

Abschlussbericht

Phosphatases – Development of new quantitative assays along terrestrial-aquatic gradients

Iris Schaub

Betreuer:	Prof. Dr. Ulf Karsten PD Dr. Rhena Schumann PD Dr. Christel Baum Dr. Monika Nausch
Einrichtungen:	Universität Rostock Leibniz Institute für Ostseeforschung Warnemünde (IOW)
Laufzeit Förderung:	01.04.2015 – 30.06.2018
Datum der Abgabe:	Geplante Abgabe: Erstes Quartal 2019
Datum der Verteidigung:	
Datum der Anerkennung:	

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	1
2 Einleitung und Ziele der Promotion	1
3 Material und Methoden	3
4 Ergebnisse und Diskussion	6
6 Literaturverzeichnis	9
Anhang	12

1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Phosphatasen (P_{asen}) sind Schlüsselenzyme in der aquatischen Umwelt, mit denen Mikroalgen und Bakterien den gelösten organischen Phosphor (DOP) Pool nutzbar machen. Reguliert wird die P_{ase} -Produktion durch die externe Phosphatkonzentration (P_i). In der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Rolle der Phosphataseaktivität (PA) in aquatischen und terrestrischen Habitaten untersucht und deren Indikatorfunktion als Phosphor (P) Limitationsparameter bewertet werden. Zum ersten Mal wurde die Michaeliskonstante (K_M) als potenzieller Indikatorwert betrachtet und die Rolle der Phosphataseaktivität in biologischen Bodenkrusten (BSC) einer Küstendüne untersucht.

Da die P_{asen} von unterschiedlichen Organismen produziert und über vielfältige Mechanismen in das wässrige Milieu gelangen, war die Bestimmung des Ursprungs der PA und die Suche nach einem Referenzparameter, um die PA unterschiedlicher Gewässer zu normieren und vergleichen zu können, nur teilweise erfolgreich. Von den getesteten Referenzparameter erwies sich nur das partikuläre organische Material (POM) als geeignet. Die Ergebnisse zeigten, dass der K_M kein geeigneter Parameter für die Bewertung einer P Limitation ist. Vergleiche zwischen der PA und anderen P Limitationsparametern ergaben ebenfalls keine einheitlichen Abhängigkeiten. Von der Nutzung der PA als alleiniger Parameter zur Bestimmung einer möglichen P Limitation muss damit abgeraten werden. Die PA war in der untersuchten BSC sehr gering, da das Wachstum der Mikroalgenegemeinschaft Wasser- und dann Stickstofflimitiert war. Generell konnten in der BSC, im Vergleich zum ansonsten sehr nährstoffarmen Dünen sand, eine Nährstoffakkumulation festgestellt werden. Die Verteilung von verschiedenen Sukzessionsstadien der BSC hing zudem von der Exposition zum Windstress ab.

2 Einleitung und Ziele der Promotion

Phosphor ist für jeden Organismus ein lebensnotwendiges Element. Neben dem P_i , ist der DOP Pool die zweit wichtigste P Quelle für mikrobielle- und Phytoplanktongemeinschaften (Karl and Björkman 2002; Paytan and McLaughlin 2007). Der Abbau des DOP Pools erfolgt über hydrolytische Enzyme, d.h. verschiedene P_{asen} , wodurch P_i und niedermolekulare organische Moleküle freigesetzt werden. Damit spielen P_{asen} eine bedeutende Rolle im globalen Phosphorkreislauf. Die häufigsten vorkommenden P_{asen} sind die alkalinen Phosphomonoesterasen ($AlkP_{ase}$), die Phosphodiesterasen und die 5'-P-Nukleotidasen (Hoppe 2003). Die $AlkP_{asen}$ besitzen eine recht breite Spezifität, d.h. sie können eine Vielzahl an verschiedenen DOP Substraten spalten (Cembella et al. 1984a). Für Mikroorganismen ist diese Enzymeigenschaft für die Nutzung von externen DOP Quellen sehr wichtig, da auch die DOP Verbindungen divers in ihrer Struktur sind. P_{asen} werden von Bakterien (Martinez et al. 1996), Cyanobakterien (Whitton et al. 1991; Lin et al. 2018) und Mikroalgen (Kuenzler and Perras 1965; Fitzgerald and Nelson 1966; Hoppe 1986) unter Phosphatmangel Bedingungen

synthetisiert (Xu et al. 2010; Lin et al. 2018) und entweder an die Zellwand gebunden (Partikel assoziierte $P_{asen} = PP_{asen}$) oder in die Umgebung abgegeben (gelöste $P_{asen} = DP_{asen}$). Natürlich besitzen Mikroorganismen auch intrazelluläre P_{asen} , welche jedoch eher allgemeine katabolische Funktionen haben (Cooper et al. 1974; Cembella et al. 1984a). Intrazelluläre P_{asen} werden unabhängig von einem P Mangel der Zelle gebildet und gehören damit zu den konstitutiven Enzymen. Im Gegensatz dazu wird die Synthese extrazellulären P_{asen} durch eine ausreichende Phosphatversorgung repressiert (Repression = Transkription der P_{asen} -Gene wird gehemmt) und durch einen P Mangel derepressiert (Repression eines Gens wird aufgehoben), was diese zu regulierbaren Enzymen macht (Degerholm et al. 2006; Lin et al. 2018). Damit sollte die alkaline Phosphataseaktivität (AlkPA) den P Status der mikrobiellen- und Phytoplanktongemeinschaft widerspiegeln können. Jedoch haben die Methoden zur Enzymaktivitätsmessung mehrere Nachteile, welche die Indikatorfunktion der AlkPA stark beeinträchtigen (Cembella et al. 1984b; Jansson et al. 1988).

Die Aktivität der $AlkP_{asen}$ kann durch zwei Parameter beschrieben werden. Durch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max} ; Einheit: $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$) und der Michaeliskonstante (K_M ; Einheit: mol l^{-1}). Die Reaktionsgeschwindigkeit (V) entspricht der Stoffmenge eines Substrats, welche in einem bestimmten Reaktionsvolumen pro Zeiteinheit von den Enzymen umgesetzt wird. Der K_M entspricht der Substratkonzentration, bei der die Hälfte von V_{max} erreicht ist. Ist dieser Wert sehr klein, d.h. schon bei geringen Substratkonzentrationen wird eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, ist die Affinität des Enzyms zu dem vorhandenen Substrat sehr hoch. Bei hohen K_M Werten ist die Affinität des Enzyms zu dem Substrat gering. Mithilfe der Michaeliskonstante kann somit eine Aussage über die Affinität des Enzyms zu dem vorhandenen Substrat getroffen werden (Jansson et al. 1988).

Das Hauptziel der Dissertation bestand in der Neubewertung der Parameter der AlkPA als Indikator einer P Limitation in natürlichen Phytoplanktongemeinschaften. Zum ersten Mal sollte hierfür auch die Michaeliskonstante als dafür möglicherweise hilfreichen Parameter untersucht werden. Des Weiteren sollte die Rolle der AlkPA in aquatischen und terrestrischen Algengemeinschaften untersucht werden. Es wurden 3 Hauptfragen definiert und bearbeitet, welche mithilfe von 3 aquatischen und einem terrestrischen Habitat beantwortet werden sollten:

- 1) Welcher Biomasseparameter spiegelt am besten die P_{ase} produzierende Planktongemeinschaft wieder und kann ein gemeinsamer Referenzparameter für sehr unterschiedliche Gewässer gefunden werden?

Um die PA unterschiedlicher Gewässer miteinander vergleichen zu können, bedarf es eines Referenzparameters, um die PA auf die P_{ase} produzierende Gemeinschaft zu normieren. Da P_{ase} nicht nur von den Organismen von Interesse, d.h. von Phytoplankter unter P Mangel produziert werden, sondern auch von anderen Organismen wie Bakterien, Zooplanktern und Protozoen, wurde ein Referenzparameter gesucht, der die P_{ase} -produzierende Planktongemeinschaft am besten widerspiegelt.

- 2) Wie ist die Michaeliskonstante, welche innerhalb einer Enzymmessung bestimmt wird, zusammengesetzt und kann der K_M als Parameter für eine P Limitation genutzt werden?

Der K_M wurde bisher nur selten zur Bewertung des P Status von Phytoplanktongemeinschaften gemessen und interpretiert (Jansson et al. 1988; Hoppe 2003). Da $AlkP_{asen}$ ein eher breites Substratspektrum besitzen, sollte der K_M verhältnismäßig höher ausfallen als von hoch spezifischen Enzymen. Möglicherweise findet jedoch trotzdem, wie von Pettersson (1980) vermutet, unter P Mangelsituationen eine Anpassung zu effizienteren $AlkP_{asen}$ mit niedrigeren K_M Werten statt. Um diesen Sachverhalt aufzuklären wurde die Beziehung zwischen dem K_M und diversen anderen P Limitationsparametern untersucht. Zusätzlich wurde die Problematik der Interpretierbarkeit der gemessenen K_M -Werte bearbeitet. Bei den genutzten Methoden zur Bestimmung der $AlkPA$ wird ein artifizielles Substrat zu einer Umweltprobe gegeben und von den vorhandenen $AlkP_{asen}$ in der Probe gespalten. Dabei wird nicht nur die Aktivität eines einzelnen Enzyms, sondern vielmehr die Aktivität eines Enzymgemischs mit Enzymen unterschiedlicher Herkunft, gemessen. Damit ist die Nutzung des K_M als Affinitätsparameter theoretisch falsch. Mittels ausgewählter Methoden sollte die Aussagekraft des K_M ermittelt werden.

- 3) Sind die P Limitationsgrenzwerte aus der Literatur auf unterschiedliche Gewässer übertragbar und welche Aussagen über den P Status von natürlichen Phytoplanktongemeinschaften können mit dem V_{max} getroffen werden?

Es wurden verschiedene Schwellenwerte von verschiedenen Autoren erarbeitet mit dem Ziel, eine PA, die aufgrund anderer Organismen wie Zooplanktern und Protozoen ins Gewässer gelangen und nicht auf einem P Mangel der Phytoplanktongemeinschaft beruht, von einer PA, die eine mittlere oder schwere P Limitation des Phytoplanktons anzeigt, zu unterscheiden (Gage und Gorham 1985, Healey and Hendzel 1979a, Pettersson 1980). Diese erarbeiteten Schwellenwerten beruhen teilweise auf Monokulturen, aber auch Freilandproben. Die Übertragbarkeit dieser Schwellenwerte auf andere Gewässer sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Zusätzlich sollte die Indikatorfunktion des V_{max} mithilfe anderer P Limitationsanzeiger neu beurteilt werden.

3 Material und Methoden

Um einen geeigneten Referenzparameter zu finden, der die P_{ase} produzierende Gemeinschaft am besten widerspiegelt, wurden drei sehr unterschiedliche Gewässer in Bezug auf Gewässertyp, Salinität, Trophiestatus und Phytoplanktonzusammensetzung ausgewählt. Zum einen die Küste der brackigen Ostsee innerhalb der Mecklenburger Bucht (Standort Heiligendamm, Seebrücke), die Warnow als Süßwasserfluss (Standort Rostock am Mühlendammwehr) und eine brackige Lagune, die Darß-Zingster Boddenkette (Standort Zingster Strom) (Abb. 1). Die 3 Gewässer wurden über eine gesamte Jahresperiodik hinweg geprobt (Jan. – Dez. 2016) und in Hinblick auf die $AlkPA$, sowie verschiedenen

Biomasseparametern und Nährstoffkonzentrationen untersucht. Die abiotischen Parameter Temperatur, pH, Salinität sowie die Nährstoffgehalte von Phosphat (SRP = soluble reactive phosphorus), TP (Gesamtphosphor), DP (gelöster Gesamtphosphor), Nitrat, Nitrit und Ammonium wurden bestimmt. Der DOP-Gehalt, methodisch richtiger der SNP-Gehalt (soluble not reactive phosphorus), wurde berechnet aus der Differenz von DP und SRP und der PP-Gehalt (partikulärer Phosphor) wurde berechnet aus der Differenz von TP und DP. Als Biomasseparameter wurden gängige Größen gemessen, wie der Chlorophyll α -, Seston-, POM (partikuläres organisches Material)-, POC (partikulärer organischer Kohlenstoff)- und, PN (partikuläre Stickstoff)-Gehalt, die Bakterienabundanz sowie der Kohlenstoffgehalt der Algen- und Bakteriengemeinschaft ($C_{A\&B}$). Zusätzlich wurde die Aminopeptidaseaktivität (PepA) als Aktivitätsparameter der Bakteriengemeinschaft (Andersen-Elvehoy and Thingstad 1991) gemessen und die Verwendung des Verhältnisses der PA/PepA als geeigneter Referenzparameter, wie von Sala et al. (2001) vorgeschlagen, untersucht. Die AlkPA wurde mittels der Methode von Hoppe (1983, 1993) und dem Substrat Methylumbelliferon-Phosphat (MUF-P) gemessen (TRIS/TRIS-HCL gepuffert auf pH 8,2; Temp. 22°C; Fluoreszenz gemessen mit SpectraMax M2^e, Molecular Devices GmbH, Deutschland, Einstellungen: Ex: 365 nm, Em: 451 nm; Kontrolle: Reinstwasser mit $< 0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$). Die PepA wurde mit dem Substrat L-Leucine-4-methylcoumarinyl-7-amid (Leu-MCA) bestimmt (Hoppe 1983; Hoppe 1993). Um den K_M der AlkP_{ase} zu ermitteln, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen (1, 5, 10, 20, 40, 60, 120 und 180 $\mu\text{mol l}^{-1}$) gemessen. Die Enzymaktivitäten wurden in der Vollprobe, sowie im steril filtrierten Filtrat bestimmt ($\varnothing 0,2 \mu\text{m}$) und daraus den Anteil an partikulär gebundener PA (PPA) und gelöster PA (DPA) berechnet. Mithilfe einer Korrelationsanalyse zwischen der PA und den verschiedenen Biomasseparametern sollte der geeignetste Referenzparameter ermittelt werden. Um Rückschlüsse über die Herkunft der PA ziehen zu können, wurde, neben der



Abb. 1: Probenahmestandorte (markiert mit einem Stern) der aquatischen Habitate an der Küste der südwestlichen Ostsee

Korrelationsanalyse, zu bestimmten Zeitpunkten im Winter 2016, Frühjahr und Sommer 2017 größenfraktionierte PA- und PepA-Messungen durchgeführt. Um verschiedenen Größenfraktionen voneinander zu trennen, wurden Filter mit verschiedenen Porengrößen (Ostsee und Warnow: 0,2 μ m, 1 μ m, 20 μ m, 50 μ m; Zingster Strom: 0,2 μ m, 1 μ m, 5 μ m, 10 μ m, 20 μ m) verwendet und die Enzymaktivität (V_{max} und K_M) im jeweiligen Filtrat bestimmt. Zusätzlich wurde, mithilfe der größenfraktionierten PA-Messungen, die Zusammensetzung des K_M -Wertes und dessen Aussagekraft diskutiert.

Um die Reaktion des V_{max} - und K_M Wertes auf eine P Mangelsituation zu untersuchen, wurde mit einer natürlichen Phytoplanktonproben aus dem Zingster Strom vom Frühling bis Sommer 2017 Düngeexperimente durchgeführt und die Reaktion von V_{max} und K_M auf die Zugabe von Phosphor und Nitrat, einzeln und zusammen in verschiedenen Verhältnissen, bestimmt (4 Düngebehandlungen: +75 μ M NO₃; +5 μ M PO₄; +75 μ M NO₃ und 5 μ M PO₄; +75 μ M NO₃ und 20 μ M PO₄). Die Parameter AlkPA, PepA, Chl α , Seston, POC, PN, Nitrat, Nitrit, Ammonium und SRP wurden vor der Düngezugabe und 24h bzw. 7 Tage nach der Düngezugabe gemessen. Phytoplanktonproben wurden zwischen den Probenahmen in einem Glasgefäß im Klimaraum bei 17°C und 58 bis 85 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹, bei einem Licht zu Dunkel Rhythmus von 16:8, gehältert.

Mit den Ergebnissen aus dem Düngeexperiment (Zingster Strom) und den Langzeitmessungen der drei Gewässer (Ostsee, Warnow und Zingster Strom), sollte die Indikatorfunktion der PA als P Limitationsanzeiger neu beurteilt werden. Dafür wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Biomassenormierten PA, sowie anderen P Limitationsanzeiger wie C/P und N/P Verhältnisse im Seston und Umgebungswasser durchgeführt und mit den, in der Literatur beschriebenen, Schwellenwerte verglichen.

Als terrestrische Algengemeinschaft wurden algendominierte biologische Bodenkrusten (BSC; Abb 2c und 2d) einer Sanddüne, gewählt (Standort zwischen der Ostsee und dem Hütelmoor). Die BSC, sowie die Sedimentschicht darunter (CS) und ein Vergleichssediment ohne Algenbewuchs (DS) (Abb 2a und 2b) wurde im Sommer, Herbst 2016 und Frühling 2017 beprobt. Es wurden die beiden Seiten der Sanddüne, die sich in Hinblick auf Exponiertheit zu Windstress unterschieden, beprobt und vergleichend untersucht (Abb 2a). Die saure und alkaline PA (gemäß Tabatabai and Bremner 1969 und Eivazi and Tabatabai 1977; *p*-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat, mit MUB auf pH 6,5 gepuffert, 1h bei 37°C inkubiert, mit CaCl₂ und NaOH Enzymreaktion gestoppt, Gemisch gefiltert (MN280 1/4, Carl Roth) und photometrisch gemessen bei 400nm (CADAS 100, Dr. Lange, 1cm Küvette)) sowie anderer Bodenparameter (Chl α , mikrobieller C, Wassergehalt, SRP, TP, TN (Gesamtstickstoffgehalt), TC (Gesamtkohlenstoffgehalt), Leitfähigkeit, Karbonatgehalt und SOM (Bodenorganisches Material) wurden gemessen. Mithilfe der Ergebnisse wurde die Rolle der PA in BSC und die Auswirkungen der BSC auf die Nährstoffkonzentration einer Sanddüne diskutiert.

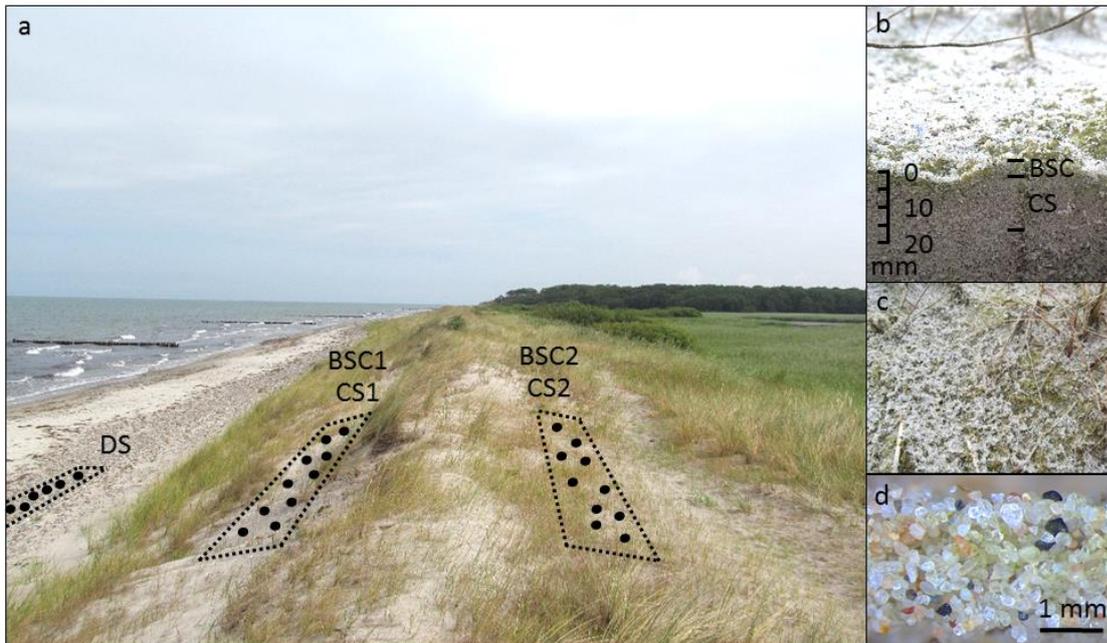


Abb. 2: a Probenahmestandort mit Beprobungsflächen; BSC = biologische Bodenkrusten, CS = Sediment unterhalb der BSC-Schicht, DS = nicht bewachsenes Sediment als Kontrolle; seeseitiger Hang (BSC1 und CS1) versus landseitigen Hang (BSC2 und CS2). b Tiefenprofil der BSC und CS Beprobung. c Blick von Oben auf eine algendominierte BSC. d Seitlicher Blick auf eine algendominierte BSC

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Der Ursprung der Phosphataseaktivität

Der Ursprung der DPA und PPA innerhalb der einzelnen Gewässer sollte mithilfe der Korrelationsanalyse (PA versus diverses Biomasseparametern), sowie durch die größenfraktionierte PA-Messungen aufgeklärt werden. Die Ergebnisse waren jedoch nicht immer eindeutig. Der Anteil der DPA and der Gesamt-PA war in der Ostsee am größten (26 – 91%), in der Warnow gemäßigt hoch (12 – 60%) und im Zingster Strom recht gering (2 – 15%). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass der Großteil der PP_{asen} der Ostsee bakteriellen Ursprungs und an Partikel gebunden sind und mit der P- und der C Verfügbarkeit korrelieren. Die PPA der Warnow entsprach zu etwa gleichen Teilen der Bakterien- und Algenfraktion. Im Zingster Strom stammte die PPA, gemäß der größenfraktionierten PA-Messung, hauptsächlich von der Größenfraktion der Nano- und Picocyanobakterien (0,2 – 1 μ m). Dies steht in scheinbarer Diskrepanz zu einem größeren in-situ Vorkommen von Koloniebildenden Cyanobakterien mit Schleimhüllen (> 5 μ m) (Schumann et al. 2009). Möglicherweise stellt die Schleimhülle um die Kolonien eine Barriere für das artifizielle MUF-P Substrat dar, wodurch die PA innerhalb der Kolonien nur im geringeren Anteil mit gemessen wird.

Einen gemeinsam geeigneten Referenzparameter für alle drei untersuchten Gewässer konnte für die DPA nicht gefunden werden. Zur PPA zeigte lediglich der POM-Gehalt in allen drei Gewässern eine signifikant positive Korrelation. Die PepA korrelierte nur in der Warnow und im Zingster Strom mit der PPA, nicht jedoch in der Ostsee. Als Referenzparameter für

die PPA wird damit der POM-Gehalt empfohlen. Außerdem sollte die Gesamt-PA stets getrennt als DPA und PPA gemessen werden, da die DPA einen hohen Anteil an der Gesamt-PA ausmachen kann. Die DPA kann wiederum zu einem Großteil von Zooplankter und Protozoen stammen (Jansson 1976).

4.2 Die Michaeliskonstante – Zusammensetzung und mögliche Aussagekraft als P Limitationsparameter

Die größtenfraktionierten PA-Messungen zeigten, dass der K_M der Vollprobe ein Mittelwert ist aus kleinen und großen K_M -Werten verschiedener P_{asen} . Als solcher Mittelwert wäre der K_M durchaus als vergleichender Parameter nutzbar. Die Düngeexperimente mit natürlichen Zingster Strom Proben ergaben, dass sich der K_M nicht relativ zur PA und den vorliegenden limitierenden Nährstoffbedingungen ändert. Die Beziehung zwischen der PA, anderen P Limitationsparametern und dem K_M in den drei untersuchten Gewässern war widersprüchlich und zeigte keine Korrelation. In einer Studie im Plußsee veränderte sich der K_M ebenfalls nicht während eines Anstiegs der PA und dem simultanen Abfall der SRP Konzentration zum Ende einer Frühjahrsblüte (Chróst et al. 1989; Fig. 8). Axenische *Anacystis nidulans* Kulturen reagierten wiederum, auf die Abwesenheit von Phosphat und unter Zugabe von verschiedenen DOP Substraten, meist mit einer Abnahme des K_M (Reichardt 1971). Die eigenen Ergebnisse und der Vergleich mit der Literatur zeigten, dass keine einheitliche Beziehung zwischen dem K_M und der PA, noch zu anderen Parametern, die eine P Limitation anzeigen, besteht. Der K_M stellt damit kein verlässlicher Parameter zur Bestimmung einer P Limitation dar.

4.3 Die Eignung der Phosphataseaktivität als P Limitationsanzeiger

Healey and Hendzel (1979a) machten bereits deutlich, dass es auch Algenarten gibt, die unter P Mangel keine erhöhte AlkPA aufweisen. Hinzu kommt, dass einige Algenarten, wie z.B. *Melosira granulata*, sehr wohl im Zuge eines P Mangels ihre AlkPA erhöhen, diese aber im Verhältnis zu AlkPA anderen Algenarten sehr gering ist und damit unterhalb der ermittelten Grenzwerte liegt (Healey and Hendzel 1979a). Healey and Hendzel (1979a) erhielten daher Grenzwerte oberhalb derer die PA/POM für eine P Limitation sprechen. Geringe PA/POM zeigen jedoch nicht eindeutig an, ob die Algen P limitiert sind, oder nicht (Healey and Hendzel 1979a). Die konstitutive Enzymaktivität ist zwischen verschiedenen Algenarten zudem hoch variabel. Fitzgerald and Nelson (1966) beschrieben eine große Bandbreite der konstitutiven PA zwischen verschiedenen Süßwasseralgen. Die höchsten Werte zeigten dabei Cyanobakterien. So variiert vermutlich der Grenzwert zwischen konstitutiver und P limitierter PA je nach der Artzusammensetzung der Gewässer und Saison. Die hohen PA im Zingster Strom (Phytoplankton von Picocyanobakterien dominiert) könnten somit, zumindest teilweise, auch auf eine hohe konstitutive Enzymaktivität

zurückzuführen sein. Die von Healey and Hendzel (1979a) ermittelten Grenzwerte scheinen nicht auf alle Gewässer übertragbar zu sein. Die PPA/Chl *a* Grenzwerte zeigten vor allem in der Ostsee einen sehr viel höheren P Mangel an als die PPA/POM und andere P Limitationsparameter (Tabelle 1). Gemäß Caruso (2010) lagen auch die PPA/Chl *a* in verschiedenen Gebieten des oligotrophen Mittelmeers zwischen 10 und 324 mal höher als der Grenzwerte für die extreme P Limitation. Eine *Skeletonema costatum* Blüte im Trondheimfjord (Norwegen) lag mit den PA/Chl *a* Werten jedoch innerhalb der von Healey und Hendzel (1979a) ermittelten Grenzwerte (Myklestad and Sakshaug 1983). Gründe für diese Unterschiedliche Eignung der Grenzwerte könnte in der unterschiedlichen Phytoplanktonzusammensetzung begründet liegen. Die PPA/POM Grenzwerte zeigten sich damit für die drei untersuchten Gewässer als wesentlich besser geeignet als die PPA/Chl *a*.

Tabelle 1: Phosphataseaktivität (PA) normiert über verschiedene Parameter, sowie abiotische und biotische Parameter der Ostseeküste, Warnow und Zingster Strom unterteilt in Winter (W), Frühling (F), Sommer (S) und Herbst (H); PPA/Chl *a* in $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a \text{ h}^{-1}$; PA/POM und PPA/POM in $\text{nmol mg}^{-1} \text{ POM h}^{-1}$; PPA/PP in $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$; K_M in nmol l^{-1} ; Chl *a* = $\mu\text{g l}^{-1}$; Bakt._{heterotr.} in 10^6 Zellen ml^{-1} ; Nährstoffkonzentrationen in $\mu\text{mol l}^{-1}$; PP/POM in $\mu\text{mol PP mg}^{-1} \text{ POM}$; Bakt._{heterotr.} = heterotrophe Bakterienabundanz; $C_{A\&B}$ = Kohlenstoffgehalt der Algen und Bakterien; Chl *a* = Chlorophyll *a*; DIN = gelöster anorganischer Stickstoff; PC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PN = partikulärer Stickstoff; PP = partikulärer Phosphor; SRP = gelöster reaktiver Phosphor; Einfärbung: **gelb = moderate N Limitation**; **hellgrün = moderate P Limitation**; **dunkelgrün = extreme P Limitation** gemäß Healey and Hendzel (1979), Healey and Hendzel (1980) und Gage and Gorham (1985)

	Ostseeküste				Warnow				Zingster Strom			
	W	F	S	H	W	F	S	H	W	F	S	H
PA/POM ¹	11	41	43	29	41	101	37	31	69	90	84	71
PPA/POM ²	7	18	23	20	24	84	26	20	58	101	45	57
PPA/Chl <i>a</i> ³	8	13	20	8	4	11	4	3	34	58	58	41
PPA/PP ⁴	2,0	0,8	3,5	1,5	2,2	8,0	3,3	1,4	25	53	33	38
Chl <i>a</i>	2,4	1,1	1,5	2,6	18	38	30	44	56	77	52	55
Bakt. _{heterotr.}	0,1	0,3	0,8	0,5	1,9	5,7	8,8	3,7	13,4	13,7	20,5	15,9
SRP	0,7	0,3	0,0	0,7	0,5	0,0	0,3	0,5	0,02	0,08	0,07	0,0
DIN	9,4	9,6	2,8	6,7	159	124	13	17	64	21	1,7	2,3
DIN/SRP	16	46	55	6	290	1692	22	38	1282	140	17	95
PN/PP	90	4	12	9	29	18	14	12	38	55	52	56
PC/PP	682	26	68	62	176	127	93	81	327	546	530	466
PC/PN	7,6	6,5	6,1	7,2	6,2	7,4	6,3	6,8	9,2	10,0	10,2	8,7
PP/POM ⁵	0,06	1,05	0,30	0,37	0,37	0,33	0,38	0,40	0,10	0,06	0,05	0,05

¹ PA/POM Grenzwerte: < 24 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ POM h}^{-1}$ kein P Mangel; 48 – 125 mittlere P Limitation; > 125 schwere P Limitation

² PPA/POM Grenzwerte: < 20 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ POM h}^{-1}$ kein P Mangel; 20 – 100 mittlere P Limitation; > 100 schwere P Limitation

³ PPA/Chl *a* Grenzwerte: < 3 $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a \text{ h}^{-1}$ kein P Mangel; 3 – 5 mittlere P Limitation; > 5 schwere P Limitation

⁴ PPA/PP Grenzwerte: < 2 $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$ kein P Mangel; 2 – 10 mittlere P Limitation; > 10 schwere P Limitation

⁵ PP/POM Grenzwerte: > 0,32 $\mu\text{mol PP mg}^{-1} \text{ POM}$ kein P Mangel; 0,14 – 0,26 mittlere P Limitation; < 0,14 schwere P Limitation

Vergleiche zwischen der PA und anderen P Limitationsparametern (Tabelle 1) zeigen kein einheitliches Bild in der Ostsee und der Warnow. Nur im Zingster Strom stimmen alle P Limitationsparameter für eine ganzjährige moderate bis extreme P Limitation, verbunden mit einer moderaten N Limitation. In der Warnow und der Ostsee spricht die PA für eine moderate P Limitation. Die meisten anderen P Limitationsparameter jedoch für keine P Limitation. Die Korrelationsanalyse zeigte ebenfalls keine einheitliche Abhängigkeit zwischen der PA und den P Limitationsparametern in den drei Gewässern. Nur die PPA/POM der Ostsee zeigte eine negative Korrelation mit der SRP Konzentration (Ostsee: $r_s = -,639$, $p = ,008$; Warnow: $r_s = -,142$, $p = ,587$; Zingster Strom: $r_s = ,277$, $p = ,410$). Insgesamt ist die Deutung des Limitationszustandes anhand der verschiedene Limitationsparameter, einschließlich der PA, sehr schwierig. Von der Nutzung der PA als alleiniger Parameter muss daher dringend abgeraten werden.

4.4 Der Einfluss von algendominierten biologischen Bodenkrusten auf die Elementstöchiometrie und Phosphataseaktivität einer Küstendüne

Das Dünensediment (DS) war generell niedrig an TC, TN und TP. Diese Elemente, zusammen mit dem SOM, akkumulierten in den BSC und im Sediment darunter (CS). Dies führte zur Einleitung der Bodenbildung, welches die Ansiedlung von höheren Pflanzen fördert (Hesp 1991). Windstress zusammen mit Verschüttung sind wichtige Faktoren in der Entwicklung der BSC (Harper and Marble 1988; Belnap and Eldridge 2001; Rao et al. 2012). Die BSC1 (Hang zur Seeseite) war stärkerem Windstress ausgesetzt als die BSC2 (Hang zur Landseite). Mit den Ergebnissen konnte die beobachtete Verteilung von verschiedenen Sukzessionsstufen der BSC an der Küstendüne erklärt werden. So waren moosdominierte BSC auf dem landwärtigen Hang der Küstendüne sehr viel stärker vertreten als auf dem seewärtigen Hang. Häufigerer Windstress hält die BSC1 auf einer niedrigeren Sukzessionsstufe mit niedrigerer Algen- und mikrobieller Biomasse und einem niedrigeren Verhältnis von Algen/mikrobiellen C. Auch die Effizienz der Kohlenstoffnutzung scheint mit steigendem Windstress zu sinken. So akkumulierte BSC1 mehr organischen C als BSC2, welches in BSC2 jedoch effektiver in mikrobiellen C umgesetzt wurde als in BSC1. Die saure und alkaline PA war in beiden BSC sehr gering und zeigte, zusammen mit dem C:N:P Verhältnissen, keine P Limitation an. Vielmehr war die Algengemeinschaft der BSC wasserlimitiert, gefolgt von einer N Limitation und die mikrobielle Gemeinschaft war C limitiert. Diese Daten sind bereits publiziert (Schaub et al. 2018; siehe Anhang).

5 Literaturverzeichnis

Andersen-Elvehoy IL, Thingstad TF (1991) Detection of limiting factors for bacterial activity using protease activity. *Kieler Meeresforschungen Sonderh* 8:392–398.

- Belnap J, Eldridge D (2001) Disturbance and recovery of biological soil crusts. In: Belnap J, Lange OL (eds) *Biological soil crusts: Structure, function, and management*. Springer Berlin Heidelberg, pp 363–383
- Caruso G (2010) Leucine aminopeptidase, β -glucosidase and alkaline phosphatase activity rates and their significance in nutrient cycles in some coastal Mediterranean sites. *Mar Drugs* 8:916–940. doi: 10.3390/md8040916
- Cembella a D, Antia NJ, Harrison PJ (1984a) The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Crit Rev Microbiol* 10:317–391. doi: 10.3109/10408418209113567
- Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ (1984b) The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Crit Rev Microbiol* 10:317–391. doi: 10.3109/10408418209113567
- Chróst RJ, Münster U, Rai H, et al (1989) Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. *J Plankton Res* 11:223–242.
- Cooper RA, Bowen ID, Lloyd D (1974) The properties and subcellular localization of acid phosphatases in the colourless alga, *Polytomella caeca*. *J Cell Sci* 15:605–618.
- Degerholm J, Gundersen K, Bergman B, Söderbäck E (2006) Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS Microbiol Ecol* 58:323–32. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00180.x
- Eivazi F, Tabatabai MA (1977) Phosphatases in soils. *Soil Biol Biochem* 9:167–172. doi: 10.1016/0038-0717(77)90070-0
- Fitzgerald GP, Nelson TC (1966) EXTRACTIVE AND ENZYMATIC ANALYSES FOR LIMITING OR SURPLUS PHOSPHORUS IN ALGAE. *J Phycol* 2:32–37. doi: 10.1111/j.1529-8817.1975.tb04539.x
- Gage M a., Gorham E (1985) Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of the phosphorus status of phytoplankton in Minnesota lakes. *Freshw Biol* 15:227–233. doi: 10.1111/j.1365-2427.1985.tb00195.x
- Harper KT, Marble JR (1988) A role for nonvascular plants in management of arid and semiarid rangelands. In: *Vegetation science applications for rangeland analysis and management*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 135–169
- Healey FP, Hendzel LL (1979) Fluorometric measurement of alkaline phosphatase activity in algae. *Freshw Biol* 9:429–439.
- Healey FP, Hendzel LL (1980) Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Can J Fish Aquat Sci* 37:442–453. doi: 10.1139/f80-058
- Hesp PA (1991) Ecological processes and plant adaptations on coastal dunes. *J Arid Environ* 21:165–191.
- Hoppe H-G (2003) Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia* 493:187–200. doi: 10.1023/A:1025453918247
- Hoppe H-G (1986) Relations between bacterial extracellular enzyme activities and heterotrophic substrate uptake in a brackishwater environment. *GERBAM - Deuxième Colloq Bactériology Mar - CNRS, IFREMER; Actes Colloq* 3:119–128.
- Hoppe H-G (1993) Use of Fluorogenic Model Substrates for Extracellular Enzyme Activity (EEA) Measurement of Bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sheer EB, Cole JJ (eds) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, pp 423–431
- Hoppe H-G (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar Ecol Prog Ser* 11:299–

308. doi: 10.3354/meps011299
- Jansson M (1976) Phosphatases in lake water: characterization of enzymes from phytoplankton and zooplankton by gel filtration. *Science* (80-) 194:320–321. doi: 10.1126/science.184531
- Jansson M, Olsson H, Pettersson K (1988) Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* 170:157–175. doi: 10.1007/BF00024903
- Karl DM, Björkman KM (2002) Dynamics of DOP. In: Hansell DA, Carlson CA (eds) *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, 1st edn. Academic Press, pp 249–366
- Kuenzler EJ, Perras JP (1965) Phosphatases of marine algae. *Biol Bull* 128:271–284.
- Lin W, Zhao D, Luo J (2018) Distribution of alkaline phosphatase genes in cyanobacteria and the role of alkaline phosphatase on the acquisition of phosphorus from dissolved organic phosphorus for cyanobacterial growth. *J Appl Phycol* 30:839–850. doi: 10.1007/s10811-017-1267-3
- Martinez J, Smith DC, Steward GF, Azam F (1996) Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat Microb Ecol* 10:223–230. doi: 10.3354/ame010223
- Myklestad S, Sakshaug E (1983) Alkaline phosphatase activity of *Skeletonema costatum* populations in the Trondheimsfjord. *J Plankton Res* 5:557–564.
- Paytan A, McLaughlin K (2007) The oceanic phosphorus cycle. *Chem Rev* 107:563–76. doi: 10.1021/cr0503613
- Pettersson K (1980) Alkaline phosphatase activity and algal surplus phosphorus as phosphorus-deficiency indicators in Lake Erken. *Arch für Hydrobiol* 89:54–87.
- Rao B, Liu Y, Lan S, et al (2012) Effects of sand burial stress on the early developments of cyanobacterial crusts in the field. *Eur J Soil Biol* 48:48–55. doi: 10.1016/j.ejsobi.2011.07.009
- Reichardt W (1971) Catalytic mobilization of phosphate in lake water and by Cyanophyta. *Hydrobiologia* 38:377–394. doi: 10.1007/BF00036544
- Sala MM, Karner M, Arin L, Marrasé C (2001) Measurement of ectoenzyme activities as an indication of inorganic nutrient imbalance in microbial communities. *Aquat Microb Ecol* 23:301–311. doi: 10.3354/ame023301
- Schumann R, Schoor A, Schubert H (2009) Fine resolution of primary production and its limitation in phytoplankton communities of the darss-zingst bodden chain, a coastal lagoon of the southern baltic sea. *Balt Coast Zo* 97–125.
- Tabatabai M a., Bremner JM (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1:301–307. doi: 10.1016/0038-0717(69)90012-1
- Whitton BA, Grainger SLJ, Hawley GRW, Simon JW (1991) Cell-bound and extracellular phosphatase activities of cyanobacterial isolates. *Microb Ecol* 21:85–98. doi: 10.1007/BF02539146
- Xu Y, Boucher JM, Morel FMM (2010) Expression and diversity of alkaline phosphatase ehap1 in *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). *J Phycol* 46:85–92. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00788.x

Anhang

Vorträge und Poster auf Konferenzen:

- 11th Baltic Sea Science Congress „Living along gradients: past, present, future“ (Juni 2017, Rostock) – Poster Präsentation: Alkaline phosphatase activity in plankton communities of a eutrophic lagoon – Seasonality and origin
- 8th International Phosphorus-Workshop (September 2016, Rostock) – Poster Präsentation: Phosphorus demand in phytoplankton communities – Alkaline phosphatase activity as a proxy?

Publikationen:

- I. Schaub, C. Baum, R. Schumann and U. Karsten (2018) Effects of an early successional biological soil crust from a temperate coastal sand dune (NE Germany) on soil elemental stoichiometry and phosphatase activity. *Microbial Ecology*; doi: 10.1007/s00248-018-1220-2
- I. Schaub (2021) Die alkaline Phosphataseaktivität – ein Indikator für den Phosphorstatus in Phytoplanktongemeinschaften? Dissertation, Universität Rostock, 143 Seiten

Aufgrund der Ergebnisse dieses Projektes und der Publikation Schaub et al. (2018) wurde für die zweite Graduiertenschule des Leibniz-Wissenschaftscampus Phosphorforschung Rostock das Doktorandenprojekt „IV.1 Gene expression in biogeochemical cycling of phosphorus in biological soil crusts of sand dunes of the Baltic Sea“ beantragt.