Fachinformationsdienst Biodiversitätsforschung
UB Universitäts Bibliothek Frankfurt am Main
DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft

FID Biodiversitätsforschung

Bioindikatoren

Ergebnisse des Symposiums: Tiere als Indikatoren für Umweltbelastungen 8. bis 11. März 1981 in Köln

Prüfung der biologischen Schadwirkungen von Wasserinhaltsstoffen mit Hilfe von Protozoentests

Nusch, Ernst A.

1982

Digitalisiert durch die *Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg, Frankfurt am Main* im Rahmen des DFG-geförderten Projekts *FID Biodiversitätsforschung (BIOfid)*

Weitere Informationen
Nähere Informationen zu diesem Werk finden Sie im:
Suchportal der Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg, Frankfurt am Main.

Bitte benutzen Sie beim Zitieren des vorliegenden Digitalisats den folgenden persistenten Identifikator:

urn:nbn:de:hebis:30:4-172839

Visual Library

Decheniana – Beihefte (Bonn) 26, 87–98 (1982)

Prüfung der biologischen Schadwirkungen von Wasserinhaltsstoffen mit Hilfe von Protozoentests

Ernst A. Nusch

Abstract

Assessment of detrimental effects of substances in water by means of bioassays with protozoa.

Within the framework of bioassays using species representing important functions in aquatic ecosystems protozoa, especially the widely known slipper animalcule *Paramecium caudatum* EHRB. can be used as sensitive indicators for xenobiotic effects.

Methods for rearing and purification of test stock, planning and executing acute toxicity tests are described. Reproducibility of the results was improved using a well defined reconstituted dilution water. Results of tests with heavy metals, chelated copper and various inorganic and organic compounds are listed in terms of LC 0, LC 50 and LC 100 and shown graphically by means of concentration-effect plots. Finally some informations on practical experience (costs, man-hours) and future possibilities (integration in multispecies systems, automatization) are given.

1. Einführung

Zur Beurteilung der biologischen Schadwirkung von Chemikalien bzw. von potentiell toxischen Abwässern werden unter anderem auch Protozoen herangezogen. Aufgrund ihrer im Verhältnis zum Körpervolumen relativ großen Oberfläche und meist dünnen und ungeschützten Zellhaut sind Protozoen gegenüber Veränderungen des sie umgebenden Mediums besonders empfindlich und daher zur Anzeige akut toxischer Stoffe und schädlicher Verunreinigungen gut geeignet. Ein einzelner Test mit einem ausgewählten Testorganismus kann nicht alle möglichen Schadwirkungen im Ökosystem abdecken, da die Empfindlichkeit bzw. Resistenz der einzelnen Arten je nach Schadstoff sehr unterschiedlich sein kann. Daher mußte das Konzept des „most sensitive organism", der stellvertretend für die gesamte aquatische Lebewelt jede Schadwirkung anzeigen sollte, fallen gelassen werden. Da andererseits aber aus praktischen Gründen, d. h. wegen des nicht mehr zu vertretenden Aufwandes, nicht alle gefährdeten Organismenarten getestet werden können, beschränkt man sich darauf, lediglich einige wenige Species stellvertretend für einige typische Organismengruppen einer Gewässerbiozönose zu prüfen.

Als Repräsentanten wichtiger Funktionsträger in aquatischen Ökosystemen werden in der Regel Algen (meist Grünalgen) als Primärproduzenten, Protozoen und/oder niedere Metazoen (meist *Daphnia magna*) als Konsumenten, Bakterien (meist *Pseudomonas putida*) als Destruenten und Fische als Endglieder der aquatischen Nahrungskette im Biotest geprüft.

Dabei kann man in einigen Fällen bereits auf standardisierte Verfahren zurückgreifen (1–4). Dabei sollten auch die „Allgemeinen Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren" (5) beachtet werden. Welche, wieviele und wie komplexe ökotoxikologische Tests zur Beurteilung einer Substanz, die in die Umwelt gelangen kann, erforderlich sind, ergibt sich aus dem zu erwartenden Gefährdungsgrad.

Dieser ist abhängig vom Produktionsvolumen, der biol. Abbaubarkeit (oder physikochem. Eliminierbarkeit), der Akkumulationsneigung und der Toxizität. Chemikalienprüfprogramme der EG und OECD (6) und das Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Chemikaliengesetz) sehen daher einen Stufenplan entsprechend dem Gefährdungsgrad vor (7). In der Grundstufe sollen daher zunächst einmal die biologische Abbaubarkeit, der Oktanol: Wasser-Verteilungskoeffizient, der als physikochemischer Hinweis für die Akkumulationsneigung eines Stoffes gelten kann, die akute Toxizität gegenüber Fischen und Daphnien, die chronische Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Daphnien sowie die Hemmung der Zellvermehrung von Algen geprüft werden.

Ein Protozoentest ist erst bei weitergehenden ökotoxikologischen Untersuchungen vorgesehen. Der Paramecientest ist zusammen mit anderen Testverfahren in die Methodensammlung des OECD-Chemicals-Testing-Programm aufgenommen worden (8).

Da wir die meisten Erfahrungen mit den Paramecientests sammeln konnten, möchte ich zunächst diesen Test vorstellen, d. h. die Methode zur Isolierung, Kultur, Anreicherung und Reinigung der Testorganismen beschreiben und einige Ergebnisse, die wir mit Hilfe dieses Tests gewonnen haben, mitteilen. Darüber hinaus möchte ich noch kurz auf andere Protozoentests eingehen und eventuelle Vor- und Nachteile diskutieren.

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

2. Der Paramecientest

Wir verwenden einen 1974 aus einer Heuinfusion isolierten Stamm von *Paramecium caudatum* EHRB. 1838. Dieses allseits bekannte Pantoffeltierchen gehört zu den holotrich bewimperten Ciliaten und ist ubiquitär verbreitet in mäßig bis stark organisch verunreinigten Gewässern. Das Pantoffeltierchen lebt vagil im Mikrobenthos (Aufwuchs) an untergetauchten Oberflächen, kommt aber auch planktisch vor, sowohl im Süßwasser als auch im Brackwasser. Es ernährt sich hauptsächlich von Bakterien. Typische Massenentwicklungen findet man in Heuaufgüssen nach etwa 2–3 Wochen. Auch bei der technischen Abwasserreinigung in Tropfkörpern oder Schlammbelebungsanlagen tritt Paramecium auf. Zusammen mit anderen bakterienfressenden Protozoen sorgt es für die Entfernung suspendierter Bakterien und schlecht absetzbaren Bakterienflocken und trägt damit zur Verbesserung der Qualität des Ablaufs aus einer Kläranlage bei (9). *Paramecium* ist an ein relativ weites Spektrum der Salinität, Alkalität (pH-Wert) und Sauerstoffkonzentrationen angepaßt bzw. adaptierbar. Der rundum bewimperte Körper (ca. 180–300 μm Länge) hat eine längliche Mundgrube, 2 kontraktile Vakuolen mit radiären Zuleitungskanälen und die typisch verlängerte Caudalciliatur (den namensgebenden „Schwanz"). Das Tier reagiert auf räuberische Attacken oder plötzliche Änderungen des Mediums mit Herausschleudern der Trichocysten (Abwehrorganellen).

Paramecien lassen sich aus Heuaufgüssen isolieren, relativ leicht in Kultur halten und sind daher jederzeit in großen Mengen und in gleichbleibender, genetisch einheitlicher Qualität für Testzwecke verfügbar.

Als Kulturmedium hat sich ein Ansatz von getrockneten Kohlrabischnitzeln (ca. 0,25 g) in 500 ml dest. Wasser, das mit ca. 10000–50000 Individuen angeimpft wird, bewährt. Nach ca. einer Woche ist die Individuendichte auf etwa 2000–3000 Individuen/ml angewachsen, d. h. das Inokulum hat sich etwa verzehnfacht (Abb. 1).

Über mehrere Wochen (mindestens 20 Tage) verläuft dann das Populationswachstum stationär, d. h. Vermehrungs- und Absterberate halten sich etwa die Waage. Für den Test werden die Paramecien zu Beginn der stationären Phase geerntet. Aufgrund des langanhaltenden bakteriellen Abbaus der Schnitzel (= Depot an organischer Substanz) steht den Paramecien über Wochen hinweg ausreichend Nahrung zur Verfügung. Erst nach ca. 3–4 Wochen muß zur Weiterführung der Kultur in frisches Substrat überimpft werden.

Als Testmedium kommt das zwar optimal zusammengesetzte, aber undefinierbare Kulturmedium nicht in Frage, da organische Inhaltsstoffe, z. B. Komplexbildner aus dem Eiweißabbau, die z. B. die Toxizität von Schwermetallen maskieren, oder anorganische Stoffwechsel- oder Abbauprodukte, die z. B. sulfidische Niederschläge bilden, das Ergebnis der Tests unkontrolliert beeinflussen können.

Wir haben darum ein einfaches synthetisches Süßwasser entwickelt, das aus Calciumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumhydrogencarbonat und Kaliumchlorid mit deionisiertem Wasser hergestellt wird. Die Summe an Erdalkalien beträgt 1 mmol/l, das entspricht einer Härte von 5,6° dH, das Verhältnis von Ca:Mg-Ionen beträgt 4:1, das Verhältnis von Na:K 10:1, die

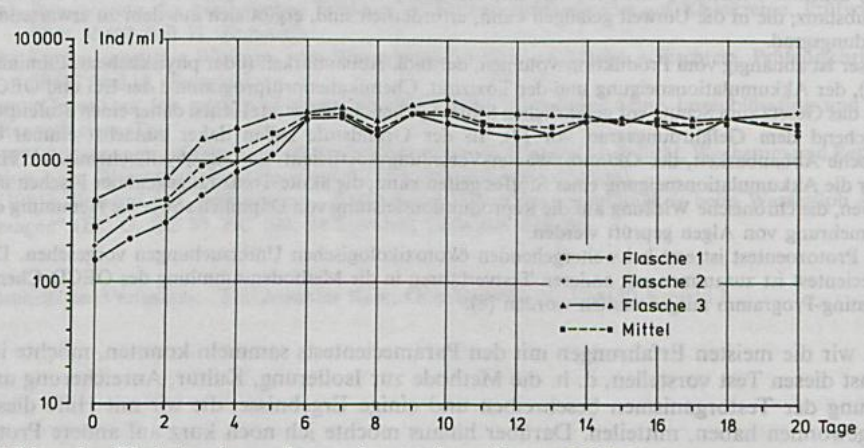

Abbildung 1. Wachstumskurve *Paramecium caudatum* Stamm RV/L 74 M (bei 20° C).

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

Säurekapazität $Ks_{4,3}$ (der frühere m-Wert als Maß für die Karbonathärte) beträgt 0,3 mmol/l. Dies entspricht in der Hauptionenbilanz etwa einem oligotrophen, weichen Talsperrenwasser. Es hat sich, leicht modifiziert (auf 15° dH eingestellt), auch für andere biol. Testverfahren, z. B. Daphnientest, Fischtest u. a. bewährt (1 und 4).

Die zu überwindende Schwierigkeit bestand darin, die Paramecien aus dem undefinierten Kulturmedium heraus und in das definierte Testmedium hineinzubekommen. Abfiltrieren oder Zentrifugieren und Waschen schädigt die Tiere unkontrolliert und kommt daher als Separierungs- und Reinigungsschritt nicht in Frage. Wir nutzten schließlich die aus Schulversuchen bekannten Taxien der Paramecien aus und ließen die Tiere aus einem umgekehrten Scheidetrichter über eine Schlauchverbindung in einen zweiten Scheidetrichter hinaufschwimmen. Sie lassen sich sogar durch einen Wattepfropf im Schlauch nicht daran hindern. Die ins Testmedium gelangende Menge an Kulturmedium ist vernachlässigbar gering.

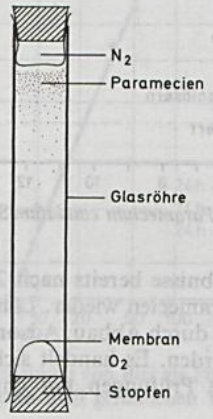

Abbildung 2. Nachweis der negativen Geotaxis von *Paramecium* bei sinkendem Sauerstoffgradienten.

Obwohl für den Test nicht von unmittelbarer Bedeutung, interessierte uns, ob es sich bei der Aufwärtsbewegung der Paramecien um eine negative Geotaxis oder eine positive Aerotaxis handelte. Beide Taxien sind normalerweise gleichgerichtet, was auch biologisch sinnvoll ist, da in der Regel an der Wasseroberfläche noch am ehesten ausreichende Sauerstoffkonzentrationen anzutreffen sind.

Zur Prüfung dieser Frage, ob Geotaxis oder Aerotaxis von größerer Bedeutung für die Paramecien sind, haben wir in einer wassergefüllten Glasröhre je eine Stickstoffblase und eine Sauerstoffblase durch eine gasdurchlässige, wasserdichte Membran eingeschlossen (Abb. 2). Zunächst haben wir die O_2-Blase am oberen Ende plaziert und erwartungsgemäß strebten alle Paramecien nach oben.

Dann haben wir die Röhre herumgedreht, so daß nun die Stickstoffblase ans obere Ende kam. Die Paramecien reagierten prompt und schwammen wieder nach oben und zwar entgegen dem Sauerstoffkonzentrationsgradienten. Demnach ist also die negative Geotaxis stärker wirksam als die positive Aerotaxis.

Die für den Test wichtige Frage war nun, ob und wie lange die Paramecien in unserem rein anorganischen Testmedium überleben. Bei zwei zeitlich getrennten Versuchen wurden die Paramecien in 500-ml-Flaschen und in 10-ml-Reagenzgläsern, wie wir sie im Test verwenden, ohne Fütterung etwa 3 Wochen im Testmedium belassen (Abb. 3). Es zeigte sich, daß die Paramecienkonzentration 3 Tage lang ungefähr gleich bleibt. Die Einzelergebnisse aus den Parallelproben werden zur Verdeutlichung der Streubreite in Abb. 3 getrennt dargestellt. Die nach dem 3. Tag deutlich abfallende Kurve zeigt, daß ungefähr die Hälfte der Paramecien bis zum 7. Tag abstirbt; der Wiederanstieg ist ein Zeichen dafür, daß die organische Substanz der Paramecienbiomasse offenbar wieder zu einer Bakterienentwicklung geführt hat, von der die Paramecien leben und sich zwischen dem 10. und 14. Tag wieder bis zur nahezu alten Populationsdichte vermehren können. Nach der 2. Woche geht es aber wieder bergab. Als Fazit aus diesem Überlebensversuch ohne Fütterung ergab sich, daß die maximale Testdauer nicht über 3 Tage hinaus ausgedehnt werden sollte. In der Folge haben wir in Anlehnung an die Testzeit im Fischtest 48 h oder, wie beim Daphnientest, 24 h als Testzeit gewählt.

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

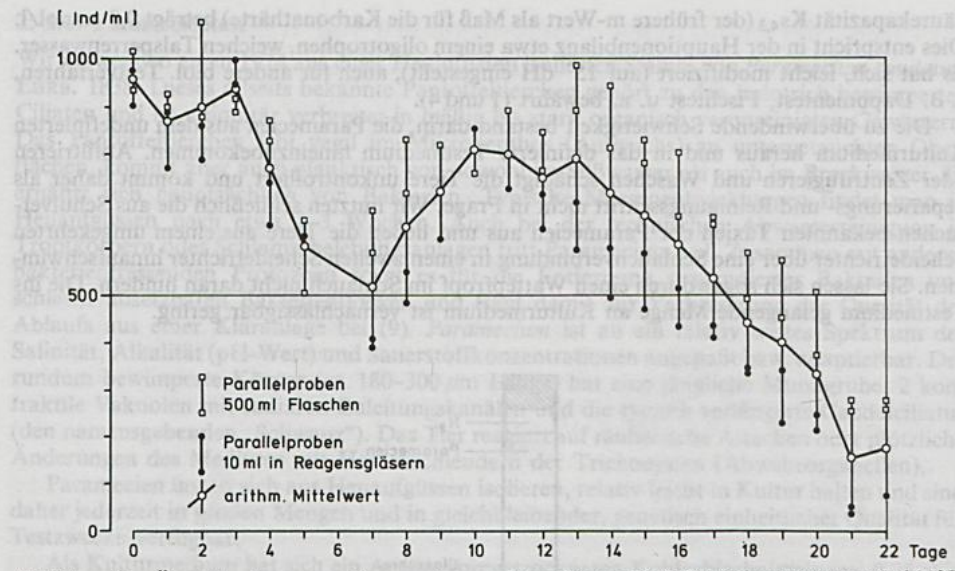

Abbildung 3. Überlebenskurve von *Paramecium caudatum* Stamm RV/L 74 M ohne Fütterung (bei 20°C).

Meist zeichnen sich die Ergebnisse bereits nach 24 Stunden ab, gelegentlich erholt sich nach 48 Stunden ein Teil der Paramecien wieder. Länger als 48 Stunden sollte jedoch wegen der Gefahr des Substanzverlustes durch Abbau, Adsorption oder Inkorporation des Testgutes die Testzeit nicht ausgedehnt werden. Es handelt sich ja in dieser Form um einen Test auf akute Toxizität, längerdauernde Prüfungen auf chronische Wirkungen müßten ohnehin anders konzipiert werden.

Durchführung des Tests

Aus dem Stamm-Ansatz der zu prüfenden Substanz und dem Verdünnungswasser (= Testwasser) werden die gewählten Konzentrationen hergestellt und mit den in 5 ml Testwasser suspendierten Paramecien in Kulturröhrchen (Reagenzgläser) mit einem Testvolumen von 10 ml, gefüllt. Pro Konzentrationsstufe werden mindestens 10000 Tiere eingesetzt. Zu jeder Testserie gehört ein Kontrollansatz ohne die zu testende Substanz. Kontroll- und Testansätze bleiben bei diffusem Tageslicht oder im Dunkeln bei 20 ± 2°C stehen.

Nach Ablauf von 24 Stunden (ggf. nach 48 Stunden) werden dann die einzelnen Testansätze in den Reagenzgläsern mit Lugolscher Lösung fixiert und nach der Utermöhl-Methodik im umgekehrten Mikroskop ausgezählt. Zum Zeitpunkt der Fixierung lebende Tiere können leicht im mikroskopischen Bild durch die scharf begrenzten Konturen und die ausgeschleuderten Trichocysten erkannt werden. Im Laufe des Tests abgestorbene Tiere zerfallen sehr rasch durch Autolyse und zeigen nicht den typischen Trichocystenkranz. Solche Zellreste werden bei der Auszählung und Auswertung nicht miterfaßt.

Auswertung

Als Bewertungsmaß für die toxische Wirkung der Testsubstanz auf *Paramecium caudatum* gelten die LC 0, das ist die höchste geprüfte Konzentration, bei der im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate auftritt, die LC 100, das ist die niedrigste geprüfte Konzentration, bei der alle Tiere nach Ablauf der Testzeit abgestorben sind, und die LC 50, das ist der statistisch ermittelte Konzentrationswert, bei dem gerade die Hälfte der Testorganismen überleben bzw. absterben würde. Zur graphischen Ermittlung des LC-50-Wertes werden in einem Wahrscheinlichkeitsnetz die Konzentrationen der untersuchten Substanz logarithmisch auf der Abzisse und die Prozentzahlen abgestorbener Paramecien im Vergleich zur Kontrolle auf der Ordinate eingetragen. Bei einer Normalverteilung der Empfindlichkeit innerhalb des eingesetzten Paramecienkollektivs liegen die Punkte zwischen

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

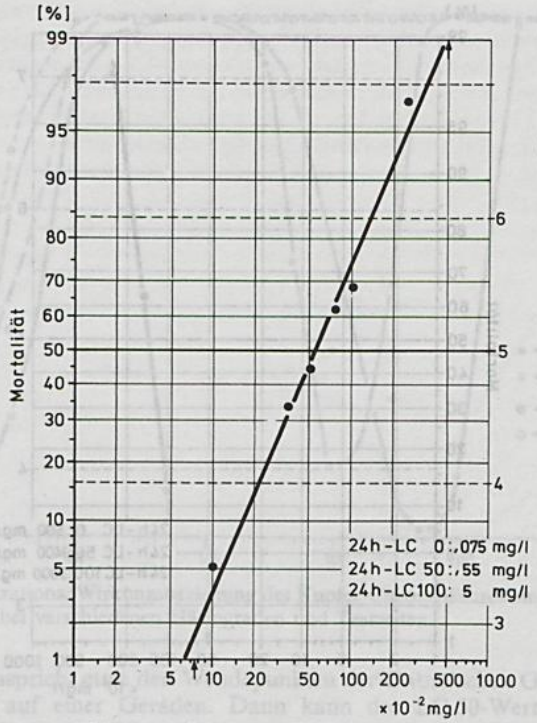

Abbildung 4. Konzentrations/Wirkungsbeziehung von Blei als $Pb(NO_3)_2$ im Paramecientest. Die Pfeile am Bildrand geben die experimentell gefundenen Werte für LC 0 und LC 100 an.

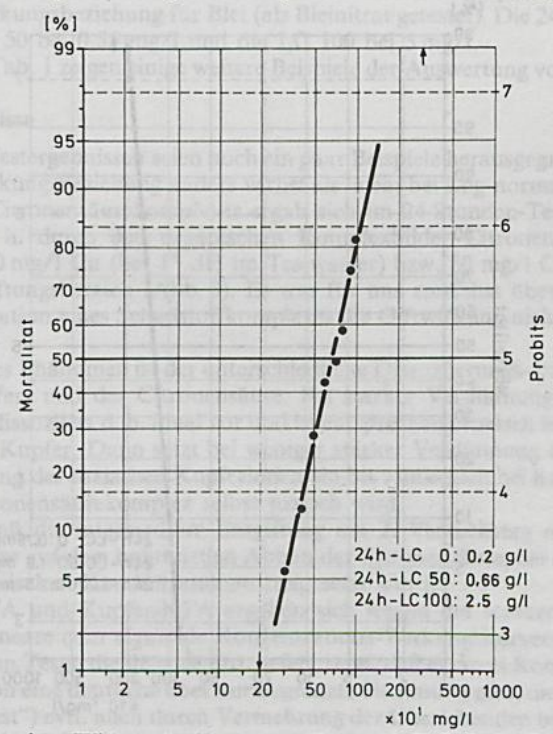

Abbildung 5. Konzentrations/Wirkungsbeziehung von Chrom als K_2CrO_4 im Paramecientest.

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

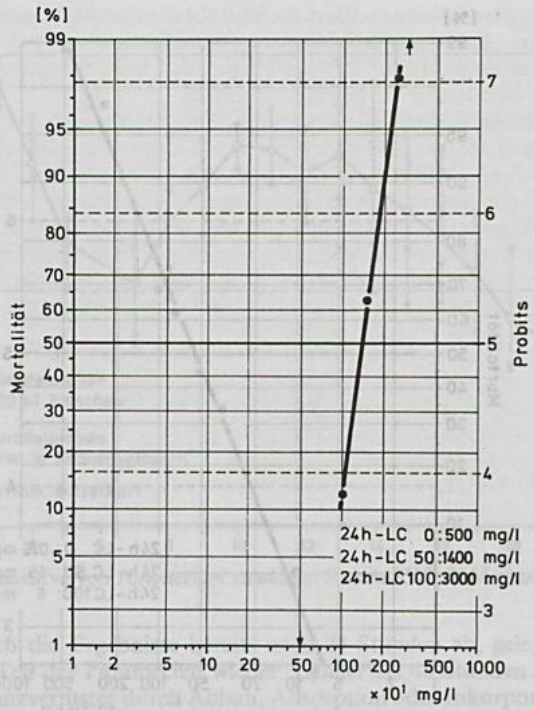

Abbildung 6. Konzentrations/Wirkungsbeziehung von Amylalkohol im Paramecientest.

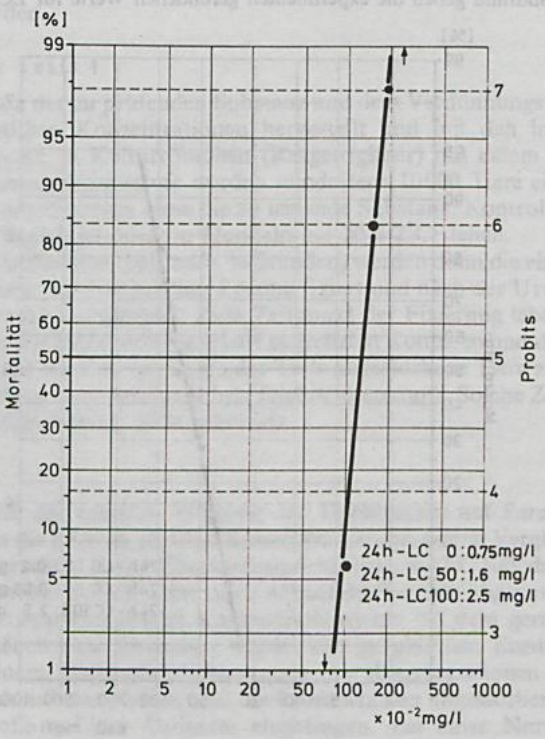

Abbildung 7. Konzentrations/Wirkungsbeziehung von Formaldehyd im Paramecientest.

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

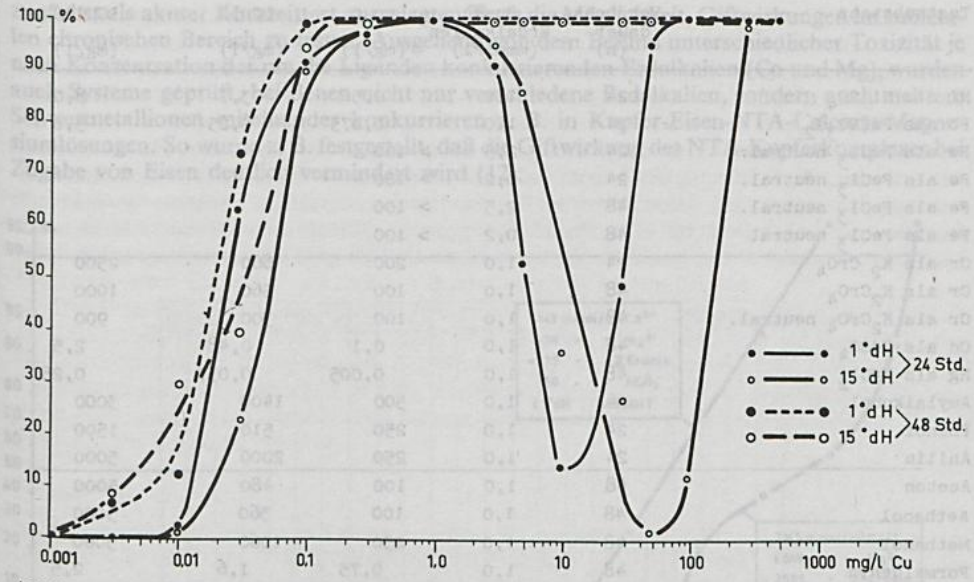

Abbildung 8. Konzentrations/Wirkungsbeziehung des Kupfer-Citronensäurekomplexes 1:4 im Paramecientest bei verschiedenen Härtegraden und Testzeiten.

16% und 84% (das enspricht etwa den Wendepunkten der GAUSS'schen Glockenkurve bzw. 2 Probits) annähernd auf einer Geraden. Dann kann der LC-50-Wert durch graphische Interpolation ermittelt werden (10 und 11).

Abb. 4 zeigt als Ergebnis des Paramecientests eine solche graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Blei (als Bleinitrat getestet). Die 24 Std.-LC 0 liegt bei 0,075 mg/l; die LC 50 bei 0,55 mg/l und die LC 100 bei 5 mg/l.

Abb. 5–7 sowie Tab. 1 zeigen einige weitere Beispiele der Auswertung von Paramecientests.

Spezielle Testergebnisse

Aus der Fülle von Testergebnissen seien noch ein paar Beispiele herausgegriffen, bei denen die Konzentrations-Wirkungsbeziehung anders verlief als linear bei Log-normal-Verteilung. Beim Test eines Kupfer-Citronensäurekomplexes ergab sich im 24-Stunden-Test eine biphasische Toxizitätskurve, d. h. durch den organischen Komplexbilder Citronensäure entstand im Bereich von etwa 10 mg/l Cu (bei 1° dH im Testwasser) bzw. 50 mg/l Cu (bei 15° dH) ein intermediärer Entgiftungsbereich (Abb. 8). Es war für uns zunächst überraschend, daß mit steigender Konzentration eines Schadstoffkomplexes die Giftwirkung nicht zunahm, sondern nachließ.

Ursache für dieses Phänomen ist der unterschiedliche Dissoziierungs- bzw. der Komplexierungsgrad des Kupfers und der Citronensäure. Bei starker Verdünnung liegt nämlich das Kupfer weitgehend dissoziiert d. h. ional vor und ist entsprechend toxisch im Bereich zwischen 0,001 und 0,1 mg/l Kupfer. Dann setzt bei weniger starker Verdünnung die Komplexierung und damit Maskierung der toxischen Kupferionen ein bis schließlich bei hohen Konzentrationen der Kupfer-Citronensäurekomplex selbst toxisch wird.

Die Tatsache, daß die intermediäre Entgiftung am 2. Versuchstag nicht mehr auftrat, beruht möglicherweise auf dem bakteriellen Abbau der Citronensäure, bei dem nicht-komplexiertes Kupfer in toxischen Konzentrationen freigesetzt wurde.

Bei Kupfer-EDTA und Kupfer-NTA ergaben sich wegen der starken Komplexierungskapazität einfache lineare oder sigmoide Konzentrations-Wirkungskurven (Abb. 9). Der sigmoide Verlauf bei den Tests, die über 48 Std. liefen, zeigt, daß es einen Konzentrationsbereich gibt, wo es zwar schon eine deutliche aber nur begrenzte Hemmung gibt, die durch Adaptation („survival of the fittest") evtl. auch durch Vermehrung der Überlebenden bis zu einer gewissen Schwellenkonzentration teilweise ausgeglichen wird. Hier bietet sich durch Modifikation des

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

Testsubstanz	Versuchs-dauer (h)	Summe Erdalkalien (mmol/l)	LC 0 (mg/l)	LC 50 (mg/l)	LC 100 (mg/l)
Ni als $NiSO_4$	24	1,0	0,5	3,7	8,0
Pb als $Pb(NO_3)_2$	24	1,0	0,075	0,25	5,0
Fe als $FeCl_3$ neutral.	24	2,5	> 100		
Fe als $FeCl_3$ neutral.	24	0,2	> 100		
Fe als $FeCl_3$ neutral.	48	2,5	> 100		
Fe als $FeCl_3$ neutral	48	0,2	> 100		
Cr als K_2CrO_4	24	1,0	200	660	2500
Cr als K_2CrO_4	48	1,0	100	560	1000
Cr als K_2CrO_4 neutral.	48	1,0	100	300	900
Cd als $CdSO_4$	48	1,0	0,1	0,48	2,5
Hg als $HgCl_2$	48	1,0	0,005	0,037	0,25
Amylalkohol	24	1,0	500	1400	3000
Phenol	24	1,0	250	510	1500
Anilin	24	1,0	250	2000	5000
Aceton	48	1,0	100	480	5000
Aethanol	48	1,0	100	360	5000
Methanol	48	1,0	250	1060	5000
Formaldehyd	48	1,0	0,75	1,6	2,5
Maleinsäure	24	1,0	> 1000		
Maleinsäure	48	1,0	> 1000		
Cyclopentantetra-Carbonsäure	24	1,0	> 1000		
Diglycolsäure	24	1,0	> 1000		
NTA	24	1,0	> 1000		
NTA	48	1,0	> 1000		
EDTA	24	1,0	> 1000		
EDTA	48	1,0	> 1000		
Cu als $CuSO_4$	48	2,5	0,00025	0,06	0,5
Cu als $CuSO_4$	48	0,2	0,001	0,07	0,25
Citronensäure	24	1,0	> 1000		
Citronensäure	48	1,0	> 1000		
Cu+Citronensäure	24	2,5	0,005	(0,02)(20)100	(0,1)200+)
Cu+Citronensäure	24	0,2	0,001	(0,01)(20)50	(0,1)200+)
Cu+Citronensäure 1:4	24	2,5	0,003	(0,05)(8)120	(1,0)300+)
Cu+Citronensäure 1:4	24	0,2	0,003	(0,03)(5)30	(1,0)(100)+)
Cu+Citronensäure 1:2	48	2,5	0,01	0,055	0,1
Cu+Citronensäure 1:2	48	0,2	0,0025	0,012	0,075
Cu+Citronensäure 1:4	48	2,5	0,001	0,036	0,3
Cu+Citronensäure 1:4	48	0,2	0,001	0,022	0,1
Cu+EDTA 1:1	48	2,5	5	26	100
Cu+EDTA 1:1	48	0,2	1	7,5	40
Cu+NTA 1:1	48	2,5	0,01	0,35	5
Cu+NTA 1:1	48	0,2	0,25	30	100
Cu+Fe+NTA 1:1:2	48	2,5	50	120	500
Cu+Fe+NTA 1:1:2	48	0,2	10	49	100
Fe+NTA 1:1	48	2,5	50	165	300
Fe+NTA 1:1	48	0,2	100	175	300
Fe als $FeSO_4$	48	1,0	0,25	8,0	25,0

Tabelle 1. Ergebnisse von Toxizitätstests mit *Paramecium caudatum*. Versuchsdauer in Stunden (h) angegeben; Summe Erdalkalien in mmol/l und die letale Konzentration (LC) in mg/l.
+) bimodale Konzentrations-Wirkungskurve. Bei Kurzzeit-Versuchen mit Kupfer-Citronensäurekomplexen traten bimodale Konzentrations-Wirkungskurven auf, d. h. mehrere Toxizitätsbereiche in Abhängigkeit von Dissoziations- bzw. Komplexierungsgrad (vgl. Abb. 8). Die intermediären LC50- und LC100-Werte sind in Klammern gesetzt.

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

zunächst als akuter Kurzzeittest ausgelegten Tests die Möglichkeit, Giftwirkungen im subletalen chronischen Bereich zu testen. Ausgehend von dem Befund unterschiedlicher Toxizität je nach Konzentration der um die Liganden konkurrierenden Erdalkalien (Ca und Mg), wurden auch Systeme geprüft, bei denen nicht nur verschiedene Erdalkalien, sondern auch mehrere Schwermetallionen miteinander konkurrieren z. B. in Kupfer-Eisen-NTA-Calcium-Magnesiumlösungen. So wurde z. B. festgestellt, daß die Giftwirkung des NTA-Kupferkomplexes bei Zugabe von Eisen deutlich vermindert wird (12).

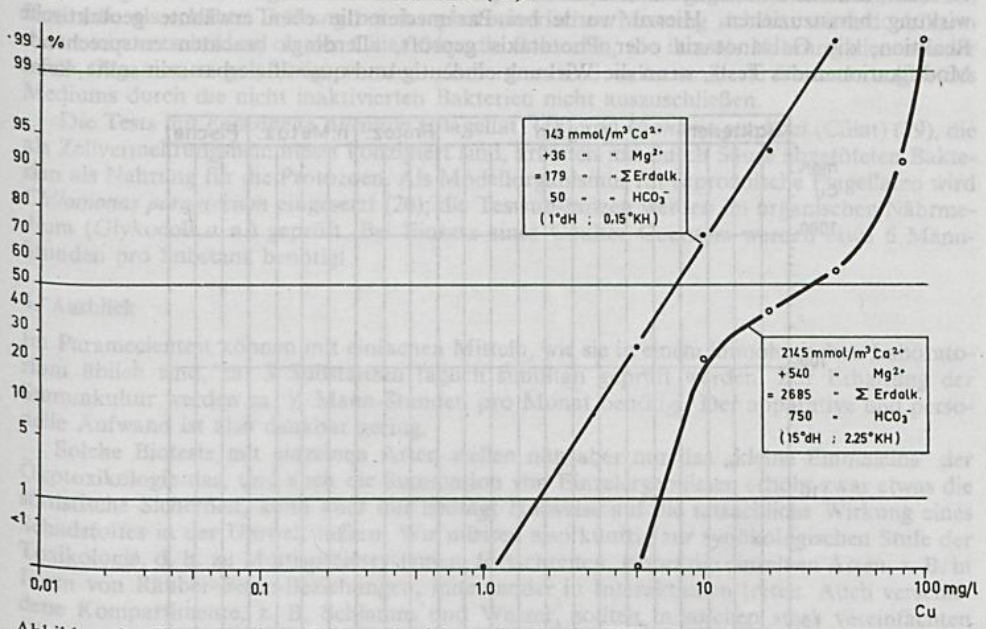

Abbildung 9. Konzentrations/Wirkungsbeziehung des Kupfer-EDTA-Komplexes (1:1 stöchiometrisch) im Paramecientest.

3. Vergleiche mit anderen Tests

Ohne in die Diskussion über artspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Organismen einzusteigen – diese Frage läßt sich ja nicht pauschal, sondern immer nur jeweils in Bezug auf die speziellen Schadstoffe beantworten – sind in Abb. 9 die Ergebnisse verschiedener Biotests von Bakterien, Algen und Protozoen verschiedener Arten, niederen Metazoen, d. h. *Daphnia magna,* Fischen, d. h. Goldorfe, vergleichend dargestellt. Es handelt sich um Ergebnisse aus einer Arbeitsgruppe der Fachgruppe Wasserchemie, die sich mit der biologischen Prüfung organischer Komplexbildner beschäftigte, die als potentielle Phosphorersatzstoffe in Detergentien zur Diskussion standen (12).

Die Ergebnisse sind nur bedingt untereinander vergleichbar, da z. T. verschiedene Testverfahren mit unterschiedlichen Testbedingungen, Testkriterien (z. B. Zellvermehrung bzw. O_2-Produktion im Algentest) und unterschiedliche Auswertungsweisen angewendet wurden.

Es zeigt sich jedoch, daß Protozoen (d. h. *Colpoda maupasi,* dem damaligen Testtier von Bringmann & Kühn (13) und *Paramecium caudatum*) beim Nachweis der Schadwirkung von Schwermetallen sehr empfindliche Indikatoren sein können und zumindest nicht unempfindlicher als das Bakterium *Pseudomonas* sind. Gute Erfahrungen mit Paramecien als Testobjekten wurden auch bei der Toxizitätsprüfung von Fettsäuren, Tensiden und Organo-Zinnverbindungen gemacht (14–16). Diese Erfahrungen haben sich in den DDR-Einheitsverfahren niedergeschlagen (17). Es ist allerdings kritisch anzumerken, daß beim hier beschriebenen Verfahren Kulturflüssigkeit ins Testmedium verschleppt wird, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigen dürfte.

Ein wesentlicher Vorteil der Protozoentests im Vergleich zu Tests mit Makroorganismen besteht in der Möglichkeit, mit großen Zahlen arbeiten zu können. Die Paramecien lassen sich

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

relativ leicht handhaben, wie z. B. pipettieren, photometrisch messen, automatisch zählen. Das Testkriterium ist die Mortalität, die im Sinne einer Ja-Nein-Entscheidung einfach und eindeutig zu bestimmen ist. Die Tendenz geht jedoch zu Tests im subakuten bzw. chronischen Bereich, wenn auch erfahrungsgemäß die Spanne zwischen eindeutiger Anzeige einer subletalen Schädigung und dem Tod der Tiere bei Mikroorganismen relativ eng ist.

Daher haben wir, trotz der allgemein guten Erfahrungen mit dem akuten Paramecientest, versucht, Manifestationsmerkmale unterhalb der Letalschwelle als Kriterium für eine Schadwirkung heranzuziehen. Hierzu wurde bei Paramecien die eben erwähnte geotaktische Reaktion, die Galvanotaxis oder Phototaxis geprüft, allerdings brachten entsprechende Modifikationen des Tests, wenn die Wirkung eindeutig und quantifizierbar sein sollte, keine

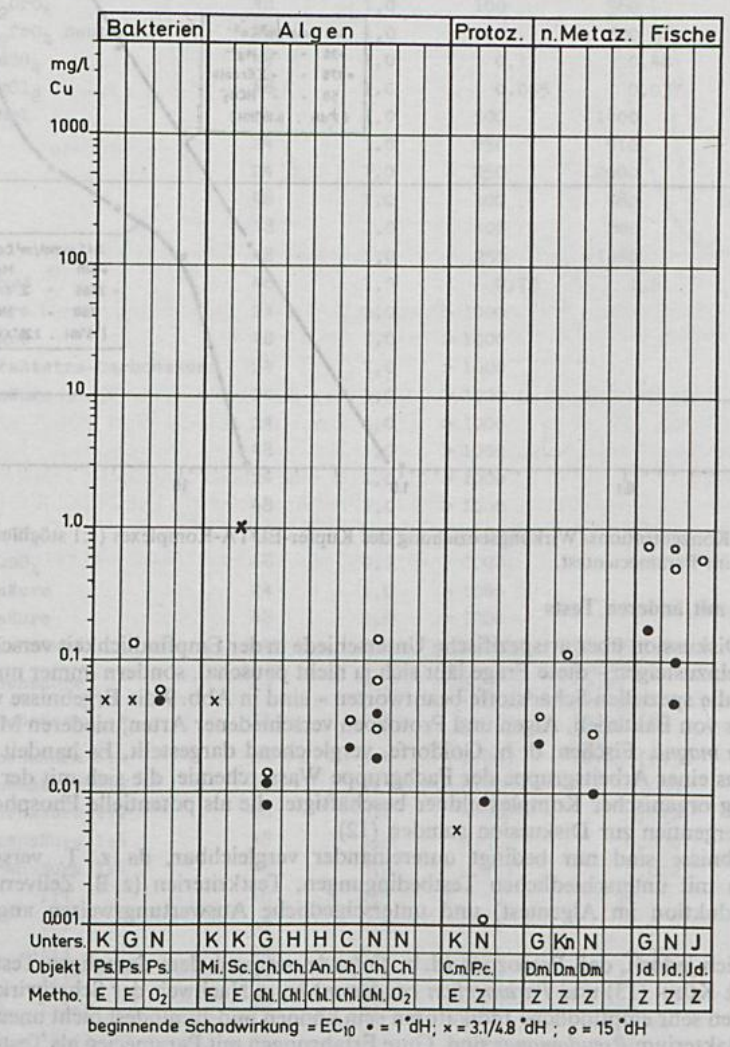

Abbildung 10. Beginnende Schadwirkung von Kupfer (Cu^{2+}) auf ausgewählte Testorganismen.

Abkürzungen: K = Kühn, G. = Gode, H = Hartz, Kn = Knauf, C = Clasen, J = Juhnke, N = Nusch, Ps = *Pseudomonas,* Mi = *Microcystis,* Sc = *Scenedesmus,* Ch = *Chlorella,* An = *Anabaena,* Cm = *Colpoda maupasi,* Pc = *Paramecium caudatum,* Dm = *Daphnia magna,* Id = *Idus*, E = Extinktionsmessung, O_2 = Sauerstoffmessung, Chl = Chlorophyllbestimmung, Z = Zählung.
Aus Nusch 1977 (12).

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

ins Gewicht fallende Verbesserung der Aussage, sondern nur eine Komplizierung des Tests. Auch Versuche mit sessilen peritrichen Ciliaten *(Vorticella* und *Carchesium),* bei denen die Kontraktilität des Stielmuskels als Manifestationsmerkmal herangezogen wurde, haben keine wesentlichen Vorteile im Sinne einer erhöhten Empfindlichkeit der Aussage oder Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gebracht.

Bringmann & Kühn (13) nutzen zwar ein subletales Manifestationsmerkmal, nämlich die Hemmung der Freßtätigkeit des Ciliaten *Colpoda maupasi,* die gegenüber einer untoxischen Kontrolle als erhöhte Trübung bei der photometrischen Messung sichtbar wird; doch kann man nicht entscheiden, ob der Ciliat oder die Bakterien, die ihm als Nahrung dienen, oder beide Organismen geschädigt wurden. Außerdem sind unkontrollierte Veränderungen des Mediums durch die nicht inaktivierten Bakterien nicht auszuschließen.

Die Tests mit *Entosiphon sulcatum* (Flagellat) (18) und *Uronema parduzzi* (Ciliat) (19), die als Zellvermehrungshemmtests konzipiert sind, arbeiten mit durch Säure abgetöteten Bakterien als Nahrung für die Protozoen. Als Modellorganismus für saprozoische Flagellaten wird *Chilomonas paramecium* eingesetzt (20); die Testsubstanzen werden im organischen Nährmedium (Glykocoll u. a.) geprüft. Bei Einsatz eines Coulter Counters werden etwa 6 Mann-Stunden pro Substanz benötigt.

4. Ausblick

Im Paramecientest können mit einfachen Mitteln, wie sie in einem limnologischen Laboratorium üblich sind, ca. 3 Substanzen täglich simultan geprüft werden. Zur Erhaltung der Stammkultur werden ca. ¼ Mann-Stunden pro Monat benötigt. Der apparative und personelle Aufwand ist also denkbar gering.

Solche Biotests mit einzelnen Arten stellen nun aber nur das „kleine Einmaleins" der Ökotoxikologie dar, und auch die Summation von Einzelergebnissen erhöht zwar etwas die statistische Sicherheit, kann aber nur bedingt Hinweise auf die tatsächliche Wirkung eines Schadstoffes in der Umwelt liefern. Wir müssen also künftig zur synökologischen Stufe der Toxikologie, d. h. zu Multispeciessystemen, fortschreiten, wobei die einzelnen Arten, z. B. in Form von Räuber-Beute-Beziehungen, miteinander in Interaktionen treten. Auch verschiedene Kompartimente, z. B. Schlamm und Wasser, sollten in solchen stark vereinfachten Ökosystemausschnitten miteinander reagieren können.

Unser Testorganismus *Paramecium* läßt sich in heterotrophe aquatische Nahrungskettenmodelle einbauen. Ein sicher und reproduzierbar funktionierendes Multispeciessystem können wir jedoch noch nicht anbieten. Dem hohen Anspruch, den der Name Ökotoxikologie beinhaltet, wenn man ihn nicht bloß als Abgrenzung zur Human- bzw. Warmblütertoxikologie verstehen will, kann man eigentlich nur gerecht werden, wenn es gelingt, mit Hilfe biologischer Testverfahren zur Erkennung und Quantifizierung von Schadstoffwirkungen in der Umwelt und zur Kausalanalyse der Wirkungswege und Wirkungsweisen, d. h. zur Erkenntnis der funktionellen Zusammenhänge, beizutragen. Dies ist, zugegebenermaßen, wenn man von der Auswertung unfreiwilliger ökotoxikologischer Großversuche absieht, bisher nur in einigen wenigen Fällen gelungen.

Danksagung

Meinem Mitarbeiter, Herrn Eberhard Mertschenk, sei für die geschickte Durchführung und zuverlässige Auswertung der Paramecientests herzlich gedankt.

Literatur

(1) Deutsches Institut für Normung (DIN); Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV): Bestimmung der biologischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Kleinkrebse (L 11); DIN 38412, Teil 11.

(2) Deutsches Institut für Normung (DIN); Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV): Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Fische – Fischtest (L 15); DIN 38412, Teil 15.

(3) Deutsches Institut für Normung (DIN); Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV): Bestimmung der Giftwirkung von Abwässern auf Fische – Fischtest (L 20); DIN 38412, Teil 20.

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

(4) International Organisation for Standardisation (ISO): Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia magna* STRAUS. – Doc. TC 147/SC5/WG2 DIS 6341 v. 30. 08. 79.
(5) Deutsches Institut für Normung (DIN); Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV): Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (L1); DIN 38412, Teil 1.
(6) Umweltbundesamt (1980): Umweltchemikalien. 140 S. – Berlin 1980.
(7) Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Chemikaliengesetz-ChemG). – Bundesratsdrucksache 376/80 v. 27. Juni 1980.
(8) Organisation of Economic Cooperation and Development (OECD); Ecotoxicology Group (1980): Monographs on useful test organisms: *Paramecium caudatum* EHRB. 1838.
(9) CURDS, C. R. (1973): The Role of Protozoa in the Activated-Sludge Process. – American Zool. **13**, 161–169.
(10) LITCHFIELD, I. T., & WILCOXON, F. (1949): A simplified method of evaluating dose-effect experiments. – J. Pharmac. exper. Ther. **96**, 99–113.
(11) STEPHAN, C. E. (1971): Methods for calculating an LC 50, in: MAYER, F. L. & HAMELING, I. L., Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation ASTM-STP 634. – American Society for Testing and Materials 1971, 65–84.
(12) NUSCH, E. A. (1977: Beurteilung der biologischen Schadwirkung organischer Komplexbildner und Komplexe aufgrund toxikologischer Testverfahren mit Bakterien, Algen, Protozoen, niederen Metazoen und Fischen. – Z. f. Wasser- und Abwasserforschung **10** (2) 49–61.
(13) BRINGMANN, G. & KÜHN, R. (1959): Wassertoxikologische Untersuchungen mit Protozoen als Testorganismen. – Ges. Ing. **80**, 239–242.
(14) SCHUSTER, G. (1961): Die toxische Wirkung von niederen und mittleren Fettsäuren auf einige Ciliaten. – Int. Rev. ges. Hydrobiol. **46**, 92–104.
(15) GOTTSCHALDT, N. (1967): Methode zur Bestimmung der Toxizität von Detergentien. – Hydrologiai Közlöny **7**, 331–334.
(16) WINTER, W. (1966): Abschlußbericht der Vertragsforschung zum Thema „Analysen und Entgiftung von organozinnhaltigen Abwässern". – 24 S. Institut für Wasserwirtschaft, Berlin 1966.
(17) Autorenkollektiv (1972): Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung. Bd. *2.* — Jena (VEB Gustav Fischer Verlag).
(18) BRINGMANN, G. (1978): Bestimmung der biologischen Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Protozoen. I Bakterienfressende Flagellaten (Modellorganismus: *Entosiphon sulcatum* STEIN). – Z. f. Wasser- und Abwasserforschung **11**, (6), 210–215.
(19) BRINGMANN, G. & KÜHN, R. (1980): Bestimmung der biologischen Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Protozoen. II Bakterienfressende Ciliaten (Modellorganismus: *Uronema parduzzi* CHATTON-LWOFF). Z. f. Wasser- und Abwasserforschung **13** (1) 26–31.
(20) BRINGMANN, G., KÜHN, R. & WINTER, A. (1980): Bestimmung der biologischen Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Protozoen. III Saprozoische Flagellaten 1 (Modellorganismus: *Chilomonas paramecium* EHRBG.). – Z. f. Wasser- und Abwasserforschung **13** (5), 170–173.

Anschrift des Verfassers: Dr. Ernst A. Nusch, Ruhrverband, Chemisches und Biologisches Laboratorium, Postfach 103242, D-4300 Essen 1.

Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg
Frankfurt am Main

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Decheniana

Jahr/Year: 1982

Band/Volume: BH_26

Autor(en)/Author(s): Nusch Ernst A.

Artikel/Article: Prüfung der biologischen Schadwirkungen von Wasserinhaltsstoffen mit Hilfe von Protozoentests 87-98