

## Züchtungsexperimente an zwei marinen Flagellaten (Dinophyta) und ihre Anwendung im toxikologischen Abwassertest

H. KAYSER

*Biologische Anstalt Helgoland, Meeresstation, Helgoland*

**ABSTRACT:** Rearing experiments on two marine flagellates (Dinophyta) and their application to a toxicological waste water test. During rearing experiments with *Prorocentrum micans* and *Ceratium furca* (Dinophyta) under different conditions of temperature, light and nutrients, the role of industrial waste water of a titaniumdioxide factory has been examined. The waste water contains primarily  $H_2SO_4$  and  $FeSO_4$  (for details consult Table 1); it is scheduled for discharge in early 1969 in quantities of some 1,200 tons per day into a North Sea area about 12 nautical miles north-west of Helgoland. The organisms were cultivated in bottles containing limited volumes of test liquid, and in chemostats, over periods of a few weeks. Growth rates of populations exposed to different waste water concentrations served as criterion of possible toxic effects of the industrial waste water. The experiments revealed distinct sublethal effects in dilutions (parts waste water : parts seawater of 32‰ S) down to 1 : 50,000 (*Ceratium furca*), and 1 : 32,000 (*Prorocentrum micans*). At 1 : 5,000 only a portion of the population (*Prorocentrum micans*) survives; the remaining cells stagnate reproduction at a given constant cell density. The specific toxic effects of the different components of the waste water are discussed. Further experiments are necessary to increase our knowledge on the biological consequences of the discharge of waste water into the North Sea, and to develop methods for the assessment of the effects of unknown toxic agents by means of culture experiments.

### EINLEITUNG

Die Kenntnisse der Biologie mariner Organismen stützen sich auf Beobachtungen in freier Natur und auf die Ergebnisse von Experimenten im Labor. Das Experiment erlaubt, durch bestimmte Versuchsanordnungen gezielte Fragen an das Objekt zu stellen. Seine Reaktion liefert uns die Antwort. Ökologische Fragestellungen erfordern eine Versuchsanordnung, die den Bedingungen in freier Natur möglichst entsprechen; erst dann erhält das im Labor gewonnene Versuchsergebnis Aussagekraft für die Reaktion der Organismen im natürlichen Milieu.

Vorliegende Arbeit berichtet über die Ergebnisse experimentell-ökologischer Untersuchungen an zwei Phytoplankton-Organismen, *Prorocentrum micans* und *Ceratium furca* (Dinophyta). Ziel der Versuche ist es, zunächst Grundlagen über die Lebensansprüche der untersuchten Arten hinsichtlich Temperatur, Licht und Nährstoffbedarf

zu erarbeiten. Anhand der auf diese Weise ermittelten optimalen Kulturbedingungen soll ein zweiter Fragenkomplex untersucht werden: der Einfluß toxischer Industrieabwässer.

Dieses über die Grundlagenforschung hinausgehende zweite Thema aus der angewandten Wissenschaft ergibt sich aus den immer stärker werdenden Bestrebungen der Industrie, ihre Abwässer in das Meer einzubringen. Die Beurteilung der Auswirkungen industrieller Abwässer auf marine Lebensgemeinschaften kann zunächst nur mit Hilfe von Experimenten im Labor durchgeführt werden. Es erscheint daher sinnvoll, im Rahmen experimentell-ökologisch orientierter Zuchtversuche an Phytoplanktonorganismen Toxizitätsuntersuchungen mit industriellen Abwässern durchzuführen.

Toxikologische Versuche im Kulturverfahren bieten die Möglichkeit, subletale Einflüsse über beliebig viele Generationen hinweg zu erfassen. Als Parameter dient die Vermehrungsrate, die sich als wesentlich empfindlicheres Merkmal erweist als die Ermittlung der Sterblichkeit (Dosis letalis). Die Vermehrungsrate wurde auch von BERNHARD, ZATTERA & FILESI (1966) zur Beurteilung der Toxizität verschiedener Werkstoffe und Detergentien auf pelagische Planktonalgen herangezogen. Das Kulturverfahren erlaubt es, langfristige Experimente im Durchströmungsverfahren (Chemostattechnik) durchzuführen, das den Verhältnissen im Meer weitgehend entspricht, da die Erschöpfung der toxischen Agentien nur sehr langsam oder gar nicht stattfindet (siehe auch HUECK 1967). Ein weiterer Vorteil des toxikologischen Kulturexperimentes mit Protozoen ist darin zu sehen, daß jeder Einzelversuch an einer ganzen Population durchgeführt wird. Die erhaltenen Aussagen beziehen sich nicht auf Einzelindividuen, sondern erfassen die ganze Reaktionsbreite eines Zuchtstammes.

Kulturexperimente im Labor erfordern zunächst eine Einschränkung in der Wahl der Versuchsorganismen: Robuste und gegen Umwelteinflüsse wenig empfindliche Arten lassen sich gut kultivieren; im toxikologischen Test erweisen sie sich daher als die widerstandsfähigsten Formen.

Arten mit geringerer ökologischer Valenz verlangen hohe Ansprüche in der Kulturtechnik und reagieren im Test empfindlicher. Dem Ökologen muß es daher angelegen sein, eine Auswahl zu treffen, die ihm Aussagen über die ganze Reaktionsbreite eines Ökosystems erlaubt und robuste und empfindliche Formen einschließt. Eine weitere Bedingung, die bei der Wahl der Versuchsorganismen berücksichtigt werden sollte, ist ihre Bedeutung im Stoffhaushalt der freien Natur. Arten, die im Meer zu bestimmten Jahreszeiten dominieren, müssen den Vorzug haben vor seltenen oder nur sporadisch auftretenden Formen.

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit vorgelegten Versuchsergebnisse an Dinoflagellaten ist *Prorocentrum micans* als robust und *Ceratium furca* als empfindlich in der Kultur anzusehen. Beide Arten kommen im Plankton der Nordsee häufig vor, können zeitweise sogar Anlaß zu Wasserblüten geben.

Der unmittelbare Anlaß für die Aufnahme toxikologischer Untersuchungen gab der Antrag der Titangesellschaft m. b. H., Leverkusen, ab Anfang 1969 täglich etwa 1200 Tonnen schwefelsäure- und eisensulfathaltige Abwässer in einem Seegebiet ca. 12 Seemeilen nordwestlich von Helgoland (54° 20' N – 54° 25' N; 7° 35' E – 7° 39' E) zu verklappen. Über die Konsequenzen, die sich für die Biocoenose dieses und benachbarter Seegebiete ergeben, ist bisher wenig bekannt. Von dem Institut für Küsten- und Bin-

nenfischerei der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg wurde ein Gutachten angefertigt. Weitere Untersuchungen wurden von der Biologischen Anstalt Helgoland in Angriff genommen (KINNE & ROSENTHAL 1967, KINNE & SCHUMANN 1968). Die letztgenannten Arbeiten befassen sich mit der Einwirkung des Industrieabwassers auf Jugendstadien von Meeresfischen. In der hier vorgelegten Arbeit wird der Einfluß dieser Abwässer auf einige charakteristische Vertreter der Primärproduzenten untersucht. Sind es doch gerade die Primärproduzenten, die als Anfangsglied der Nahrungskette maßgebenden Einfluß auf den Stoffhaushalt des Meeres haben.

### MATERIAL UND METHODE

Für die Versuche wurden zwei Arten von Dinoflagellaten aus dem Helgoländer Plankton isoliert und in Kultur genommen: *Prorocentrum micans* und *Ceratium furca*. Die Kulturen wurden artrein (Unialgal-Kultur) gezüchtet, aber nicht bakterienfrei (axenisch) gehalten.

Beide Arten wurden zunächst in Schreiberlösung (Seewasser + 10 ‰  $\text{NaNO}_3$  + 2 ‰  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) kultiviert und bei 6000 Lux (Tageslicht-Leuchtröhren) und 18° C in 5-Liter-Flaschen in Massenkultur genommen. Die Vermehrungsrate wurde durch Auszählung definierter Proben mit dem Plankton-Mikroskop nach Utermöhl bestimmt

Zur Ermittlung optimaler Kulturbedingungen wurde *Prorocentrum micans* außer in Schreiberlösung auch in Erdschreiberlösung (Schreiberlösung + 20 ‰ Erdextrakt) und in einer halbsynthetischen Nährlösung (Seewasser = 1020 g;  $\text{NaNO}_3$  = 42,5 mg;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  = 10,75 mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  = 0,278 mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  = 0,0198 mg;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  = 3,72 mg; Vitamin  $\text{B}_{12}$  = 0,0007 mg (abgeändert nach v. STOSCH & DREBES 1964) gezüchtet. Diese Versuche wurden bei 10° C, 14° C und 18° C in Flaschen mit je 200 cm<sup>3</sup> Nährlösung durchgeführt.

Zusätzlich zu den Kulturversuchen in Flaschen mit konstantem Volumen wurde die Vermehrungsrate der Algen auch in Kulturen mit ansteigendem Volumen bestimmt. Die Menge der täglich zugesetzten Nährlösung wurde so bemessen, daß der tägliche Zuwachs an Zellen durch Verdünnung wieder ausgeglichen wurde und somit die Zelldichte der Kultur konstant blieb. Dieses Verfahren entspricht dem Chemostat-Prinzip und wird im folgenden als „Chemostat mit steigendem Volumen“ bezeichnet. Die Kulturen wurden auf einer Zelldichte von 1000 Zellen/cm<sup>3</sup> gehalten. Die Versuche wurden von einem Anfangsvolumen von 250 cm<sup>3</sup> ausgehend bei zum Erreichen der 6-Liter-Grenze durchgeführt (Schreiberlösung, 18° C, 6000 Lux, Tageslicht-Leuchtröhren).

Für die Versuche mit industriellem Abwasser wurde eine von der Titangesellschaft m. b. H. zur Verfügung gestellte Abwasserprobe verwendet. Nach Angabe der Firma setzt sich das Abwasser aus Dünnsäure und Grünsalz im Mengenverhältnis von 10 Liter Dünnsäure auf 3,3 kg Grünsalz zusammen und soll je nach Jahreszeit mit Temperaturen zwischen 20° und 40° C in See eingeleitet werden. Die Zusammensetzung der Dünnsäure ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Das Abwasser soll ab Anfang 1969 mit einem Spezialschiff in Mengen von etwa 850 bis 880 Tonnen Dünnsäure und etwa 350 Tonnen Grünsalz pro Tag 12 Seemeilen nordwestlich Helgolands verklappt werden.

Im unverdünnten Abwasser ist bei Zimmertemperatur ein Teil des  $\text{FeSO}_4$  auskristallisiert. Um alles  $\text{FeSO}_4$  in Lösung zu bringen, wurde das Abwasser auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzt und eine Stammlösung von 1 Teil Abwasser auf 10 Teile Seewasser hergestellt. Zum Ansetzen der Verdünnungsreihen wurde die Stammlösung im Bereich von 1 : 2500 bis 1 : 100 000 Teilen Abwasser zu Seewasser gemischt. Das Seewasser ( $32\text{‰} \pm 1,5\text{‰ S}$ ) wurde der Helgoländer Reede entnommen und zur Anreicherung der Nährstoffe mit  $\text{NaNO}_3$  (10 ‰) und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2 ‰) versetzt.

Tabelle 1

Zusammensetzung der Abwässer der Titangesellschaft m.b.H., Leverkusen

Dünnsäure	$\text{H}_2\text{SO}_4$	14,4 ‰
	$\text{FeSO}_4$	7,1 ‰
	$\text{TiOSO}_4$	1,6 ‰
	$\text{MnSO}_4$	0,08 ‰
	$\text{MgSO}_4$	1,59 ‰
	$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$	0,02 ‰
	$\text{VOSO}_4$	0,065 ‰
	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	0,3 ‰
	$\text{Na}_2\text{O}$	0,04 ‰
	$\text{CaSO}_4$	0,1 ‰
	$\text{H}_2\text{O}$ (Rest)	ca. 74,7 ‰
Grünsalz	$\text{FeSO}_4$	50 ‰
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	0,25 ‰
	$\text{TiOSO}_4$	0,4 ‰
	$\text{MgSO}_4$	2,5 ‰
	$\text{MnSO}_4$	0,09 ‰
	$\text{H}_2\text{O}$	46,76 ‰

Bei Einleitung von frischem Titanwerk-Abwasser in die See finden lebhaft chemisch-physikalische Umsetzungen mit dem Meerwasser statt. Das schwefelsäurehaltige Abwasser, das etwa einer 4-normalen  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung entspricht, läßt den pH-Wert des Seewassers, der etwa bei pH 8 liegt, je nach Konzentration rasch absinken. Die Schwefelsäure zerstört dabei das Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht des Seewassers und führt zu einem schnellen Anstieg des  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks. Erst die Turbulenz des Seewassers läßt das  $\text{CO}_2$  in die freie Luft entweichen, so daß sich ein neues Gleichgewicht einstellt. Entsprechend steigt der pH-Wert des Wassers wieder an.

Die Eisenionen fallen im schwach alkalischen Seewasser als flockiger Eisenhydroxid-Niederschlag aus. Mit dieser Reaktion ist eine Sauerstoffzehrung verbunden. Die Reaktion läßt sich durch die Formel  $2\text{Fe}^{++} + 4\text{OH}' + \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow 2\text{Fe}(\text{OH})_3$  ausdrücken.

Die Reaktionen des Abwassers mit dem Seewasser bestimmten die Methodik der Versuchsanordnung. Parallel zur Messung der Vermehrungsrate der Organismen durch Zählung wurden pH-Messungen in den Versuchsgefäßen durchgeführt. Turbulenz und Durchlüftung des Seewassers wurde durch grobblasige Belüftung nachgeahmt. Die Temperatur in den Versuchsgefäßen betrug  $18^\circ\text{C}$ , die Beleuchtung  $2 \times 3000$  Lux zweier Tageslicht-Leuchtröhren, die seitlich der Versuchsflaschen angeordnet waren.

Um den unterschiedlichen Verhältnissen, denen die Organismen bei der Abwasser-einleitung auf offener See ausgesetzt sind, möglichst nahezukommen, wurden die Versuche nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt: (1) Die Organismen geraten in eine in See treibende Titan-Abwasserwolke hinein. Für die Versuche wurden die Testorganismen in ein um 24 Stunden gealtertes Abwasser-Seewasser-Gemisch eingesetzt. Die Reaktionen des Abwassers mit dem Seewasser waren in dieser Zeit bereits abgelaufen: das Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht des Gemisches hatte sich wieder eingestellt. Der Eisenhydroxidniederschlag war ausgefallen. Die Testorganismen wurden in verschiedenen Abwasserkonzentrationen in 200-cm<sup>3</sup>-Flaschen über mehrere Wochen hinweg weiterkultiviert. Diese Versuche wurden mit beiden Testarten durchgeführt. (2) Die Testorganismen geraten direkt in frischeingeleitetes Abwasser hinein und nehmen einmal an der Reaktion des Abwassers mit dem Seewasser teil. Im Versuch befanden sich die Organismen daher schon im Versuchsgefäß, während die entsprechende Abwassermenge zugesetzt wurde, und durchliefen sowohl die anfänglich starke pH-Ernieidrigung als auch die Fällung des Eisenhydroxidniederschlages. Die Testorganismen wurden gleichfalls in 200-cm<sup>3</sup>-Flaschen über mehrere Wochen hinweg weiterkultiviert. Diese Versuche wurden nur mit *Procoentrum micans* durchgeführt. (3) Die Testorganismen werden täglich mit frischem Abwasser konfrontiert. Für diese Versuche eignete sich am besten das Chemostat-Verfahren, bei dem die Kultur durch tägliche Verdünnung mit Kulturlösung auf einer konstanten Zelldichte gehalten wurde. Die Menge der täglich zur Verdünnung zugesetzten Lösung wurde aus der Zuwachsrate im Kontrollversuch berechnet. Die gleiche Menge an Lösung, jedoch mit frischem Abwasser der Titanwerke versetzt, wurde den entsprechenden Abwasserversuchsgefäßen täglich zugesetzt.

Die Versuche nach dem Chemostat-Prinzip wurden nach zwei Methoden durchgeführt: (a) Chemostat mit steigendem Volumen. Entsprechend der auf p. 23 bereits ausgeführten Methode wurde dem Kontrollversuch täglich soviel neue Nährlösung zugesetzt, daß die Zelldichte auf 1000 Zellen/cm<sup>3</sup> konstant gehalten wurde. Den Abwasserversuchsgefäßen wurde die gleiche Menge an frischem Abwasser-Seewasser-Gemisch zugesetzt. Von 250 cm<sup>3</sup> ausgehend, wurden die Versuche nach Erreichen der 5-Liter-Grenze beendet (15 Tage). Die gesamte Population, die im Versuchsgefäß enthalten ist, bleibt über die Versuchszeit hinweg erhalten. (b) Chemostat mit konstantem Volumen. Auch hier wurde die Zelldichte im Kontrollversuch auf 1000 Zellen/cm<sup>3</sup> konstant gehalten. Das Versuchsvolumen blieb dagegen für die ganze Dauer des Versuchs auf 1 Liter in jeder Flasche beschränkt. Hierfür wurde der Kontrollkultur zunächst die Menge an Lösung entnommen, die den täglichen Zuwachs an Zellen enthielt und anschließend das Versuchsgefäß mit frischer Nährlösung wieder auf einen Liter aufgefüllt. In den Abwasserversuchsgefäßen wurde der Wasseraustausch in gleicher Höhe vollzogen, mit dem Unterschied, daß die zum Auffüllen zugesetzte Lösung die entsprechende Menge an frischem Titanwerke-Abwasser enthielt. Das Verfahren erlaubte eine beliebig lange Fortsetzung der Versuche und wurde über einen Zeitraum von 25 Tagen durchgeführt. Im Gegensatz zum Versuch (a) wird der Population des Kontrollversuchs täglich die dem Zuwachs entsprechende Anzahl an Zellen entzogen. In entsprechendem Maße werden auch die Populationen in den Abwasserversuchsgefäßen reduziert.

## ERGEBNISSE

*Prorocentrum micans**Versuche zur Ermittlung optimaler Kulturbedingungen*

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse von Zuchtexperimenten in Kulturen mit begrenztem Volumen. Bei 18° C wachsen die Kulturen in Schreiberlösung in ca. 30 Tagen von einer Zelle/10 cm<sup>3</sup> auf eine Dichte von 30 000 Zellen/10 cm<sup>3</sup> heran. Bei halb-logarithmischer Auftragung verläuft die Wachstumskurve in Gestalt einer Geraden. Ganz ähnlich verhalten sich die Wachstumskurven in Erdschreiberlösung und in halbsynthetischer Lösung: Mit einer Verzögerung von ca. 2 Tagen wachsen die Kulturen bis zu einer Zelldichte von 20 000 Zellen heran. Aus dem Anstieg der Geraden läßt sich eine mittlere Teilungsgeschwindigkeit von je einer Zellteilung in 2 Tagen ablesen. Nach ca. 30 Tagen ist die Nährlösung in den Kulturflaschen erschöpft; die Kulturen haben das Maximum ihrer Dichte erreicht und beginnen abzusterben. Im Verlauf weiterer 12 Tage sinkt daher die Zelldichte in allen drei Kulturen auf ca. 1000 Zellen/10 cm<sup>3</sup> ab. Bis hierhin entsprechen die Kurven dem charakteristischen Wachstumsschema einzelliger Algen von FOGG (1965). Überraschenderweise kommen die Absterbeprozesse in der Phase der sinkenden relativen Wachstumsrate jedoch nach etwa 12 Tagen zum Stehen. Auf Grund von Remineralisierungsvorgängen aus den abgestorbenen Zellen werden erneut die ins Minimum geratenen Nährstoffe frei und ermöglichen eine Erholung der Kulturen. Nach insgesamt 65 Tagen hat die Zelldichte in halbsynthetischer Nährlösung die Zahl von 10 000 Zellen/10 cm<sup>3</sup> wieder erreicht. Die Kulturen in Schreiber- und Erdschreiberlösung folgten mit 8000 und 4500 Zellen/10 cm<sup>3</sup>.

Unter den extremen Bedingungen eines auf 200 cm<sup>3</sup> beschränkten Lebensraums in der Kulturflasche gelingt es *Prorocentrum micans*, über lange Zeiträume hinweg ein Gleichgewicht zwischen Absterberate und Zuwachsrate herzustellen und ein kleines, in sich geschlossenes Ökosystem aufzubauen. Minima und Maxima der Populationsdichte folgen vermutlich wellenförmig hintereinander.

Bei 14° C verlaufen die Wachstumskurven in den drei Nährstofflösungen in gleicher Weise annähernd parallel, erreichen aber erst nach ca. 55 Tagen ihre Maxima. Für den Anstieg ergibt sich eine mittlere Teilungsgeschwindigkeit von je einer Zellteilung in 4 Tagen. Die Zelldichte erreicht Werte von 20 000 Zellen/10 cm<sup>3</sup> in halbsynthetischer Lösung und 12 000 bis 14 000 Zellen/10 cm<sup>3</sup> in Schreiber- und Erdschreiberlösung. Remineralisierungsvorgänge konnten noch nicht erfaßt werden, da der Versuch nach 65 Tagen beendet wurde.

Bei 10° C beginnt das Wachstum der Kultur in Schreiberlösung sehr zögernd und erreicht nach 65 Tagen erst eine Zelldichte von 1500 Zellen/10 cm<sup>3</sup>. Der Anstieg der Kurve entspricht einer mittleren Teilungsgeschwindigkeit von je einer Teilung in 6 Tagen. In den beiden anderen Medien verläuft das Wachstum so unregelmäßig und verzögert, daß auf eine Darstellung der Kurven verzichtet wurde.

Aus den Versuchen läßt sich erkennen, daß die drei verwendeten Nährlösungen etwa gleich gute Wachstumsbedingungen bieten. Der Temperaturfaktor ist deutlich

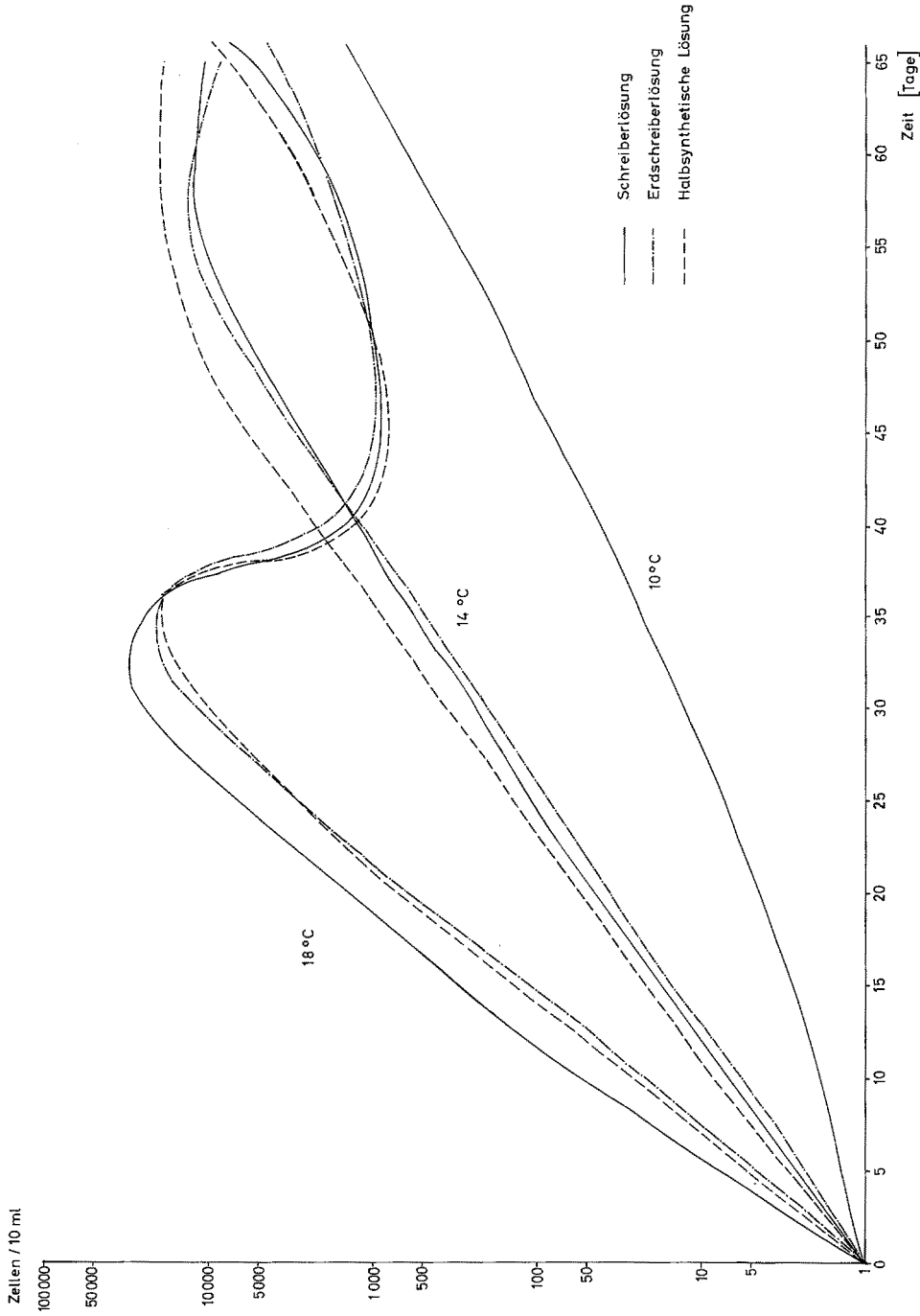


Abb. 1: *Prorocentrum micans*. Zelldichte bei 18°, 14° und 10° C in 200 cm<sup>3</sup> Nährlösung bei 6000 Lux (Tageslichtleuchtrohren)

ausgeprägt und zeigt in unseren Versuchen bei 18° C die besten Bedingungen. Nach BRAARUD (1961) liegt das Temperaturoptimum für *Prorocentrum micans* bei 20° C.

Die Ergebnisse der Zuchtexperimente im Chemostat-Verfahren mit steigendem Volumen (vgl. p. 23) sind in Abbildung 2 dargestellt. Die rechte Ordinate der Abbildung zeigt das Versuchs-Volumen an, die linke die Gesamtzellzahl im Versuchsgefäß. Die Wachstumskurve der Population verläuft bei halblogarithmischer Darstellung als Gerade. Die Zellzahl steigt von 250 000 Zellen in 250 cm<sup>3</sup> nach 10 Tagen auf 6 000 000 Zellen in einem Volumen von 6 Litern an. Die Vermehrung entspricht je einer Zellteilung in ca. 2,2 Tagen. Der tägliche Zuwachsfaktor beträgt 1,39. Das Verfahren ermöglicht es, die Kultur über die ganze Versuchsdauer in der exponentiellen (logarithmischen) Phase zu halten.

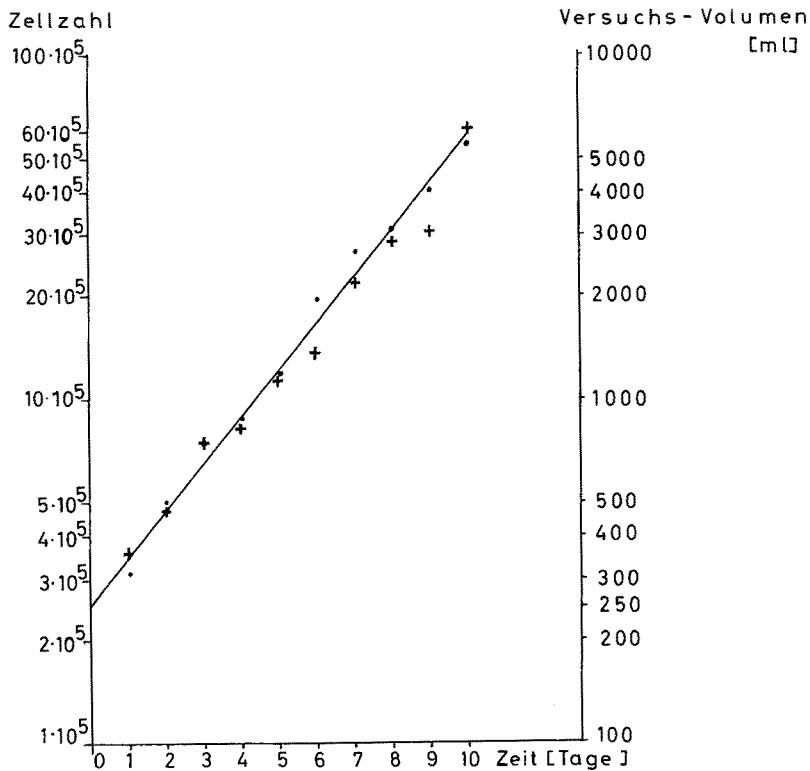


Abb. 2: *Prorocentrum micans*. Zunahme der Zellzahl im „Chemostat mit steigendem Volumen“ bei konstanter Zelldichte von 1000 Zellen/cm<sup>3</sup> (Schreiberlösung, 18° C, 6000 Lux Tageslichtleuchtröhren)

#### Zuchtexperimente unter Abwassereinfluß

Auf Grund der vorstehend geschilderten Ergebnisse zeigt sich, daß *Prorocentrum micans* in reiner Schreiberlösung gute Wachstumsbedingungen findet. Für die Ver-



suche unter Abwassereinfluß wurde daher diese Nährlösung zugrunde gelegt. Erdschreiberlösung und Nährlösungen mit Zusatz von Metallchelatoren (EDTA) eignen sich nicht für die Toxizitätsuntersuchungen, da sie die im Abwasser enthaltenen giftigen Schwermetallionen abpuffern und somit dem Wirkungsmechanismus entziehen.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche in einem um 24 Stunden gealterten Abwasser-Seewasser-Gemisch (vgl. p. 25) sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Kulturen enthalten zu Versuchsbeginn 20 Zellen/cm<sup>3</sup>. Im Kontrollversuch ohne Abwasserzusatz wachsen die Zellen innerhalb von 14 Tagen auf die Dichte von 1200 Zellen/cm<sup>3</sup> heran.

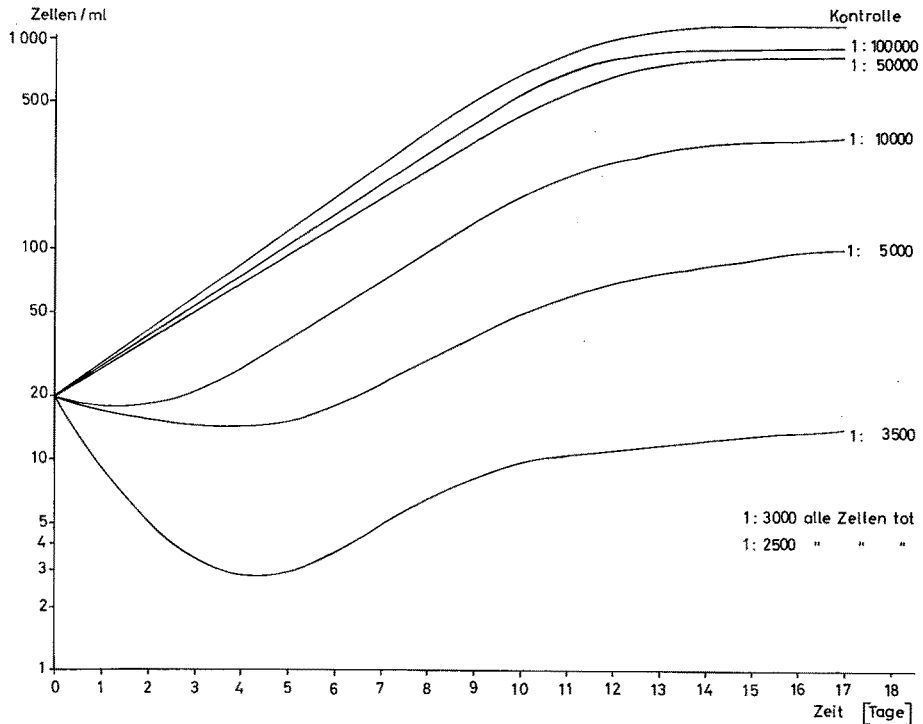


Abb. 3: *Procoentrum micans*. Verlauf der Wachstumskurven bei Einwirkung von um 24 Stunden gealterten Abwasser-Seewassergemischen in 200 cm<sup>3</sup> Lösung.

In Abwasserkonzentrationen von 1 : 100 000 und 1 : 50 000 Teilen Abwasser zu Schreiberlösung zeigen die Kulturen jeweils eine geringfügige Verzögerung der Vermehrungsrate und wachsen bis zur Beendigung der Versuche nach 17 Tagen nur auf Zelldichten von 900 und 800 Zellen/cm<sup>3</sup> heran. Von Konzentrationen von 1 : 10 000 an macht sich bereits in den ersten Tagen eine deutliche Schädigung bemerkbar. Die Kulturen erholen sich jedoch nach einigen Tagen. So verläuft die Wachstumskurve der Population bei 1 : 10 000 vom 4. Tag an den vorherigen Kurven parallel, erreicht aber bei Versuchsende nur eine maximale Zelldichte von ca. 350 Zellen/cm<sup>3</sup>. Bei der Konzentration 1 : 5000 wird nach anfänglichem Absinken der Zellzahl auf 15 Zellen/cm<sup>3</sup> bei

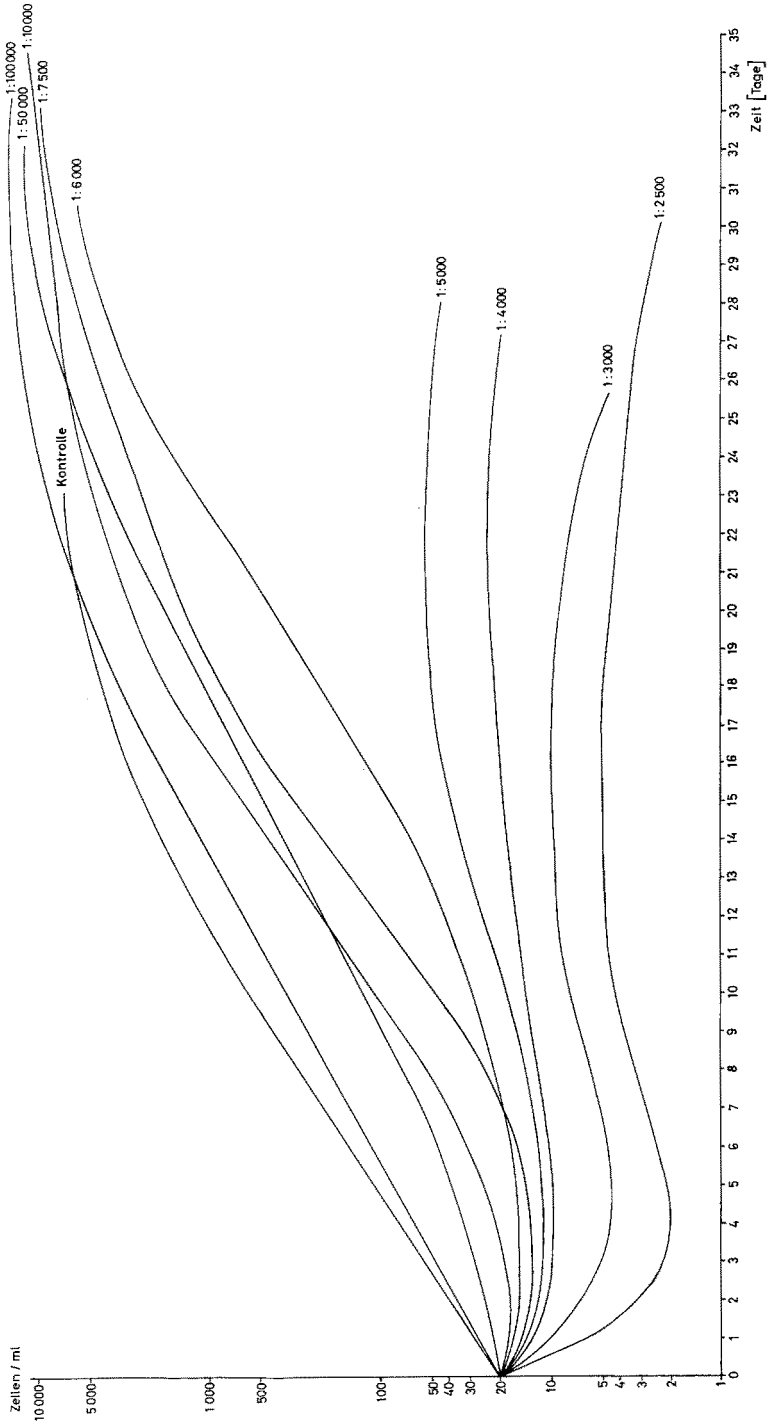


Abb. 4: *Proocentrum micans*. Verlauf der Wachstumskurven bei Einwirkung von frischen Abwasser-Seewassergemischen in 200 cm<sup>3</sup> Lösung

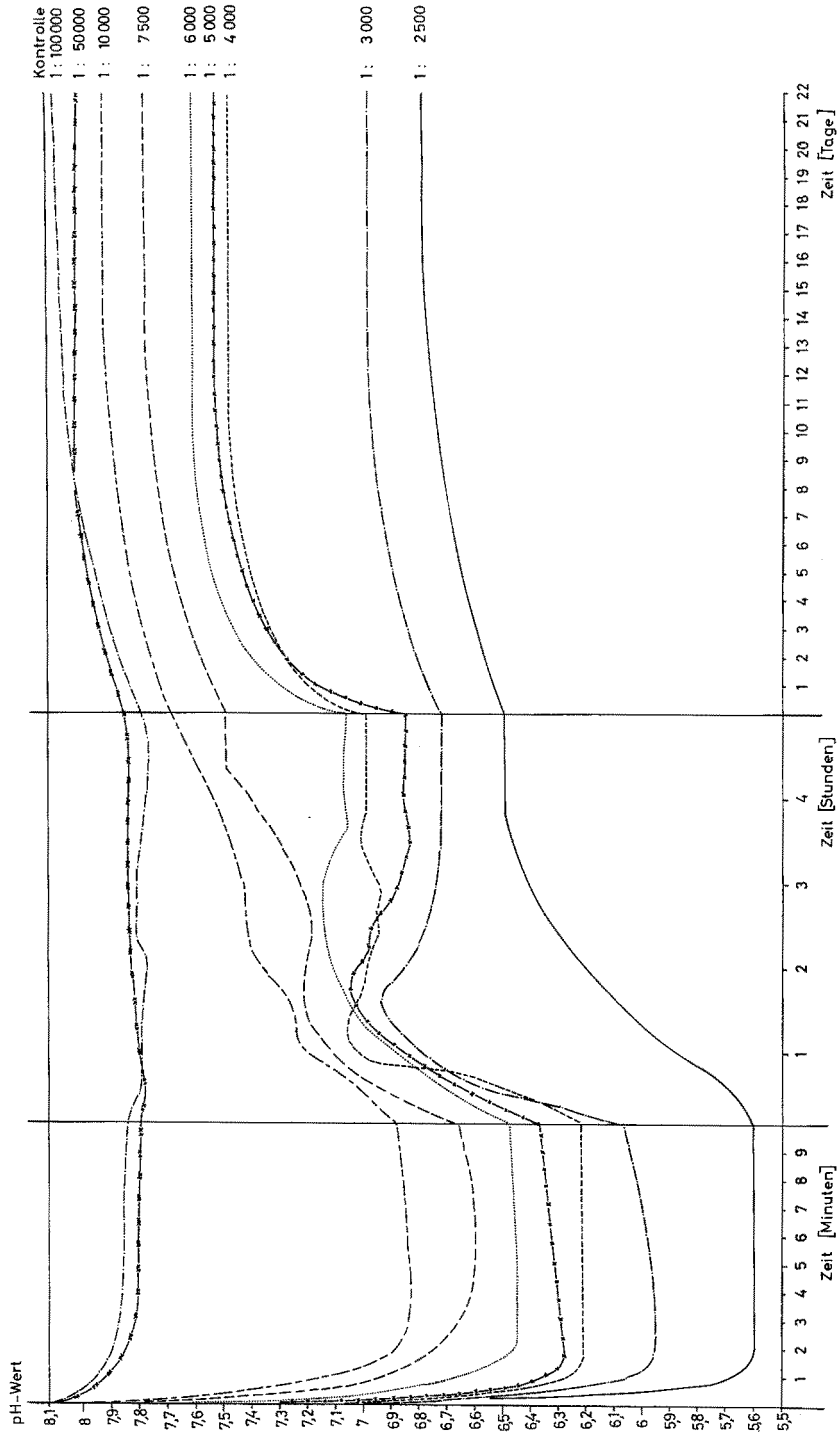


Abb. 5: *Protophyllum micans*. Der Verlauf der pH-Änderung bei Zugabe von Abwasser zu Kulturen in 200 cm<sup>3</sup> Seewasser (18° C, grobblasige Belüftung)

Versuchsende nur noch eine Dichte von 100 Zellen/cm<sup>3</sup> erreicht. Die Konzentration von 1 : 3500 führt fast zum Absterben der Kultur: ausgehend von 20 Zellen/cm<sup>3</sup> sinkt die Zellzahl nach 4 Tagen auf 3 Zellen/cm<sup>3</sup> ab. Nach leichter Erholung in den nächsten 5 Tagen wird bei Versuchsende nur eine Zellzahl von ca. 15 Zellen/cm<sup>3</sup> erreicht. In Abwasserkonzentrationen von 1 : 3000 und 1 : 2500 sterben die Kulturen in diesem Versuch ab.

Die Ergebnisse der Versuche mit frisch eingeleitetem Abwasser zeigen Abbildungen 4 und 5. Den Testorganismen wird bei Versuchsbeginn einmal frisches Abwasser zugesetzt. Wie im Versuch mit gealtertem Abwasser-Seewasser-Gemisch enthalten die Kulturen zunächst 20 Zellen/cm<sup>3</sup> (Abb. 4). In der Kontrolle wird nach 22 Tagen eine Zelldichte von 7000 Zellen/cm<sup>3</sup> erreicht. Bei der Abwasserkonzentration von 1 : 100 000 folgt die Kurve der Vermehrungsrate der Kontrollkurve mit leichter Verzögerung, überkipft sie aber vom 21. Tage an und erreicht nach 33 Tagen bei Versuchsende den Wert von 15 000 Zellen/cm<sup>3</sup>. Eine immer deutlicher ausgeprägte Anfangsschädigung zeigen die Konzentrationen von 1 : 50 000, 1 : 10 000, 1 : 7500 und 1 : 6000. Bei den 3 letzteren ist die Absterberate in den ersten Tagen sogar größer als die Zuwachsrate. In allen Verdünnungsstufen tritt jedoch eine Erholung ein, die bei Versuchsende nach ca. 32 Tagen zu Zelldichten von 12 000 (1 : 50 000 und 1 : 10 000), 10 000 (1 : 7500) und 6000 (1 : 6000) Zellen/cm<sup>3</sup> führt. Bei Konzentrationen von 1 : 5000 findet nach anfänglichem Rückgang der Population nur noch ein sehr geringer und bei 1 : 4000 kein Zuwachs an Zellen mehr statt. Nach 27 Tagen enthalten die Kulturen nur 50 bzw. 20 Zellen/cm<sup>3</sup> und zeigen eine rückläufige Tendenz der Vermehrungsrate. Bei Konzentrationen von 1 : 3000 und 1 : 2500 sterben die Kulturen nach 4 bis 5 Tagen bis auf wenige Individuen ab. Die Überlebenden teilen sich zögernd weiter, erreichen aber nur Zelldichten von 10 bzw. 5 Zellen/cm<sup>3</sup> nach ca. 16 Tagen. Im weiteren Verlauf des Versuchs gehen die Kulturen zahlenmäßig wieder leicht zurück. Trotzdem sind in der Verdünnungsstufe von 1 : 2500 nach 30 Tagen noch einige Individuen lebend nachzuweisen.

Abbildung 5 zeigt die zu den verschiedenen Abwasserkonzentrationen gehörigen pH-Werte. Um den Verlauf der pH-Änderung in Abhängigkeit von der Zeit in allen Einzelheiten über die ganze Versuchsdauer hinweg darzustellen, mußte die Zeitskala in drei verschiedene Maßstäbe unterteilt werden. Abschnitt 1 ist in Minuten unterteilt und umfaßt die Zeit vom Augenblick der Abwasserzugabe bis zum Ablauf der ersten 10 Minuten. Abschnitt 2 zeigt den Verlauf der pH-Änderung in den anschließenden nächsten 5 Stunden und Abschnitt 3 in den folgenden 22 Tagen an.

Die den Versuchen zugrunde gelegte Schreiberlösung hat einen pH von 8,12. Im Kontrollversuch bleibt dieser Wert relativ konstant über die ganze Versuchsdauer hinweg erhalten. In den Versuchen mit Abwasserzugabe fällt der pH-Wert in den ersten Minuten nach der Einleitung sofort ab. Im Mischungsverhältnis von 1 : 100 000 und 1 : 50 000 sinkt er von 8,12 nach 4 Minuten auf 7,85 bzw. 7,80 ab und hält diesen Wert mit leichten Schwankungen auch über die nächsten 5 Stunden ein. Im Verlauf der nächsten Tage steigt er wieder auf 8,13 bzw. 8,05 an und bleibt auf diesem Wert stehen. In der Konzentration von 1 : 10 000 sinkt der pH-Wert nach 4 Minuten auf 6,83 ab. Nach einer Stunde steigt er wieder bis auf 7,20 und nach 5 Stunden auf 7,70 an. Bei Versuchsende nach 22 Tagen hat er sich auf 7,95 eingestellt. In den höheren Konzentrationsstufen wird der pH-Abfall in den ersten Minuten immer ausgeprägter und erreicht bei

1 : 2500 den Wert von 5,6 nach 2 Minuten. In der folgenden Phase des pH-Anstiegs macht sich in den Konzentrationen von 1 : 7500 bis 1 : 3000 jedoch eine deutlich ablesbare Tendenz bemerkbar: Der Anstieg kommt nach 1 bis 2 Stunden zum Stillstand und sinkt in den anschließenden 3 bis 4 Stunden wieder etwas ab. Besonders deutlich ist das Verhalten in der Konzentration von 1 : 3000 ausgeprägt, in der der pH-Wert nach 1 Stunde und 40 Minuten ein Maximum von 6,94 erreicht und in den folgenden 2 Stunden wieder auf 6,73 zurückgeht. Die Maxima fallen mit dem Ausfall des Eisenhydroxidniederschlags zusammen. Der unruhige Kurvenverlauf kennzeichnet die Phase der als Zeitreaktionen ablaufenden chemisch-physikalischen Umsetzungen des Abwassers mit dem Seewasser. 4 bis 5 Stunden nach Zugabe des Abwassers hat sich wieder ein neues Gleichgewicht eingestellt. Die Konzentration von 1 : 2500 folgt nicht diesem Kurvenverlauf, sondern steigt im Verlauf von 4 Stunden von pH 5,6 kontinuierlich auf pH 6,5 an. Der Verlauf der pH-Änderung in den folgenden 22 Tagen zeigt zu Beginn eine leicht steigende Tendenz. Vom 10. Tage an bleibt der pH-Wert jedoch bis zum Versuchsende etwa auf dem gleichen Wert stehen und liegt innerhalb der Werte 7,8 (1 : 7500) und 6,8 (1 : 2500). Die Extremwerte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

pH-Wert bei Zusatz von Abwasser zu 200 cm<sup>3</sup> Schreiberlösung

Mischungsverhältnis	pH-Ausgangswert	pH-Minimum (2-5 min)	pH-Endwert (22 Tage)
Kontrolle	8,12	8,12	8,16
1 : 100 000	8,12	7,78	8,13
1 : 50 000	8,12	7,78	8,04
1 : 10 000	8,12	6,84	7,95
1 : 7 500	8,12	6,60	7,80
1 : 6 000	8,12	6,45	7,63
1 : 5 000	8,12	6,28	7,55
1 : 4 000	8,12	6,21	7,50
1 : 3 000	8,12	5,95	7,00
1 : 2 500	8,12	5,60	6,80

Für die Methodik der Versuche im „Chemostat mit steigendem Volumen“ sei auf p. 23 und p. 25 verwiesen. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der täglichen Zellzählung in allen 10 Flaschen. Die Kontrolle wird bei einer Dichte von 1000 Zellen/cm<sup>3</sup> konstant gehalten. Die Kurve der Vermehrungsrate hat daher die Gestalt einer horizontalen Geraden. In den Verdünnungsstufen des Abwassers im Verhältnis von 1 : 100 000, 1 : 50 000, 1 : 32 000 und 1 : 25 000 reagieren die Organismen sofort durch relativ einheitliches Absinken der Zellzahl innerhalb der nächsten 15 Tage. Die Zelldichten bei Versuchsende liegen zwischen 700 und 600 Zellen/cm<sup>3</sup>. Auch die Konzentrationen 1 : 10 000 und 1 : 7500 schließen sich der vorherigen Gruppe noch an, obwohl hier die Zellzahl bereits in den ersten Tagen merklich abnimmt. So sinkt die Zellzahl bei 1 : 7500 nach 4 Tagen auf 800 Zellen/cm<sup>3</sup>, nach 10 Tagen auf 700 Zellen/cm<sup>3</sup> und nach 15 Tagen bei Versuchsende auf 550 Zellen/cm<sup>3</sup> ab. Scharf abgesetzt gegen die vorige Gruppe verlaufen die Kurven in den Verdünnungsstufen 1 : 5000 und 1 : 4000. Gleich

in den ersten Tagen sinkt die Zellzahl beträchtlich ab. Nach einem Tag sind noch 700 Zellen/cm<sup>3</sup>, nach 3 Tagen nur noch ca. 500 Zellen/cm<sup>3</sup> vorhanden. Der rasche Rückgang verlangsamt sich jedoch im Lauf der nächsten Zeitspanne und führt bei Versuchsende zu Zelldichten von ca. 250 Zellen/cm<sup>3</sup>. In der Konzentration 1 : 3000 sinkt die Zellzahl bis auf 90 Zellen/cm<sup>3</sup> nach 15 Tagen ab.

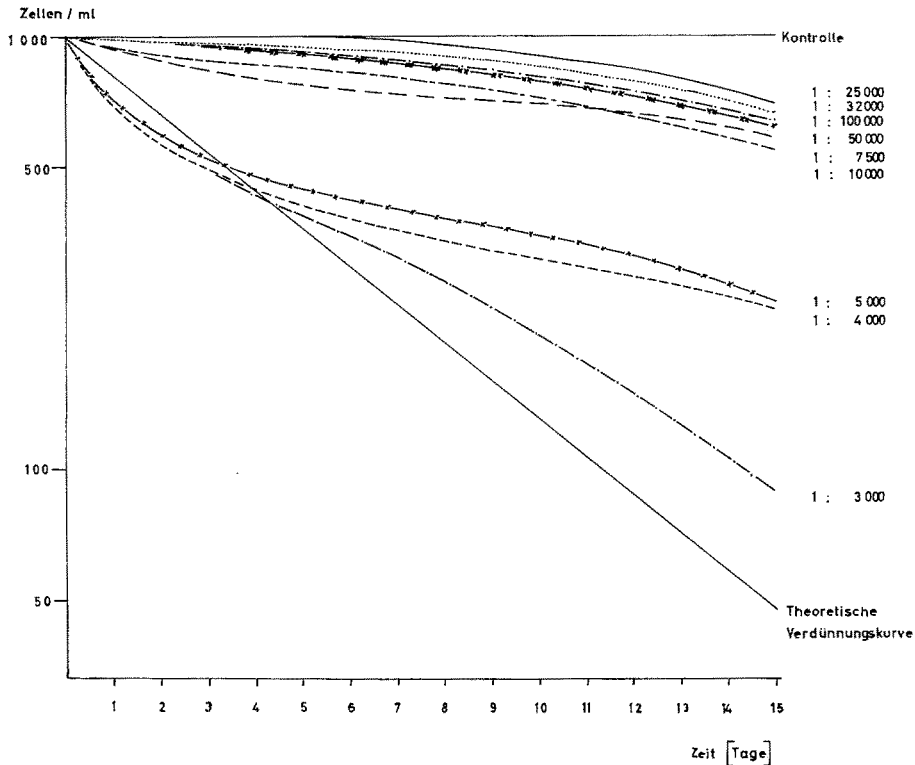


Abb. 6: *Procoentrum micans*. Verlauf der Wachstumskurven im „Chemostat mit steigendem Volumen“ bei täglichem Zusatz von frischem Abwasser-Seewassergemisch

In Abbildung 6 ist zusätzlich die theoretische Verdünnungskurve eingezeichnet. Sie zeigt die von den Vermehrungsvorgängen unabhängige Abnahme der Zellzahl, die sich aus der täglichen Verdünnung mit zellfreier Versuchslösung ergibt. 1000 Zellen/cm<sup>3</sup> werden in 15 Tagen auf 47 Zellen/cm<sup>3</sup> verdünnt. Alle oberhalb der Geraden gelegenen Werte zeigen eine Vermehrung, alle unterhalb gelegenen Werte ein Absterben der Kultur an. Parallel zur Geraden verlaufende Kurven bedeuten ein Stagnieren der Kultur auf einer konstanten Zelldichte.

In Abbildung 7 sind die zugehörigen pH-Werte aufgetragen. Im Kontrollversuch bleibt der pH-Wert über die ganze Versuchsdauer hinweg konstant bei etwa 8,01. In den Abwasserversuchsgefäßen sinkt er am ersten Tag relativ am stärksten ab, da die zugesetzte Abwassermenge auf das gesamte Volumen des ersten Tages (250 cm<sup>3</sup>) be-

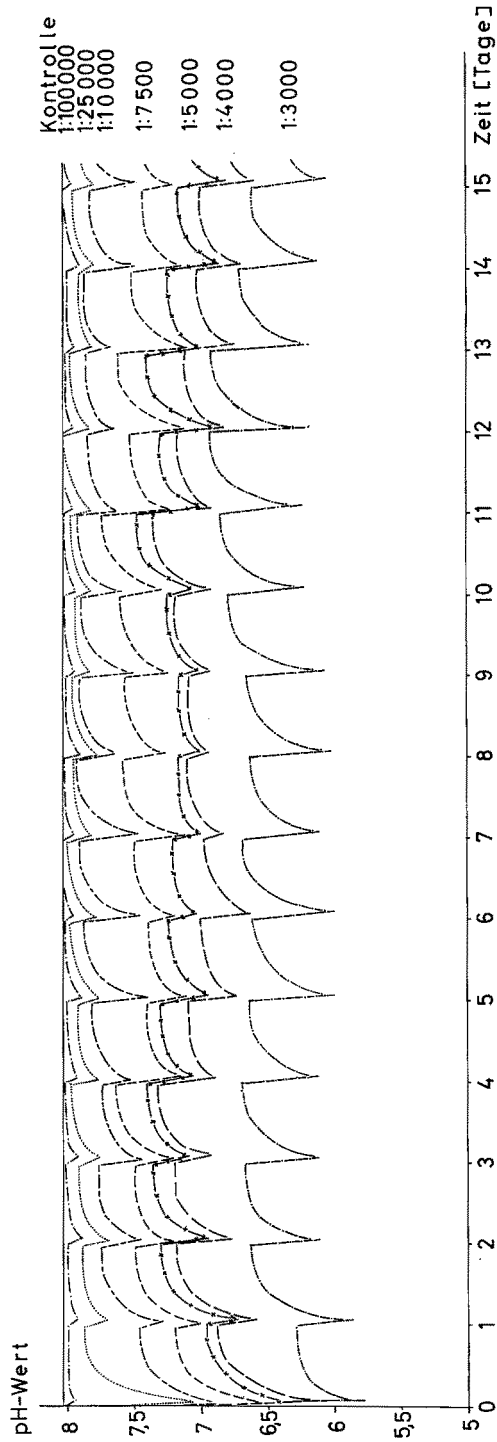


Abb. 7: *Proorocentrum micans*. Verlauf der pH-Änderung im „Chemostat mit steigendem Volumen“ bei täglichem Zusatz von frischem Abwasser-Seewassergemisch

rechnet wurde. An den folgenden Tagen ist der pH-Sprung geringer, da die zugesetzte Menge an frischem Abwassergemisch jeweils nur etwa einem Fünftel der vorhandenen Menge an bereits gealtertem Abwassergemisch der Vortage entspricht.

In den Konzentrationen von 1 : 100 000 bis 1 : 25 000 weicht der pH-Wert infolge der täglichen Abwasserbelastung nur um 0,1 bis 0,2 vom täglichen Grundwert ab. Der

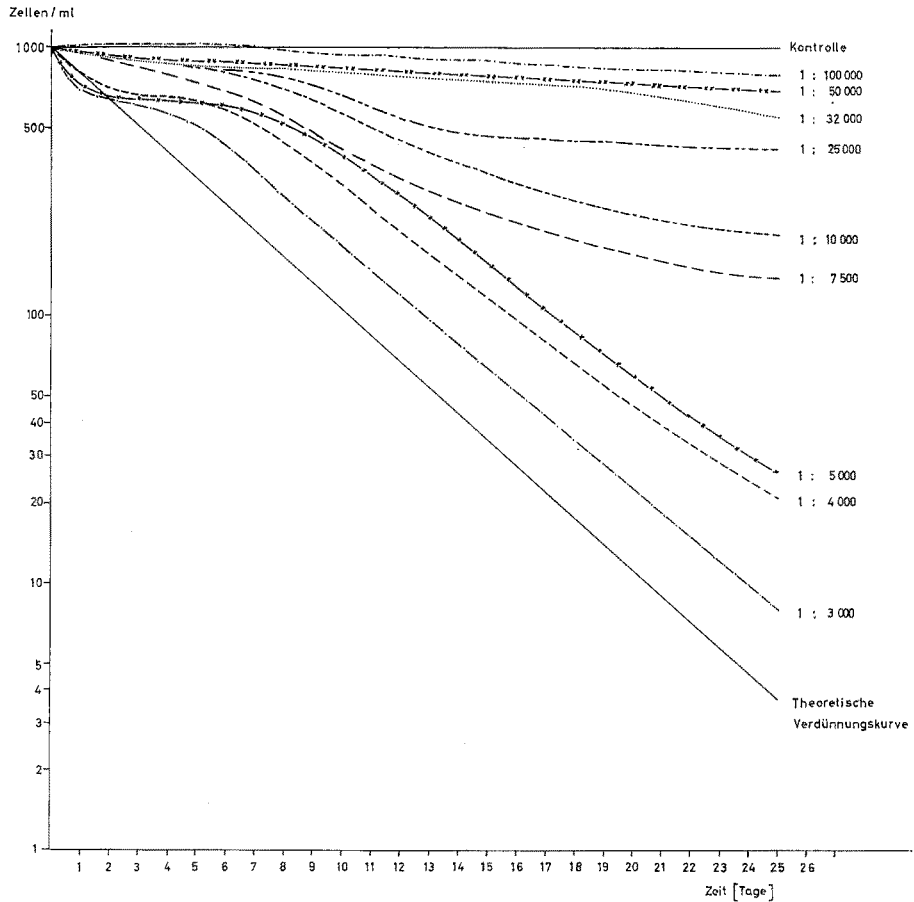


Abb. 8: *Procoentrum micans*. Verlauf der Wachstumskurven im „Chemostat mit konstantem Volumen“ bei täglichem Zusatz von frischem Abwasser-Seewassergemisch

Grundwert liegt zwischen pH 7,9 und 8,0. In der Konzentration 1 : 10 000 sinkt der pH-Wert am ersten Tag auf 6,9 ab, stellt sich in den folgenden Tagen aber immer wieder auf einen Grundwert von 7,7 bis 7,9 ein. Die täglichen Abwasserzugaben lassen ihn dabei täglich auf ca. 7,5 absinken. In der Konzentration 1 : 7500 liegt die Anfangsspitze bei 6,5. Der pH-Wert pendelt in den folgenden Tagen zwischen 7,6 und 7,1. Bei Konzentrationen von 1 : 5000 und 1 : 4000 liegen die täglichen Grundwerte etwa bei pH 7,4 bzw. 7,3; die Spitzenwerte liegen bei pH 7,0 bzw. 6,8. Der tägliche pH-Sprung



beträgt im Mittel 0,4. In der Konzentration 1 : 3000 wird am ersten Tage der pH 5,8 erreicht. Die täglich folgenden Spitzenwerte liegen zwischen pH 6,0 und 6,2, gehen jedoch auf Grundwerte von 6,6 bis 6,9 zurück. Die mittlere pH-Schwankung liegt bei 0,6.

Die Methodik der Versuche im „Chemostat mit konstantem Volumen“ wurde auf p. 25 erläutert. In den auf 1 Liter konstant gehaltenen Versuchsflaschen wurden täglich

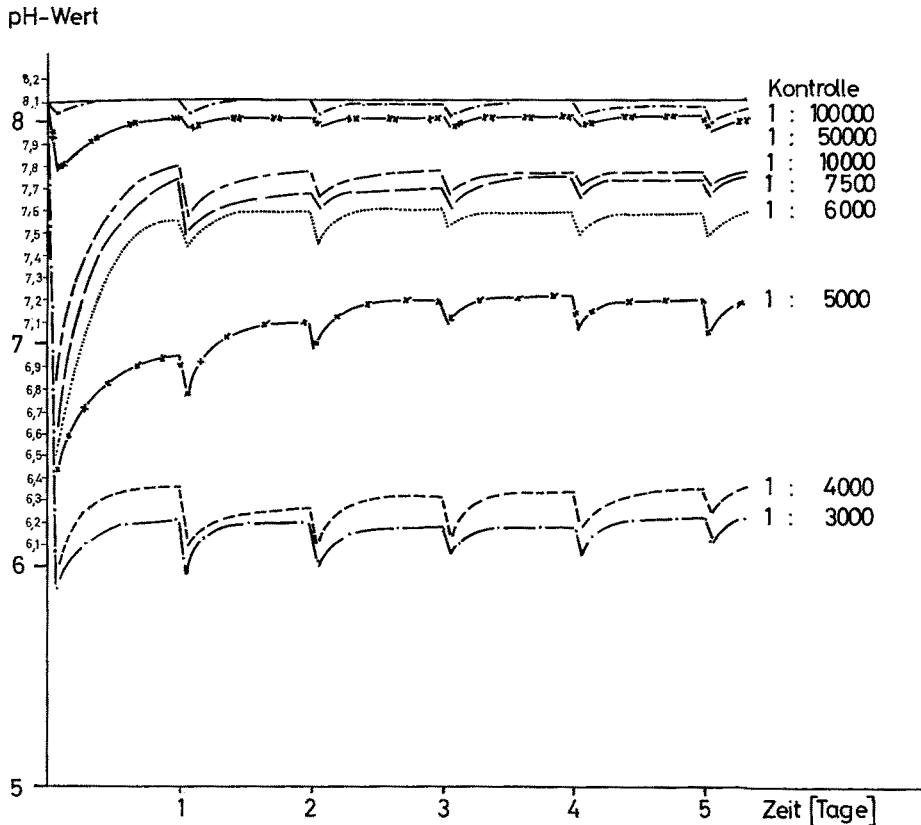


Abb. 9: *Prorocentrum micans*. Verlauf der pH-Änderung im „Chemostat mit konstantem Volumen“ bei täglichem Zusatz von frischem Abwasser-Seewassergemisch

ca. 200 cm<sup>3</sup> Versuchslösung ausgetauscht. Abbildung 8 zeigt den Verlauf der Wachstumskurven der Populationen über einen Zeitraum von 25 Tagen. Wie in dem vorstehend geschilderten Versuch verläuft die Kurve der Zelldichte im Kontrollversuch als horizontale Gerade bei 1000 Zellen/cm<sup>3</sup>. In der Verdünnung von 1 : 100 000 liegt die Zelldichte bis zum 6. Tage ebenfalls annähernd bei 1000 Zellen/cm<sup>3</sup> und sinkt bis zum Versuchsende langsam auf 800 Zellen/cm<sup>3</sup> ab. In den Konzentrationen 1 : 50 000 und 1 : 32 000 fällt die Zelldichte gleich in den ersten 3 Tagen auf 900 Zellen/cm<sup>3</sup> ab, hält sich bis zum 12. Tage etwa bei 800 Zellen/cm<sup>3</sup> und sinkt bis zum 25. Tage langsam auf

700 bzw. 550 Zellen/cm<sup>3</sup> weiter ab. Die Verdünnung 1 : 25 000 bleibt bis zum 8. Tage etwa bei 800 Zellen/cm<sup>3</sup>, sinkt bis zum 15. Tage relativ schnell bis auf 470 Zellen ab und bleibt bis Versuchsende etwa bei diesem Wert stehen (420 Zellen/cm<sup>3</sup>). In den Konzentrationen 1 : 10 000 und 1 : 7500 ist der Abfall der Kurven vom 8. Tage an ebenfalls beschleunigt und führt bei Versuchsende zu Zelldichten von 200 bzw. 140 Zellen/cm<sup>3</sup>. Der Kurvenverlauf der Konzentrationen 1 : 5000, 1 : 4000 und 1 : 3000 hebt sich deutlich von der Schar der vorigen Kurven ab. In den ersten 2 Tagen fällt die Zelldichte sofort auf Werte von 700 bzw. 650 Zellen/cm<sup>3</sup> ab. In allen 3 Stufen zeigt sich in den nächsten Tagen jedoch eine deutliche Erholungsphase bis zum 6. Tage (1 : 5000 und 1 : 4000) bzw. 4. Tage (1 : 3000). Dann aber kommt die Vermehrung vollends zum Stillstand, so daß die Kurven relativ parallel bis auf Werte von 26 (1 : 5000), 21 (1 : 4000) und 8 (1 : 3000) Zellen/cm<sup>3</sup> bei Versuchsende absinken. Vom 7. bzw. 5. Tage an verlaufen sie daher parallel zur theoretischen Verdünnungskurve.

In Abbildung 9 sind die zugehörigen Werte der pH-Kontrollen in den Versuchsgefäßen vor und nach dem täglichen Austausch an Versuchslösung aufgetragen. Die Kontrolle hält den pH-Wert von 8,1 nahezu konstant über die ganze Versuchsdauer ein. Wie im vorigen Versuch gibt die erstmalige Abwasserzugabe den stärksten pH-Abfall. An den folgenden Tagen ist der pH-Abfall entsprechend geringer, da nur  $\frac{1}{3}$  des Chemostat-Volumens durch frisches Abwassergemisch ausgetauscht wird.

In der Konzentration von 1 : 100 000 weicht der pH-Wert täglich nur um 0,06 vom Grundwert von 8,1 ab. Bei einem Gemisch von 1 : 50 000 sinkt der pH-Wert am ersten Tage auf 7,8 ab. Der Grundwert liegt in den folgenden Tagen bei 8,02. Die tägliche pH-Abweichung beträgt wiederum nur 0,06. In Konzentrationen von 1 : 10 000 bis 1 : 6000 liegen die Grundwerte bei 7,8 bzw. 7,6, die täglichen Spitzenwerte bei 7,7 bzw. 7,5. Die pH-Kurve der Konzentration 1 : 5000 hebt sich deutlich von den vorigen ab. Nach einer Anfangsspitze von pH 6,4 am ersten Tage steigt der Grundwert im Laufe von 3 Tagen auf pH 7,2 an. Die tägliche pH-Schwankung beträgt etwa 0,14 vom Grundwert. Bei Konzentrationen von 1 : 4000 und 1 : 3000 ist ein weiterer Sprung im Kurvenbild abzulesen. Die pH-Werte stellen sich nach anfänglichem Absinken auf 5,95 bzw. 5,90 auf Grundwerte von ca. 6,3 bzw. 6,2 ein. Die täglichen Spitzenwerte liegen um 6,15 bzw. 6,05. Die tägliche pH-Änderung liegt daher im Mittel bei 0,15.

### *Ceratium furca*

#### *Versuche in Schreiberlösung*

Die Ergebnisse der Kulturerperimente zur Ermittlung der Vermehrungsrate sind in Abbildung 10 dargestellt. *Ceratium furca* wächst bei 18°C und 8000 Lux (Tageslicht-Leuchtröhren) in 300 cm<sup>3</sup> Schreiberlösung von einer Zelldichte von 2 Zellen/10 cm<sup>3</sup> innerhalb von 34 Tagen auf 5000 Zellen/10 cm<sup>3</sup> heran. Aus dem Anstieg der Geraden berechnet sich eine mittlere Teilungsgeschwindigkeit von je einer Zellteilung in drei Tagen.

Zusätzlich wurde in Abbildung 10 noch das Ergebnis eines Kulturversuchs mit *Ceratium horridum* abgebildet. Unter gleichen Bedingungen steigt die Zellzahl inner-

halb von 22 Tagen bis zu einer Dichte von 100 Zellen/10 cm<sup>3</sup>. Die Teilungsgeschwindigkeit liegt bei einer Zellteilung in etwa 4 Tagen.

### Versuche unter Abwassereinfluß

Nach der auf p. 25 unter Punkt (1) beschriebenen Methode wurden die Testorganismen in ein um 24 Stunden gealtertes Abwasser-Seewasser-Gemisch eingesetzt und über einen Zeitraum von 18 Tagen weiterkultiviert. Die Ergebnisse der täglichen Zellzählungen im Kontrollversuch und in 6 verschiedenen Abwasserkonzentrationen sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Kulturen wurden mit einer Zelldichte von 10 Zel-

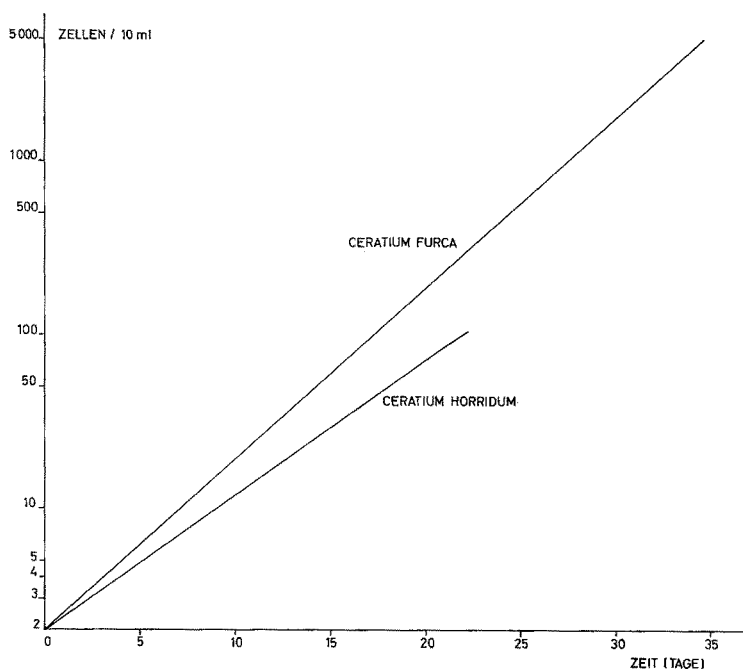


Abb. 10: *Ceratium furca*. Zunahme der Zelldichte bei 18° C in 300 cm<sup>3</sup> Schreiberlösung bei 8000 Lux (Tageslichtleuchtröhren)

len/cm<sup>3</sup> angesetzt. In der Kontrolle steigt die Zelldichte innerhalb der Versuchszeit auf 185 Zellen/cm<sup>3</sup> an. In der Abwasserkonzentration 1 : 100 000 macht sich bereits ein leichtes Absinken der Vermehrungsrate bemerkbar. Die Kultur wächst im gleichen Zeitraum nur noch auf die Dichte von 130 Zellen/cm<sup>3</sup>. In der Konzentration 1 : 50 000 ist die Beeinträchtigung der Vermehrung bereits deutlich ausgeprägt, da die Zelldichte bei Versuchsende nur noch 63 Zellen/cm<sup>3</sup> erreicht. In den folgenden Konzentrationsstufen von 1 : 10 000 bis 1 : 4000 liegen die Zelldichten bei Versuchsende nur noch bei 50 bis 22 Zellen/cm<sup>3</sup>. Bei einer Konzentration von 1 : 3500 stirbt in den ersten 14 Tagen ein großer Teil der Zellen ab. Die Überlebenden halten sich bis zum Versuchsende etwa auf gleicher Zelldichte von 2 Zellen/cm<sup>3</sup>.

## DISKUSSION

Die Ergebnisse der Versuche unter Abwassereinfluß sind im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse. Die Methodik dieser Versuche wurde jedoch erst aus den vorher durchgeführten Experimenten zur Ermittlung optimaler Kulturbedingungen

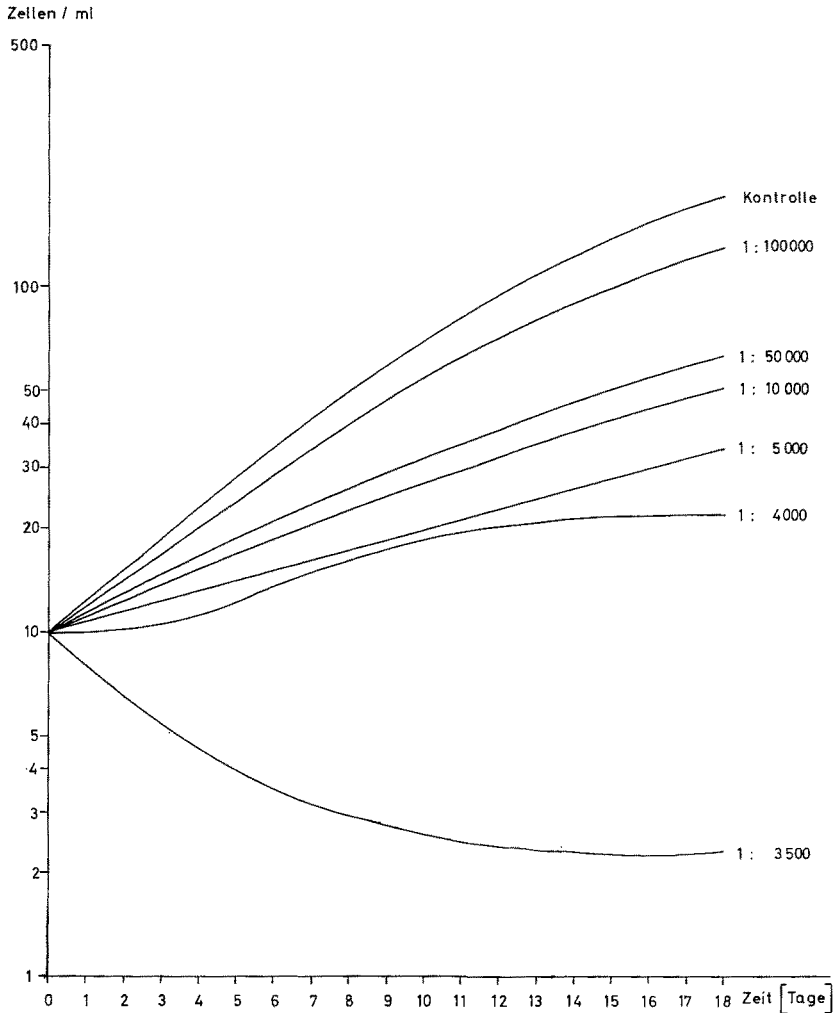


Abb. 11: *Ceratium furca*. Verlauf der Wachstumskurven bei Einwirkung von um 24 Stunden gealterten Abwasser-Seewassergemischen in 200 cm<sup>3</sup> Lösung

heraus entwickelt. Hierfür wurden die Algen sowohl in geschlossener Flasche bei konstantem Volumen (Abb. 1 und 10) als auch im Chemostat-Verfahren (Abb. 2) gezüchtet. Ein Vergleich der nach beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse zeigt übereinstimmende Vermehrungsraten in der exponentiellen Wachstumsphase der Populationen.

Bei der in begrenztem Volumen folgenden Phase des Absterbens der Kultur ist das Phänomen der Erholung auf Grund von Remineralisierungsvorgängen aus abgestorbenen Individuen bei 18° C deutlich ausgeprägt (Abb. 1). Für die Beurteilung von Abwassereinflüssen wurde in den späteren Versuchen aber immer nur auf die Beeinflussung in der exponentiellen Phase Bezug genommen; sie schließt die durch das begrenzte Versuchsvolumen bedingten Erschöpfungserscheinungen der Kulturen noch nicht ein und entspricht daher den Verhältnissen in freier Natur. Auch im Chemostat-Verfahren befindet sich die Kultur in der exponentiellen Phase der Vermehrung. Die Ergebnisse der nach beiden Methoden durchgeführten Abwasserversuche sind daher direkt miteinander vergleichbar.

Das Kriterium zur Beurteilung der Toxizität des geprüften Abwassers bildete die Beeinflussung der Vermehrungsrate. HALSBAND (1968) unterscheidet bezüglich des schädigenden Einflusses von Abwässern drei Phasen: (a) Letalitätsgrenze (die Organismen sind nicht lebensfähig und gehen nach kurzer Zeit ein); (b) Störungsschwelle (die Organismen unterliegen stärkeren physiologischen Schwankungen, die jedoch noch nicht unmittelbar zum Tode führen; können die Organismen in biologisch gesündere Zonen abwandern, so überleben sie, gelingt ihnen dies nicht, führen die Schädigungen auf die Dauer gesehen zum Tode); (c) Erträglichkeitsgrenze (geringe Schädigungen können von den Organismen kompensiert werden). HALSBANDS Klassifizierung bezieht sich auf die Reaktion von Einzelorganismen. Bei der Deutung vorliegender Versuche muß man sich jedoch vor Augen halten, daß die Ergebnisse das Verhalten ganzer Populationen wiedergeben. Ein Rückgang der Vermehrungsrate einer Art führt in freier Natur bereits zu einer Störung des dynamischen Gleichgewichts der Biocoenose.

Die kritische Grenze, die einer Beurteilung von Abwassereinleitungen zugrunde gelegt werden muß, liegt bereits bei einer ersten, deutlich erkennbaren Beeinflussung der Vermehrungsrate. Der Grenzwert bleibt dabei noch innerhalb der von HALSBAND definierten „Erträglichkeitsgrenze“, da die Schädigungen von den Testorganismen bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden können. Die „Störungsschwelle“ geht unmittelbar in die „Letalitätsgrenze“ über, weil sich die Testorganismen über die ganze Versuchsdauer unter Abwassereinfluß befanden und nicht in sauberes Wasser ausweichen konnten.

Die Ergebnisse aller Versuche zeigen übereinstimmend, daß jegliche Abwasserzugabe bereits einen Einfluß auf die Vermehrungsrate erkennen läßt. Bei *Prorocentrum micans* bleibt die Schädigung in Konzentrationen von 1 : 100 000 und 1 : 50 000 noch fast unmerklich. In der Konzentration von 1 : 32 000 ist die Schädigung bereits deutlich ausgeprägt. Bei *Ceratium furca* beginnt die Grenze einer deutlichen Schädigung bereits in der Konzentration von 1 : 50 000. In beiden Arten nimmt die Beeinträchtigung der Vermehrungsrate in den höheren Konzentrationen fließend zu. Bei *Prorocentrum micans* überwiegt im Mischungsverhältnis 1 : 5000 in den ersten Tagen bereits die Zahl der absterbenden Organismen die Zahl der zuwachsenden. Die Letalitätsgrenze liegt bei Konzentrationen unterhalb von 1 : 2500. Für *Ceratium furca* liegt die Letalitätsgrenze bereits unterhalb der Konzentration 1 : 3500.

Bei Versuchsbeginn macht sich die Schädigung jeweils am stärksten bemerkbar. Es folgt eine Phase der Erholung. Die Organismen besitzen bis zu einem gewissen Grad die Fähigkeit, sich an die veränderten Umweltbedingungen anzupassen. Ferner kann

auch eine Selektion resistenter Individuen oder resistenter Entwicklungsphasen der Individuen innerhalb der Population stattfinden; sie ermöglicht die Erholungsphase und das Fortbestehen der Kulturen. In den mit frischem Abwasser beschickten Versuchen bedingt auch die erstmalige starke pH-Erniedrigung eine extreme Anfangsbelastung, die mit einer maximalen Anfangsschädigung beantwortet wird.

Ein Vergleich der in gealtertem Abwassergemisch gezüchteten Kulturen mit den Kulturen unter Einfluß von frischem Abwasser zeigt keine wesentlichen Unterschiede der Ergebnisse. Auch die Versuche nach dem Chemostatprinzip kommen grundsätzlich zu gleichen Resultaten. Die Höhe der Abwasserkonzentration hat über längere Zeiträume hinweg gesehen demnach größere Bedeutung für die Reaktionen der Organismen als der Einfluß der Anteile von frischem Abwassergemisch zu gealtertem. Haben sich die Organismen erst einmal an das Milieu angepaßt, sind sie in der Lage, tägliche pH-Schwankungen in gewissen Grenzen zu überstehen.

Für die Frage, welche Bestandteile des Abwassers die toxische Wirkung hauptsächlich bedingen, können drei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: (1) Einfluß des  $H_2SO_4$ -Anteils, (2) Einfluß des  $Fe(OH)_3$ -Niederschlages und (3) Einfluß toxischer Metallionen.

Die subletalen Schädigungen in Konzentrationen von 1 : 100 000 und 1 : 50 000 sind vermutlich nicht auf die geringen pH-Verschiebungen des Abwasser-Seewassersystems zurückzuführen, sondern durch die Wirkung des Fe-Niederschlages oder toxischer Metallionen zu erklären. Die entstehenden Fe-Hydroxidflocken wirken als Fällungsmittel für schwebende Partikel und schließen diese ein. Ein Teil der Organismen könnte auf diese Weise abgefangen werden. In höheren Konzentrationen macht sich zusätzlich die pH-Verschiebung bemerkbar. In Konzentrationen von 1 : 5000 pendelt der pH-Wert im Chemostat-Verfahren um den Wert 7 und liegt bei höheren Konzentrationen zwischen 6 und 6,5. Im Verfahren mit nur einmaliger Abwasserzugabe zu Versuchsbeginn stellt sich der pH-Wert auf 7,5 (1 : 5000) bzw. 7,0 (1 : 4000) und 6,8 (1 : 2500) ein. Eine Klärung der Wirkungsmechanik eines so komplexen Abwassers läßt sich aber mit Sicherheit erst anhand von Versuchen mit den einzelnen Abwasserbestandteilen erzielen und soll künftigen Versuchen vorbehalten sein.

Die Ergebnisse vorliegender Versuche entsprechen in der Größenordnung der schädigenden Konzentrationen den Untersuchungen von KINNE & ROSENTHAL (1967) an Eiern und Larven von *Clupea harengus* und von KINNE & SCHUMANN (1968) an jungen *Gobius pictus* und *Solea solea*.

Der Schwerpunkt vorliegender Versuche wurde auf die Entwicklung von Kulturmethoden gelegt, die subletale Einflüsse toxischer Abwässer über lange Zeiträume erkennen lassen. Die Prüfung der Industrieabwässer der Titanwerke GmbH bot dabei den praktischen Anlaß. Es erschien angebracht, die Ergebnisse der Versuche bereits vor der ersten Einleitung der Abwässer im Seegebiet bei Helgoland zu veröffentlichen.

Ziel weiterer Untersuchungen wird es sein, Standardmethoden zu entwickeln, um mit geeigneten Organismen die Toxizität unbekannter Abwässer im Züchtungsverfahren zu testen.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Die geplante Einleitung von Industrieabwässern eines Titandioxidwerkes in ein Seegebiet 12 Seemeilen nordwestlich Helgolands gibt den Anlaß, Untersuchungen über die Toxizität dieser Abwässer im Labor aufzunehmen. Die Untersuchungen wurden an zwei marinen Flagellaten durchgeführt, *Prorocentrum micans* und *Ceratium furca* (Dinophyta). Beide Arten treten im Plankton der Nordsee häufig auf.
2. Grundlage der Toxizitätsuntersuchungen boten Züchtungsexperimente über den Einfluß von Temperatur, Licht und Nährstoffbedarf. Die Experimente wurden mit Unialgalkulturen sowohl in Flaschen als auch nach dem Chemostat-Prinzip durchgeführt. Die Vermehrungsrate der Algen wurde durch Auszählen definierter Proben bestimmt.
3. In den Versuchen unter Abwassereinfluß bildete die Beeinträchtigung der Vermehrungsrate das Kriterium zur Beurteilung der Toxizität. Die Testorganismen wurden in Konzentrationen von 1 : 100 000 bis 1 : 2500 Teilen Abwasser : Seewasser über einen Zeitraum von mehreren Wochen kultiviert. In getrennten Versuchsansätzen wurde der Einfluß von frischen und von gealterten Abwasser-Seewassergemischen untersucht. Der Verlauf der pH-Änderung in den Versuchsgefäßen wurde über die gesamte Versuchsdauer gemessen.
4. Die Ergebnisse lassen erkennen, daß die Vermehrungsrate der Algen bereits durch Abwasserkonzentrationen von 1 : 100 000 leicht beeinflußt wird. Deutlich schädigende Wirkungen treten bei *Ceratium furca* in Konzentrationen von 1 : 50 000, bei *Prorocentrum micans* von 1 : 32 000 Teilen Abwasser : Seewasser auf. In Konzentrationen von 1 : 5000 kommt bei *Prorocentrum micans* das Wachstum der Kulturen vollkommen zum Erliegen. Die letalen Konzentrationen liegen für *Ceratium furca* unterhalb 1 : 3500, für *Prorocentrum micans* unterhalb 1 : 2500 Teilen Abwasser : Seewasser.
5. Bei der Festsetzung der Grenzwerte, die bei Abwassereinleitungen in See eingehalten werden müßten, sollten insbesondere die Ergebnisse von Untersuchungen über subletale Schädigungen zugrunde gelegt werden. Die hier vorgelegten Untersuchungen über die Beeinflussung der Vermehrungsrate mariner Flagellaten durch Industrieabwässer leisten dazu einen Beitrag.

*Danksagung.* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft wird für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens gedankt. Meinem technischen Assistenten, Herrn R. BENESCH, sage ich Dank und Anerkennung für seine Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit. Ebenso möchte ich Fräulein P. HOSUMBEC für die Anfertigung der Zeichnungen danken.

## ZITIERTE LITERATUR

- BERNHARD, M., ZATTERA, A. & FILESI, P., 1966. Suitability of various substances for use in the culture of marine organisms. *Pubbl. Staz. zool. Napoli* **35**, 89–104.
- BRAARUD, T., 1961. Cultivation of marine organisms as a means of understanding environmental influences on populations. In: *Oceanography*. Ed. by M. Sears. *Publ. Am. Ass. Advmt. Sci.* **67**, 271–298.

- FOGG, G. E., 1965. Algal cultures and phytoplankton ecology. The Athlone Press, London, 126 pp.
- HALSBAND, E., 1968. Physiologische Untersuchungsmethoden zur Bestimmung des Schädlichkeitsgrades von Abwassergiften in Süß-, Brack- und Salzwasser. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **17**, 224–246.
- HUECK, H. J. & ADEMA, D. M. M., 1968. Toxicological investigations in an artificial ecosystem. A progress report on copper toxicity towards algae and daphniae. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **17**, 188–199.
- KINNE, O. & ROSENTHAL, H., 1967. Effects of sulfuric water pollutants on fertilization, embryonic development and larvae of the herring, *Clupea harengus*. *Mar. Biol.* **1**, 65–83.
- & SCHUMANN, K. H., 1968. Biologische Konsequenzen schwefelsäure- und eisensulfathaltiger Industrieabwässer. Mortalität junger *Gobius pictus* und *Solea solea* (Pisces). *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **17**, 141–155.
- STOSCH, H. A. v. & DREBES, G., 1964. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. IV. Die Planktondiatomee *Stephanopyxis turris* – ihre Behandlung und Entwicklungsgeschichte. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **11**, 209–257.

Anschrift des Autors: Dr. H. KAYSER  
Biologische Anstalt Helgoland  
Meeresstation  
2192 Helgoland