

METHODOLOGIE VAN DE MICROBIELE ECOLOGIE IN NATUURLIJKE BIOTOPEN

J. P. VOETS

“No cell lives by itself. It always depends on the environment which surrounds it, part of which is other cells. Isolating a cell means merely transferring it from one environment to another. No cell can act independently. Whatever it manifests is an interaction between it and its environment”

P.W. WEISS¹

Inleiding

Micro-organismen zijn overal aanwezig in de biosfeer; men treft ze aan in het water (zoet- en zeewater), in de bodem en in de atmosfeer.

Micro-organismen zijn vrij levend of kunnen alleen repliceren in de aanwezigheid en ten nadele van hogere organismen (mens, dier en plant). Het zijn ééncellige wezens die autonoom voorkomen en enkel met de microscoop (optische of electronenmicroscoop) kunnen waargenomen worden. De afmetingen van de micro-organismen kunnen variëren van enkele millimicron ($m\mu$) tot enkele tientallen micron (μ).

Samengebracht in de groep van de *protisten* kan men bij de micro-organismen onderscheiden: *microben*, *fungi* (= schimmels), *algen* (= wieren), *protozoa* en *virussen*. In Figuur 1 zijn vertegenwoordigers van deze verschillende groepen micro-organismen voorgesteld.

Niet alleen naar hun morfologisch uitzicht maar eveneens in hun fysiologische en biochemische kenmerken verschillen deze groepen van protisten sterk van elkaar. De metabolische activiteiten zijn

determinerend voor het overleven en de groei van een micro-organisme in een bepaald milieu.

Sommige micro-organismen zoals de algen en enkele microbensoorten zijn bekwaam zich te ontwikkelen door het zonlicht te benutten als energiebron. Deze micro-organismen beschikken dan over fotosynthetische pigmenten (chlorofyl of bacteriochlorofyl). Zij gebruiken het koolzuur uit de atmosfeer waarin zij leven en bouwen hiermede volledig hun lichaam op. De overige voedingsstoffen die zij benutten zijn mineralen: gebonden stikstofverbindingen, fosfaten, sulfaten, chloriden van natrium, kalium, calcium en magnesium, enz. Men noemt ze derhalve *foto-lithotrofe* micro-organismen.

Verscheidene microbensoorten putten eveneens hun voedingsstoffen uit minerale substraten, maar door het feit dat zij niet over fotosynthetische pigmenten beschikken, kunnen zij het zonlicht niet gebruiken als energiebron. De noodzakelijke energie wordt opgebracht door chemische oxydatie van gereduceerde minerale verbindingen, zoals ammoniak, zwavelverbindingen, ijzerzouten. Deze microben noemt men *chemo-lithotrofe*.

De micro-organismen die organische substraten oxyderen en benutten als bron van energie en als koolstofbron betitelt men als *chemo-organotrofe*. De meeste microben en de fungi behoren tot deze groep.

Protozoa zijn unicellulaire organismen die geen ware celwand en geen chlorofyl bezitten en organisch materiaal als voedsel benutten. Protozoa verschillen sterk in afmetingen en vorm. Sommige zijn zo klein als microben, terwijl andere reeds kunnen waargenomen worden met een eenvoudige vergrootlens. Protozoa treft men aan in zoet- en zoutwater, in de bodem en zelfs in de lucht. Een aantal parasiteren op dieren en in de mens. De natuurlijke voedingsbron voor de protozoa zijn de microben; vandaar dat zij veelvuldig voorkomen in milieus die rijk zijn aan organisch materiaal waarop de microben zich snel vermenigvuldigen.

De virussen zijn de kleinste micro-organismen. Een virus kan aanzien worden als een genetisch element dat nukleïnezuur bevat en bekwaam is twee alternatieve vormen aan te nemen, namelijk intracellulair en extracellulair. In de extracellulaire of infectieve status zijn virussen submicroscopische deeltjes die opgebouwd zijn uit nukleïnezuur omringd door eiwit. Deze virusdeeltjes of virions hebben geen metabolische activiteit en kunnen vergeleken worden met een levenloze organische stof in een min of meer gekristalliseerde toestand.

Virussen kunnen beschouwd worden als agenten van ziekte en als agenten van erfelijkheid. Als agenten van ziekte kunnen de virussen

plantaardige en dierlijke cellen binnendringen en zo erg beschadigen dat de cel afsterft. Als agenten van erfelijkheid kunnen virussen bij het binnendringen van de cel tijdelijke of blijvende erfelijke veranderingen teweegbrengen in de genetische "make-up" van de waardcel.

Virussen variëren sterk in hun afmetingen, vorm, chemische en genetische samenstelling, spectrum van organismen die zij kunnen aantasten en de soort beschadiging van de cel die zij teweegbrengen. Extracellulair worden de virussen in alle biotopen aangetroffen. Deze die microben kunnen infekteren worden bacteriofagen genoemd.

Microben, fungi, algen en protozoa kunnen autonoom leven, metaboliseren en vermenigvuldigen. Hun vermenigvuldiging geschiedt meestal asexueel door binaire deling of door sporenvorming. Onder milieustress echter kan bij eucaryotische² fungi en algen een seksuele reproductie optreden door paring van twee gameten. Virussen kunnen zich niet autonoom vermenigvuldigen; zij kunnen zich slechts repliceren in gevoelige waardecellen ten nadele van de gastheer.

De meeste micro-organismen vertonen een hoge delingssnelheid. Zo kan uit één microbecel, onder optimale omstandigheden van voeding en temperatuur, na 24 uur een populatie van 10^7 – 10^9 cellen gevormd worden. Dit snel vermenigvuldigingsmechanisme brengt met zich dat de micro-organismen de voedingsstoffen in hun milieu vlug uitputten en metaboliseren. Tijdens dit metabolisme worden allerlei chemische verbindingen door de micro-organismen in hun omgevend milieu afgescheiden. Deze stoffen kunnen het milieu ongeschikt maken voor verdere microbiële vermenigvuldiging.

Voor meer uitgebreide gegevens betreffende de kennis van de micro-organismen verwijzen wij naar het werk van Voets (1966).

Fundamentele begrippen van de microbiële ecologie

In de microbiële ecologie worden de interacties bestudeerd die optreden tussen de micro-organismen onderling (individueel of in groep) en het milieu waarin zij voorkomen. Omwille van het feit dat deze interacties vaak zeer complex zijn, is de microbioloog die zich met ecologische studies inlaat, verplicht enkele algemene principes vast te leggen. Baanbrekend werk op dit gebied werd verricht door Odum (1959), Brock (1966) en Alexander (1971).

Het complex geheel van verschillende micro-organismen, samen met de abiotische factoren die op hen een invloed uitoefenen noemt men een *biotoop*. Elk biotoop omvat een verzameling van biotische en abiotische componenten die uniek zijn voor het systeem. De organismen die leven in een bepaald biotoop vormen een

gemeenschap. Microbiële gemeenschappen zijn opgebouwd uit *populaties van individuele organismen*.

Wanneer men bedenkt dat duizenden soorten van microben, schimmels, algen en protozoa in de natuur voorkomen, dan is het duidelijk dat microbiële species niet "at random" verspreid zijn maar daarentegen voorkomen in wel bepaalde associaties en verzamelingen. In die zin zijn de microbiële gemeenschappen van de bodem, de oceanen, zoete oppervlaktewaters, ontbindend organisch materiaal, afvalwaters en de lucht allemaal uniek. Dit dient toegeschreven te worden aan het feit dat elk biotoop een aantal fysische, chemische en biologische factoren omvat die de samenstelling van de biologische gemeenschap determineren. Deze factoren zullen bepalen welke organismen die de biotoop binnendringen in staat zullen zijn zich succesvol te vestigen en welke niet. Tevens bepalen deze milieufactoren welke organismen dominant en welke van minder belang zullen zijn. Uit deze vaststellingen vloeit voort dat een organisme niet een bepaald milieu kiest, maar wel dat het milieu selekteert.

Wanneer nu een bepaalde gemeenschap gevestigd is in een bepaald milieu, kan deze gemeenschap door middel van haar fysiologische activiteiten veranderingen teweegbrengen in haar biotoop. Sommige van deze veranderingen hebben een beperkte plaatselijke invloed zoals verschuivingen in de zuurheidsgraad (pH), in het zuurstofgehalte en in de chemische samenstelling van de biotoop. Andere veranderingen zijn echter van meer globale betekenis, zoals de regeneratie van het atmosferisch koolzuurgehalte door de degradatie van organisch materiaal, de hercyclering van de stikstof en de transformaties van verschillende mineralen. Hieruit volgt dat na de selectieve installatie van organismen in een bepaald biotoop bilaterale interacties tussen de biota en het milieu wel degelijk optreden.

Micro-organismen zijn onderhevig aan de invloed van fysische en chemische factoren die een bepaald biotoop kenmerken. Het ligt dan ook voor de hand dat deze factoren nauwkeurig kwalitatief en kwantitatief moeten geanalyseerd worden bij de studie van de microbiële ecologie. Het geheel van deze factoren vormen het *macro-milieu*. De voornaamste milieufactoren die een ecologische betekenis hebben zijn samengevat in Tabel 1.

Naast het macro-milieu speelt eveneens het *micro-milieu* een belangrijke rol in de activiteit van de micro-organismen. De microbiële cel is immers zeer klein en het omringend milieu waarmede zij in contact leeft vertoont eveneens microscopische afmetingen. Zo bevat een grondkruimeltje, een stukje plantaardig of dierlijk weefsel, een brokje faecaal materiaal verschillende micro-

Tabel 1. Milieufactoren van ecologische betekenis

Fysische	Chemische
Temperatuur	Wateractiviteit
Radiatie	Zuurheidsgraad (pH)
Hydrostatische druk	Voedingsstoffen :
Osmotische druk	kwaliteit
Oppervlaktespanning	kwantiteit
Viscositeit	Groeistimulators
Zwaartekracht	Groeiinhibitoren
Adsorptie	Redox-potentiaal

-milieus die van elkaar sterk kunnen verschillen naar hun vochtgehalte, pH, zuurstofconcentratie en zo meer. Vermits deze micro-milieus bijdragen tot de diversificatie van de micro-organismen in een bepaald biotoop, spelen zij een grote rol in de microbiële ecologie. Daarenboven kunnen bepaalde micro-milieus er eveneens voor instaan dat micro-organismen die een vreemd biotoop binnentreden waarin zij normaal niet kunnen ontwikkelen — bijvoorbeeld pathogene microben die het menselijke of dierlijk lichaam na infectie verlaten en in het oppervlaktewater terecht komen — toch voor lange tijd in leven kunnen blijven dank zij de beschermende werking van componenten in het micro-milieu en niettegenstaande de ongunstige factoren van het macro-milieu.

Het meten van de fysische en chemische kenmerken van het macro-milieu stelt gewoonlijk geen grote problemen. Fysische en chemische analysemethoden werden hiervoor uitgewerkt. De analyse van het micro-milieu is echter veel moeilijker en hiervoor dient men beroep te doen op microscopische technieken en micro-manipulatie.

Zoals reeds gesteld oefenen de micro-organismen eveneens invloeden uit op het milieu. De ware bewoners van een biotoop, ook *autochtone* soorten genoemd, groeien en vermeerderen in hun milieu en dragen bij tot de algehele metabolische activiteiten van de gemeenschap. De vreemde of *allochtone* species vinden hun oorsprong in andere gemeenschappen, doch kwamen terecht in een nieuwe gemeenschap. Deze indringers kunnen zich soms voor een bepaalde tijd in stand houden, doch worden meestal vrij vlg door de autochtone gemeenschap verdrongen.

Sommige habitaten vertonen een groot aantal micro-organismen terwijl andere eerder dun bevolkt zijn. Een biotoop dat rijk is aan voedingsstoffen bevat meestal een groot aantal micro-organismen, tenzij de milieufactoren zoals zeer lage of hoge pH, hoge

temperatuur, hoge zoutconcentraties en zo meer, zeer drastisch optreden.

Niet alleen de kwantitatieve aanwezigheid van de micro-organismen in een biotoop is van belang, maar ook de species diversiteit. Een ruime species diversiteit wordt meestal aangetroffen in deze biotopen die onderhevig zijn aan normale fysische en chemische milieufactoren en slechts matig voorzien worden van nutritieve elementen. Voorbeelden hiervan zijn de bodem, vijvers, rivieren en oceanen. Een middelmatige species diversiteit tenslotte treft men aan in milieus die aan normale milieufactoren onderhevig zijn, doch zeer rijk voorzien worden van voedende bestanddelen. Onder deze omstandigheden ontwikkelen zich een beperkt aantal species in dergelijke mate dat vele andere soorten volkomen verdrongen worden. Verontreinigde waterlopen, zwaar bemeste gronden, bepaalde industriële afvalwaters zijn hier typische voorbeelden van.

Een belangrijk kenmerk van microbiële gemeenschappen met een grote species diversiteit is, dat zij gewoonlijk vrij stabiel zijn en bepaalde invloeden op het milieu tot in zekere mate kunnen ondervangen door lichte relatieve wijzigingen in de onderlinge populaties. De microbiële gemeenschap bezit de genetische versatiliteit om zich aan de stress op het milieu te adapteren. In tegenstelling met deze stabiele gemeenschappen staan de microbiële gemeenschappen die tengevolge van de hoge nutritieve rijkdom van de biotoop een geringe species diversiteit hebben. Biotische zowel als abiotische alteraties van het milieu zijn meestal fataal voor dergelijke gevestigde populaties en zij worden bij geringe veranderingen in het milieu verdrongen door een groep van populaties die beter aangepast is. Een goede illustratie hiervan is het plotse doch kortstondig opbloeien van bepaalde algensoorten in verontreinigde aquatische biotopen dat vaak in de zomermaanden kan opgemerkt worden.

Micro-organismen groeien in een milieu wanneer zij voorzien worden van de aangepaste energiebron en de nodige voedingsstoffen (koolstof- en stikstofverbindingen, mineralen) evenals van de eventueel noodzakelijke groeifactoren. Zowel in de atmosfeer als in het water en de bodem is het zonlicht de primaire energiebron. De organismen die in een bepaald ecosysteem deze originele energiebron benutten noemt men primaire producenten. Andere populaties, secundaire producenten genoemd, bekomen hun energie en hun voedingsstoffen door het benutten van de afscheidingsprodukten van de primaire populaties of door deze laatste te parasiteren. Deze secundaire populaties worden op hun beurt als voedingsbron benut door andere macro-organismen en zo verloopt de voedselketen verder. Enkele vereenvoudigde voedselketens zijn weergegeven in Figuur 2.

De ontwikkeling van micro-organismen in een bepaald biotoop wordt geconditioneerd door de interacties die tussen de micro-organismen kunnen optreden. Microbiële populaties leven soms samen zonder elkaar voor- of nadeel te berokkenen; deze afwezigheid van interactie noemt men *neutralisme*. Wanneer een populatie voordeel haalt uit de aanwezigheid van een andere spreekt men van *commensalisme*. Een voorbeeld hiervan is de associatie tussen microben en sommige blauw-groene algen in oppervlaktewater. Deze algen fixeren de stikstof uit de atmosfeer en scheiden de getransformeerde stikstof gedeeltelijk als eiwitten af. De microben geassocieerd met deze algen benutten deze eiwitten als koolstof- en stikstofbron. De term *symbiose* of *mutualisme* omschrijft de associatie tussen twee species welke onderling van elkaar afhankelijk zijn voor succesvolle proliferatie in een bepaald ecosysteem. Talrijke symbiotische associaties zijn bekend, zowel tussen micro-organismen onderling als tussen micro-organismen en macro-organismen. Voorbeelden hiervan zijn de korstmossen bestaande uit een alge en een fungus en de stikstoffixerende vlinderbloemigen die bestaan uit een vlinderbloemige plant en een specifieke *Rhizobium* bacterie. Deze symbiotische associaties zijn niet alleen specifiek maar ook fragiel en aldus onderhevig aan milieuveranderingen. Zo zijn korstmossen erg gevoelig aan luchtverontreiniging, in dergelijke mate zelfs dat hun al of niet aanwezigheid in een ecosysteem een goede biologische index is voor de kwaliteit van de lucht in dat milieu. Micro-organismen kunnen met elkaar ook in *competitie* treden voor een bepaalde voedingsstof of voor een energiebron en zelfs voor plaats en ruimte. Onder *antagonisme* of amensalisme verstaat men de toestand waarbij een bepaald organisme een andere nadelig beïnvloedt. Tal van algen, schimmels en microben scheiden toxische stoffen af in hun omgeving die de omringende biota somtijds sterk en niet-selectief kunnen afremmen. *Parasitisme* tenslotte omvat deze interacties waarbij een organisme rechtstreeks een ander aanvalt en er zich mede voedt. De parasiet voedt zich met delen, weefsels of lichaamsvochten van een ander organisme.

Methodologie

De ideale methode voor de studie van de microbiële ecologie zou er in bestaan de micro-organismen in hun natuurlijke biocenosen te onderzoeken. De heterogeniteit van de natuurlijke biotopen en de uiterst geringe afmetingen van de individuele microbiële cellen maken een dergelijke methodiek praktisch onuitvoerbaar. Wanneer men echter de individuele elementen buiten beschouwing laat en alleen de

studie willen maken van de gemeenschap van deze elementen, wordt het probleem eenvoudiger. De microbiële ecologie is dan ook zo geëvolueerd dat men de microscopische activiteiten tracht te benaderen op een macroscopische schaal. In de studie van de microbiële ecologie kan men: 1) de micro-organismen als microscopische wezens benaderen en hun interacties microscopisch bestuderen; 2) een uitgekozen habitat aanzien als een macroscopisch systeem dat micro-organismen bevat en het als een geheel bestuderen zonder rekening te houden met de individuele cellen als dusdanig; 3) het microscopische en macroscopische onderzoek simultaan uitvoeren op verschillende onderdelen van de biotoop. In het eerste geval verricht men een analytische studie van de biotoop en doet men aan *autecologie*, in het tweede benadert men het probleem op een synthetische of integratieve wijze en doet men aan *synecologie*.

1. Directe microscopische enumeratie

De meest geschikte methode voor het tellen van protozoa en algen in natuurlijke biotopen is het gebruiken van de microscopische techniek. Deze micro-organismen zijn groot genoeg om met de microscoop te worden waargenomen en hun structuur is zo complex en verschillend dat zij microscopisch kunnen geklassificeerd worden. Voor de algen is de microscopische methode alleen gangbaar voor de ééncellige species. Immers de cellen zijn ongeveer van dezelfde afmetingen en dus vergelijkbaar onderling.

Een directe telling van microben in aquatische biotopen werd uitgewerkt door Collins (1957). Deze methode kan als volgt worden geresumeerd. Hoeveelheden van 10^{-2} ml van een watermonster worden gekleurd met gentianaviolet in een glycerol-water mengsel en geconcentreerd onder vacuum. Het overblijvende residu bevat glycerol en gekleurde microben. Glascapillairen worden gevuld met het residu en het volume ervan wordt bepaald. De micro-organismen worden hierin microscopisch geteld.

Door Brock (1966) werd een radioautografische methode ontwikkeld. Gemerkte voedingsstoffen (bv. ^{14}C -glutamaat) worden aan het aquatisch milieu toegevoegd. Na incubatie gedurende een bepaalde tijd wordt een radioautografische opname gemaakt. Uitgevoerd op algen, toegevoegd aan zeewater, liet deze methode toe een telling uit te voeren en gelijktijdig biochemische transformaties in de cellen vast te stellen.

Door Jones en Mollison (1948) en Allen (1957) werden eveneens technieken uitgewerkt voor de directe microscopische enumeratie

van microben en schimmels in de bodem. De eerst genoemde auteurs gaan als volgt te werk. Na wassen van de afgewogen hoeveelheid grond met steriel water, wordt de waterige fase gemengd met een vloeibare agaroplossing en uitgespreid op een telkamer. Het vastgeworden vliesje wordt verwijderd (het bezit een dikte van 0,1 mm) en gekleurd. Na drogen telt men de gekleurde micro-organismen onder de microscoop. Deze methodes laten niet toe een onderscheid te maken tussen levende en dode microben en schimmels. Verder is het niet mogelijk waargenomen micro-organismen te klassifiëren bij gebrek aan gedifferentieerde structuren.

2. Isolatie technieken

Wanneer een micro-organisme in een aangepaste voedingsbodem wordt gebracht, zal na inkubatie een kolonie of "clone" worden gevormd. Bij het tellen van het aantal kolonies is het op deze wijze mogelijk een inzicht te verkrijgen in het aantal oorspronkelijke aanwezige cellen. Men kan hiertoe gebruik maken van dilutietechnieken in steriel water en uitplaten van een gekend aliquot van iedere dilutie op een voedingsbodem (optimaal samengesteld) waaraan een stijvmiddel zoals gelatine of agar werd toegevoegd. Zo werden technieken ontwikkeld voor het tellen van micro-organismen in zoet water (American Public Health Association, 1971) en zeewater (ZoBell, 1946) en in de bodem (Allen, 1957).

De kwantitatieve estimaties van micro-organismen door culturele isolatie technieken zijn nooit exact. Inderdaad het is niet mogelijk om een universeel groeimedium samen te stellen waarop, zij het afzonderlijk, het totaal aantal microben of het totaal aantal schimmels kan bepaald worden. De groeivereisten van de micro-organismen behorende tot een zelfde groep zijn immers zo uiteenlopend dat zij op een bepaald groeimedium niet simultaan kunnen ontwikkelen. Kwantitatieve tellingen, gebruik makend van selectieve groeimedia, laten alleen toe bepaalde populaties in gelijkaardige biotopen in aantal met elkaar te vergelijken.

Ecologische studies van micro-organismen in verschillende biotopen hebben uitgewezen dat niet zo zeer het totaal aantal micro-organismen van belang is, maar veeleer de kwantitatieve aanwezigheid en de activiteit van de belangrijke *functionele groepen*. Zowel in aquatische milieus als in de bodem komen de volgende essentiële functionele groepen voor :

- de foto-lithotrofe micro-organismen
- de chemo-lithotrofe micro-organismen
 - de nitrificerende die ammoniumzouten oxyderen tot nitrieten en nitraten

- de ijzeroxyderende die ferro-zouten oxyderen tot ferri-zouten
- de zwaveloxyderende die gereduceerde zwavelverbindingen oxyderen tot zwavel en sulfaten
- de chemo-organotrofe micro-organismen
 - de stikstoffixerende die de stikstof uit de atmosfeer kunnen assimuleren en transformeren
 - de cellulolytische, amylolytische en pectinolytische die respectievelijk cellulose, zetmeel en pectinen hydrolyseren en metaboliseren
 - deze die allerlei organische koolstofverbindingen kunnen metaboliseren: proteïnen, koolhydraten, koolwaterstoffen, lipiden, enz...
 - de denitrificerende die de nitraten reduceren tot elementaire stikstof
 - de micro-organismen die de metalen transformeren zoals fosfor, magnesium, mangaan, kwik, enz..

Voor ieder van deze functionele groepen werden voedingsmedia samengesteld waardoor het mogelijk is hun aantal in optimale omstandigheden in natuurlijke biotopen te bepalen.

Relatief weinig onderzoekingen zijn gedaan betreffende de verdeling van de verschillende fysiologische groepen van micro-organismen in aquatische biotopen. Het totaal aantal en de kwantitatieve aanwezigheid van de verschillende functionele groepen in aquatische biotopen is immers sterk verschillend en afhankelijk van de verontreinigingsgraad van het systeem. Op basis van het zogenaamde "Saprobiesysteem", ontwikkeld in Duitsland, deelt men de aquatische ecosystemen in op basis van de biotische gemeenschappen (micro-en macro-organismen) die zij bevatten. Zo onderscheidt men :

1. de oligosaprobe systemen : dit zijn niet verontreinigde aquatische biotopen die minder dan 100 kiemen per ml water bevatten. Weinig protozoa, doch tal van groene en rode algen zijn aanwezig. Ook komen tal van raderdiertjes, slakken en insektenlarven voor.
2. β -mesosaprobe systemen : dit zijn zwak verontreinigde aquatische milieus waarvan het kiemgehalte niet hoger is dan 10.000 per ml. Talrijke protozoa, blauw-groene en groene algen zijn aanwezig. Ook mosselen, raderdiertjes en insektenlarven zijn talrijk vertegenwoordigd.
3. α -mesosaprobe systemen : deze zijn sterk verontreinigd. Het kiemgetal bedraagt 10^5 /ml. De protozoa en voornamelijk de ciliaten zijn talrijk. De blauw-groene en groen algen ontwikkelen vaak explosief.
4. de polysaprobe systemen : deze aquatische biotopen zijn zeer sterk verontreinigd. Het kiemgetal bedraagt 10^6 /ml en meer.

Voornamelijk bacteriën en protozoa maken de hoofdpopulaties uit. Praktisch geen hogere planten en dieren zijn nog aanwezig.

Het aantal micro-organismen dat in een bepaald aquatisch biotoop voorkomt, vertoont aanzienlijke variaties. Deze variaties zijn groter in stromen en rivieren dan in meren of andere stagnerende waters. Deze variaties worden beïnvloed door de temperatuur, de waterturbulentie, de intensiteit van het zonlicht, de seizoenen, de regenneerslag en voornamelijk door de aanvoer van biogene³ en xenobiontische⁴ afvalstoffen.

Door het volgen, in functie van de tijd, van de variaties die optreden in het totaal aantal micro-organismen, maar voornamelijk in de kwantitatieve aanwezigheid van de functionele microbiële groepen, is het mogelijk de verontreiniging van aquatische biotopen op te sporen.

Uitgebreide ecologische studies werden ondernemen betreffende de micro-organismen aanwezig in de bodem. Gezien het direct contact tussen de bodem en het oppervlaktewater worden praktisch dezelfde functionele microbiële groepen in beide ecosystemen aangetroffen. Gezien de variaties in de microbiële populaties van de bodem trager verlopen dan in aquatische biotopen, treft men in de bodem een meer uitgesproken microbiële stabiliteit aan. De variaties die worden waargenomen in de totale microflora en in de kwantitatieve samenstelling van de functionele groepen worden voornamelijk in de hand gewerkt door de veranderingen in temperatuur, vochtgehalte en bemesting. Seizoenschommelingen in de microflora als gevolg van deze uitwendige factoren zijn goed reproduceerbaar. De verschillende technieken die werden op punt gesteld om de kwantitatieve enumeratie van de functionele microbiële groepen in de bodem te bepalen zijn dan ook voldoende betrouwbaar.

Bij het ecologisch onderzoek van natuurlijke biotopen wordt de microbioloog onvermijdelijk geconfronteerd met de *taxonomische betekenis* van de geïsoleerde micro-organismen. In de microbiologie is immers de zuivere stam of de "clone" - een populatie van genetisch identische cellen - de basis van de taxonomische classificatie. Iedere microbenstam onderscheidt zich van alle andere door een collectief geheel van kenmerkende eigenschappen. Twee stammen zijn verwant wanneer zij de meeste van deze eigenschappen gemeen hebben. Hoe verder de fylogenetische afstand van twee stammen, hoe minder fenotypische eigenschappen zij gemeenschappelijk bezitten. Voor de ecooloog is het verwantschap tussen twee microbiële stammen van minder belang dan het feit dat zij zich ecologisch op gelijkaardige wijze gedragen. Het is meestal axiomatisch dat iedere microbiële stam

geïsoleerd uit een natuurlijk biotoop verschilt van alle andere stammen, op voorwaarde dat men voldoende onderzoek instelt naar de verschillende eigenschappen. Wat de microbioloog voornamelijk aanbelangt, is te weten of twee stammen verschillen in één of meerdere eigenschappen die ecologisch belangrijk zijn.

Wanneer twee morfologisch verschillende micro-organismen bekwaam zijn om ureum-herbiciden, zoals bijvoorbeeld Monolinuron, af te breken en men voornamelijk aandacht besteedt aan deze biodegradatie, dan is de taxonomische classificatie van deze micro-organismen van geringe betekenis. Daarentegen, wanneer men voornamelijk belang stelt in het feit dat een welbepaalde microbiële stam in een specifiek milieu wordt aangetroffen, dan zal men deze eigenschappen in de eerste plaats opzoeken die toelaten het micro-organisme te identificeren en minder aandacht besteden aan de kenmerken die van geringe ecologische betekenis zijn.

Zo zijn de immunologische determinatie technieken, de typering met bacteriofagen en de genetische eigenschappen zeer bruikbare technieken voor het identificeren van micro-organismen, zelfs wanneer de bestudeerde eigenschappen slechts een indirecte uiting zijn van ecologisch belangrijke kenmerken. Naar onze mening is het niet zo zeer belangrijk om van een micro-organisme zijn taxonomische kenmerken op te sporen, maar dient voornamelijk aandacht besteed te worden aan deze eigenschappen die van primordiaal belang zijn met betrek tot zijn rol en functie in natuurlijke milieus.

De biochemische activiteiten die de micro-organismen aan de dag leggen zijn dan ook van uitgesproken betekenis voor de ecologische studies van natuurlijke biotopen.

3. Biochemische technieken

Micro-organismen, evenals alle levende cellen, vertonen verschillende biochemische activiteiten. Door het feit dat een microbecel een groot arsenaal bezit van enzymes⁵ is zij bekwaam talrijke transformaties uit te voeren op chemische verbindingen die kunnen geabsorbeerd worden. Vandaar dat in natuurlijke biotopen alle biogene stoffen en vele xenobiontische verbindingen een microbiële degradatie kunnen ondergaan.

De biodegradatie van voedingsstoffen, die ook als energiebron worden aangewend, door de micro-organismen geeft in de eerste plaats aanleiding tot een toename van de functionele groep die zich met het metabolisme van deze verbindingen zal inlaten. Zo zal onvermijdelijk het lozen van afvalwaters, rijk aan proteïnen, in een

oligosaproob aquatisch milieu een toename voor gevolg hebben van de proteolytische microflora. Deze toename kan kwantitatief gevolgd worden door de isolatietechniek toe te passen voor het enumereren van de eiwitplitsende micro-organismen. Door het feit dat de proteolyse gepaard gaat met een intensieve ammoniakproductie kan de lozing van eiwithoudende afvalwaters in een waterloop worden bevestigd door een stijging van het ammoniakgehalte. De vrijstelling van ammoniak door microbiële proteolyse is een indicatief biochemisch proces dat door een colorimetrische ammoniak dosage kwantitatief kan worden gevolgd.

De biodegradatie van biogene en xenobiontische verbindingen in natuurlijke biotopen, zowel water als bodem, verloopt meestal op aërobe wijze, waardoor de micro-organismen zuurstof onttrekken aan hun milieu. Zo stelt men vast dat de hoeveelheid opgeloste zuurstof in een oligosaproob aquatisch systeem bij 20°C gemiddeld 10 mg per liter bedraagt. De lozing van afbreekbare verbindingen in een dergelijk systeem gaat niet alleen gepaard met een explosieve toename van functionele microbiële groepen, maar tevens met een uitgesproken afname van de opgeloste zuurstof in het milieu. Deze daling van de opgeloste zuurstof, als gevolg van een toenemende microbiële activiteit, is gecorreleerd met de toename of groei van de microbiële entiteiten.

De evolutie van het zuurstofverbruik kan nu rechtstreeks potentiometrisch worden gemeten in de waterloop op verschillende afstanden van het lozingspunt door gebruik te maken van zuurstof elektroden. Een andere methode bestaat er in de biochemische zuurstofbehoefte of B.O.D. (= biochemical oxygen demand) te bepalen in verontreinigde waters. Men bepaalt hiervoor de hoeveelheid opgeloste zuurstof op het ogenblik van de monsternamming. Het watermonster wordt vervolgens in een gesloten fles bij 20°C geïncubeerd gedurende 5 dagen. Daarna bepaalt men opnieuw de hoeveelheid aanwezige opgeloste zuurstof. De hoeveelheid zuurstof die werd verbruikt is deze die door de aanwezige micro-organismen werd aangewend voor de biodegradatie van de verontreinigde afvalstoffen.

In bijgaande Figuur 3 wordt een beeld opgehangen van het verloop van de microbiële groei en het zuurstofverbruik bij de lozing van biodegradeerbaar materiaal in een oligosaprobe waterloop.

Op deze wijze kan het zelfreinigend vermogen of de autoepuratie van waterlopen nauwkeurig worden bepaald en berekend, hetgeen van primordiaal belang is voor de watervoorziening. Immers wanneer blijkt dat door overmatige lozing van afvalstoffen, het zuurstofgehalte zeer laag ($< 2 \text{ mg O}_2/\text{liter}$) en de B.O.D. evenals het aantal

micro-organismen zeer hoog blijven en geen auto-epuratie meer optreedt in een verontreinigde waterloop, dan is dit oppervlaktewater niet alleen niet meer geschikt voor drinkwaterwinning, maar betekent tevens een reëel gevaar voor de volksgezondheid en de hygiëne van de huisdieren.

Met de respiratorische techniek volgens Warburg is het mogelijk het zuurstofverbruik van micro-organismen kwantitatief te meten zowel in water als in de bodem. Principieel bestaat de werkwijze er in het aantal microliter zuurstofgas dat door de micro-organismen verbruikt wordt, volumetrisch en in functie van de tijd te bepalen. De Warburg respiratietechniek kan op monsters van natuurlijke biotopen uitgevoerd worden bij verschillende incubatietemperaturen. In bijgaande Figuur 4 wordt een respirometer schematisch voorgesteld. Met deze techniek is het mogelijk, door toevoeging van verschillende substraten, de hoeveelheid zuurstof te meten die de micro-organismen zullen verbruiken bij de oxydatieve biodegradatie er van en de tijd te bepalen die noodzakelijk is voor deze afbraak. Tevens kan met deze techniek de invloed worden nagegaan van toxische verbindingen op de natuurlijke activiteit van de micro-organismen in natuurlijke biotopen.

Recent werd het Sapromat toestel op de markt gebracht voor het uitvoeren van zuurstofmetingen in natuurlijke biotopen. Deze metingen zijn gesteund op dezelfde principes als deze die van toepassing zijn in de Warburg techniek. Het Sapromat toestel laat echter toe de respiratie kwantitatief te volgen op een grotere hoeveelheid monster water of grond (\pm 330 ml). Verder is het meetbereik van de zuurstofconsumptie praktisch onbeperkt, vermits de hoeveelheid verbruikte zuurstof stelselmatig elektronisch wordt aangevuld. Het Sapromat toestel is schematisch weergegeven in Figuur 5.

De respiratie van de microbiota in de bodem kan ook gemeten worden aan de hand van de CO₂ produktie. Verschillende werkwijzen werden in dit verband ontwikkeld :

- Een afgewogen hoeveelheid grond wordt in een afgesloten bokaal geplaatst. Aan het oppervlak van de grond stelt men een kleine beker die een gekende hoeveelheid natriumhydroxide oplossing bevat. De gevormde CO₂ die wordt vrijgesteld uit de grond wordt door de natriumhydroxyde oplossing geabsorbeerd. Door titratie kan men in functie van de incubatietijd de hoeveelheid geabsorbeerde CO₂ kwantitatief bepalen.
- In situ metingen van de CO₂ vorming in het veld met de Koepf-methode. Met behulp van een speciaal ontworpen apparaat dat toelaat de gasfase van de bodem te bemonsteren kan de

- respiratiesnelheid in deze biotoop kwantitatief worden gevolgd.
- Een bodemmonster wordt gemengd met een radio-actieve gemerkte glucose oplossing en de vrijstelling van radio-actief CO_2 wordt kwantitatief gemeten. De incubatie van het bodemmonster samen met de radio-actieve glucose geschiedt onder wel gecontroleerde omstandigheden. In functie van de tijd kan men aldus het metabolisme van glucose door de microbiota kwantitatief volgen. Naast de snelheid van de CO_2 vorming kan tijdens deze bepalingen eveneens een inzicht worden verkregen betreffende de biochemische aspecten van deze glucose afbraak. Immers wanneer men glucose moleculen introduceert in de bodem die op verschillende koolstof atomen gemerkt zijn, kan men door de $^{14}\text{CO}_2$ evolutie de "pathway" van de glucose biodegradatie vastleggen. Vermits de bodem alleen werd aangerijkt met glucose verkrijgt men met deze techniek alleen een beeld van de activiteit van de glucose afbrekende microbiota. Niet alle micro-organismen aanwezig in de bodem zijn bekwaam glucose te biodegraderen. Men mag echter wel aannemen dat een groot aantal organotrofe micro-organismen hiertoe wel in staat zijn, zodat de $^{14}\text{CO}_2$ metingen na toevoeging van radioactieve glucose wel als een vergelijkende maat kunnen beschouwd worden voor de respiratiecapaciteit van de microbiota in verschillende gronden.

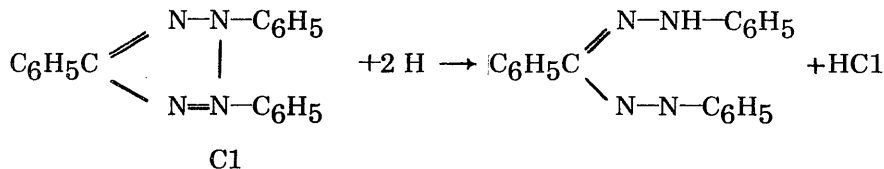
Zoals reeds gesteld vertonen de microbiota in natuurlijke biotopen specifieke enzymatische activiteiten. Inderdaad vele micro-organismen zijn bekwaam extracellulaire enzymen in hun biotoop te produceren, zoals de saccharase, fosfatasen, de urease, β -glucosidasen, enz.. Deze extracellulaire enzymenproductie door de micro-organismen is het gevolg van het feit dat de cellen bepaalde substraten zoals koolhydraten, eiwitten, organische fosforverbindingen alleen kunnen metaboliseren wanneer deze macro-moleculen buiten de microbecel worden gehydrolyseerd tot kleinere moleculen.

Door Voets en Dedeken (1966), Hofman en Hoffmann (1966) en Skuijns (1967) werden de methodes beschreven voor de dosage van vrije enzymen in de bodem. Deze methodes kunnen als volgt geresumeerd worden. Aan 10-20 g luchtdroge grond (1-4% vochtgehalte), nauwkeurig afgewogen in een maatkolf van 100 ml wordt 1,5-2,5 ml toluen toegevoegd. Na 15 minuten schudden worden respectievelijk toegevoegd 20 ml van een substraat oplossing en 20 ml van een bufferoplossing (met optimale pH voor de enzymatische reactie). Vervolgens laat men het maatkolfje met zijn inhoud 3-24 uren incuberen bij 37°C . Na aanlengen met gedistilleerd water tot de merkstreep wordt gefiltreerd en in het filtraat worden de reactieproducten, ontstaan door de vrije enzymatische activiteit,

colorimetrisch gedoseerd. Met deze methode, waarbij voornamelijk de *hydrolytische enzymen* in de bodem worden bepaald, is het mogelijk een inzicht te verkrijgen betreffende de biochemische activiteiten van de micro-organismen in de bodem. Het toevoegen van toluen tijdens de bepaling van de vrije enzymatische activiteit heeft tot doel de groei van de micro-organismen te inhiberen, evenals de absorptie van het toegevoegde substraat en het microbiel metabolisme ervan. De dosages van de vrije hydrolytische enzymen in de bodem laten eveneens toe de invloed na te gaan van de bemesting en de pesticiden op de activiteit van de microbiota.

De redox-transformaties die door de microbiota worden teweeggebracht in natuurlijke biotopen kunnen eveneens bepaald worden. Deze redox-transformaties berusten op de activiteit van de *oxydo-reductieve enzymen* die intracellulair in de micro-organismen voorkomen.

Voor de kwantitatieve bepaling van deze enzymatische activiteiten doet men beroep op redox-indicatoren zoals methyleenblauw, resazurine en 2,3,5-trifenylnitro-tetrazolium chloride (TTC). Het kleurloze en wateroplosbare TTC wordt aan een bepaalde hoeveelheid grond toegevoegd. Na verschillende incubatietijden bij 37°C en in de aan- of afwezigheid van een gereduceerd substraat (glucose) wordt het mengsel geëxtraheerd met een organische solvent (aceton). Het TTC werd door de microbiële dehydrogenasen omgezet tot het water onoplosbare formazan dat een specifieke rode kleur vertoont en kan geëxtraheerd worden met een organische oplosmiddel. De hoeveelheid gevormde formazan wordt vervolgens kwantitatief colorimetrisch gedoseerd. De vorming van het formazan door microbiële oxydatie van het TTC wordt voorgesteld in volgende reactie :



Met de TTC techniek is het mogelijk de microbiële activiteit in de bodem te meten door de snelheid van de formazan vorming kwantitatief te volgen.

Deze techniek laat eveneens toe de invloed na te gaan van bodemverontreinigde stoffen op de natuurlijke activiteit van de microbiota.

De enzymatische methodes die beschreven werden om de microbiële activiteit te benaderen in de bodem zijn eveneens geldig voor aquatische biotopen. Recente onderzoeken hieromtrent werden ondernomen door Verstraete en Voets (1973).

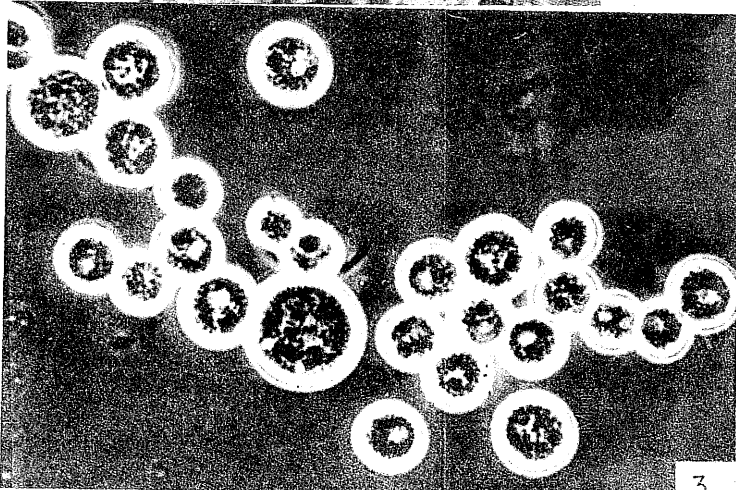
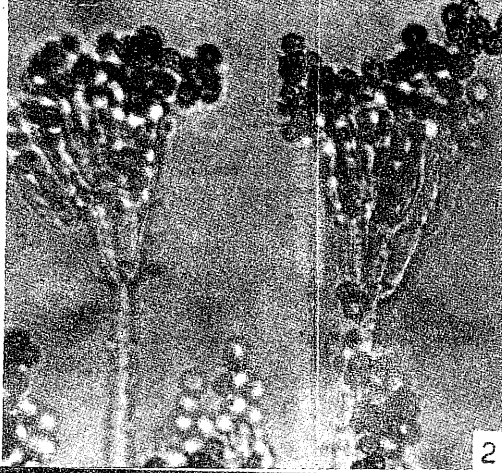
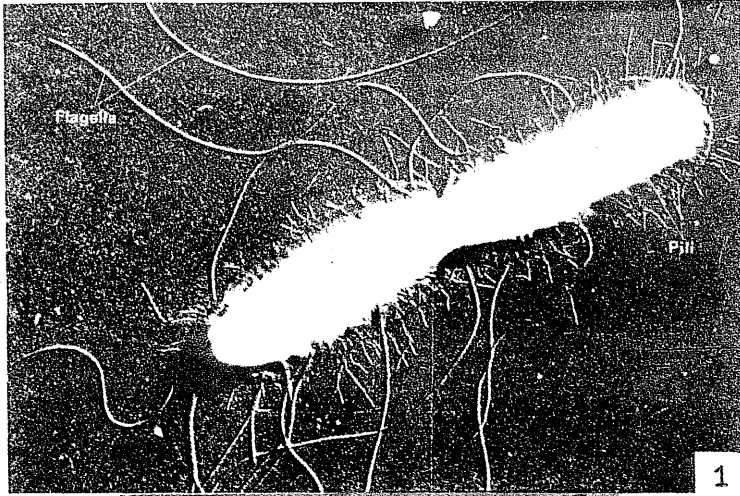
Besluit

De studie van de microbiële ecologie in natuurlijke biotopen is in de laatste twee decennia uitgegroeid tot een voornamelijk tak van de microbiologische wetenschap. De reden hiervan is dat ieder biotoop zijn kenmerkende microbiota vertoont en dat het aantal en de functies van deze microbiota de leefbaarheid bepalen van de biotoop. Zo is de bodem een levend organisme en hangt de fertiliteit er van rechtstreeks af van de activiteit van de functionele groepen van micro-organismen die deze biotoop bewonen. De zuiverheid van oppervlaktewater dient toegeschreven te worden aan de activiteit van de micro-organismen die de accidenteel of opzettelijk geloosde afvalstoffen, indien zij biodegradeerbaar zijn, kunnen afbreken.

Niet alleen de kennis van de morfologie en de taxonomische positie van de microbiota in natuurlijke biotopen is van belang, maar vooral de interacties en de biochemische activiteiten die de micro-organismen op elkaar en in hun milieu uitoefenen. Vandaar dat de studie van de microbiota in natuurlijke biotopen niet alleen met microscopische en culturele isolatie technieken dient gevoerd te worden, maar eveneens door meting van de biochemische activiteiten.

Het bewaren van de bodem en het oppervlaktewater in optimale omstandigheden is een van de belangrijkste aspecten van het milieubeheer. Een grondige kennis van de microbiële ecologie van deze biotopen is hiertoe noodzakelijk. Meer uitgebreid gesubsidieerd onderzoek op dit gebied is dan ook noodzakelijk. Immers het is slechts door een diepgaande kennis van de microbiële ecologie dat men de "Lebensfähigkeit" van de natuurlijke biotopen zal doorgronden en verontreinigingen die een blijvende en schadelijke invloed op de levensfuncties en de gezondheid van mens, dier en plant zal kunnen opsporen en voorkomen.

*Laboratorium voor Algemene en Industriële Microbiologie
Rijksuniversiteit Gent.*



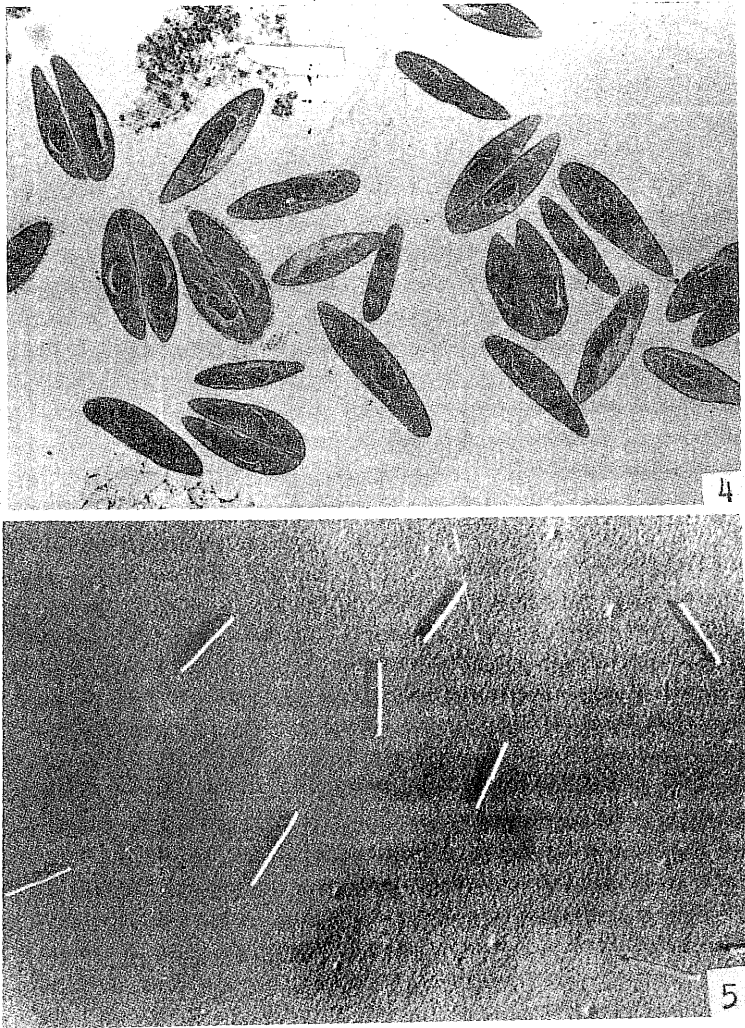


Fig. 1. Vertegenwoordigers van verschillende groepen van micro-organismen.

1 = Microbecel in deling (*Escherichia coli*) — 2 = Fungi (*Penicillium* spp.) — 3 = Groene alg (*Chlorophyta* spp) — 4 = Protozoa (*Paramecium* spp.) — 5 = Virus (*Tabak mozaïekvirus*)

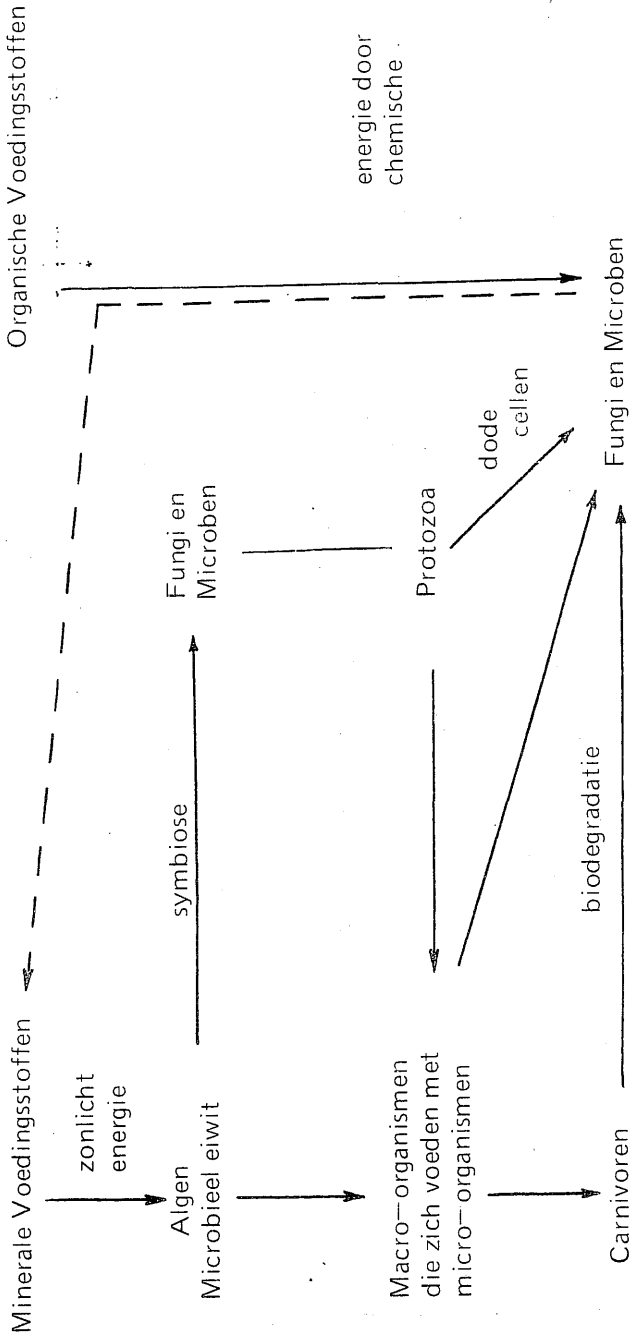
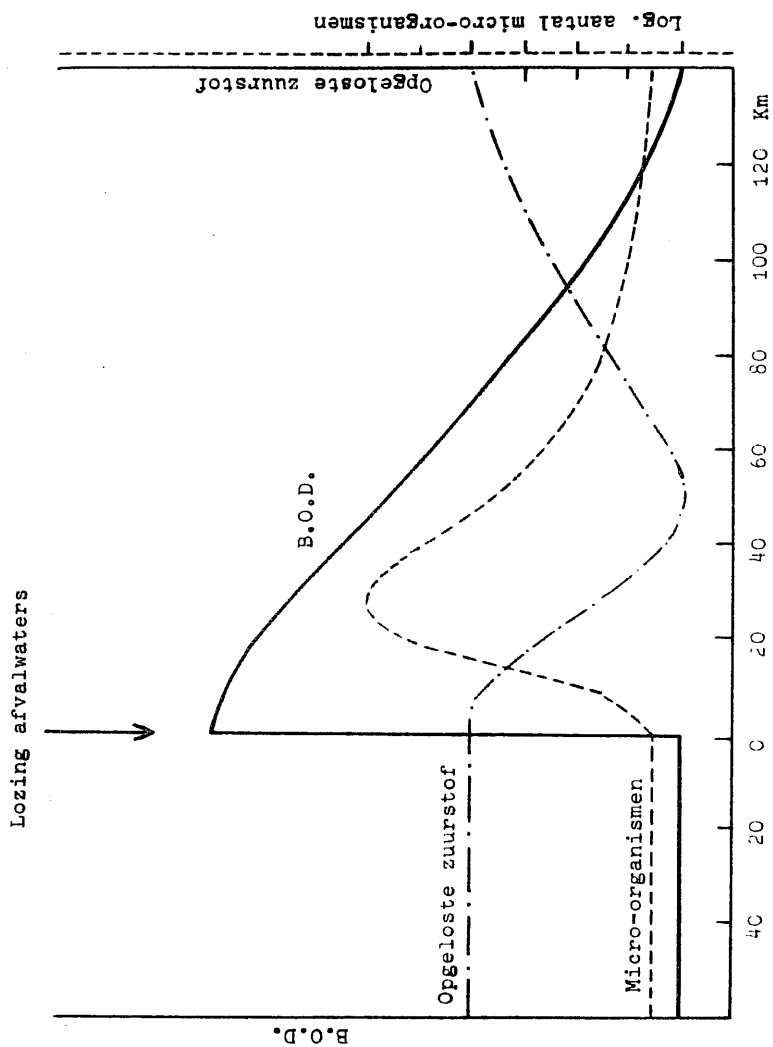


Fig. 2. Enkele vereenvoudigde voedselketens in water



Figuur 3. Evolutie van B.O.D., opgeloste zuurstof en logaritmische aantal micro-organismen in een oligosaprobe waterloop bij lozing van afvalwaters.

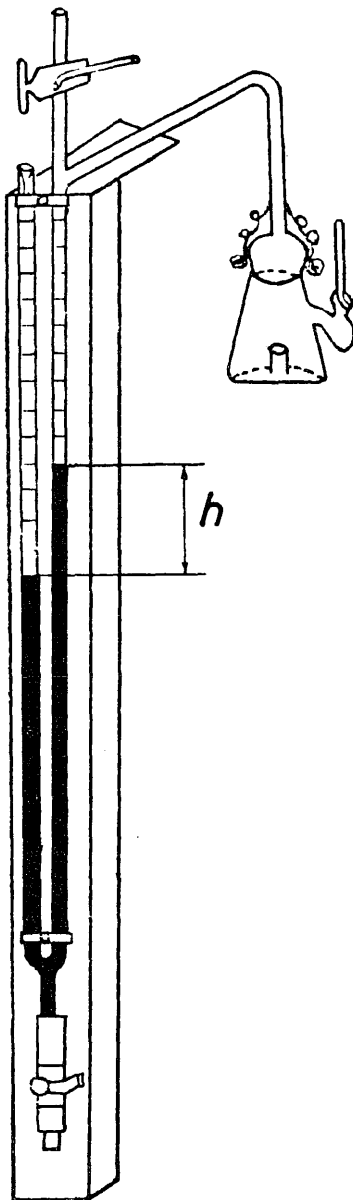


Fig. 4. Schematische voorstelling van een Warburg respirometer

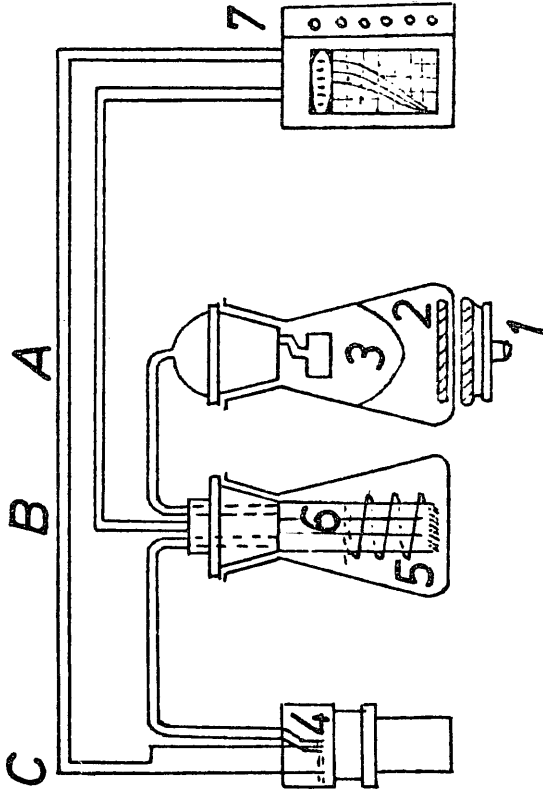


Fig. 5. Schematische voorstelling van een Sapro-mat meetcel
 A = meetcel — B = zuurstofcel — C = drukindikator
 1 = magneetroeder — 2 = monster — 3 = CO₂ adsorbens — 4 =
 drukindikator — 5 = electrolyt — 6 = elektroden — 7 =
 registreerapparaat

Nota's

¹“Cells and their environment, including other cells. in : M.J. Brennan and W.L. Simpson, (eds.), *Biological Interactions in normal and neoplastic growth; a contribution to the host-tumor problem*, Little Brown, Boston, 1962.

²Eucaryotische cellen vertonen een nucleolus- of kernwand; bij procaryotisch cellen is deze wand niet aanwezig.

³Biogene stoffen zijn deze die op natuurlijke wijze voorkomen in plantaardige en dierlijke producten.

⁴Xenobiontische stoffen worden door industriële synthese geproduceerd. Sommige xenobiontische verbindingen kunnen in hun chemische structuur een analogie vertonen met biogene stoffen.

⁵Enzymes zijn organische katalysatoren die in de levende cel aanwezig zijn en de snelheid bepalen van de chemische transformaties. In één microbecel zijn zowat 800-1000 enzymes aanwezig.

Literatuur

Alexander, M., 1971, *Microbial ecology*, J. Wiley and Sons, Inc. New York.

Allen, O.N., 1957, *Experiments in soil bacteriology*, 3d ed., Burgess Publ. Co, Minneapolis.

American Public Health Association, 1971, *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 1740 Broadway, New York.

Brock, T.D., 1966, *Principles of microbial ecology*, Prentice Hall, Inc., London.

Brock, T.D. and M.L. Brock, 1966 “Autoradiography as a tool in microbial ecology”, in *Nature*, 209, 734.

Collins, V.G. and C. Kipling, 1957, “The enumeration of waterborne bacteria by a new direct count method”, in *J. Appl. Bact.*, 20, 257.

Hofmann, E.D. und G.G. Hoffmann, 1966, *Advances in Enzymology*, 28, 365.

Jones, P.C.T. and J.E. Mollison, 1948, “A technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms”, in *J. Gen. Microb.*, 2, 54.

Odum, E.P., 1959, *Fundamentals of ecology*, W.B. Saunders Co, London.

- Skuijns, J.J., 1967, "Enzymes in soil", p. 371, in *Soil Biochemistry*, A. Mc Laren and G.H. Peterson, (eds.), Marcel Dekker Inc., New York.
- Verstraete, W., J.P. Voets and P. Van Lancker, 1973, "Evaluation of some enzymatic methods to measure the bio-activity of aquatic environments", in Abstr. FEBS Special Meeting, Dublin, 125.
- Voets, J.P. and M. Dedeken, 1966, "Soil enzymes", *Meded. Fac. Landbouw.*, RUG, 31, 177.
- Voets, J.P., 1966, *Leerboek in de Algemene Mikrobiologie*, 2de druk, Uitgeverij Vyncke, Gent.
- Zobell, C.E., 1946, "Marine Microbiology, a monograph on hydrobacteriology", in, *Chronica Botanica*, Waltham, Mass.