

Aus dem Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Univ. Tübingen

DER NACHWEIS SCHWEFELHALTIGER MIKROBIELLER GERUCHSSTOFFE IM NEUSIEDLER SEE, ÖSTERREICH

B. HOFBAUER

1. Einleitung

Die seit 1977 (KUSEL-FETZMANN 1978, DOKULIL 1978) auftretenden Wasserblüten im Neusiedler See waren in den Jahren 1982, 1984 und 1985 von einer stark schwefligen Geruchsbelästigung begleitet. Vereinzelt wurde von Besuchern im Zusammenhang mit diesem Ereignis über Kopfschmerzen und Übelkeit berichtet.

Als Hauptverursacher der Wasserblüten konnten verschiedene *Microcystis*-Arten identifiziert werden (HOFBAUER 1984). Da in der zur Verfügung stehenden Literatur (ab 1927) keine Hinweise auf flüchtige schwefelhaltige organische Verbindungen in *Microcystis*-Wasserblüten gefunden werden konnten, wurde im Zuge eines AGN-Projektes eine nähere Untersuchung auf solche Komponenten angeregt.

Die 1982 durchgeführten Voruntersuchungen mit verschiedenen *Microcystis*-Isolaten aus dem Neusiedler See, die jedoch nicht bakterienfrei waren, hatten gezeigt, daß mehrere Schwefelkomponenten an der Geruchsentwicklung beteiligt sind. Bereits geringe Probenvolumina von 2-3 ml, die nur einige *Microcystis*-Kolonien enthielten, reichten aus, um Schwefelverbindungen gaschromatographisch nachweisen zu können. Allerdings konnte eine Identifizierung damals nicht durchgeführt werden.

*Diese Arbeit wurde während des Jahrestreffens der Österreichischen Landesgruppe SIL (Societas Internationalis Limnologiae) in Wien, Österreich, im Oktober 1986 referiert. Sie stellt auch einen Beitrag zum AGN-Programm (Arbeitsgemeinschaft Gesamtkonzept Neusiedler See) dar.

In weiteren Untersuchungen, die während eines DAAD-Stipendiums (Deutscher Akademischer Austauschdienst) durchgeführt wurden, war der Nachweis und die Identifizierung von Schwefelverbindungen axenischer Klonkulturen, die aus dem Neusiedler See isoliert worden waren, möglich.

Um die physiologisch-biochemischen Laborexperimente (HOFBAUER & JÜTTNER 1985) durch Freilanduntersuchungen zu bestätigen, wurden Analysen des Rohwassers während einer Wasserblüte angestrebt. Im Juli 1985 konnten dann im Verlauf einer Wasserblüte mehrerer *Microcystis* -Arten Proben im Neusiedler See entnommen und analysiert werden. Hierdurch konnte der Nachweis flüchtiger Organoschwefelverbindungen im Gewässer unter Anwendung mikroanalytischer Methoden, deren Nachweisgrenzen im ng/kg-Bereich liegen, erbracht werden.

2. Material und Methoden

Für die Probenahme an verschiedenen Stellen des Neusiedler Sees war die chemische Inhomogenität des Sees entscheidend. Infolge der chemisch unterschiedlichen Grundwässer muß zwischen einem Ca- und Mg-reichen Nordteil und einem Na-reichen Südteil unterschieden werden (LÖFFLER 1979, WURZER 1982) Dies veranlaßte die Auswahl von einer Probenahmestelle im Süden (47° 45' 45'' N, 16° 43' 48'' O) in der Mitte der Verbindungslinie zwischen Mörbisch und Illmitz, in Seemitte (47° 51' 01'' N, 16° 46' 33'' O) in der Mitte der Verbindungslinie zwischen Donnerskirchen und Podersdorf und im Norden (47° 53' 40'' N, 16° 48' 00'' O) in der Mitte der Verbindungslinie zwischen Purbach und Breitenbrunn. Für die Analyse des humos-braunen Schilfwassers wurde der Schilfkanal neben dem Ruster Kanal herangezogen (47° 48' 16'' N, 16° 41' 23'' O) Der in der Ruster

Bucht verlaufende Kanal ist ca. 1,5 2,0 m breit und hat eine Wassertiefe von 0,75 m.

Die Rohwasserproben des See- und Schilfkanalwassers wurden mit einem Glasgefäß von der Oberfläche (bis 20 cm Tiefe) abgeschöpft. An jedem Standort wurden 3 Parallelproben gezogen. Jeweils 10 l Rohwasser wurden in Glasflaschen abgefüllt, die vorher mit Standortwasser ausgespült worden waren. Sie wurden, mit Glasschliffstopfen verschlossen, ins Labor transportiert.

Die flüchtigen Stoffe der Seewasserproben wurden innerhalb von 8 Stunden mit dem closed-loop-System (GROB & GROB 1974) auf ein von JÜTTNER & WURSTER (1979) entwickeltes Geruchssammelnröhrchen, das mit Tenax TA gefüllt war, adsorbiert. Die Überführung der Substanzen in die GC- und GC/MS-Analysensysteme erfolgte mit einer Vorrichtung von JÜTTNER & WURSTER (1979) Für die gaschromatographische Detektion diente ein Multidetektionssystem, das eine stoffklassenspezifische Aufzeichnung der Verbindungen mit SSD (Schwefel-selektiver Detektor), ECD (Elektroneneinfang-Detektor) und FID (Flammenionisations-Detektor) ermöglichte. Genauere Angaben zur Methode werden an anderer Stelle publiziert (JÜTTNER, in Druck).

Für die Identifizierung der flüchtigen Schwefelverbindungen wurden zunächst Gaschromatogramme mit SSD- und FID-Detektion aufgezeichnet. Anhand der SSD-Signale konnten die Retentionszeiten der einzelnen Schwefelkomponenten leicht festgestellt werden. Sie dienten zum Auffinden der entsprechenden Massenspektren. Durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren der unbekannt flüchtigen Schwefelverbindungen mit denen von Referenzsubstanzen wurden die einzelnen Komponenten identifiziert. Stimmt Retentionszeit und Massenspektrum der unbekannt Verbindung mit denen einer authent-

tischen Substanz überein, wurde eine gaschromatographische Überlagerung durchgeführt.

Die zur Analyse vorgesehenen Organismen bestimmter Bio-coenosen des Schilfkanals oder des Freiwassers in Seemitte wurden durch Abschöpfen mit einem Sieb konzentriert (Wasserblütenauftrieb in Seemitte) oder direkt mit einer Pinzette entnommen (Aufwuchs und Auftriebsmatten im Schilfkanalwasser) Diese Proben wurden in 10 ml Portionen tiefgefroren und nach Aufarbeitung der flüchtigen organischen Stoffe einer gaschromatographischen und einer gaschromatographischen/massenspektrometrischen Analyse unterworfen.

An allen Standorten wurden Proben für die semiquantitative und prozentuelle Abundanzbestimmung der Organismen (Cyanobakterien, Algen, fädige Bakterien) entnommen. Die semiquantitativen Planktonanalysen wurden stets mit nativem Phytoplankton durchgeführt. Für die Abundanzbestimmung wurden 5 Häufigkeitsstufen verwendet: ss (sehr selten), s (selten), h (häufig), sh (sehr häufig), m (massenhaft)

Folgende chemisch-physikalische Parameter wurden in situ an allen Standorten bestimmt: Wassertemperatur, Windgeschwindigkeit, Windrichtung, pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoff (%-Sättigung und mg/l) Für weitere Chemieanalysen wurden Wasserproben an die Gewässeraufsicht in Wulkaprodersdorf weitergegeben und dort nach den DIN-Normen auf Schwebstoffgehalt, chemischen Sauerstoffbedarf, Ammonium-Stickstoff, Nitrat-Stickstoff, ortho-Phosphat, Gesamtphosphat, lösliches Phosphat, Chlorid, Calcium und Magnesium untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Schilfkanal

Als Probenahmestelle wurde der Schilfkanal neben dem Ruster Kanal gewählt. Die begleitenden chemisch-physikalischen

Messungen in situ und im Labor erbrachten, daß von den bestimmten Ionen die Werte für Phosphat ($\text{PO}_4\text{-P}$, Ges.-P und lösl.-P) und Calcium gegenüber dem Freiwasser in Seemitte deutlich erhöht waren (Tab. 1) Im Gegensatz zum freien Seewasser konnte im Braunwasserkörper ein Sauerstoffdefizit (40 % Sättigung, 3,7 mg $\text{O}_2\text{/l}$) gemessen werden.

Tab. 1:

Ergebnisse der Labor- und in-situ Messungen chemischer und physikalischer Parameter an den Standorten in Seemitte und im Schilfkanal des Neusiedler Sees.

n.b. nicht bestimmt, n.n.: nicht nachweisbar, WR:Windrichtung, WG:Windgeschwindigkeit, SST:Schwebstoffgehalt, COD:chemischer Sauerstoffbedarf.

Probenahmestelle	Seemitte			Schilfkanal	
	Nord	Mitte	Süd		
Datum	4.7.85	3.7.85	3.7.85	3.7.85	7.7.85
Zeit	13.00	12.00	10.00	13.15	11.00
WR		NW	N		
WG	0	3-4	2-3	0	0
Temperatur (°C)	24,0	18,7	17,7	19,0	22,0
pH-Wert	8,80	8,99	9,03	8,04	8,00
Leitfähigkeit ($\mu\text{S/cm}$)	2000	1950	1900	1950	2300
O_2 -Gehalt (mg/l)	10,0	9,7	9,3	3,7	n.b.
O_2 -Sättigung (%)	130	103	96	40	n.b.
<hr/>					
SST (mg/l)	54	25	28	8	8
COD-ges. (mg/l)	30,5	49,8	50,2	56,9	57,0
COD-lösl. (mg/l)	27,2	37,8	31,1	47,4	53,2
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/l)	0,037	0,113	0,113	0,150	0,135
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/l)	n.n.	0,089	0,089	0,081	0,087
$\text{PO}_4\text{-P}$ (mg/l)	0,048	0,020	0,020	0,274	0,100
P-ges. (mg/l)	0,144	0,140	0,140	0,545	0,164
P-lösl. (mg/l)	0,077	0,025	0,027	0,324	0,131
Cl^- (mg/l)	231,9	224,1	228,7	254,6	258,9
Ca^{2+} (mg/l)	21,6	28,1	32,1	40,1	35,3
Mg^{2+} (mg/l)	121,6	140,0	135,6	129,8	123,0

Infolge der geringen Tiefe und der Klarheit des Wassers reichte die Penetration des Lichts im Schilfkanal bis zur Sedimentoberfläche. Matten aus fädigen Cyanobakterien, Bakterien (Cytophagales) und epiphytischen Diatomeen waren stark vertreten. Cytophagales, die mit mehreren *Beggiatoa*-Arten vertreten waren, bildeten spinnwebenartige Überzüge. Wenn die Algenmatten durch Gasblasen vom anaeroben Sediment losgelöst waren, schwammen sie auf und flottierten dann an der Wasseroberfläche (Tab. 2)

Tab. 2:

Abundanzbestimmung der an der Bildung der Auftriebsmatten beteiligten Cytophagales und Algen (flottierende Auftriebsmatte im Braunwasser) Es wurden 5 Häufigkeitsstufen verwendet. Die Probenahme erfolgte am 7.7.1985 im Schilfkanal neben dem Ruster Kanal, Neusiedler See.

Mikroorganismen	Abundanz
<i>Beggiatoa</i> sp. Trevisan (b=6µm)	sh
<i>Beggiatoa alba</i> (Vaucher)Trevisan	s
<i>Beggiatoa arachnoidea</i> (Ag.)Rabenhorst	s
<i>Beggiatoa leptomitiformis</i> (Meneghini)Trevisan	s
<i>Oscillatoria</i> sp. Vaucher	s
<i>Oscillatoria tenuis</i> Ag.	s
<i>Oscillatoria chalybea</i> Mertens	h
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>schmale chalybea</i>	sh
<i>Oscillatoria chlonina</i> Kütz.	h
<i>Oscillatoria curviceps</i> Ag.	s
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>proboscidea</i> Gom.	h
<i>Oscillatoria minima</i> Gickelhorn (gelb)	ss
<i>Oscillatoria princeps</i> Vaucher	s
<i>Oscillatoria limosa</i> Ag.	ss
<i>Oscillatoria sancta</i> (Kütz.) Gom.	s
<i>Oscillatoria ornata</i> Kütz.	s
<i>Oscillatoria okenii</i> Ag.	ss
<i>Spirulina subsata</i> Oerst.	ss
<i>Spirulina subtilissima</i> Kütz.	ss
<i>Anabaena constricta</i> (Szafer)Geitler	ss
<i>Tribonema</i> sp. Derb.&Sol.	ss
<i>Fragilaria brevistriata</i> Grun.	ss
<i>Navicula</i> sp.1 Bory	s
<i>Navicula</i> sp.2 Bory	ss
<i>Navicula oblonga</i> Kütz.	ss
<i>Navicula cuspidata</i> (Kütz.)Kütz.	h
<i>Navicula cuspidata</i> var. <i>ambigua</i> (Ehr.)Cleve	s
<i>Gyrosigma macrum</i> (Smith) Cleve	ss
<i>Nitzschia</i> sp.Hassall	ss
<i>Nitzschia sigmoidea</i> (Ehr.)Smith	s
<i>Anomoeneis spaerophora</i> (Kütz.)	s
<i>Rhizoclonium</i> sp. Kütz.	
<i>Euglena</i> sp. Ehr.	
<i>Euglena oxyuris</i> Schmarida	
<i>Phacus pleuronectes</i> (O.F.M.)Duj.	

Die Organismen (z.B. *Oscillatoria*) können so leicht ins Plankton gelangen (Tab. 3)

Tab. 3 :

Abundanzbestimmung der Bakterien und Algen im Plankton des Schilfkanal- und des Seemitte-Wassers. Es wurden 5 Häufigkeitsstufen verwendet. Die Probenahme erfolgte vor und während einer Wasserblüte verschiedener *Microcystis*-Arten und der Grünalge *Botryococcus braunii*. Standort für 3.7.1985 war Seemitte zwischen Mörbisch und Illmitz; Standort für 8.7.1985 war Seemitte zwischen Oggau und Podersdorf; Standort für 4.7.1985 war Seemitte auf der Höhe von Purbach. Die Probe vom 29.6.1985 wurde in dankenswerter Weise von Frau Prof. Dr. ELSALORE KUSEL-FETZMANN zur Verfügung gestellt.

Entnahmestelle Datum	Seemitte			Schilfkanal
	29.6.	3.7.	8.7.	4.7. 7.7.
Mikroorganismen	Abundanz			
<i>Beggiatoa alba</i> (Vauch.) Trev.				-
<i>Microcystis aeruginosa</i> f. <i>aeruginosa</i> Elenkin				h
<i>Microcystis aeruginosa</i> f. <i>flos-aquae</i> Elenkin				sh
<i>Microcystis wesenbergii</i> Komárek	-			s
"Haufenblaualge"-1 (distinkte Gallerte)	sh			s
"Haufenblaualge"-2 (ohne distinkte Gallerte)				ss
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemm.				ss
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemm.				s
<i>Oscillatoria</i> sp. Vauch.			-	
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kütz.			sh	
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thur.) Kom. Leg. (= <i>Ankistrodesmus falcatus</i> var. <i>spirilliformis</i>)	sh	h		ss
"Haufengrinalge"	h	-		h
<i>Pediastrum duplex</i> Meyen	s	h		sh
<i>Sphaerocystis schroeteri</i> Chod.	s	h		sh
<i>Botryococcus braunii</i> Kütz.	-	ss		sh
<i>Oocystis lacustris</i> Chod. (rund)	h			s
<i>Oocystis lacustris</i> Chod. (länglich)				-
<i>Oocystis solitaria</i> Wittr.				h
<i>Craucigeria tetrapedia</i> (Kirch.) West. & West.	-	-		ss
<i>Lobocystis dichotoma</i> Thompson	h	sh		sh
Flagellaten (grün, winzig)				sh
<i>Cryptomonas</i> sp. Ehr.				
<i>Chroomonas</i> sp. Hansgirg				
<i>Euglena</i> sp. Ehr.				
<i>Euglena oxyuris</i> Schmarida				

In der Artzusammensetzung des Planktons des Schilfkanalwassers spiegelt sich die Verbindung dieses Teils zum See wider. Arten des freien Seewassers drangen weit in den Schilfkanal vor. Bedingt durch unterschiedliche ökologische Bedingungen in parallel verlaufenden Kanälen und Blänken des Schilfgürtels muß in diesen mit anderen Formen gerechnet werden (KUSEL-FETZMANN 1986, 1979). Das Periphyton auf Halmen von *Phragmites australis* (Tab. 4) war von fädigen Grünalgen (*Cladophora*, *Tribonema*, *Spirogyra*) dominiert. Diese trugen ihrerseits wieder an der Oberfläche angeheftete Büschel von *Synedra* und *Rhoicosphenia* (auf Gallertstielen) und *Epithemia*. Dazwischen bewegten sich Flagellaten und Diatomeen. *Utricularia vulgaris* und submerse Makrophyten konnten an dieser Probenahmestelle nicht beobachtet werden.

Tab. 4:

Abundanzbestimmung des Aufwuchses auf Halmen von *Phragmites australis*. Es wurden 5 Häufigkeitsstufen verwendet. Die Probenahme erfolgte am 7.7.1985 im Schilfkanal neben dem Ruster Kanal, Neusiedler See.

Mikroorganismen

Abundanz

Thiothrix sp. Vinogradskij (lokal sh)

Nostoc sp. Vauch.

Oscillatoria sp. Vauch

Oscillatoria princeps Vauch.

Calothrix braunii Born. & Flah.

Rhoicosphenia curvata (Kütz.) Grun.

s

Synedra sp. Ehr.

h

Synedra ulna (Nitsch.) Ehr.

ss

Epithemia sorex Kütz.

h

Rhopalodia gibba (E.) O.Müller

s

Bacillaria paradoxa Gmelin

ss

Tribonema sp. Derb. & Sol.

h

Microspora sp. Thuret

ss

Cladophora sp. Kütz.

h

Rhizoclonium hieroglyphicum (Kütz.) Stockm.

s

Spirogyra sp. Link.

m

Die GC-Analyse der Rohwasserproben des Schilfkanals enthielten eine große Anzahl flüchtiger Substanzen. Die Analyse der flüchtigen Schwefelverbindungen von 10 l Schilfkanal-Wasserproben mit der closed-loop-Strippinganlage erbrachte unter Anwendung der Mehrfachdetektion mit FID und SSD den Nachweis für eine Reihe von Schwefelkomponenten.

Bei ausreichenden Konzentrationen konnten durch GC/MS-Paralleluntersuchungen folgende Substanzen identifiziert werden:

Abb. 1a - d:

Massenspektren der schwefelhaltigen Hauptkomponenten aus den Rohwasserproben des Schilfkanals bei Rust (Neusiedler See) Als Vergleich wurden die Spektren der entsprechenden Referenzverbindungen und teilweise die in der Literatur beschriebenen angegeben.

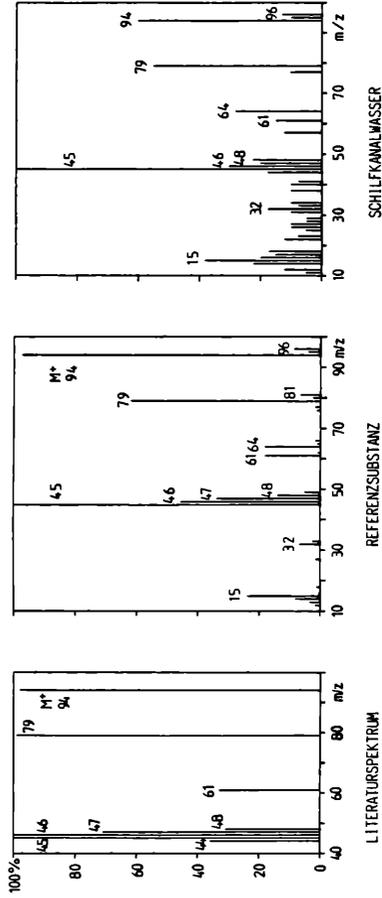
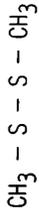
Abbildungen umseitig

a) Dimethyldisulfid (2,3-Dithiabutan)

DIMETHYLDISULFID

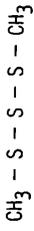


MG 94

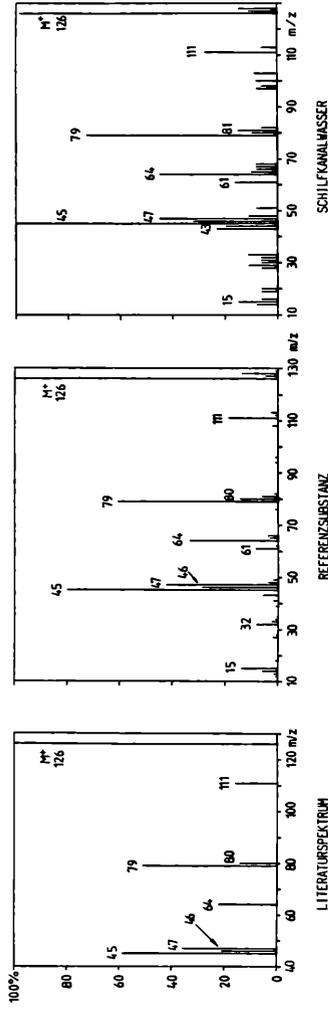


b) Dimethyltrisulfid (2,3,4-Trihiapentan)

DIMETHYLTRISULFID



MG 126



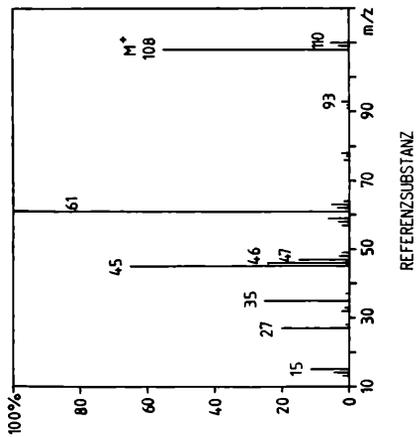
c) bis-(Methylthio)-methan (2,4-Dithiapentan)

BIS-(METHYLTHIO)-METHAN

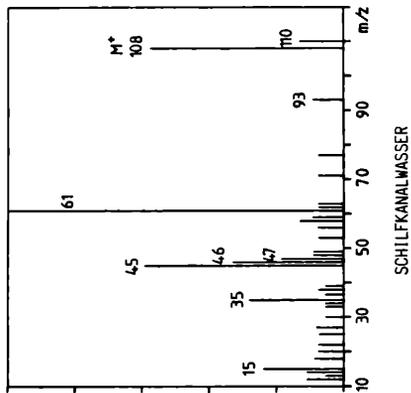
$C_3H_8S_2$

MG 108

$CH_3 - S - CH_2 - S - CH_3$



REFERENZSUBSTANZ



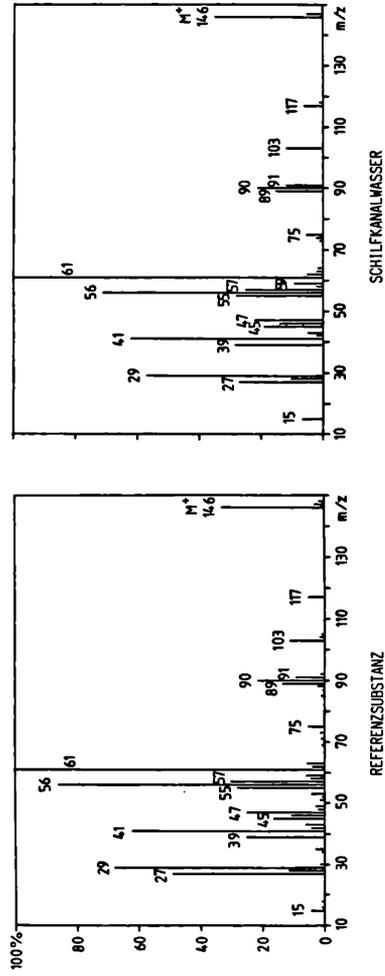
SCHILFKANAALWASSER

d) Dibutylsulfid (5-Thianonan)

DIBUTYLSULFID



MG 146



In den aufgezeichneten Massenspektren waren infolge der geringen Konzentrationen der Schwefelverbindungen zum Teil Fremdfragmentationen in kleinen Mengen vorhanden. Die gute Übereinstimmung der Intensitäten der charakteristischen Fragmentationen und der Retentionszeiten mit denen authentischer Verbindungen erbrachte die eindeutige Identität der flüchtigen organischen Schwefelsubstanzen.

Für zwei weitere Schwefelverbindungen, die charakteristische SSD-Signale zeigten, konnte aufgrund der Retentionszeiten eine Identität mit 2-Methylthiophen und Thiopropionsäuremethylester wahrscheinlich gemacht werden. Wegen der geringen Konzentrationen konnten jedoch keine Massenspektren erhalten werden. Die weiteren drei, in Spuren vorhandenen Schwefelkomponenten, konnten nicht bestimmt werden.

Um den biogenen Ursprung der im Braunwasserkörper identifizierten Schwefelverbindungen weiter einengen zu können, wurden die Auftriebsmatten (10 ml der tiefgefrorenen Proben) ebenfalls einer GC- und GC/MS-Analyse unterworfen. Es konnten keine S-Verbindungen nachgewiesen werden. In der Zusammensetzung der Organismen dominierten in diesen Proben eindeutig *Oscillatoria*-Arten.

In gleicher Weise wie die Auftriebsmatten wurden auch die Aufwuchsproben von den Schilfhalmen untersucht. Die GC- und GC/MS-Analysen erbrachten keinen Nachweis für S-Substanzen. Der Bewuchs setzte sich aus *Spirogyra*-, *Cladophora*- und *Tribonema*-Arten zusammen.

3.2. Seemitte

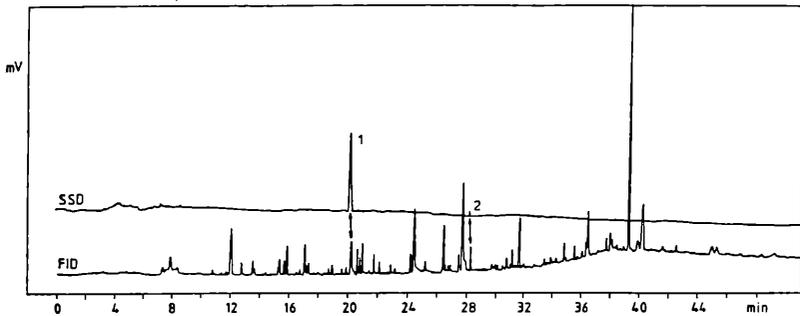
Die Proben in Seemitte wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (3. und 4. Juli 1985) gezogen. Am ersten Tag, an dem Windstärke 3 mit starkem Wellengang herrschte, wurden die Proben in Seemitte zwischen Mörbisch und Illmitz und zwischen Donnerskirchen und Podersdorf entnommen. Am darauffolgenden Tag herrschte Windstille. Bei einer Wassertemperatur von 24°C konnte ein leichter Sauerstoffgradient (Oberfläche/10cm/40cm Tiefe: 10,0/10,3/10,5 mg O₂/l bzw. 130/120/113 %-Sättigung) gemessen werden. Im mittleren Drittel des Sees auf der Höhe von Breitenbrunn/Purbach traten grüne Auftriebsflocken mit *Microcystis flos-aquae* als dominierende Art auf. Der damit verbundene schwefelgestechende Geruch des Wassers verursachte Übelkeit und Kopfschmerzen bei den Besuchern.

Da an den Probenstellen des Freiwassers die gleichen S-Verbindungen identifiziert werden konnten, wird in Abb. 2 nur die GC-Analyse vom Standort Breitenbrunn/Purbach dargestellt. Bei diesen Wasserproben waren die höchsten Konzentrationen an S-Substanzen vorhanden. Nach GC-Analyse mit SSD- und FID-Detektion konnten Diisopropyldisulfid und Diisopropyltrisulfid eindeutig nachgewiesen werden. Für die parallel durchgeführten GC/MS-Analysen waren die isolierten Mengen an S-Verbindungen nicht ausreichend.

Nach der semiquantitativen Planktonanalyse dominierten Chlorophyceen-Arten wie *Botryococcus braunii*, *Lobocystis dichotoma*, *Pediastrum duplex* und *Sphaerocystis Schroeteri*. Sehr häufig traten auch die beiden *Oocystis*-Arten und eine Kolonie-bildende coccale Chlorophyceae ("Haufengrünalge") auf. Von den Cyanobakterien-Arten waren nur coccale Formen, *Microcystis aeruginosa* und *Microcystis flos-aquae*, vorherrschend (siehe Tab.3)

Abb. 2:

Gaschromatogramm der flüchtigen Stoffe, isoliert aus 10 l Wasserblüten-Seewasser des Neusiedler Sees. Die Isolierung erfolgte nach der stripping-Methode unter Zugabe von 2,4 kg NaCl, bei einer Ausblaszeit von 1 h. Die Trennung wurde auf einer 50 m Glas-Kapillarsäule, belegt mit UCON 50 HB 5100, durchgeführt (5 min bei 0°C isotherm, 0°C-190°C mit 5°C/min, 20 min isotherm bei 190°C, 100 ml/min H₂ als Trägergas, Splittverhältnis 1:30). FID: Flammenionisations-Detektor, SSD: Schwefelselektiver-Detektor, 1. Diisopropyldisulfid, 2. Diisopropyltrisulfid

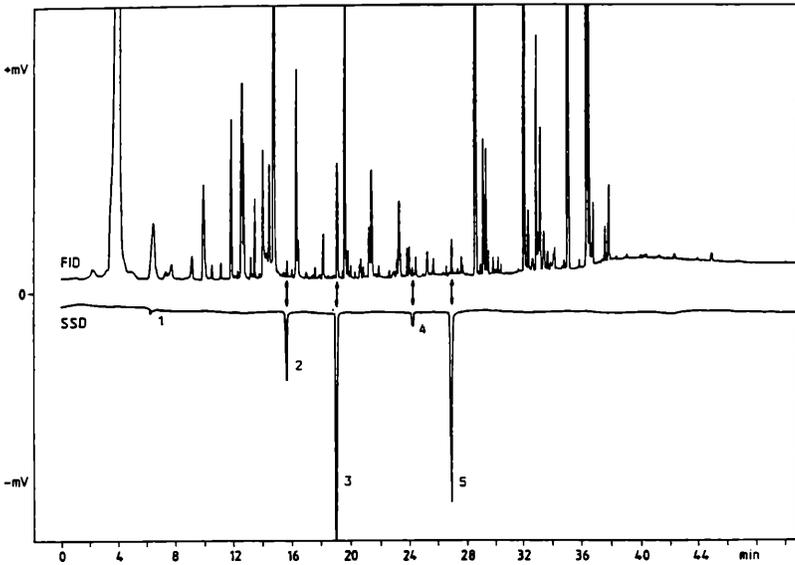


Die begleitenden chemisch-physikalischen Analysen werden in Tabelle 1 angeführt. Interessanterweise konnte im Wasserblüten-Wasser des Nordteils kein Nitrat-Stickstoff nachgewiesen werden.

Um auch in Seemitte den Ursprung der Schwefelverbindungen weiter einschränken zu können, wurden Auftriebflocken, die einen Durchmesser bis zu 2 cm erreichten, abgeschöpft und in 10 ml Portionen tiefgefroren. Diese wurden dann einer GC- (Abb. 3) und einer GC/MS-Analyse unterzogen.

Abb. 3:

Gaschromatogramm der flüchtigen organischen Stoffe, isoliert von 10 ml tiefgefrorenen Auftriebsflocken der Wasserblüten im Neusiedler See 1985 (Seemitte auf der Höhe Breitenbrunn, 4.7.1985) Die gaschromatographischen Bedingungen waren identisch mit denen von Abb. 2. Zur besseren Übersicht wurde das SSD-Signal umgekehrt aufgezeichnet. FID: Flammenionisations-Detektor, SSD: Schwefel selektiver-Detektor, 1. Isopropylmethylsulfid (?), 2. Isopropylmethyldisulfid, 3. Diisopropyldisulfid, 4. Isopropylmethyltrisulfid, 5. Diisopropyltrisulfid.



Zusätzlich zu den im Seewasser identifizierten Schwefelkomponenten, Diisopropyldisulfid und Diisopropyltrisulfid, gelang der gaschromatographische Nachweis von Isopropylmethyldisulfid und Isopropylmethyltrisulfid. Bei der parallel durchgeführten GC/MS-Analyse waren die Konzentrationen für den Nachweis folgender Schwefelverbindungen ausreichend:

Isopropylmethyltrisulfid (2,3,4-Trithia-5-hexan) Abb.4a

Diisopropyltrisulfid (3,4,5-Trithia-2,6-dimethylheptan) Abb.4b

Wie bei den Massenspektren der Schilfkanalproben war auch hier durch die geringe Konzentration der Schwefelverbindungen ein Anteil an Fremdfragmentionen vorhanden. Die Übereinstimmung der charakteristischen Ionenfragmentierungen und der Retentionszeiten mit denen der Referenzsubstanzen weisen die Verbindungen als identisch aus. Beim Nachweis von Isopropylmethyltrisulfid wurde das Spektrum einer S-Verbindung, die in einer *Microcystis flos-aquae*-Klonkultur (isoliert aus dem Neusiedler See) nachgewiesen worden war, als Referenz herangezogen (Abb. 4 a). Bei dem Massenspektrum, aufgezeichnet vom Wasserblüten-Auftrieb des Neusiedler Sees, ist die Ionenfragmentierung von m/z 43 um ca 50 % überhöht. Der Anteil an Fremdfragmentionen infolge der geringen Substanzmenge ist deutlich zu erkennen. Bei Berücksichtigung aller Störfaktoren kann auch diese S-Verbindung als eindeutig identifiziert betrachtet werden.

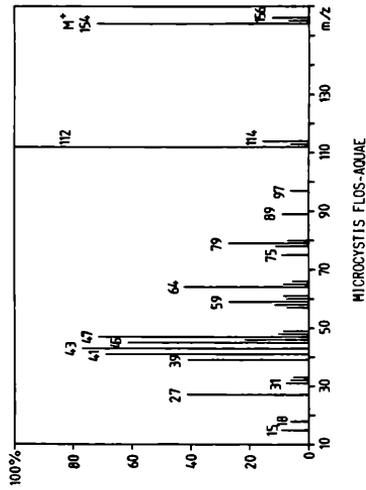
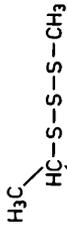
Abb. 4a und b
 Massenspektren der flüchtigen Schwefelsubstanzen aus den Auftriebsflocken der Wasser-
 blüte im Neusiedler See 1985.

a) Isopropylmethyltrisulfid (2,3,4-Triithia-5-hexan)

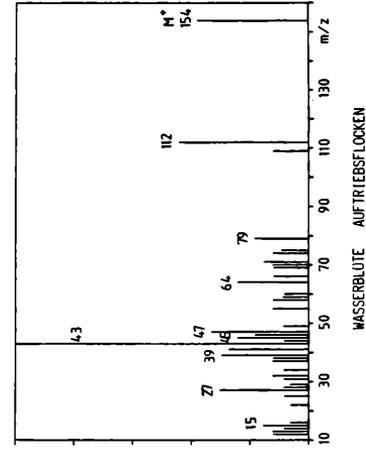
ISOPROPYLMETHYLTRISULFID



MG 154



MICROCYSTIS FLOS-AQUAE



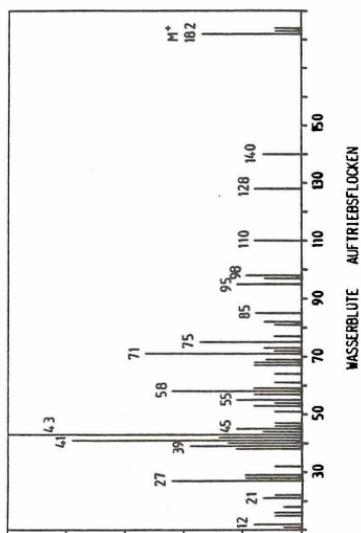
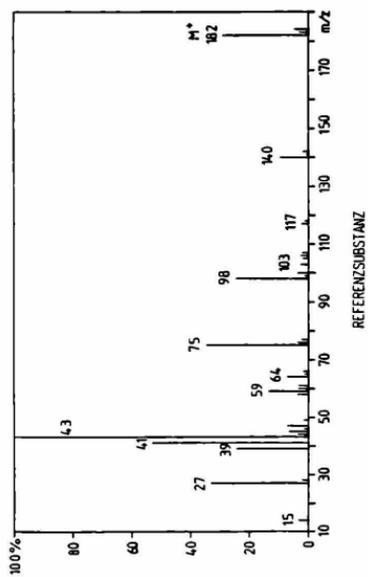
WASSERBLÜTE AUFTRIEBSFLOCKEN

b) Diisopropyltrisulfid (3,4,5-Trithia-2,6-dimethyleptan)

DIISOPROPYLTRISULFID

 $C_6H_{14}S_3$

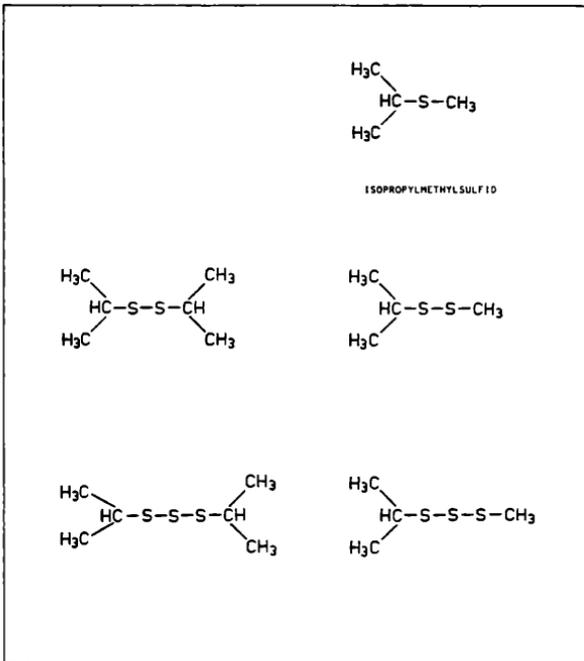
MG 182



Die Strukturformeln der in den Auftriebsflocken einer Wasserblüte im Neusiedler See und teilweise auch im Wasserblüten-Wasser identifizierten Schwefelsubstanzen sind in Abb. 5 dargestellt.

Abb. 5:

Strukturformeln der in Auftriebsflocken einer Wasserblüte im Neusiedler See identifizierten flüchtigen Schwefelverbindungen: Isopropylmethylsulfid, Diisopropyldisulfid (2,5-Dimethyl-3,4-dithiahexan), Diisopropyltrisulfid (3,4,5-Trithia-2,6-dimethylheptan), Isopropylmethyldisulfid (2,3-Dithia-4-methylpentan), Isopropylmethyltrisulfid (2,3,4-Trithia-5-hexan)



In den untersuchten Proben konnte *Microcystis flos-aquae* mit 70 % als dominierende Art festgestellt werden. *Botryococcus braunii*, eine coccale Grünalge, die durch Einlagerung von Öl zum Auftrieb befähigt ist, hatte einen Anteil von 12 %. *Microcystis aeruginosa* und *Microcystis wesenbergii* stellten den Rest der Biomasse mit je 9 %.

4. Diskussion

Von den im Neusiedler See identifizierten Schwefelverbindungen stellt Dimethyldisulfid die am häufigsten nachgewiesene biogene organische Schwefelkomponente dar. Ihr Vorkommen wurde in den verschiedenartigsten Biotopen und Organismengruppen beobachtet. Im limnischen Bereich wurde Dimethyldisulfid in Seen (JÜTTNER, 1981; NISIDA, 1982; GROB & GROB 1974), in Flüssen (NISIDA, 1982; WAGGOTT, 1981, STAUDENMAYER 1986), in anaeroben Sedimenten (JÜTTNER & SCHRÖDER, 1982; ZINDER & BROCK, 1978) und in Wasserblüten von *Anabaena sp.* (JÜTTNER, 1981; JENKINS et al. 1967) festgestellt.

Die Geruchsqualität von Dimethyldisulfid wird als schwefelig (JÜTTNER 1983), die von Dimethyltrisulfid als sumpfig-schwefelig (BURRWEY et al. 1976) beschrieben. Da die Geruchsschwellenwerte im Wasser relativ niedrig liegen, können erhebliche Beeinträchtigungen der Rohwasserqualität auftreten. Der Geruchsschwellenwert für Dimethyldisulfid wird je nach Autor mit 0,2, 1,2 oder 50 µg/kg (VAN GEMERT & NETTENBREIJER, 1977) angegeben. Dieser von Dimethyltrisulfid liegt nach WAJON (1985) bei 0,005-0,01 µg/kg oder in guter Übereinstimmung nach BUTTERY et al. (1976) bei 0,01 µg/kg.

Die weiteren beiden S-Verbindungen, bis-(Methylthio)-methan und Dibutylsulfid, die im Schilfkanal des Neusiedler Sees beobachtet wurden, sind bisher nicht für aquatische Ökosysteme beschrieben worden. Obwohl es vereinzelt Literatur über das Vorkommen in verschiedenen biologischen Materialien gibt, liegen keine speziellen Untersuchungen zur Biosynthese dieser flüchtigen organischen Schwefelsubstanzen vor.

Die im freien Seemitte-Wasser des Neusiedler Sees identifizierten Alkylsulfide mit Isopropylgruppen wurden in oxidiert oder reduzierter Form außer für *Microcystis*-Arten (JENKINS et al. 1969, JÜTNER 1984a) auch für Bakterien (DAINTY et al. 1984, FREEMAN et al. 1976) und in denaturiertem Pflanzenmaterial (GUMBANN & BURR 1964, QUIST 1976) nachgewiesen. Über die kaum bearbeiteten Isopropylthio-Verbindungen konnten keine Arbeiten über Toxizitäts- oder Biosyntheseuntersuchungen gefunden werden.

Die einzelnen *Microcystis*-Arten wurden aus dem Neusiedler See isoliert, und es gelang, axenische Klonkulturen heranzuziehen. Bei der anschließenden Geruchsstoffanalyse (GC und GC/MS) erwies sich *Microcystis flos-aquae* als einzige Art, die zur Bildung der isopropylhaltigen S-Verbindungen befähigt war. Nach physiologisch-biochemischen Untersuchungen an Isolaten aus dem Neusiedler See und dem aus Algotheken erhältlichen Material konnte mit axenischen Klonkulturen der eindeutige Beweis für den cyanobakteriellen Ursprung dieser Verbindungen erbracht werden. JENKINS et al. (1967) hat an bakterienhaltigen *Microcystis flos-aquae* Kulturen Isopropylthiol bestimmen können, doch war die Herkunft der Substanz ungewiß.

Der Unterschied in der Zusammenstezung der flüchtigen organischen Schwefelverbindungen in den Wasserproben des Neusiedler Sees von Seemitte und vom Schilfkanal ist offensichtlich. Dies zeigen auch die biologischen Untersuchungen verschiedener Biocoenosen und die chemisch-physikalischen Analysen. Das Phytoplankton des Schilfkanals wird von Seewasser-Populationen geprägt, während der Periphyton und das Benthos für den Schilfkanal charakteristische Artenzusammensetzungen zeigen.

Wie Sauerstoffmessungen seit 1959 (STEHLIK, 1959; SCHMID, 1968 und DOKULIL, 1971/72 in NEUHUBER & HAMMER, 1979; KUSEL-FETZMANN & SPATZIERER 1986; HOFBAUER, 1984) zeigen, beeinflussen mikrobielle O_2 -Zehrungsprozesse im Schlamm die Sauerstoffbedingungen vor allem in den Wasserschichten über dem Sediment des Schilfkanals. Die O_2 -Werte zeigten immer eine deutliche Untersättigung bis Anaerobie (0-7,1 mg O_2/l), während im freien Seewasser aufgrund der guten Durchmischung meist Werte um den Sättigungspunkt gemessen werden konnten (8,2-16,6 mg O_2/l)

Das massive Auftreten von *Beggiatoa* -Arten und anderen gleitenden Bakterien weist auch auf H_2S als Stoffwechselprodukt hin (PRINGSHEIM 1970), das jedoch nicht speziell nachgewiesen wurde. Nach KUSEL-FETZMANN (1979) kann H_2S nur von wenigen Arten toleriert werden.

Im Schilfkanal waren Methyl- und Butylthioverbindungen vorherrschend, während in Seemitte Thiole mit Isopropylgruppen auftraten. Tabelle 5 zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Standorte. Daneben werden auffallende Geruchscharakteristika angegeben.

Tab. 5:

Vergleich der Probenahmestellen in Seemitte und im Schilfkanal des Neusiedler Sees hinsichtlich der zum Entnahmezeitpunkt charakteristischen chemisch-physikalischen Parameter, Vertreter der Biocoenosen, Geruchsstoffe und Geruchsqualitäten. Im speziellen wurde die Wasserblüte vom 4.7.1985 berücksichtigt.

	Schilfkanal	Seemitte	Wasserblüte*
<u>physikalisch-chemische Parameter</u>			
Farbe	gelb-braun	graugrün	graugrün
Transparenz	klar	trüb	trüb
pH-Wert	8,0	9,0	8,8
O ₂ (mg/l)	3,7	9,3-9,7	10,0
(% Sättigung)	40	96-103	130
SST (mg/l)	8	27	54
NH ₄ -N (mg/l)	0,135	0,113	0,037
NO ₃ -N (mg/l)	0,087	0,089	n.n.
PO ₄ -P (mg/l)	0,100	0,020	0,048
<u>Biocoenosen (Abundanz)</u>			
<u>Wasser</u>			
<i>Microcystis flos-aquae</i>		ss	sh
<i>Microcystis aeruginosa</i>		ss	h
<i>Lobocystis dichotoma</i>	ss	sh	sh
<i>Sphaerocystis Schroeteri</i>	h	h	sh
<i>Pediastrum duplex</i>	ss	h	sh
<i>Oocystis lacustris</i>	s		h
"Haufengrünalge"	s	-	h
<i>Monoraphidium contortum</i>	sh	h	ss
Flagellaten	sh	-	-
<u>Auftriebsbildungen</u>			
	<u>Matten</u>	keine	<u>Flocken</u>
	(fädige Formen)		(coccale Formen)
	<i>Oscillatoria</i>		<i>Microcystis</i>
	<i>Beggiatoa</i>		<i>Botryococcus</i>
<u>Periphyton</u>			
(Aufwuchs, <i>Phragmites austr.</i>)	fädige Chlorophyceen		
	Diatomeen		
<u>identifizierte Thiole</u>			
(flüchtige organ. Schwefelverb.)	<u>Wasser</u>	<u>Matten</u>	<u>Aufwuchs</u>
	M ₂ S ₂	keine	keine
	M ₂ S ₃		I ₂ S ₂
	B ₂ S		I ₂ S ₃
	MSMSM		I ₂ S ₂
			I ₂ S ₃
			IMS ₂
			IMS ₃
<u>Geruchsqualität</u>			
	erdig-nodrig	fischig	keine
			schweflig-stechend

Abkürzungen: n.n. (nicht nachweisbar), SST (Schwebstoffgehalt), M₂S₂ (Dimethyldisulfid), M₂S₃ (Dimethyltrisulfid), B₂S (Dibutylsulfid), MSMSM (bis-(Methylthio)-methan), I₂S₂ (Diisopropyltrisulfid), I₂S₃ (Diisopropyltrisulfid), IMS₂ (Isopropyltrisulfid), IMS₃ (Isopropylmethyltrisulfid).

* Wasserprobe aus Seemitte, gezogen während einer Wasserblüte (Auftriebsbildung an der Wasseroberfläche, FOIT 1971)

Der Ursprung der Schwefelverbindungen im Schilfkanalwasser konnte nicht geklärt werden. In den Benthos- und Periphytonproben waren keine S-Substanzen nachzuweisen. Die im Schilfkanal-Wasser identifizierten flüchtigen Schwefelkomponenten können wohl kaum Stoffwechselprodukte der auch im Freiwasser auftretenden planktischen Organismen darstellen, da die Zusammensetzung der coccalen Chlorophyceen und Diatomeen weitgehend der des Sees entsprach (Tab. 3,5). Eine mikrobielle Entstehung in oder an der anaeroben Sedimentoberfläche kann als wahrscheinlich angenommen werden.

Da die Verbindungen zum Teil erstmals als natürlich vorkommende Substanzen für Oberflächengewässer identifiziert wurden, sind diese bisher auch weitgehend unbearbeitet. Eine Aussage bezüglich der Interaktionen in der Bio-coenose selbst oder der Toxizität gegenüber Wasserorganismen und dem Menschen kann daher für einige S-Verbindungen (Dibutylsulfid, bis-(Methylthio)-methan, Dimethyltrisulfid, alle Isopropylverbindungen) nicht getroffen werden. Bei den im Wasser freigesetzten Konzentrationen kann durchaus mit akuten toxischen Wirkungen, wie Übelkeit und Kopfschmerzen, gerechnet werden (Berichte aus der Bevölkerung und eigene Beobachtungen)

5. Ausblick

Die geringe Zahl der analysierten Proben läßt nur bedingt einen Aufschluß über die horizontale und vertikale Verteilung der flüchtigen organischen Schwefelverbindungen im Oberflächengewässer zu. Auch die Frage der jahreszeitlichen Dynamik wäre von großem Interesse, würde jedoch einen erheblichen Aufwand erfordern. Die vorliegende

Untersuchung zeigt, daß der Neusiedler See noch zusätzlich durch ein breites Spektrum nicht S-haltiger flüchtiger Verbindungen belastet ist. Eine vollständigere Untersuchung, die auch diese vorerst unbekannt bleibenden Verbindungen erfassen würde, wäre zwar technisch möglich, aber in der Aufwendung umfangreicher. Die toxikologische und ökologische Bewertung der bereits aufgefundenen Stoffe sollte in weiteren Untersuchungen mit axenischen Klonkulturen und im Freilandversuch bearbeitet werden. Cancerogene oder chronisch-toxikologische Eigenschaften, die für Methylthiol und Dimethyldisulfid belegt sind (TANSY et al. 1981, AHMED et al. 1984), können auch für die anderen identifizierten S-Verbindungen nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

Im Neusiedler See wurden der Schilfkanal und das freie Seewasser auf flüchtige organische Schwefelverbindungen untersucht. Im Wasser, das in Seemitte gezogen worden war, konnten Diisopropyldisulfid und Diisopropyltrisulfid identifiziert werden (Abb. 2) Die gleichen Verbindungen waren auch in den Auftriebsflocken, die sich aus *Microcystis flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* und *Botryococcus braunii* zusammensetzten, nachweisbar (Abb. 3,4) Die Annahme, daß diese *Microcystis* -Arten für die Bildung dieser Stoffe verantwortlich sind, wurde durch axenische *Microcystis* -Isolate aus dem Neusiedler See bestätigt.

Im Wasser des Schilfkanals fanden sich Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid, Dibutylsulfid und bis -(Methylthio)-methan (Abb. 1) Diese Substanzen konnten nur im Wasser, nicht aber im aufgesammelten Benthos (Tab. 2) oder Periphyton (Tab. 4) nachgewiesen werden.

Die meisten der identifizierten Schwefelverbindungen konnten erstmals für den aquatischen Bereich als biogene Verbindungen nachgewiesen werden.

Während der Wasserblüte konnte Nitrat-Stickstoff als limitierender Faktor bestätigt werden (Tab. 1)

SUMMARY

Evidence for Sulphurous Odour Compounds of microbial origin in Neusiedler See, Austria

Volatile organic sulphurous compounds from water of the Neusiedler See, Austria, were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry. The major sulphur compounds in the water obtained from the middle of the lake were di-isopropyl-disulfide and di-isopropyl-trisulfide. The same substances were also found in the cyanobacterial scums skimmed from the water surface. The dominant species were *Microcystis flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* and *Botryococcus braunii*. The assumption that the *Microcystis* species are responsible for the formation of these compounds was supported by axenic isolates of *Microcystis* species from Neusiedler See.

Different sulphur compounds which were determined as dimethyl-disulfide, dimethyl-trisulfide, dibutyl-sulfide, and bis- (methylthio)-methane were found in the water of a canal passing through the reed belt. These substances were present only in the water, and were not found in benthos or periphyton samples. Most of the identified sulphur compounds were described as microbial metabolites of aquatic ecosystems.

During the formation of water blooms, nitrogen could be confirmed as a limiting factor.

Literatur

- AHMED, K. et al. (1984): Effects of methanethiol on erythrocyte membrane stabilization and on sodium, potassium-adenosine triphosphate: Relevance to hepatic coma.- *J Pharmacol exp Ther* 228(1), 103-108.
- BUTTERY, R.G., et al. (1976): Additional Volatile Components of Cabbage, Broccoli and Cauliflower.- *J Agr Food Chem* 24, 829-832.
- DAINTRY, R.H. et al. (1984): Volatile compounds associated with the aerobic growth of some *Pseudomonas* species on beef.- *Journ appl Bact* 57(1), 75-81.
- DOKULIL, M. (1979): 10 Jahre Phytoplanktonstudien am Neusiedler See.- *Schriften des Vereins zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse in Wien - Bericht über das 117. u. 118. Vereinsjahr* 161-175.
- FOTT, B. (1971): *Algenkunde*.- Vlg. G. Fischer, Stuttgart.
- FREEMAN, L.R. et al. (1976): Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage.- *Appl. Environ. Microbiol.* 32(2), 222-231.
- GEMERT, L.J. van, NETTENBREIJER, A.H. (1977): *Compilation of odour threshold values in air and water*.- National Institute for Water Supply, Voorburg, Netherlands.
- GROB, K., GROB, G. (1974): Organic substances in potable water and its precursor. Part II. Application in the area of Zürich.- *J Chrom* 90, 303-313.
- GUMBANN, M.R. & BURR, H.K. (1964): Volatile sulfur compounds in potatoes.- *J Agr Food Chem* 12(5), 404-408.
- HOFBAUER, B. (1984): *Untersuchungen über die Ursachen von Blaualgenblüten (Cyanobakterien) im Neusiedler See*.- Arb.a.d.Bgld. Sonderband 72, 373-410.
- HOFBAUER, B., JÜTTNER, F. (1985): *Untersuchungen zur Autoökologie von Microcystis flos-aquae (Wittr.) Elenkin (Cyanobacterium)*.- Landesentwicklung und Landesforschung, Schr. d. Fachbereichs Landschaftsentwicklung der TU Berlin Nr. 40, 49-50.
- JENKINS, D., et al. (1967): Odorous compounds in natural waters. Some sulfur compounds associated with blue-green algae.- *Envir Sci Techn* 1, 731-735.

- JÜTTNER, F. (1981): Biologically active compounds released during algal blooms.- Verh.int.Ver.Limnol.21,227-230.
- (1983): Volatile odorous excretion products of algae and their occurrence in the natural aquatic environment.- Wat.Sci.Techn. 15,247-257.
- (1984a): Dynamics of the volatile organic substances associated with cyanobacteria and algae in a eutrophic shallow lake.- Appl.Environ.Microbiol.47 (4), 814-820.
- (1984b): Characterization on *Microcystis* strains by alkyl sulfides and β -cyclocitral.- Z f Nat Fo 39c, 867-871.
- (in Druck): Quantitative trace analysis of volatile organic compounds (VOC). Methods in Enzymol.
- JÜTTNER, F., SCHRÖDER, R. (1982): Microbially derived volatile organic compounds in the recent sediment of the *Phragmites australis* bed of the Bodensee (Lake Constance).- Arch Hydrobiol 94,172-181.
- JÜTTNER, F., WURSTER, K. (1979): Einfache Anordnung zur Adsorption von Geruchsstoffen aus Algen auf Tenax GC und deren Überführung in Gaschromatographie-Systeme.- J Chrom 175,178-182.
- KUSEL-FETZMANN, E. (1978): Änderungen in der Zusammensetzung der Algenflora im Neusiedler See.- BFB-Bericht 29, 33-37.
- The algal vegetation of Neusiedlersee.- Monogr Biol Vol.37, 171-201.
- KUSEL-FETZMANN, E., SPATZIERER, G. (1986): Untersuchungen über die Algenentwicklung in Schilfbrand-, Schilfschnitt- und Altschilfflächen am Neusiedler See.- Wasser und Abwasser 30, 261-291.
- LÖFFLER, H. (ed.) (1979): Neusiedlersee: The Limnology of a Shallow Lake in Central Europe.- Dr.W.Junk Publ. The Hague, Boston, London.
- NEUHUBER, F., HAMMER, L. (1979): Oxygen conditions.- Monogr Biol, Vol.37, 121-130.
- NISIDA, K. (1982): Measurement of total sulfur concentration in the water and silt of lake and river.- Kankyo Gijutsu 11(6), 410-422.
- PRINGSHEIM, E.G. (1970): Die Lebensbedingungen des farblosen Schwefelorganismus *Beggiatoa*.- Beitr.Biol.Pflanzen 46,323-336.

- QUIST, I.H. et al. (1976): Unconventional proteins as aroma precursor: instrumental and sensory analysis of the volatile compounds in a canned meat product containing soy or rapeseed protein.- LWT 9(5), 311-320.
- STAUDENMAYER, M. (1986): Gaschromatographisch-massenspektrometrische Spurenanalyse von flüchtigen organischen Stoffen in Zuflüssen des Bodensees.- Diplomarbeit, Tübingen.
- TANSY, M.F. et al. (1981): Acute and subchronic toxicity studies of rats exposed to vapors of methyl mercaptan and other reduced-sulfur compounds.- J. Toxikol. Environ. Health 8(1-2), 71-88.
- WAGGOT, A. (1981): Trace organic substances in the River Lee (Great Britain).- Chem. in Water Reuse 2, 55-99.
- WAJON, J.E. et al. (1985): Dimethyl trisulfide and objectionable odours in potable water.- Chemosphere 14(1), 85-89.
- WURZER, E. (1982): Seenreinhaltung in Österreich.- Schr. "Wasserwirtschaft" des BMLF, Wien, H. 6.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1987

Band/Volume: [1987](#)

Autor(en)/Author(s): Hofbauer B.

Artikel/Article: [Der Nachweis schwefelhaltiger mikrobieller Geruchsstoffe im Neusiedler See, Österreich 381-411](#)