

Sonderdruck aus

Verhandlungen  
Gesellschaft für Ökologie  
Band XVIII  
Essen 1988

Im Auftrag der Gesellschaft  
herausgegeben  
von Wilhelm Kuttler

Göttingen 1989

## Kombinierte fluorimetrische Nukleinsäuren-Bestimmung zur Bioaktivitäts- und Biomassequantifizierung bei Grünalgen unter Schwermetallbelastung

Günter Krückemeier und Wilhelm Kuttler

### Synopsis

Cultures of the green algae *Scenedesmus subspicatus* CHODAT (SAG 86.81) and *Scenedesmus communis* (SAG 276-4b), well-known laboratory micro-organisms such as in the Cell Multiplication Inhibition Test, were used as bioindicators in studies of heavy metal toxicology. In this study a combined method of quantitative cell disintegration and high specific fluorimetric determinations of nucleic acids was used to show the influence of toxic cations such as  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  at very low concentrations. It could be shown that a quantitative determination of biological effects of inorganic cations on nucleic acids of green algae is more sensitive than measured by optical density.

*bioindicator, biomass, cadmium, heavy metals, lead, native nucleic acids, Scenedesmus, toxicity threshold*

### 1. Einführung

Eine bekannte Methode zur Ermittlung der Biomasse von Mikroorganismen ohne großen apparativen Aufwand stellt die Bestimmung der optischen Dichte als Analoggröße des Trockengewichtes oder der Zellzahl dar (HOLM-HANSEN 1969). Als eine spezifische und sensitive Methode, bei der Meßfehler, vor allem bedingt durch tote Organismen und Detritus, ausgeschlossen werden können, kann die fluorimetrische Bestimmung der nativen DNA-Konzentration, des Äquivalents der lebenden Biomasse, angesehen werden (IWAMURA 1955, HABERS 1964, DEVULDER 1969, HOLM-HANSEN 1969). Analog dazu ermöglicht die Quantifizierung der RNA-Konzentration die Abschätzung der Bioaktivität von Testorganismen (DEVULDER 1969, DORTCH et al. 1983). Unter Schwermetalleinwirkungen geringer Konzentration ( $Pb^{2+} = 1,85\text{mg/l}$ ;  $Cd^{2+} = 0,015\text{mg/l}$ ) läßt sich im Gegensatz zur Bestimmung der optischen Dichte eine signifikante Änderung der Biomasse und -aktivität in den Algentestkulturen feststellen.

### 2. Meßansatz und -methoden

Die angewandte Methode gliedert sich in die in Abb. 1 dargestellten Teilschritte. Quantitative Bestimmungen von Zellbestandteilen bzw. Zellinhaltsstoffen, respektive Aussagen über zeitlich variierende Zellgehalte an Stoffwechselprodukten, sind nur durch einen vollständigen Probenaufschluß und, daraus resultierend, eine quantitative Freisetzung der zu messenden Zellbestandteile und -inhaltsstoffe, zu realisieren. Daher werden die aufkonzentrierten bzw. konservierten Algenproben in einer Zelmühle durch in hochfrequente Schwingungen versetzte Glaskugeln zertrümmert. Dies ist insbesondere für Vertreter ubiquitärer Grünalgenstadien wie *Scenedesmus* (KOMAREK und LUDVIK 1971, KOMAREK, LUDVIK 1973, KRÜCKEMEIER 1987), *Chlorella*, *Pediastrum* und wahrscheinlich auch *Volvox*, *Eudorina*, *Sorastrum* und *Prototheca* (ATKINSON et al. 1972) von Bedeutung, da diese Organismen Zellwandstrukturen mit bemerkenswerten Schutzfunktionen gegenüber mechanischen und chemischen Einwirkungen aufweisen. Aufgrund erster Vergleichsexperimente kann man davon ausgehen, daß auch die quantitative Bestimmung anderer zellulärer Parameter wie  $Chl_a$ -, Gesamtprotein- und Kohlehydratgehalt mit einem Zelmühlenaufschluß effektiver ist.

Die freigesetzten nativen Nukleinsäuren werden fluorimetrisch durch die Kombination zweier spezifischer Fluorochrome, Ethidiumbromid (STAEHELIN und PICKET-HEAPS 1975) und DAPI (FALKOWSKI und OWENS 1982), erfaßt. Durch eine Summenbestimmung von DNA und RNA, eine spezifische DNA-Erfassung sowie eine an-

schließende Differenzbildung können die Nukleinsäurenkonzentrationen in der gleichen Probe bestimmt werden (KRÜCKEMEIER 1987). Zusätzlich dazu wird die optische Dichte der Algenkulturen bei 720 nm bestimmt (KRÜCKEMEIER 1987).

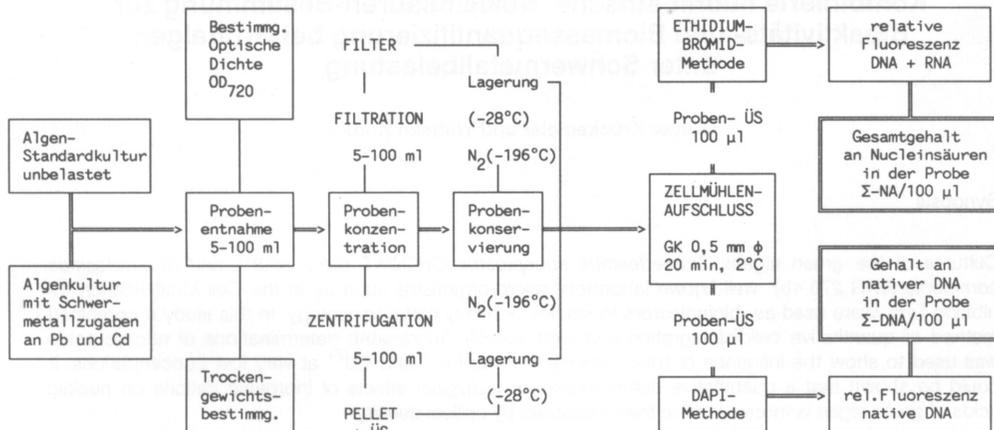


Abb. 1: Ablaufschema von Probenaufschluß und kombinierter Nucleinsäurenbestimmung für *Scenedesmus*.

Je eine statische und synchrone Kultur von *Scenedesmus* wird über 72 bzw. 96 h untersucht, wobei die Probenahme jeweils um 9<sup>00</sup> Uhr, zwei Stunden nach Lichtbeginn, erfolgt und danach wie in Abb. 1 beschrieben vorgegangen wird. Die Schwermetallkonzentrationen beziehen sich auf die Ionenkonzentrationen (Zugabe jeweils als Nitrat), wobei diese Werte den ermittelten Werten bei BRINKMANN und KÜHN 1980 entsprechen (3,7 mg/l Pb<sup>2+</sup> und 0,03 mg/l Cd<sup>2+</sup>) bzw. jeweils halbiert werden (s. a. NAW 1984, OECD 1984).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 DNA-Messungen

Die in den Abb. 2 und 3 dargestellten Verläufe der Parameter optische Dichte und Nukleinsäurenkonzentrationen für die nicht mit Schwermetallkationen belasteten Standardkulturen (-\*) entsprechen den aus der Literatur bekannten Wachstumskurven (LORENZEN und RUPPEL 1959, HOLM-HANSEN 1969, STEENBERGEN 1974).

Unter definierter Schwermetallbelastung kann bei der stationären wie auch bei der synchronen Kultur von *Scenedesmus subspicatus* (Abb. 2 und 3) eine auffallende Veränderung der DNA-Konzentrationen im Vergleich zur unbelasteten Standardkultur festgestellt werden. Während die Verlaufskurven der optischen Dichte nur sehr geringe Unterschiede zwischen belasteten und unbelasteten Kulturen erkennen lassen (Abb. 2a, b; 3a, b), sind die Unterschiede der DNA-Konzentrationen zwischen belasteten Kulturen und Standard sehr deutlich sichtbar (Abb. 2c, d; 3c, d). Dies gilt insbesondere für die 72 h-Synchronkulturen (Abb. 3c, d); bei den stationären Kulturen (Abb. 2c, d) sind die Unterschiede nicht derart auffallend, liegen aber auch dort noch deutlich unter den Standardwerten.

Die jeweils im unteren Bereich der einzelnen Teildiagramme aufgetragenen Abweichungen der belasteten Kulturen vom unbelasteten Standard liegen für die Bestimmungen der optischen Dichte nahe unter bzw. über dem als Null-Linie gesetzten Standard, und zwar im Bereich von 0 bis maximal 15 %, wobei sie teilweise mit den Standardwerten identisch sind und eine etwaige Schädigung nicht belegen können (Abb. 2a; 3b). Demgegenüber betragen die Abweichungen der DNA-Konzentrationen der belasteten Kulturen, wie besonders in Abb. 3d und 2d zu erkennen ist, teilweise mehr als 50 % (maximal 67 % in Abb. 3c) und deuten somit auf eine erhebliche Schädigung im Vergleich zur Standardkultur hin.

Auffallend bei den mit Blei und Cadmium belasteten Kulturen ist die nach einiger Zeit (48 bis 72 h) eintretende "Erholung" bzw. "Regeneration" der Kultur (Abb. 2a, b; 3a, b), was anhand der zunehmenden DNA-Konzentrationen bzw. der geringeren Abweichungen vom Standard deutlich wird.

Der Vergleich der belasteten Kulturen untereinander zeigt, daß die Unterschiede in der Wirkung höherer Kationenkonzentrationen nur bei den bleibelasteten Kulturen sichtbar werden (Abb. 2c; 3c); unter Cadmiumbelastung ergeben sich nur undeutliche Unterschiede zwischen niedrigen und hohen Konzentrationen (Abb. 2d; 3d).

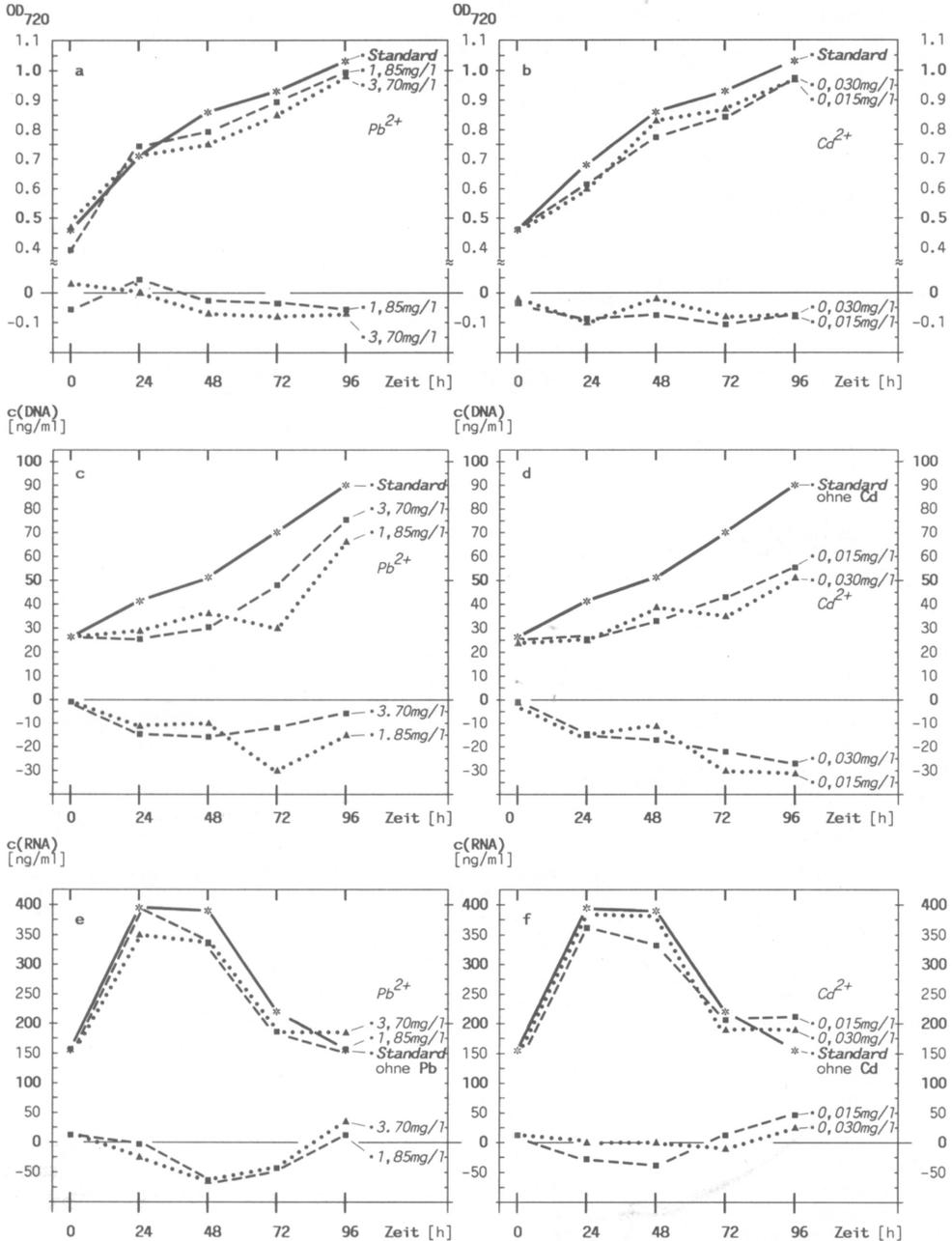


Abb. 2: Darstellung des Verlaufes der statischen Kultur von *Scenedesmus* über 96 h; aufgetragen sind die Parameter optische Dichte, DNA- und RNA-Konzentration jeweils für den Standard (-\*-\*) und die blei- bzw. cadmiumbelasteten Kulturen (-.-,.-.-) im oberen Abbildungsteil, sowie die Abweichungen der belasteten Kulturen (-.-,.-.-) vom Standard (Null-Linie) im unteren Teildiagramm. Die aufgeführten Konzentrationen sind Ionenkonzentrationen an Pb und Cd in mg/l, zugegeben als Nitrat.

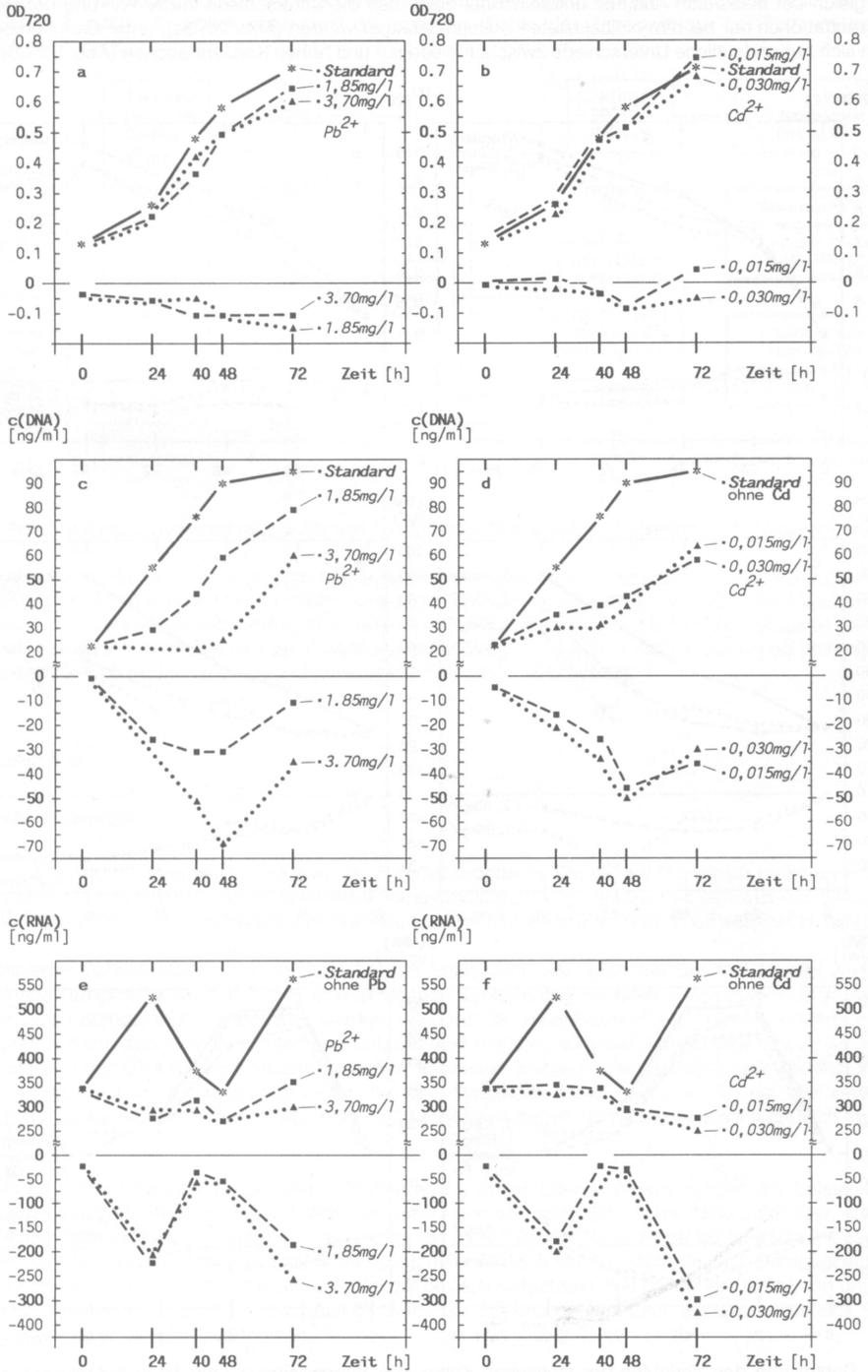


Abb. 3: Darstellung des Verlaufes der synchronen Kultur von *Scenedesmus* über 72 h; aufgetragen sind die Parameter optische Dichte, DNA- und RNA-Konzentrationen; Erläuterungen vgl. Abb. 2.

### 3.2 RNA-Messungen:

Ein ganz anderes Bild bieten die Verläufe der RNA-Konzentrationen. Während bei den stationären Kulturen die Messungen der RNA-Konzentrationen zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei der optischen Dichte führen (Abb. 2e, f), also nur geringe Unterschiede zwischen belasteten und unbelasteten Kulturen feststellbar sind, kann man für die synchronen Kulturen teilweise erhebliche Abweichungen vom Standard erkennen, wobei die Verlaufsschwankungen der RNA-Konzentrationen der belasteten statischen Kulturen sehr viel geringer sind als die der Vergleichskulturen. Die synchronen Kulturen scheinen ein bestimmtes Niveau nicht überschreiten zu können (Abb. 3e, f). Man sollte jedoch berücksichtigen, daß die RNA-Konzentrationen während des Wachstums der Kultur erheblichen natürlichen Schwankungen, bedingt durch die kurzen Turnoverzeiten der unterschiedlichsten RNA's, unterliegen können (IWAMURA 1955, LORENZEN und RUPPEL 1959, KRÜCKEMEIER 1987).

### 4. Diskussion und Schlußfolgerung

Wie in Abb. 4 zusammengestellt, ergeben sich gegenüber der Messung der  $OD_{720}$  bei den Nukleinsäurebestimmungen (Abb. 2 und 3) unter Schwermetalleinwirkungen sehr viel deutlichere prozentuale Abweichungen vom unbelasteten Standard. Während sich die  $OD_{720}$ -Werte im Bereich der allgemeinen Schwankungsbreite der Meßwerte bewegen, sind die Nukleinsäure-Werte signifikant über der zugehörigen Schwankungsbreite angeordnet. Dies trifft insbesondere für die Werte der 72 h-Synchronkulturen zu.

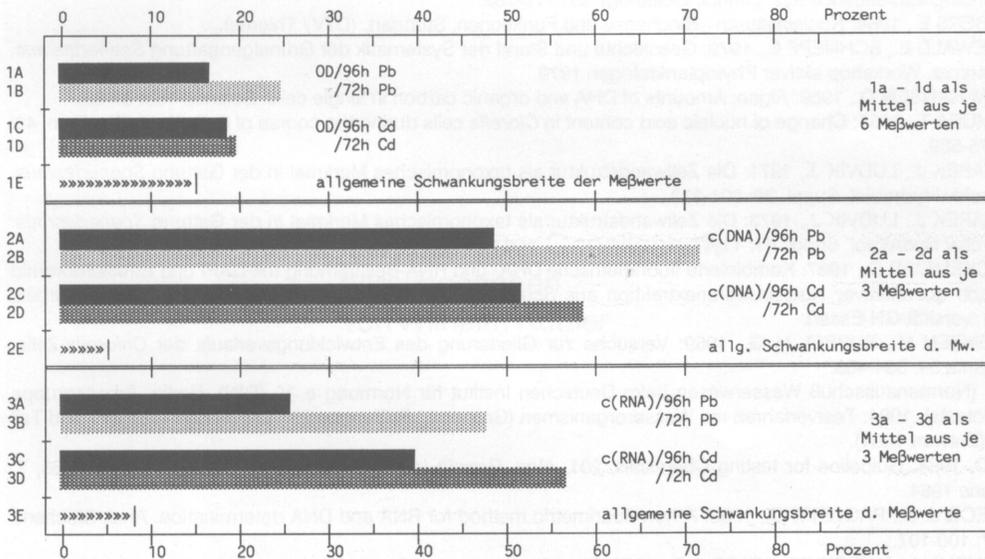


Abb. 4: Darstellung der jeweils maximalen gemessenen Abweichungen der schwermetallbelasteten *Scenedesmus*-Kulturen von der unbelasteten Standardkultur für die einzelnen gemessenen Parameter: 1A -1E = optische Dichte ( $OD_{720}$ ), 2A - 2E = DNA- und 3A - 3E = RNA-Konzentration, jeweils für den 96 h- und 72 h-Versuch; alle Angaben in Prozent.

Die Synchronkulturen (Abb. 2c, d) lassen gegenüber den statischen Kulturen (Abb. 3c, d) von *Scenedesmus*, vor allem in den ersten 24 h nach Schwermetallzugabe, eine deutlichere Abnahme der DNA-Konzentrationen erkennen, da bei den langsamer wachsenden statischen Kulturen die Biomassezunahme des unbelasteten Standards geringer ist, die Schere zwischen belasteter und unbelasteter Kultur demnach nicht so groß werden kann. Während das Maximum der Abnahme der Nukleinsäurekonzentrationen bei den belasteten synchronen Kulturen schon nach 24 h bzw. früher eintritt (Abb. 2c), ist bei den statischen Kulturen erst nach 72 bzw. 96 h die maximale Abweichung gegenüber dem Standard erreicht. Bezogen auf die in Kap. 3.2 angesprochenen RNA-Konzentrationen gilt, daß die Synchronkultur auch hier die verwertbareren Ergebnisse liefert. Der Untersuchungszeitraum läßt sich daher durch den Einsatz synchroner Kulturen auf 24 bzw. 48 h verkürzen, wobei der

Schwerpunkt der Messung auf die Bestimmung der DNA-Konzentrationen gelegt werden sollte, da die starken natürlichen Schwankungen der RNA-Konzentrationen das Ergebnis unter Umständen verfälschen könnten.

Die Biomassequantifizierung über die DNA-Konzentration bietet daher den Vorteil, auch bei sehr gering einwirkenden Schwermetallkonzentrationen eine etwaige Schädigung der Reproduktionsfähigkeit respektive des Stoffwechsels mit hoher Empfindlichkeit bestimmen zu können. Dies ist mit fehlerbelasteten Trübungsmessungen (Bestimmung der optischen Dichte) mit ihrer niedrigen Empfindlichkeit nicht mehr möglich.

## Literatur

- ATKINSON A. W., GUNNING B. E. S., JOHN P. C. L., 1972: Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella*. *Planta* 107: 1-32.
- BRINGMANN G., KÜHN R., 1980: Comparison of the toxicity threshold of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the Cell Multiplication Inhibition Test. *Water research* 14: 231-241.
- DEVULDER K., 1969: Jahreszeitliche, tiefenabhängige und örtliche Veränderungen im wechselseitigen Verhältnis von Nucleinsäuren, Proteinen und Chlorophyll im Netzplankton. Bericht dt. wiss. Kommiss. Meeresforschung 20: 216-255.
- DORTCH Q., ROBERTS T. L., CLAYTON J. R., AHMED S. I., 1983: RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth-rate and biomass. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 13: 61-71.
- FALKOWSKI P. G., OWENS T. G., 1982: A technique for estimating phytoplankton division rates by using a DNA-binding fluorescence dye. *Limnol. Oceanogr.* 27: 776-782.
- HARBERS E., 1964: Nucleinsäuren - Biochemie und Funktionen. Stuttgart. (DTV/ Thieme).
- HEGEWALD E., SCHNEFF E., 1979: Geschichte und Stand der Systematik der Grünalgegattung *Scenedesmus*. Internat. Workshop aktiver Phytoplanktologen 1979.
- HOLM-HANSEN O., 1969: Algae: Amounts of DNA and organic carbon in single cells. *Science* 163: 87-88.
- IWAMURA T., 1955: Change of nucleic acid content in *Chlorella* cells during the course of their life. *J. Biochem.* 42: 575-589.
- KOMAREK J., LUDVIK J., 1971: Die Zellwandstruktur als taxonomisches Merkmal in der Gattung *Scenedesmus*. *Archiv Hydrobiol. Suppl.* 39: 301-333.
- KOMAREK J., LUDVIK J., 1973: Die Zellwandstruktur als taxonomisches Merkmal in der Gattung *Scenedesmus*. *Archiv Hydrobiol. Suppl.* 41: 11-47.
- KRÜCKEMEIER G., 1987: Kombinierte fluorimetrische DNA- und RNA-Bestimmung mit DAPI und Ethidiumbromid nach quantitativer Nucleinsäureextraktion aus *Scenedesmus*- und *Fragilaria*-Zellen. Staatsexamensarbeit, Universität-GH-Essen.
- LORENZEN H., RUPPEL H.-G., 1959: Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der *Chlorella*-Zelle. *Planta* 54: 394-403.
- NAW (Normenausschuß Wasserwesen beim Deutschen Institut für Normung e. V. (DIN), Berlin. Arbeitsgruppe Biotests), 1984: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) Prüfungsvorschrift DIN 38 412 Teil 1 und Teil 9 (Entwurf 1984).
- OECD, 1984: Guideline for testing Chemicals, 201. Alga, Growth Inhibition test. OECD COUNCIL C (84) 65, 7. June 1984.
- LE PECQ J. B., PAOLETTI C., 1966: A new fluorimetric method for RNA and DNA determination. *Anal. Biochem.* 17: 100-107.
- STAEHELIN L. A., PICKETT-HEAPS J. D., 1975: The Ultrastructure of *Scenedesmus*. *J. Phycol.* 11: 163-185.
- STEENBERGEN C. L. M., 1974: The role of light in the life cycle of *Scenedesmus obliquus* KÜTZING. Diss. Limnologisches Institut Niewershui.

## Adresse

Günter Krückemeier und Prof. Dr. Wilhelm Kuttler  
Universität-GH-Essen, Fachbereich 9  
Institut für Ökologie, Abt. Landschaftsökologie  
Postfach 10 34 67

D - 4300 Essen 1