

Abschlussbericht

Anschubprojekt: „ProCycle – Die Rolle der Protisten im Phosphorkreislauf von Biokrusten“

Zuwendungsempfänger:	Universität Rostock
Kooperationspartner:	Institut für Ostseeforschung Warnemünde
Vorhabensbezeichnung:	Anschubprojekt
Laufzeit des Vorhabens:	01.10.2019-31.12.2020
Autoren:	Dr. Martin Albrecht, Dr. Karin Glaser

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	
2 Einleitung und Ziele des Projektes	
3 Material und Methoden	
4 Ergebnisse & Diskussion	
5 weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt	
6 Literaturverzeichnis	
Danksagung	

1. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Rolle der Protisten in biologischen Bodenkrusten allgemein und im Stoffkreislauf von P ist bisher sehr wenig beachtet und untersucht worden. In anderen Habitaten und Gemeinschaften, etwa im Plankton und in der Rhizosphäre, ist die herausragende Rolle der Protisten und damit des microbial loop bekannt. Deshalb hat sich dieses Anschubprojekt zum Ziel gesetzt, ein vereinfachtes Modellsystem hinsichtlich des P-Kreislaufes zu untersuchen mit 3 der wichtigsten Komponenten einer Biokruste: Protisten, Bakterien und Algen.

Es wurden verschiedene Organismen auf ihre Eignung (Größe, Wachstum, Zählbarkeit, etc.) getestet und gute Kandidaten identifiziert, die in verschiedenen Kombinationen in P-verarmtem Medium angezogen wurden. Zu Beginn und Ende des Experiments wurden Proben für die P-Analytik gezogen und zweitägig auch Proben für Zellbestimmungen aller drei Organismen.

Die Ergebnisse für P zeigten, dass in Anwesenheit des Protisten mehr molbydatreaktives Phosphat vorhanden war als ohne Protisten. Die Zellzahlen belegen, dass der Protist die angebotenen Bakterien aufgenommen und verdaut hat. Jedoch ist durch die nur zwei Zeitpunkte der P-Probennahme nicht ersichtlich, ob das Mehr an P aus einer aktiven Freisetzung oder aus dem Absterben der Protisten resultiert.

Die Vor- und Hauptexperimente der Anschubprojektphase haben gezeigt, dass der Aufbau prinzipiell funktioniert. Verschiedene Optimierungsmöglichkeiten konnten identifiziert werden. Die Organismenauswahl wurde bereits im Rahmen des Anschubprojektes optimiert, bedarf aber weiterer Tests mit widerstandfähigeren Protisten. In einem nächsten Schritt sollen daher Amöben aus biologischen Bodenkrusten genutzt werden auch wenn diese sich schlecht oder gar nicht quantifizieren lassen. Ebenso ist geplant, das Modellsystem vom aquatischen ins terrestrische Milieu zu übertragen mit sterilisiertem Dünsand, der, ebenso wie hier, mit verschiedenen Komponenten der Biokruste beimpft werden soll.

Die Corona-Pandemie hat auch dem Verlauf des Anschubprojektes geschadet, weil wichtige Experimente kurz vor Beendigung der Laborarbeiten abgebrochen werden mussten und wegen fehlender Personalkraft in diesem Umfang nicht wiederholt werden konnten. Dennoch konnten wichtige Erkenntnisse in diesem Anschubprojekt gewonnen werden, die uns darin bestärken, die Rolle der Protisten im P-(Re)cycling in biologischen Bodenkrusten weiterzuverfolgen.

2. Einleitung und Ziele des Projektes

Biologische Bodenkrusten sind eine Gemeinschaft vieler verschiedener Organismengruppen wie Algen, Pilze, Bakterien oder auch Protisten und stellen die dominante Vegetationsform in Habitaten dar, wo höhere Pflanzen nicht wachsen können (Belnap et al. 2001). Biologische Bodenkrusten kommen nicht nur an klimatischen Extremstandorten wie Wüsten und polaren Gebieten vor, sondern sind auch im gemäßigten Klima zu finden, z.B. an Störstellen in Wäldern oder auf Sanddünen der Küsten (Schulz et al. 2016; Baumann et al. 2017; Glaser et al. 2018). Bodenkrusten bilden an der Oberfläche und in den ersten Millimetern des Bodens eine äußerst diverse, hoch produktive und belebte Schicht, die Bodenpartikel bindet, weshalb sie als „Haut der Erde“ bezeichnet werden (Belnap et al. 2001). Die Bodenkrustengemeinschaft hat ökologisch positive Effekte, denn sie stabilisiert die Böden und verhindert so Erosion, erhöht den Stoffumsatz und reichert Nährstoffe wie Phosphat sowie organische Substanz an und verbessert die Wasserhaltekapazität (Belnap and Büdel 2016; Baumann et al. 2017). Dünen profitieren wegen ihres Sediment-Charakters - loser Sand ohne Organik mit besonders schlechter Wasserhaltekapazität und kleinen Phosphorpoolen – besonders stark davon (Schulz et al. 2016). Das Vorkommen und die Zusammensetzung der phototrophen Gemeinschaft sowie der Phosphorpoolen wurden in den sandigen Dünen entlang der Ostseeküste in zwei aktuellen Arbeiten beschrieben und bieten eine fundierte Grundlage für weitere Forschungen (Schulz et al. 2016; Mikhailyuk et al. 2019). Bei der Betrachtung der Phosphorkreisläufe von Bodenkrusten wurden Protisten aufgrund methodischer Probleme bisher gar nicht berücksichtigt. Protisten sind einzellige Eukaryoten wie Ciliaten (z.B. Pantoffeltierchen) oder Amöben, die sich von Bakterien und anderen Mikroorganismen ernähren. Protisten tragen maßgeblich zum sogenannten Microbial Loop (Azam et al. 1983; Clarholm 1985) bei, indem sie Bakterien und kleinere Algen fressen und pflanzenverfügbare Nährstoffe, wie Phosphat, wieder ausscheiden und so die Vorräte an verfügbaren Nährstoffen in den besiedelten Substraten oder Böden erhöhen (Abb. 1). In einer laufenden Arbeit konnten die Diversität der Protisten erfasst und Isolate gewonnen werden, mit denen die Rolle der Protisten in der P-Freisetzung durch Laborexperimente dargestellt werden kann (Khanipour Roshan et al. 2020). Protisten sind für die Pflanzenentwicklung essentiell, weil sie diese mit dem freigesetzten anorganischen P „düngen“. In Bodenkrusten ist die Rolle der Protisten im P-Kreislauf jedoch völlig unbekannt.

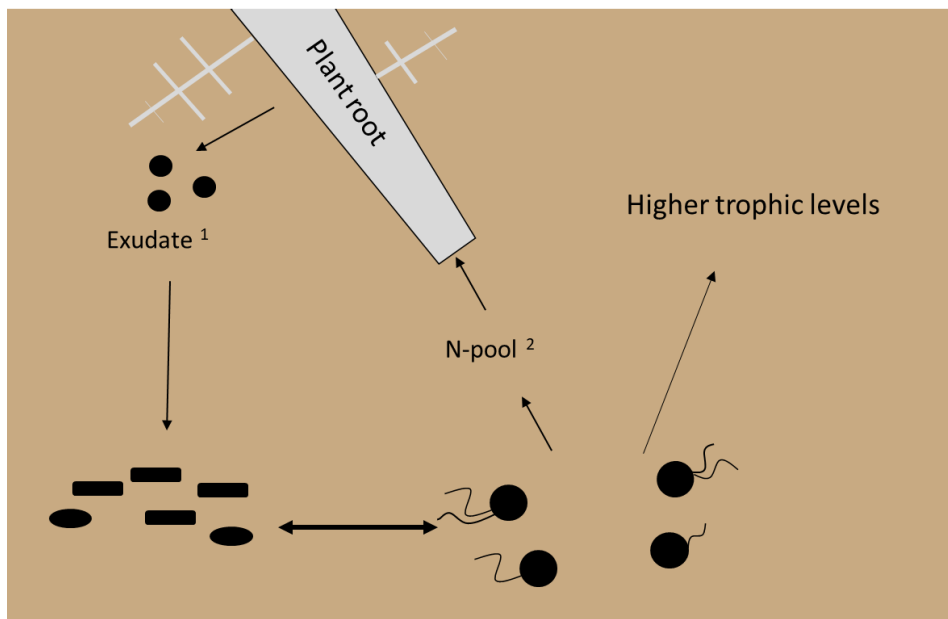


Abb. 1 Schematische Darstellung des Microbial Loop im Boden an der Rhizosphäre

In diesem Projekt soll erstmalig der Einfluss von Bodenkrusten-Protisten auf krustenbildende Algen in P-limitierten Dünen untersucht werden. Das Wachstum von Algen, die für Protisten wegen ihrer Größe keine Nahrung darstellen, wird mit und ohne Protisten bestimmt. Das Microbial Loop soll im Labor mit den repräsentativsten Vertretern der Protisten, Bakterien (als Protistennahrung) und Bodenalgen (Wachstum als Ergebnis des Düngens) stark vereinfacht nachgebildet werden. Zur Beschreibung der P-Flüsse werden die anorganischen und organischen P-Pools bestimmt. Das Ziel ist, den P-Fluss zwischen Bakterien, Algen und Protisten abzuleiten und grundsätzliche mechanistische Konzepte zu den biogeochemischen P-Umsetzungsprozessen in Bodenkrusten weltweit zu entwickeln.

3. Material und Methoden

Vorversuche

In Vorversuchen wurden verschiedene Kombinationen von Organismen getestet auf ihre wichtigsten Anforderungen. Die Übersicht über Anforderungen, Probleme, die getroffene Vorauswahl von Modellorganismen und finale Auswahl sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Übersicht Organismenauswahl

Organismus	Anforderung	Vorauswahl	Problem	Finale Auswahl
		Amöben		<i>Tetrahymena</i>
Protist	- Bakterien fressen - Algen nicht fressen - freischwimmend - aus Boden/Sand	x ? - x	- Nicht zählbar - unklarer Zugang zu Bakterien	x x x -
		<i>Pseudomonas & Bacillus</i>		
Bakterien	- nicht pathogen - aus Boden - fressbar	x x x	-	-
		<i>Chlorella</i>		<i>Interfilum</i>
Alge	- einzellig (zählbar) - nicht fressbar - aus Boden - bakterienfreie Kultivierung	x - - x	- von <i>Tetrahymena</i> gefressen	x x x x

Darüber hinaus wurden der Phosphatgehalt im P-verarmtem Medium, sowie Methoden zum Waschen der Organismen aus P-haltigen Medien getestet. Das P-verarmte Medium (BG-11 – P) enthielt weniger molybdatreaktives Phosphat (MRP) als mit der Molybdatblau-Methode nachweisbar war (Nachweisgrenze hier: 0,1 $\mu\text{mol Phosphat l}^{-1}$).

Die Organismen aus P-haltigen Medien wurden in zwei aufeinander folgenden Waschschrritten jeweils vorsichtig in einer zentrifugiert (Protisten: 550 g, 10 Min.; Bakterien & Algen: 5.000 g, 10 Minuten; MegaFuge, Haereus), der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet in frischem P-verarmtem Medium aufgenommen.

Tabelle 2 Stämme und Medien

Organismus	Spezies/Stamm	Medium
Protist	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	PPY (CCAP)
Bakterien	<i>Pseudomonas</i> DSM	DSMZ 1
	<i>Bacillus</i> DSM	DSMZ 1
Alge	<i>Interfilum paradoxum</i> SAG 4.85	BG-11 (Rippka and Herdman 1992)

Hauptexperiment

Aus Zeitgründen wurde das Hauptexperiment reduziert und nur *Pseudomonas* im Experiment verwendet, weil *Bacillus* zum Teil schlecht/langsam bzw. gar nicht angewachsen ist und die Hauptaussage des Experiments trotzdem verdeutlicht werden kann.

Es wurde von allen Organismen unter optimalen Bedingungen (20 °C, 40 µmol Photonen cm⁻² s⁻¹, 16:8 hell:dunkel, volle Nährstoffversorgung) Biomasse angezogen. Die Algen für 14 Tage, Protisten 5 Tage und Bakterien 3 Tage. Die Algen wurden vor dem Experiment für weitere 7 Tage in P-verarmtem BG-11 inkubiert, um durch ihr Wachstum Spuren von MRP im Medium aufzunehmen und eigene P-Reserven anzugreifen.

Die so vorbereiteten Organismen wurden vor Experimentbeginn durch vorsichtige Zentrifugation aufkonzentriert, dann gewaschen wie oben beschrieben, in jeweils 50 ml P-armes Medium resuspendiert und dann mit immer gleichen Volumina (Protist je 25 ml, Bakterien je 50 ml, Alge je 50 ml) in die Experimentiergefäße gegeben. Das Experiment wurde in 500 ml Zellkulturflaschen (Greiner BioOne) angesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 350 ml mit P-armem Medium aufgefüllt, anschließend bei den zuvor genannten Kulturbedingungen für 15 Tage gehältert.

Alle zwei Tage wurden 2 x 2 ml Probe für Zellzählungen entnommen und in Lugolscher Lösung fixiert. Vor der Entnahme der Proben wurden die Zellkulturflaschen vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Zellsuspension zu erhalten. Die Zellen wurden anschließend in Sedimentierkammern (Protist & Alge) bzw. Blutzählkammern (Bakterium) unter dem Mikroskop ausgezählt.

Am Anfang und Ende des Experiments wurden je 35 ml Probe entnommen für direkte Phosphatmessungen und weitere 25 ml für Gesamtphosphataufschlüsse mit basischer Persulfatreagenz (90 °C, 24 h, Teflongefäße) nach Berthold et al. (2015). Es wurde stets in Duplikaten gemessen.

4. Ergebnisse & Diskussion

Die Ansätze gliedern sich im Folgenden nach diesen Abkürzungen für einzelnen Ansätze: T+P (*Tetrahymena* + *Pseudomonas*), P+I (*Pseudomonas* + *Interfilum*) und T+P+I (*Tetrahymena* + *Pseudomonas* + *Interfilum*).

Die **Zellzahlen** (Abb. 3) verlief bei *Pseudomonas* wie vermutet mit einer schnellen und nachhaltigen Abnahme. Bei *Tetrahymena* nahm die Zellzahl zunächst schnell zu, gefolgt einer Abflachung der Kurve auf ein Plateau, sowie einem Abfall der Zellzahl nach einigen Tagen. Auch die Alge *Interfilum* zeigte den erwarteten Verlauf mit einigen Tagen lag-Phase. Das Wachstum von *Interfilum* war jedoch kaum messbar, weil es eine langsam wachsende Alge ist, die eine noch längere Inkubationszeit gebraucht hätte. Deshalb sind in den beiden Ansätzen mit der Alge keine belastbaren Unterschiede zu finden auch wenn die Zellzahl im Ansatz ohne Protist etwas höher liegt als mit dem Protisten. Die MRP-Werte sprechen jedoch dafür, dass es sich nicht um einen P-Effekt handelt, sondern andere Faktoren eine Rolle spielen. Weitere Nährstoffe sollten in dem Medium nicht gefehlt haben, dennoch ist ein P-Limitationseffekt in unserem Ansatz nicht nachweisbar. Dazu wäre ein nachgeschaltetes Experiment nötig, in dem die Zellkulturflaschen mit P-haltigem Medium aufgefüllt und über einen gleich langen Zeitraum wie das Experiment mit demselben Regime beprobt werden.

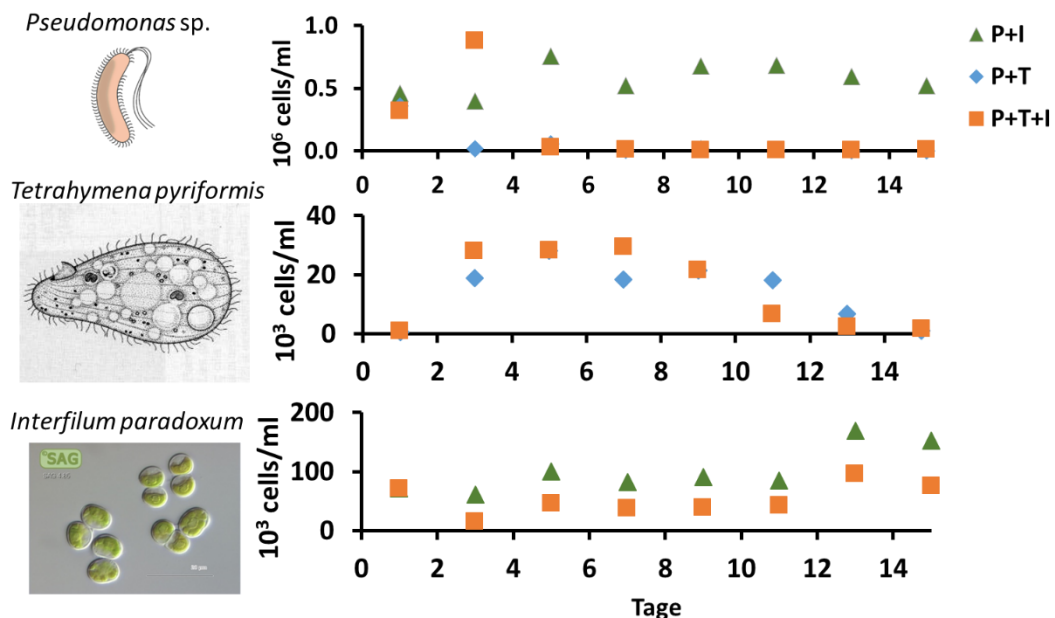


Abb. 3 Zellzahlen im Experimentverlauf

Schlussfolgerungen für Folgeexperimente:

- **Parallele Kontrolle oder post-experimentale Kontrolle mit P-haltigem Medium**
- **Inkubationszeitraum verlängern für messbares Algenwachstum abhängig vom P-Gehalt im Medium**
- **Bei längerer Inkubation: weitere Bakterienzugaben testen, um Protisten lebendig zu halten**

Im **Gesamtphosphorgehalt (TP)** der Proben ist ein Anstieg über die Inkubationszeit zu erkennen (Abb. 2 oben), der bis zum Vierfachen des Ausgangsgehaltes ansteigt. Das ist insofern überraschend, als dass die erste Messung zum Start bereits alle Komponenten enthielt, die auch bei letzten Messung vorhanden waren. Da die TP-Proben vom Start zunächst eingefroren wurden und dann nach Experimentende zusammen mit den Endproben aufgeschossen und gemessen wurden, sind der Aufschluss und die Messung als entscheidende Faktoren auszuschließen. Da es nur die beiden Zeitpunkte gibt, ist fraglich, ob P mit der Zeit in das Medium gelangt ist, z.B. aus den Zellkulturflaschen herausgelöst wurde oder aber durch die zweitäglichen Probennahmen eingetragen wurde. Reaktionen mit den im Medium vorhandenen zahlreichen Eisenverbindungen sind ebenfalls nicht auszuschließen. Interessanterweise ist aber der Ansatz ohne den Protisten (P+I) weit weniger davon betroffen als die anderen beiden. Es könnte also ein Effekt der Protisten sein, der darauf beruhen könnte, dass die Protisten organisches oder stark gebundenes P durch Verdauung der Bakterien verfügbar gemacht haben, das nicht durch das basische Persulfat aufgeschlossen werden konnte. Dahingehend muss die Aufschlussmethode noch einmal mit stärkeren Aufschlüssen (z.B. H_2SO_4) überprüft werden. Es wäre auch möglich, dass der Aufschluss der ersten Proben durch den pH-Puffer im Nährmedium behindert wurde und die Pufferwirkung am Ende der Inkubation weniger stark war.

Daraus ergeben sich folgende **Schlussfolgerungen** für Folgeexperimente:

- **Zusätzliche P-Messungen während der Inkubation**
- **Test der Aufschlussmethode in frischem Nährmedium mit zugegebenem Standard (Diphenyl-Phosphat)**
- **Ggf. ein anderes Nährmedium mit weniger Eisenverbindungen**

Das **molybdatreaktive P** zeigt den gleichen Trend wie TP. Im Vergleich zum Startpunkt sind die Konzentrationen viel höher am Endpunkt (Abb. 2 unten), wieder mit dem Bakterien-Algen-Ansatz mit dem geringsten Anstieg. Das bestätigte unsere Hypothese, dass die Protisten die Bakterien aufnehmen, verdauen und leicht verfügbare P-Verbindungen ausscheiden. Jedoch ist *Tetrahymena* ein empfindlicher Organismus, der bei leichter physikalischer oder chemischer Belastung, sowie beim Absterben aufplatzt und seinen Zellinhalt ins Medium freisetzt. Es ist damit nicht klar zu differenzieren, welchen Anteil am MRP die Protisten aktiv ausgeschieden haben und welcher Anteil durch das Sterben der Zellen ins Medium gelangt ist. Im Gegensatz zu anderen Protisten, wie etwa Amöben, bildet *Tetrahymena* keine Dauerstadien, in denen das aufgenommene P auch über längere Zeit gespeichert werden kann.

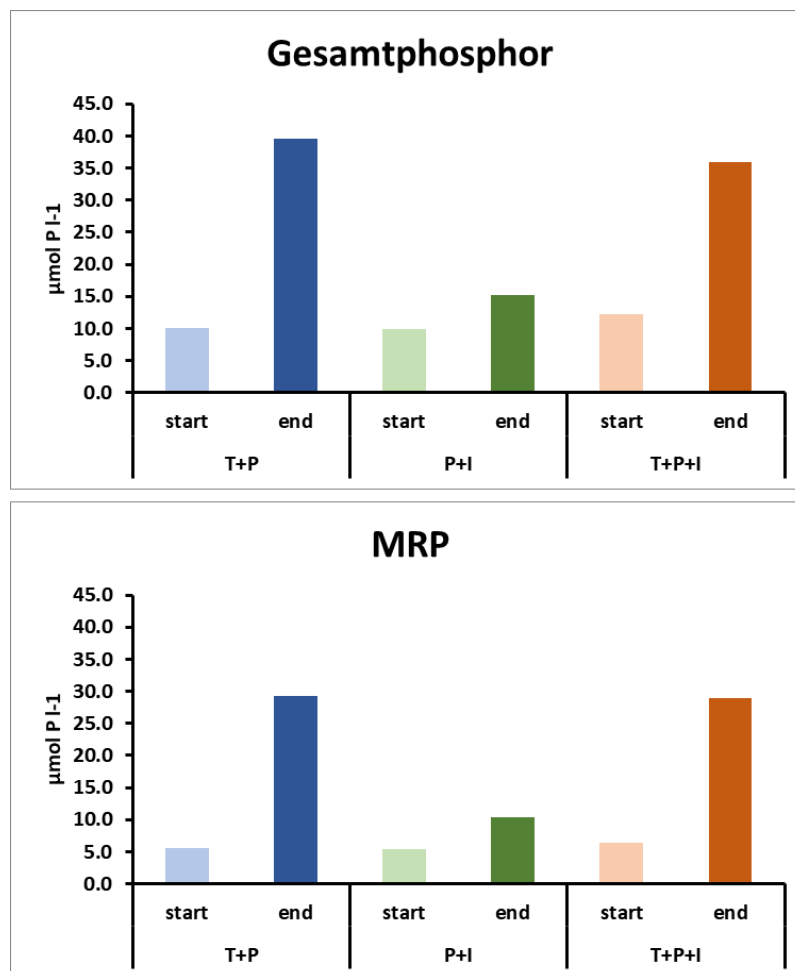


Abb. 2 Gehalte an Gesamtphosphor und molybdatreaktiven Phosphat (MRP) zu Beginn und am Ende des Experiments (Dauer 15 Tage). T – *Tetrahymena* (Protists), P – *Pseudomonas* (Bakterium), I – *Interfilum* (Alge)

Das Verhältnis von MRP zu TP verschiebt sich von anfangs 51-54 % in allen Ansätzen zu 74 % (T+P), 67 % (P+I) und 80 % (T+P+I). In allen Ansätzen wird also der Anteil an MRP größer, was durch das Absterben der Bakterien (P+I) und der Frassaktivität der Protisten (T+P, T+P+I) erzeugt worden sein kann. Es demnach auch Effekte ohne die Anwesenheit von Protisten, sie fallen jedoch deutlich geringer aus.

Schlussfolgerung für Folgeexperimente:

- **Anderer Protist mit Dauerstadienbildung nötig**
- **Prinzipieller Experimentaufbau funktioniert**

5. weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt

- keine

6. Literaturverzeichnis

- Azam F, Fenchel T, Field J, et al (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Baumann K, Glaser K, Mutz JE, et al (2017) Biological soil crusts of temperate forests: Their role in P cycling. *Soil Biol Biochem* 109:156–166. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.02.011>
- Belnap J, Büdel B (2016) Biological Soil Crusts as Soil Stabilizers. In: Weber B, Büdel B, Belnap J (eds) *Biological Soil Crusts: An organizing Principle in Drylands*. Springer, Cham, pp 305–320
- Belnap J, Büdel B, Lange OL (2001) Biological soil crusts: structure, function, and management 1 *Biological Soil Crusts: Characteristics and Distribution*. Springer 150:3–30
- Berthold M, Zimmer D, Schumann R (2015) A simplified method for total phosphorus digestion with potassium persulphate at sub-boiling temperatures in different environmental samples. *Rostocker Meeresbiologische Beiträge* 25:7–25
- Clarholm M (1985) Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol Biochem* 17:181–187. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90113-0)
- Glaser K, Baumann K, Leinweber P, et al (2018) Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences* 15:4181–4192. <https://doi.org/10.5194/bg-15-4181-2018>
- Khanipour Roshan S, Dumack K, Bonkowski M, et al (2020) Stramenopiles and Cercozoa dominate the heterotrophic protist community of biological soil crusts irrespective of edaphic factors. *Pedobiologia (Jena)* 83:150673. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2020.150673>
- Mikhailyuk T, Glaser K, Tsarenko P, et al (2019) Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur J Phycol* 54:263–290. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1557257>
- Rippka R, Herdman M (1992) Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains in Axenic Culture. In: *Institute Pasteur*. Paris, France, p 103pp
- Schulz K, Mikhailyuk T, Dreßler M, et al (2016) Biological Soil Crusts from Coastal Dunes at the Baltic Sea: Cyanobacterial and Algal Biodiversity and Related Soil Properties. *Microb Ecol* 71:178–193. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0691-7>

Danksagung

Wir danken dem Leibniz Wissenschaftscampus Phosphorforschung die Bereitstellung der Mittel für dieses Anschubprojekt, dem Lehrstuhl Angewandte Ökologie & Phykologie für die Ergänzung der Mittel für Personal und Material, sowie die Nutzung aller Labore. Des Weiteren danken wir Prof. Labrenz für seine sehr aktive fachliche und materielle Unterstützung, sowie Prof. Leinweber für fachlichen Input.

In der praktischen Laborarbeit gilt unser besonderer Dank Luisa Dragunsky, Andrei Savin und Simon Müller.

Vielen Dank auch an Dana Zimmer und Maxi Hoche für ihre Unterstützung in allen formalen und Verwaltungsbelangen.