschöpfer entnommen. Zur Aufarbeitung der Wasserproben diente ein Membranfiltrationsgerät der Fa. Sartorius. Es wurden Zellulosenitratfilter mit einer Porenweite von 0,45 µm verwendet. Die eingesetzten Filtrationsvolumina betragen in der Regel 25 ml, 50 ml bzw. 100 ml.

Von zwölf der Literatur entlehnten Medien wurden nach entsprechenden Vorversuchen drei geeignete Medien ausgewählt: Medium A (Maismehlmedium nach KREISEL & SCHAUER 1987), Medium B (Glucose- Pepton- Medium nach NORKRANS 1966 b) und Medium C (Glucose- Pepton- Medium nach VAN UDEN & FELL 1968). Jedem Medium wurden 6‰ Meersalz zugefügt. Ein Antibiotikagemisch (1:1) aus Streptomycinsulfat und Oxytetracyclin in einer Endkonzentration von 0,1 % bzw. 0,05 % im Medium diente der Unterdrückung der

Bakterienflora. Nach der Filtration wurden die Filter sowohl bei 10°C als auch bei 25°C (drei verschiedene Ansätze Flüssigkeitsvolumen) bebrütet und die Koloniezahlen der Hefen und filamentösen Pilze nach 3 bis 7 Tagen ermittelt; Rotheferen wurden gesondert ausgezählt. Die Stammhaltung der isolierten und gereinigten Pilzstämmen (10 Hefen und Myzelpilze pro Monat) erfolgte auf 2,5%igem Malzagarextrakt.

Für die Bestimmung der Hefeisolate wurden Röhren- bzw. Plattenauxanographietests (KREISEL & SCHAUER 1987) sowie C- Quellenschnelltests (Fa. BIOMERIEUX, ID 32 C) verwendet. Bei der umfangreichen Datenauswertung half ein Computerprogramm von J.A. BARNETT in den Versionen 3 und 4 (1994, 1996). Die Bestimmung der Myzelpilze erfolgte lichtmikroskopisch.

Zur Analyse des Kohlenstoff- Gehaltes stand ein TOC- Gerät der Fa. SHIMADZU zur Verfügung. Die Wasserproben wurden unfiltriert und sofort nach Ankunft der Proben an Land aufgearbeitet. Mittels zwei verschiedener Aufbereitungsmethoden ermöglicht das Gerät die Messung von Gesamt- Kohlenstoff (TC) einerseits und anorganischem Kohlenstoff (IC) andererseits, so daß der Anteil an organischem Kohlenstoff (TOC) in der Probe errechnet werden kann.

Die computergestützte Korrelationsanalyse wurde vorgenommen mit dem Statistikprogramm SPSS. Alle aus der Datenbank nutzbaren Parameter der anderen Teilprojekte gingen in den Vergleich mit den Daten dieses Teilprojektes ein. Verglichen wurde mittels linearer Regression nach SPEARMAN.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. ARNDT wurden am IfÖ (Kloster/Hiddensee) die Fütterungsversuche der Copepoden und Protozoen mit Hefen und Algen durchgeführt. Die Zooplankter der Gattung *Acartia* stammten aus dem Vitter Bodden und ließen sich im Probewasser etwa eine Woche bei 6 °C am Leben erhalten. Die potentiellen Nahrungspartikel wurden nach einer 24stündigen Hungerphase der Copepoden mit in die Probegefäße gegeben. Zur Simulation des Boddenökosystems (Welleneinfluß) und optimalen Durchmischung der Versuchsorganismen befanden sich die Gefäße an einem bewegten Laufrad. Mit einem Tropfen Jod- Jod- Kalium- Lösung wurde der Versuch nach 3 Stunden abgestoppt. Nach Anfärben der Hefezellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) erfolgte das Auszählen im

Epifluoreszenzkontrast getrennt nach Einzel- und Sproßzellen. Der Fraß von Hefezellen durch die Protozoengattungen *Euplotes vannus* und *Bodo sorokini* (beide Gattungen aus der Protozoenkultursammlung ARNDT) wurde lichtmikroskopisch überprüft.

Die Stoffumsätze ausgewählter Hefearten wurden über die Sauerstoffverbrauchsmessungen erfaßt. Dazu diente eine manometrische Versuchsanordnung mit 14 parallelen Barometern (10-12 Meßansätze, endogene Atmung, Thermobarometer). Die Auswertung und die Ermittlung der Respirationsraten ( $\mu\text{IO}_2/\text{h}/\text{mgTM}$ ) erfolgte nach dem von BORRISS (1956) beschriebenen Verfahren. (Eine polarographische Sauerstoff- Messung mittels Elektrode war wegen der Alterung der Zellsuspension in nachfolgenden Messungen unvorteilhaft.) Ein eingebautes Heizungssystem ermöglichte die Einstellung verschiedener Temperaturen oberhalb der Zimmertemperatur. Die eingesetzten Hefesuspensionen wurden etwa einen Tag lang auf Glucose- Nährmedium kultiviert und für den Versuch auf eine optische Dichte von 5,0 bei 600 nm eingestellt. Die Trockenmassen von 1ml dieser Zellsuspension betragen für die einzelnen Arten: *Candida sake* - 0,895mg, *Cryptococcus laurentii* - 1,32mg und *Rhodotorula mucilaginosa* 1,102mg. Als Substrate wurden jeweils 0,1 ml folgender organischer Verbindungen eingesetzt: 10%ige Glucose, 10%ige Galactose; 0,5%iges Succinat, 0,5%iges Alanin und 0,5%iges Lactat als neutrale Lösungen. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen betrug 4 ml.

### **Untersuchungsverlauf**

Die Beprobung erfolgte monatlich regelmäßig ab Januar 1994 mit Ausnahme der Wintermonate (Eisbedeckung) und des Oktobers 1995/96 bzw. Septembers 1996 (technische Gründe). Nach einer kurzen Einarbeitungsphase wurde bereits der Februar 1994 hinsichtlich des Pilztiters und Kohlenstoff-Gehaltes ausgewertet, obwohl die Mitarbeiterstelle im Teilprojekt erst am 01.02.1994 besetzt wurde. Im August und September 1995 wurden zwei Vertikalprofile an der Station 2 (Tonne Ariadne) aufgenommen. Schwierigkeiten bereitete nur die vollständige Korrelationsanalyse, da mit Abschluß des Teilprojektes im März 1997 die Datenbank im Rechenzentrum noch nicht vollständig nutzbar vorlag. Wegen der langen Eisbedeckung im Winter 1996/97 konnten die Stoffumsatztestungen leider nicht mit nativem

Standortwasser durchgeführt werden. Die natürlichen Bedingungen wurden daher im Labor simuliert.

## Ergebnisse

### Quantitative Analyse von Populationen mariner Pilze im jahreszeitlichen Verlauf in horizontalen Kompartimenten

Nur mittels längerfristiger Untersuchungen lassen sich Aussagen zur Ökologie von marinen bzw. potentiell marinen Pilzen (Definition: SCHAUMANN 1993) ermöglichen. Aufgrund der dreijährigen Bestimmung des monatlichen Pilztiters können daher Tendenzen der jahreszeitlichen Variation der Zellzahlen von Hefen und Myzelpilzen in den Boddengewässern abgeleitet werden.

Ähnlich den Koloniezahlen der **Hefepilze** im Untersuchungsjahr 1994 trat im April bzw. Mai 1996 an fast allen Stationen ein frühjahreszeitliches Maximum auf. Die Keimgehalte im Sommer waren relativ gering und erreichten in der Regel im August Minimalwerte. Im November 1995 und 1996 stieg der Hefetiter an nahezu allen Stationen im Vergleich zu den Werten der vorhergehenden Monate wieder an. Auf einen vergleichbaren Jahrgang der Hefekeimzahlen verwies auch HOPPE (1972 a) nach Untersuchungen in der Kieler Förde. Abweichungen von diesem typischen Verlauf sind allerdings - wie die Umkehrung der Sommerdepression im Juli 1995 zeigte - möglich.

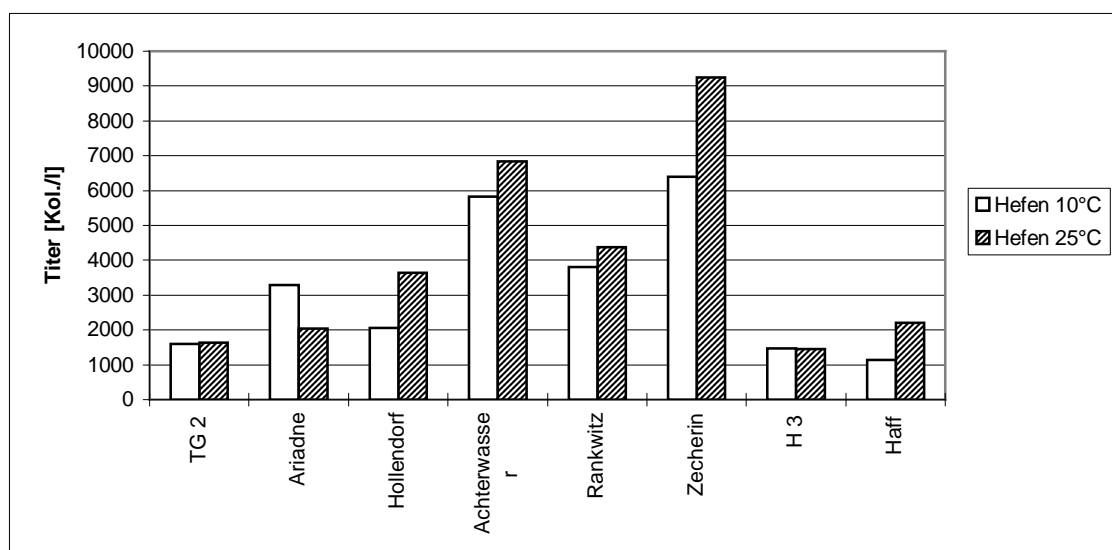


Abb. 1: Durchschnittliche Hefekoloniezahlen beider Bebrütungstemperaturen (10°C und 25°C) im gesamten Untersuchungszeitraum an allen Stationen

Die durchschnittlichen Koloniezahlen für Hefen (Mittelwerte über alle 3 Jahre an allen Stationen, 10°C und 25°C) liegen bei 3570 Kolonien pro Liter, wobei an den einzelnen Stationen recht unterschiedliche Besiedlungen ermittelt wurden (Abb. 1). Die höchsten Koloniezahlenwerte der Hefen innerhalb der Untersuchungszeit wurden an Station 6 (Zecheriner Brücke) mit Koloniezahlen von 136 898 Kolonien pro Liter erreicht. Generell wurden 1995 die höchsten Keimzahlen im Probewasser nachgewiesen, besonders deutlich im Juni und November.

Tab. 1: Verhältnis von Weißhefen zu Rotheften an Station 2 (Tonne Ariadne) des Greifswalder Bodden. Bebrütungstemperatur 25 °C., 1994

Monat	Medium A	Medium B	Medium C
Februar	>36 : 1	20 : 1	> 270 : 1
März	>1353 : 1	30 : 1	>237 : 1
April	>7773 : 1	>895 : 1	>105 : 1
Mai	1400 : 1	930 : 1	540 : 1
Juni	>83 : 1	- <sup>1)</sup>	>56 : 1
Juli	2 : 1	2,5 : 1	2,5 : 1
August	<sup>2)</sup>		
September	> 440 : 1	> 906 : 1	> 106 : 1

<sup>1)</sup> Keine Relation ermittelbar, da in dieser Probe keine Hefen vorkamen, <sup>2)</sup> Aus technischen Gründen entfiel die Probennahme im August 1994 an Station 2, > : wenn keine Rotheften bei der ermittelten Anzahl X ausgewählter Weißhefe-Kolonien vorkamen, wurde das Verhältnis > X : 1 angegeben.

Typisch ist das verstärkte Auftreten von Rotheften in den Sommermonaten (Juni bis August 1996), das 1972 bereits erstmalig für die Kieler Bucht beschrieben worden war (HOPPE, 1972 a). Das ist als Hinweis dafür zu werten, daß sich im Verlaufe des Jahres parallel zur Veränderung der Gesamtkoloniezahl z.T. auch das Spektrum der einzelnen Hefetaxa erheblich verändert. Tab. 1 zeigt am Beispiel der Station Ariadne, wie sich der Anteil der Rotheften an der Gesamthefepopulation 1994 zum Sommer hin verschob.

In allen drei Jahren ließen sich in der wärmeren Jahreszeit (vgl. z. B. Juli, August 1996) erhöhte Titer **filamentöser Pilze** nachweisen. In der Regel lagen die Myzelpilztiter der bei 25°C inkubierten Proben über denen der bei 10°C inkubierten - wie die spätere Korrelationsanalyse

bestätigte. Allerdings geht aus den Abbildungen 1 und 2 hervor, daß bis auf die Station 6 (Zecheriner Brücke) die 10°C- Werte bei den Hefen nahezu an die 25°C- Werte heranreichen, während bei den Myzelpilzen oftmals ein erheblich höherer Titer bei 25°C- Inkubationen zu verzeichnen war. Das kann als ein gewisser Hinweis dafür gelten, daß die Hefen an die durchschnittliche Wassertemperatur der Ostsee (10°C) etwas besser adaptiert zu sein scheinen.

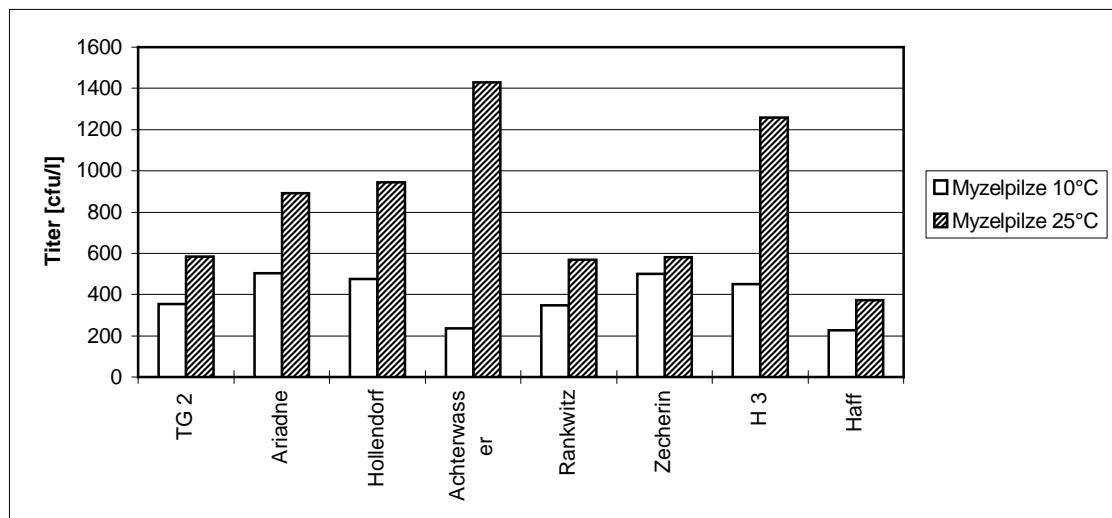


Abb. 2 - Durchschnittswerte der koloniebildenden Einheiten von Myzelpilzen bei beiden Bebrütungstemperaturen (10°C und 25°C) im gesamten Untersuchungszeitraum an allen Stationen

Die Durchschnittswerte der Koloniezahlen von Myzelpilzen (Mittelwerte aus allen 3 Jahren, allen Stationen, 10°C und 25°C) liegen im Pelagial (1m Wassertiefe) bei 608 Kolonien pro Liter (vgl. Abb. 2). Maximalwerte traten an Station 2 (Tonne Ariadne) im April 1996 mit einem Wert von 5230 cfu/l auf. Generell ließen sich 1996 stark erhöhte Einzelwerte an allen Stationen nachweisen.

### Vertikale Verteilung pilzlicher Organismen

Im August und September 1995 wurden zwei Vertikalprofile an der Station 2 (Tonne Ariadne) aufgenommen. Die Probenahme erfolgte in Abständen von 1 m (Oberfläche bis 7 m Tiefe knapp über dem Sediment). Das Verteilungsmuster der Hefen im September 1995 ergab die stärkste Besiedlung in 1 m Wassertiefe, die gleichzeitig der Beprobungstiefe entsprach und



sich somit für pilzliche Biomassebestimmungen als sehr günstig erwies. Mit zunehmender Tiefe fiel die Hefezellzahl ab, während sie in Sedimentnähe (6 bis 7 m Tiefe) teilweise geringfügig anstieg (Abb. 3).

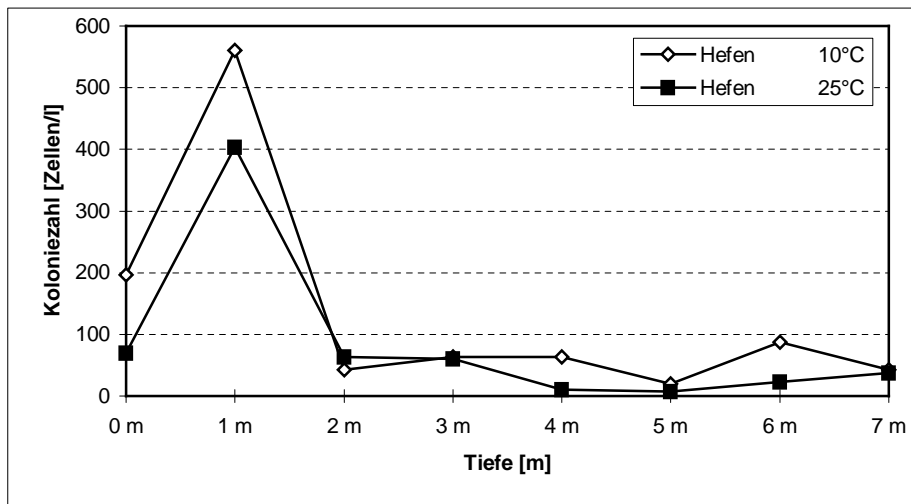


Abb. 3: Hefekoloniezahlen an Station 2 (Tonne Ariadne) in verschiedenen Wassertiefen

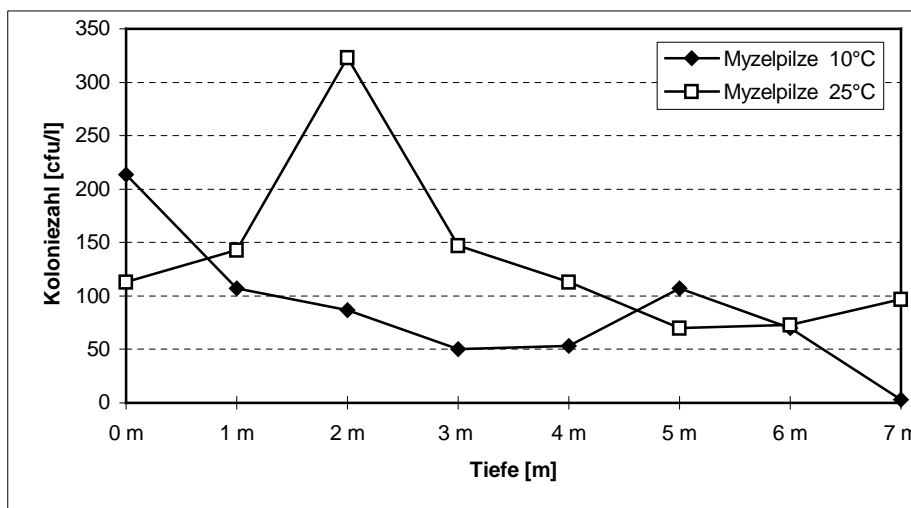


Abb. 4 - Koloniebildende Einheiten der Myzelpilze an Station 2 (Tonne Ariadne) in verschiedenen Wassertiefen

Auch die Myzelpilze erreichten ihre höchsten Keimzahlen im Bereich von 0 m bis 2 m Tiefe (Abb. 4) und waren in den folgenden Wassertiefen mit geringeren Koloniezahlen vertreten,

die sich bei 5 m Tiefe (10°C- Proben) bzw. kurz über dem Sediment in 7 m Tiefe (25°C- Proben) wieder leicht erhöhten.

## Qualitative (taxonomische) Analyse der marinen Pilze

### Hefen

Bisher wurden 34 Hefestämme näher untersucht und bis zur Art bestimmt. Insgesamt wurden 9 Arten im Untersuchungsgebiet gefunden. Davon sind 6 Arten pigmenttragend, 3 Arten hingegen gehören den Weißhefen an. Der Tabelle 2 sind die gefundenen Arten mit ihrer Stammanzahl, dem Hinweis auf ihren Ubichinon- Typ (Coenzym Q) und Pigmentbildung, ihren Fundorten (Nummern entsprechen den Stationen) und dem Isolationsmedium zu entnehmen. Die Bestimmung der Hefestämme erfolgte durch B. Heideck. Die genannten Hefearten sind bereits aus wäßrigem Milieu bekannt (BARNETT et al. 1990). Das im Untersuchungsgebiet ermittelte Spektrum an Hefen, die relativ schwer zu identifizieren sind, ist im Vergleich zu anderen Untersuchungen recht umfangreich und entspricht nicht generell den in der westlichen Ostsee gefundenen Arten. Lediglich *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula aurantiaca* sowie *Rhodotorula mucilaginosa* sind bisher dort registriert worden. Die anderen Hefen konnten erstmals für die Ostsee beschrieben werden. Es ist anzunehmen, daß die isolierten Hefen fakultativ marine Pilze repräsentieren. Im Labor wurde nachgewiesen, daß sie noch bei Salzgehalten von 10% wachsen können.

Tab. 2 - Taxonomische Zuordnung von Hefe-Isolaten

Anzahl	Hefeisolate	Coenzym	Pigment	Station	Medium
7	<i>Candida sake</i>	Q9	-	1, 2, 5, 7, 8,	C
2	<i>Cryptococcus hungaricus</i>	Q10	+	7, 8	A, B
2	<i>Cryptococcus infirmo- miniatus</i>	Q8	+	1, 6	C
2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Q10	+	2, 3	A, B
3	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	Q9	-	2	B, C
2	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Q10	+	1, 7	B, C
13	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Q10	+	1, 2, 4, 5,	A, B, C
1	<i>Sporobolomyces roseus</i>	Q10	+	5	C
2	<i>Trichosporon mucoides</i>	Q10	-	4	C

## Myzelpilze

Die 78 aus dem Greifswalder Bodden und Oderästuar isolierten filamentösen Pilze konnten 44 Arten zugeordnet werden. Es erwiesen sich 8 Isolate als Mycelia sterilia. Die Bestimmung der Myzelpilze erfolgte durch A. Reinhard und H. Kreisel. In der folgenden Tabelle sind alle bisher identifizierten filamentösen Pilze zusammengefaßt:

Die aus den Untersuchungsgewässern am häufigsten isolierte Art war *Cladosporium cladosporioides*, gefolgt von *Cladosporium herbarum* und *Mucor hiemalis*. Alle drei Arten sind weit verbreitet und weisen keine besonderen Nährstoffansprüche auf. Generell sind die isolierten filamentösen Pilze keineswegs spezifisch für marine Habitate. Vielmehr handelt es sich mehr oder weniger um gewöhnliche Boden- und Schimmelpilze, die teilweise auch durch Einwehung von Stäuben (insbesondere Ackerkrume) in die küstennahen Gewässer gelangt sein können. Die Keimfähigkeit der Sporen der isolierten Pilze im Brackwasser wurde bisher nicht geprüft. Zumindest teilweise könnte es sich bei den Isolaten um fakultativ marine Pilze handeln.

Tab. 3 - Taxonomische Zuordnung von Isolaten filamentöser Pilze

Anzahl	Isolate filamentöser Pilze	Station	Medium
1	<i>Acremonium strictum</i>	3	C
1	<i>Alternaria tenuissima</i>	2	C
1	<i>Aspergillus flavus</i>	7	C
3	<i>Aspergillus niger</i>	2,8	B,C
1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	7	C
1	<i>Chaetomium indicum</i>	1	C
1	<i>Chrysosporium pannorum</i>	5	B
10	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,2,4,6,7,	A,B,C
5	<i>Cladosporium herbarum</i>	1,2,4,7	A,C
1	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6	B
2	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	3,4	B,C
2	<i>Gliocladium roseum</i>	2	B
1	<i>Humicola fuscoatra</i>	2	B
1	<i>Memnoniella echinata</i>	1	A
5	<i>Mucor hiemalis</i>	3,4,5,6,7	C
1	<i>Mucor plumbeus</i>	2	C
1	<i>Mucor racemosus</i>	6	C
8	<i>Mycelia sterilia</i>	1,2,4,7,8	A,B,C
1	<i>Nectria inventa</i>	4	B
2	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	3,7	C
4	<i>Penicillium chrysogenum</i>	2,8	A,C
4	<i>Penicillium crustosum</i>	2,4	C
3	<i>Penicillium expansum</i>	1,2,6	A,C
2	<i>Penicillium glabrum</i>	5,4	A

1	<i>Penicillium glandicola</i>	2	B
1	<i>Penicillium granulatum</i>	5	A
1	<i>Penicillium griseofulvum</i>	7	C
Anzahl 1	Isolate filamentöser Pilze	Station	Medium
2	<i>Penicillium janczewskii</i>	1,7	A
1	<i>Penicillium jensenii</i>	2	C
1	<i>Penicillium lanosum</i>	6	C
1	<i>Penicillium lividum</i>	8	B
1	<i>Penicillium melinii</i>	6	C
1	<i>Penicillium paxilli</i>	7	C
1	<i>Penicillium piceum</i>	2	C
1	<i>Penicillium variabile</i>	8	B
1	<i>Penicillium velutinum</i>	7	C
1	<i>Penicillium verruculosum</i>	6	C
1	<i>Penicillium viridicatum</i>	7	A
2	<i>Phialophora cinerescens</i>	2	B,C
1	<i>Phialophora lignicola</i>	4	C
1	<i>Phoma glomerata</i>	6	C
1	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	5	C
1	<i>Rhizopus stolonifer</i>	8	A
1	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	7	C
2	<i>Trichoderma harzianum</i>	6,8	B

### **Erfassung der organischen Belastung der untersuchten Gewässer anhand des Kohlenstoff-Gehaltes im jahreszeitlichen Verlauf**

An allen Meßstationen wurde die Menge des Gesamtkohlenstoffs (TC), des anorganischen Kohlenstoffs (TIC) und des organischen Kohlenstoffs (TOC) in den Wasserproben ermittelt. Die Gesamtkohlenstoff- Gehalte des Greifswalder Boddens und der angrenzenden Gewässer bewegen sich zwischen etwa 30 mg/l und 60 mg/l. Der Anteil des organischen Kohlenstoffes (TOC) daran beträgt ca. ein Viertel. Mit Ausnahme der sehr hohen Frühjahrs- und Herbstwerte 1995 und dem März 1994 (Station 6) schwanken die Kohlenstoff- Gehalte übers Jahr hin um etwa 20 mg/l. Im Rahmen der Synopta (29./30.06.1994) wurde ermittelt, daß der um 6.00 Uhr und 12.00 Uhr bestimmte Wert von Gesamt- Kohlenstoff fast identisch ist, während er sich zum Abend hin (18.00 Uhr) geringfügig ändern kann (um ca. 3 mg/l).

Größenordnungsmäßig liegen die im marinen Milieu gemessenen maximalen Gehalte an Gesamtkohlenstoff nur geringfügig über denen von Greifswalder Leitungswasser (ca. 50mg/l),

dessen Gesamtkohlenstoff- Gehalt zu nahezu 100% aus anorganischem Kohlenstoff (Carbonate) gebildet wird. Regenwasser (Probe vom 14.04.1994) hat dagegen einen 7fach geringeren TC- Wert (ca. 7 mg/l mit einem TOC- Gehalt von etwa 6,95 mg/l).

Die **TIC- Gehalte** weisen an vielen Stationen relativ konstante Werte im Jahresverlauf auf, besonders im Greifswalder Bodden und im Oderhaff. Im Peenestrom treten z.T. stärkere Schwankungen auf. Besonders im Jahre 1994 ist in der Regel ein kontinuierlicher, deutlicher Rückgang der Werte vom Januar bis zum Spätsommer (August/September) zu verzeichnen. 1995/1996 sind diese Relationen allerdings nicht so deutlich ausgeprägt. Die **TOC- Gehalte** unterliegen an allen Stationen mehr oder weniger starken Schwankungen. Einem Anstieg der Werte im Spätsommer (meist ab August) folgt ein Abfall im Frühjahr. Im März/April (seltener im Mai) ist i.d.R. ein Minimum erreicht. In der folgenden Abbildung (Abb. 5) sind die TIC- und TOC- Gehalte, über den gesamten Untersuchungszeitraum von 3 Jahren gemittelt, dargestellt. Es ist ersichtlich, daß die höchsten TOC- Werte an Station 5 (Rankwitz), 6 (Zecheriner Brücke) und 3 (Hollendorf) gemessen wurden. Auffällig an diesen beiden Stationen ist die Nähe zur Küste, wodurch landseitige Einträge von organischen Stoffen oder anorganischen Nährstoffen (als Basis für die weitere Biomasseproduktion) eher erfaßt werden. Die niedrigsten TOC- Werte treten an der vom Lande am weitesten entfernten Station 2 (Tonne Ariadne) auf. Nicht generell geht eine höhere Belastung an organischem Kohlenstoff mit hohen Koloniezahlen an Hefen und Myzelpilzen einher (vgl. Abb. 1 und 2).

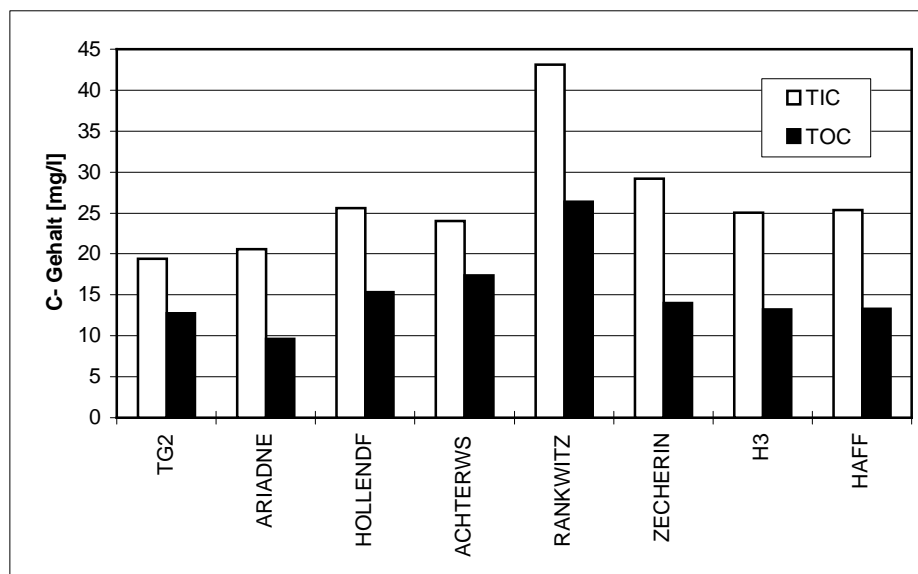


Abb. 5 - Gemittelte TIC- und TOC- Gehalte [mg/l] 1994 bis 1996

## **Korrelationen zwischen der Besiedlung der Gewässer mit Pilzen und ökologischen Parametern**

Bei der Einschätzung der Rolle von Pilzen in marinen Ökosystemen ist die Frage nach der Abhängigkeit der pilzlichen Keimgehalte von biotischen und abiotischen Einflußfaktoren bedeutsam. Alle in der Datenbank verfügbaren Meßwerte anderer Teilprojekte wurden daher zu einem statistischen Vergleich mit den pilzlichen Koloniezahlen herangezogen. Die Keimzahlen der Pilze wurden auch untereinander verglichen. In die Analyse gingen folgende Größen ein:

Hefe-Gehalt (10°C und 25°C), Gehalt an Myzelpilzen (10°C und 25°C), Wassertemperatur (Temp), Salinität (Salin), relative Sauerstoffsättigung (Oxygen), absoluter gelöster Sauerstoff-Gehalt des Wassers (Solox), Transmission (Trans), Sichttiefe (Sicht), pH-Wert, Chlorophyll-Gehalt (Chl), gelöste Nährstoffe (Nitrat - NO<sub>3</sub>, Nitrit - NO<sub>2</sub>, Ammonium - NH<sub>4</sub>, anorganischer Stickstoff - DIN, organischer Stickstoff - DON, anorganischer- und organischer Stickstoff - TDN, Phosphat - PO<sub>4</sub>, anorganischer Phosphor - DIP, organischer Phosphor - DOP, anorganischer- und organischer Phosphor - TDP, Silikat - SiO<sub>4</sub>), an feste Bestandteile gebundener Stickstoff (PN) und Phosphor (PP), Gesamtstickstoff NTOT und Gesamtphosphor - PTOT, Seston über 45 µm (SESTON), Gesamtkohlenstoff-Gehalt Seston (C- Sest) sowie der Kohlenstoff-Gehalt (gesamt - TC, organisch - TOC und anorganisch - IC). Alle Variablen wurden mittels linearer Regression (SPEARMAN, Statistikprogramm SPSS) untereinander verglichen. Alle standardisierten Meßwerte der letzten drei Untersuchungsjahre wurden einbezogen.

Zunächst konnte festgestellt werden, daß die Hefekoloniezahlwerte der bei 10°C inkubierten Proben hohe Korrelationen zu den bei 25°C inkubierten aufwiesen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,694. Das gleiche Bild ergibt sich für die Myzelpilze (K= 0,667). Dagegen konnte - wie bereits im Kapitel 6.1. dargestellt - keine Korrelation im Vergleich der Koloniezahlwerte von Hefen und Myzelpilzen ermittelt werden. Das deutet darauf hin, daß die im Pelagial nachgewiesenen koloniebildenden Einheiten von Hefen einerseits und Myzelpilzen andererseits im jahreszeitlichen Verlauf unterschiedlichen ökologischen Regulationsgrößen unterliegen.

Eine hohe Korrelation der Koloniezahlwerte von Hefen bzw. Myzelpilzen mit einzelnen der erfaßten ökologischen Parametern (s. oben) konnte in keinem Fall ermittelt werden. Jedoch ergibt die zusammenfassende Korrelationsanalyse aller erhobenen Daten von allen Stationen eine mittlere negative Korrelation ( $K \geq 0,5$ ) bei einer Signifikanz unter 0,05 zwischen dem Gehalt an Myzelpilzen (insbesondere 10°C- Proben) und der Transmission ( $K = 0,589$ ). Höhere Lichtdurchlässigkeit des Wassers korreliert somit mit einem geringeren Titer an Myzelpilzen. Für andere gemessene Parameter konnte nur an einzelnen Stationen ein Zusammenhang zur Koloniezahl von Hefen und Myzelpilzen festgestellt werden. In Tabelle 4 sind die mit den jeweiligen Koloniezahlen korrelierenden Parameter für die einzelnen Stationen dargestellt; dabei wurden nur die Parameter angegeben, bei denen sich mindestens an zwei Meßstationen (oder bei beiden Bebrütungstemperaturen) Korrelationen ergaben.

Tab. 4: Korrelationen an den einzelnen Stationen mit einem Korrelationskoeffizienten von  $K \geq 0,5$  (Abkürzungen: siehe Einleitung , +: positive, -: negative Korrelation, Trans = Transmission des Lichtes

Station	1	2	3	4	5	6	7	8
	Tonne G2	Tonne Ariadne	Tonne Hollendorf	Tonne Achterwasser	Tonne Rankwitz	Tonne Zeche-riner Brücke	Tonne H3	Tonne A/H (Haff)
Hefen 10°C				Sichttiefe +	NO <sub>3</sub> + NO <sub>2</sub> +	NO <sub>2</sub> +	O <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> +	O <sub>2</sub> +
Hefen 25°C			O <sub>2</sub> +	Sichttiefe +	NO <sub>3</sub> + NO <sub>2</sub> +	NO <sub>2</sub> +	O <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> +	
Myzelpilze 10°C	Trans-pH+ NO <sub>2</sub> - DIN- PO <sub>4</sub> - DIP- TOC+	Trans-	Trans-NO <sub>3</sub> - NO <sub>2</sub> - DIN- TDN- TOC+	Trans-PO <sub>4</sub> - DIP-	pH+ TDN- DON-	Trans-		TOC+
Myzelpilze 25°C	NO <sub>2</sub> - TOC+	Trans-pH+ NO <sub>2</sub> - DIN- TDN-	TDN- DON- TOC+			DON-		

Für Hefen deuten sich positive Zusammenhänge zum  $\text{NO}_3$  - und  $\text{NO}_2$  - Gehalt des Wassers, zur Menge des gelösten Sauerstoffs und in geringerem Maße (nur Station 4) zur Sichttiefe an. Bei den Myzelpilzen sind es neben der bereits erwähnten deutlichen Korrelation zur Transmission vor allem mögliche positive Wechselwirkungen mit dem Gehalt an organischem Kohlenstoff im Wasser (5x) und ansteigendem pH- Wert (2x). Negative Kopplungen zum Stickstoff - Gehalt ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ , TDN, DIN, DON) oder P- Gehalt ( $\text{PO}_4$ , DIP) sind z..Z. schwer interpretierbar.

Bedauerlicherweise genügte die zeitliche und räumliche Dichte zusätzlich vorhandener Daten anderer Teilprojekte wie Bakterien- und Zooplanktontiter, Windrichtung und Windstärke einem statistisch relevanten Vergleich nicht.

Die in der Tabelle angeführten Korrelationen können nur gewisse Zusammenhänge zwischen pilzlichen Zellzahlen und dem jeweiligen Faktor andeuten. Anzunehmen ist, daß eindeutige Beziehungen durch den gleichzeitigen Einfluß verschiedener Faktoren nicht deutlich erkannt werden können. Beispielsweise stimmt die Zunahme der Hefezellzahlen weitgehend mit der Abnahme des TOC im Frühjahr überein, wird jedoch im Sommer vermutlich durch eine größere Populationsdichte der Fraßfeinde (vgl. Abb. 6) überlagert, so daß sich über den Jahresverlauf keine Korrelation TOC - Hefezellzahl ergibt. Offenbar wird die Zellzahl von marinen Pilzen nicht durch einen einzelnen, bestimmenden Faktor reguliert (z.B. Gehalt an organischem C), sondern ebenso durch andere Faktoren.

### **Untersuchungen zu ökologischen Wechselwirkungen der marinen Pilze mit anderen Organismengruppen**

Zur Klärung der Rolle von Hefen im Nahrungsgefüge der Brackgewässer wurden potentielle Fraßfeinde wie Copepoden (Ruderfußkrebse) und Protozoen (eukaryotische Einzeller) getestet. Der Jahresgang der Hefen 1994 wies im Vergleich zum Titer an Copepoden (Untersuchungen der AG VIETINGHOFF; Rostock, zu *Acartia bifilosa*) eine offensichtliche Umkehrung auf. Wie in Abb. 30 verdeutlicht, gingen hohe Abundanzen der Copepodenart *Acartia bifilosa* stets einher mit geringen Hefezellzahlen, die sich erhöhten, sobald die Individuendichte des potentiellen Fraßfeindes abnahm. Eine Schlußfolgerung aus dem beobachteten Phänomen waren Experimente zum Fraßverhalten von Ruderfußkrebsen, die im Herbst 1995 begonnen wurden.



Nachdem im Herbst 1995 ein selektiver Fraß von Hefezellen nicht eindeutig belegt werden konnte, wurden die Experimente mit variierten Versuchsbedingungen 1996 wiederholt bzw. erweitert. Darüberhinaus sollten die beiden Hypothesen überprüft werden, ob für die Aufnahme der Nahrung bei Copepoden ausschließlich die Partikelgröße entscheidend ist und ob *Acartia* als typische Copepodengattung der Boddengewässer in der Lage ist, ihre Nahrung chemisch zu erkennen, d.h. selektiv zu fressen.

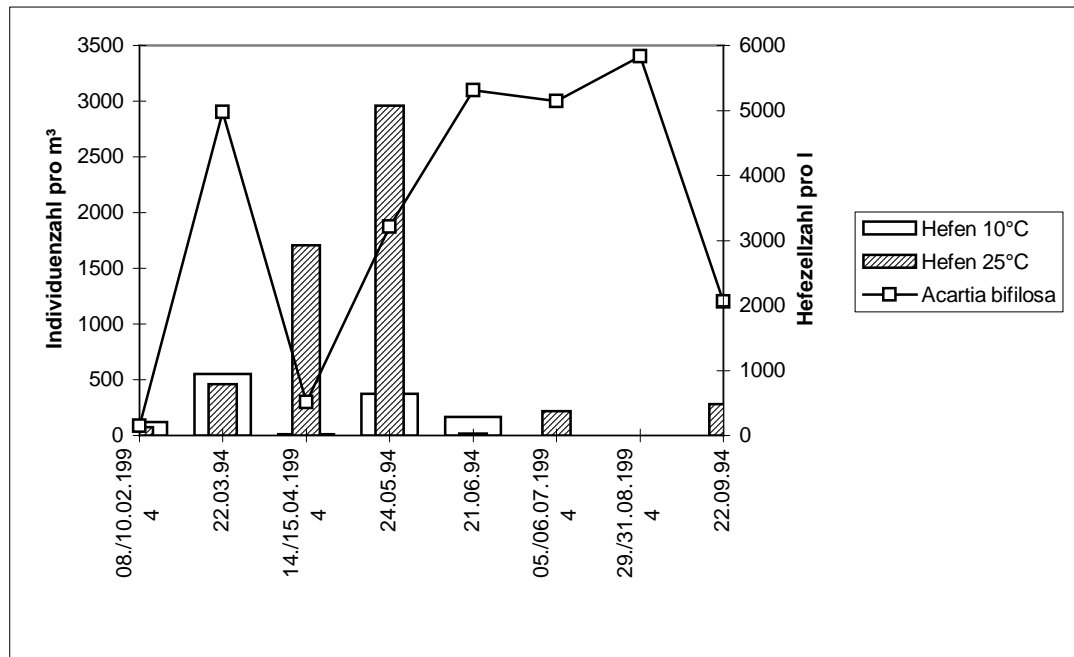


Abb. 6: Titer der bei 10°C und 25°C inkubierten Hefen [Zellzahl/l] und des Copepoden *Acartia bifilosa* [Individuen/m³] 1994 an Station 2 (Tonne Ariadne). Es wurden die zoologischen als auch die mykologischen Beprobungsdaten angegeben.

Copepoden der Gattung *Acartia* wurde daher in drei Versuchsreihen verschieden große Nahrung angeboten. Im ersten Experiment enthielten die Probegefäße Einzelzellen ( $d=5\ \mu\text{m}$ ) und Sporezellen ( $12,5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ ) der Rothefe *Rhodotorula mucilaginosa*. Als Nahrung im folgenden Versuch diente die Weißhefe *Candida sake*, deren Einzelzellen ( $d=2,5\ \mu\text{m}$  bis  $3,5\ \mu\text{m}$ ) und Sporezellen ( $6,25\ \mu\text{m} \times 2,5\ \mu\text{m}$ ) wie im ersten Versuch gemischt vorlagen. Um gezielte Filtration einer Partikelgröße nachweisen zu können, wurden die Copepoden im letzten Experiment mit einem Gemisch aus *Rhodotorula mucilaginosa* und *Candida sake* inkubiert.

Bei gleichen Ausgangstieren der eingesetzten Hefen ergab sich bei den ersten Experimenten eine deutliche Bevorzugung von kleineren Nahrungspartikeln. Es wurde für die Weißhefe eine Freßrate von 1023 Z/Cop/h ermittelt, während insgesamt nur 678 Rothefezellen pro Copepode

in einer Stunde gefressen wurden. Die Einzelzellen wurden generell stärker dezimiert als die Sproßzellen. Das Fraßverhalten von *Acartia spec.* änderte sich, als im dritten Versuch ein Gemisch aus jeweils gleichen Teilen Einzel- und Sproßzellen verschiedener Hefearten vorlag. An dieser Stelle wurden etwa gleiche Freßraten für *Rhodotorula mucilaginosa* (1211 Z/Cop/h) als auch für *Candida sake* (1413 Z/Cop/h) ermittelt. Die Protozoenarten *Euplotes vannus* und *Bodo sorokini* nahmen Hefezellen der Art *Rhodotorula mucilaginosa*, die als ausschließliche Nahrung angeboten wurde, nicht auf (lichtmikroskopische Kontrolle). Das Fraßverhalten bei *Candida sake* wurde in diesem Falle nicht geprüft. Mit den Fütterungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß Weiß- und Rotheferen in marinen Ökosystemen für vorwiegend herbivore Copepoden als Nahrungsgrundlage dienen können. Die hier ermittelten Freßraten von 1211 Z/Cop/h sowie 1413 Z/Cop/h entsprechen etwa einem Kohlenstoff-Gehalt von 0,0171 µg bzw. 0,0201 µg und liegen damit in der Größenordnung natürlicher Filtrationsleistungen. So beträgt der ermittelte Phytoplanktonfraß 0,02 µg C/l, der bei *Acartia spec.* beschrieben wurde (DARO, 1988).

Die Frage nach der selektiven Auswahl der Nahrung aufgrund der Partikelgröße läßt sich anhand der bisherigen Versuche nicht ohne Einschränkungen bejahen. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß bei einem Nahrungsangebot von einzelligen Organismen gleicher Größenordnung kleine, sphärische Partikel aufgenommen werden, während bei Zellgemischen (vgl. Zwischenbericht 1995: Experimente mit Hefe-Algen-Gemischen) andere größere Partikel oft unselektiv mit eingestrudelt werden. Inwieweit die Nahrungsaufnahme bei calanoiden Copepoden chemosensorisch (vgl. POULET et al. 1978) oder größenabhängig determiniert ist, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht erklären.

## **Ermittlung von Stoffumsätzen und -umsatzraten von Substraten durch marine Pilze**

### **Substratspektren mariner Pilze am Beispiel der Hefen**

Zur Einschätzung der Rolle von Hefen als Destruenten in marinen Habitaten ist es essentiell, ihr Substratspektrum zu kennen. Daher wurden die bisher bestimmten Hefearten auf die Verwertung von mindestens 30 C- Quellen und 5 N- Quellen hin getestet. In der Regel wurde die C- Assimilation aller Stämme zuerst im Schnelltest (C- Quellen- Testset der Fa. BIOMERIEUX) geprüft, zur Sicherheit jedoch mit der Überprüfung des Wachstums im

Reagenzröhrchentest bestätigt. Das Substratspektrum der isolierten Hefestämme ist in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Der überwiegende Teil isolierter Hefen ist nicht in der Lage, Zucker zu vergären. Dagegen ist eine oxidative Verwertung zahlreicher Zucker, Zuckeralkohole, organischer Säuren und verschiedener Alkohole möglich. Von allen Hefen kann Ammonium als N-Quelle genutzt werden, Nitrat dagegen kann nur für die knappe Hälfte der Arten als N-Quelle dienen. Nitrit scheint für einige Hefestämme eher als N-Quelle geeignet zu sein als Nitrat.

Tab. 5 - Verwertung verschiedener C- und N-Quellen durch marine Hefen

Hefeart	Candida sake	Cryptococcus hungaricus	Cryptococcus infirmo-miniatus	Cryptococcus laurentii	Debaryomyces hansenii	Rhodotorula aurantiaca	Rhodotorula mucilaginosa	Sporobolomyces roseus	Trichosporon mucoides
<b>Aerobe Verwertung von C - Quellen</b>									
1	D - Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
2	D - Galactose	+	+	V	+	+	V	V	V
3	L - Sorbose	+	V	V	V	V	V	V	V
4	D - Glucosamin	V	V	-	V	V	-	-	-
5	D - Ribose	V	V	V	V	V	V	V	V
6	D - Xylose	V	+	V	+	+	V	+	V
7	L - Arabinose	-	+	+	+	V	V	V	-
8	D - Arabinose	-	V	+	+	V	V	V	V
9	L - Rhamnose	-	V	V	+	V	-	V	-
10	Saccharose	+	+	+	+	+	V	+	+
11	Maltose	+	+	+	+	+	V	V	+
12	a, a- Trehalose	+	+	V	+	+	V	+	V
13	Methyl a-D - glucopyranosid	V	V	V	+	+	V	V	V
14	Cellobiose	V	+	+	+	V	D	V	V
15	Salicin	V	V	+	V	V	V	V	V
16	Arbutin	V	+	+	+	V	V	V	V
17	Melibiose	-	V	-	+	V	-	-	-
18	Lactose	-	V	V	+	V	-	-	-
19	Raffinose	-	+	+	+	+	-	+	+
20	Melezitose	V	+	+	+	+	V	V	+
21	Inulin	-	-	-	V	V	-	-	-
22	Stärke	-	V	+	V	V	-	-	V
23	Glycerol	V	V	V	V	+	V	V	V
24	Erythritol	-	V	V	V	V	-	-	-
25	Ribitol	V	V	+	V	+	V	+	V

Hefeart		Candi- da sake	Crypto- coccus hunga- ricus	Crypto- coccus infir- miniatus	Crypto- coccus laurentii	Debaryo- -myces hansenii	Rhodo- torula auran- tiaca	Rhodo- torula muci- lagi-nosa	Sporo- bolo- myces roseus	Tricho- sporon muco- ides
26	Xylitol	V	V	V	+	+	V	+	V	+
27	L - Arabinitol	-	V	V	V	V	V	V	-	+
28	D - Glucitol	+	+	+	V	+	V	V	V	+
29	D - Mannitol	+	+	+	+	+	V	V	V	V
30	Galactitol	-	+	V	+	V	-	V	-	+
31	myo - Inositol	-	V	+	V	-	-	-	-	+
32	D - Glucono - 1,5 - lacton	V	V	+	V	V	V	+	V	+
33	2 - Keto - D - gluconat	+	+	+	+	+	V	V	-	+
34	D - Gluconat	V	V	V	+	V	V	V	V	+
35	D - Glucuronat	-	+	+	+	V	V	-	-	+
36	D -Galacturonat	-	V	+	V	-	V	V	-	+
37	DL - Lactat	V	V	V	V	V	-	V	V	+
38	Succinat	V	+	+	+	+	V	V	+	+
39	Citrat	V	V	+	V	+	V	V	V	+
40	Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	Ethanol	+	V	+	V	+	V	V	V	+
42	Propan - 1,2 - diol	-	-	-	V	-	V	V	V	+
43	Butan - 2,3 - diol	V	-	-	-	-	V	-	-	V

Hefeart		Candi- da sake	Crypto- coccus hunga- ricus	Crypto- coccus infir- miniatus	Crypto- coccus lauren-tii	Debaryo -myces hansenii	Rhodo- torula auran- tiaca	Rhodo- torula muci- lagi-nosa	Sporo- bolo- myces roseus	Tricho- sporon muco- ides
<b>Aerobe Verwertung von N - Quellen</b>										
1	Ammonium	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Nitrat	-	-	+	-	-	+	V	V	-
3	Nitrit	-	V	+	V	V	+	V	V	+
4	Ethylamin	V	-	+	V	+	V	+	V	+
5	L- Lysin	+	V	V	V	+	V	V	V	+
6	Cadaverin	+	-	V	V	+	-	V	V	+
7	Creatin	-	-	-	-	V	-	-	-	-
8	Creatinin	-	V	-	V	-	-	-	-	2
9	Glucosamin	-	-	-	V	-	-	-	-	-
10	Imidazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Hefeart		Candi- da sake	Crypto- coccus hunga- ricus	Crypto- coccus infir- mo- miniatus	Crypto- coccus lauren- tii	Debaryo- myces hansenii	Rhodo- torula auran- tiaca	Rhodo- torula muci- lagi-nosa	Sporo- bolo- myces roseus	Tricho- sporon muco- ides
<b>Fermentation von C - Quellen</b>										
1	D - Glucose	+	-	-	-	V	-	-	-	-
2	D Galactose	- V	-	-	-	V	-	-	-	-
3	Maltose	V	-	-	-	V	-	-	-	-
4	Methyl- a-D - glucopyranos id	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Saccharose	V	-	-	-	V	-	-	-	-
6	a, a- Trehalose	V	-	-	-	V	-	-	-	-
7	Melibiose	-	-	-	-	V	-	-	-	-
8	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Cellobiose	-	-	-	-	V	-	-	-	-
10	Melezitose	-	-	-	-	V	-	-	-	-
11	Raffinose	-	-	-	-	V	-	-	-	-
12	Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	D - Xylose	V	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Verwertung; -: keine Verwertung; V: variable Reaktion (bei verschiedenen Ansätzen oder parallelen Stämmen); D: verzögertes Wachstum

### Oxidationsraten von Substraten

Von Interesse waren außerdem die Umsatzleistungen ausgewählter Hefearten. Die Abbauraten von Glucose, Galactose, Succinat, Lactat und Alanin wurden für die Hefearten *Candida sake* (Stammnr. C5), *Cryptococcus laurentii* (Stammnr. F4) und *Rhodotorula mucilaginosa* (Stammnr. C1 bzw. SBUG 821) getestet.

Zunächst wurden bei der Hefe *Rhodotorula mucilaginosa* die Oxydationsraten 5 verschiedener Substrate über einen Zeitraum von 3 Stunden ermittelt (Abb. 7). Dabei zeigte sich nach einer z.T. anfänglichen stärkeren Oxydation in den ersten 40 Minuten ein relativ konstanter Verbrauch der Substrate über den restlichen Meßzeitraum. In den folgenden Darstellungen wurden daher nur die mittleren Oxydationsraten (innerhalb von 3 Stunden Meßzeit) angegeben. Der stärkste

Substratumsatz ergab sich mit Glucose als Oxydationssubstrat, dann folgen Galactose, Lactat und Alanin. Succinat wurde in diesem Versuchsansatz nur sehr schwach umgesetzt.

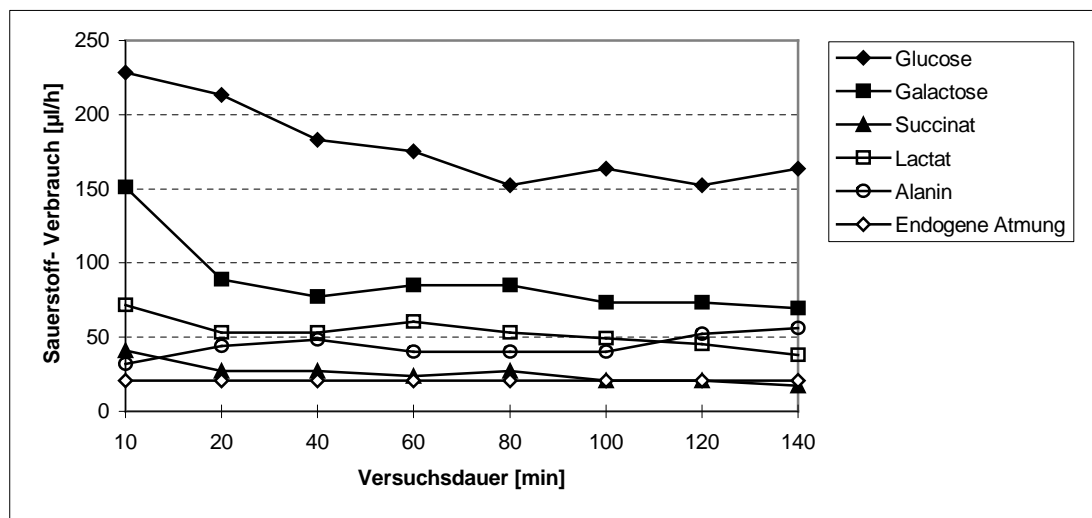


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Oxydation verschiedener C- Quellen durch den Hefestamm *Rhodotorula mucilaginosa* SBUG 821 bei 30°C nach Vorkultur auf Glucose (1%)

Einen großen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Stoffumsätzen hat die Temperatur. Aus diesem Grund wurde die Stoffwechselintensität von *Rhodotorula mucilaginosa* mit den jeweiligen Ausgangssubstraten bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (Abb. 8). Für die Art *Rhodotorula mucilaginosa*, von der eine Vielzahl von Stämmen im Untersuchungsgebiet isoliert werden konnten, zeigten sich im Bereich von 20°C, 25°C und 30°C nur geringe Unterschiede bezüglich der Oxydation verschiedener C- Quellen. Für viele biochemische Reaktionen und wachstumskinetische Mengen an Mikroorganismen- Kulturen gilt, daß sich bis zum Erreichen des Temperaturoptimums alle 10°C die Umsatzgeschwindigkeiten bzw. Wachstumsraten etwa verdoppeln. Das ist für die untersuchte Hefe im erfaßten Temperaturbereich nicht der Fall, so daß angenommen werden kann, daß ab 20°C bereits das Temperaturoptimum überschritten ist; darauf deuten auch die im Vergleich dazu leicht abfallenden Werte bei 25°C und 30°C hin.

Beim Vergleich der Oxydationsraten verschiedener aus marinem Milieu isolierter Hefestämme ergaben sich deutliche Unterschiede (Abb. 9). Während *Cryptococcus laurentii* mit allen geprüften Substraten hohe Oxydationsraten aufwies, wurden bei den anderen beiden Hefestämmen teilweise recht unterschiedliche Umsatzraten für die getesteten C- Quellen ermittelt.

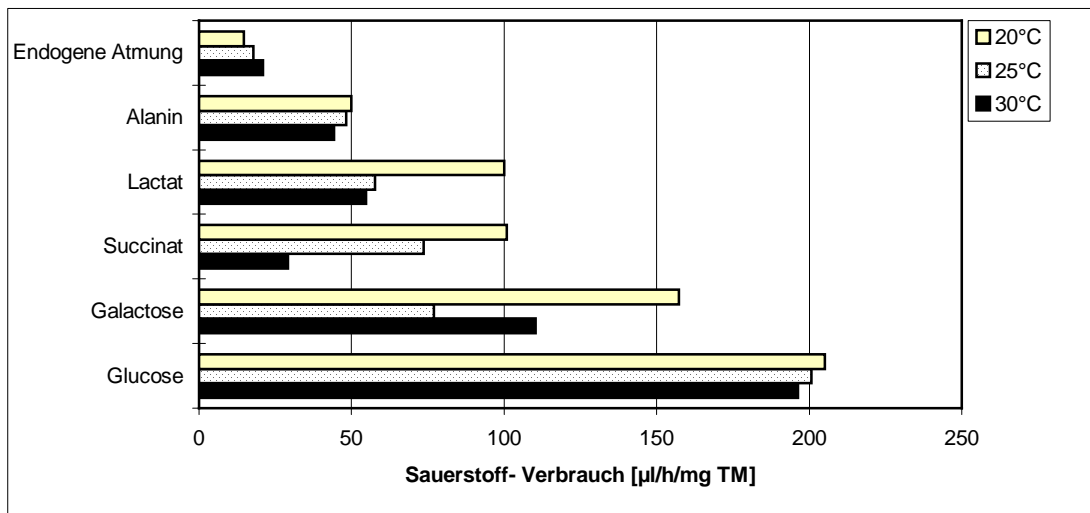


Abb. 8: Oxydationsraten des Hefestammes *Rhodotorula mucilaginosa* in Abhängigkeit von unterschiedlichen Inkubationstemperaturen, Vorkultur: Glucose (1%), Oxydationsraten ohne Abzug der endogenen Atmung

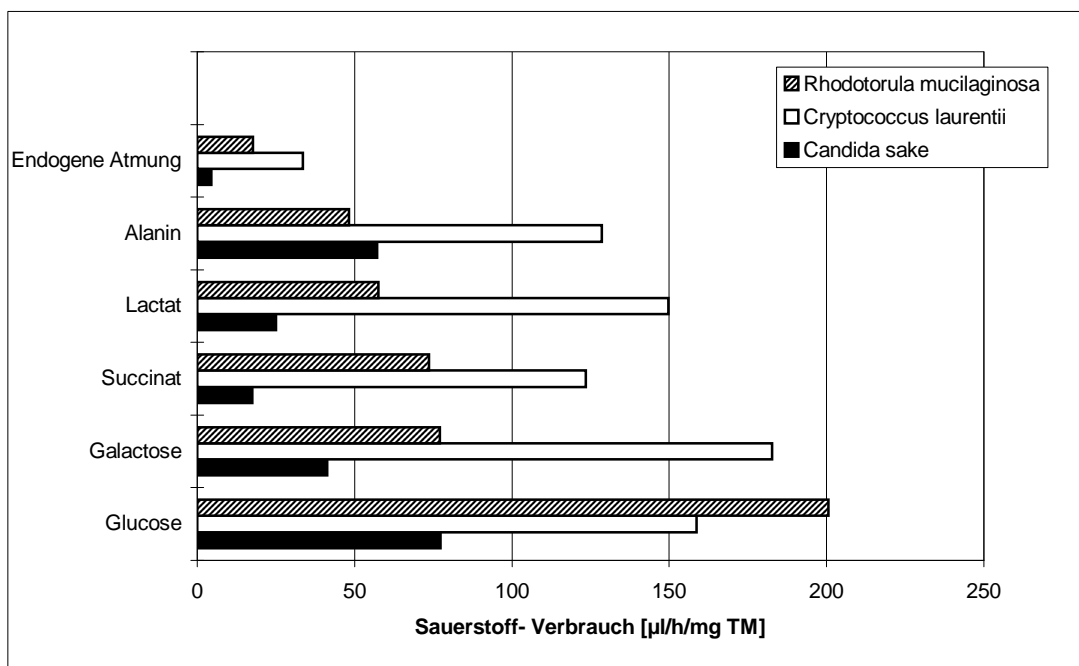


Abb. 9: Vergleich der Oxydationsraten von 6 verschiedenen C- Quellen bei den drei Hefestämmen *Candida sake*, *Cryptococcus laurentii* und *Rhodotorula mucilaginosa* Vorkultur: Glucose (1%) ohne Abzug der endogenen Atmung. Inkubationstemperatur: 25°C

### Hochrechnungen zum Stoffumsatzpotential mariner Hefen

Die folgenden Abschätzungen beziehen sich nicht auf sämtliche marine Pilze des Untersuchungsgebietes, sondern nur auf die Hefen des Pelagials, da hierfür allein genügend stoffwechselphysiologische Daten vorliegen. Da die Hefen von der Koloniezahl im

Jahresdurchschnitt etwa 85% der koloniebildenden Einheiten mariner Pilze ausmachen, scheint der Bezug auf diese Pilzgruppe im Vergleich zu den Myzelpilzen (ca. 15%) gerechtfertigt. Darüber hinaus liegen im Gegensatz zu den meisten Hefen die filamentösen Pilze teilweise auch in der physiologisch inaktiven Sporenform vor.

Unter der Voraussetzung, daß 1mg Hefetrockenmasse einer Zellzahl von  $7,1 \times 10^6$  (*Rhodotorula mucilaginosa*),  $4,6 \times 10^7$  (*Candida sake*) bzw.  $5,6 \times 10^7$  (*Candida maltosa*) entspricht, ergibt sich aufgrund der erfaßten Koloniezahlen eine Hefebiomasse in den untersuchten marinen Gewässern, die den Bereich von 0,06 mg bis 19 mg Biomasse (Trockenmasse = TM) pro m<sup>3</sup> Wasser umfaßt.

Falls die ermittelten Zahlen an koloniebildenden Einheiten nicht überwiegend durch einzeln vorliegende Hefezellen bedingt sind, sondern vielmehr auch Zell- Aggregate wie Mutter-Tochter- Zellverbände oder Pseudomyzel- Stücke der Ausgangspunkt für die spätere Koloniebildung waren, würde eine etwas über diese Werte hinausgehende Biomasse zu erwarten sein. Generell beträgt die Biomasse einer Hefezelle (Ø von 15 Stämmen) im Vergleich zu einer Bakterienzelle (*Pseudomonas aeruginosa*) aufgrund des größeren Zellumfanges und der dickeren Zellwände der Pilzzelle etwa das 58fache an Trockenmasse.

Bei der Annahme einer "Zellmolekül"- Struktur von  $C_6H_{10}O_3N_1$  für Hefen (ermittelt an *Hansenula polymorpha*, BABEL 1988) kann ein Kohlenstoff- Anteil von 50% für die Hefe-Biomasse erwartet werden.

Bezogen auf die ermittelten TOC- Werte, die in den Gewässern im Bereich von 10 bis 26,4 mg/l (vgl. Abb. 5) liegen, ergeben sich für den "Hefe-Kohlenstoff" maximal Anteile bis etwa 0,1% am organischen Kohlenstoff in den Gewässern. In der Regel wird dieser Wert jedoch deutlich unterschritten.

Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß der reale, in den Gewässern durch Substratabbau erreichte Biomassezuwachs um einiges höher liegt, weil die jeweils ermittelten Hefezellzahlen nur die "Restzahl" an Hefen darstellt, die nicht durch Fraßfeinde dezimiert wurde. Der ursprünglich vorhandene synthetisierte "Hefe- Kohlenstoff" ist somit teilweise bereits in die Nahrungskette eingegangen.



Da das Wachstum der meisten isolierten Hefen bei 0 - 5°C eingestellt wird und auch die Stoffumsatzraten in diesem Bereich minimal werden, kann für die Temperatur von 10°C (als etwaigem Jahresmittelwert in den untersuchten Gewässern) aus vorhandenen Daten sowie auch aus anderen stoffwechselphysiologischen Untersuchungen an weiteren Hefestämmen interpoliert werden, daß die Substratumsatzraten bei diesem Temperaturbereich etwa 50 - 65% der 20°C- Werte betragen. Die unter diesen Bedingungen maximal möglichen Oxydationsraten verschiedener Substrate liegen bei genügendem Substratangebot und optimaler Sauerstoff-Versorgung somit zwischen 15 und 75µl O<sub>2</sub>/h/mg TM (entsprechend 0,67 bis 3,35 µmol O<sub>2</sub>/h/mg TM). Die in gepuffertem Wasser unter Wachstumslimitation ermittelten Respiratorischen Quotienten liegen im Bereich um 0,88 (endogene Atmung), 0,9 bis 1,2 (Glucose und Galactose) bzw. 1,0 bis 1,15 (Succinat u.a. organische Säuren).

Bei der Substratoxydation kann im maximalen Fall 85% des Kohlenstoffs in das "Zellmolekül" integriert werden, da in der Regel auch bei effektivster Verwertung Verluste z.B. durch Decarboxylierungen im Stoffwechsel bedingt werden. Alternativ können bei starker Wachstumslimitation (z.B. N- oder P- Mangel) die Substrate nur für den Energiestoffwechsel (Erhaltungsstoffwechsel) zu CO<sub>2</sub> endoxydiert werden, ohne daß ein stärkerer Einbau des Substratkohlenstoffs in die Hefebiomasse erfolgt. Je nachdem, ob der erste oder der zweite Fall eintritt, liegen die gemessenen RQ- Werte im Bereich von unter 0,5 oder entsprechen (für den zweiten Fall) weitgehend den theoretischen RQ- Werten (Glucose z.B. 1,0; Succinat 1,14; Fettsäuren um 0,7). Die von uns im Labor eingestellten Bedingungen lehnen sich eher an den zweiten Fall an, zumal die Wachstumsraten der marinen Pilze im natürlichen Ökosystem der Küstengewässer äußerst niedrig sind.

Die für die marinen Hefen ermittelten Oxydationsraten im Bereich von 0,67 - 3,35µmol O<sub>2</sub>/h/mg TM entsprechen somit einem Substratumsatz von etwa 0,1 - 0,56µmol Kohlenhydraten (Monomere) oder 0,2 - 0,96µmol an organischen Säuren (kurzkettige Dicarbonsäuren).

Unter Berücksichtigung der in den Gewässern vorliegenden Hefebiomasse von 0,06mg bis maximal 19mg pro m<sup>3</sup> ergibt sich ein potentieller Umsatz pro Tag und m<sup>3</sup>, der im Bereich von 0,14µmol bis 438µmol organisches Kohlenstoffsubstrat (Molekulargewicht 150 ± 30) liegen kann, entsprechend einer Menge von etwa 0,02mg bis 66mg Substrat.

Die genannten Substrate enthalten ca. 40% Kohlenstoff, so daß sich eine Oxydationsfähigkeit von 0,009 bis maximal 26mg organischem Substrat- Kohlenstoff pro Tag und m<sup>3</sup> Wasser ergibt. Allerdings dürften die genannten theoretischen Maximalwerte kaum erreicht werden können, da im marinen Ökosystem im Normalfall keine Absättigung der Zellen mit verwertbaren Substraten vorliegt, die unter den Laborbedingungen jedoch zugrunde gelegt wurde. Die erreichten Werte drücken somit nur die Potenz der marinen Hefen unter optimalen Nährstoffbedingungen aus, d.h. bei hohem Sauerstoffeintrag, hoher Konzentration an leicht verwertbaren organischen C- Quellen sowie ohne die Konkurrenz anderer Destruenten.

### **Weiterführende Forschungsansätze**

Mit dem vorliegenden Bericht gelang es erstmalig, aktuelle Angaben zum Artenspektrum, Vorkommen und zu Stoffumsätzen mariner Pilze im Greifswalder Bodden, Peenestrom und Oderhaff - aufgeschlüsselt nach Hefen und filamentösen Pilzen - zu machen. Für ein autochthones Vorkommen der Hefepilze im Pelagial der beprobten Gewässer gibt es deutliche Hinweise. Schwer abzuschätzen ist es jedoch, inwieweit die Hefen auch mit Süßwassereinträgen aus den einmündenden Flüssen in das Oderhaff, den Peenestrom und den Greifswalder Bodden gelangen, da bisher keine diesbezüglichen Daten vorliegen. Zukünftige Untersuchungen zu pilzlichen Keimgehalten der Flüsse wären daher von Bedeutung.

Ein weiterer Schwerpunkt künftiger mykologischer Arbeit im Ostseeraum könnte die Analyse der Besiedlung von Biofilmen oder Sedimenten mit Hefen und filamentösen Pilzen sein. Im Hinblick auf die Verbreitung und Aktivitäten der Pilze in marinen Sedimenten ergibt sich derzeit ein noch recht unklares Bild. Für einige benthische Lebensräume (z.B. das Litoral) liegen sehr detaillierte Ergebnisse vor. Dagegen ist über Koloniezahlen, vorkommende Arten und stoffwechselphysiologische Aktivitäten von Pilzen in Sedimenten der Ostsee sowie sublitoralen und Tiefseebereichen nur wenig bekannt.

1993 wurden von SCHAUMANN Untersuchungen zur Besiedlungsdichte mariner Sedimente vorgenommen, bei denen die Koloniezahlen der Pilze oft um das Tausendfache höher als im Freiwasser lagen. Nach eigenen stichprobenartigen Analysen liegt die Gesamtzahl der Pilze auch im Ostsee- Sediment weitaus über den Keimgehalten des Pelagials. Ein Teil der Pilze,

die in 1m Wassertiefe nachgewiesen wurden, sind überdies vermutlich durch Resuspensionsvorgänge aus dem Sediment freigesetzt worden.

Somit gehen die pilzlichen Stoffwechselaktivitäten, die im vorliegenden Bericht nur für das Pelagial dargestellt wurden, in ihrer Gesamtheit weit über die gemachten Angaben hinaus und dürften einen größeren Einfluß auf Stoff- Flüsse im marinen Ökosystem besitzen als bisher angenommen.

### Literatur

- AHAERN, D. G., ROTH, F. J. & S.P. MEYERS (1968): Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. - *Mar.Biol.* **1**, 291 - 308.
- ALEEM, A. A. (1953): Marine fungi from the west-coast of Sweden. - *Arkiv för Botanikser.* **2**, Bd. **3**, 1 - 33.
- BABEL, W. (1988): Effizienz und Geschwindigkeit von Wachstum und Vermehrung. In HECKER, M. & W. BABEL (Hrsg.): *Physiologie der Mikroorganismen.* - G. Fischer Verlag Jena, 72 - 92.
- BARGHOORN, E.S. & D.H. LINDER (1944): Marine fungi: their taxonomy and biology. - *Farlowia* **1**: 395 - 467.
- BARNETT, J. A., PAYNE, R. W. & D. YARROW (1990): *Yeasts: characteristics and identification.* - University Press Cambridge, 1002 p.
- BORRIS, H. (1956): Die Anwendung manometrischer Methoden (Warburg- Apparatur) bei stoffwechselfysiologischen und biochemischen Untersuchungen. - In BELOSERSKI, A. N. & N. I. PROKURJAKOW: *Praktikum der Biochemie der Pflanzen.* VEB Dt. Verlag der Wissenschaften Berlin, 370 - 388.
- DARO, D. (1988): Copepod Behavior. - In PRICE, H.J.: *Zooplankton Behavior.* *Bulletin of Marine Science* **43**, 3, 724 - 725.
- FARRANT, C., HYDE, K.D. & E.B. G. JONES (1985): Further studies on lignicolous marine from Danish sand dunes. - *Trans. Brit. Myc. Soc.* **85**, 164 - 167.
- FELL, J.W., AHEARN, D.G., MEYERS, S.P. & F.J. ROTH (1960): Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida, and adjacent benthic areas. - *Limnology and Oceanography* **5**, 366 - 371.
- FELL, J.W., STATZELL, A.C., HUNTER, I.L. & H.J. PHAFF (1969): *Leucosporidium* gen. nov., the heterobasidiomycetous stage of several yeasts of the genus *Candida*. - *Antonie van Leeuwenhoek* **35**, 433 - 462.
- FELL, J.W. & N. VAN UDEN (1963): Yeasts in marine environments. In C.H. OPPENHEIMER: *Symposium on marine microbiology*, Springfield; 329 - 340.
- GOLD, H.S. (1959): Distribution of some lignicolous Ascomycetes and Fungi imperfecti in an estuary. - *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* **75**, 25 - 28.

- GUSTAFSSON, U. & N. FRIES (1956): Nutritional requirements of some marine fungi. - *Physiologia Plantarum* **9**, 462-465.
- HENNINGSSON, M.(1974): Aquatic Lignicolous Fungi in the Baltic and along the West Coast of Sweden. - *Svensk Botanisk Tidskrift* **68**, 401-425.
- HOPPE, H.-G. (1972a): Untersuchungen zur Ökologie der Hefen im Bereich der westlichen Ostsee. - *Kieler Meeresforschungen* **28**, 54 - 77.
- HOPPE, H.-G. (1972b): Taxonomische Untersuchungen an Hefen aus der westlichen Ostsee. - *Kieler Meeresforschungen* **28**, 219 - 226.
- HUGHES, G.H. (1974): Geographical distribution of the higher marine fungi. - *Veröff. Inst. Meeresforschung Bremerhaven Suppl.* **5**, 419 - 441.
- JOHNSON, T.W. & F.K. SPARROW (1961): *Fungi in Oceans and Estuaries*. - Verlag J.Cramer, Weinheim, 668 p.
- KOHLMEYER, J. (1963): Parasitische und epiphytische Pilze auf Meeresalgen. - *Nova Hedwigia* **6**, 127 - 146.
- KOHLMEYER, J. (1968): Marine fungi from the tropics. - *Mycologia* **60**, 252 - 270.
- KOHLMEYER, J. (1969): Deterioration of wood by marine fungi in the deep sea. In: *Materials performance and the deep sea*. - Amer. Soc. Testing and Materials Special techn. Publ. No. **445**, 20 - 30.
- KOHLMEYER, J. (1972): Marine fungi deteriorating chitin of hydrozoa and keratin-like annelid tubes. - *Marine Biology* **12**, 277 - 284.
- KOHLMEYER, J. & E. KOHLMEYER (1963ff.): *Icones Fungorum Maris*. - Verlag J. Cramer, Weinheim 1963 ff.
- KOHLMEYER, J. & E. KOHLMEYER (1971): Marine fungi from tropical America and Africa. - *Mycologia* **63**, 831 - 861.
- KOHLMEYER, J. & E. KOHLMEYER (1979): *Marine Mycology*. - Academic Press, New York, 690 p.
- KOHLMEYER, J. & E. KOHLMEYER (1980): *Marine Mycology, The Higher Fungi*. Academic Press, New York, London, 704 p.
- KOHLMEYER, J. & B. VOLKMANN- KOHLMEYER (1991): Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. - *Botanica Marina* **14**, 1 - 61.
- KREISEL, H. & F. SCHAUER (1987): *Methoden des mykologischen Laboratoriums*. - G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 181 S.
- MORRIS, E.O. (1975): Yeasts from the marine environment. - *J. Appl. Bact.* **38**, 211 - 223.
- NORKRANS, B. (1966a): Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. - *Arch. Mikrobiol.* **54**, 374 - 392.
- NORKRANS, B. (1966b): On the occurrence of yeasts in an estuary of the Swedish westcoast. - *Svensk Botanisk Tidskrift* **60**, 463 - 482.
- POULET, S.A. & P. MARSOT (1978): Chemosensory grazing by marine calanoid copepods (Arthropoda: Crustacea). - *Science* **200**, 1403 - 1405.
- REES, G., JOHNSON, R.G. & E.B.G. JONES (1979): Lignicolous marine fungi from Danish sand dunes. - *Trans. Brit. Myc. Soc.* **72**, 99 - 106.
- RITCHIE, D. (1954): A fungus flora of the sea. - *Science* **120**, 578 - 579.
- ROTH, F.J., AHEARN, D.G., FELL, J.W., MEYERS, S.P. & S.A. MEYER (1962): Ecology and taxonomy of yeasts from various marine substrates. - *Limnol. Oceanogr.* **7**, 178-185.

- ROTH, F.J., ORPURT, P.A. & D.G. AHEARN (1964): Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment. - *Can. J. Bot.* **42**, 375- 383.
- SCHAUMANN, K. (1969): Über marine höhere Pilze von Holzsubstraten der Nordsee-Insel Helgoland. - *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **82**, 307 - 327.
- SCHAUMANN, K. (1993): Marine Pilze. - In: MEYER- REIL, L.-A. & M. KÖSTER (Hrsg.): *Mikrobiologie des Meeresbodens.* - G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 290 S.
- SCHMIDT, I (1974): Untersuchungen über höhere Meerespilze an der Ostseeküste der DDR. Diss. Greifswald 1972. - *Natur und Naturschutz in Mecklenburg* **12**, 1 - 148.
- SIEBURTH, J.M. (1979): *Sea Microbes* (Chapter 20: Yeasts.) - Oxford Univ. Press, New York. 491p.
- SIEPMANN, R. (1959): Ein Beitrag zur saprophytischen Pilzflora des Wattes der Wesermündung. - *Veröff. Inst. Meeresforschung Bremerhaven* **6**, 213 - 297.
- VAN UDEN, N. & FELL, J.W. (1968): Marine yeasts. - In: DROOP, M.R. & J.E. FERGUSON WOOD: *Advances in Microbiology of the Sea.* Academic Press London, New York. 167 - 201.