

# Zur Reinkultur von *Dunaliella*

Von Klaus-Jürgen Götting

Biologische Anstalt Helgoland, Meeresstation auf Helgoland

(Mit 7 Tabellen und 9 Abbildungen im Text)

## Inhaltsübersicht

0 Einleitungen S. 404 — 1 Methodik S. 404 — 2 Bisherige Ergebnisse S. 405 — 3 Eigene Untersuchungen S. 408 — 31 Vorversuche S. 408 — 32 Hauptversuche S. 411 — 321 Einfluß von Vitamin B<sub>12</sub> S. 411 — 322 Einfluß von  $\beta$ -Indolylessigsäure S. 412 — 323 Einfluß von Gibberellinsäure S. 413 — 324 Einfluß von Maleinhydrazid S. 416 — 325 Vitaminkombinationen und präzipitatzfreie Nährlösung S. 417 — 326 Vitaminkombination und Spurenelemente S. 418 — Zusammenfassung S. 422 — Angeführte Schriften S. 422.

## 0 Einleitung

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, für die Anlage von Zooplankton-Kulturen und für spätere strahlenbiologische Arbeiten die optimalen Bedingungen für Kulturen einzelliger Grünalgen im Laboratorium zu untersuchen.

Die Arten der Gattung *Dunaliella* haben sich für die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen und als Futterorganismen schon in einigen marin-biologischen Instituten bewährt. Daher wurde für die Versuche *Dunaliella euchlora* LERCHE, 1937 herangezogen.

Es war von vornherein nicht beabsichtigt, sterile Kulturen anzulegen, jedoch wurde die Zahl der Bakterien in Grenzen gehalten, in denen ein spürbarer Einfluß auf den Entwicklungsverlauf der Kultur nicht anzunehmen war.

Der Begriff „Reinkultur“ ist in dem von SCHREIBER (1927) definierten Sinne gebraucht: „Eine ‚Reinkultur‘ enthält konventionell außer dem kultivierten Organismus nur noch unschädliche Bakterien, die Bezeichnung ‚absolute Reinkultur‘ schließt auch Bakterien aus.“

Den Herren Dr. H. J. AURICH, List, und Dr. P. KORNMANN, Helgoland, danke ich für wertvolle Literaturhinweise, letzterem auch für die Überlassung des Impfmateri als von *Dunaliella*.

Mit diesen Untersuchungen wird an der Biologischen Anstalt Helgoland eine Tradition wiederaufgenommen, die auf E. SCHREIBER zurückgeht, der bereits in den zwanziger Jahren auf Helgoland marine Diatomeen und eine Chlorophycee kultivierte.

## 1 Methodik

Das Ansetzen der Nährlösungen erfolgte auf der Grundlage natürlichen Seewassers, das der Seewasserleitung der Biologischen Anstalt entnommen

wurde. Dieses Wasser kommt durch eine Pumpleitung von der NO-Mole aus der freien See. Größere Partikel können in den Tiefbehältern sedimentieren. Vor Gebrauch wurde dieses Wasser durch eine Seitz-Klärscheibe Nr. 5 gefiltert. Bei den ersten Versuchen erhitzen wir anschließend nur bis 65° C, weil Bedenken bestanden, daß es bei stärkerer Erwärmung zu Ausfällungen im Seewasser und dadurch zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen könnte. Diese Bedenken erwiesen sich jedoch als nicht gerechtfertigt, so daß später nicht nur gekocht, sondern sogar autoklaviert wurde. Eventuelle Veränderungen im Seewasser fanden in einer Richtung bzw. in einem Ausmaße statt, die die Kulturen nicht ungünstig beeinflussten.

Es wurde streng darauf geachtet, für die Versuchsserien stets nur Seewasser aus einer bestimmten Vorratsflasche zu verwenden, um so einheitliche Beschaffenheit zu gewährleisten.

Als Kulturgefäße dienten Rundkolben von 500 ml Inhalt, mit der angegebenen Menge gefüllt. Bei einigen Versuchen wurden 700-ml-Scheidetrichter, 12-l-Vollglasaquarien und 55-l-Glasballons verwendet.

Die Kulturen entwickelten sich bei Dauerlicht von ungefähr 2200 Lux und einer Temperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Eine Tageslichtröhre vom Typ Sylvania F 40 T 12/D, 40 W lieferte das Licht.

Für Nährlösungen mit Erdextrakt bereiteten wir ein Dekokt auf folgende Weise: Die Erde wird mit der zwei- bis dreifachen Wassermenge etwa zwei Stunden gekocht. In dieser Zeit verdampft ein großer Teil des Wassers, so daß man nach Erkalten etwa so viel Filtrat erhält, wie vorher Erde eingemessen wurde.

Zur Auszählung der Kulturdichte erwiesen sich Blutzählkammern mit Netzteilung nach Buerker am zweckmäßigsten. Von den neun vorhandenen Gruppenquadraten wurden im allgemeinen zehnmal die fünf ausgezählt, die sich nur mit einer Ecke berühren, so daß jeder Punkt der Kurven das Mittel aus 50 Einzelwerten darstellt.

Die Ergebnisse der Zählungen wurden statistisch ausgewertet (vgl. LINDER 1953). Dazu waren von vornherein einige Voraussetzungen einzuhalten: 1. die Versuche wurden mehrfach wiederholt, 2. die Zuteilung der Verfahren erfolgte zufällig, 3. wurden die Versuche zu Blöcken zusammengefaßt.

Bei der Auswertung zeigte sich zuerst durch den  $\chi^2$ -Test, ob die Grundgesamtheiten dieselbe Streuung  $\sigma^2$  hatten. War das der Fall, so erschloß sich damit der Weg für die Anwendung von F- und t-Test. Der F-Test ergab, ob überhaupt signifikante Differenzen zwischen den Gruppenmitteln vorhanden waren und der t-Test zeigte an, wo diese Differenzen liegen. Die t-Werte sind in den folgenden Tabellen mitaufgeführt.

## 2 Bisherige Ergebnisse

Die Geschichte der Anlage von Kulturen einzelliger mariner Algen ist verknüpft mit der Geschichte der Süßwasseralgenkulturen. Viele wertvolle Erfahrungen, gewonnen vor allem an *Chlorella*- und *Scenedesmus*-Arten, ließen sich sinnentsprechend übertragen. PRINGSHEIM (1954) hat einen Großteil dieser Erfahrungen in einer Kulturanleitung zusammengefaßt.

MIRQUEL (1890/93) publizierte zuerst Ergebnisse über Diatomeen-Kulturen, ALLEN & NELSON (1907) entwickelten darauf aufbauend eine Nährlösung, mit

der sie unter anderem bei *Chaetoceras*, *Biddulphia*, *Skeletonema* und *Coscinodiscus* gute Erfolge erzielten. Die Rezepte dieser und weiterer Nährlösungen sind bei PROVASOLI, McLAUGHLIN & DROOP (1957) übersichtlich und vergleichend dargestellt.

Der Lösung von MIQUEL ähnlich ist die von HOUGHTON GILL (VAN HEURCK 1893/96, 1897), das von RICHTER (1903, 1904) angegebene Medium ist besonders für Diatomeen geeignet (MANGERET & CHABERT 1953). STAGNO D'ALCONTRES, LAMONICA, POLIMENI CONTI & LINO (1960) verwenden noch in jüngster Zeit für ihre Massenkultur eine Mineralsalz-Spurenelemente-Kombination des gleichen Prinzips.

Ein großer Schritt vorwärts war die Einführung von Erdextrakt als Zusatz zum Kulturmedium durch FØYN (1934) auf der Grundlage der Nährlösung von SCHREIBER (1927). Diese „Erdschreiberlösung“ hat sich für eine Vielzahl von Algen sehr gut bewährt und liefert auch jetzt noch die höchsten Populationsdichten. Sie ist besonders geeignet für die Anlage von Massenkulturen (WISELY & PURDAY 1961).

Der Nachteil dieser mit Erdschreiberlösung versetzten Kulturen ist in der weitgehend unbekanntem Zusammensetzung des Erdextraktes begründet. Vielleicht liegt der Grund für seine besondere Wirksamkeit in dem Gehalt an komplexen Metallverbindungen, vielleicht im Vitamingehalt. In beiden Richtungen sind eine Reihe von Untersuchungen vorgenommen worden.

Anstelle von Erdextrakt setzte SWEENEY (1954) als Chelatbildner Äthylen-diamintetraessigsäure (ÄDTE) zu, außerdem Vitamin B<sub>12</sub>. Diese Lösung ist für den Dinoflagellaten *Gymnodinium splendens* und viele andere Einzeller gut geeignet. Nach PROVASOLI & PINTNER (1953) müssen jedoch Zn-, Mn-, Cu- und Co-Salze zugefügt werden, um den Verlust an freien Ionen durch ÄDTE auszugleichen. Vitamin B<sub>12</sub> wird von vielen niederen und höheren Algen gebraucht. Von 25 Algen enthielten 23 größere Mengen B<sub>12</sub>. Am stärksten ist die Konzentration nach unseren bisherigen Kenntnissen bei *Vaucheria dichotoma* mit 2,8  $\gamma$  pro g Trockenmasse (LUNDIN & ERICSON 1955). Als Primärquelle dienen wahrscheinlich epiphytische Bakterien: von 34 isolierten Bakterienarten konnten 24 B<sub>12</sub> produzieren, und zwar erzeugten Bakterien von B<sub>12</sub>-armen Algen wenig B<sub>12</sub>, Bakterien von B<sub>12</sub>-reichen Algen viel. Das Vitamin wird vor allem in der Zellwand gespeichert: die einzellige Grünalge *Valonia* enthält in der Wand 0,2  $\gamma$  B<sub>12</sub> pro g Trockengewicht, im Protoplasma dagegen weniger als 0,001  $\gamma$ . Der Bedarf an Vitamin B<sub>12</sub> ist bei vielen Arten hoch. Darauf aufbauend konnten HAMILTON, HUTNER & PROVASOLI (1952) eine biologische Bestimmungsmethode mit Hilfe von Chrysomonaden für dieses Vitamin vorschlagen. Phototrophe Arten verlangen im allgemeinen nur Vitamin B<sub>12</sub>, Thiamin und Biotin (PROVASOLI 1960). *Dunaliella* macht eine Ausnahme: sie braucht kein B<sub>12</sub> (PROVASOLI 1956).

Eine weitere Erhöhung der Ausbeute ist mit pflanzlichen Wuchshormonen versucht worden, vor allem an höheren Algen. ALGEUS konnte durch  $\beta$ -Indolyl-essigsäure die Zellzahl erhöhen, nicht aber die Zellgröße (zitiert nach THIMANN & BETH 1959). Mit Gibberellinsäure konnten BURDETT & TURNBULL (1960) bei *Chlamydomonas moewusii* zunächst die Zellzahl steigern, die Zellgröße erreichte nach etwa neun Tagen die der Zellen im Kontrollversuch. Demgegenüber soll die Biomasse bei Verwendung von Substanzen der Auxingruppe nach PINEVICH & VERZILIN (1961) trotz Erhöhung der Zellzahl abnehmen. Maleinhydrazid in optimalen Konzentrationen ( $10^{-2}$  bis  $10^{-1}$  mg/l für *Chlorella pyre-*

*noidosa*) hat nach Angabe derselben Autoren diese nachteilige Wirkung nicht, sondern erhöht Photosynthese- und Atmungsaktivität und die Trockensubstanzspeicherung. Normalerweise sind Chlorophyll- und Stickstoff-Gehalt in größeren Zellen geringer (Carnegie ... Publ. 600, 1953).

Bei *Chlorella* ließ sich die Besatzdichte mittels Durchlüftung um 50% steigern, noch etwas mehr bei Zusatz von 5% CO<sub>2</sub> zum Luftstrom (Carnegie ... Publ. 600, 1953). Das ist für die Ausnutzung industrieller Abgase in Massenkulturen wichtig (KETCHUM, LILICK & REDFIELD 1949, MEFFERT & STRATMANN 1951, MYERS, PHILLIPS & GRAHAM 1951, ENEBO & JOHNSON 1956, FOGG, SMITH & MILLER 1959, WISELY & PURDAY 1961). Die Besiedlungsdichte ist nach Untersuchungen von VON DENFFER (1950) an *Nitzschia palea* ausschließlich von der Konzentration der Nährstoffe abhängig, während Temperatur, Lichtintensität und Zahl der eingepfropften Zellen nur die Geschwindigkeit bestimmen, mit der der Endzustand erreicht wird. Die erzielbare Zellkonzentration ist bei Süßwasseralgen wesentlich höher als bei marinen. Als Beispiel sei angeführt, daß bei *Chlorella* in 20 Tagen eine Dichte von  $950 \cdot 10^6$  Zellen/ml (Carnegie ... Publ. 600) erreicht wurde, bei *Dunaliella tertiolecta* (Chloroph.) in 28 Tagen  $3,1 \cdot 10^5$ , bei *Isochrysis galbana* (Chrysoph.) in 30—35 Tagen  $2 \cdot 10^6$  Zellen (WISELY & PURDAY 1961).

Massenkulturen sind aus zwei Gründen angelegt worden: einmal, um Material zu gewinnen für Untersuchungen, die die direkte Nutzung der Algen für den Menschen zum Ziele haben, zum anderen, um Futter für Zooplankter zu erhalten. Der Nährwert von 17 verschiedenen Algenarten für Austernveliger wurde von WALNE (1956) bestimmt, ähnliche Beobachtungen sind von DAVIS & GUILLARD (1958) angestellt worden. Die Wachstumsleistung von Algen für Copepoden soll bei etwa 70% liegen (HARVEY 1950).

Für Stoffwechsel- und andere Untersuchungen ist es unter Umständen notwendig, von einer absoluten Reinkultur auszugehen. Das Impfmateriale wird über Agar-Plattenkulturen und/oder Verwendung von Antibiotika für die Sterilisierung der Kulturen gewonnen (FELFÖLDY & KALKÓ 1959). In letzterem Falle muß mit einer nachteiligen Wirkung auf die Alge beziehungsweise einzelne Zellbestandteile gerechnet werden (PROVASOLI, HUTNER & PINTNER 1951, WILLIAMS 1960). Werden bakterienfreie Algen-Einkulturen verfüttert, so können sie beim Konsumenten zu Unfruchtbarkeit oder hoher Larvensterblichkeit führen. Ein Mischfutter aus zwei Arten wird dagegen gut vertragen (PROVASOLI, SHIRAIISHI & LANCE 1959).

Die Arten der Gattung *Dunaliella* sind weitgehend euryök. Sie sind nicht sehr empfindlich gegen pH-Verschiebungen, wie sie in den Kulturen stattfinden (BAGHDIAZ 1952), *Dunaliella salina* verträgt starke Salzgehaltsschwankungen (MARRÉ, SERVETTAZ & ALBERGONI 1958).

Zum Auszählen der Populationsdichten haben sich die üblichen Blutzählkammern bewährt. Das Auszählen ist mühsam, liefert aber zuverlässigere Werte als die Zelldichtebestimmung durch Messung der Lichtdurchlässigkeit einer kleinen Kulturmenge, da der Gehalt an Chlorophyll nicht konstant ist, sondern in größeren Zellen geringer wird (Carnegie ... Publ. 600). Diesen Nachteil vermeidet der elektronische Partikelzähler von MALONEY, DONOVAN & ROBINSON (1962).

## 3 Eigene Untersuchungen

Für eine intensive Kultur von *Dunaliella* war zunächst eine Reihe von Voraussetzungen zu prüfen. Dazu wurden zum Teil qualitative, zum Teil quantitative Vorversuche angestellt. Die quantitativen Hauptversuche sollten schließlich den Wert verschiedener Substanzen für eine Erhöhung der Populationsdichte klären.

## 31 Vorversuche

Die ersten Kulturen wurden mit den Nährlösungen von ALLEN & NELSON (1907) und SCHREIBER (1927) angesetzt. Damit erzielten wir unter den gegebenen Bedingungen ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , 2200 Lux) Konzentrationen von etwa  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Für eine weitere Steigerung des Ertrages ohne Zusatz von Erdextrakt sollte eine Lösung gefunden werden, die bei einfacher Zusammensetzung das bestmögliche Ergebnis liefert. Ausgehend von den chemischen Analysen von Seewasser und Meeresorganismen (VINOGRADOV 1953, DIETRICH & KALLE 1957) wurde ausgerechnet, welche Mengen an Salzen dem Medium zugesetzt werden müssen, um in 1 Liter Kulturflüssigkeit 100 g Organismen Entwicklungsmöglichkeit zu geben. Danach fehlt es an Nitrat, Phosphat, Eisen und Zink (und für Diatomeen an Silikat). Es ist zwar unwahrscheinlich, 100 g *Dunaliella* in einem Liter Nährlösung zu erhalten, diese Zahl wurde aber mit Absicht so hoch angesetzt, um ein Minimum an Nährstoffen auszuschließen. Die hohe Konzentration bringt natürlich die Gefahr mit sich, auf die Algen toxisch zu wirken oder störend in die osmotischen Beziehungen einzugreifen. Dementsprechend mußte die nächste Aufgabe darin bestehen, verschiedene Verdünnungen der errechneten Lösung herzustellen und die optimale Konzentration auszuprobieren. Auf diese Weise wurde eine Lösung erhalten (im folgenden als Nährlösung G 1 bezeichnet), die bei den späteren Versuchen zugrundegelegt wurde. Sie setzt sich so zusammen:

1	1 Seewasser, filtriert und autoklaviert
0,08	g $\text{NaNO}_3$
0,03	g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
0,004	g $\text{ZnSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
10	ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 1%ige Lösung.

Diese Lösung bildet ein Praecipitat wie alle bisher bewährten Lösungen (PROVASOLI, McLAUGHLIN & DROOP 1957), das abfiltriert wurde.

Die Wirkung von verdünntem Seewasser auf die Entwicklung der Kultur ergab keinen statistisch gesicherten Unterschied (Tab. 1). Daher wurde das Seewasser für alle folgenden Versuche in seiner natürlichen Konzentration (32—33‰) verwendet.

Eine Reihe nicht quantitativer Versuche zeigte, daß die Lösung G 1 den erwähnten Nährlösungen von ALLEN & NELSON und SCHREIBER zum mindesten ebenbürtig, wenn nicht gar überlegen ist. Daraufhin wurden auch quantitative Versuche angestellt. Das Ergebnis des Vergleichs von Schreiberlösung (ohne Erdextrakt) und G 1 zeigt die graphische Darstellung der Abb. 1. Auf der Ordinate ist — wie bei allen weiteren Abbildungen — der Faktor aufgetragen, um den sich die Kultur im angegebenen Zeitraum vervielfacht hat. Es bestätigt sich die alte Erfahrung, daß eine geringe Nährstoffkonzentration (in die-

sem Fall in der Schreiberlösung) eine günstigere Ausgangsbasis bildet als eine konzentriertere (G 1) (VON DENFFER 1950), obwohl die Differenz in diesem Falle gering ist. Schnell hat die konzentriertere die andere überflügelt, nach zwei Tagen weist sie bereits eine höhere Zelldichte auf. Nach vier Tagen ist die Wachstumsphase abgeschlossen, die Speicherphase beginnt.

Zusätze organischer Verbindungen wie Harnstoff, Pepton und Natriumacetat haben sich nicht bewährt. Sie erfordern steriles Arbeiten, da sonst die Bakterienentwicklung enorm ist und die *Dunaliella*-Kultur zum Zusammenbruch bringt.

Ähnliche Schwierigkeiten ergeben sich bei der Anlage von Kulturen in offenen Gefäßen wie flachen Wannen und Vollglasaquarien, die sehr schnell verunreinigt werden. Glasballons von ca. 50 l Inhalt haben diesen Nachteil zwar nicht, dafür ist aber die Schichtdicke zu groß und die Lösung der Frage

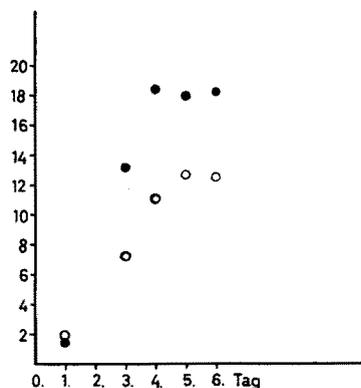


Abb. 1. Wachstum von *Dunaliella* in Schreiberlösung (weiße Kreise) und Nährlösung G 1 (schwarze Kreise). Auf der Ordinate ist der Zuwachsfaktor aufgetragen

der zweckmäßigsten Beleuchtung schwierig. Die beste Lichtausnutzung erzielt man durch eine eingetauchte Leuchtröhre. In unseren Versuchen wurden die Glasballons von außen mit  $2 \times 60$  W beleuchtet und damit Zelldichten von  $0,8 \cdot 10^6$  Zellen/ml erreicht.

*Dunaliella* ist gut beweglich. Es ist daher keine Vorrichtung notwendig, die eine Wasserumwälzung in der Kultur bewirkt. Die Versuchskolben wurden lediglich einmal am Tag vorsichtig geschüttelt.

Einige Kulturen setzten wir in Scheidetrichtern an und durchströmten sie von unten mit Preßluft. Es wurde sowohl ein groß- als auch ein feinblasiger Luftstrom eingestellt, um verschiedene Grade der Durchlüftung und Umwälzung zu erzielen. Die Entwicklung von *Dunaliella* erwies sich in allen Fällen als ungünstiger als in den Kolben mit stehender Nährlösung.

Der pH-Wert war unmittelbar nach dem Beimpfen der Nährlösung etwa der des Seewassers. pH-Werte von 8,0—8,5 sind die optimalen. Während der ersten Tage verschiebt sich die H-Ionenkonzentration zum alkalischen Bereich (Abb. 2). Diese Verschiebung findet während der Wachstumsphase statt und ist wohl begründet in der  $\text{CO}_2$ -Assimilation durch die Algen. Der pH-Wert bleibt im weiteren Verlauf bei etwa 9,6. Ein Abfall in der Speicherphase, wie er von VON DENFFER (1950) für *Nitzschia palea* beschrieben wurde, war erst

später festzustellen. Die in der Speicherphase einsetzende Fettbildung ist mit hoher  $\text{CO}_2$ -Abspaltung verbunden. So wird z. B. bei der Umwandlung einer bestimmten Molzahl Hexose in Stearinsäure die doppelte Molzahl  $\text{CO}_2$  frei. Der Überschuß an  $\text{CO}_2$  müßte zu einer Erniedrigung des  $\text{pH}$ -Wertes führen. Das ist jedoch erst nach ca. 8 Tagen der Fall, woraus zu schließen ist, daß das  $\text{CO}_2$  für die Assimilation wieder verbraucht wird. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, der  $\text{pH}$ -Wert bleibt für einige Zeit fast konstant. Nach etwa acht Wochen liegt er bei 8. Das weitere Absinken auf etwa 7,8 ist verbunden mit gelblicher Verfärbung der Zellen. Zum völligen Zusammenbruch der Kultur kommt es nur in seltenen Fällen, unter besonders ungünstigen Bedingungen (Verdunkelung, Temperaturabfall, Fremdinfection).

### Erläuterung zu den Tabellen

Tabelle a enthält jeweils die Versuchsergebnisse mit Angabe der Zahl der Einzelzählungen und Versuchswiederholungen.

Tabelle b gibt die berechneten Werte von SQ, DQ,  $\chi^2$  und F.

Tabelle c gibt die Streuungswerte und t.

Es werden einheitlich folgende Abkürzungen benutzt:

$\bar{x}$	ist der Zuwachsfaktor am Ende des Versuchszeitraumes, das Mittel aus $m \cdot N$ Einzelwerten innerhalb der Gruppe. $\bar{x}$ ist ein Relativwert, bezogen auf eine Anfangskonzentration von 1.
$\bar{x}_M$	ist das Mittel aus den $\bar{x}$ aller Gruppen.
m	Anzahl der Zählungen pro Versuch.
N	Anzahl der Versuche innerhalb der Gruppe.
n	Zahl der Freiheitsgrade.
$n_1$	Zahl der Freiheitsgrade zwischen den Gruppen.
$n_2$	Zahl der Freiheitsgrade innerhalb der Gruppen.
SQ	Summe der Quadrate.
DQ	Durchschnittsquadrat.
$\chi^2$	aus den Versuchsergebnissen berechneter Wert von $\chi^2$ .
$\chi^2_{0,05}$	theoretischer Wert von $\chi^2$ für die Sicherheitsschwelle 0,05.
F	} sind die entsprechenden Werte von F und t.
$F_{0,05}$	
t	
$t_{0,05}$	
K	Kontrollversuch (Närlösung ohne Zusätze).
$s^2$	Streuung.
s	mittlere quadratische Abweichung.
+	in der letzten Spalte der Tabelle c bedeutet, daß die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant sind,
—	daß sie nicht signifikant sind.

Ist  $\chi^2 < \chi^2_{0,05}$ , so kann man annehmen, daß die Grundgesamtheiten alle dieselbe Streuung  $\sigma^2$  haben. Damit ist die Voraussetzung erfüllt für die Anwendung des F- und des t-Tests.

Ist  $F > F_{0,05}$ , so bestehen zwischen den Durchschnittswerten der Gruppen gesicherte Unterschiede. Zwischen welchen Gruppen diese liegen zeigt der t-Test. Der Unterschied ist signifikant, wenn  $t > t_{0,05}$ . Ergeben sich  $\chi^2 > \chi^2_{0,05}$  oder  $F < F_{0,05}$ , so fällt Tabelle c sinn gemäß weg.

Für die Berechnung der einzelnen Größen sei auf LINDER (1953) verwiesen.

Die Mengenangaben der zugesetzten Substanzen beziehen sich stets auf 1 Liter Kulturflüssigkeit.

Tabelle 1  
 Unterschiede in der Wirkung von natürlichem und verdünntem Seewasser  
 auf die Kultur von *Dunaliella*

1 a

	Gruppe		$\bar{x}_M$
	1 Seewasser	2 80 %iges Seewasser	
$\bar{x}$	68,0	66,2	67,1
m	25	25	
N	5	5	
m · N	125	125	

1 b

Streuung	n	SQ	DQ
zwischen den Gruppen	1	1803,70	1803,70
innerhalb der Gruppen	8	225,06	28,13
insgesamt	9	2028,76	225,42

$\chi^2 = 1,59$   
 $n = 1$   
 $\chi^2_{0,05} = 3,84$

1 c

Gruppen	s <sup>2</sup>	s	t
1 und 2	28,133	5,304	0,536

$n = 8$   
 $t_{0,05} = 2,306$

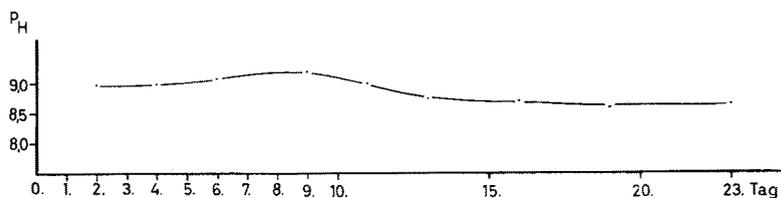


Abb. 2. Veränderung des pH-Wertes in *Dunaliella*-Kulturen

### 32 Hauptversuche

Ausgehend von der angegebenen Nährlösung als Grundlage ergibt sich die Frage, durch welche Zusätze die Zelldichte in der Kultur erhöht werden kann. Ein bewährtes Mittel ist Erdextrakt. Aus den im Abschnitt 2 genannten Gründen sollten Substanzen gefunden werden, die mindestens den gleichen Effekt auf die Produktionsfreudigkeit der Algen erzielen.

#### 321 Einfluß von Vitamin B<sub>12</sub>

Wie bereits erläutert, ist das Vitamin B<sub>12</sub> für eine große Zahl mariner Organismen von Bedeutung. *Dunaliella* schien nach den Untersuchungen von PROVASOLI (1956) eine Ausnahme zu machen.

Das Ergebnis unserer Versuche geht aus Abb. 3 und Tab. 2 hervor. Danach ist Vitamin B<sub>12</sub> ohne jeden Einfluß auf die Entwicklung der Kultur. Die um ein geringes höhere Populationsdichte bei Zusatz von 2  $\gamma$  B<sub>12</sub>/l ist statistisch nicht zu sichern. Dieses Resultat wurde durch mehrere Versuchswiederholungen bestätigt.

Man vergleiche mit dieser Anspruchslosigkeit hinsichtlich des B<sub>12</sub>-Gehaltes z. B. das Massenaufreten von *Gonyaulax* vor der amerikanischen Küste, das vom Vorhandensein von B<sub>12</sub> weitgehend abhängig ist und sich verheerend auswirken kann, indem ganze Fischschwärme vergiftet werden. Angeführt seien auch *Gymnodinium splendens* (SWEENEY 1954), *Monochrysis lutheri*, *Prymnesium parvum* und *Syracosphaera elongata* (DROOP 1955) als Beispiele für B<sub>12</sub> benötigende Organismen.

### 322 Einfluß von $\beta$ -Indolylessigsäure

Zusatz von  $\beta$ -Indolylessigsäure (IES) hat einen deutlich wahrnehmbaren Effekt. Optimal ist eine Konzentration von 2  $\gamma$ /l (Abb. 3, 3, Tab. 2). Die wirksame Menge liegt damit bedeutend niedriger als bei Gibberellinsäure (vgl. 323). BENTLEY (1959) gibt für *Skeletonema costatum* in synthetischem Kultur-

Tabelle 2

Einfluß von Vitamin B<sub>12</sub> und  $\beta$ -Indolylessigsäure auf die Kultur von *Dunaliella*

2 a

	Gruppen					$\bar{x}_M$
	1 K	2 1 $\gamma$ B <sub>12</sub>	3 2 $\gamma$ B <sub>12</sub>	4 2 $\gamma$ IES	5 4 $\gamma$ IES	
$\bar{x}$	36,99	32,76	42,66	60,81	41,67	42,98
m	25	25	25	25	25	
N	8	3	4	4	4	
m · N	200	75	100	100	100	

2 b

Streuung	n	SQ	DQ
zwischen den Gruppen	4	1879,31	469,83
innerhalb der Gruppen	18	2194,80	121,93
insgesamt	22	4074,11	185,22
	$\chi^2 = 5,50$	F = 3,85	
	n = 4	n <sub>1</sub> = 4	
	$\chi^2_{0,05} = 9,49$	n <sub>2</sub> = 18	
		F <sub>0,05} = 2,93</sub>	

2 c

Gruppen	s <sup>2</sup>	s	t	
1 und 2	100,92	10,05	0,622	—
1 und 3	102,33	10,12	0,915	—
1 und 4	180,23	13,43	2,897	+
1 und 5	88,05	9,38	0,814	—
2 und 3	63,69	7,98	1,626	—
4 und 5	178,30	13,35	2,027	—

$$n = 22$$

$$t_{0,05} = 2,074$$

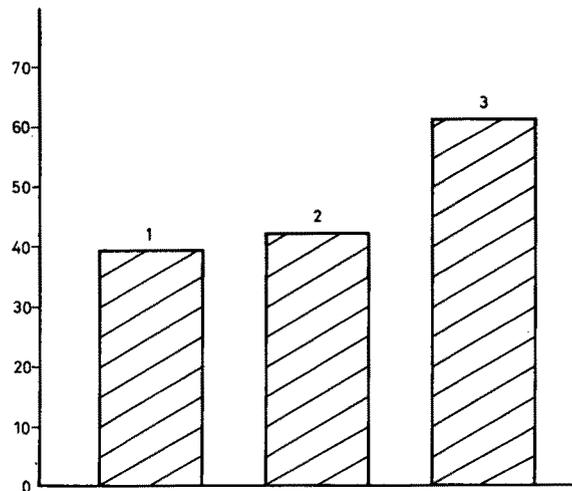


Abb. 3. Einfluß von Vitamin B<sub>12</sub> und IES auf *Dunaliella*. Zählung am 10. Tag  
1: Kontrolle, 2: 1 µg B<sub>12</sub>/l, 3: 1 µg IES/l

medium als günstigsten Wert 0,1—0,01 µg/l an. Kettenlänge und Zellzahl dieser Diatomee werden vergrößert. JI-FANG & YING-FANG (1959) erhielten bei *Dunaliella salina* kein positives Ergebnis bei Zusatz von IES. Ihre Resultate sind jedoch nicht statistisch gesichert.

### 323 Einfluß von Gibberellinsäure

Die Gibberellinsäure A<sub>3</sub> (Merck) wurde, ausgehend von den Erfahrungen bei höheren Pflanzen, zunächst in geringeren Konzentrationen verwendet (100 bis 500 µg/l). Es zeigte sich, daß größere Mengen nicht nur unschädlich, sondern sogar förderlich waren. Das Ergebnis von 3 quantitativen Gruppenversuchen (22 Einzelversuchen) ist folgendes:

Während der Wachstumsphase übt die Gibberellinsäure einen deutlich positiven Einfluß aus. Die Zelldichte wächst mit der Konzentration des Wachstoffs. Nach acht Tagen ist die Wachstumsphase abgeschlossen. Gleichzeitig holen die Kulturen mit geringerer Gibberellinsäuremenge und die Kontrollversuche auf. Am 11. Tag wird zum erstenmal die bisher streng gibberellinmengenbedingte Reihenfolge durchbrochen und von nun an ist kein Gibberellineinfluß mehr zu erkennen (Abb. 4). Die Unterschiede in der Zellkonzentration am 7. Tag sind — mit Ausnahme des Wertes für 100 µg/l — gesichert (Tab. 3).

Deutlich wird vor allem, daß die Algen wesentlich höhere Gaben an Gibberellinsäure vertragen und fordern als phanerogame Kulturpflanzen. Die bisher als am empfindlichsten bekannte Testpflanze ist eine japanische Trichterwinde (*Pharbitis nil*), die bereits auf Mengen von 0,0005 µg Gibberellinsäure reagiert (KNAPP 1962 a, 1962 b). PROVASOLI (1958) gibt *Ulva* 0,1—1 mg/l.

Die Konzentration erreicht für *Dunaliella* optimale Werte bei 4 mg/l (Abb. 5, Tab. 4). Zu abweichenden Ergebnissen kamen JI-FANG & YING-FANG (1959) bei *Dunaliella salina*. In ihrer, leider nur chinesisch abgefaßten, Veröffentlichung geben sie Werte von ca. 0,6 mg/l als besonders günstig an. Die

Tabelle 3

Einfluß verschiedener Mengen Gibberellinsäure auf die Kultur von *Dunaliella*

3 a

	Gruppen				$\bar{x}_M$
	1 K	2 0,1 mg	3 0,5 mg	4 1 mg	
$\bar{x}$	15,60	18,45	24,96	35,42	23,61
m	25	25	25	25	
N	4	4	4	4	
m · N	100	100	100	100	

3 b

Streuung	n	SQ	DQ
zwischen den Gruppen	3	928,36	309,45
innerhalb der Gruppen	12	78,57	6,55
insgesamt	15	1006,93	67,12
	$\chi^2 = 2,87$	F = 47,24	
	n = 3	n <sub>1</sub> = 3	
	$\chi^2_{0,05} = 7,82$	n <sub>2</sub> = 12	
		F <sub>0,05</sub> = 3,49	

3 c

Gruppen	s <sup>2</sup>	s	t	
1 und 2	3,918	1,980	2,036	—
1 und 3	4,943	2,223	5,952	+
1 und 4	5,517	2,349	11,933	+
2 und 3	7,578	2,753	3,343	+
2 und 4	8,152	2,855	8,405	+
3 und 4	9,177	3,029	4,883	+

$$n = 15$$

$$t_{0,05} = 2,131$$

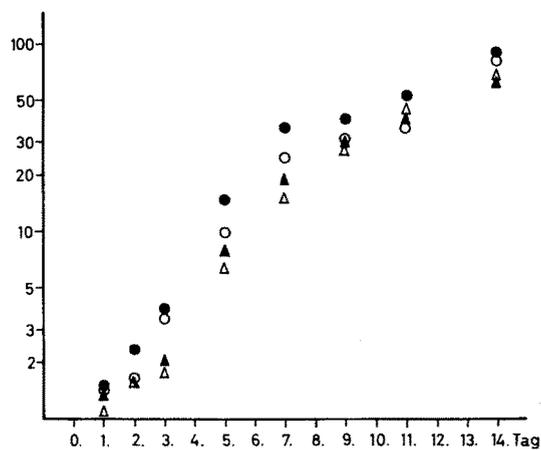


Abb. 4. Einfluß von Gibberellinsäure auf die Entwicklung der Kulturen. Weißes Dreieck: Kontrolle, schwarzes Dreieck: 100 µg/l, weißer Kreis: 500 µg/l, schwarzer Kreis: 1 mg/l

abgebildeten Kurven der Konzentrationen liegen unregelmäßig und lassen keinen eindeutigen Schluß zu.

Worauf beruht die Wirkung der Gibberellinsäure? Ist die Substanz nach acht Tagen verbraucht oder beschränkt sich ihre Einwirkungsmöglichkeit auf die Wachstumsphase? Zur Klärung dieser Frage diente folgender Versuch: vier Kulturkolben mit Nährlösung und 2 mg/l Gibberellinsäure wurden beimpft. Nach 8 Tagen erhielten zwei der Kulturen eine weitere Gabe von 2 mg/l Gibberellinsäure. Nach weiteren 5 Tagen wurde die Zelldichte wiederum bestimmt. Die zweite Gibberellingabe ist ohne förderlichen Einfluß. Daraus ist zu schließen, daß sich die Wirkung auf die Zeit der Wachstumsphase beschränkt.

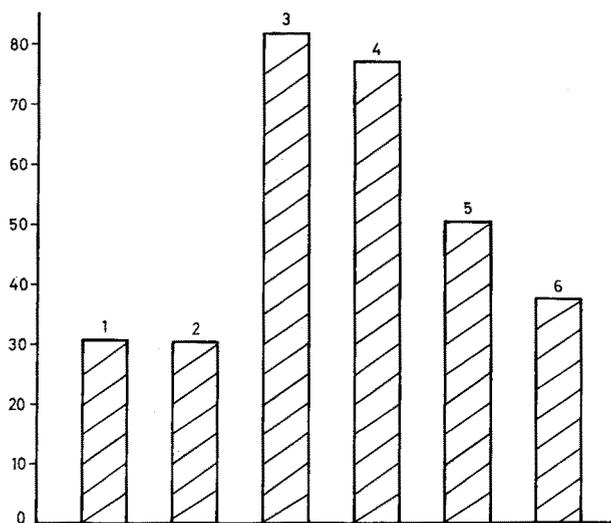


Abb. 5. Wirkung verschiedener Gibberellinsäurekonzentrationen auf die *Dunaliella*-Kulturen. Zählung am 8. Tag. 1: Kontrolle, 2: 1 mg/l, 3: 2 mg/l, 4: 3 mg/l, 5: 4 mg/l, 6: 5 mg/l

Tabelle 4

Einfluß höherer Gibberellinsäuremengen auf die Kultur von *Dunaliella*

4 a

	Gruppen						$\bar{x}_M$
	1 K	2 2 mg	3 4 mg	4 6 mg	5 8 mg	6 10 mg	
$\bar{x}$	30,78	30,55	81,27	77,04	51,33	37,67	51,44
m	25	25	25	25	25	25	
N	4	4	4	4	4	4	
m · N	100	100	100	100	100	100	

4 b

Streuung	n	SQ	DQ
zwischen den Gruppen	5	10392,16	2078,43
innerhalb der Gruppen	18	567,42	31,52
insgesamt	23	10959,58	476,46

$\chi^2 = 12,95$	F = 65,94
n = 5	n <sub>1</sub> = 5
$\chi^2_{0,01} = 15,09$	n <sub>2</sub> = 18
	F <sub>0,05</sub> = 2,77

4 c

Gruppen	s <sup>2</sup>	s	t	
1 und 2	9,31	3,051	0,107	—
1 und 3	46,75	6,837	10,444	+
1 und 4	8,96	2,993	21,858	+
1 und 5	20,13	4,487	6,477	+
1 und 6	40,76	6,384	1,526	—
2 und 3	40,39	6,355	11,287	+
3 und 4	40,04	6,328	0,944	—
4 und 5	13,42	3,663	9,926	+
5 und 6	45,22	6,725	2,873	+

n = 23  
t<sub>0,05</sub> = 2,069

## 324 Einfluß von Maleinhydrazid

Als letzter Wuchsstoff wurde den Kulturen Maleinhydrazid zugesetzt. Die Deutung der Ergebnisse erwies sich als schwieriger als vorauszusehen war. Es ergab sich in keinem Fall für einen der Konzentrationswerte eine statistische Sicherung gegenüber der Kontrolle. Auffallend war jedoch, daß die Zugabe von 50  $\gamma/l$  eine Steigerung der Zellzahl des öfteren vermuten ließ. Aus diesem

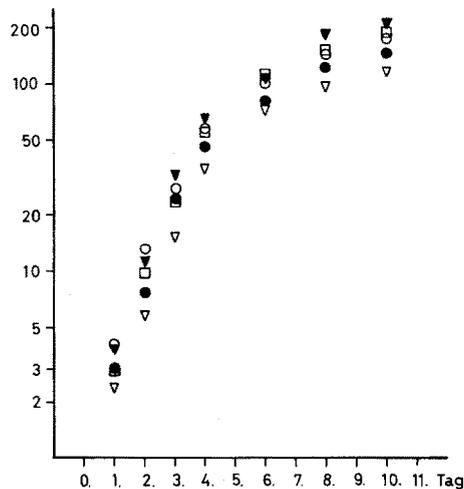


Abb. 6. Einfluß von Maleinhydrazid auf die Kulturen. Weißes Dreieck: Kontrolle, weißes Rechteck: 5  $\gamma/l$ , schwarzes Dreieck: 25  $\gamma/l$ , schwarzer Kreis: 50  $\gamma/l$ , weißer Kreis: 100  $\gamma/l$

Grunde wurde die angegebene Menge bei der Zusammenstellung der endgültigen Nährlösung zugesetzt. Auf alle Fälle ist der Schluß zu ziehen, daß das Maleinhydrazid, wenn überhaupt, so doch nur einen äußerst geringen Einfluß ausübt.

Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, daß stets nur die Zellzahl ermittelt wurde, nicht aber die Biomasse. Eine Erhöhung der Zellzahl muß nicht unbedingt auch eine Erhöhung der Masse bedeuten. Die Untersuchung des Massenzuwachses muß weiteren Versuchsreihen vorbehalten bleiben.

## 325 Vitaminkombination und praecipitatzfreie Nährlösung

Nach dem negativen Ergebnis der Versuche mit Vitamin B<sub>12</sub> wurde die Einwirkung mehrerer Vitamine gleichzeitig untersucht. In Frage kamen die wasserlöslichen Vitamine, denn nur sie können im Buchenerdextrakt enthalten sein. Verschiedene Kombinationen wurden zusammengestellt und den Kulturen zugesetzt. Das zunächst rein qualitative Ergebnis war, daß folgende Vitamine die Entwicklung der Algen positiv beeinflussen:

Thiamin  
Nicotinsäureamid  
Ca-D-pantothenat  
Riboflavin  
Folsäure  
Ascorbinsäure

Insbesondere scheint das Riboflavin wichtig zu sein.

Schon eingangs wurde erwähnt, daß das verwendete Kulturmedium wie fast alle in der Literatur aufgeführten Nährlösungen Praecipitate bildet, die aus mehreren Gründen unerwünscht sind. Einmal ist nicht kontrollierbar, welche Substanzmengen in der Lösung verbleiben, zum anderen muß noch einmal filtriert werden, da sich *Dunaliella* gern an flockigen Niederschlägen festsetzt. Dadurch entstehen Verklumpungen, die eine quantitative Auswertung sehr erschweren oder gar unmöglich machen. Die Niederschläge enthalten Eisen und Phosphat. Mit Hilfe von Chelatbildnern wurde versucht, einen stabilen Eisenkomplex herzustellen. Die Äthylendiamintetraessigsäure hat sich für diesen Zweck nicht bewährt. Ein besseres Ergebnis lieferte Natriumcitrat in Verbindung mit einer geringeren Menge Eisensulfat. Das Eisensulfat hat gegenüber dem Eisenchlorid den Vorteil, daß es leichter abzuwiegen ist. Die beste Lösung ist aber die Verwendung von Na-β-glyzerophosphat als Phosphorquelle.

Um rationell arbeiten zu können, werden die Nährsalze (außer Eisensulfat) in konzentrierten Lösungen vorrätig gehalten.

## Nährlösung G 2

Seewasser	1	1		
NaNO <sub>3</sub>	0,25 ml	32	%ige Lösung (△ 80	mg)
Na-β-glyzerophosphat	0,25 ml	22	%ige Lösung (△ 55	mg)
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,25 ml	1,5	%ige Lösung (△ 3,8	mg)
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,25 ml	1	%ige Lösung (△ 2,5	mg)
Thiaminiumdichlorid	2	ml	0,025%ige Lösung (△ 0,5	mg)
Nicotinsäureamid	2	ml	0,4 %ige Lösung (△ 8	mg)
Ca-D-pantothenat	2	ml	0,125%ige Lösung (△ 2,5	mg)
Riboflavin	2	ml	0,04 %ige Lösung (△ 0,8	mg)
Folsäure	2	ml	0,006%ige Lösung (△ 0,12	mg)
Ascorbinsäure	2	ml	1,25 %ige Lösung (△ 25	mg)
β-Indolylessigsäure	0,05 ml		0,004%ige Lösung (△ 2	γ)
Gibberellinsäure (A <sub>3</sub> )	10	ml	0,04 %ige Lösung (△ 4	mg)
Maleinhydrazid	0,15 ml		0,033%ige Lösung (△ 50	γ)

## 326 Vitaminkombination und Spurenelemente

Mit der Nährlösung G 2 durchgeführte Versuche zeigen, daß zwar die Ergebnisse besser waren als bei Verwendung von G 1, aber doch bei weitem nicht die mittels Zusatz von Buchenerdextrakt erzielten Zelldichten erreichten.

Die Vermutung lag nahe, daß der Mangel an Spurenelementen der Grund für diesen Unterschied ist. Es wurde eine Lösung angesetzt, die in 1 ml folgende Salze enthält:

3	mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,3	mg	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
0,2	mg	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O
0,4	mg	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O
0,2	mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
0,05	mg	NaF
0,005	mg	NaJO <sub>3</sub>

1 ml wird zu 1 Liter Kulturflüssigkeit zugesetzt.

Tabelle 5

Vergleich der Wirkung von Erdextrakt und Vitamin-Spurenelemente-Kombination

- Gruppen: 1: Kontrolle  
 2: Kontrolle, Zusatz von Spurenelementen am 5. Versuchstag  
 3: Buchenerdextrakt (10 ml/l Kultur)  
 4: vitaminhaltige Nährlösung  
 5: vitaminhaltige Nährlösung, Zusatz von Spurenelementen am 5. Versuchstag

5 a

	Gruppen					$\bar{x}_M$
	1	2	3	4	5	
$\bar{x}$	5,82	16,55	95,57	7,16	26,50	30,32
m	25	25	25	25	25	
N	4	4	8	2	4	
m · N	100	100	200	50	100	

5 b

Streuung	n	SQ	DQ
zwischen den Gruppen	4	38 351,06	9 587,77
innerhalb der Gruppen	17	1 207,38	71,02
insgesamt	21	39 558,44	1 883,91
$\chi^2 = 53,24$		F = 135,00	
n = 4		n <sub>1</sub> = 4	
$\chi^2_{0,05} = 9,45!$		n <sub>2</sub> = 17	
		F <sub>0,05} = 2,97</sub>	

5 c

Gruppen	s <sup>2</sup>	s	t	
1 und 2	0,488	0,699	21,71	+
1 und 4	0,315	0,561	2,76	+
2 und 4	0,483	0,695	15,60	+
2 und 5	5,327	2,308	6,09	+
3 und 5	120,432	10,974	10,28	+
		n = 21		
		t <sub>0,05} = 2,08</sub>		

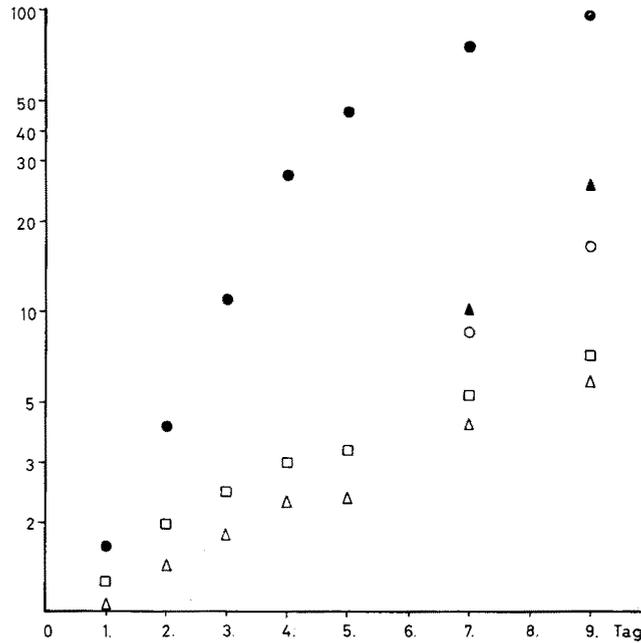


Abb. 7. Vergleich der Wirkung von Buchenerdextrakt, Vitaminen und Spurenelementen auf die Kulturen. Zusatz der Spurenelemente nach dem 5. Tag. Weißes Dreieck: Kontrolle, weißes Rechteck: Vitamin-Kombination, schwarzer Kreis: Erdextrakt, weißer Kreis: Kontrolle mit Zusatz von Spurenelementen, schwarzes Dreieck: Vitamin-Kombination mit Zusatz von Spurenelementen

Aus Abb. 7 sind die Ergebnisse des Versuches zu erkennen: von den drei Gruppen Kontrolle-Vitaminzusatz-Buchenerdextrakt hat der Erdextrakt die anderen weit überflügelt. Nach dem 5. Versuchstag wird einem Teil der Kontroll- und der Vitaminversuche die Spurenelemente-Lösung zugesetzt. Sofort erhöht sich in diesen Kulturen die Zellzahl beträchtlich. Selbst die Kontrolle mit Spurenelementen überholt die nur vitaminhaltige Nährlösung. Das bedeutet, daß die Spurenelemente für *Dunaliella* förderlicher sind als die Vitamine. Der Buchenerde am nächsten kommt in der Wirkung die Kombination von Vitaminen und Spurenelementen.

Tabelle 6

Vergleich der Wirkung von Erdextrakt und Vitamin-Spurenelemente-Kombination bei gleichzeitigem Start

- Gruppen: 1: Extrakt von Buchenerde, 10 ml/l
- 2: Vitamin-Spurenelemente-Kombination
- 3: Vitamin-Spurenelemente-Kombination, am 7. Tag nochmaliger Zusatz von Spurenelementen

6 a

	1	Gruppen 2	3	$\bar{x}_M$
$\bar{x}$	48,40	40,96	39,24	42,87
m	25	25	25	
N	8	4	4	
m · N	200	100	100	

6 b

Streuung	n	SQ	DQ
zwischen den Gruppen	2	311,96	155,98
innerhalb der Gruppen	13	214,68	16,51
insgesamt	15	526,64	35,09
$\chi^2 = 3,51$		F = 9,45	
n = 13		n <sub>1</sub> = 2	
$\chi^2_{0,05} = 5,99$		n <sub>2</sub> = 13	
		F <sub>0,05</sub> = 3,81	

6 c

Gruppen	s <sup>2</sup>	s	t	
1 und 2	20,49	4,53	2,68	+
1 und 3	18,54	4,31	3,48	+
2 und 3	6,51	2,55	0,95	—

$$n = 15$$

$$t_{0,05} = 2,13$$

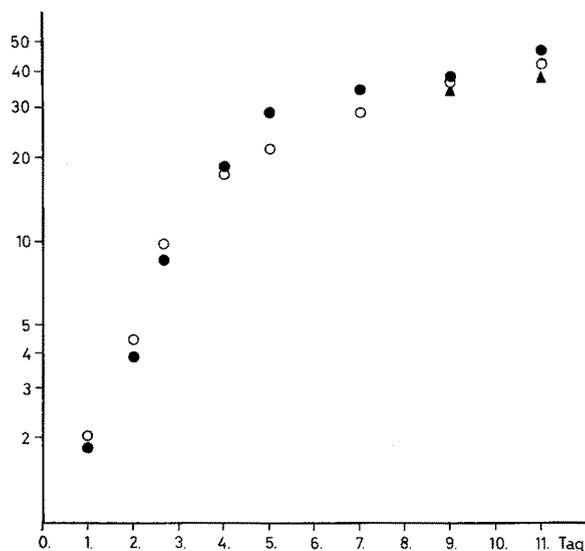


Abb. 8. Vergleich der Wirkung von Erdextrakt, Vitaminen und Spurenelementen bei gleichzeitigem Start. Schwarzer Kreis: Erdextrakt, weißer Kreis: Vitamine und Spurenelemente, schwarzes Dreieck: nochmaliger Zusatz von Spurenelementen zur Vitamin-Spurenelemente-Kombination nach dem 7. Tag

Ein nächster Versuch sollte klären, ob die Vitamin-Spurenelemente-Kombination mit dem Erdextrakt bei gleichzeitigem Start konkurrieren kann (Abb. 8). Während der ersten drei Tage geht die Vermehrung in der synthetischen Lösung etwas schneller vor sich als in dem erdextrakthaltigen Medium. Vom 4. Tag an kehren sich die Verhältnisse um. Erneuter Zusatz von Spurenelementen bewirkt keine Verschiebung zugunsten des künstlichen Mediums, ein Zeichen dafür, daß die Spurenelemente noch in ausreichender Menge vorhanden sind. Am 11. Tag ist die Differenz zwischen den Nährlösungen gering, der Unterschied ist aber signifikant (Tab. 6). Das synthetische Medium läßt sich durch Veränderungen in der Konzentration einzelner Bestandteile in seiner

Tabelle 7

Vergleich verschiedener Vitamin-Spurenelemente-Kombinationen

- Gruppen: 1: Vitamine und Spurenelemente  
 2: Vitamine und halbe Menge Spurenelemente  
 3: Vitamine und halbe Menge Spurenelemente und 2  $\gamma$ /l B<sub>12</sub>  
 4: Vitamine und Spurenelemente, jedoch nur die halbe Menge B, Cu und F

7 a

	Gruppen				$\bar{x}_M$
	1	2	3	4	
$\bar{x}$	115,32	111,44	121,82	114,77	115,84
m	25	25	25	25	
N	4	4	4	4	
m · N	100	100	100	100	

7 b

Streuung	n	SQ	DQ
zwischen den Gruppen	3	226,12	75,37
innerhalb der Gruppen	12	416,55	34,71
insgesamt	15	642,67	42,64

$\chi^2 = 9,94$       F = 2,17  
 $n = 12$        $n_1 = 3$   
 $\chi^2_{0.01} = 11,35$        $n_2 = 12$   
                                   $F_{0.05} = 3,49$

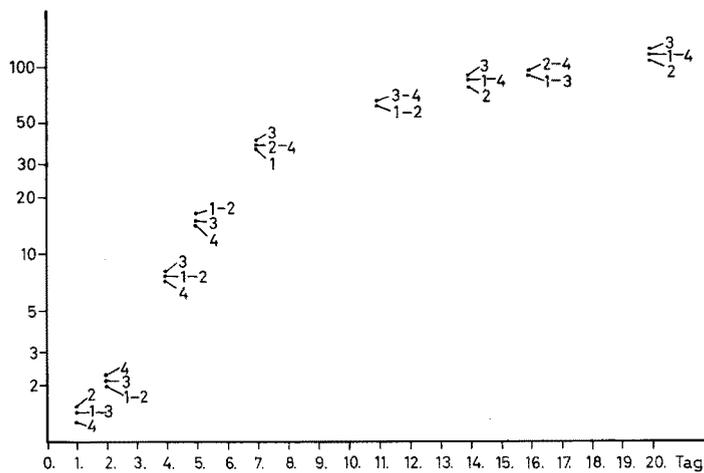


Abb. 9. Wirkung von Vitamin-Spurenelemente-Kombinationen in verschiedenen Konzentrationen. 1: Vitamine und Spurenelemente, 2: Vitamine und halbe Menge Spurenelemente, 3: Vitamine und halbe Menge Spurenelemente und 2  $\gamma$ /l B<sub>12</sub>, 4: Vitamine und Spurenelemente, jedoch nur die halbe Menge an B, Cu und F

Wirksamkeit nicht verbessern (Abb. 9, Tab. 7). Die Menge der Spurenelemente insgesamt oder nur die Zugabe von Bor, Kupfer und Fluor wurde auf die Hälfte herabgesetzt. Auch ein Zusatz von Vitamin B<sub>12</sub> vermochte keinen besseren Effekt zu erzielen. Immerhin lassen sich Zelldichten erreichen, die denen von erdextrakthaltiger Nährlösung entsprechen. Nach 20 Tagen sind es

z. B. beim letzten Versuch (Abb. 9) etwa  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Zwar steigt die Zellzahl noch weiter an, aber so langsam, daß der Zuwachs in keinem Verhältnis zum Zeit- und Energieaufwand steht. Kulturen, die speziell für die rationelle Gewinnung von Algensubstanz betrieben werden, sollten also unter den angegebenen Bedingungen nicht älter als 14—20 Tage werden.

### Zusammenfassung

Nach einer Darstellung der bisherigen Ergebnisse bei der Kultur einzelliger mariner Grünalgen wird der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Produktionsleistung von *Dunaliella* untersucht.  $\beta$ -Indolyllessigsäure und Gibberellinsäure in optimalen Konzentrationen steigern den Ertrag, Vitamin B<sub>12</sub> und Maleinhydrazid haben keinen nachweisbaren Effekt. Für das Gedeihen der Kulturen ist in erster Linie das Vorhandensein von Spurenelementen wichtig. Das vorgeschlagene Rezept für eine praezipitatfreie Nährlösung enthält außer den üblichen Nährsalzen 6 Vitamine, 3 Wuchsstoffe und 7 Spurenelemente. Damit lassen sich Zelldichten erreichen, die den unter Verwendung von Erdextrakt erzielten entsprechen.

### Summary

The influence of various substances on the productive capacity of *Dunaliella* is examined following a description of results obtained so far in culturing unicellular marine green algae. Optimum concentrations of indol-3-acetic acid and gibberellic acid increase the yield, vitamin B<sub>12</sub> and maleic acid hydrazide failed to give evidence of any effect. If cultures are to grow well, it is, above all, important, that trace elements be present. The prescription proposed for a culture medium free from precipitation comprises, apart from the usual nutritive salts, 6 vitamins, 3 growth substances and 7 trace elements. The cellular growth dimensions thus obtained correspond to those resulting from employment of soil extract.

### Angeführte Schriften

- Allen, E. J., & Nelson, E. W., 1907: On the artificial culture of marine plankton organisms. — J. mar. biol. Ass. U. K., N. S. **8**, 1, 421—474.
- Baghdiantz, A., 1952: L'évolution du pH de divers milieux de cultures liquides, inoculés par *Pseudomonas fluorescens* (Flügge-Migula). — Archives de Sciences **5**, 1.
- Bentley, J. A., 1959: Plant hormones in marine phytoplankton, zooplankton and sea water. — Int. Oceanographic Congress, Preprints, 910—911.
- Burdett, R. M., & Turnbull, L. P., 1960: The effect of gibberellic acid on the growth of *Chlamydomonas moewusii* Gerl. — Brit. Phycol. Bull. **2**, 1, 13. Carnegie Institution of Washington Publication 600 (1953).
- Davis, H. G., & Guillard, R. R., 1958: Relative value of ten genera of microorganisms as food for oyster and clam larvae. — Fish. Bull. Fish Wildlife Serv. **58**, 293—304.
- Denffer, D. v., 1950: Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. — Arch. Mikrobiol. **14**, 159—202.
- Dietrich, G., & Kalle, K., 1957: Allgemeine Meereskunde. — Borntraeger, Berlin.
- Droop, M. R., 1955: A pelagic marine diatom requiring cobalamin. — J. mar. biol. Ass. U. K. **34**, 229—231.

- Droop, M. R., 1959: Chemical and ecological considerations in the design of synthetic culture media for marine algae (Abstract). — Proc. IX. Int. Bot. Congr. **2**, 96—97.
- Enebo, L., & Johnsson, E., 1956: Outdoor cultivation of *Chlorella* during the summer 1954. — *Iva* **27**, 4, 165—172.
- Felföldy, L. J. M., & Kalkó, Z. F., 1959: Some methodical observations on the use of antibiotics for preparing bacteria-free algal cultures. — *Acta Biol. Acad. Sc. Hung.* **10**, 1, 95—99.
- Fogg, G. E., Smith, W. E. E., & Miller, J. D. A., 1959: An apparatus for the culture of algae under controlled conditions. — *J. Biochem. Microbiol. Techn. Eng.* **1**, 59—76.
- Føyn, B., 1934: Lebenszyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophyceae *Cladophora Suhriana* Kützing. — *Arch. Protistenkunde* **83**, 1, 6.
- Hamilton, L. D., Hutner, S. H., & Provasoli, L., 1952: The use of protozoa in analysis. — *The Analyst* **77**, 920, 618—628.
- Harvey, H. W., 1950: On the production of living matter in the sea off Plymouth. — *J. mar. biol. Ass. U. K.* **29**, 97—137.
- Heurck, H. van, 1893/96: Notice biographique sur C. Houghton Gill. — *Le Diatomiste* **11**, 125.
- Heurck, H. van, 1897: Culture des Diatomées. *Z. angew. Mikrosk.* **3**.
- Ji-fang, G., & Ying-fang, Zh., 1959: (Effects of gibberellic acid and indole-3-acetic acid on marine unicellular alga, *Dunaliella salina*) (chines.). — *Kexue Tongbao* **6**, 201 bis 202.
- Ketchum, B. H., Lillick, L., & Redfield, A. C., 1949: The growth and optimum yields of unicellular algae in mass culture. — *J. Cell. Comp. Physiol.* **33**, 267.
- Knapp, R., 1962a: Neue Ergebnisse von Untersuchungen über Gibberelline. — *Umschau* **62**, 17, 538—541.
- Knapp, R., 1962b: Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline. — Springer.
- Lerche, W., 1937: Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. — *Arch. Protistenk.* **88**, 236—268.
- Linder, A., 1953: Planen und Auswerten von Versuchen. — Birkhäuser, Basel.
- Lundin, H., & Ericson, L.-E., 1955: On the occurrence of vitamins in marine algae. — Second Int. Seaweed Symposium, Trondheim.
- Maloney, T. E., Donovan jr., E. J., & Robinson, E. L., 1962: Determination of numbers and sizes of algal cells with an electronic particle counter. — *Phycologia* **2**, 1.
- Mangeret, P., & Chabert, G., 1953: Cultures de diatomées. — *Archives de Sciences* **5**, 4.
- Marré, E., Servettaz, O., & Albergoni, F., 1958: Sul meccanismo di adattamento a condizioni osmotiche estreme in *Dunaliella salina*. I. Reazioni fisiologiche a variazioni dell'ambiente osmotico. — *Rendiconti dell'Accad. Nazionale dei Lincei, Cl. Scienze fisiche, mat. e naturali, ser. VIII*, **25**, 6.
- Meffert, M. E., & Stratmann, H., 1951: Algen-Großkulturen im Sommer 1951. — *Forschungsber. Wirtschafts- und Verkehrsministerium Nordrhein-Westfalen* **8**.
- Miquel, P., 1890/93: De la culture artificielle des diatomées. — *Le Diatomiste* **1**.
- Myers, J., Phillips, J. N., & Graham, J. R., 1951: On the mass culture of algae. — *Plant Physiol.* **26**, 539.
- Pinevich, V. V., & Verzilin, N. N., 1961: (The effect of maleic acid hydrazide on certain protococcal algae) (russ.). — *Doklad. Akad. Nauk SSSR* **137**, 1230—1232.
- Pringsheim, E. G., 1954: Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung. — VEB Fischer, Jena.
- Provasoli, L., 1956: Alcune considerazioni sui caratteri morfologici e fisiologici delle Alge. — *Boll. Zool. Agraria Bachicoltura* **22**.
- Provasoli, L., 1958: Effect of plant hormones on *Ulva*. — *Biol. Bull.* **114**, 3, 375—384.
- Provasoli, L., 1960: Micronutrients and heterotrophy as possible factors in bloom production in natural waters. — *Transact. Seminar on Algae and Metropolitan Wastes. U. S. Public Health Serv., R. A. Taft Engineering Center.*
- Provasoli, L., Hutner, S. H., & Pintner, I. J., 1951: Destruction of chloroplasts by streptomycin. — *Cold Spring Harbor Symp. on quantitative Biol.*, **16**.
- Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A., & Droop, M. R., 1957: The development of artificial media for marine algae. — *Arch. Mikrobiol.* **25**, 392—428.
- Provasoli, L., & Pintner, I. J., 1953: Ecological implications of in vitro nutritional requirements of algal flagellates. — *Ann. New York Acad. Sc.* **56**, 5, 839—851.

- Provasoli, L., Shiraishi, K., & Lance, J. R., 1959: Nutritional idiosyncrasies of *Artemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture. — *Ann. New York Acad. Sc.* **77**, 2, 250—261.
- Richter, O., 1903: Reinkulturen von Diatomeen. — *Ber. deutsch. bot. Ges.* **21**.
- Richter, O., 1904: Über Reinkulturen von Diatomeen und die Notwendigkeit der Kieselsäure für *Nitzschia palea* (Kütz.). — *Verh. Ges. deutsch. Naturf. Ärzte, Breslau*, **2**.
- Schreiber, E., 1927: Die Reinkultur von marinem Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers. — *Wiss. Meeresunters.*, N. F. **16**, 2.
- Stagno d'Alcontres, G., Lamonica, G., Polimeni Conti, M., & Lino, A., 1960: Cultura massiva di alghe. — *Atti Soc. Peloritana* **6**.
- Sweeney, B. M., 1954: *Gymnodinium splendens*, a marine dinoflagellate requiring B<sub>12</sub>. — *Amer. J. Bot.* **41**, 821—824.
- Thimann, K. V., & Beth, K., 1959: Action of auxins on *Acetabularia* and the effect of enucleation. — *Nature* **183**, 946—948.
- Vinogradov, A. P., 1953: The elementary chemical composition of marine organisms. — *Memoir Sears Foundation for marine Research* **2**.
- Walne, P. R., 1956: Experimental rearing of the larvae of *Ostrea edulis* L. in the laboratory. — *Fish. Invest. Ser. II*, **20**, 9, 1—23.
- Williams, L. G., 1960: Uptake of Cesium-137 by cells and detritus of *Euglena* and *Chlorella*. — *Limnol. Oceanogr.* **5**, 3, 301—311.
- Wisely, B., & Purday, C., 1961: An algal mass-culture unit for feeding marine invertebrate larvae. — *Div. Fish. Oceanogr., Techn. Paper 12, Commonwealth Sc. Industr. Research Org., Melbourne*.