

# VEREIN FÜR BEWEGUNGSFORSCHUNG e.V. INSTITUT FÜR STRÖMUNGSWISSENSCHAFTEN

HERRISCHRIED IM SÜDSCHWARZWALD

## Beschreibung der Methode der Algenuntersuchung

Algen werden heute in der Toxikologie zum Nachweis qualitativer, meist toxischer Wirkungen, z. T. auch in der Trinkwasserwirtschaft als Indikatoren für die Wasserqualität verwendet. Als Ergänzung zu chemisch-analytischen Testverfahren zeigen lebende Organismen ein Gesamtbild der Wirkung einer Wasserprobe. Im Institut für Strömungswissenschaften werden mit Algen Wasseruntersuchungen durchgeführt, die an Normen angelehnt und erweitert wurden. So werden neben den herkömmlichen Wachstumsparametern auch die Veränderungen der Morphologie sowie des Vermehrungszyklus zur Beurteilung herangezogen, wodurch auch schwache Beeinflussungen der Wasserqualität aufgezeigt werden können.

## Versuchsbedingungen

Kulturbedingungen und Kulturmedium folgen den Vorgaben der EU-Direktive 92/69/EEC C.3 (entsprechend EPA 712-C-006 bzw. OECD 201) mit den beschriebenen Änderungen. Als Versuchsorganismus wird *Pediastrum duplex* (*P. duplex*) der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen, SAG Nr. 28.83, verwendet. Zur Kultur werden je Wasserprobe und Behandlungsgerät 3 Parallelkulturen mit 30 ml Probelösung angesetzt unter Zusatz der in der EU-Direktive angegebenen Mineralsalze. Für die Kontrolle wird hierbei gemäß EU-Direktive A. dest. als Probelösung verwendet. Die Lösungen und Geräte sind steril, die Probelösungen bleiben jedoch unbehandelt, werden also nicht sterilisiert. Alle weiteren Arbeiten erfolgen jeweils unter sterilen Bedingungen. Die Übersicht über die Kulturbedingungen zeigt Tab. I.

Beleuchtung	6 Philips TL-D 58W-865-Röhren mit einer Farbtemperatur von 6500 K Hell- / Dunkelrhythmus von 16 / 8 h
Beleuchtungsstärke	$143 \pm 4,4 \mu\text{E} / \text{m}^2 \text{ s}$ , entsprechend etwa 8000 lx
Bestimmung des Wachstums	photometrisch bei 446 nm
Vorkultur	mehrwöchig bei Kontrolle der Zellmorphologie
Zellichte bei Versuchsbeginn	$\text{OD}_{446} \approx 0,005$ entsprechend etwa $5 \cdot 10^5$ Zoenobien / ml
Temperatur	$25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$
Weiteres	leichte Bewegung bei 110 U/min im Wasserbad eines Aquatron der Firma Infors, Bottmingen, Schweiz

Tab. I: Versuchsparameter unter Standardbedingungen

Wachstum und pH-Wert werden innerhalb des Versuchszeitraums jeweils mindestens täglich kontrolliert. Zusätzlich wird zum Versuchsbeginn und bei der Entnahme der Zellen zur morphologischen Auswertung der Sauerstoffgehalt der Kulturen gemessen.

Zur morphologischen Auswertung werden aus drei Parallelkulturen jeweils Zellsuspensionen von 1 ml Lösung entnommen, eine angemessene Menge wird mikroskopiert und hieraus mindestens etwa 100 Algenzellen / -zoenobien fotografiert, bei sich nicht vermehrenden Kulturen etwa 60 Algenzellen / -zönobien. Anhand der Bilder erfolgt die Bestimmung der Zellzahl und Größe der Zönobien und die Zuordnung des entsprechenden Morphotyps.

## Morphologische Gruppen = Morphotypen

Arttypische Gestalt

Die Algenart *P. duplex* bildet in der Regel eine differenzierte Zellgestalt aus. Hierbei sind gewöhnlich 8, 16 oder 32 Zellen zu einer Zellkolonie oder einem Zellzusammenschluß verbunden, auch **Zoenobium** genannt (siehe Abb. I oben links). Dieses bildet einen flachen Diskus, welcher im Wasser das Absinken verzögert. Die Einzelzelle ist je nach Position innerhalb der Zellkolonie arttypisch differenziert. Am Rande der Kolonie gelegene, differenziert gestaltete Zellen sind durch zwei nach außen gerichteten Zellfortsätzen

gekennzeichnet. Diese bilden zueinander üblicherweise einen Winkel  $\leq 45^\circ$ . Zwischen den Zellen einer Kolonie bestehen in der Regel charakteristische Zwischenräume. Da die äußere Zellwand der Zellen aus extern aufgelagerten Zellulosefasern gebildet wird, erfolgt eine Veränderung der morphologischen Gestalt nach der Reifephase in der Regel nicht.

In den Abbildungen I bis III wie auch zum Teil an anderer Stelle werden folgende Abkürzungen verwendet:

Ko	Kontrollprobe (= Anzucht unter Standardbedingungen mit A. dest.),
QW	Quellwasser,
n = ....	Anzahl der Untersuchungen,
NF	Normalform,
QF	Quellform,
QFm	Quellform mit Zwischenräumen zwischen den Zellen,
QFo	Quellform ohne Zwischenräume zwischen den Zellen,
KF	starke Quellform (=morphologisch einem Kissen ähnlich),
KFm	starke Quellform mit Zwischenräumen zwischen den Zellen,
KFo	starke Quellform ohne Zwischenräume zwischen den Zellen,
Nfb	Normalform, jedoch mit reduzierten Pigmentanteilen (farblos),
LH	Zellhülle, ohne Zellen ,
LHm	Zellhülle, darin noch wenige, sich teilende Zellen ,
zk / Dis	disharmonische Zellen oder Zoenobien
EZ	Einzelzellen bzw. Zoenobien im Zwei- oder Vierzellstadium,
VS	Vermehrungsstadien.

#### Vermehrung und Zellformen (Morphotypen)

*P. duplex* vermehrt sich in der Regel vegetativ durch Zellteilungen. Hierbei führen die einzelnen Zellen eines Zoenobiums unabhängig voneinander innerhalb der Mutterzelle Teilungen durch bis die spätere Zellzahl eines Zoenobiums erreicht ist. Während dieses Prozesses wird durch ausgeschiedene Enzyme die äußere Zellwand teilweise aufgelöst. Dies bewirkt eine leichte bis starke Quellung der Zelle mit zunehmendem Verlust der arttypischen Zellform.

Dieses Stadium wird als Quellform (=QF mit einem Winkel zwischen den beiden Zellfortsätzen  $> 45^\circ \leq 90^\circ$ ) bzw. starke Quellform (=KF, Kissenform infolge der Zellgestalt mit einem Winkel zwischen den beiden Zellfortsätzen  $> 90^\circ$ ) bezeichnet. Die Quellung der Mutterzelle während der Teilungsvorgänge kann auch stärker sein, so dass die Zellzwischenräume verschwinden und zwischen den Formen mit Zellzwischenräumen (QFm, KFm) sowie ohne Zellzwischenräumen (QFo, KFo) unterschieden werden kann. Im weiteren Vermehrungsablauf lösen die Zellen (hier Zoosporen) die Zellwand auf, schlüpfen aus und bilden ein neues Zoenobium, welches zunächst noch kleiner ist, aber morphologisch schon der Mutterform ähnelt. Innerhalb kurzer Zeit wächst das Tochterzoenobium zur reifen Normalform (NF) heran. Abbildung I zeigt eine Übersicht über einige der entstehenden Formen.

Neben dieser Art der Vermehrung kann *P. duplex* sich auch sexuell, generativ vermehren. Hierbei bilden sich eine Vielzahl von beweglichen Zoosporen aus, welche als Einzelzellen ebenfalls ausschlüpfen und Befruchtungsvorgänge durchlaufen. Nach der Befruchtung bildet sich eine kantige Zellform aus, als Polyeder bezeichnet. Diese durchläuft eine Reifephase um zur üblichen Normalform (NF) zu gelangen.<sup>1</sup>

#### Darstellungen der Morphotypen

Innerhalb der Untersuchung werden verschiedene Darstellungen verwendet, um die zahlenmäßige Verteilung der verschiedenen Formen abzubilden. In der Regel werden infolge der besseren Übersicht die anteilmäßig vorherrschenden Formen ausgewählt. Ein Beispiel einer solchen Darstellung der durchschnittlichen zahlenmäßigen Verteilung der ausgewerteten Formen innerhalb des Projektzeitraumes für die Standardbedingungen (Kontrolle = Ko) bzw. das unbehandelte Quellwasser (QW) zeigt Abb. II.

---

<sup>1</sup> Rojo et. al. ( 2009)

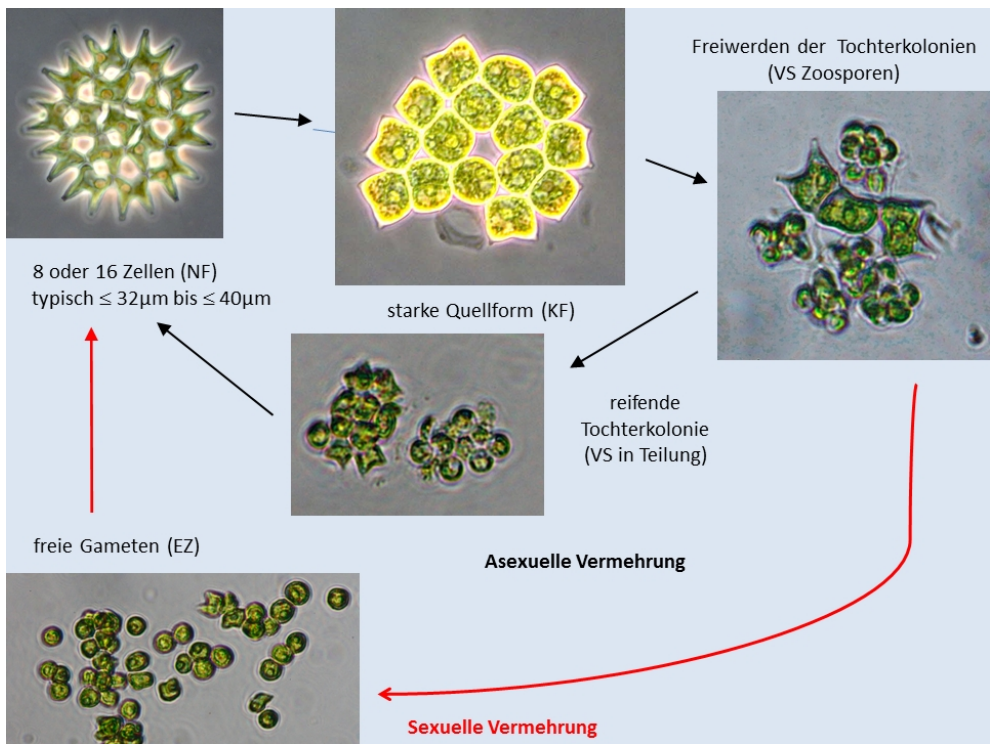


Abb. I: Typische, bei den Vermehrungsvorgängen auftretende Morphotypen von *P. duplex*

Anteile der morphologischen Gruppen

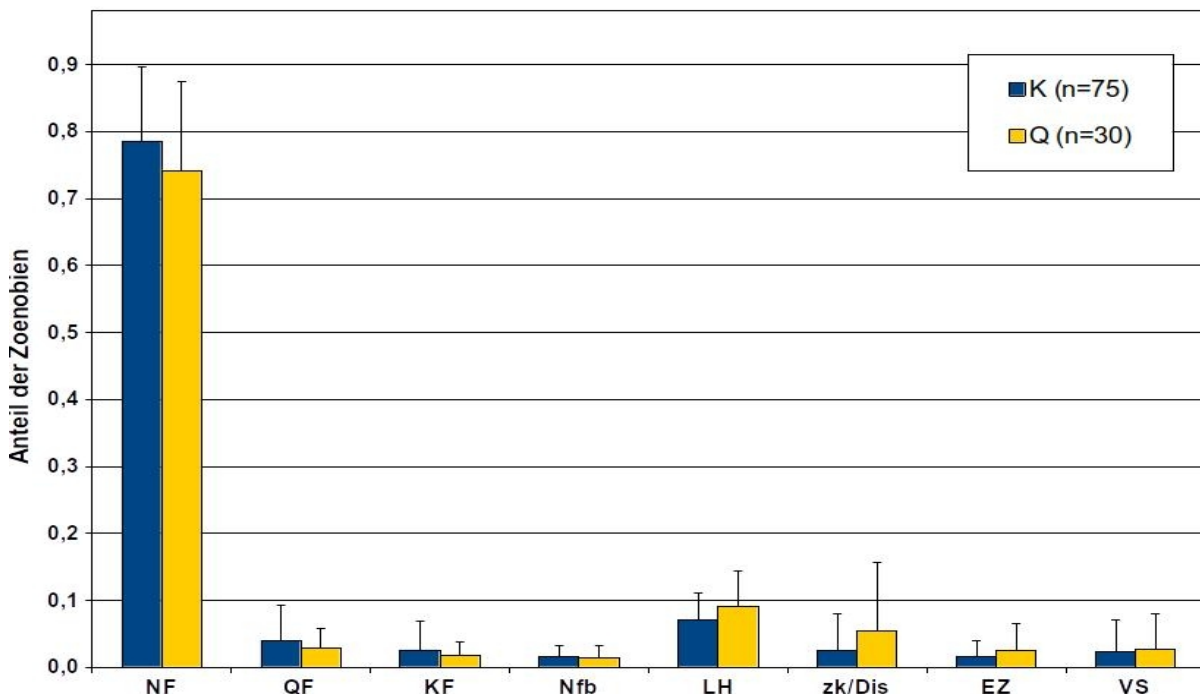


Abb. II: Durchschnittliche Anteile der morphologischen Gruppen von *P. duplex* nach ~ 24 h in Kontrollmedium (Ko) bzw. Wasser der Stutzhofquelle (QW) (jeweils Mittelwert mit Standardabweichung, Erläuterung siehe Text)

Dargestellt sind in Abb. II von links nach rechts die üblicherweise zahlenmäßig vorherrschende arttypische Normalform (NF), die beiden Quellformen (QF, KF) sowie ein Stadium mit einem Aussehen entsprechend der Normalform, aber meist deutlich kleiner und farblos (Normalform farblos Nfb). Bei verschiedenen Wässern oder Vergiftungen nehmen die im Medium gefundenen Zellen deutlich ab, dafür finden sich die Zellhüllen (LH), welche deshalb ebenfalls mitgezählt werden. Es folgt eine Spalte, welche morphologisch disharmonische oder geschädigte Zellen auflistet (zk/Dis) sowie Spalte EZ, in der die meist runden Einzel-

Zweier- oder Viererverbände aufgeführt sind. Daneben treten noch Zoenobien auf, welche gerade das Stadium der Zoosporenbildung durchlaufen oder nach vollzogener Fortpflanzung zur reifen Kolonie heranwachsen (VS = Bildung der Vermehrungsstadien).

Für die weitere Auswertung werden die gefundenen Formen weiter nach der Zahl der Zellen je Kolonie (4, 8, 16 oder 32) sowie der Koloniegröße differenziert. Ein Beispiel für die bei der Auswertung verwendete Darstellung zeigt Abb. III mit den durchschnittlichen Werten für die Kontrolle innerhalb des Zeitraums eines Projektes. Dargestellt sind auf der x-Achse die verschiedenen Morphotypen, auf der y-Achse die Zellzahlen je Kolonie mit den jeweiligen Größen sowie auf der z-Achse der Anteil der jeweiligen morphologischen Form an der Grundgesamtheit = 1. Die beiden rechten Spalten der x-Achse listen bei Spalte EZ, vorne beginnend, zunächst die Anteile der Einzelzellen, dann die zusammenhängenden Zweier- bzw. Vierzellen auf, welche noch nicht den reifen Formen (NF, QF, KF) zuzuordnen sind. Die rechte Spalte VS zeigt von vorne nach hinten die Anteile der nach der Teilung heranreifenden Zoenobien mit 8 bzw. 16 Zellen sowie im weiteren Verlauf die Anteile der Zoenobien, welche gerade das Stadium der Freisetzung der Zoosporen durchlaufen, beginnend beim 8-, 16- bzw. 32-zelligen Zoenobium (siehe Abb. III).

Bei Vermehrung der Algen unter Standardbedingungen liegt ein Großteil der Zoenobien in arttypischer morphologischer Gestalt vor. Unter den hier verwendeten Bedingungen ist dies ein Zoenobium aus acht Zellen mit einem Durchmesser  $22 \leq 32 \mu\text{m}$  (mehr als 50 % der Zellen). Daneben treten etwas größere Zusammenschlüsse ( $> 32 \leq 40 \mu\text{m}$ , etwa 10%) auf sowie zu einem kleineren Anteil 4er und 16er Zoenobien verschiedener Größen.

Kontrolle, ~ 24 h

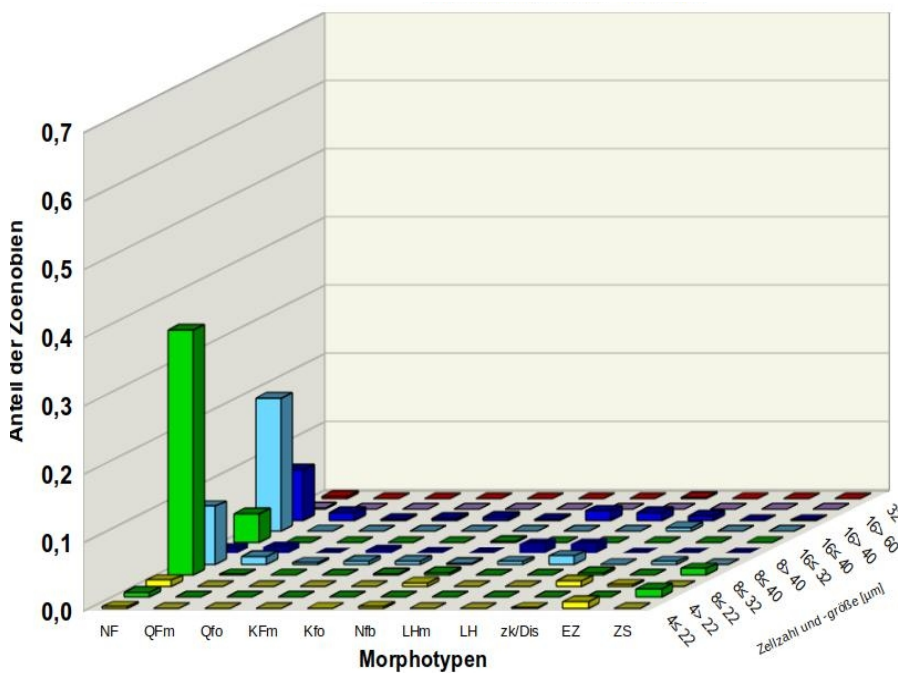
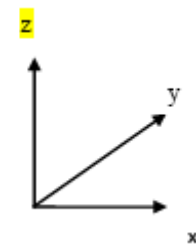


Abb. III: Verteilung der Anteile der Morphotypen von im Kontrollmedium etwa 24 h gewachsenen Algen (n=75), aufgeteilt nach Gruppen (x-Achse), Zellzahl je Zoenobium und deren Größe (y-Achse) (nähere Erläuterung siehe Text)



### Zeitlicher Ablauf eines Versuchs

Jeder Versuch ist zeitlich begrenzt, da das Wachstumsmedium durch Nährstoffentzug und Abgabe von Stoffwechselprodukten so verändert wird, dass schließlich keine kontrollierten Wachstumsbedingungen mehr bestehen. Entsprechend der Norm ist diese Zeit auf 3 Tage festgelegt. Dies entspricht bei einer Teilungsdauer von etwa 25 Stunden drei Vermehrungsschritten oder Verdopplungen. Die Bestimmung der Verteilung und des Anteils der Morphotypen innerhalb der Kulturen wird jeweils nach etwa einer bzw. drei Verdopplungen (angegeben als 24h bzw. 72h) durchgeführt. Innerhalb der Versuchsserien bestanden keine Hinweise auf eine Synchronisation des Teilungsverhaltens durch den Hell- / Dunkelrhythmus.

Darstellungen mit Ergebnissen dieser Methode finden sich in u. a. in Liess *et al.* (2012, 2016 und 2017) sowie Schleyer *et al.* (2011a und b)

## Literatur

- European Community Directive 92/69/EEC C.3. (o. J. 383 A): Algal Inhibition Test.
- EPA 712-C-006 (2012): Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4500: Algal Toxicity, Washington, USA
- Gupta, S., S. Agrawal (2007): Survival and reproduction in some algae under stress. *Folia Microbiol.* **52**: p. 603.
- Liess, C., C. Sutter, M. Schleyer (2012): Untersuchung von Methoden der Wasserbehandlung zur Qualitätsverbesserung, so genannte "Vitalisierung", "Energetisierung" oder „Belebung“. Projektbericht, Herrischried
- Liess, C., C. Sutter, P. Stolz, M. Schleyer (2016): Entwicklung von Verfahren zur Qualitätsverbesserung von gefilterten bzw. gereinigten Trinkwässern: Teil 1: Filterung und Reinigung. Projektbericht, Herrischried
- Liess, C., C. Sutter, P. Stolz, M. Schleyer (2017): Entwicklung von Verfahren zur Qualitätsverbesserung von gereinigten Trinkwässern: Teil 2: Verbesserung der lebensfördernden Eigenschaften. Projektbericht, Herrischried
- OECD (2011): Organisation for Economic Cooperation and Development: Algal growth inhibition test. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 201, adopted 23. 3. 2006, Annex 5 corrected: 28 July 2011. Paris, France.
- Rojo, C., M. Segura, M. A. Rodrigo, G. Salazar ( 2009): Factors controlling the colonial structure of *Pediastrum tetras* (Chlorophyceae). *Hydrobiologia* **617**, p. 143-155.
- Schleyer, M., Ch. Sutter-Picariello, P. Stolz, D. Schmidt (2011a): Untersuchung zur Auswirkung der Verpackung auf qualitative Eigenschaften von Mineralwasser. Untersuchungsbericht, Herrischried.
- Schleyer, M., Ch. Sutter-Picariello, P. Stolz, D. Schmidt (2011b): Qualität von Mineralwasser. Glas oder PET-Flaschen – ein Qualitätsvergleich mit drei Methoden. *DIE FÜR! ZEITUNG*, S. 4.