

Barbara ZIPPEL

Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung

Dilution-Methode - Möglichkeit der Bestimmung von Wachstum und Sterblichkeit durch Grazing in Planktongemeinschaften

Das Prinzip der Untersuchungsmethode besteht in der Veränderung der Nettowachstumsrate in den gegebenen Verdünnungsstufen durch reduzierten Grazingdruck. Die Auswertung der gemessenen Unterschiede erfolgt innerhalb einer definierten Inkubationsdauer (vorwiegend 24 h). Das Prinzip basiert auf dem Modell des exponentiellen Wachstums in Planktongemeinschaften, wobei die beobachtete Nettowachstumsrate r für das Zeitintervall t die Differenz zwischen momentaner Bruttowachstumsrate μ und der Sterblichkeitsrate m ist,

$$r = \ln (P_t/P_0)/t = \mu - m \quad (1)$$

(P_0 , P_t Abundanz der zu untersuchenden Planktonkomponente zu Beginn und Ende der Inkubationsdauer)

Die Sterblichkeitsrate m errechnet sich aus der Beziehung

$$m = F * (D) \quad (2)$$

wobei F die Clearancerate (Wasservolumen, welches pro Grazer und Zeiteinheit beutefrei filtriert wird) ist und (D) die zeitabhängige Grazerdichte (Anzahl der Grazer pro Wasservolumen) bedeutet.

$$(D) = (D_t - D_0)/\ln D_t/D_0 \quad (3)$$

Bei konstanter Bruttowachstums- und Clearancerate variiert die Nettowachstumsrate des Phytoplanktons linear als Funktion der Grazerdichte mit dem Schnittpunkt μ und dem Anstieg $-F$ unter der

Annahme, dass sich die Sterblichkeitsrate durch Grazing entsprechend der Grazerdichte zu Beginn der Inkubation verhält.

$$r = \mu - m_n * (D)/D_{n,0} \quad (4)$$

Ein Berechnungsfehler entsteht, wenn anstatt der auf die natürliche Grazerdichte normalisierte Grazerabundanz $(D)/D_{n,0}$ der Verdünnungsfaktor $D_0/D_{n,0}$ verwendet wird.

Die Untersuchungsmethode kann unter Berücksichtigung der Annahmen

- (i) Wachstum und Sterblichkeit können innerhalb kurzer Zeitintervalle variieren,
- (ii) die mittlere spezifische Wachstumsrate des Phytoplanktons ist unabhängig von der Abundanz, d.h. unbeeinflusst durch die Verdünnung und
- (iii) die durchschnittliche Clearancerate der Grazer ist in allen Verdünnungen konstant,

angewendet werden.

Erweiterungen der Methode wurden von Gallegos (1989) in Bezug auf die funktionelle Beziehung zwischen Grazingrate und Phytoplanktonkonzentration vorgenommen. Dabei erfolgte die Bestimmung der Wachstumsrate des Phytoplanktons in sehr hohen Verdünnungsstufen. Andersen et al. (1991) und Elser & Frees (1995) führten spezielle Untersuchungen zu P- und N-Limitierung durch, wobei sowohl interne und externe Pools als auch Recyclingprozesse berücksichtigt wurden. Evans & Paranjape (1992) führten Untersuchungen in Bezug auf nichtlineares Grazingverhalten durch.

Zum Anwendungsbereich der Methode kann gesagt werden, daß keine einheitlichen und optimalen Vorgaben für die Durchführung von Dilutionexperimenten genannt werden können. Die Verfahrensschritte und verwendete Ausrüstung müssen an die spezielle Problematik angepaßt sein.

Für die Ermittlung der Abundanz bzw. Konzentration des Phytoplanktons können verschiedene Methoden verwendet werden. Die Bestimmung von Chl a gilt als Idealparameter, um die Kontrolle der Verdünnungsverhältnisse vorzunehmen und bietet die Möglichkeit des schnellen Abcheckens der experimentellen Resultate. Die Anwendung von Mikroskopie/Flowcytometrie liefert die zahlenmäßige Unterteilung der Planktongemeinschaft anhand verschiedener Taxa, der Größe, des

morphologischen Charakters und Autofluoreszenzmerkmalen der Organismen.

Vorteile	Nachteile
Möglichkeit der Ratenabschätzung für Wachstum und Sterblichkeit durch Grazing des Phytoplanktons in einem Experiment	beträchtlicher Aufwand für die erfolgreiche Durchführung der Experimente und die Probenauswertung
geringe Beeinflussung der Organismen bzw. minimales „handling“	3 Annahmen der Methode sind routinemäßig schwierig zu testen
simultane Analyse der Dynamik der unterschiedlichen Komponenten der Planktongemeinschaft möglich	Beeinflussung der rel. Wachstumsraten in den Verdünnungsstufen durch Kontamination und NS-Limitation bzw. -Anreicherung
	„threshold“-feeding kann Grazingraten in höheren Verdünnungsstufen verringern
	rel. lange Inkubationszeiten führen ggf. zu unklaren bzw. ungenauen Raten-abschätzungen
	geforderte Abschätzung der mittleren Grazerdichte wird erschwert bzw. unmöglich, wenn sich die unterschiedlichen Kategorien der potentiellen Konsumenten während der Inkubationsdauer ändern

Für die Versuchsdurchführung wird Verdünnungswasser benötigt, welches frei von den zu untersuchenden Planktonkomponenten und frei von Kontaminationen, welche die Wachstums- und Grazingraten positiv (Nährstoffe) bzw. negativ (Inhibitoren) beeinflussen können, sein sollte. Als Filtermaterial werden möglichst große ($\varnothing$ 142 mm) aus Methylcellulose (MC) oder Polycarbonat (PC) mit der Porenweite 0,2 μ m verwendet. Vorteile der MC-Membranen bestehen in der schnelleren Flußrate als PC-Membranen und der geringeren Gefahr der Zellerstörung bzw. des Herauslösens von Kontaminationen aus dem Filter. Wenn sehr große Volumina des Verdünnungswasser benötigt werden, können Filterkapsulen eingesetzt werden. Sie gewährleisten

einen effizienten und sterilen Filtrationsprozeß, sind aber sehr teuer. Das Filtrationssystem sollte aus nichttoxischem Kunststoff bzw. teflonbeschichteten Materialien bestehen. Als Verbindungselemente sollten Schläuche aus Silikon eingesetzt werden. Die Reinigung aller während des Filtrationsprozesses verwendeten Ausrüstungen sollte mit 10% HCl und sorgfältigem Spülen mit dest. Wasser durchgeführt werden.

Beim Herstellen der Verdünnungsstufen wird das unfiltrierte und filtrierte Wasser schonend je nach geforderter Verdünnungsstufe gemischt. Dabei kann das Anmischen der Verdünnungsstufen in großen Vorgefäßen und das Überführen in kleinere Experimentalgefäße erfolgen. Dieser Ablauf liefert eine bessere Reproduzierbarkeit und einfache Anfangsprobenahme und ist notwendig für die Arbeit mit Dialyseschläuchen. Sie bietet allerdings die Gefahr der negativen Beeinflussung fragiler Organismen. Eine zweite Möglichkeit besteht im Einfüllen des Verdünnungswassers in die Experimentalgefäße in Volumeneinheiten entsprechend des Verdünnungslevels. Anschließend erfolgt die Zugabe von frisch geschöpftem Wasser, wobei Blasenbildung zu vermeiden ist. Bei diesem Verfahren ist allerdings die Probenahme zu Beginn des Versuches erschwert.

Zur Berechnung der erforderlichen Parameter ist mindestens eine Probenahme zu Beginn und zum Ende der Inkubationsdauer notwendig. Beprobungen während der Inkubationsdauer sind wünschenswert, wenn hohe Wachstums- und Grazingraten zu erwarten sind bzw. zur Kennzeichnung von Tag-Nacht-Unterschieden. Die Charakterisierung der Anfangssituation (Chla oder Mikroskopie) sollte mindestens 2fach, besser 3fach aus der unverdünnten Probe erfolgen. Generell ist die Präzision ($< 5\%$ SD) der Bestimmungsverfahren von großer Bedeutung für die spätere Auswertung und sichere Interpretation der Ergebnisse. Als Anfangssituation wird die Abundanz in den einzelnen Verdünnungsansätzen bestimmt. Am Ende der Inkubationszeit erfolgt die Beprobung jedes Experimentalgefäßes. Als Kontrolle sollte das Verdünnungswasser mit in die Versuchsdurchführung aufgenommen werden, um evtl. den Filter passierte Organismen in die Abschätzungen miteinbeziehen zu können.

Die Inkubationsgefäße sollten unter annähernd natürlichen Bedingungen inkubiert werden. Optimal ist *in situ* - Inkubation, um sicherzustellen, daß die Versuchsdurchführung unter natürlichen Temperatur- und Lichtverhältnissen in geeigneter Tiefe abläuft. Bei der Verwendung von Dialyseschläuchen bzw. Diffusionskammern sollten diese mit weichen Nylonnetzen geschützt werden.

Bei der Durchführung von Versuchen im Labormaßstab erfolgt die Inkubation im Wasserbad. Dabei ist auf die Simulation der gegebenen Lichtqualitäten und -quantitäten sowie auf die Kontrolle der Wassertemperatur ($\pm 1^\circ\text{C}$) zu achten, um eine Erhöhung oder Verminderung der Wachstums- bzw. Grazingraten zu verhindern. Unter Verwendung der linearen Standardabweichung werden bei der Auswertung die aus den Zählergebnissen der einzelnen Verdünnungsstufen errechneten Wachstumsraten in Diagramme eingetragen. Die daraus ableitbare Bruttowachstumsrate ergibt sich als Schnittpunkt mit der y-Achse. In Tab. 2 sind Situationen geschildert, die zur Beeinflussung der eindeutigen Interpretierbarkeit der Ergebnisse führen.

Störungen	Ergebnis	Gegenmaßnahme
1. Nährstoff-Zugabe	spezif. Wachstumsrate des Phytoplanktons verändert	Inkubation von unverdünnten Proben ohne Zugabe von Nährstoffen
2. unterschiedliche NS-Verfügbarkeiten in hohen Verdünnungsstufen	Anstieg der Regressionslinie erhöht, Grazingrate überschätzt	direkte Versuchsdurchführung in hohen Verdünnungsstufen
3. Kontamination des Verdünnungswassers	Anstieg der Regressionslinie positiv, Grazingrate unterschätzt	Kontrolle des Verdünnungswassers
4. Grazerdichte geht ohne konkrete Bestimmung als unabhängige Variable ein	Unter- bzw. Überschätzung der Grazingraten, wenn sich Grazer während der Inkubation verändern	Grazerdichte bestimmen
5. Sättigung der Ingestionsraten der Konsumenten in Fällen hoher Phytoplanktonabundanz	Grazingrate unterschätzt	direkte Versuchsdurchführung in hohen Verdünnungsstufen

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Dilutionmethode trotz der vorausgesetzten Annahmen und des vorhandenen Potentials von Fehlinterpretationen Informationen über die Dynamik der gesamten

Phytoplanktongemeinschaft liefern kann. Selektiv metabolische Inhibitoren können die Wachstums- und Grazingraten von prokaryotischen Populationen trennen, haben aber eine begrenzte Aussagekraft für die Auflösung der Beziehung zwischen eukaryotischem Phytoplankton und deren Konsumenten.

Die Dilutionmethode erweist sich als weniger sensitiv, wenn geringe Zelldichten vorliegen.

Die Untersuchung des Grazingverhaltens einzelner Taxa oder die Abschätzung der Raten in kleinen Zeitintervallen ist nicht möglich. Hierbei sollte die FLA/FLB-Technik zur Anwendung kommen, die ihrerseits wiederum unpraktikabel ist für routinemäßige Messungen auf dem „community level“.

Im Bezug auf Primärproduktionsmessungen stellt die Dilutionmethode keine Alternative dar. Sie ist als Ergänzung zu anderen Methoden mit dem Ziel einer möglichen Verifizierung von Ergebnissen bzw. erhöhtem Erkenntnisgewinn zu sehen.

Die Methodendarstellung wurde in Anlehnung an Landry (1993) erstellt.

Literatur

- ANDERSEN, T.; SCHARTAU, A. K. L. & PAASCHE, E. (1991): Quantifying external and internal nitrogen and phosphorus pools, as well as nitrogen and phosphorus supplied through remineralization in coastal marine plankton by means of a dilution technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*: 69, 67-89
- ELSER, J. J. & FREES, D. L. (1995): Microconsumer grazing and sources of limiting nutrients for phytoplankton growth: Application and complications of a nutrient-deletion/dilution-gradient technique. *Limnol. Oceanogr.* 40(1), 1-16
- EVANS, G. T. & PARANJPE, M. A. (1992): Precision of estimates of phytoplankton growth and microzooplankton grazing when the functional response of grazers may be nonlinear. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*: 80, 285-290
- GALLEGOS, C. L. (1989): Microzooplankton grazing on phytoplankton in the Rhode River, Maryland: nonlinear feeding kinetics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*: 57, 23-41
- LANDRY, M. R. (1993): Estimating rates of growth and grazing mortality of phytoplankton by the dilution method. In: Kemp, P. F.; Sherr, B. F.; Sherr, E. B. & Cole, J. J. (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis publishers, Boca Raton, 715-722

Verfasser

Barbara Zippel
Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Gewässerforschung Magdeburg
Am Biederitzer Busch 12
39114 Magdeburg