

Die Verwendung einer neuen Lemna-Kulturanlage in Wachstums- und Stoffwechseluntersuchungen mit gelösten und gasförmigen Schwefelverbindungen

Autor(en): **Erismann, K.H. / Brunold, Chr.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **83 (1973)**

Heft 3

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-58450>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Die Verwendung einer neuen Lemna-Kulturanlage in Wachstums- und Stoffwechseluntersuchungen mit gelösten und gasförmigen Schwefelverbindungen

von K.H. Erismann und Chr. Brunold

Manuskript eingegangen am 18. Juli 1973

Gegenüber andern höhern Pflanzen weisen *Lemnaceen* eine ganze Reihe von Vorteilen auf, welche sie für physiologische Untersuchungen in besonderem Masse geeignet erscheinen lassen (Landolt 1957, Hillman 1961, Schulz 1962, Kandler 1968, Erismann und Finger 1968). Als besonders zweckmässig erweist sich die Verwendung von *Lemnaceen* vor allem dort, wo der Einfluss einer bestimmten Behandlung auf das Wachstum untersucht wird, oder wo es gilt, die bei Mikroorganismen und einzelligen Algen entwickelte steady-state-Methodik (Bassham und Kirk 1960) auf höhere Pflanzen zu übertragen. Eine wichtige Voraussetzung für steady-state-Experimente sind Anlagen, welche erlauben, die Versuchorganismen unter konstanten Bedingungen zu kultivieren und dabei den steady-state zu kontrollieren. Dazu kann die Tatsache herangezogen werden, dass Organismen im steady-state exponentielles Wachstum aufweisen. Deshalb können Wachstumsmessungen auch bei der Bereitstellung von Pflanzenmaterial für steady-state-Experimente wichtig sein.

Im folgenden wird über eine Anlage berichtet, welche gestattet, auf der Nährlösungsoberfläche schwimmende *Lemnaceen* unter Registrierung des Wachstums aseptisch bei gleichbleibenden Bedingungen zu kultivieren. Sie erlaubt neben Wachstumsmessungen die Bereitstellung grosser Mengen von jederzeit gleichwertigem Pflanzenmaterial, welches in besonders angepassten Versuchseinrichtungen (Erismann und Brunold 1967) in steady-state-Experimenten weiterverwendet werden kann. Die Anlage lässt sich aber auch direkt für kinetische Experimente verwenden, bei welchen die durch einen Wechsel der Bedingungen bewirkte Änderung des steady-state untersucht wird. In diesem Zusammenhang sind besonders die Anwendungsmöglichkeiten interessant, welche eine zur Wachstumsanlage konstruierte Begasungseinrichtung eröffnet.

Beschreibung der Anlage

Die Wachstumsanlage setzt sich im wesentlichen aus 4 Einheiten zu je 6 Kulturgefäßen und einer Begasungseinrichtung zusammen. Jede Einheit umfasst ausser den Kulturgefäßen, welche auf einer Plexiglasplatte linear angeordnet sind, einen Nährlösungs- und einen Luftverteiler (Fig. 1).

Je 2 Einheiten sind einander gegenüberliegend auf einem Holzgestell montiert. Als Nährlösungsbehälter dienen Marjottesche Flaschen von 10 l Inhalt, welche 1 m über den Kulturgefäßen stehen. Sie sind mit Hilfe von Kugelschliffen und Gummischlauch mit den Nährlösungsverteilern verbunden. Die Verbindung mit Kugel und Pfanne erlaubt den aseptischen Wechsel der Nährlösungsflaschen. Der Nährlösungsverteiler besteht aus einem 45 cm langen Pyrexglasrohr mit einem Durchmesser von 2,8 cm, einem Einlass- und 6 Auslasstuben. Durch je einen Tropfenzähler mit Regulierschraube lässt sich die Nährlösungszugabe zu den Kulturgefäßen dosieren.

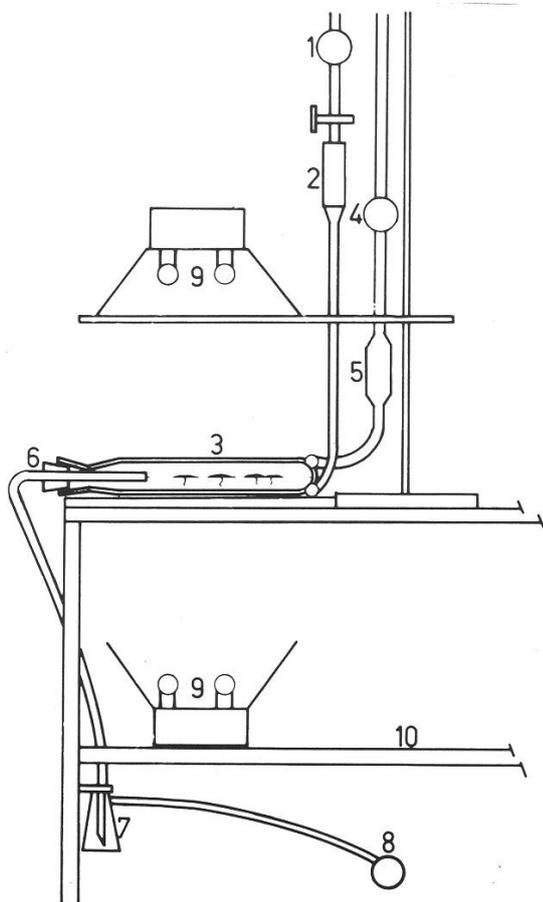


Fig. 1:

Aufbau der Wachstumsanlage

1. Nährlösungsverteiler mit Anschlüssen für 6 Kulturgefäße
2. Tropfenzähler mit Regulierschraube
3. Kulturgefäß
4. Luftverteiler mit Anschlüssen für 6 Kulturgefäße
5. Wattefilter
6. Auslass für Nährlösung und Luft
7. Absorptionsgefäß mit Tauchrohr
8. Sammelrohr
9. Beleuchtungskörper
10. Holzgestell

Die Begasungseinrichtung (Fig. 2) besteht im wesentlichen aus einer Kolbenpumpe (Reziprotor, Kopenhagen) und einem Verteilersystem, welches die Beimischung von Gasen zur atmosphärischen Luft gestattet. Die Begasungsluft wird in Waschflaschen befeuchtet und von Staub und unerwünschten Begleitgasen wie SO_2 befreit. Sie gelangt in einen Verteiler, dessen 4 Ausgänge von je einem

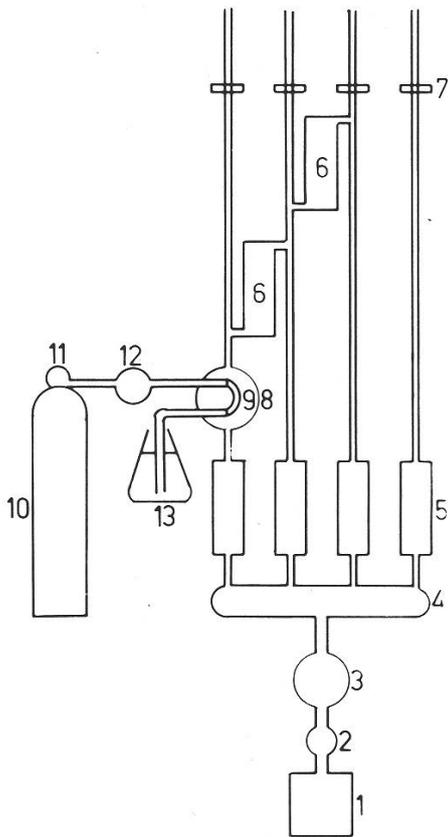


Fig. 2:

Schema der Begasungseinrichtung:
Im gezeigten Aufbau kann sie zur Beimischung von Gasen mittels Diffusion durch einen Schlauch verwendet werden.

1. Luftschacht
2. Wattefilter
3. Luftpumpe
4. Luftverteiler
5. Strömungsmesser 0–130 l/h
6. Strömungsmesser 0–50 l/h
7. Schlauchklemmen zur Regulation des Luftdurchsatzes
8. Mischgefäß
9. Diffusionsschlauch
10. Gasflasche
11. Reduzierventil
12. Blasenähler
13. Absorptionsgefäß

Strömungsmesser (BROOKS-MITE, 0–130 l/h) kontrolliert werden. Von einem dieser Strömungsmesser gelangt die Luft in ein Mischgefäß, wo mittels Diffusion durch einen geeigneten Schlauch oder mit Hilfe eines Injektors Gase (CO_2 , SO_2 , H_2S usw.) beigemischt werden können. Zwei Strömungsmesser (0–60 l/h) erlauben die Verdünnung des Gasgemisches mit atmosphärischer Luft. Die resultierenden Gaskonzentrationen für definierte Strömungsmessereinstellungen lassen sich an den Ausgängen mit den entsprechenden Instrumenten messen. Schlauchklemmen dienen zusätzlich zu den Nadelventilen der Strömungsmesser zur Regulation des Luftdurchsatzes. Von den vier Ausgängen der Begasungseinrichtung wird die Luft in Pyrexglasrohren zu den Luftverteilern der einzelnen Einheiten geführt. Die Luftverteiler sind gleich konstruiert wie die Nährlösungsverteiler. Die sechs Kulturgefäße einer Einheit sind über je ein wattegefülltes Luftfilter mit dem Luftverteiler verbunden.

Als Kulturgefäße werden Kolben nach KOLLE (Länge 170 mm, Breite 116 mm, Höhe 37 mm, Halsdurchmesser 32 mm) verwendet, welche mit je einem Einlass für Luft und Nährlösung versehen sind. Als Verschluss dient ein autoklavierbarer Gummistopfen, in welchen als Auslass für Nährlösung und Luft ein Glasrohr eingeführt ist. Seine hakenförmige Krümmung erlaubt die Regulierung des Nährlösungsniveaus in den Kulturgefäßen. Um zu verhindern, dass Lemmen vom Nährlösungs- und Gasstrom durch den Auslass getrieben werden, ist das Glasrohrende im Kolben zu einem schmalen Schlitz geformt. Das andere Ende des Glasrohrs ist über einen Gummischlauch mit einem Tauchrohr in einem Erlenmeyerkolben verbunden, welcher zur Absorption von gegebenenfalls

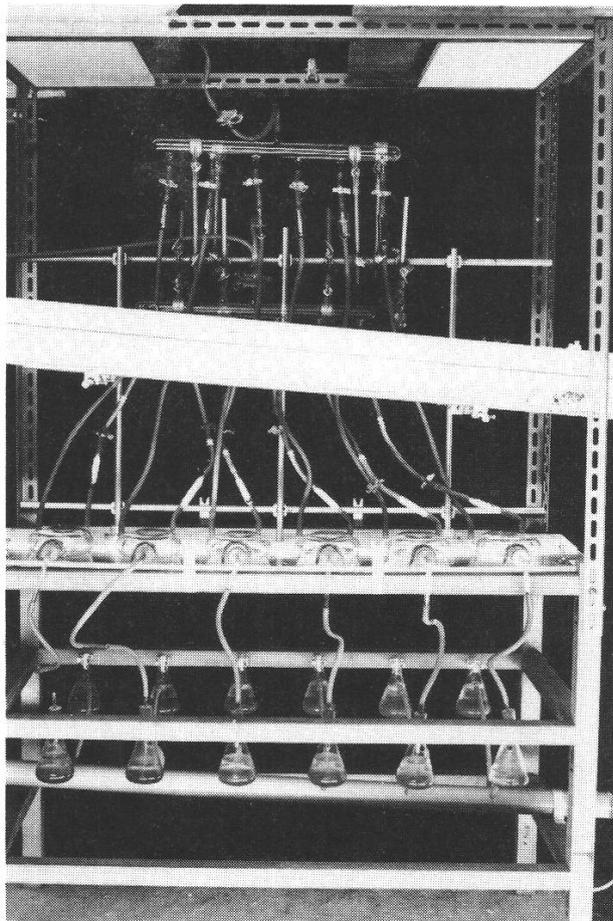


Fig. 4:

Teilansicht der Lemna-Kulturanlage. Die rückwärtigen Kulturgefäße und die untern Beleuchtungskörper sind für die Aufnahme entfernt worden.

beigemischten giftigen Gasen mit einem entsprechenden Absorptionsmittel beschickt ist. Mit Hilfe des Tauchrohrs lässt sich das normale Funktionieren der Belüftung der einzelnen Kulturgefäße kontrollieren. Aus dem Absorptionsgefäß können Nährlösung und Luft durch einen Stutzen über einen Gummischlauch in ein abfallend montiertes Sammelrohr übertreten, welches mit einer Abwasserleitung verbunden ist.

Für die Sterilisation werden sechs Kulturgefäße einer Einheit mit den Luftfiltern, den Auslassschläuchen und dem zugehörigen Nährlösungsverteiler vom Holzgestell getrennt. Alle Öffnungen werden mit Wattefiltern versehen, welche durch Aluminiumfolie geschützt sind. Die Sterilisation erfolgt bei 1 atü und dauert 30 Minuten. Sie wird nach 3 Tagen wiederholt.

Vor der Beimpfung werden die Kulturgefäße aus den Vorratsflaschen mit Nährlösung beschickt. Dann wird die Plexiglasplatte, auf welcher die Kulturgefäße mit Drahtfedern fixiert sind, schräg angehoben, so dass die Gummistopfen entfernt werden können, ohne dass Nährlösung aus den Kulturgefäßen fließt. Zur Beimpfung dient eine Impfnadel mit meanderförmig gebogenem Draht. Sie kann auch zur aseptischen Entnahme des Pflanzenmaterials aus den Kulturgefäßen verwendet werden.

Die Wachstumsanlage ist in einem thermostatisierten Raume aufgestellt. Die Temperatur in den Kulturgefäßen weicht bei Beleuchtungsstärken bis 5000 Lux $\pm 1^{\circ}\text{C}$ von der Raumtemperatur ab. Die Beleuchtung kann von oben

oder unten erfolgen. Die verwendeten Reflektoren sind mit je 2 Fluoreszenzröhren (Philips TL 40W/33) ausgestattet. Durch Veränderung des Abstandes der Traggestelle von den Kulturgefässen lässt sich die Beleuchtungsstärke auf den gewünschten Wert regulieren.

Das Traggestell für die obere Reflektoren ist als Führungsschiene für einen Photoapparat oder eine Filmkamera ausgebildet. So können die Kulturgefässe mit den Lemmen nach Abheben des Reflektors und Einschalten der unteren Beleuchtung photographiert werden. Um gut auswertbare Bilder zu erhalten, ist es nötig, das Licht der Fluoreszenzröhren mit einer Milchglasscheibe zu streuen.

Für die Messung des Wachstums werden die einzelnen Kulturgefässe am zweckmässigsten täglich zur gleichen Zeit photographiert. Auf Projektionen der photographischen Negative lassen sich die *Lemna*-Gliederzahlen leicht bestimmen. Wenn sich die Organismen im Zustand des logarithmischen Wachstums befinden, nimmt der Logarithmus der Gliederzahlen linear mit der Zeit zu. Es lassen sich also auf Grund der Logarithmen der Gliederzahlen Regressionsgeraden berechnen. Für die statistische Auswertung werden am besten die Steigungen dieser Regressionsgeraden herangezogen:

$$\mu = \frac{\ln \text{GZ } t_2 - \ln \text{GZ } t_1}{t_2 - t_1}$$

$\ln \text{GZ } t$ = natürlicher Logarithmus der Gliederzahl zur Zeit t
 t = Zeit in Tagen

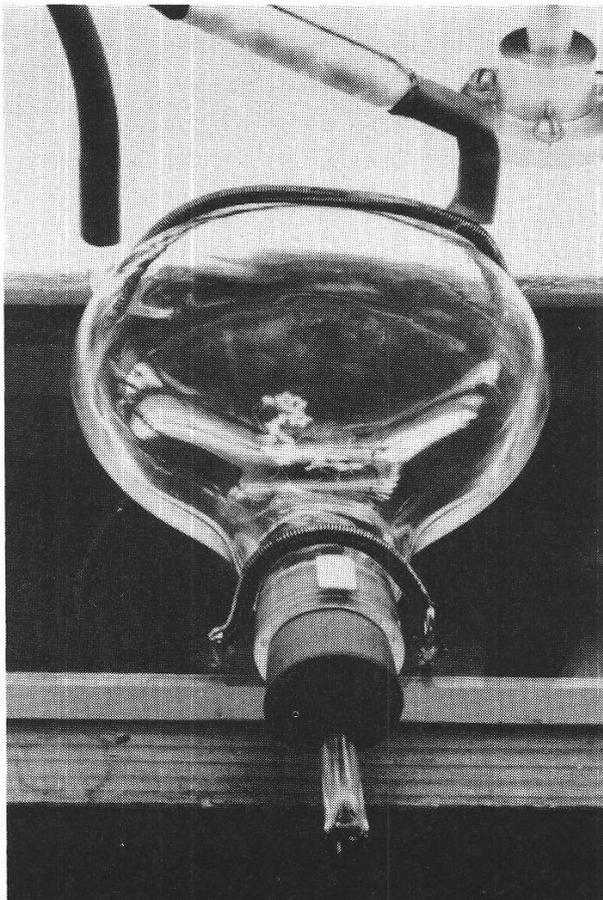


Fig. 5:
 Einzelnes Kulturgefäss mit *Lemna minor*.

Die Steigungen entsprechen der spezifischen Wachstumsrate (Fencel 1966).

Wenn beim Photographieren ein durchsichtiger Massstab mit Millimeter-einteilung neben die Kulturgefässe gelegt wird, kann der Vergrößerungs-
massstab der Projektionen bestimmt werden. Damit lassen sich nach Ausmessung des
Projektionsbildes die wirklichen Dimensionen der *Lemna*-Glieder berechnen.

Die entsprechend der Zufuhr aus den Kultivierungsgefässen austretende
Nährlösung kann aufgefangen und analysiert werden. Diese Analyse ist besonders
wichtig bei der Belüftung mit Gasen, welche sich in der Nährlösung gut lösen
und deren Zusammensetzung unter Umständen drastisch ändern können.

Anwendung

Die folgenden Ergebnisse stammen aus einer Untersuchung über die Schwefel-
assimilation von *Lemna minor* L. (Brunold 1972). Sie mögen eine der Anwendungs-
möglichkeiten der beschriebenen Anlage verdeutlichen.

Tabelle I:

Spezifische Wachstumsraten von *Lemna minor* aus zwei Experimenten bei den 4 Einheiten
der Wachstumsanlage (Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 Kulturgefässen).
Kultivierungsbedingungen: Dauerbeleuchtung von oben 5000 Lux, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Begasung mit
Luft mit ca. 0,03% CO_2 , Belüftungsrate 20 l/h/Kulturgefäss, Nährlösung H 8 (Erismann
und Finger 1968) pH 6,0, Durchflussrate 40 ml/h/Kulturgefäss, Inoculum ca. 20 Glieder,
Kultivierungsdauer 9 Tage.

Einheit Nr.	Experiment 1		Experiment 2	
	Spezifische Wachstumsraten μ	Standard- abweichung s	Spezifische Wachstumsraten μ	Standard- abweichung s
1	0,429	0,0209	0,420	0,0198
2	0,425	0,0207	0,420	0,0204
3	0,420	0,0179	0,410	0,0203
4	0,434	0,0181	0,427	0,0194

In Tab. I sind die Mittelwerte der spezifischen Wachstumsraten der 4 Einheiten
aufgeführt. Ein Vergleich zeigt, dass zwischen den einzelnen Einheiten bei
gleicher Behandlung keine Unterschiede auftreten. Auch zwischen den Wachstums-
raten der beiden sechs Monate auseinanderliegenden Versuche lässt sich kein
Unterschied sichern. Die Standardabweichungen liegen im üblichen Rahmen der
Resultate aus biologischen Versuchen (Landolt 1957). Trotz der Konstanz
der spezifischen Wachstumsrate wurde das Wachstum vor jedem Experiment
mit verschiedenartiger Behandlung der einzelnen Einheiten während 7 Tagen
bei gleicher Behandlung kontrolliert. Um nicht zu hohe Gliederzahlen auszählen
zu müssen, wurde die Gliederzahl der einzelnen Kulturgefässe vor der Behandlung
auf 20 reduziert. Bei den gewählten Bedingungen vermehrten sich diese
anschliessend im Laufe von 9 Tagen auf 600–700.

Tabelle II:

Spezifische Wachstumsraten von *Lemna minor* bei verschiedenen Sulfatkonzentrationen (Bedingungen mit Ausnahme der Sulfatkonzentration wie Tabelle I) (Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 Parallelen).

Sulfatkonzentration	Spezifische Wachstumsraten μ	Standardabweichung s
$4 \cdot 10^{-4}$ M	0,425	0,024
$4 \cdot 10^{-5}$ M	0,325	0,028
$4 \cdot 10^{-6}$ M	0,271	0,026
$4 \cdot 10^{-7}$ M	0,261	0,034

Wenn jede der 4 Einheiten mit Nährlösung verschiedener Sulfatkonzentration versorgt wird, zeigt sich, dass die spezifischen Wachstumsraten bereits bei einer Sulfatkonzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ M gegenüber $4 \cdot 10^{-4}$ M signifikant kleiner sind (Tab. II), d.h. Sulfat scheint das Wachstum bei den gewählten Bedingungen bereits bei einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ M zu limitieren.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob sich Sulfat als Schwefelquelle durch Schwefelwasserstoff ersetzen lässt, welcher an den natürlichen Standorten von *Lemna minor* oft nachgewiesen werden kann (Kuchar 1954, Schulz 1962).

Tab. III gibt Aufschluss über die spezifischen Wachstumsraten von Kulturen in Nährlösung ohne Sulfat, welche aber mit Hilfe der Dosiereinrichtung mit verschiedenen H_2S -Konzentrationen begast wurden. Die Differenzen zwischen den Mittelwerten lassen sich statistisch sichern, d.h. zwischen den Wachstumsraten bestehen Unterschiede, welche auf der Begasung mit verschiedenen H_2S -Konzentrationen beruhen.

Auf Grund dieser Untersuchung ist zunächst der Schluss, dass *Lemna minor* mit H_2S als alleiniger Schwefelquelle wachsen kann, nicht zwingend, weil während der Begasung ständig H_2S in der Nährlösung gelöst und dort oxidiert wird. Bei 12 ppm wurde in der Nährlösung ein Gesamtschwefelgehalt von 0,475 mg/l bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass es sich dabei ausschliesslich um Sulfatschwefel handelt, würde dieser Betrag einer Sulfatkonzentration von $1,5 \cdot 10^{-5}$ M entsprechen. Aus Tab. II geht nun aber hervor, dass sogar bei einer Sulfatkonzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ M nur eine mittlere spezifische Wachstumsrate

Tabelle III:

Spezifische Wachstumsrate von Kulturen von *Lemna minor* bei verschiedenen H_2S -Konzentrationen in der Begasungsluft. Kultivierungsbedingungen wie Tabelle I, Nährlösung H 8 mit Cl^- anstelle von SO_4^{2-} . (Mittelwerte und Standardabweichung von 6 Parallelen).

H_2S -Konzentration in ppm	Spezifische Wachstumsraten μ	Standardabweichung s
0	0,270	0,032
0,12	0,322	0,038
1,2	0,323	0,028
12	0,407	0,025

von 0,325 erreicht wird. Die Sulfatkonzentration von $1,5 \cdot 10^{-5}$ M dürfte also nicht genügen, um den festgestellten Wert von 0,407 zu erreichen. Deshalb darf angenommen werden, dass *Lemna minor* mindestens einen Teil ihres Schwefelbedarfs mit gasförmigem H_2S deckt.

Es zeigt sich allerdings, dass die Glieder von *Lemna* unter dem Einfluss von H_2S kleiner werden. Dieser Effekt ist auch dann zu beobachten, wenn die Nährlösung genügend Sulfat enthält (Fig. 3). Die kleinere Gliedergröße dürfte mindestens teilweise eine Erklärung liefern für das kleinere mittlere Trockengewicht pro Glied (Tab. IV). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass es sich bei Wachstumsuntersuchungen als nötig erweisen kann, dass zusätzlich zur Gliederzahl die Gliederflächen und das Trockengewicht pro Glied bestimmt werden müssen.

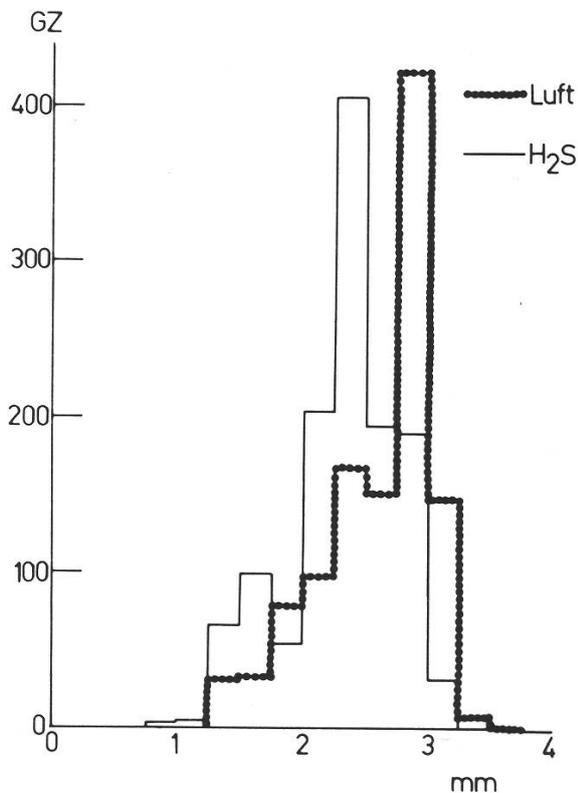


Fig. 3:
Häufigkeitsverteilungen der Gliederbreiten von *Lemna minor* bei Begasung mit Luft und bei Begasung mit Luft mit 6 ppm H_2S (Klassenbreite 0,25 mm).

Tabelle IV:

Mittlere Fläche pro Glied und mittleres Trockengewicht pro Glied von *Lemna minor* bei Begasung mit Luft ohne H_2S und mit 6 ppm H_2S .

Begasung	Mittlere Fläche/Glied	Mittleres Trockengewicht/Glied
Luft	0,0659 cm ²	0,091 mg
Luft mit 6 ppm H_2S	0,0533 cm ²	0,082 mg

Zusammenfassung

1. Es wird eine Wachstumsanlage beschrieben, mit welcher auf der Nährlösung schwimmende *Lemnaceen* unter definierten Bedingungen kultiviert werden können. Die Anlage eignet sich vor allem für Wachstumsmessungen mit statistischer Auswertung. Daneben erlaubt sie die Bereitstellung von jederzeit gleichwertigem Versuchsmaterial für physiologische oder biochemische Untersuchungen.

2. Die Verwendung der Anlage wird an Arbeiten gezeigt, die im Rahmen einer Untersuchung über die Schwefelernährung von *Lemna minor* L. ausgeführt wurden.

Summary

A device is described for the cultivation of *Lemnaceae* under controlled conditions. It is especially suited for growth measurements with statistical treatment.

It can also be used to produce plant material of uniform quality for physiological and biochemical experiments. The possibilities of the device are shown and discussed in connection with work done on sulfur nutrition of *Lemna minor* L.

Die Arbeiten wurden im Rahmen eines vom Schweiz. Nationalfonds unterstützten Projektes (Nr. 5122.3) ausgeführt. Die 16 mm Schmalfilmkamera (Beaulieu) zur Registrierung des Wachstums konnte mit Unterstützung der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern angeschafft werden. Wir danken auch Herrn Läufer, dem Institutsmechaniker, für die sorgfältige Ausführung der Werkstattarbeiten.

Literatur

- Bassham J.A. and M. Kirk, 1960. Dynamics of the Photosynthesis of Carbon Compounds: I. Carboxylation Reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 43, 447–464.
- Brunold Chr. 1972. Regulation der Sulfataufnahme und der Sulfatassimilation durch Schwefelwasserstoff bei *Lemna minor* L. Diss. Bern.
- Erismann K.H. and Chr. Brunold, 1967. Die Probeentnahme in kinetischen Stoffwechseluntersuchungen mit Wasserlinsen *Lemna minor* L. (Lemnaceen). *Exper.* 23, 235–236.
- und A. Finger, 1968. Lemnaceen in kontinuierlicher Kultur. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 78, 5–15.
- Fencel Z. 1966. Theoretical analysis of continuous culture systems. In: „Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms“ ed. by J. Malek and Z. Fencel. Acad. Press New York and London, 11.
- Hillman W.S. 1961. The *Lemnaceae* or duckweeds. *Bot. Rev.* 27, 221–287.
- Kandeler R. 1968. Blühinduktion bei *Lemnaceen*. *Biol. Rdsch.* 6, 49–56.
- Kuchar K.W. 1954. Bakteriologische und limnologische Untersuchungen an einem Lemnagewässer. *Arch. f. Hydrobiol.* 49, 329–334.
- Landolt E. 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an *Lemnaceen*. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 67, 271–410.
- Schulz B. 1962. Wasserlinsen. A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt.

Prof. Dr. K.H. Erismann; Dr. Ch. Brunold
Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern
Altenbergrain 21
CH-3013 Bern