

# ***Biomonitoring in der Gewässerüberwachung***

Herausgegeben von  
H.-J. Pluta, J. Knie und R. Leschber



Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · Jena · New York · 1994

Schriftenreihe des Vereins für  
Wasser-, Boden- und Lufthygiene

---

**93**

Herausgegeben von **R. Leschber und E. Lahmann**

## **VEREIN FÜR WASSER-, BODEN- UND LUFTHYGIENE E.V.**

Der 1902 gegründete gemeinnützige Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene e.V. fördert das gleichnamige Institut.

Er tritt mit wissenschaftlichen Veranstaltungen auf den einschlägigen Gebieten der Umwelthygiene und der Gesundheitstechnik an die Öffentlichkeit.

Er gibt für seine Mitglieder die Schriftenreihe und die Literaturberichte über Wasser, Abwasser, Luft und feste Abfallstoffe heraus. Sie werden auch über den Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, vertrieben.

### **Geschäftsführender Vorstand:**

Oberstadtdirektor Dr. Klaus Bussfeld, Gelsenkirchen  
Dr. Fritz Bergmann, Essen  
Direktor Dr.-Ing. Heinz Tessendorff, Berlin

### **Geschäftsführung:**

Dipl.-Ing. Heiner Nobis-Wicherding,  
Postfach 31 14 20, 10644 Berlin

***Biomonitoring***  
***in der Gewässerüberwachung***

Herausgegeben von  
H.-J. Pluta, J. Knie und R. Leschber



Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · Jena · New York · 1994

Alle Rechte der Übersetzung vorbehalten

© Copyright 1994 by Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene,  
Berlin-Wilmersdorf

Printed in Germany

ISBN 3-437-30786-X

Herstellung:

Regina-Druck / Gloria-Verlag, Hanshelmut Glökler, Inh.: Michael Knüppelholtz,  
Oranienburger Str. 170/172, 113437 Berlin, Tel.: 030 / 403 12 34

## Inhaltsverzeichnis

Seite

Vorwort .....	
P. Schmitz, U. Irmer, F. Krebs Automatische Biotestverfahren in der Gewässerüberwachung .....	1
P. Schmitz, U. Irmer, F. Krebs Vergleichende Erprobung und Beurteilung von automatischen Biotestverfahren für den Einsatz in Meßstationen .....	19
H. Puzicha Erprobung von on-line betriebenen Biotestsystemen für die Gewässerüberwachung und Ergebnisse aus Untersuchungen mit teilgeklärtem industriellem Abwasser .....	41
J. Knie Immissionsüberwachung von Rhein und Elbe mit dem Dynamischen Daphnientest .....	59
P. Stein, P.-D. Hansen, H.J. Löbbel Erprobung des WRC-Fischmonitors zur Störfallüberwachung .....	75
E. Blübaum-Gronau, M. Hoffmann O.H. Spieser, F. Krebs Der Koblenzer Verhaltensfischtest, ein auf dem Meßsystem "BehavioQuant" beruhender Biomonitor zur Gewässerüberwachung .....	87
J. Borcherding, M. Volpers Der "Dreissena-Monitor" - Erfahrungen mit dem neuen biologischen Frühwarnsystem .....	119
M. Hoffman, E. Blübaum-Gronau, F. Krebs Die Schalenbewegung von Muscheln als Indikator von Schadstoffen in der Gewässerüberwachung .....	125
R. Gerresheim Der automatisierte Algatest nach DIN 38412 L33 .....	151
U. Noack, J. Walter Das BIOSENS-Algentoximeter in der Gewässerüberwachung .....	155

C. Moldaenke, U. P. Hansen Das 1-Hz-Fluorometer .....	175
V. Gerhardt, J. Putzger DF-Algentest: Ein Biotest zur Gewässerüberwachung auf der Grundlage der verzögerten Fluoreszenz von einzelligen Algen .....	185
J. Putzger, V. Gerhardt Regensburger Leuchtbakterientest - Erweiterung des DF-Algentests zum on-line-Monitor mit Bacterium Phosphoreum .....	205
C. Merschhemke Automatische Biotestsysteme zur kontinuierlichen Rheinüberwachung: Biolum, ein kontinuierlicher Leuchtbakterientest, und FluOx, ein Algentestautomat .....	215
U. Pilz Monitoring akuter Toxizität mit Bakterien, Grünalgen oder Belebtschlamm .....	227
P.-D. Hansen, P. Stein Biosensoren im Umweltmonitoring am Beispiel der EuCyano-Bakterienelektrode .....	237
H. Fritz-Langen, B. Blessing, F. Krebs Bakterientoximeter mit Reinkulturen ( <i>Photobacterium</i> <i>phosphoreum</i> und <i>Pseudomonas putida</i> ) in der Gewässerüberwachung .....	249
B. Blessing, H. Fritz-Langen, F. Krebs Bakterientoximeter mit Aufwuchsorganismen in der Gewässerüberwachung .....	275
S. Overmeyer, E. Hostert, S.E. Lindner, H. Schnabl, L. Peichl Der Protoplastenbiotest - ein Wirkungstest zur summarischen Schadstofferfassung in der Umwelt .....	291
H.-J. Schwarz Elektrophysiologisches Monitoring der Schadstoffwirkung über die Epithelphysiologie von Wassertieren mittels einer speziellen Ionen-Transportkammer .....	299
Autorenverzeichnis .....	315

## **Vorwort**

Vom 10. bis 14. Mai 1993 fand in Berlin die bisher weltweit größte Ausstellung von Biomonitoren statt. Die Veranstaltung wurde vom Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes in Zusammenarbeit mit dem Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT), dem Umweltbundesamt (UBA) und der Technischen Universität Berlin im Rahmen des 6. Internationalen Symposiums "Toxicity Assessment and on-line Monitoring" durchgeführt.

In einer zweitägigen Vortragsveranstaltung am 13. und 14. Mai 1993 zum Thema "Biomonitor zur kontinuierlichen Überwachung von Wasser und Abwasser" wurden ausgewählte Biomonitoringsysteme vorgestellt und Möglichkeiten und Grenzen ihrer Anwendung diskutiert. Der vorliegende Berichtsband faßt diese Beiträge zusammen. Sie geben einen Überblick über den aktuellen Stand der Biomonitor-Entwicklung und bieten Fachleuten von Behörden, Industrie und Forschungseinrichtungen Möglichkeiten und Anregungen zur Lösung umweltanalytischer Probleme.

Die Herausgeber danken allen, die zur Erstellung dieses Bandes beigetragen haben, vor allem dem Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene e.V., der den Druck ermöglicht hat. Besonderer Dank gilt Frau Sabine Rabau, die als Redaktionsassistentin für das Layout zuständig war.

**Die Herausgeber**



# Automatische Biotestverfahren in der Gewässerüberwachung

Patricia Schmitz, Ulrich Irmer und Falk Krebs

## Zusammenfassung

Schadstoffwellen in Fließgewässern können bei kontinuierlicher biologischer Überwachung zeitnah erfaßt werden. Im Rahmen des BMFT/UBA - Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" wurden insgesamt 22 automatische Biomonitoring entwickelt und/oder erprobt. Zur Beurteilung der Meßdaten und zur Festlegung von Alarmschwellen wurde ein auf die meisten Testverfahren anwendbares statistisches Verfahren erarbeitet. Zur Kennzeichnung der Sensitivität dienen Schwellen- oder LOEC-Werte, die in Aufstockungsexperimenten mit ausgewählten Referenzchemikalien ermittelt werden. Aufgrund der während der Erprobungsphase gewonnenen positiven Ergebnisse wird der Einsatz kontinuierlicher Biotestverfahren für Überwachungsaufgaben empfohlen.

## Summary

Waves of contaminants in flowing waters can be detected in near real-time mode by biological on-line monitoring.

Under a joint research project of the Federal Ministry of Research and Technology (BMFT) and the Federal Environmental Agency (UBA) titled "Developing, testing and implementing biotest systems for monitoring the River Rhine", a total of 22 automatic biomonitoring have been developed and tested. A statistical procedure that is applicable to most of the bioassays has been developed to evaluate the measured data and to define thresholds for pollution alarm. The sensitivity of the tests is expressed in terms of thresholds or LOEC (lowest observed effect concentration) levels which had been determined in experiments with different concentrations of selected reference chemicals in natural surface waters.

Because of the positive results obtained during the trial phase, automatic bioassay systems are recommended for monitoring water quality.

## Einleitung

Industrielle Betriebsstörungen und Störfälle führen zeitweise zu einer deutlichen Erhöhung der Grundbelastung des betroffenen Gewässers. Im Spätherbst 1986 ereignete sich im Chemiewerk Sandoz in Basel der bislang schwerwiegendste Störfall am Rhein. In Folge eines Lagerhausbrandes gelangten mit dem Löschwasser 10 - 30 t biozide Wirkstoffe in den Vorfluter. Die Folgen des Sandoz-Störfalls waren für die Trinkwasserversorgung und die aquatische Lebensgemeinschaft im Rhein gravierend. An akuten Wirkungen waren zu verzeichnen: erhebliche Minderung des Aalbestandes bis zur Loreley, Bestandsminderungen bei Zander, Hecht und Äschen in Baden-Württemberg und Schädigung des Makrozoobenthos bis zur Mosel [1].

Dieser Unfall zeigte, wie notwendig eine kontinuierliche Gewässerüberwachung mit biologischen Testverfahren ist. Von den kontinuierlich arbeitenden Biomonitoren konnte der dynamische Daphnientest seine Eignung zur Störfallkontrolle unter Beweis stellen. Beim Durchlaufen der Schadstoffwelle in Bad Honnef stimmten die Ergebnisse des dynamischen Daphnientests (Meßkriterium Schwimmaktivität) sehr gut mit denen des statischen Daphnientests (Meßkriterium Schwimmfähigkeit) überein. Der Test zeigte aber auch bereits vor und nach dem Durchlaufen der Sandoz-Schadstoffwelle schadstoffbedingte Beeinträchtigungen des Schwimmverhaltens an [2]. Diese waren ein Indiz für weitere, aus unbekannten Belastungsquellen stammenden Schadstoffeintrittungen zur Zeit des Sandoz-Störfalls.

Vor dem Hintergrund des Sandoz-Unfalls wurde von der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" ein "Rahmenkonzept für Forschungsvorhaben zur Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" erstellt [3]. Auf der Grundlage dieses Konzeptes wurden von 1989 bis 1993 in einem BMFT/UBA-Verbundforschungsvorhaben kontinuierliche Biotestverfahren entwickelt und erprobt. Die Arbeiten sollten dazu beitragen, die wissenschaftlichen und technischen Grundlagen für eine verbesserte biologische Gewässerüberwachung zu liefern [4,5].

Im Folgenden werden die im Forschungsvorhaben entwickelten und erprobten kontinuierlichen Biotestverfahren vorgestellt. Darüber hinaus wird eine von der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" erarbeitete Methode zur Datenauswertung beschrieben.

### **Einsatz biologischer Testverfahren**

Biotestverfahren werden seit mehreren Jahrzehnten in verschiedenen Bereichen der Gewässerüberwachung eingesetzt. Es handelt sich hierbei um Testmethoden, die die Wirkung biologisch schädlicher oder auch fördernder Stoffe auf ausgewählte Testorganismen prüfen [6,7]. Bei statischen Biotestverfahren wird die Wirkung des Testgutes auf die eingesetzten Testorganismen nach einer vorgegebenen Zeit (z.B. 24 h oder 48 h) ermittelt. Die Bezeichnung statisch besagt, daß das Testwasser während der Testdauer nicht erneuert wird. Statische Biotests mit aquatischen Organismen spielen in der Bundesrepublik Deutschland einerseits bei der Zulassung von Stoffen nach dem Chemikaliengesetz (ChemG) und dem Pflanzenschutzgesetz (PflSchG), andererseits beim Vollzug des Wasserhaushaltsgesetzes (§§ 7 a und 19 g WHG) und des Abwasserabgabengesetzes (AbwAG) eine bedeutende Rolle.

In der Gewässerüberwachung werden neben statischen Biotestverfahren vereinzelt auch Testverfahren mit kontinuierlichem Testwasserdurchfluß eingesetzt. Diese Verfahren werden in der Literatur als kontinuierliche oder dynamische Tests, Durchflußtests, Biotestautomaten, Biomonitor oder auch als biologische Frühwarnsysteme (biological early warning systems) bezeichnet [8, 9]. Die Bezeichnungen Biomonitor und Biologische Frühwarnsysteme charakterisieren ihre Funktion als Überwachungs- und Warnsysteme zur Identifikation summarischer Schadstoffwirkungen.

Für eine zeitlich lückenlose Gewässerüberwachung eignen sich generell nur kontinuierlich messende Biotestverfahren. Einen Überblick über diese Biotestverfahren und ihre Anwendungsmöglichkeiten geben [9, 10, 11]. Im Folgenden werden die kontinuierlichen Biotestverfahren beschrieben, die im Rahmen des Forschungsvorhabens "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" entwickelt und/oder hinsichtlich ihrer Eignung zur Rheinüberwachung erprobt worden sind [12-20]. Mit allen Testsystemen werden im automatischen Betrieb Änderungen von physiologischen oder Verhaltensparametern zur Detektion subletaler Effekte gemessen (Tab. 1).

Zu den kontinuierlich, also mit permanentem Wasseraustausch arbeitenden Geräten gehören einige Bakterientests, der Dynamische Daphnientest sowie generell die Fisch- und Muscheltests. Die übrigen Geräte arbeiten semikontinuierlich, d.h. während einer festgelegten Einwirkzeit (Kontaktzeit, maximal 30 Minuten) wird jeglicher Zufluß zur Meßzelle gestoppt. Nach der Messung wird neues, aktuelles Testwasser in die Meßzelle gepumpt und der Meßzyklus erneut gestartet.

Um die unterschiedlichsten Wirkungsspezifitäten von möglichst vielen Schadstoffen erfassen zu können, bedarf es mehrerer Testverfahren mit Organismen verschiedener Trophieebenen (Produzenten, Primär- und Sekundärkonsumenten sowie Destruenten).

### Bakterientests

Bakterientests spielen insbesondere bei der Abwasserüberwachung eine wichtige Rolle. Eine große Zahl der kontinuierlich arbeitenden Bakterientests nutzt die bakterielle Atmungsintensität als Meßkriterium. Das luftgesättigte Testwasser durchströmt eine Meßzelle oder einen Bioreaktor, wobei die Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Aktivität der Testorganismen abnimmt. Als Maß für die Atmungsaktivität der Bakterien wird der Restsauerstoffgehalt im Testwasser bestimmt.

Bakterientoximeter mit Aufwuchsorganismen werden seit über 20 Jahren in biologischen Kläranlagen als Warnsysteme eingesetzt, da sie toxische Abwässerströme zu detektieren vermögen [51,52]. Im Rahmen dieser Forschungsmaßnahme wurde versucht, sie in modifizierter Form zur Vorfluterüberwachung einzusetzen. Bei dem Testautomat "Toxiguard" wird Flußwasser durch einen Bioreaktor geleitet. Hierbei bildet sich ein Aufwuchs mit den im Flußwasser vorkommenden Mikroorganismen. Ein vom Testprinzip her identisches Gerät ist das "Biox 1000T". Bei anderen Bakterientestgeräten wird die Atmungsaktivität von Reinkulturen gemessen [53-55]. Hierzu gehören die Bakterientoximeter "Toxalarm" und "Stiptox-norm", bei denen Bakterien (*Pseudomonas putida*) in einem Turbidostaten bzw. Chemostaten getrennt vom Testwasser kultiviert werden. Der Vorteil der Trennung von Bakterienkultur und Testsystem besteht darin, daß eine Adaptation der Testorganismen an Schadstoffe nicht erfolgen kann.

Im Leuchtbakterientest wird die Abnahme der Lichtemission lumineszierender Bakterien gemessen. Da Leuchtbakterien konservierbar sind und sich leicht handhaben lassen, wurde mit dem "Auto-Microtox" eine automatisierte Version des Leuchtbakterientests nach DIN 38412 Teil 34 entwickelt [56]. Der französische on-line Analyser "Auto-Microtox" wurde in Koblenz zur Rheinüberwachung eingesetzt.

Ein anderes Leuchtbakterientoximeter wurde von einem chemischen Unternehmen speziell für die Überwachung der Zuläufe der werkseigenen Kläranlage entwickelt. Als Testorganismen werden gentechnisch hergestellte Leuchtbakterien eingesetzt. Für diesen Zweck wurde dem Abwasserbakterium *Klebsiella planticola* ein Leuchtgen implantiert. Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde dieses "Biotoximeter" im Betrieb mit selbstgezogenen Flüssigkulturen von *Photobacterium phosphoreum* erprobt.

Das "Lumino 2000" (neuerdings "Biolum" genannt) und der "Regensburger Leuchtbakterientest" sind zwei im Verbundprojekt entwickelte Leuchtbakterientestautomaten. Bei der Entwicklung des "Regensburger Leuchtbakterientests" konnte weitgehend auf die Technik des DF-Algentests zurückgegriffen werden.

Der im Verbundprojekt und in dieser Arbeit als *Photobacterium phosphoreum* bezeichnete Leuchtbakterienstamm ist nach neuer taxonomischer Bestimmung *Vibrio fischeri* zuzuordnen.

Eine Sonderstellung in der Reihe der Bakterientests nimmt die "EuCyano-Bakterien-elektrode" ein. Mit diesem Testsystem kann sowohl der Elektronentransport der bakteriellen Atmungskette von heterotrophen Eubakterien (*Escherichia coli*) als auch der photosynthetische Elektronentransport von photoautotrophen Cyanobakterien (*Synechococcus spec.*) ermittelt werden. Das englische Meßsystem [57] wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens weiterentwickelt.

### **Photosynthesetests**

Zur schnellen Erfassung algentoxischer Substanzen wurden im Verbundprojekt vier Algentestautomaten entwickelt resp. optimiert. Das "FluOx-Testsystem" erfaßt kombiniert Fluoreszenz- und Sauerstoffsignale. Das "IfW-Fluorometer" mißt die spontane, variable Fluoreszenzemission unter Schadstoffeinfluß. Mit dem "Biosens-Algentoximeter" wird die prompte Fluoreszenz über Impulslichtanregung und mit dem "DF-Algentest" (DF = delayed fluorescence) die verzögerte Fluoreszenz von Blau- und Grünalgen ermittelt. Der DF-Algentest nutzt die Eigenschaft von Pflanzen, nach Belichtung im Dunkeln Licht abzustrahlen.

Auch auf suborganismischer Ebene steht ein Biostestautomat für die Gewässerüberwachung zur Verfügung. Die Schädigung von Photosyntheseprozessen wird anhand der lichtabhängigen Sauerstoffentwicklung von pflanzlichen Protoplasten erfaßt ("Protoplastenbiotest").

### **Tests mit Kleinkrebsen**

*Daphnia magna* gehört zu den Krebstieren (Crustacea) und nimmt als Konsument niedriger Ordnung eine ökologisch bedeutende Stellung zwischen den Destruenten (Bakterien), den Primärproduzenten (Algen) und den Konsumenten höherer Ordnung (Fischen) in der Nahrungskette ein.

Der "Dynamische Daphnientest" wird als automatischer Biomonitor zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung seit 1982 vom Landesamt für Wasser und Abfall in Nordrhein-

Westfalen eingesetzt. Meßkriterium ist die Schwimmaktivität der Kleinkrebse, die mit Hilfe von Lichtsensoren überwacht wird. Abweichungen von der Normalaktivität, gemessen als Aktivitätsdifferenz zwischen einer Test- und einer Referenzkammer, werden als Indiz für eine stoffbedingte Beeinträchtigung der Organismen gewertet. Der "Dynamische Daphnientest" weist für viele Stoffe eine hohe Empfindlichkeit auf und hat sich im praktischen Betrieb seit Jahren bewährt [2, 46, 47, 48, 49, 50].

## Tests mit Fischen und Muscheln

Fische spielen als Testorganismen in der biologischen Gewässerüberwachung eine besondere Rolle, da sie zum einen Endglieder der aquatischen Nahrungskette sind, zum anderen verfügen sie als Wirbeltiere innerhalb der Gruppe der Monitoringorganismen über das höchst entwickelte Nervensystem.

Neben der Immissionsüberwachung werden kontinuierliche Fischtests bei der Einleiterüberwachung und in Wasserwerken zur Rohwasserkontrolle eingesetzt [2, 10, 58, 59]. Als Parameter wird das rheotaktische Verhalten [60, 61], das Fluchtverhalten [62] oder die Atmungsfrequenz [63, 64, 65] gemessen. Die folgenden Testsysteme wurden im Rahmen der Forschungsarbeiten am Rhein und am Main erprobt:

Die Strömungsfischtests nutzen die Eigenschaft von Fischen gegen die Strömung zu schwimmen (Rheotaxis). Störungen des Schwimmverhaltens, die unter Schadstoffeinfluß auftreten, werden von speziellen Sensoren erfaßt. In Meßstationen am Rhein sind zwei vom Meßprinzip ähnliche Strömungsfischtestverfahren installiert: der "Fischwarntest" [60] und der "Aqua-Tox-Control" [66].

Weitere kontinuierliche Fischtestverfahren sind der "Koblenzer Verhaltensfischtest" und der "WRc-Fischmonitor". Während beim "WRc-Fischmonitor" der Kiemendeckelschlag (Atmungsfrequenz) zur Anzeige einer Intoxikation genutzt wird [65], wird beim "Koblenzer Verhaltensfischtest" das Verhaltensmuster eines kleinen Testfischschwärms mit Hilfe des bildverarbeitenden Verhaltensmeßsystems BehavioQuant [67, 68] erfaßt. Die Indikation von biologisch relevanten Schadstoffen erfolgt durch die separate Bewertung der sechs Verhaltensparameter: Motilität, Bewegungsinkonstanz, Anzahl der Wendungen, Schwimmhöhe, mittlere Aufenthaltsorte in Horizontalrichtung und Abstandsverhalten.

In den Niederlanden wurde zu Beginn der 80er Jahre ein Testsystem entwickelt, das auf der Messung charakteristischer Schalenbewegungen von Muscheln beruht [69, 70]. Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde dieser niederländische "Mosselmonitor" sowie ein weiterer kontinuierlicher Muscheltest, der "Dreissena-Monitor", erprobt. Von beiden Meßgeräten wird die Schalenbewegung und der Öffnungszustand der Süßwassermuschel *Dreissena polymorpha* kontinuierlich erfaßt. Sinkt der prozentuale Anteil offener Muscheln und steigt die Häufigkeit der Schalenbewegungen sprunghaft an, deutet dies auf einen Schadstoffeinfluß hin.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren sind im Gesamtabschlußbericht [20] und in dem Band 93 der Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene [71] dargestellt. Einen ersten Überblick über die Vielzahl der Systeme geben die Broschüren des BMFT [72, 73] und des Umweltbundesamtes [74].

Tab.1: Liste der bearbeiteten automatischen Biotestverfahren

Testverfahren (Meßparameter)	Testorganismen	Veröffentlichungen
<b>Bakterientoximeter</b>		
Toxiguard (O <sub>2</sub> - Verbrauch)	Aufwuchsorganismen	[13,17,21,22]
Biox 1000T (O <sub>2</sub> - Verbrauch)	Aufwuchsorganismen	[13,22]
Toxalarm (O <sub>2</sub> - Verbrauch)	<i>Pseudomonas putida</i>	[13,17,23,24]
Stiptox-norm (O <sub>2</sub> - Verbrauch)	<i>Pseudomonas putida</i>	[13,17,23,24]
EuCyano-Bakterien- elektrode (Elektronentransport der Atmungskette)	<i>Escherichia coli</i>	[14,25,26,27]
Auto-Microtox (Leuchtintensität)	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	[13,24]
Biotoximeter (Leuchtintensität)	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	[12]
Lumino 2000 (Leuchtintensität)	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	[12,28]
Regensburger Leuchtbakterientest (Leuchtintensität)	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	[16,29]
<b>Photosynthesetests</b>		
FluOx-Algentest (spontane Fluoreszenz und O <sub>2</sub> - Produktion)	<i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	[12,17,28,30]
Biosens-Algentoximeter (prompte Fluoreszenz)	<i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	[15,17,31,32]
IfW-Fluorometer (spontane, variable Fluoreszenz)	<i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	[15,17,33]
DF-Algentest (verzögerte Fluoreszenz)	<i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	[16,17,34,35]

Tab.1 Fortsetzung: Liste der bearbeiteten automatischen Biotestverfahren

Testverfahren (Meßparameter)	Testorganismus	Veröffentlichungen
<b>Photosynthesetests</b>		
EuCyano-Bakterienelektrode (Elektronentransport der Photosynthese)	<i>Synechococcus</i> spec.	[14,25,26,27]
Protoplastenbiotest (O <sub>2</sub> - Produktion)	<i>Vicia faba</i>	[18,36,37]
<b>Muschelmonitore</b>		
Dreissena-Monitor (Schalenbewegung)	<i>Dreissena polymorpha</i>	[17,19,38,39]
Mosselmonitor (Schalenbewegung)	<i>Dreissena polymorpha</i>	[13,40]
<b>Fischwarntests</b>		
Aqua-Tox-Control (rheotaktisches Verhalten)	<i>Leuciscus idus melanotus</i>	[13,14,17,41]
Fischwarntest (rheotaktisches Verhalten)	<i>Leuciscus idus melanotus</i>	[13,17,41]
Koblenzer Verhaltensfischtest (Schwimmverhalten)	<i>Leuciscus idus melanotus</i>	[13,42,43]
WRc-Fischmonitor (Kiemendeckelbewegung)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	[14,17,44,45]
<b>Daphnientest</b>		
Dynamischer Daphnientest (Schwimmaktivität)	<i>Daphnia magna</i>	[17,41,46, 47,48,49]

## Ermittlung von Alarmschwellen bei kontinuierlichen Biotestverfahren

Für die statistische Auswertung von Meßdaten kontinuierlicher Biotestverfahren gab es bislang keine einheitlich festgelegte Vorgehensweise. Um einen Alarmfall sicher von natürlichen Schwankungen der Meßwerte unterscheiden zu können, wurden von der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" Bewertungsschemata zur Beurteilung der Meßdaten entwickelt und Alarmgrenzen zur Alarmauslösung festgelegt [20]:

Ändern sich die Meßwerte eines Testsystems während der Prüfung von schadstofffreiem Testwasser nur geringfügig - wie bei vielen Bakterientests - dann reichen statische Alarmgrenzen aus. Eine Überschreitung indiziert eine Schadstoffwelle und löst ein Alarmsignal aus. Unterliegen die Meßwerte der Biomonitor jedoch systematischen Änderungen (Wachstum, Reproduktion, Tag-/Nachtzyklen), so sind veränderliche, dynamische Alarmgrenzen zur Alarmauslösung erforderlich. Zur Festlegung von Alarmschwellen wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

Ein Biotestgerät zeigt beim Monitoring von Fließwasser - auch wenn die Schadstoffkonzentration "Null" ist - eine mehr oder minder schwankende Aktivität der Testorganismen an. Der aus den Meßwerten errechnete Effekt wird als "Nulleffekt" bezeichnet. Um die natürlichen Meßwertschwankungen von schadstoffbedingten Meßwertniveaus unterscheiden zu können, werden mit jedem Testsystem zunächst Kontrollmessungen ohne Schadstoffzugabe vorgenommen. Eine bestimmte Anzahl von Messungen ( $n \geq 30$ ), die der aktuellen Messung vorangehen, werden als Nulleffektmessungen betrachtet. Aus den Werten des Bezugszeitraumes wird auf den aktuell zu erwartenden Nulleffekt, die Normalaktivität, extrapoliert (in der Regel ist es der Mittelwert aus den in den zurückliegenden Messungen gewonnenen Daten). Eine Schadstoffwirkung zeigt sich als Abweichung der aktuellen Aktivität von der berechneten "theoretischen" Normalaktivität.

Als Alarmschwelle wird der Wert festgelegt, der um die dreifache Standardabweichung über dem Mittelwert des Nulleffektes liegt. Eine vom Prinzip her entsprechende Vorgehensweise wird für die Messung der Atemfrequenz von Fischen beschrieben [75].

Zur Alarmauslösung reicht eine statistische Betrachtung von einzelnen Alarmwertüberschreitungen in der Regel jedoch nicht aus. In der Erprobungsphase wurde sichtbar, daß einzelne, kurzzeitige Überschreitungen einer vorgegebenen Alarmschwelle vielfältige Ursachen haben können. Um Fehlalarme auszuschließen, sollte daher erst bei zweimaliger Überschreitung der Alarmschwelle (d.h. in zwei aufeinanderfolgenden Meßzyklen) von einer Alarmsituation ausgegangen werden. Statistische Betrachtungen bei Algertestautomaten haben ergeben, daß Fehlalarmmeldungen bei Anwendung des Modus der einmaligen Alarmschwellenüberschreitung theoretisch alle 14 Tage zu erwarten sind, während derartige Fehlmeldungen bei zweimaliger Alarmschwellenüberschreitung lediglich alle 10 Jahre auftreten [20].

## Statistische Methoden zur Ermittlung der testspezifischen Sensitivität im Chemikalienetest

Zur Kennzeichnung der Sensitivität eines Testsystems dienen Schwellen- und LOEC-Werte (LOEC = lowest observed effect concentration), die in Aufstockungsexperimenten mit ausgewählten Referenzchemikalien (Atrazin, Natriumpentachlorphenolat u.a.) ermittelt werden [20].

Der Schwellenwert wird aus der dreifachen Standardabweichung des Nulleffektes (Alarmschwelle) und der einfachen Standardabweichung der Reaktion der Organismen auf den zugegebenen Schadstoff errechnet. Der Schwellenwert entspricht somit der Schadstoffkonzentration, bei der mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit eine vom Normalverhalten abweichende Wirkung gemessen werden kann. In Abb. 1 ist exemplarisch eine Schwellenwertberechnung dargestellt.

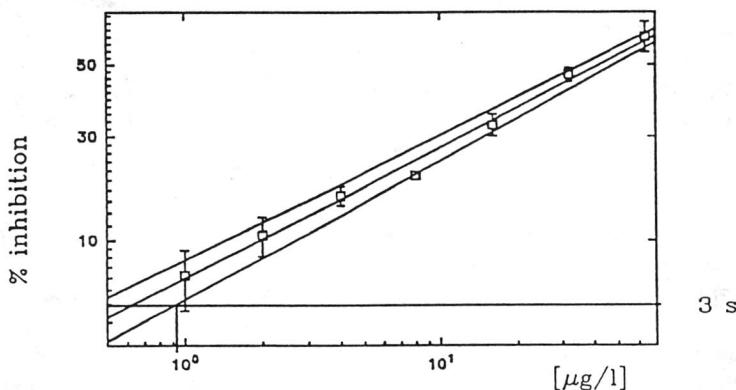


Abb. 1: Beispiel einer Schwellenwertberechnung aus einem Aufstockungsexperiment (mit Atrazin im FluOx-Algentest, aus [12])

Der LOEC-Wert ist die erste geprüfte Konzentrationsstufe in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe, deren Wirkungswert oberhalb der vierfachen Standardabweichung des Nulleffekt-Mittelwertes liegt. Es ist ein experimentell ermittelter Wert, dessen Höhe von den gewählten Konzentrationsstufen abhängig ist. Die auf diese Weise ermittelten LOEC-Werte werden zur Charakterisierung der Testsensitivität immer dann herangezogen, wenn sowohl die Anzahl der getesteten Konzentrationsstufen als auch die Anzahl der Wiederholungen so limitiert sind, daß eine statistisch gesicherte Berechnung von Schwellenwerten nicht möglich ist.

## Ausblick

Der Einsatz kontinuierlicher Biotestverfahren in der Immissions- und Emissionsüberwachung bietet eine Reihe von Möglichkeiten zur Verwirklichung umweltpolitischer Ziele im Bereich des Gewässerschutzes. Bei der Immissionsüberwachung können Biotestautomaten in erster Linie als Warnsysteme verwendet werden, die oberhalb der Grundbelastung eines Gewässers störfallbedingte Spitzenbelastungen anzuzeigen vermögen. In Verbindung mit der chemischen Analyse und weiterführenden biologischen Untersuchungen dienen sie der Beweissicherung bei unerlaubten Einleitungen und Störfällen. Darüber hinaus ist der Einsatz ausgewählter Biotestautomaten bei der Erfassung, Beschreibung und Bewertung des Gewässerzustandes sowie bei der Ableitung und Überprüfung wirkungsspezifischer Zielvorgaben für oberirdische Fließgewässer möglich. Als Zielvorgabe wäre denkbar, daß bei bestimmten empfindlichen Biotests keine Alarmschwellenüberschreitungen auftreten dürfen.

Bei der Überwachung von Abwasser ist grundsätzlich zu unterscheiden zwischen der Überwachung der Einleitung von gereinigtem Abwasser oder Kühlwasser in den Vorfluter und der Zuleitung von Rohabwasser in die biologische Kläranlage. Für den Bereich der Überwachung von Abwasserteilströmen eignen sich vor allem Bakterientoximeter. Derartige Testverfahren können als echte Frühwarnsysteme bezeichnet werden, da sie eine sich anbahnende Vergiftung der Kläranlagenbiozönose durch Umleitung der Giftströme in Rückhaltebecken zu verhindern vermögen. Bei der Überwachung des Gewässerzustandes fungieren die Biomonitoring hingegen als Warnsysteme, die eine bereits eingetretene Verschmutzung anzuzeigen, aber nicht mehr zu verhindern vermögen.

Für die Überwachung von Kläranlagenabläufen ist der Einsatz automatischer Biotests ebenfalls sinnvoll. Ein derartiges Screening-Verfahren stößt jedoch dann auf Grenzen, wenn quantifizierbare Informationen zur Schadstoffwirkung erforderlich werden. Bei der Abwasserüberwachung im Rahmen der Wassergesetzgebung sind somit die statischen Biotests nicht zu ersetzen. Ihr Einsatz könnte jedoch zukünftig auf Situationen beschränkt werden, in denen kontinuierliche Biotests bereits eine bestimmte Abwassertoxizität detektiert haben [76].

## Literatur

1. Der Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit: Rhein-Bericht. Bericht der Bundesregierung über die Verunreinigung des Rheins durch die Brandkatastrophe bei der Sandoz AG/Basel und weitere Chemieunfälle. Umweltbrief 34, Februar 1987
2. Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen: Gewässergütebericht '86. Düsseldorf, 1987, 36-37

3. Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)": Rahmenkonzept für Forschungsvorhaben zur Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins. Umweltbundesamt, Berlin, 1989
4. IRMER, U.: Biologische Warnsysteme zur Erfassung von Störfällen am Rhein. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 203-210
5. SCHMITZ, P., IRMER, U. und KREBS, F.: Einsatz kontinuierlicher Biotestsysteme zur Überwachung des Rheins. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1989, 233-246
6. BESCH, W.K.: Bioteste in der limnischen Toxikologie. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe. Studien zum Gewässerschutz 2, 1977, 1-217
7. NUSCH, E. A.: Biologische Testverfahren - Aussagekraft und Grenzen der Übertragbarkeit. UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 5, 1993, 155-162
8. BESCH, W. K.: Wasseruntersuchungen mit Hilfe von Toxizitätstests - Teil III: Abkürzungen und Begriffe der aquatischen Toxikologie. In: W.K. Besch, A. Hamm, B. Lenhart, A. Melzer, B. Scharf und C. Steinberg (Hrsg.): Limnologie für die Praxis: Grundlagen des Gewässerschutzes. 2. Auflage. Ecomed Verlag, Landsberg am Lech, 1985, 3-18
9. DIAMOND, J., COLLINS, M. and GRUBER, D.: An overview of automated bio-monitoring - past developments and future needs. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.): Automated biomonitoring - living sensors as environmental monitors. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988, 23-38
10. CAIRNS, Jr., J. and van der Schalie, W. H.: Biological monitoring, Part I - Early warning systems, review. Water Research 14, 1980, 1179-1196
11. KOEMAN, J. H., POELS, C. L. M. and SLOOF, W.: Continuous biomonitoring systems for detection of toxic levels of water pollutants. In: O. Hutzinger, L. H. van Lelyveld and B. C. J. Zoeteman (eds.): Aquatic pollutants - transformation and biological effects. Proceedings of the second international symposium on aquatic pollutants. Nordwijkerhout, Sept. 26-28, 1977. Pergamon Press, Oxford, New York, 1977, 339-347
12. KNIE, J. und MERSCHHEMKE, C.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 1: Algen- und Leuchtbakterientest. Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf, 1993

13. KREBS, F., BLESSING, B., FRITZ-LANGEN, H., BLÜBAUM-GRONAU, E., HOFFMANN, M. und SCHMITZ, P.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination/Zentrale Auswertung. Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, 1994
14. HANSEN, P.-D., STEIN, P. und LÖBBEL, H.-J.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 3: EuCyano-Bakterienelektrode und WRc - Fischmonitor. Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Berlin, und Technische Universität Berlin, Institut für Ökologie, Berlin, 1994
15. NOACK, U., SCHREIBER, F. und WALTER, J.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 4: Spontane Algenfluoreszenz. Dr. U. Noack-Laboratorium für Angewandte Biologie, Hildesheim, in Kooperation mit dem Institut für Wasserforschung, Schwerte, 1993
16. GERHARDT, V. und PUTZGER, J.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 5: DF-Algentest und Leuchtbakterientest. Universität Regensburg, Institut für Physik II, Regensburg, 1993
17. PUZICHA, H.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 6: Laborcontainer. Projektleitung I. Seydel, K. Digel und T. Ehlscheid. Landesamt für Wasserwirtschaft Rheinland-Pfalz, Mainz, in Zusammenarbeit mit der Hessischen Landesanstalt für Umwelt, Wiesbaden, 1993
18. SCHNABEL, H., LINDNER, S. E. und OVERMEYER, S.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 7: Der Protoplastenbiotest. Universität Bonn, Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Bonn, 1993
19. NEUMANN, D. und BORCHERDING, J.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 8: Der Dreissena-Monitor. Universität Köln, Zoologisches Institut, Köln, 1993
20. Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)": Kontinuierliche Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins. Abschlußbericht des BMFT/UBA-Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins". Umweltbundesamt, Berlin. UBA-Berichte, 1994 (in Vorbereitung)

21. BLESSING, B., FRITZ-LANGEN, H. und KREBS, F.: Einsatz von Bioreaktoren zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 247-254
22. BLESSING, B., FRITZ-LANGEN, H. und KREBS, F.: Bakterientoximeter mit Aufwuchsorganismen in der Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
23. FRITZ-LANGEN, H., BLESSING, B. und KREBS, F.: Einsatz von Bakterientoximetern mit separater Zellanzucht zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1993, 255-268
24. FRITZ-LANGEN, H., BLESSING, B. und KREBS, F.: Bakterientoximeter mit Reinkulturen (*Photobacterium phosphoreum* und *Pseudomonas putida*) in der Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
25. HANSEN, P.-D.: Kontinuierliche biologische Testverfahren zur Abwasserüberwachung und ereignisgesteuerten Probenahme. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 223-232
26. HANSEN, P.-D.: Biosensoren im Umweltmonitoring am Beispiel der EuCyano-Bakterienelektrode. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
27. STEIN, P.: Bakterienelektrode mit *Synechococcus* und *Escherichia coli*: Ein kontinuierliches Testsystem zur Online-Überwachung von Oberflächengewässern. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 269-276
28. MERSCHHEMKE, C.: Automatische Biotestsysteme zur kontinuierlichen Rheinüberwachung: Biolum, ein kontinuierlicher Leuchtbakterientest, und FluOx, ein Algentestautomat. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
29. PUTZGER, J. und GERHARDT, V.: Regensburger Leuchtbakterientest - Erweiterung des DF-Algentests zum on-line-Monitor mit *Photobacterium phosphoreum*. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
30. MERSCHHEMKE, C. und REGH, W.: Das FluOx-Meßsystem: Ein automatisches Algentestgerät zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 285-294

31. NOACK, U. und WALTER, J.: Das Algentoximeter in der kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 305-309
32. NOACK, U.: Das Biosens-Algentoximeter in der Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
33. ERNST, D. und Schmidt, C. (Hrsg.): Grundlagen und Anwendungsbereiche der Chlorophyllfluoreszenz. Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH und der Hydrologischen Abteilung der Dortmunder Stadtwerke AG, Dortmund, 1989
34. GERHARDT, V. und PUTZGER, J.: Ein Biotest zur Gewässerüberwachung auf der Grundlage der verzögerten Fluoreszenz von Algen. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 277-284
35. GERHARDT, V. und PUTZGER, J.: DF-Algentest - Ein on-line Monitor auf der Basis der verzögerten Fluoreszenz. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
36. OVERMEYER, S., LINDNER, S. E., BRADENAH, J. E. und SCHNABL, H.: Der Protoplasmabiotest. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 293-304
37. OVERMEYER, S., LINDNER, S. E., HOSTERT, E., SCHNABL, H. und PEICHL, L.: Der Protoplasmabiotest - ein Wirkungstest zur summarischen Schadstoff erfassung in der Umwelt. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
38. BORCHERDING, J.: Die Schalenbewegungen der Muschel *Dreissena polymorpha* als Monitorsystem zur Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 361-374
39. BORCHERDING, J. und VOLPERS, M.: Der "Dreissena-Monitor" - Erfahrungen mit dem neuen biologischen Frühwarnsystem. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
40. HOFFMANN, M., BLÜBAUM-GRONAU, E. und KREBS, F.: Die Schalenbewegung von Muscheln als Indikator von Schadstoffen in der Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
41. PUZICHA, H.: Erprobung von on-line betriebenen Biotestsystemen für die Gewässerüberwachung und Ergebnisse aus Untersuchungen mit teilgeklärtem industriellen Abwasser. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994

42. BLÜBAUM-GRONAU, E., SPIESER, O. H. und KREBS, F.: Bewertungskriterien für einen Verhaltensfischtest zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 333-348
43. BLÜBAUM-GRONAU, E., HOFFMANN, M., SPIESER, O. H. und KREBS, F.: Der Koblenzer Verhaltensfischtest, ein auf dem Meßsystem BehavioQuant beruhender Biomonitor zur Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
44. LÖBBEL, H.-J. UND STEIN, P.: Messung der Kiemendeckelbewegung mit dem WRc-Fischmonitor im on-line Betrieb am Niederrhein. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 323-332
45. STEIN, P.: Erprobung des WRc-Fischmonitors zur Störfallüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
46. PUZICHA, H.: Der dynamische Daphnientest - Erfahrungen aus dem Meßstationsbetrieb am Gewässer. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 349-360
47. KNIE, J.: Immissionsüberwachung von Rhein und Elbe mit dem Dynamischen Daphnientest. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
48. KNIE, J.: Der dynamische Daphnientest - praktische Erfahrungen bei der Gewässerüberwachung. Gewässerschutz-Wasser-Abwasser 102, 1988, 341-356
49. Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)": Der Dynamische Daphnientest - Erfahrungen und praktische Hinweise. Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf. LWA-Materialien, 1994 (im Druck)
50. DEVENTER, K.: Der Dynamische Daphnientest - Erste Erfahrungen in der Immissions- und Emissionsüberwachung an Gewässern und Einleitungen in Hessen. Schriftenreihe der Hessischen Landesanstalt für Umwelt. Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz, Heft Nr. 112, 1991, 1-33
51. MARTIN, J. V.: Biomonitoring of polluted waters: three systems. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.): Automated biomonitoring - living sensors as environmental monitors. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988, 172-181
52. SOLYOM, P.: Industrial experiences with Toxiguard, a toxicity monitoring system. Prog. Wat. Tech. 9, 1977, 193-198
53. PILZ, U.: Erfahrungen mit dem Bakterientoximeter bei der Untersuchung giftstoffhaltiger Lösungen und schadstoffbelasteter Wasserproben. Vom Wasser 66, 1986, 85-96

54. PILZ, U.: Verbesserung der Betriebssicherheit und der Meßempfindlichkeit des Bakterientoximeters. *Vom Wasser* 74, 1990, 351-359
55. PILZ, U.: Monitoring akuter Toxizität mit Bakterien, Grünalgen oder Belebtschwamm. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene* 93, 1994
56. LEVI, Y., HENRIET, C., COUTANZ, J. P., LUCAS, M. and LEGER, G.: Monitoring acute toxicity in rivers with the help of the Microtox test. *Water Supply* 7, 1989, 25-31
57. RAWSON, D. M., WILLMER, A. J. and CARDOSI, M. F.: The development of whole cell biosensors for on-line screening of herbicide pollution of surface waters. *Toxicity Assessment* 2, 1987, 325-340
58. VAN DER SCHALIE, W. H., DICKSON, K. L., WESTLAKE, G. F. and CAIRNS, JR., J.: Fish bioassay monitoring of waste effluents. *Environmental management* 3 (3), 1979, 217-235
59. MÄCKLE, H. und STABEL, H.-H.: Qualitätsüberwachung von Roh- und Trinkwasser - Messung, Analyse und Bewertung. 13. *Wasser-technisches Seminar*. Technische Universität München. *Berichte aus Wassergüte-wirtschaft und Gesundheitsingenieurwesen* 85, 1989, 175-188
60. SCHARF, B. W.: A fish test alarm device for the continual recording of acute toxic substances in water. *Arch. Hydrobiol.* 85, 1979, 250-256
61. BESCH, W. K., LOSERIES, H. G., MEYER-WARDEN, K. und SCHMITZ, W.: Eine automatische Warnanlage zum Nachweis von Giften in akut toxischen Konzentrationen durch Fische. *gfw-Wasser/Abwasser* 115, 1974, 501-503
62. GUNKEL, G., HOPPE, C., KOSWIG, M., VOLL, M. und AXT, G.: Die Fluchtreaktion von Fischen als Grundlage eines Fischtests. *Vom Wasser* 61, 1983, 199-215
63. SLOOF, W.: Detection limits of a biological monitoring system based on fish respiration. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 23, 1979, 517-523
64. HEATH, A. G.: A critical comparison of methods for measuring fish respiratory movements. *Water Research* 6, 1972, 1-7
65. EVANS, G. P. and WALLWORK, J. F.: The WRc Fish Monitor and other bio-monitoring methods. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.): *Automated biomonitoring - living sensors as environmental monitors*. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988, 75-90

66. ORTA, K.: Kontinuierlicher Fischtest. Eine Warn- und Testanlage zum Nachweis von akut toxischen Stoffen in Wasser und Abwasser. GWA Gas, Wasser, Abwasser 44, 1980, 317-324
67. SPIESER, O. H. und YEDILER, A.: Empfindliche Parameter bei der Entwicklung von Langzeittests an Fischen. Forschungsbericht. Umweltforschungsplan des Bundesministers des Innern (10603030). Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), Institut für Toxikologie, Neuherberg, 1986
68. SPIESER, O. H., LEHNBERGER, A., BALLHORN, L., FREITAG, D. und FERLING, H.: Quantifizierung von Verhaltensparametern unter Schadstoffeinwirkung bei Fischen. Forschungsbericht. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umweltschutz, Naturschutz und Reaktorsicherheit (10603068). GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Toxikologie, Neuherberg, 1993
69. SLOOF, W., DE ZWART, D. and MARQUENIE, J. M.: Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 30, 1983, 400-405
70. KRAMER, K. J. M., JENNER, H. A. and DE ZWART, D.: The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. Hydrobiologia 188/189, 1989, 433-443
71. PLUTA, H.-J. und KNIE, J. (Hrsg.): Gewässerüberwachung mit Biomonitorn. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Band 9, 1994
72. KNIE, J. und PLUTA, H.-J.: Biomonitorn zur kontinuierlichen Überwachung von Wasser und Abwasser. Hrsg.: Forschungszentrum Jülich; Projektträger "Biologie, Energie, Ökologie (BEO)" des BMFT, Außenstelle Berlin, 1993, 1-48
73. BINE-Projekt Info-Service: Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins. Hrsg.: Forschungszentrum Jülich; Projektträger "Biologie, Energie, Ökologie (BEO)" des BMFT, Jülich, 1994 (im Druck)
74. Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)": Kontinuierliche Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins - Zusammenfassung, Empfehlung und Darstellung der Testverfahren. Umweltbundesamt, Berlin. UBA-Texte, 1994 (im Druck)
75. GRUBER, D. and CAIRNS, Jr., J.: Data acquisition and evaluation in biological monitoring systems. Hydrobiologia 83, 1981, 387-393
76. IRMER, U. und SCHMITZ, P.: Einsatz von Biertestverfahren bei der Gewässerüberwachung. Tagungsband Kongreß "Wasser Berlin '93", 1993 (im Druck)



# **Vergleichende Erprobung und Beurteilung von automatischen Biotestverfahren für den Einsatz in Meßstationen**

Patricia Schmitz, Ulrich Irmer und Falk Krebs

## **Zusammenfassung**

Die im Rahmen des BMFT/UBA-Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" entwickelten Biotestverfahren wurden von 1990 bis 1993 an den Flüssen Rhein und Main auf Tauglichkeit getestet. Zur vergleichenden Bewertung der Biomonitor wurden von der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)" Eignungskriterien definiert und für jedes Kriterium ein mehrstufiges Bewertungsschema erarbeitet. Mit Hilfe der Kriterien Sensitivität, Reaktionszeit, Standzeit, Betriebsfreundlichkeit, Wartungsbedarf, Plausibilitätsprüfung, Verfügbarkeit, Refraktärzeit, Störanfälligkeit, Anschaffungskosten, EDV-Ausstattung, Platzbedarf und Materialeinsatz wurde jedes Testsystem beurteilt.

Um Testsysteme mit Organismen gleicher Kategorie hinsichtlich ihrer Sensitivität vergleichen zu können, wurden Abwassertests, Laborversuche und vergleichende Aufstockungsexperimente am Gewässer mit ausgewählten Referenzchemikalien durchgeführt. Unter den Bakterientests zeigten das Bakterientoximeter Toxiguard und der Regensburger Leuchtbakterientest im Aufstockungsexperiment mit Natriumpentachlorphenolat die höchste Empfindlichkeit. Der DF-Algentest und der FluOx-Algentest reagierten am Rhein bereits auf Atrazinkonzentrationen, die unterhalb von 1 µg/l lagen. Eine besonders hohe Zuverlässigkeit im kontinuierlichen Betrieb an Rhein und Main bewies neben dem DF-Algentest das Biosens-Algentoximeter. Bei den Aufstockungsversuchen mit Fischen reagierten der WRc-Fischmonitor und der Koblenzer Verhaltensfischtest sensitiver als die etablierten Strömungsfischtests. Bei vergleichbarer Empfindlichkeit zeigte der Dreissena-Monitor eine hohe Zuverlässigkeit im kontinuierlichen Betrieb.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse konnte die Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" der Deutschen Kommission zur Reinhaltung des Rheins eine Testpalette mit Testorganismen aus verschiedenen Trophiestufen zur Implementation empfehlen.

## **Summary**

Between 1990 and 1993 biotest systems that had been developed in the joint research project of the Federal Ministry of Research and Technology (BMFT) and the Federal Environmental Agency (UBA) "Developing, testing and implementing biotest systems for monitoring the River Rhine", were tested for their applicability in routine operation on the rivers Rhine and Main. For a comparative evaluation of the biomonitor the joint

Federal/States Project Group "Wirkungstests Rhein - WIR" (effect tests for monitoring water quality of the Rhine) defined suitability criteria and developed for each criterion a tiered assessment scheme. Each test system was evaluated with the aid of the criteria sensitivity, reaction time, uninterrupted operation time, ease of operation, maintenance requirements, plausibility control, availability, refractory time, susceptibility to troubles, purchase price, data processing equipment, space required and material requirements.

In order to compare the sensitivity of different systems operating with test organisms of the same category, wastewater tests, laboratory tests, and comparative tests with increasing concentrations of selected reference chemicals in natural waters were made in the field.

Among the bacterial toxicity tests, the Toxiguard test and the Regensburg luminescent bacteria test showed the best sensitivity in spiking experiments with sodium pentachlorophenolate. The DF algal test and the FluOx algal test reacted on River Rhine water at atrazine concentrations even below 1 µg/l. Besides the DF algal test, the Biosens algal toximeter proved to be particularly reliable in continuous operation on the rivers Rhine and Main. In the tests with increasing contaminant concentrations in natural waters and fish as testorganisms the WRc Fishmonitor and the Koblenz behavioural fish test reacted more sensitively than the established counter-current fish tests. At comparable sensitivity, the Dreissena Monitor also showed high reliability in continuous operation.

Because of the positive results the joint Federal/States Project Group "Wirkungstests Rhein" recommended to the German Commission for the Protection of the Rhine a test battery - with test organisms which represent different trophic levels - for implementation in monitoring water quality of the river Rhine.

## **Einleitung**

Bei einer kontinuierlichen Gewässerüberwachung kann mit Hilfe der chemischen Analytik nur eine begrenzte Anzahl der im Gewässer vorkommenden Schadstoffe gemessen werden. Biologische Testverfahren erfassen dagegen die integrale Schadstoffwirkung. Da die von einem Schadstoff ausgehende Toxizität organismenspezifisch ist, ist der Einsatz mehrerer Monitororganismen erforderlich.

Als biologische Effektmonitore sind der Strömungsfischtest und der Dynamische Daphnientest seit mittlerweile 20 bzw. 10 Jahren in deutschen Rheinmeßstationen etabliert. Die eingesetzten Testorganismen vermögen solche Schadstoffe zu erfassen, die fisch- oder daphnientoxisch wirken. Hierzu gehören beispielsweise zahlreiche Insektizide.

Zur Gewässerbelastung tragen in erheblichem Umfang gegenwärtig insbesondere die Herbizide bei. Besonders der Anteil der Triazine führt zu wasserwirtschaftlichen Problemen [1]. Erhöhte Atrazin-Werte ( $> 0,1 \mu\text{g/l}$ ) werden derzeitig u.a. am Rhein ab Worms stromabwärts sowie an den Flüssen Main und Elbe ermittelt [2]. Da Herbizide

meist in Photosyntheseprozesse eingreifen, können sie von Biotestverfahren mit photochemischen Meßparametern erfaßt werden. Für die kontinuierliche Oberflächengewässerüberwachung stehen eine Reihe von automatischen Testsystemen zur Verfügung, die die photosynthetische Aktivität von Algen messen [3, 4, 5, 6].

Kontinuierlich arbeitende Bakterientoximeter werden vor allem als Warnsysteme zum Schutz biologischer Kläranlagen und zur Kontrolle von Kläranlagenabläufen eingesetzt. Grundsätzlich können diese Biomonitora auch bakterientoxische Substanzen in Oberflächengewässern detektieren [7, 8].

Im Rahmen des Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" sollten Biotestverfahren mit Testorganismen unterschiedlicher Trophiestufen im Vergleich erprobt und beurteilt werden. Die in 8 wissenschaftlichen Institutionen durchgeführten Forschungs- und Entwicklungsarbeiten wurden vom Bundesministerium für Forschung und Technologie und über den Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit gefördert. Im Auftrag der Deutschen Rheinschutzkommision wurde das Verbundprojekt von der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)" wissenschaftlich begleitet.

Aufgabe des Arbeitskreises war es, anhand festgelegter Kriterien geeignete Biotests zur Gewässerüberwachung auszuwählen und eine aus mehreren Verfahren bestehende Testbatterie zur Anwendung zu empfehlen. Bei der Erstellung eines Kriterienkataloges orientierte sich der Arbeitskreis zunächst an der einschlägigen Literatur. Autoren wie Cairns [9] und Diamond [10] nennen Anforderungen, die an kontinuierliche Testverfahren zu stellen sind. Darüber hinaus existieren im Bereich der Meßtechnik Begriffe wie Verfügbarkeit, Refraktär- und Standzeit [11], die auch auf Biomonitora angewendet werden können. Um mehrere Testgeräte objektiv miteinander vergleichen zu können, war es erforderlich, eine Klassifizierung und Gewichtung der Kriterien vorzunehmen. Auf der Basis eines differenzierten Bewertungsschemas wurden die Biomonitora verglichen und bewertet.

Aufgrund der positiven Ergebnisse konnte die Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" der Deutschen Rheinschutzkommision im Jahr 1993 eine Testbatterie mit Testorganismen aus verschiedenen Trophiestufen zur Implementation in Rheinmeßstationen empfehlen.

### **Bewertungsschema zur Beurteilung von kontinuierlichen Biotestverfahren**

Zur vergleichenden Bewertung der Biomonitora wurden Eignungskriterien definiert und für jedes Kriterium ein Bewertungsschema mit einer mehrstufigen Skala (I-IV oder I-VI) erarbeitet. Ziel war es, die Biomonitora bezüglich ihres möglichen Einsatzes in Meßstationen objektiv beurteilen zu können. Hierzu wurde ein einheitliches Bewertungsschema festgelegt und eine Reihe von Begriffen neu definiert.

Beim Monitoring von Oberflächen- oder Abwasser zeigt jeder Meßparameter einen mehr oder minder schwankenden Verlauf auf. Auch wenn die Schadstoffkonzentration "Null" ist, so sind doch die Testorganismen im zeitlichen Verlauf unterschiedlich aktiv. Der hieraus errechnete Effekt wird als **Nulleffekt** bezeichnet; dessen Größe und Streuung bedingt die Lage der Alarmschwellen. Für Geräte mit relativ konstantem Nulleffekt genügt es, eine **statische Alarmschwelle** festzulegen. Weist dagegen der Nulleffekt eine Drift oder stärkere zeitliche Schwankungen auf, muß mit **dynamischen Alarmschwellen** gearbeitet werden, um Fehlalarme zu vermeiden. Um die Wahrscheinlichkeit für die Auslösung von Fehlalarmen zu begrenzen, wird eine obere und/oder untere Alarmschwelle festgelegt, die um die dreifache Standardabweichung des Nulleffektes über und/oder unter dem Mittelwert des Nulleffektes liegt [12].

Zur Kennzeichnung der **Sensitivität** eines Testsystems dienen Schwellen- oder LOEC-Werte.

Der **Schwellenwert** ist die errechnete Konzentration eines Schadstoffes, bei der mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit eine vom Normalverhalten abweichende Wirkung gemessen werden kann. Die Höhe des Schwellenwertes resultiert einerseits aus der dreifachen Standardabweichung vom Mittelwert des Nulleffektes am Gewässer (Alarmschwelle), d.h. aus der Höhe der Schwankungsbreite eines Testgerätes, andererseits aus der einfachen Standardabweichung der Reaktion der Testorganismen auf den jeweiligen Schadstoff in der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Fitfunktion durch das untere Ende der Fehlerbalken).

Der **LOEC-Wert** (lowest observed effect concentration) ist die erste geprüfte Konzentrationsstufe in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe, bei der eine vom Normalverhalten abweichende Wirkung beobachtet wird. Statistisch gesichert wird dieser experimentelle Wert durch die vierfache Standardabweichung vom Mittelwert des Nulleffektes [12, 13].

Schwellen- und LOEC-Werte werden in gleicher Weise klassifiziert:

Referenzsubstanz (Nominalkonzentration im Prüfansatz)		Klasse
< 1	µg/l	I
1 - 9,99	µg/l	II
10 - 99,99	µg/l	III
100 - 999,99	µg/l	IV
1 - 9,99	mg/l	V
≥ 10	mg/l	VI

Da das zentrale Kriterium zur Beurteilung der Biomonitor ist die **Sensitivität** gegenüber Schadstoffen ist, wurden während der Erprobung am Main auch Testläufe mit teilgeklärtem industriellen Abwasser durchgeführt [14]. Folgende Fragen wurden gestellt:

Zeigt das Testgerät eine signifikante Reaktion auf die Abwasserprobe?

ja/nein	Klasse
ja	I
nein	IV

Wie lang ist die Reaktionszeit?

Zeit [min]	Klasse
< 15	I
15 - 30	II
> 30	IV

Als **Reaktionszeit** wird die Zeitdauer definiert, die ein Testgerät nach Zugabe einer Prüfsubstanz (Referenzchemikalie, Abwasserprobe) bis zur Überschreitung einer vorgegebenen, statistisch gesicherten Alarmschwelle benötigt.

Als **Standzeit** wird jener Zeitraum bezeichnet, in dem ein Meßgerät ohne Wartungsbedarf störungsfrei funktioniert. Für die im Forschungsvorhaben getesteten, kontinuierlich arbeitenden Biomonitor wird eine Mindeststandzeit von 7 Tagen gefordert (einschließlich einer Wartung).

Standzeit [Tage]	Klasse
≥ 7	I
< 7	IV

Die **Betriebsfreundlichkeit** eines Testgerätes wird anhand folgender Punkte beurteilt:

- Es ist ein verständliches Handbuch vorhanden.
- Es besteht das Angebot einer Schulung durch den Gerätehersteller.
- Eine Liste mit möglichen Fehlern ist verfügbar.
- Charakteristische Kurvenverläufe zur Alarmerkennung sind beigelegt.
- Alle zu- und abführenden Schläuche sind gekennzeichnet.
- Wichtige Funktionen und Ableseparameter am Gerät sind gekennzeichnet.
- Gerätebedingte Kalibriermöglichkeiten sind eingehend beschrieben.
- Die Betreuung durch den Vertreiber des Biotestgerätes und ein Wartungsservice werden gewährleistet.
- Verschleißteile können leicht und schnell ausgetauscht werden.

Anhand der ja/nein-Entscheidungen erfolgt eine Klassifizierung in die Stufen I bis IV:

Anzahl ja	Klasse
7-8	I
5-6	II
3-4	III
1-2	IV

Der **Wartungsbedarf** eines Testgerätes umfaßt sämtliche anfallenden Arbeiten. Dazu gehören sowohl Vorarbeiten (Hälterung, Anzucht von Testorganismen, Herstellen und Autoklavieren von Nährmedien, Reinigen von Hälterungsbecken usw.) als auch die direkt beim Betrieb der Testgeräte auftretenden routinemäßigen Wartungsarbeiten (Reinigung und Erneuerung der Schläuche, Meßkammern, Elektroden u.s.w.; Austausch der Testorganismen, Erneuerung der Test- und Kulturmedien). Außerdem wurde der Aufwand für die in unterschiedlichen Zeitabständen notwendigen Reinigungs- und Wartungsarbeiten für die Gesamtanlage berücksichtigt.

Zeit [h pro Woche]	Klasse
< 3	I
3,0 - 5,4	II
5,5 - 8	III
> 8	IV

Der **Meßbereich** ist ein durch die Gerätekonstruktion und das Testverfahren bedingter Wertebereich, in dem bestimmte Meßwerte theoretisch gemessen werden können und in dem in der Praxis Meßwerte ermittelt worden sind.

Es wurde bewertet, ob für den Routineeinsatz eines Testgerätes ausreichende Angaben zum Meßbereich, zum tolerierbaren Temperaturbereich des Testwassers, zur Schwankungsbreite des Meßparameters sowie entsprechende graphische Darstellungen vorliegen. Diese Angaben sollten so differenziert wie möglich sein, d.h. getrennte Angaben für unterschiedliche Wassertemperaturen, Jahreszeiten, Tageszeiten, Organismenarten usw. Falls die Schwankungsbreite nicht als Mittelwert des Nulleffektes  $\pm$  einfache Standardabweichung testgerätespezifisch angegeben werden kann, so sollten zumindest umfassende Meßkurven mitgeliefert werden. Die Meßwerte als solche wurden nicht bewertet.

Umfassende Daten und Graphiken sind vorhanden ?

ja/nein	Klasse
ja	I
nein	IV

Durch **Plausibilitätsprüfungen** sollen Fehlalarme, die durch technische oder nicht deutbare Fehlerquellen hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden. Die Geräte sollten eine interne Überprüfung der Meßdaten auf eventuelle technische Fehler hin selbstständig durchführen können (Auto-Control). Gleichzeitig sollte dem Betreiber die Möglichkeit gegeben werden, mit Hilfe des Computerprogrammes selbst technische Störungen feststellen zu können. Eine Überprüfung der Alarmwerte auf Plausibilität muß anhand der für die Berechnung der Meß- und Alarmgrenzwerte relevanten Daten möglich sein.

Die Geräte wurden danach beurteilt, ob eine geräteinterne Störungsmeldung (Auto-Control) vorhanden ist (A) und ob der Gerätebetreiber die Möglichkeit hat, im Alarmfall alle für die Bildung des Alarmwertes relevanten Parameter zu überprüfen (B). Die Klassifizierung erfolgte anhand von ja/nein-Entscheidungen.

ja/nein	Klasse
ja (A und B)	I
ja (nur B)	II
ja (nur A)	III
nein (weder A noch B)	IV

Mit **Verfügbarkeit** ist die tatsächlich verfügbare Zeitspanne gemeint, in der ein Testgerät im kontinuierlichen Betrieb valide Daten liefert. Nicht verfügbar ist ein Testgerät z.B. nach einer Störung, Alarmmeldung, während der Wartung oder Säuberung, nach dem Neueinsetzen von Organismen und während der anschließenden Eingewöhnungsphase. Ebenfalls nicht verfügbar kann ein Gerät auch sein in der Zeitspanne, die zur Neuberechnung von Mittelwerten zur Alarmwertbildung benötigt wird. Theoretisch beträgt die maximale Verfügbarkeit eines Gerätes (ohne Wartung) 168 Stunden pro Woche.

Zeit [h pro Woche]	Klasse
> 155	I
151-155	II
146-150	III
< 146	IV

Als **Refraktärzeit** wurde in Anlehnung an [11] die Zeitspanne definiert, die bis zur erneuten Inbetriebnahme nach irreversibler Schädigung der Testorganismen notwendig ist.

Tage	Klasse
≤ 1	I
> 1	IV

Die **Störanfälligkeit** eines Biotestgerätes wurde nach der Häufigkeit der aufgetretenen Störungen (aufgrund von technischen Defekten, Software-Problemen, Verstopfungen von Pumpen und Schläuchen usw.) beurteilt.

Häufigkeit pro Monat	Klasse
1-2 Mal	I
3-4 Mal	II
5-6 Mal	III
> 7 Mal	IV

Für die Bewertung der empfohlenen **Testorganismen** dienten folgende Kriterien

- Platz- und Zeitbedarf für die Anzucht und Hälterung der Testorganismen,
- Standardisierbarkeit der Anzuchtverfahren,
- ganzjährige, konstante Verfügbarkeit von Testorganismen.

Anhand von ja/nein-Entscheidungen erfolgt eine Zuordnung in 4 Klassen.

- Frage nach dem Platzbedarf:  
Werden für die Anzucht und Hälterung der Testorganismen zusätzliche Räume in der Meßstation benötigt ?
- Frage nach dem Zeitbedarf für die Anzucht und Hälterung der Testorganismen:  
Wird weniger oder mehr als 1 Stunde pro Woche benötigt ?
- Frage nach der Standardisierbarkeit der Anzucht.
- Frage nach der ganzjährigen, konstanten Verfügbarkeit von Testorganismen.

Anzahl ja	Klasse
4	I
3	II
2	III
≤1	IV

Für die Beurteilung der Testorganismen war nicht entscheidend, ob bereits Vorschriften zu einer standardisierten oder genormten Zucht existieren. Es mußte lediglich eine standardisierbare Anzucht und Hälterung möglich sein.

Die **Anschaffungskosten** für ein Testgerät umfassen einerseits den Kaufpreis für das eigentliche Testsystem in einfacher Ausstattung mit Auswerteeinheit (PC), andererseits die Kosten für das Zubehör zur Anzucht und Hälterung der Testorganismen.

Höhe der Kosten [DM]	Klasse
< 25.000	I
25.000 - 50.000	II
50.000 - 100.000	III
> 100.000	IV

Zu jedem Biomonitor gehört eine entsprechende EDV-Ausstattung zur Datenauswertung und Alarmwerterkennung sowie Vorrichtungen zur Datenübertragung an einen Stationsrechner. Die **EDV-Ausstattung** der Testgeräte wurde wie folgt beurteilt:

- Vorhandensein serieller Schnittstellen für die Datenaufzeichnung und Datenübertragung auf einen Zentralcomputer (grundsätzliche Forderung an die technische Ausstattung).
- Vorhandensein eines statischen Grenzwertes (Alarmschwelle) oder einer dynamischen Alarmwerterkennung durch das Gerät selbst (grundsätzliche Forderung an einen Biomonitor).
- Möglichkeit der Datenübertragung im einheitlichen Datenformat (ASCII) auf eine Zentralanlage.
- Bedienerfreundlichkeit der Software: Ist nach einer eintägigen Schulung die Software zu bedienen ?

Anhand von ja/nein-Entscheidungen erfolgte die Klassifizierung :

Anzahl ja	Klasse
4	I
3	II
2	III
< 2	IV

Auch der **Platzbedarf** der Testgeräte wurde bewertet. Er umfaßt den für die Installation eines Biomonitor (einschließlich aller Hilfsgeräte) und der Computereinheit benötigten Stellfläche.

Platzbedarf	Klasse
$\leq 1 \text{ m}^2$ und Höhe < 1 m	I
$\leq 1 \text{ m}^2$ und Höhe zwischen 1 und 2 m	II
1,1-2 $\text{m}^2$	II
2,1-3 $\text{m}^2$	III
> 3 $\text{m}^2$	IV
Höhe > 2 m	IV

Bei dem Kriterium **Materialeinsatz** werden die für die Konstruktion eines Biomonitor verwendeten Materialien beurteilt. Unterschieden wird zwischen chemisch inerten und nicht inerten Materialien. Generell wird chemisch inertes Material für all jene Teile des Biomonitor gefordert, die mit dem Testgut in Berührung kommen (Testkammern, zuführende Schläuche, Meßzellen u.s.w.).

Materialeinsatz	Klasse
ausschließlich inerte Materialien	I
vorwiegend inerte Materialien bei kleinem Oberflächen/Volumenverhältnis	II
vorwiegend inerte Materialien bei großem Oberflächen/Volumenverhältnis	III
ausschließlich nicht inerte Materialien	IV

Der **Bewertungsschlüssel** für die Klassifizierung wurde folgendermaßen festgelegt: Die niedrigste Stufe I bedeutet sehr hoch oder sehr gut, die höchste Stufe IV oder VI (je nach der Klassengesamtzahl eines Kriteriums) gering oder nicht geeignet. Die einzelnen Kriterien wurden nach ihrer Relevanz für den praktischen Dauerbetrieb in die **Gewichtungsstufen A bis C** eingeteilt, wobei A sehr wichtig (oder grundsätzliche Anforderung), B wichtig und C weniger wichtig bedeutet (Tab. 1).

Bewertungskriterium	Gewichtung
Sensitivität bei der Gewässerüberwachung	A
Sensitivität im Abwassertest*	A
Standzeit	A
EDV-Ausstattung	A
Störanfälligkeit	A
Verfügbarkeit	A
Plausibilitätsprüfung	A
Sensitivität im Laborversuch	B
Betriebsfreundlichkeit	B
Materialeinsatz	B
Wartungsbedarf	B
Testorganismen	B
Platzbedarf	B
Refraktärzeit	B
Meßbereich	B
Anschaffungskosten	C

\* im Rahmen dieser Maßnahme wurde nur die kurzzeitige Belastung der Testsysteme mit teilgeklärtem Abwasser untersucht.

### Erprobung der Biertestverfahren

Die Testgeräte wurden im kontinuierlichen Betrieb am Rhein in den festen Meßstationen Bimmen, Bad Honnef und Koblenz geprüft. Weiterhin stand für die Erprobung an den Flüssen Rhein und Main ein mobiler Laborcontainer zur Verfügung. Dieser wurde zunächst in der Nähe der Rheinwasser-Untersuchungsstation Mainz/Wiesbaden (bei Rhein-km 500) und anschließend am Untermain unterhalb von Frankfurt eingesetzt [14].

Zur Ermittlung der Sensitivität der Biomonitor wurden Stoffprüfungen einerseits im Labor mit synthetischem Testwasser [15] oder Leitungswasser, andererseits mit Rheinwasser in sogenannten Aufstockungsexperimenten durchgeführt.

In der Meßstation der Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz fanden parallele Aufstockungsexperimente mit den Bakterientestgeräten unter Zugabe von Natriumpentachlorphenolat (Na-PCP, Merck-Schuchardt 820952) als Referenzsubstanz statt. Zur Ermittlung von LOEC-Werten wurde die Konzentrationsreihe 0,025/0,05/0,1/0,5/1,0/1,5 mg/l Na-PCP mindestens zweifach getestet.

Die Algertestgeräte FluOx-Algentest, IfW-Fluorometer, Biosens-Algentoximeter und DF-Algentest wurden in Aufstockungsexperimenten in der Wasserkontrollstation des Landesamtes für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen in Bremen auf ihre Sensitivität gegenüber Atrazin getestet. Alle vier Testgeräte wurden gemeinsam aus einem Turbidostaten mit der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* versorgt. Die EuCyano-Bakterienelektrode wurde unter vergleichbaren Bedingungen mit *Synechococcus spec.* aus einer Batchkultur in einem separaten Aufstockungsexperiment getestet. Atrazin wurde in einer aufsteigenden geometrischen Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 2 von 1 bis 64 µg/l in vier Wiederholungen appliziert.

Aufstockungsexperimente mit den Muschel- und Fischtets wurden in Bremen und Koblenz mit Endosulfan und Natriumpentachlorphenolat durchgeführt. Neben den dem Koblenzer Verhaltensfischtest, dem WRc-Fischmonitor, dem Strömungsfischtest Aqua-Tox-Control und dem Fischwarntest wurden der Dreissena-Monitor und der niederländische Mosselmonitor im Vergleich erprobt. In der Koblenzer Rheinmeßstation wurden parallele Aufstockungsexperimente mit allen Muschel- und Fischtets und Natriumpentachlorphenolat durchgeführt. Die Konzentrationsreihe 120/240/480 µg/l Na-PCP wurde vierfach getestet.

### **Beurteilung der Biotestverfahren**

Anhand der dargestellten Beurteilungskriterien wurden die Testgeräte von der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" bewertet. Im folgenden Kapitel sind die wesentlichen Ergebnisse zusammengefaßt. Die umfassende Beurteilung ist dem Gesamtabschlußbericht [12] zu entnehmen. Kurzbeschreibungen der eingesetzten Testautomaten sowie eine Zusammenstellung der im Rahmen des Verbundprojektes erstellten Veröffentlichungen sind in [13] enthalten.

## Bakterientests

In den **Chemikalienuntersuchungen im Labor** mit reinem Testwasser zeigten von den getesteten Bakterientestautomaten - Toxalarm, Stiptox-norm, Biotoximeter, Lumino 2000 und Regensburger Leuchtbakterientest (RBT) - die ersten drei eine ähnlich empfindliche Reaktion gegenüber Natriumpentachlorphenolat. Der Schwellenwert für Toxalarm lag bei 0,3 mg/l, für Stiptox-norm bei 0,62 mg/l und für das Biotoximeter bei 0,6 mg/l Na-PCP. Deutlich sensibler waren dagegen das Lumino 2000 und der Regensburger Leuchtbakterientest mit Schwellenwerten von 0,01 bzw. 0,05 mg/l Na-PCP (Tab. 2).

Tab 2: Vergleichende Prüfung von Bakterientoximetern: Schwellenwerte für Natriumpentachlorphenolat unter Laborbedingungen mit Leitungswasser oder künstlichem Testwasser

Testsystem	Testorganismus	Schwellenwert (µg/l)
Toxalarm	<i>Pseudomonas putida</i>	300
Stiptox-norm	<i>Pseudomonas putida</i>	620
Biotoximeter	<i>Photobacterium phosphoreum</i> <sup>1</sup>	600
RBT	<i>Photobacterium phosphoreum</i> <sup>1</sup>	50
Lumino 2000	<i>Photobacterium phosphoreum</i> <sup>1</sup>	10

<sup>1</sup> *Photobacterium phosphoreum* als Batchkultur

Auch in den **Aufstockungsversuchen** mit Rheinwasser zeigte Natriumpentachlorphenolat (mit einer Ausnahme) sowohl auf die bakterielle Atmung als auch auf die bakterielle Biolumineszenz eine hemmende Wirkung. Meist war hier der toxische Effekt jedoch deutlich abgeschwächt. Wie die Ergebnisse in Tab. 3 zeigen, lagen die ermittelten LOEC-Konzentrationen zwischen 0,05 und 1,5 mg/l Na-PCP. Toxiguard und der Regensburger Leuchtbakterientest (RBT) verfügten über einen gemeinsamen LOEC-Wert von 0,05 mg/l und waren damit die mit Abstand sensitivsten Bakterientestautomaten. Der LOEC-Wert der EuCyano-Bakterienelektrode lag bei 1,0 mg/l Na-PCP. Eine signifikante Hemmung der Sauerstoffzehrung wurde für Toxalarm bei einer Konzentration von 1,0 mg/l und für Stiptox-norm bei 1,5 mg/l Na-PCP ermittelt. Für das Biotoximeter wurde ein LOEC-Wert von 1,5 mg/l bestimmt. Biox 1000T zeigte keinen Hemmeffekt bis zur höchsten getesteten Konzentrationsstufe von 1,0 mg/l Na-PCP.

Tab. 3: Vergleichende Prüfung von Bakterientoximetern: LOEC-Werte für Natriumpentachlorphenolat in Aufstockungsexperimenten mit Rheinwasser und Klassifizierung der Bakterientestgeräte

Testsystem	Testorganismus	LOEC-Wert ( $\mu\text{g/l}$ )	Klasse
Toxalarm	<i>Pseudomonas putida</i>	1000	V
Stiptox-norm	<i>Pseudomonas putida</i>	1500	V
Toxiguard <sup>1</sup>	Aufwuchs (Biofilm)	50	III
Biox 1000T <sup>2</sup>	Aufwuchs (Biofilm)	(> 1000)	( $\geq$ V)
Biotoximeter <sup>3</sup>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	1500	V
RBT <sup>4</sup>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	50	III
EuCyano-Bakterienelektrode <sup>5</sup>	<i>Escherichia coli</i>	1000	V

1 mit 5 mg/l Citronensäure als zusätzliche C-Quelle

2 mit 8 mg/l Citronensäure als zusätzliche C-Quelle

3 *Photobacterium phosphoreum* als Batchkultur

4 *Photobacterium phosphoreum* aus gefriergetrockneten Bakterienpräparaten (Microtox)

5 *Escherichia coli* als immobilisiertes Bakterienpräparat

Die bereits auf dem Markt erhältlichen Bakterientoximeter Toxalarm, Stiptox-norm und Toxiguard wurden an Rhein und Main auf ihre **Praxistauglichkeit** getestet. Mit einer mittleren Standzeit am Rhein von 7 Tagen und am Main von 6 Tagen erreichte das Toxiguard von den drei Bakterientoximetern die höchste Standzeit. Das Gerät zeichnete sich an beiden Gewässern durch eine hohe Betriebsfreundlichkeit (I), einen geringen Wartungsbedarf (I) und eine recht geringe Störanfälligkeit (II) aus. Die Verfügbarkeit des Gerätes wird allerdings durch die Anzahl vorhandener Austauschbioreaktoren begrenzt: Werden nach einem Schadstoffstoß die Aufwuchsorganismen stark geschädigt, so sind 2 Wochen zur Neuanzucht eines stabilen Biofilms erforderlich. Das Testgerät ist in dieser Zeit nicht voll betriebsfähig. Tritt ein Alarmfall auf, dann verringert sich die Verfügbarkeit auf weniger als 146 Stunden pro Woche (III). Die Refraktärzeit kann bis zu 2 Wochen pro Monat betragen (bis IV). Auch Stiptox-norm erwies sich im praktischen Betrieb an Rhein und Main als sehr betriebsfreundlich, allerdings betrug die mittlere Standzeit nur maximal 4 Tage. Der Wartungsbedarf lag wie beim Toxalarm bei 2 Stunden pro Woche (I). Toxalarm erreichte eine mittlere Standzeit von rund 3 Tagen. Die Häufigkeit der Betriebsstörungen schwankte zwischen 1 und 4 Mal pro Monat. Einen deutlich negativen Einfluß hatte der bei Hochwasser erhöhte Schwebstoffgehalt.

Den kommerziell erhältlichen Bakterientoximetern fehlte - im Gegensatz zu den im Forschungsvorhaben entwickelten Bakterientestgeräten - die als notwendig erachtete EDV-Ausstattung. So war eine Datenfernübertragung bei den für die Erprobung zur

Verfügung gestellten Geräteversionen nicht möglich. Das Toxigard wurde nachträglich mit einer zusätzlichen seriellen Schnittstelle ausgestattet. Bei fast allen Geräten werden weitgehend inerte Materialien für Meßzellen und zuführende Schläuche verwendet, so daß mit wenigen Ausnahmen zumindest Klasse II erreicht wurde. Toxigard und der Regensburger Leuchtbakterientest sind Tischgeräte mit einem besonders geringen Platzbedarf (Klasse I). Die übrigen Geräte wurden bezüglich ihres Platzbedarfes mit Klasse II bewertet. Mit Anschaffungskosten von rund 50.000 bis 100.000 DM liegen die Bakterientestautomaten in den Klassen II bis III.

Eine Bewertung der Praxistauglichkeit (Standzeit, Wartungsbedarf usw.) der anderen Bakterientestgeräte war aufgrund der unzureichenden Erprobung am Gewässer bislang nicht möglich.

### Photosynthesetests

Die Algentests zeichneten sich sowohl in den Labor- als auch in den Aufstockungsexperimenten durch eine hohe Sensitivität gegenüber Herbiziden aus. Unter **Laborbedingungen** sprachen die Testautomaten auf Konzentrationen von 0,95 bis 18,4 µg/l Atrazin an. Der mit der Blaualge *Microcystis aeruginosa* betriebene FluOx-Algentest erwies sich bei der Atrazin-Prüfung als am empfindlichsten, gefolgt vom DF-Algentest, dem Biosens-Algentoximeter und dem IfW-Fluorometer. Die EuCyano-Bakterienelektrode und der Protoplastenbiotest zeigten demgegenüber eine wesentlich geringere Empfindlichkeit (Tab. 4).

Tab. 4: Vergleichende Prüfung von Algentestautomaten: Schwellenwerte für Atrazin unter Laborbedingungen mit Leitungswasser oder künstlichem Testwasser.

Testsystem	Testorganismus	Schwellenwert (µg/l)
FluOx-Algentest	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,9
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	7,1
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	1,0
Biosens-Algentoximeter	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4,6
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	14,6
	<i>Chlorella vulgaris</i>	3,8
IfW-Fluorometer	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	18,4
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	4,2
	<i>Chlorella vulgaris</i>	11,2
DF-Algentest	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	5,7
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	1,4
	<i>Synechococcus PCC 6301</i>	11,1
EuCyano-Bakterienelektrode		
Protoplastenbiotest	<i>Vicia faba</i>	45

In den **Aufstockungsversuchen** am Rhein waren die Algentestgeräte in der Regel um das 2 bis 3-fache empfindlicher als im Labor. Die mit *Chlamydomonas reinhardtii* als Testalge erprobten Geräte reagierten auf Atrazinkonzentrationen von 0,4 bis 5,0 µg/l mit signifikanten Überschreitungen der Alarmschwellen. Der DF-Algentest zeigte mit einem Schwellenwert von 0,4 µg/l Atrazin - gefolgt vom FluOx-Algentest mit 0,9 µg/l Atrazin - die höchste Sensitivität. Für das Biosens-Algentoximeter betrug der Schwellenwert 1,9 µg/l, für das IfW-Fluorometer 5,0 µg/l und für die EuCyano-Bakterienelektrode 33 µg/l Atrazin. Der Protoplastenbiotest wurde nicht getestet (Tab.5).

**Tab. 5:** Vergleichende Prüfung von Algentestautomaten: Schwellenwerte für Atrazin in Aufstockungsexperimenten mit Rheinwasser und Klassifizierung der Photosynthesetests

Testsystem	Testorganismus	Schwellenwert (µg/l)	Klasse
FluOx-Algentest	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,9	I
Biosens-Algentoximeter	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,9	II
IfW-Fluorometer	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5,0	II
DF-Algentest	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,4	I
EuCyano-Bakterienelektrode	<i>Synechococcus PCC 6301</i>	33	III

Im Dauerbetrieb am Rhein bewiesen besonders die Algenfluoreszenztests mit Standzeiten von mindestens 7 Tagen, einer allgemein geringen Störanfälligkeit (Klasse I) und einem geringen Wartungsbedarf (Klasse I bis II) ihre hervorragende Eignung zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Die am Main erprobten Geräte - Biosens-Algentoximeter und DF-Algentest - gewährleisteten hier ebenfalls eine 7-tägige Standzeit. Beide Biomonitorze zeichneten sich auch am Main durch eine hohe Verfügbarkeit, geringe Refraktärzeit, gute Betriebsfreundlichkeit und einen geringen Wartungsbedarf aus (Klasse I bis II).

Hinsichtlich der Kriterien EDV-Ausstattung, Materialeinsatz, Platzbedarf und Anschaffungskosten bestanden zwischen den Testgeräten nur geringe Unterschiede. Alle Testautomaten wurden EDV-mäßig sehr gut ausgestattet, d.h. es werden dynamische Alarmschwellen rechnerintern ermittelt und signifikante Überschreitungen angezeigt. Im Falle von Alarmmeldungen können alle Geräte intern Plausibilitätskontrollen durchführen, wodurch Fehlalarme weitgehend ausgeschlossen werden können. Die Möglichkeit einer Datenfernübertragung wurde für alle Testgeräte realisiert.

Generell wurden jene Geräteteile, die Kontakt mit dem Testgut haben, aus chemisch inerten Materialien gefertigt. Die im Rahmen der Forschungsarbeiten getesteten Algenarten (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* spec.) konnten unter standardisierten Bedingungen bei geringem Zeit- oder Platzbedarf kultiviert werden. Wie aus Tab. 4 ersichtlich, bestanden jedoch deutliche Unterschiede in ihrer Sensitivität.

### Muschel- und Fischtests

Die Ergebnisse der vergleichenden Aufstockungsexperimente der Muschel- und Fischtests mit Natriumpentachlorphenolat sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Weder das Aqua-Tox-Control noch der Fischwarntest zeigten auf die höchste getestete Konzentration von 480 µg/l Na-PCP eine Reaktion. Der WRc-Fischmonitor, der Koblenzer Verhaltensfischtest und der Mosselmonitor reagierten bereits auf die niedrigste getestete Konzentration von 120 µg/l Na-PCP mit signifikanten Überschreitungen der Alarmschwellen. Beim Dreissena-Monitor lag der errechnete Schwellenwert für das Testkriterium "Häufigkeit der Schalenbewegungen" bei 130 µg/l Na-PCP.

Tab. 6: Vergleichende Prüfung von Fisch- und Muscheltests: LOEC-Werte für Natriumpentachlorphenolat in Aufstockungsexperimenten mit Rheinwasser und Klassifizierung der Testgeräte

Testsystem	Testorganismus	LOEC-Wert (µg/l)	Klasse
Aqua-Tox-Control	<i>Leuciscus idus melanotus</i>	(>480)	(≥ IV)
Koblenzer Verhaltensfischtest	<i>Leuciscus idus melanotus</i>	120	IV
Fischwarntest	<i>Leuciscus idus melanotus</i>	(>480)	(≥ IV)
WRc-Fischmonitor	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	120	IV
Dreissena-Monitor	<i>Dreissena polymorpha</i>	240	IV
Mosselmonitor	<i>Dreissena polymorpha</i>	120	IV

In der Rheinmeßstation Kleve-Bimmen wurden zusätzlich Aufstockungsexperimente mit Endosulfan durchgeführt. Besonders sensitiv reagierte dabei der WRc-Fischmonitor. Der LOEC-Wert betrug 1,76 µg/l Endosulfan, während der parallel getestete Strömungsfischtest Aqua-Tox-Control bis zur höchsten geprüften Konzentration von 12,8 µg/l Endosulfan keine signifikante Reaktion zeigte.

Der Fischwarntest, der Strömungsfischtest Aqua-Tox-Control, der WRc-Fischmonitor und der Dreissena-Monitor wurden sowohl am Rhein als auch am Main getestet. Von

den Fischtests erwies sich der Fischwarntest als besonders einfach handhabbar, bedienerfreundlich und wenig störanfällig. Der WRc-Fischmonitor konnte während der mehr als einjährigen Testphase am Rhein seine Praxistauglichkeit unter Beweis stellen: Bei lediglich 2 bis 3 Stunden Wartungsaufwand pro Woche und einer Standzeit von mindestens 7 Tagen ist der WRc-Fischmonitor bedienerfreundlich und wenig störanfällig. In den Sommermonaten des Jahres 1992 kam es jedoch am Main zu häufigen Betriebsausfällen, da die als Testfische eingesetzten Forellen die Flusswassertemperatur von rund 25 °C nicht vertrugen. Auch der Koblenzer Verhaltensfischtest zeigte während seines Einsatzes am Rhein gute Resultate bezüglich Standzeit, Wartungsbedarf und Bedienerfreundlichkeit. Die im Laborcontainer an Rhein und Main getestete Gerätversion des Strömungsfischtests Aqua-Tox-Control schnitt dagegen schlechter ab. Das Gerät zeigte sich als wenig bedienerfreundlich und recht störanfällig [14]. Jedoch betrug auch hier die Standzeit in der Regel 7 Tage. Für Wartungsarbeiten wurden rund 4 Stunden pro Woche benötigt.

Der Dreissena-Monitor zeigte im Dauerbetrieb am Rhein eine hohe Praxistauglichkeit. Allerdings verursachten am Main die extrem hohen Wassertemperaturen eine erhöhte Mortalität der Zebramuscheln. Dies führte zu einem erhöhten Wartungsaufwand und einer Standzeit von weniger als einer Woche. Wegen fehlender Erfahrungen im Dauerbetrieb konnte für den Mosselmonitor keine Bewertung abgegeben werden.

Im Vergleich zu den anderen Testgeräten fiel der WRc-Fischmonitor aufgrund seines hohen Platzbedarfs und der hohen Anschaffungskosten auf. Mit Ausnahme der Strömungsfischtests verfügen alle Geräte über eine sehr gute EDV-Ausstattung mit interner Alarmschwellenberechnung und einer umfassenden geräteinternen Plausibilitätskontrolle.

## Diskussion

Atrazin ist ein Herbizid, dessen phytotoxische Wirkung auf einer Blockierung des Elektronentransportes des Photosystems II der Photosynthese beruht [16]. In der Gruppe der Photosynthesetests reagierten die Algenfluoreszenztests mit Schwellenwerten von teilweise < 1 µg/l Atrazin besonders empfindlich. Unabhängig von Testgerät und Meßparameter sind zwischen verschiedenen Algenarten deutliche Unterschiede in ihrer Sensitivität zu erkennen. Vergleichende Untersuchungen an Blau- und Grünalgen zeigen, daß Blaualgen sensibler und auch schneller auf Atrazin reagieren als Grünalgen [17]. Bei Messung der verzögerten Fluoreszenz bei Grünalgen weist *Chlamydomonas reinhardtii* im Vergleich zu *Scenedesmus subspicatus* und *Chlorella vulgaris* die kürzeste Ansprechzeit auf. Die größere Atrazin-Empfindlichkeit der Blaualgen steht in Einklang mit publizierten Befunden: Im Zellvermehrungshemmtest wurden toxische Grenzkonzentrationen für die Blaualge *Microcystis aeruginosa* von 3 µg/l und für die Grünalge *Scenedesmus subspicatus* (der Teststamm wurde vormals *Scenedesmus quadricauda* zugeordnet) von 30 µg/l Atrazin ermittelt [18]. Zu beachten ist jedoch, daß die hier dargestellten Befunde die Variabilität der Kontrollmessungen mit einer dre- bzw. vierfachen Standardabweichung berücksichtigen. Die in der Literatur angegebenen Wirkkonzentrationen (EC-Werte)

wurden mit anderen statistischen Verfahren berechnet und sind daher mit den vorliegenden Schwellen- und LOEC-Werten nur bedingt zu vergleichen. Darüber hinaus beziehen sich die Literaturwerte auf das Algenwachstum.

Natriumpentachlorphenolat weist ein breites Wirkungsspektrum auf und wird daher häufig als Referenzchemikalie verwendet. Seine toxische Wirkung beruht u.a. auf einer Entkopplung der Elektronentransportübergänge in der Atmungskette [19]. Besonders empfindlich reagierten das Bakterientoximeter Toxiguard und der Regensburger Leuchtbakterientest. Die in den verschiedensten Toximetern ermittelten Befunde zeigen, daß neben dem verwendeten Testorganismus und dem gemessenen Testparameter auch das Testgerät selbst einen hohen Einfluß auf die Sensitivität des Biomonitoring auszuüben vermag. Verursacht wird dieses unter anderem durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse und Kontaktzeiten.

In den vergleichenden Aufstockungsexperimenten der Muschel- und Fischtests lagen die LOEC-Werte für Natriumpentachlorphenolat bei 120 bis 240 µg/l. Die Strömungsfischtests (Aqua-Tox-Control und Fischwarntest) zeigten auch bei der höchsten geprüften Konzentration von 480 µg/l Na-PCP keine Reaktion. Wo die Empfindlichkeitsschwelle dieser dynamischen Fischtests tatsächlich liegt, wurde aufgrund der gesetzlichen Vorgaben für Versuchsdurchführungen nicht untersucht.

Die Zahl der Alarmsmeldungen durch die am Rhein installierten Strömungsfischtests nahm in den letzten Jahren im Vergleich zu den 70er und 80er Jahren deutlich ab. So wurde in Nordrhein-Westfalen im Jahre 1991 nur einmal durch den Strömungsfischtest Aqua-Tox-Control ein Alarm ausgelöst [20]. Dieses ist Ausdruck einer verbesserten Umweltsituation und Störfallvorsorge. Für die Gewässerüberwachung sind somit Fischtestverfahren, die sensitivere Parameter als die Rheotaxis messen, erforderlich. Die Notwendigkeit Fischtestverfahren bei der Gewässerüberwachung einzusetzen, wird kontrovers diskutiert: So gibt es Bestrebungen, den statischen Fischtest im Bereich des Abwasserabgabengesetzes aus Tierschutzgründen durch alternative Verfahren (z.B. Embryolarven- oder Fischzellkulturtest) zu ersetzen. Ob im Rahmen der Gewässerüberwachung fischtoxische Substanzen durch eine aus Kleinkrebsen, Muscheln und anderen wirbellosen Testorganismen bestehende Testpalette zu detektieren sind, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## **Schlußfolgerung**

Biotestverfahren mit Testorganismen verschiedener Trophiestufen können einander nicht ersetzen. Ein biologisches Effektmonitoring sollte daher mit Vertretern der drei trophischen Ebenen: Destruenten (Bakterien), Produzenten (photosynthetisch aktive Organismen) und Konsumenten (Tiere) durchgeführt werden.

Der Dynamische Daphnientest wurde bereits von der Deutschen und der Internationalen Rheinschutzkommission zur Implementation empfohlen [21]. Da die im Projekt entwickelten Algenfluoreszenztests sehr gute Resultate sowohl bei den Chemikalieneinprüfungen als auch während der Dauererprobung am Gewässer zeigten, wird von

der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" an zweiter Stelle der Empfehlungsliste nach dem Dynamischen Daphnientest ein kontinuierlicher Algenfluoreszenztest zur Anwendung vorgeschlagen. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse wird dem DF-Algentest, der auf der Messung der verzögerten Fluoreszenz beruht, der Vorzug gegeben. Gute Ergebnisse zeigten aber auch die auf der spontanen Fluoreszenz basierenden Testverfahren. Das Bakterientoximeter Toxiguard und der Regensburger Leuchtbakterientest haben sich im Aufstockungsexperiment gegenüber den anderen getesteten Bakterientoximetern als vergleichsweise sensitiv erwiesen. Da dem Leuchtbakterientest in der Abwasserüberwachung eine besondere Rolle zukommt [22], wird der Implementation eines automatisierten Leuchtbakterientests Priorität zugemessen. Von den Muschel- und Fischttests hat der Dreissena-Monitor seine Praxistauglichkeit unter Beweis gestellt. Der Einsatz eines Muscheltests erscheint als weiteres Testsystem in einer Testbatterie mit vierter Priorität sinnvoll.

Auf die Empfehlung eines Fischttests wird verzichtet. Die auf dem Markt erhältlichen Fischttestautomaten sind für die Gewässerüberwachung nicht geeignet oder die Erprobungsphase ist noch nicht abgeschlossen. Gründe sind u.a. die mangelnde Sensitivität (Aqua-Tox-Control, Fischwarntest) oder der Platzbedarf, die Kosten und die bei hohen Gewässertemperaturen fehlende ganzjährige Verfügbarkeit (WRc-Fischmonitor). Im Gegensatz hierzu steht der Koblenzer Verhaltensfischtest, der Änderungen im Verhaltensmuster eines kleinen Testfischschwarmes zur Detektion von Schadstoffwellen verwendet [23]. Eine deutliche Steigerung der Fischtestempfindlichkeit wird hierdurch erwartet.

## Literatur

1. STOCK, H.-D.: Pestizidbelastung von Oberflächengewässern in Nordrhein-Westfalen. In: Pestizide im Gewässer. Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf, 1988, LWA-Materialien 2/88
2. IRMER, U., WOLTER, R. und KUSSATZ, C.: Problembereich Pflanzenschutzmittel aus wasserwirtschaftlicher Sicht. Schriftenreihe Agrarspectrum (Frankfurt am Main) 21, 1993, 22-23
3. GERHARDT, V. und PUTZGER, J.: Ein Biotest zur Gewässerüberwachung auf der Grundlage der verzögerten Fluoreszenz von Algen. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 277-284
4. MERSCHHEMKE, C. und REGH, W.: Das FluOx-Meßsystem - Ein automatisches Algentestgerät zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 285-294
5. NOACK, U. und WALTER, J.: Das Biosens-Algentoximeter in der kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 305-310

6. STEIN, P.: Bakterienelektrode mit *Synechococcus* und *Escherichia coli*: Ein kontinuierliches Testsystem zur Online-Überwachung von Oberflächengewässern. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 269-276
7. BLESSING, B., FRITZ-LANGEN, H. und KREBS, F.: Einsatz von Bioreaktoren zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 247-254
8. FRITZ-LANGEN, H., BLESSING, B. und KREBS, F.: Einsatz von Bakterientoximetern mit separater Zellanzucht zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 255-268
9. CAIRNS, JR., J. and VAN DER SCHALIE, W. H.: Biological monitoring, Part I - Early warning systems. Water Research 14, 1980, 1179-1196
10. DIAMOND, J., COLLINS, M. and GRUBER, D.: An overview of automated biomonitoring - past developments and future needs. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.): Automated biomonitoring - living sensors as environmental monitors. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988, 23-39
11. Verein deutscher Ingenieure: Grundlagen zur Kennzeichnung vollständiger Meßverfahren - Begriffsbestimmungen. VDI-Richtlinien, VDI 2449. VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 5, 1987
12. Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)": Kontinuierliche Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins. Abschlußbericht des BMFT/UBA-Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins". Umweltbundesamt, Berlin. UBA-Berichte, 1994 (in Vorbereitung)
13. SCHMITZ, P., IRMER, U. und KREBS, F.: Automatische Biertestverfahren in der Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994
14. PUZICHA, H.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 6: Der Laborcontainer. Projektleitung I. Seydel, K. Digel und T. Ehlscheid. Landesamt für Wasserwirtschaft Rheinland-Pfalz, Mainz, in Zusammenarbeit mit der Hessischen Landesanstalt für Umwelt, Wiesbaden, 1993
15. DIN 38412, Teil 30: Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen (L30). Deutsche Norm. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Beuth Verlag, Berlin, 1989

16. BOGER, P. und VETTER, H.: Herbizide im modernen Pflanzenbau. Naturwissenschaftliche Rundschau 6, 1977, 322-331
17. GERHARDT, V. und PUTZGER, J.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins, Abschlußbericht von Teilvorhaben 5: DF-Algentest und Leuchtbakterientest. Institut für Physik II der Universität Regensburg, 1993
18. BRINGMANN, G. und KÜHN, R.: Grenzwerte der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Blaualgen (*Microcystis aeruginosa*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*) im Zellvermehrungshemmtest. Vom Wasser 50, 1978, 45-60
19. Lee, D. R.: Reference toxicants in quality control of aquatic bioassays. In: A. L. Buikema, Jr. and J. Cairns, Jr. (eds.): Aquatic invertebrate bioassays. American Society for Testing and Materials. ASTM STP 715, 1980, 188-199
20. VON DANWITZ, B., MERSCHHEMKE, C., LÖBBEL, H. und STEIN, P.: Zeitnahe Gewässerüberwachung mit kontinuierlichen Biotests. Gewässerschutz, Wasser, Abwasser 134, 1992, 55-65
21. Internationale Kommission zum Schutze des Rheins gegen Verunreinigung: Anwendbarkeit von Biotestverfahren für die Emissions- und Immissionsüberwachung des Rheins. Veröffentlichung der Internationalen Kommission zum Schutze des Rheins gegen Verunreinigung im Rahmen des Aktionsprogramms "Rhein", APR-Nr. 18, 1990
22. KREBS, F.: Der Leuchtbakterientest für die Wassergesetzgebung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 591-624
23. BLÜBAUM-GRONAU, E., HOFFMANN, M., SPIESER, O. H. und KREBS, F.: Der Koblenzer Verhaltensfischtest, ein auf dem Meßsystem BehavioQuant beruhender Biomonitor zur Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1994



# **Erprobung von on-line betriebenen Biotestsystemen für die Gewässer-überwachung und Ergebnisse aus Untersuchungen mit teilgeklärtem industriellem Abwasser**

Heike Puzicha

## **Zusammenfassung**

In den letzten Jahren sind zu den implementierten biologischen on-line-Biomonitoren am Rhein (Dynamischer Daphnientest, Aquatox-Strömungsfischtest und Fischfrühwarntest) weitere 9 Biomonitor für die Oberflächengewässerüberwachung neu entwickelt und von uns erprobt worden. In einem mobilen Meßcontainer wurden insgesamt 12 Biotestsysteme an zwei verschiedenen Gewässerstandorten auf Wartungsaufwand, Störanfälligkeit, Standzeit und Aussagefähigkeit der Meßdaten überprüft. Soweit zeitgleich Biotestgeräte einer Organismengruppe (Bakterien, Algen, Fische) zur Verfügung standen, wurden sie auf ihre Ansprechempfindlichkeit getestet und miteinander verglichen. Die im Untersuchungszeitraum aufgetretenen 31 Gewässeralarme von 1990 - 1993 an Rhein und Main sind jeweils auf Echtheit überprüft worden.

Zudem wurden Untersuchungen zur Wirkung von Abwasser auf Testorganismen der verschiedenen Organismengruppen durchgeführt. Dazu wurde teilgeklärtes, industrielles Abwasser kurzzeitig bis zu 5 Biotestsystemen parallel zugeführt, so daß die Reaktionen der Testorganismen in den Geräten einer solchen Testserie direkt miteinander verglichen werden konnten. Dabei wird die Reaktionszeit als die Zeit bis zur Alarmauslösung, die Reaktionsdauer als die Gesamtdauer der Reaktion der Testorganismen auf die zugegebene Belastung und das Reaktionsmuster des Reaktionsverlaufes registriert.

Für den Einsatz in Stationen entlang des Rheins und anderer Gewässer erscheint je ein Biotestsystem aus einer Organismengruppe als empfehlenswert. Von den vergleichend getesteten Algentoximetern auf Fluoreszenzbasis hat sich das DF-Algentoximeter aufgrund hoher Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit bewährt. Der Muschelmonitor ist wegen seiner ausgereiften, anwenderfreundlichen Software empfehlenswert. Der Dynamische Daphnientest wurde bereits 1992 offiziell empfohlen [1]. Unter den kontinuierlich betriebenen Fischtests kann zur Zeit keiner empfohlen werden. Von den geprüften Bakterientoximetern ist zur Zeit kein Testsystem für den Einsatz in Gewässerstationen geeignet, da sie in der Datenerzeugung und -weiterleitung rückständig sind und eine Bewertung von Alarmereignissen schwer möglich ist.

## **Summary**

In addition to the biological on-line monitoring systems implemented along the Rhine river (dynamic daphnia test, Aquatox flow fish test and early warning fish test), 9 other biomonitor for surface water have been developed and tested by us in recent years. In a mobile measuring container, a total of 12 biotest systems were examined at two different sites for susceptibility to interference, expenditure on maintenance, maintenance-free period, and evidence of the data obtained. If several biotest devices were available simultaneously for one group of organisms (bacteria, algae, fish), they were tested for their response sensitivity and compared with one another. Thirty-one cases of water alarm which occurred between 1990 and 1993 at the Rhine and Main rivers were investigated for their causes and justification.

Moreover, the effect of waste water on test organisms of various groups was investigated by introducing simultaneously partially treated industrial waste water into 5 biomonitor for a short period of time so that the reactions of the test organisms in each device of such a test series were directly comparable. For these tests, the reaction period was recorded, i.e. the time until alarm was triggered, the duration of reaction, i.e. the total duration of the reaction of the test organisms to the contaminated water introduced, and the reaction pattern of the course of reaction.

It seems to be recommendable that one biotest system from one group of organisms be used in stations along the Rhine river and other waters. From the algae toximeters operating on the basis of fluorescence measurements, the DF algae toximeter has proved to be reliable and sensitive. The mussel monitor is recommendable owing to its sophisticated and user-friendly software. The dynamic daphnia test was recommended as official method already in 1992. None of the fish tests examined under conditions of continuous operation can be recommended at the present time. None of the bacteria toximeters tested is suitable at present for use in water stations since they are sub-standard as to the generation and transmission of data so that an evaluation of cases of alarm is difficult.

## **Einleitung**

Oberflächengewässer sind durch Umweltchemikalien potentiell gefährdet. Mit Hilfe von biologischen Schnelltests sollen mögliche Schadstoffe im Wasser so frühzeitig wie möglich erkannt werden. Zu diesem Zweck wurden für die verschiedenen Organismengruppen (Algen, Bakterien, Muscheln, Kleinkrebse und Fische) jeweils mehrere kontinuierlich betriebene Biomonitor entwickelt. Für die Eignung eines Testorganismus waren folgende Bedingungen vorrauszusetzen: hohe Empfindlichkeit, Verfügbarkeit, Reproduzierbarkeit, Vitalität und Meßbarkeit der Reaktion. Hierbei macht man sich die Erkenntnis zunutze, daß (wasserbewohnende) Organismen auf Grund physiologischer Prozesse, z.B. Photosynthese- und Atmungsintensität oder Bewegungsaktivität sehr empfindlich auf veränderte Umweltbedingungen - so auch auf

Schadstoffbelastungen - reagieren. Diese eingesetzten Organismen haben in der praktischen Gewässerüberwachung auf Ereignisse reagiert. Die Einflüsse der Umgebungsfaktoren auf die Haupt- und Begleitparameter sowie die Bedeutung des Zeitraumes der Reaktionen der Testorganismen wurden untersucht, um auffallende Signale von Falschsignalen zu unterscheiden.

Es wurden testspezifische Grenzwerte ermittelt, deren Überschreitung zur Alarmauslösung führt. Anhand von Labor- und Praxisuntersuchungen zu den einzelnen Parametern eines Testsystems, z.B. beim DF-Algentoximeter: Gesamtintegral, Dunkelrate, Eigenfluoreszenz, u. a., wurde eine Bewertung von Alarmsignalen erarbeitet.

In den letzten 4 Jahren sind zu den implementierten biologischen on-line-Biomonitoren am Rhein (Dynamischer Daphnientest, Aquatox-Strömungsfischtest und Fischfrühwarntest) weitere 9 Biomonitore für die Oberflächengewässerüberwachung neu entwickelt und von uns erprobt worden. In einem mobilen Meßcontainer wurden insgesamt 12 Biotestsysteme an zwei verschiedenen Gewässerstandorten auf Wartungsaufwand, Störanfälligkeit, Standzeit und Aussagefähigkeit der Meßdaten überprüft. Soweit zeitgleich Biotestgeräte einer Organismengruppe (Bakterien, Algen, Fische) zur Verfügung standen, wurden sie auf ihre Ansprechempfindlichkeit getestet und miteinander verglichen.

#### **Einsatzdauer der im Container getesteten Biomonitore**

<b>Biomonitor</b>	<b>Meßprinzip</b>	<b>Einsatzdauer</b>
<b>Organismengruppe: Muscheln, Daphnien, Fische</b>		
Aquatox-Strömungsfischtest	Veränderung d. rheotakt. Schwimmverhaltens	18 Monate
Fischfrühwarntest	Veränderung d. rheotakt. Schwimmverhaltens	13 Monate
WRC-Fischmonitor	Kiemendeckelschlagfrequenz	4 Monate
DM-Muschelmonitor	Öffnungszustand und Schalenbewegung	5 Monate
Dyn. Daphnientest	Änderung d. Schwimmverhaltens	28 Monate

<b>Biomonitor</b>	<b>Meßprinzip</b>	<b>Einsatzdauer</b>
<b>Organismengruppe: Algen</b>		
DF-Algentoximeter	Differenz d. verzögerten Fluoresz. z. Kontrolle	9 Monate
AT01-Algentoximeter	Spontane, variable Chlorophyll a-Fluoreszenz	9 Monate
IFW-Algentoximeter	Spontane, variable Chlorophyll a-Fluoreszenz	6 Wochen
FluOx-Algentoximeter	kombinierte Fluoreszenz- u. Sauerstoff-Signale	6 Wochen

## **Organismengruppe: Bakterien**

ToxAlarm-Bakterientest	Hemmung der bakteriellen Sauerstoffzehrung	6 Wochen
Toxiguard-Bakterientest	Hemmung der bakteriellen Sauerstoffzehrung	6 Wochen
STIPTOX-norm-Bakt.test	Hemmung der bakteriellen Sauerstoffzehrung	6 Wochen

Die aufgezählten Biotestsysteme standen je nach Entwicklungszustand für mehrere Wochen bis zu mehreren Monaten zur Erprobung bereit.

## **Datenerfassung und Auswertung**

Die Datenauswertung der on-line-betriebenen biologischen Monitore erfolgte weitgehend über eine Datenzentrale innerhalb der mobilen Laborstation. Einige der Biotestgeräte besaßen im Untersuchungszeitraum ein veraltetes oder ein unübliches Datenerfassungssystem, welches nicht in einem ausreichenden Umfang an die zentrale Auswerteeinheit angeschlossen werden konnte. Die Alarmwertüberschreitungen wurden von einigen Testgeräten automatisch angezeigt, teilweise akustisch oder bildschirmoptisch deutlich gemacht (z.B. WRC-Fischmonitor, Muschelmonitor, DF- Algatest, Stiptox-Bakterientest) oder mußten bei den Testgeräten ohne automatische Alarmangabe über die tägliche bzw. wöchentliche Auswertung der Verlaufskurven bestimmt werden. Eine solche Auswertung war aufwendiger, aber ebenso verlässlich. Automatische Grenzwertüberschreitungen wurden auf ihre Plausibilität hin kontrolliert. Die Alarne werden entweder für die Dauer eines Meßzyklus angezeigt (und abgespeichert) oder solange, bis der Alarm vor Ort manuell abgestellt wurde.

## **Auslösezeitpunkt und Dauer eines Gerätealarms**

Ab welchem Moment ein Biotestautomat bei einer passierenden Schadstoffwelle Alarm auslöst, ist von der Empfindlichkeit der Organismen im System und der geräteinternen Meßzyklusdauer (5, 10, 20, 30 Min) abhängig. Innerhalb eines Meßzyklus wurde die Berechnung der Parameter (z.B. der effektiven Toxizität und die dynamische Grenzwertbildung) abgeschlossen und anschließend ausgegeben. Ebenso muß die Zeitspanne der Förderung des Flußwassers bis zum Eintreten in das Testsystem bei vorheriger Filtrierung und Temperierung des Flußwassers berücksichtigt werden. Auch ist zu beachten, daß eine Weile benötigt wird, um die Darstellung der aktuellen Meßdaten auf der zentralen Auswerteeinheit ansehen zu können. Aufgrund der genannten Faktoren kann es trotz sofortiger Reaktion der Testorganismen auf einen toxischen Stoff zu einer zeitverzögerten Alarmauslösung kommen. Eine in einem relativ eng begrenzten Zeitraum auftretende Alarmanzeige von mehreren parallel betriebenen Biotestautomaten wird als Synchronalarm bezeichnet (Tab. 1 und 2).

Tab. 1: Registrierte Gewässeralarme am Rhein 1991  
durch parallel betriebene Biomonitor

Datum	Dyn.Daphnt.	Aquatox-Fischt.	Fischfrühwarnt.	AT01-Algentox.
	Daphnien	Goldorfen	Goldorfen	Scenedesmus
04.12.90	+	+	-	( )
15.01.91	+	-	-	( )
22.01.91	+	+	-	( )
04.02.91	+	+	-	( )
13.03.91	+	-	-	+
22.03.91	+	-	-	+
07.04.91	+	+	+	+
12.04.91	+	+	-	+
15.04.91	+	-	-	+
26.04.91	+	-	( )	-
28.04.91	+	-	( )	+
11.05.91	+	+	( )	-

Legende:

+= Alarm

+,+ = Alarm zweier gleicher Testgeräte

- = Biotest ohne Alarmsignale

( ) = Biotest war zum Zeitpunkt nicht installiert

+- = Alarm undeutlich

Tab. 2: Registrierte Gewässeralarme am Main 1991 und 1992 durch parallel betriebene Biomonitor

Datum	D.Dapht. <sup>1</sup> Daphnien	Aquatox Goldorfen	AT01-Algt. Chlamyd.	DF-Algt. Chlamyd.	WRC-F. Forellen	DMuschel Dreissena
23.08.91	+	0	+ <sup>2</sup>	( )	( )	( )
27.08.91	+	+	0 <sup>2</sup>	( )	( )	( )
15.09.91	+	+	+ <sup>2</sup>	( )	( )	( )
12./13.11.	+,+	+	( )	( )	( )	( )
14.12.91	0	+	( )	( )	( )	( )
21.12.91	+	0	( )	+ <sup>2</sup>	( )	( )
03.01.92	+	( )	( )	-	( )	( )
08.02.92	-,-	( )	( )	+	( )	( )
15.02.92	-,-	( )	( )	+	( )	( )
04.03.92	-,-	( )	( )	+	( )	( )
19.03.92	+,+	( )	( )	-	( )	( )
25.03.92	+-,	( )	( )	-	( )	( )
29.03.92	-,-	( )	( )	+	( )	( )
06.05.92	+	( )	( )	-	-	-
27.05.92	-	( )	-	-	+	-
07.07.92	+	( )	+-	+-	+	-
16.07.92	-	( )	-	+	( )	( )
25.08.92	+	( )	( )	-	( )	( )
06.09.92	-	( )	( )	+	( )	( )

Ende der Testphase am Main Ende September 1992.

1 Die Angabe eines zweiten Bewertungszeichens bezieht sich auf den Testbetrieb eines weiteren baugleichen Daphnientestgerätes

2 Testbetrieb mit *Scenedesmus subspicatus*, anschließend mit *Chlamydomonas reinhardtii*.

Legende:

+ = Alarm

+,- = Alarm zweier gleicher Testgeräte

- = Biotest ohne Alarmsignale

( ) = Biotest war zum Zeitpunkt nicht installiert

+- = Alarm undeutlich

Die in der Tabelle 1 und 2 angegebenen 31 Gewässeralarme von 1990-1993 an Rhein und Main sind jeweils auf Echtheit überprüft worden. Es wurden testspezifische Alarmwerte signifikant überschritten. Mögliche Fehlerquellen wie technische Ausfälle, Durchfluß-störungen, Bedienungsfehler oder nicht valide Meßdaten konnten nach Überprüfung der Vor-Ort-Situation ausgeschlossen werden.

Bei Betrachtung der aufgelisteten Gewässeralarme (Tab. 1 und 2) fiel auf, daß nicht zwangsläufig bei Alarmauslösung z. B. eines Fischtestsystems auch eine Alarmmeldung eines Algen- oder Bakterientoximeters auftreten muß (s. Beispiel vom 27.5.92). Tatsächlich gab es in der gesamten Untersuchungszeit von 3 Jahren nur wenige Male Ereignisse, bei denen mehr als zwei Biotestsysteme gleichzeitig Alarm gegeben haben (s. Beispiel vom 7.4.91, 15.9.91 und vom 7.7.92). 1991 gab es am Rhein mehrere Synchronalarme durch Goldorfen und Daphnien. Am Main zeigten Forellen und Daphnien nur am 7.7.92 einen Synchronalarm. An diesem Tag zeigten auch die beiden Algentoximeter einen Effekt an, so daß von einem unspezifisch wirkenden Wasserinhaltsstoff in relativ hoher Konzentration ausgegangen werden mußte. Über die Alarmhäufigkeit am Gewässer innerhalb der Gruppe der Algentests untereinander, der Bakterientests untereinander oder zwischen Muschel-, Wasserfloh- und Fischtoxiometern kann aufgrund der kurzen zeitgleichen Einsatzzeit keine Aussage über das empfindlichere System der jeweiligen Gruppe getroffen werden. Darüber konnten die Ergebnisse der Untersuchungen mit teilgeklärtem Abwasser mehr Aufschluß geben.

### **Untersuchungen mit teilgeklärtem industriellen Abwasser**

Um die Auslösung und Dauer der biologischen Reaktion auf einen Schadstoff von der gerätespezifischen Dauer bis zur Auslösung eines Alarms unterscheiden zu können, ist für alle verwendeten Testorganismen ein toxischer Stofftest nötig. Anhand der Untersuchungen mit zugegebenem teilgeklärten industriellen Abwasser zu einem bestimmten Zeitpunkt konnte diese Fragestellung beantwortet werden.

Bis zu 5 Biotestsysteme wurden parallel dem gleichen Abwasser ausgesetzt. Die Reaktionen der Testgeräte einer solchen Testserie können direkt miteinander verglichen werden. Dabei wird die Reaktionszeit als die Zeit bis zur Alarmauslösung, die Reaktionsdauer als die Gesamtdauer der Reaktion der Testorganismen auf die zugegebene Belastung und das Reaktionsmuster des Reaktionsverlaufes registriert.

Die einzelnen Testserien unterscheiden sich hinsichtlich der Testwasserverdünnung (Verdünnung des teilgeklärten Abwassers mit aktuellem Flußwasser 1:1, 1:2, 1:3, 1:4), Testwasserbelüftung (mit oder ohne Belüftung) und Dauer des Testwasserzuflusses (1-100 min). Die Temperaturen des Abwassers wurden denen des Flußwassers angepaßt. Eine Zusammenstellung der durchgeföhrten Abwassertests mit Angabe der Testbedingungen kann der "Liste der durchgeföhrten Tests mit teilgeklärtem Abwasser" (Tab. 3) entnommen werden [2].

Tab. 3: Liste der durchgeführten Tests mit teilgeklärtem Abwasser

Test- serie	Testwasser- konzentration	Testwasser- zufluß	parallel getestete Geräte	Reaktion
1.	unverd.	25 min 30 min	Dynamischer Daphnientest Muschelmonitor	- ++
2.	unverd.	25 min	Dynamischer Daphnientest Muschelmonitor DF-Algentest	++ ++ ++
3.	unverd.	20 min	Dynamischer Daphnientest Muschelmonitor DF-Algentest	0 + ++
4.	unverd. mit Belüftung	18 min	Dynamischer Daphnientest Muschelmonitor DF-Algentest	- ++ ++
5.	unverd. mit Belüftung	67 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest	++ +
6.	unverd. mit Belüftung	30 sec	WRC-Fischmonitor	++
7.	Verdünnung 1:2 mit Belüftung	50 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest Muschelmonitor	0 + ++
8.	Verdünnung 1:2 mit Belüftung	100 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest Algentoximeter (Biosens)	++ ++ -
9.	Verd. 1:2 mit Belüftung	4 min	WRC-Fischmonitor	-
10.	Verdünnung 1:2 mit Belüftung	55 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest Algentoximeter (Biosens)	++ ++ -
11.	Verdünnung 1:3 mit Belüftung	100 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest Algentoximeter (Biosens)	++ ++ 0
12.	Verdünnung 1:3 mit Belüftung	49 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest Algentoximeter (Biosens)	++ ++ -
13.	Verdg. 1:3 mit Belüftung	8 min	WRC-Fischmonitor	-
14.	Verdg. 1:4 mit Belüftung	11 min	WRC-Fischmonitor	++

Fortsetzung Tab. 3: **Liste der durchgeführten Tests mit teilgeklärtem Abwasser**

Test- serie	Testwasser- konzentration	Testwasser- zufluß	parallel getestete Geräte	Reaktion
15.	unverd. mit Belüftung	42 min	DF-Algentest Algентoximeter (Biosens)	++ -
16.	Verdg. 1:6 mit Belüftung	40 min	DF-Algentest Algентoximeter (Biosens)	+
17.	unverd. mit Belüftung	60 min	DF-Algentest Algентoximeter (Biosens)	++ -
18.	Verdünnung 1:2 mit Belüftung	60 min	DF-Algentest Algентoximeter (Biosens) Dynamischer Daphnientest Muschelmonitor	++ - 0 +
19.	unverd. mit Belüftung	40 min	DF-Algentest Algентoximeter (Biosens)	++ -
20.	unverd. mit Belüftung	113 min	Dynamischer Daphnientest Bakterientest STIPTOX-norm Bakterientest Toxiguard Bakterientest Tox-Alarm	++ 0 ++ 0
21.	unverd. mit Belüftung	17 min	Dynamischer Daphnientest Bakterientest STIPTOX-norm Bakterientest Toxiguard Bakterientest ToxAlarm	++ ++ ++ -
22.	unverd. mit Belüftung	40 min	Dynamischer Daphnientest Bakterientest STIPTOX-norm Bakterientest Toxiguard Bakterientest ToxAlarm	++ + ++ -
23.	unverd. mit Belüftung	30 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest Bakterientest STIPTOX-norm Bakterientest Toxiguard Bakterientest ToxAlarm	++ ++ 0 + -
24.	unverd. mit Belüftung	62 min	Dynamischer Daphnientest DF-Algentest Bakterientest STIPTOX-norm Bakterientest Toxiguard Bakterientest ToxAlarm	++ ++ + ++ 0

[++ deutlicher Effekt, + Effekt, 0 Effekt nicht eindeutig, - kein Effekt]

Die Unterschiede in der Wirkung der Abwasserbelastung auf Testorganismen wurde in den verschiedenen Organismengruppen untersucht. Fiel die Reaktion der Testorganismen gleichzeitig in mehreren Testsystemen positiv aus, wurde dieser Fall als **"Synchronalarm auf Abwasser"** bezeichnet. Beispiele dieser "Synchronalarme auf Abwasser" sind im folgenden zur Verdeutlichung dargestellt.

**Beispiel 1: "Synchronalarme auf Abwasser": Vergleich von Biotestautomaten mit verschiedenen Testorganismen**

Parallel erzeugte Ergebnisse der Biotestsysteme auf die stoßweise zugeführte Belastung von teilgeklärtem industriellem Abwasser wurden in jeder Testserie miteinander verglichen und als Auszug aus der Gesamtliste (Tab. 4) dargestellt.

Tab. 4:

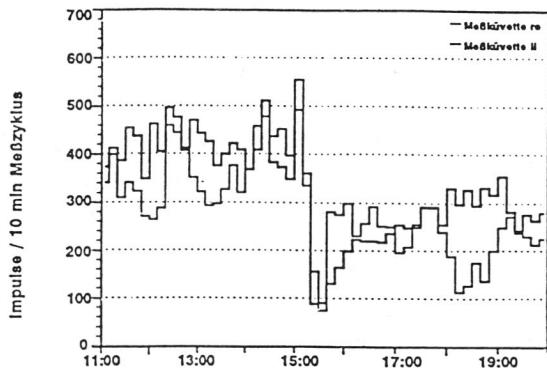
Testserie	2	3	4	5	7	8
Dyn. Daphnientest:	+	0	-	+	0	+
Muschelmonitor:	+	+	+	( )	+	( )
DF-Algentest:	+	+	+	+	+	+
WRC-Fischmonitor:	( )	( )	-	+	-	-

Legende:

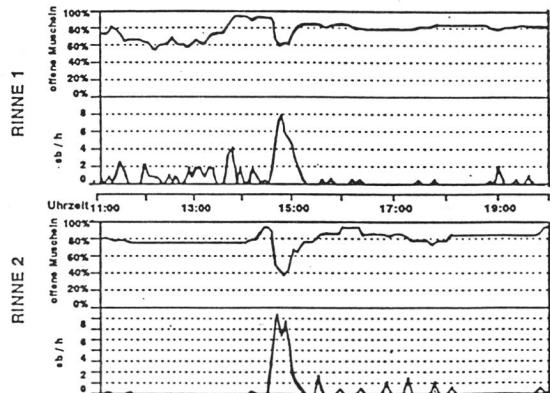
- "-" keine Reaktionsänderung oder Alarmwertüberschreitung
- "0" schwache, aber nicht signifikant veränderte Reaktion
- "+" signifikant veränderte Reaktion, deutliche Alarmwertüberschreitung
- "( )" Biotest war zum Zeitpunkt nicht installiert

Zum Vergleich von Biotestautomaten mit verschiedenen Testorganismen wurde das Beispiel der Testserie 2 ausgewählt (Abb. 1). Bei einer Abwasser-Temperatur von 24,2 °C, einem pH-Wert von 6,95 und einem Sauerstoffgehalt von 6,1 mg O<sub>2</sub>/l wurde das Abwasser unverdünnt und unbelüftet von 14:35 - 15:00 Uhr für 25 min zudosiert. Im Dynamischen Daphnientest reagierten die Testdaphnien sofort, zunächst mit einer Hyper-, dann mit Hypoaktivität und anschließender "Erholung" auf ein normales Bewegungsimpulsniveau nach Abstellen des Abwasserzuflusses. Im DM-Muschelmonitor reagierten die eingesetzten 72 Dreissena-Muscheln mit deutlichen Peaks in den Parametern "Schalenbewegung" und "Öffnungszustand %-offen". Im DF-Algentoximeter reagierten die eingesetzten Chlamydomonas-Algen zu einem nahezu maximal erreichbaren Peak in Referenz zum unbeaufschlagten Flußwasser (54% von max. erreichbaren 80%). Die Gesamtdauer der Reaktion der beteiligten Biotestsysteme betrug in diesem Falle bis zum Erreichen des Normalniveaus je 1 Stunde.

## Dynamischer Daphnientest



## Dreissena Muschelmonitor



## DF-Algentest

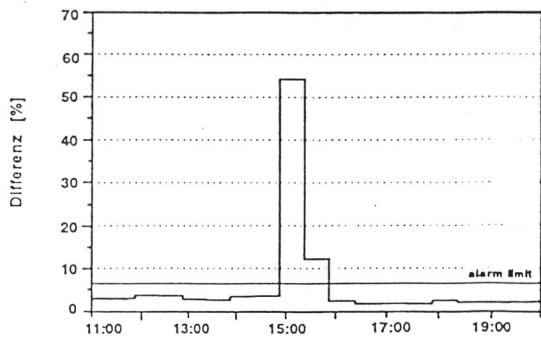


Abb. 1.: Vergleich von verschiedenen Biotestautomaten

## Beispiel 2: "Synchronalarme auf Abwasser": Organismenebene Bakterien

Die Empfindlichkeit der Bakterientestsysteme STIPTOX-norm, Toxiguard und ToxAlarm auf stoßweise Belastung mit teilgeklärtem Abwasser wurde in den Testserien 20-24 miteinander verglichen. Parallel dazu wurde der Dynamische Daphnientest mit getestet (s. Tab. 5).

Tab. 5:

Testserie	20	21	22	23	24
STIPTOX-norm:	0*	+	+	0*	+
Toxiguard:	+	+	+	+	+
ToxAlarm:	0	-	-	-	0*
Dyn. Daphnientest:	+	+	+	+	+

### Legende:

"-" keine Reaktionsänderung oder Alarmwertüberschreitung

"0" schwache, aber nicht signifikant veränderte Reaktion

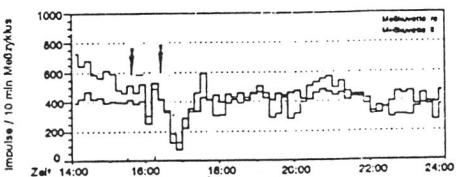
"+" signifikant veränderte Reaktion, deutliche Alarmwertüberschreitung

"( )" Biotest war zum Zeitpunkt nicht installiert

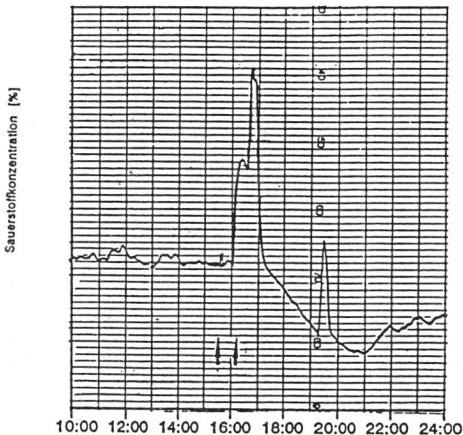
Die Kennzeichnung "\*" bedeutete dabei, daß die Signaländerung möglicherweise von anderen Prozessen überlagert wurde; es bedeutet nicht, daß eine technische Störung vorlag.

Wie aus der Aufstellung ersichtlich wird, erwies sich das Bakterientoximeter Toxiguard als das empfindlichste Testgerät innerhalb der Gruppe der Bakterientestautomaten. Weniger deutlich, aber schneller reagierte das STIPTOX-norm-Bakterientestgerät auf die Abwasserbelastungen. Keine oder uneindeutige Effekte zeigte das ToxAlarm. Das Daphnientestgerät zeigte stets eine deutliche Alarmwertüberschreitung auf die Zugabe von Abwasser an. Das nachstehende Beispiel in Abb. 2 (Testserie 22) verdeutlicht dieses Ergebnis exemplarisch.

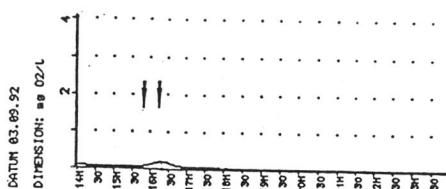
Dynamischer Daphnientest



Bakterientest Toxiguard



Bakterientest STIPOX-norm



Bakterientest ToxAlarm

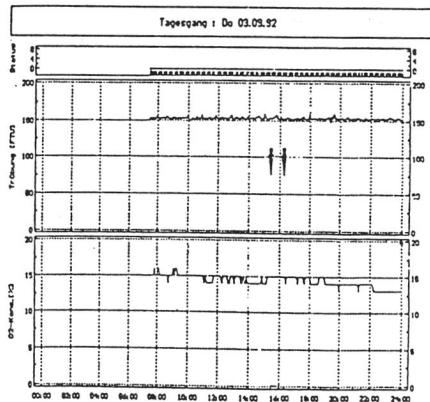


Abb. 2.: Vergleich der Reaktion der Bakterientestsysteme STIPOX-norm, Toxiguard und ToxAlarm auf die stoßweise Belastung von teilgeklärtem Abwasser im Parallelversuch

Das unverdünnte und unbelüftete Abwasser wurde 40 min (15:35 - 16:15 Uhr) den Biotestsystemen zudosiert. In allen Bakterientestgeräten wird als Untersuchungskriterium die Änderung der bakteriellen Sauerstoffzehrung als Folge einer Beeinflussung der bakteriellen Atmungskette bestimmt. Im STIPOX-norm stieg die Rest-O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,1 auf 0,2 mg/l. Die Reaktionszeit betrug 10 min, die Reaktion der Testorganismen auf die Abwasserbelastung dauerte ca. 60 min. Im Toxiguard-Bakterientest zeigte sich der Alarm zunächst durch ein Absinken der Rest-O<sub>2</sub>-Konzentration um 30%, der durch das Eindringen einer großen Zahl von an Abwasser adaptierter Bakterien in den Testraum erklärt werden kann. Danach stieg die Rest-O<sub>2</sub>-Konzentration um 45% an. Die ursprüngliche Sauerstoffbasislinie wurde nicht mehr erreicht. Der weitere Verlauf kann als Intoxikation des Biofilters gewertet werden. Der ToxAlarm-Bakterientest registrierte keinen Alarm, es war keine Veränderung der Sauerstoffkonzentration festzustellen.

### Beispiel 3: "Synchronalarme auf Abwasser": Organismenebene Algen

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Ergebnisse der Algenteestsysteme bei den unter gleichen Bedingungen durchgeföhrten Abwasseruntersuchungen stellen einen Auszug aus der Gesamtliste dar. Ergänzend wurden die Reaktionen aus dem ebenfalls parallel betriebenen Dynamischen Daphnientest mit angegeben.

Tab. 6:	Testserie	10	11	12	18	19
	DF-Algentoximeter:	+	+	+	+	+
	AT01-Algentoximeter:	-	0	-	-	-
	Dynam. Daphnientest:	+	+	+	0	( )

#### Legende:

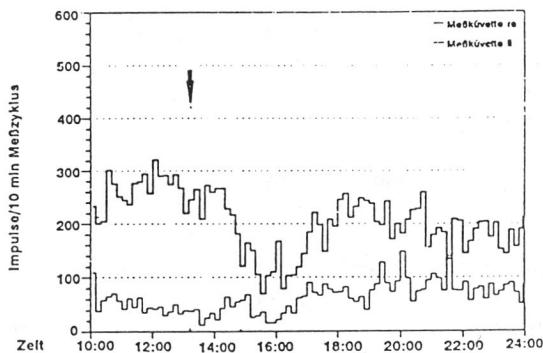
- "-" keine Reaktionsänderung oder Alarmwertüberschreitung
- "0" schwache, aber nicht signifikant veränderte Reaktion
- "+" signifikant veränderte Reaktion, deutliche Alarmwertüberschreitung
- "( )" Biotest war zum Zeitpunkt nicht installiert

Im folgenden werden als Beispiel die Ergebnisse der Testserie Nr. 11 in der Abb. 3 dargestellt.

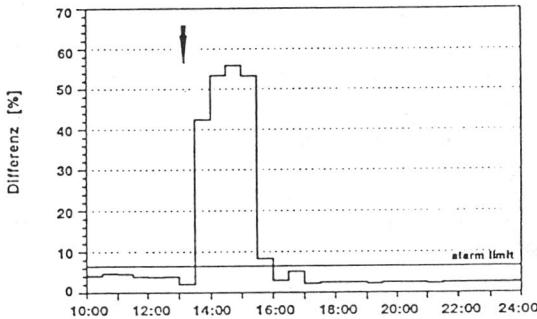
Der Abwasserzufluß dauerte 100 min (von 13:10 - 14:50 Uhr). Das Abwasser wurde vorher 1:3 verdünnt und belüftet. Im Dynamischen Daphnientest konnte ein Alarm registriert werden: nach einer unterschiedlich starken Hypoaktivität auf beiden parallelen Kanälen folgte ein Impulsanstieg. Während das DF-Algentoximeter auf die Abwasserbelastung einen sehr deutlichen Effekt zeigte, konnte im AT01-Algentoximeter auf die Stoßbelastung mit teilgeklärtem Abwasser kein signifikanter

Anstieg des Parameters "Effektive Toxizität" festgestellt werden. Die Darstellung der Begleitparameter "Test", "Kultur" und "Probe" ließ erkennen, daß eine alleinige herausragende Fluoreszenzänderung des Parameters "Test" nicht erfolgte. Insofern verlief die Plausibilitätskontrolle negativ. Alarm wurde nicht ausgelöst.

## Dynamischer Daphnientest



## DF-Algentest



## Algentoximeter AT01

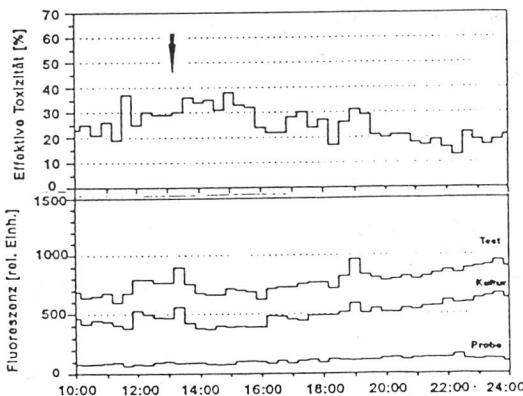


Abb. 3: Vergleich der Reaktion der Fluoreszenztestsysteme DF-Algentest und AT01-Algentest im Parallelversuch

## **Nachweis eines Gewässeralarms**

Nach einem festgestellten Alarm eines oder mehrerer Biotestsysteme stellt sich die Frage nach den verursachenden Wasserinhaltsstoffen. Diese toxischen Substanzen können mit dem Biotestsystem, welches durch einen Alarm eine toxische Stoffwirkung registriert hat, nicht identifiziert werden. Als Alarmauslöser kommen Einzelstoffe, synergistisch wirkende Verbindungen oder Abbauprodukte in Frage. Ein negatives Ergebnis einer chemischen Analyse muß nicht bedeuten, daß im Testwasser keine toxischen Stoffe vorlagen, sondern nur, daß sie analytisch nicht erfaßt werden konnten.

Die Rückstellprobenahme bietet insbesondere bei stark erhöhten toxischen Konzentrationen der fließenden Welle die Möglichkeit, Gewässeralarme einem nachträglichen Wiederholungstest zu unterziehen. Dazu wird mit Hilfe der DIN-genormten statischen (akuten) Biotests versucht, den im kontinuierlichen Verfahren registrierten toxischen Effekt mit einer Rückstellprobe zu wiederholen. Die Testprinzipien in statischen Biotests sind jedoch andere als die in Biomonitorn, insofern ist trotz gleicher Testorganismen aus gleicher Zucht ein übereinstimmendes Ergebnis nur bei hoher toxischer Konzentration zu erwarten.

Höher liegen die Chancen bei Wiederholung des Tests mit der Wasserprobe aus dem Rückstellprobenehmer in dem gleichen kontinuierlichen Verfahren, mit dem es zum ersten Mal registriert wurde, sofern der rückgestellte Wasservorrat ausreicht. Dazu kann ein zweites baugleiches Gerät verwendet werden oder der Routinebetrieb kann für diese "Beweissicherung" kurzzeitig unterbrochen werden.

Auch Synchronalarme von zwei oder mehreren Biotestsystemen können als Bestätigung für einen Gewässeralarm gewertet werden. Da aber jede Organismenart spezifisch auf eine unterschiedliche Palette von Stoffen reagiert, sollten die Meßstationen der IKSR mit Biotestgeräten aus je einer der Organismengruppen ausgerüstet werden. Um ein möglichst breites Spektrum von toxischen, ökologisch schädigenden Stoffen zu erfassen, müssen die empfohlenen Biotestautomaten in die Stationen entlang des Rheins auch netzbildend eingesetzt und betrieben werden.

## **Biomonitor-Empfehlungen aus den Erfahrungen an Rhein und Main**

Durch Anwendung eines Kriterienkataloges [3], (z.B. Wartungsaufwand, Störfähigkeit, Verfügbarkeit, Sensitivität, EDV-Austattung usw.) und Untersuchungen weiterer Aspekte aus der Erprobungszeit der Biotestsysteme an den zwei Containerstandorten an Rhein und Main [2] können folgende Testsysteme empfohlen werden:

Von den vergleichend getesteten Algentoximetern auf Fluoreszenzbasis hat sich das DF-Algentoximeter aufgrund hoher Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit bewährt. Der Muschelmonitor ist wegen seiner ausgereiften, anwenderfreundlichen Software empfehlenswert. Der Dynamische Daphnientest wurde bereits 1992 offiziell empfohlen [1]. Unter den kontinuierlich betriebenen Fischttests kann nach der praktischen

Testphase keiner empfohlen werden. Von den geprüften Bakterientoximetern ist zur Zeit kein Testsystem für den Einsatz in Gewässerstationen geeignet, da sie in der Datenerzeugung und -weiterleitung rückständig sind und eine Bewertung von Alarmereignissen schwer möglich ist. Der empfindlichste Biotestmonitor ist nur dann für den Einsatz am Gewässer empfehlenswert, wenn er nicht nur einen Schadeneffekt als Alarm registriert, sondern wenn diese Alarmauslösung auch plausibel nachvollzogen werden kann.

#### **Literatur:**

1. KNIE, J. und PUZICHA, H.: "Der Dynamische Daphnientest - Erfahrungen und praktische Hinweise-", Hrsg. Umweltbundesamt, Berlin, 1992
2. PUZICHA, H.: "Gewässerüberwachung mit Hilfe von kontinuierlichen Biotests in einem mobilen Meßcontainer", Abschlußbericht des UBA-Forschungsvorhabens Nr. 10205146/-06, TV 6, 2. Entwurf, Hrsg. Umweltbundesamt, Berlin; auch LfW-Schriftenreihe, Landesamt für Wasserwirtschaft Rheinland-Pfalz, 1993
3. SCHMITZ, P.: "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestgeräten zur Überwachung des Rheins", Gesamtabschlußbericht des Forschungsvorhabens BMU-Nr. 10205145/07 und BMFT-Nr.0339299D, 2. Entwurf, Hrsg. Umweltbundesamt, Berlin, 1993



# Immissionsüberwachung von Rhein und Elbe mit dem Dynamischen Daphnientests

Joachim Knie

## Zusammenfassung

Die beiden größten deutschen Flüsse, Rhein und Elbe sowie deren Einzugsgebiete werden großräumig mit Biomonitorn überwacht. Der Dynamische Daphnientest ist integraler Bestandteil in allen Wasserkontrollstationen.

Am Rhein hat jedes Bundesland ein eigenes Gewässergüteüberwachungssystem. Ein automatischer länderübergreifender Datentransfer zwischen den Landesmeßstellen findet nicht statt. Nur die der Internationalen Rheinschutzkommission angeschlossenen Meßstationen kommunizieren über die Zentrale in Koblenz miteinander.

Das Gewässergüteüberwachungssystem an der Elbe reicht Landes- und Ländergrenzen überschreitend von der Quelle bis zur Mündung. Der Datentransfer erfolgt über ein rechnergestütztes, mehrstufiges Informationsnetz. Die darin integrierten Biomonitorn können damit ihre Funktion als Frühwarnsysteme erfüllen.

## Summary

The two largest rivers in Germany, the Rhine and the Elbe, as well as their catchment areas are controlled systematically using biomonitor. The dynamic daphnia test is an integral part of all water control stations.

Along the Rhine river, each federal Land has its own system to monitor water quality. An automatic data transfer between the measuring sites of the respective Länder does not take place. Only the measuring stations associated with the International Commission for the Protection of the Rhine against Pollution (Internationale Rheinschutz-kommission) exchange their data via their main branch in Koblenz.

The system to monitor water quality of the Elbe which passes several national and international borders covers the whole river from the spring to the estuary. Data transfer is ensured by a computer-assisted multi-stage information network which enables the integrated biomonitor to function as an early warning system.

## **Einleitung**

Der Großbrand bei der Schweizer Chemie-Firma Sandoz, bei dem mit dem Löschwasser tonnenweise Pestizide in den Rhein gespült wurden [1], sorgte 1986 für internationales Aufsehen. Noch in 500 km Entfernung vom Unglücksort konnte in Nordrhein-Westfalen die Wirkung der Schadstoffe mit dem Dynamischen Daphnientest nachgewiesen werden [2].

Für die Internationale und Deutsche Rheinschutzkommission war der Störfall Anlaß, den Aufbau eines Überwachungsnetzes am Rhein mit Biomonitoren anzuregen. Daraufhin rüsteten die einzelnen Bundesländer sowie die Niederlande, sofern noch nicht geschehen, die von ihnen betriebenen Wasserkontrollstationen mit Daphnientestgeräten aus.

Die Entscheidung für den Dynamischen Daphnientest ist im wesentlichen auf die große Empfindlichkeit der Daphnien gegenüber einem breiten Schadstoffspektrum zurückzuführen. Auch der hohe technische Standard des Testsystems, der inzwischen Maßstäbe für andere Biomonitoring setzt sowie die seit 1982 in Nordrhein-Westfalen vorliegenden guten Erfahrungen machten das System attraktiv [2].

Parallel zum Daphnientest wird in vielen Meßstationen auch ein Fischtest betrieben, mit dem allerdings in den letzten Jahren kaum noch Schadstoffe im Rhein nachgewiesen werden konnten, da deren Konzentrationen in der Regel unterhalb der Ansprechschwelle des Gerätes lagen.

Dieser Umstand und die Tatsache, daß mit dem Dynamischen Daphnientest letztlich auch nicht alle Schadstoffe erfaßt werden können, weil deren Wirkmechanismen organismenspezifisch sehr unterschiedlich sein können, hat zur Entwicklung weiterer Biomonitoring geführt. So wurden in jüngster Zeit in einem mit öffentlichen Mitteln geförderten Forschungsvorhaben Testautomaten mit Bakterien, Algen, Muscheln und Fischen zur Einsatzreife gebracht [3]. Damit steht heute eine Palette an Biomonitoring zur Verfügung, die erwarten läßt, daß Schadstoffe in Gewässern mit einem hohen Maß an Sicherheit detektiert werden [4].

## **Integration des Dynamischen Daphnientests in die zeitnahe Gewässerüberwachung im Einzugsgebiet des Rheins**

Ende der 80er Jahre wurde vom Landesamt für Wasser und Abfall (LWA) in Nordrhein-Westfalen die intensivierte Gewässerorganisation (INGO) etabliert [5]. Bei INGO werden der Rhein und seine Nebenflüsse, vor allem unter dem Gesichtspunkt der Trinkwassergewinnung, mindestens einmal täglich beprobt und auf Schwermetalle und organische Verbindungen untersucht. Ziel ist die schnelle, möglichst zeitgleiche (zeitnahe) Erfassung von Veränderungen der Wasserqualität, sobald diese z.B. infolge von Unfällen, Leckagen oder unerlaubten Einleitungen auftreten [6].

Die hohe Probenahme- und Meßfrequenz verdichtet im Vergleich zu früher das analytische Datenraster erheblich. Dennoch vergehen zwischen Probenahme und Ergebnis durch (eventuellen) Probentransport, Probenaufbereitung, Messung und Auswertung größere Zeitspannen, in denen durchaus kurzfristige Stoßbelastungen unentdeckt bleiben können. Von einer kontinuierlichen Analytik wichtiger organischer oder anorganischer Verbindungen, die beispielsweise als Leitparameter Schadstoffbelastungen indizieren können, ist man noch weit entfernt.

In das INGO-Konzept ließ sich der Dynamische Daphnientest als kontinuierlich, im Durchfluß arbeitendes Meßsystem in geradezu idealer Weise einbinden. Der Test liefert rund um die Uhr Informationen zur Wasserqualität, entspricht also dem erhobenen Anspruch der Zeitnähe.

Wie alle Biomonitorre mißt der Daphnientest integral die Wirkung aller im Wasser befindlichen Schadstoffe, also auch solcher, die dort durch Interaktionen neu entstehen oder sich durch ihr Zusammentreffen verändern. Demzufolge ist ein Stoffnachweis nicht möglich. Hier muß die chemische Analytik ansetzen, vor allem deshalb, wenn aufgrund der Identifizierung von Stoffen die Chance besteht, den Verursacher oder die Quelle eines Schadereignisses festzustellen. Denn gewisse Stoffe oder Stoffgruppen sind häufig charakteristisch für bestimmte Einleitungen oder Herkunftsbereiche. So war es zum Beispiel möglich, anhand des Stoffspektrums einen Einleiter an der Ruhr ausfindig zu machen, der ursächlich verantwortlich war für erhöhte Frachten an Chlorkohlenwasserstoffen, die beim Dynamischen Daphnientest in der Kontrollstation Fröndenberg Alarm ausgelöst hatten (Abb. 1, Abb. 2).

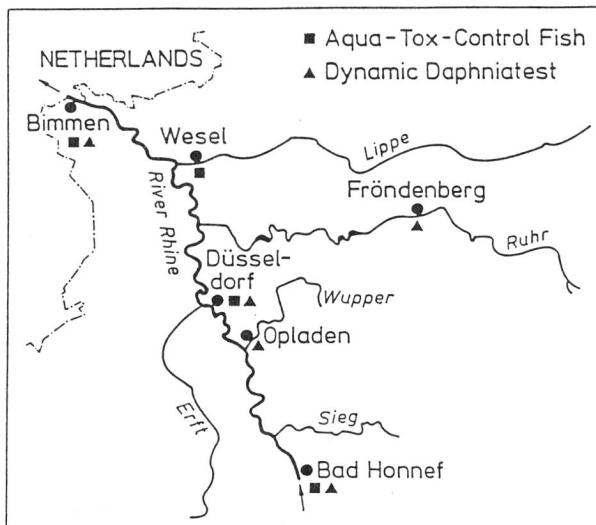


Abb. 1: Gewässergütemeßstationen mit Biomonitorre in Nordrhein-Westfalen.  
Quelle: Landesamt für Wasser und Abfall NRW

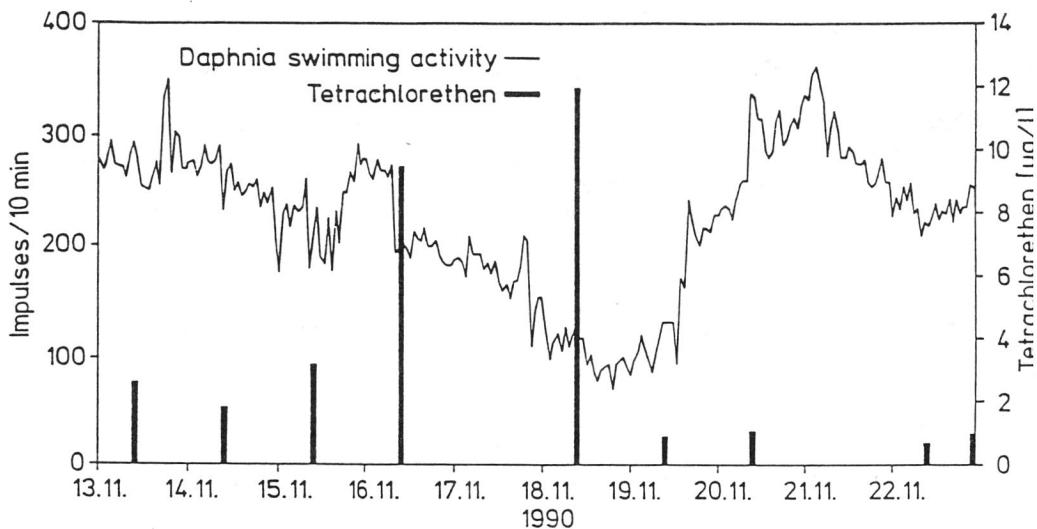


Abb. 2: Verlauf der Daphnienaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration an Tetrachlorethen als Leitparameter eines Gemisches an CKW in der Ruhr.  
Quelle: Landesamt für Wasser und Abfall NRW

In einem anderen Fall an der Wupper wäre die Quelle der Wasserverunreinigung durch das Insektizid Isophenphos ebenfalls feststellbar gewesen, auch wenn der Verursacher sich nicht selbst bei den Behörden gemeldet hätte (Abb. 3).

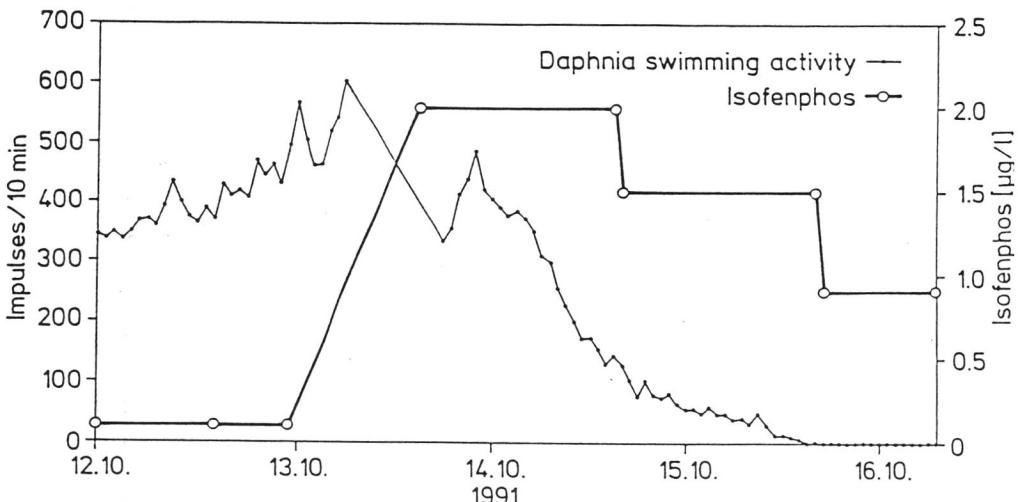


Abb. 3: Verlauf der Daphnienaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Insektizids Isophenphos in der Wupper.  
Quelle: Landesamt für Wasser und Abfall NRW

Im Vergleich zu den beiden Alarmfällen sind in den Abbildungen 4 und 5 Beispiele der normalen Schwimmaktivität von Daphnien dargestellt. Die Alarmgrenzen sind gleitend. Sie werden vom Rechner des Gerätes bzw. einem Stationsrechner der biologisch bedingten Schwankungsbreite der Daphnienaktivität angepaßt.

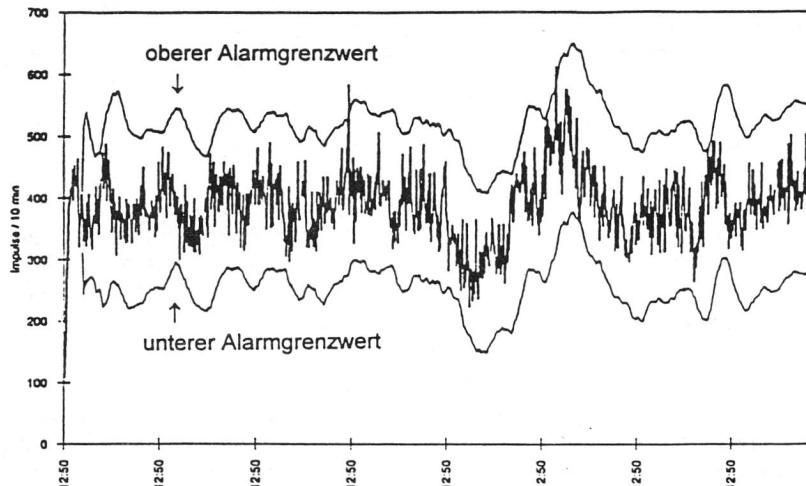


Abb. 4: Normalverhalten von Daphnien im Dynamischen Daphnientest in der niederländischen Wasserkontrollstation Lobith.  
Quelle: Hendriks und Stouten, 1993 (verändert) [14]

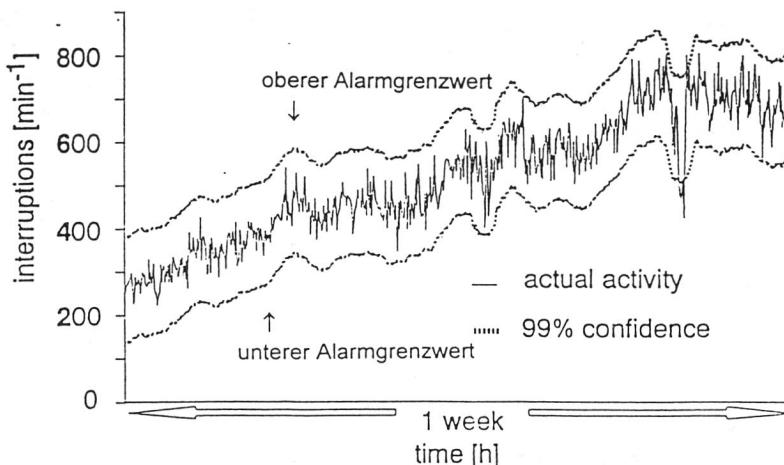


Abb. 5: Typischer wöchentlicher Verlauf der Schwimmaktivität von Daphnien im Dynamischen Daphnientest. Aufgenommen vom 19.08.1992 bis 27.08.1992 in der Hamburger Station Blankenese.  
Quelle: Umweltbehörde Hamburg (verändert) [3]

Auf der anderen Seite kann mit den heute verfügbaren Analysenverfahren nur ein Bruchteil der in Gewässern potentiell vorkommenden Stoffe gemessen werden. Wenn demnach ein Biomonitor Schadstoffalarm gibt, ist grundsätzlich nicht zu erwarten, daß die Analyse einen erklärenden Befund liefert. Teilweise liegen die Konzentrationen von Stoffen, die bei den in den Monitoren eingesetzten Testorganismen Reaktionen auslösen, auch unter den Nachweisgrenzen der analytischen Verfahren. Der Nichtnachweis von Stoffen ist also als normal zu betrachten. Das ist vor allem dann unbefriedigend, wenn die Testorganismen sterben und damit eine akute Intoxikation des Gewässers signalisieren. In solchen Situationen käme der Ermittlung von Art und Herkunft der Belastung besondere Bedeutung zu.

Zu den INGO-Meßstellen in Nordrhein-Westfalen, die mit Dynamischen Daphnientests und/oder Fischtests ausgestattet sind, gehören drei Stationen am Rhein sowie jeweils eine an Wupper, Ruhr und Lippe (Abb. 1). Die Testsysteme sind über ihre seriellen Schnittstellen Online mit dem LWA in Düsseldorf verbunden, so daß bei Auffälligkeiten von hier aus Maßnahmen ergriffen werden können [7/8].

In der Wasserkontrollstation Bad Honnef, an der Landesgrenze zu Rheinland-Pfalz gelegen, wird die Wassergüte des nach Nordrhein-Westfalen einfließenden Rheins überwacht. In der Station Düsseldorf werden die Emissionen aus dem Industriegebiet um Köln sowie aus Leverkusen und Dormagen erfaßt; in Kleve-Bimmen, an der Grenze zu den Niederlanden sind es im wesentlichen die Einträge aus dem Ruhrgebiet.

Die Meßstelle Opladen an der Wupper wurde zur Erfassung von Belastungen aus den zahlreichen Industriebetrieben aus dem Bergischen Land, insbesondere aber aus einem Betrieb der chemischen Großindustrie in Wuppertal-Elberfeld eingerichtet. In Fröndenberg/Ruhr werden mögliche Beeinträchtigungen der Trinkwassergewinnung durch die vielen, meist kleinen oder mittelgroßen Betriebe an der oberen Ruhr und ihrem Einzugsgebiet registriert. Die Station Wesel an der Lippe überwacht den Abfluß aus dem nördlichen Ruhrgebiet.

Zusätzlich zu den beiden genannten Monitorsystemen werden zur Zeit in den Meßstationen am Rhein neu entwickelte Geräte mit Leuchtbakterien, Algen und Muscheln erprobt. Langfristig ist daran gedacht, bei Eignung auch diese Biomonitor in das INGO-Netz zu integrieren.

Bei jedem Biomonitoralarm führt das LWA aus Rückstellproben oder aktuell entnommenen Proben weitere Analysen durch, falls nicht schon die Meßwerte des Routinescreenings auf die Ursache schließen lassen [9]. Dies tritt jedoch selten auf. In vielen Fällen weisen erst die Biomonitor auf die Anwesenheit von Schadstoffen hin, wobei es nicht immer gelingt, sie zu identifizieren. Zu den Zeiten, als die ersten Biomonitor installiert wurden, wurden analytisch nicht absicherbare Alarne von den Analytikern gerne als technisch oder biologisch bedingte Fehlalarme gedeutet. Nachdem aber, im Rahmen der erweiterten Analytik, häufig die biologischen Reaktionen durch chemische Befunde bestätigt wurden, werden Biomonitoralarme mit ebensolcher Aufmerksamkeit bedacht, wie etwa das Überschreiten von Grenzwerten.

Tritt in Nordrhein-Westfalen ein Alarmfall am Rhein auf, auch wenn er analytisch nicht nachvollzogen werden kann, führt das in der Regel dazu, daß die Niederlande als Unterlieger darüber informiert werden.

In den anderen Bundesländern am Rhein wird ähnlich, teils aber auch sehr abweichend vom Vorgehen Nordrhein-Westfalens verfahren. Wenn in Rheinland-Pfalz in der Wasserkontrollstation Mainz (Abb. 6) beim Dynamischen Daphnientest oder bei dem im Landesamt für Wasserwirtschaft entwickelten Fischwarntest die Alarmschwellen überschritten werden, ruft das so lange keine Besorgnis hervor, bis nicht durch Analysedaten abgesichert ist, daß die Daphnien oder Fische Grund hatten, Alarm auszulösen. Da in Mainz jedoch routinemäßig keine anderen Parameter untersucht werden wie in Nordrhein-Westfalen, kommen also nur solche Stoffe als Alarmauslöser in Frage, die im Meßprogramm vorgegeben sind. Trotz dieser sehr konservativen Haltung hat das Landesamt für Wasserwirtschaft für die neue Meßstation in Worms, die zusammen mit Hessen und Baden-Württemberg betrieben werden soll, einen Daphnien- und Fischtest eingeplant, um toxische Belastungen insbesondere aus dem Raum Ludwigshafen messen zu können.

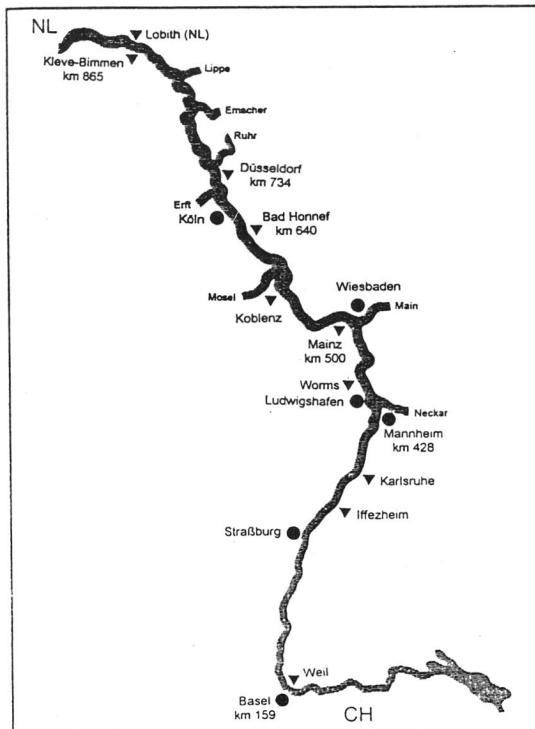


Abb. 6: Gewässergütemeßstationen mit Biomonitoren am Rhein (▼)

Die Hessische Landesanstalt für Umwelt (HLfU) betreibt in Bischhofsheim am Main eine Meßstation vor allem zur Kontrolle der Emissionen aus dem industriellen Ballungsgebiet um Frankfurt. Dort läuft auch ein Dynamischer Daphnientest. In umfangreichen Untersuchungen hat die HLfU das Daphnientestgerät einer Prüfung auf Tauglichkeit zur Gewässerüberwachung unterzogen und ist dabei zu einem positiven Ergebnis gekommen [10]. Seit der Zeit werden die Reaktionen der Daphnien mit der gleichen Sorgfalt beachtet, wie die Daten der chemischen Analytik. Die Überzeugung vom hohen Stellenwert der Biomonitoring im Gewässerschutzmanagement hat in der HLfU zu konkreten Plänen geführt, einen Dynamischen Daphnientest direkt am Ablauf der Kläranlage eines Betriebes der chemischen Großindustrie zu installieren.

In Baden-Württemberg unterhält die Landesanstalt für Umweltschutz (LfU) Kontrollstationen mit Daphnien- und Fischtests in Iffezheim und Karlsruhe sowie zusammen mit der Schweiz in Weil (Abb. 6). Während in Karlsruhe und Iffezheim in erster Linie Einleitungen aus dem Elsaß erfaßt werden sollen, deckt die Station in Weil vornehmlich die Betriebe der Großchemie um Basel herum ab.

Ähnlich wie in Hessen erprobte die LfU den Dynamischen Daphnientest unter den verschiedensten Bedingungen im Labor und am Rhein, bevor er fester Bestandteil des Rheinüberwachungssystems wurde [11]. Von den Testgeräten gemeldete Veränderungen der Wasserqualität werden von der LfU vergleichbar behandelt wie in Hessen oder Nordrhein-Westfalen. Besondere Auffälligkeiten beim Dynamischen Daphnientest - beim verwendeten Fischtest treten systembedingt in der Regel keine auf - werden an die Unterlieger weitergegeben.

### **Der Dynamische Daphnientest im Gewässergütermeßsystem im Einzugsgebiet der Elbe**

1990 wurde zwischen der Bundesrepublik Deutschland, der damals noch bestehenden Tschechischen und Slowakischen Föderativen Republik und der Kommission der Europäischen Gemeinschaften vereinbart, ähnlich wie im Rheineinzugsgebiet, eine Internationale Kommission zum Schutz der Elbe (IKSE) zu gründen. Die Kommission ist, mit Sitz in Magdeburg, inzwischen tätig.

Aufgabe der IKSE ist die Verbesserung des ökologischen Zustandes der Elbe und ihrer Nebenflüsse durch Reduzierung bzw. Vermeidung verunreinigender Einträge. Aus diesem Grund wurden 18 Meßstationen mit modernen Analysengeräten ausgestattet, darunter sechs auf deutschem Gebiet mit Dynamischen Daphnientests (Abb. 7). In den Stationen soll zunächst der Istzustand der Gewässerbelastungen und später der Erfolg von Sanierungsmaßnahmen festgestellt werden.

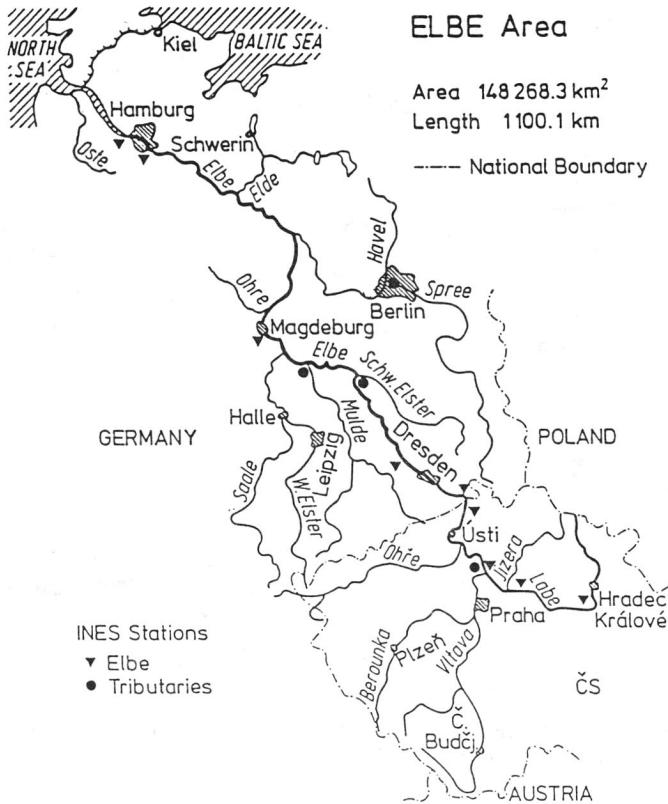


Abb. 7: Gewässergütemeßstationen mit Biomonitoren im Einzugsgebiet der Elbe.

Quelle: de Vries, 1992 (verändert) [12]

Die ermittelten Meßdaten werden zunächst in den einzelnen Meßstationen über das rechnergestützte Informationsnetz Elbe-Sanierung (INES) gesammelt und verdichtet und im Normalfall einmal in 24 Stunden an die jeweiligen Landesdienststellen über Wähleitungen weitergegeben [12]. Bei Grenzwertüberschreitungen oder Ansprechen der Biomonitor löst der Stationsrechner Alarm aus. Über die Wähleitungen werden die Daten von den Landesdienststellen an die Arbeitsgemeinschaft zur Reinhaltung der Elbe (ARGE Elbe) in Hamburg transferiert. In der Tschechischen Republik wird der Datenfluß aus den Meßstationen in der Zentrale in Prag gesammelt. Die Daten aus Hamburg und Prag werden schließlich bei der IKSE-Zentrale in Magdeburg zusammengeführt (Abb. 8).

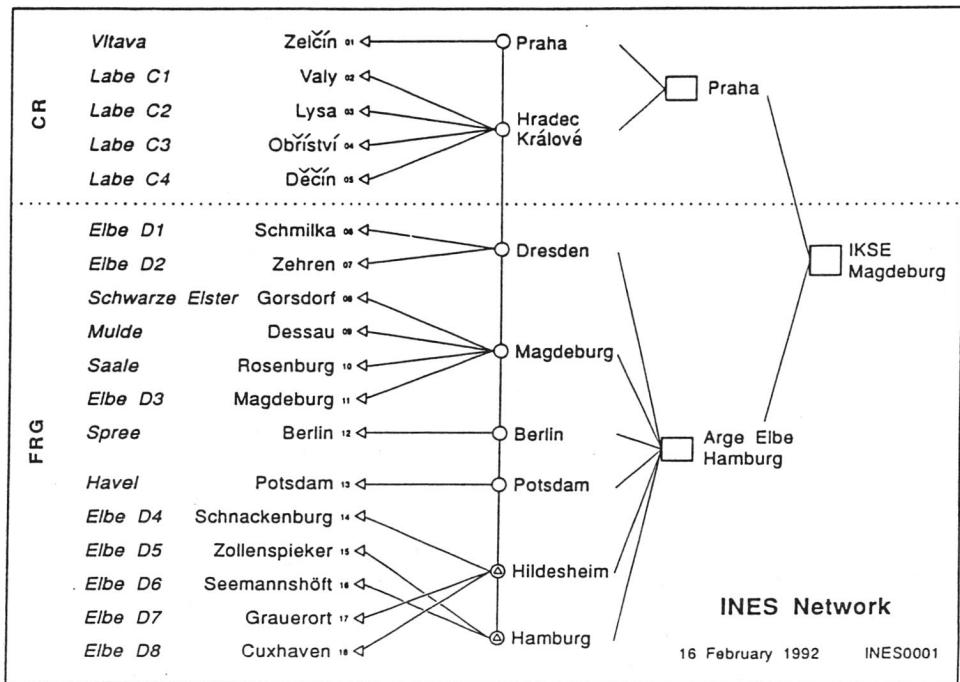


Abb. 8: Struktur und Aufbau des Informationsnetzes Elbe-Sanierung (INES).  
Quelle: de Vries, 1992 [12]

Die sechs mit Daphnientestgeräten ausgestatteten Meßstationen sind umweltstrategisch so verteilt, daß größere Belastungsräume abgedeckt werden. In Schmilka an der Elbe werden alle aus der Tschechischen Republik kommenden Einleitungen erfaßt, in Zehren diejenigen aus dem Industriegroßraum Pirna-Dresden-Meißen und in Magdeburg die Einleitungen, die über die Saale erfolgen. In Dessau werden an der Mulde die Emissionen im Großraum Chemnitz und um Bitterfeld überwacht und in Jessen der gesamte Einzugsbereich der Schwarzen Elster. Die Berliner Station an der Spree mißt die Belastungen aus dem industriellen Ballungsgebiet im Osten der Stadt sowie aus dem Agrargroßraum im Südosten.

Die Aufnahme der Meßtätigkeit in den einzelnen Stationen ist unterschiedlich weit fortgeschritten. Für den Betrieb der Daphnientestgeräte gilt allgemein, daß sich zur Zeit das damit betraute Personal einarbeitet und erste Erfahrungen sammelt. Eine Ausnahme ist die Berliner Meßstelle; hier wird das Testsystem bereits routinemäßig betrieben.

Nähere Informationen über den Ausbau- und Betriebszustand in den tschechischen Untersuchungseinrichtungen liegen zur Zeit nicht vor.

Die Hamburger Umweltbehörde setzt seit 1989 zur Überwachung der Elbe in ihren Meßstationen auf SchwimmPontons Biomonitor ein (Abb. 9), darunter auch den Dynamischen Daphnientest, der gleichzeitig als Dynamischer Fischtstest verwendet wird (Tab. 1). Dies ist aufgrund der Bestückung des Testgerätes mit zwei Testkammern möglich, die unabhängig voneinander betrieben werden können. In eine Testkammer werden Daphnien eingesetzt, in die andere zwei Tage alte Guppies. Die Geräte sind on-line mit der Zentrale verbunden, wo mittels eines speziell entwickelten Programms Auswertungen unter verschiedenen Gesichtspunkten vorgenommen und Tabellen und Graphiken erstellt werden können [13].

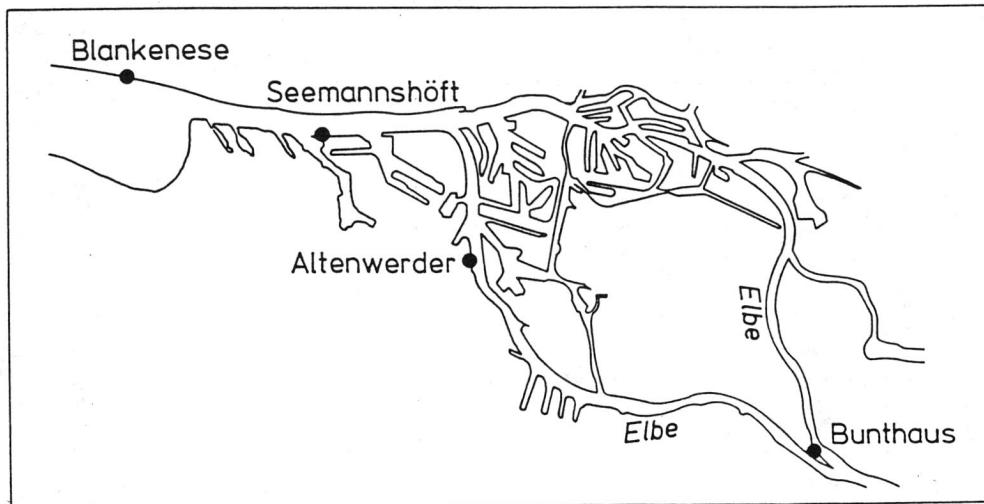


Abb. 9: Gewässergütemeßstationen mit Biomonitoren am Hamburger Elbabschnitt.  
Quelle: Umweltbehörde Hamburg, Gewässerkundlicher Meßdienst

Tab. 1: Ausstattung der Elbermeßstationen in Hamburg mit Biomonitorn.  
 Quelle: Umweltbehörde Hamburg (verändert) [3]

Meßsystem	Meßstationen			
	Bunthaus	Altenwerder	Seemannshöft	Blankenese
Dynamischer Daphnientest	x	x	x	x
Dynamischer Fischtest (*)	x	x	x	x
Bakterientoximeter Toxalarm	x		x	x
Strömungsfischtest				x

\*) identisch mit Dyn. Daphnientest

Abb. 10 beschreibt das Schwimmverhalten von Daphnien in der Hamburger Station Seemannshöft in Abhängigkeit von Schlickumlagerungen im Hafengebiet. Mit Einsetzen der Umlagerung ist im Daphnientest ein deutlicher Anstieg der Schwimmaktivität zu verzeichnen, die sich bei Beendigung der Arbeiten wieder auf einem niedrigeren Niveau eingependelt. Offensichtlich werden die Daphnien durch die bei dieser Aktion wieder im Wasser der Elbe resuspendierten Sedimente und somit auch von darin enthaltenen Schadstoffen beeinflußt. Üblicherweise gibt es in Hamburg keine Abhängigkeit zwischen Schwebstoffgehalt und Daphnienaktivität [15].

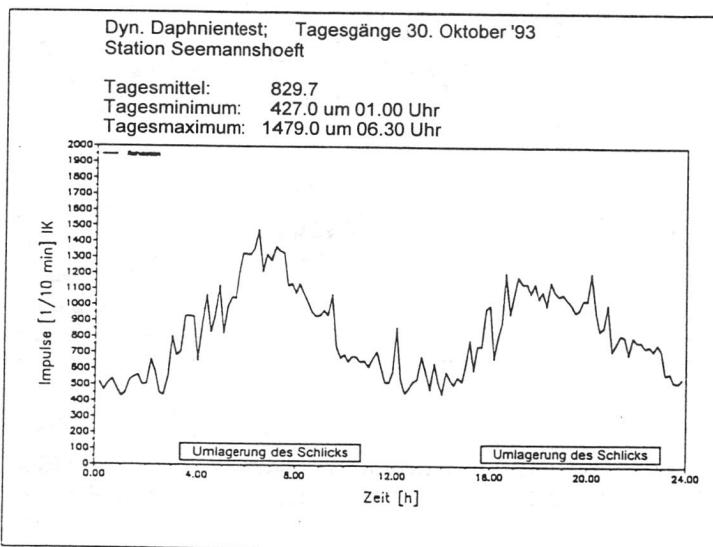


Abb.10: Änderungen der Schwimmaktivität von Daphnien im Dynamischen Daphnientest in Abhängigkeit von Schlickumlagerungen im Hamburger Hafen.  
 Quelle: Umweltbehörde Hamburg (verändert) [15]

Über die ARGE Elbe ist Hamburg dem INES-Netz angeschlossen (Abb. 8). Damit existiert an der Elbe von der Quelle bis zur Mündung ein modernes, leistungsfähiges Gewässergütemeßsystem, das Landes- und Ländergrenzen überschreitend arbeitet. Als einziger Biomonitor ist der Dynamische Daphnientest in allen Meßstationen mit Wirkungstests implementiert. Es ist jedoch zu erwarten, daß in absehbarer Zeit Tests mit Algen und Leuchtbakterien die biologische Überwachung abrunden.

Was an der Elbe binnen kurzer Zeit möglich war, konnte am Rhein in vielen Jahren nicht geschaffen werden. Hier hemmen nach wie vor die Ländergrenzen einen freien Datentransfer. Informationen über Beeinträchtigungen der Wasserqualität werden sozusagen noch von Hand zu Hand weitergereicht.

## Diskussion

An Rhein und Elbe wurden Gewässergüteüberwachungssysteme geschaffen, in denen Biomonitor ihre festen Platz haben.

Entlang der Rheinschiene begann die Installation von Biomonitorn Ende der 70er, Anfang der 80er Jahre mit einem Fischtest, bzw. dem Dynamischen Daphnientest in Nordrhein-Westfalen. Aufgrund der insgesamt guten Erfahrungen in diesem Bundesland folgten andere Länderbehörden dem Beispiel und begannen einzelne Meßstationen ebenfalls mit den Testsystemen auszurüsten.

Der große Durchbruch für die Biomonitorn gelang jedoch erst nach dem Sandoz-Unfall im Jahr 1986. Hier war es vor allem der Dynamische Daphnientest, der die Vertreter der Überwachungsbehörden von der Bedeutung biologischer Wirkungstests für einen effizienten Gewässerschutz überzeugte. Parallel zu dieser Erkenntnis hatte sich bei verantwortlichen Analytikern ein Eingeständnis hinsichtlich der begrenzten Möglichkeiten der chemischen Analytik angesichts der nicht mehr überschaubaren Anzahl von Stoffen in Gewässern entwickelt. Das hatte unter anderem bereits zu einer Beschränkung auf etwa 150 bis 250 besonders umweltrelevante Einzelstoffe im Routine-Meßbetrieb der Labors am Rhein geführt.

Konnten Stoffe also nur in begrenztem Umfang gemessen werden, so boten die biologischen Verfahren doch die Gewähr, die Anwesenheit von Schadstoffen über deren Wirkung nachzuweisen. Besonders geeignet dafür waren natürlich die kontinuierlich arbeitenden Biomonitorn. Sie eröffneten im Falle der Ansprache gleichzeitig auch die Chance, chemisch analytisch gezielter nach der Ursache zu forschen.

Die genannten Gründe führten mit der Zeit zur breiten Akzeptanz der Biomonitorn innerhalb des sonst traditionell von Chemikern besetzten Systems der Gewässerüberwachung.

Von den beiden, in allen Meßstationen am Rhein anzutreffenden Biomonitoring, Fischtest und Dynamischer Daphnientest, hat das verwendete Fischtestsystem seit Mitte der 80er Jahre an Bedeutung verloren. Das ist zum einen auf das wenig sensible Meßverfahren zurückzuführen, zum anderen aber auch auf den Rückgang akut fischtoxischer Stoffkonzentrationen im Rhein. Seit Einführung des Abwasserabgabengesetzes 1976, das die Fischtoxizität von Abwasser mit einer Abgabe belegt, kam es zu einer erheblichen Reduzierung derartiger Stoffe. Fischsterben im Rhein, wie in den 70er Jahren, gibt es seit langem nicht mehr. Als dennoch infolge des Sandoz-Unglücks Fische wegen der extrem hohen Schadstoffkonzentrationen starben, zeigten die Testfische in den unterhalb liegenden Kontrollstationen keine Reaktion, wohl aber die Daphnien. Die Begründung für die Notwendigkeit des Fischtests wird nicht nur durch die genannten Gründe in Frage gestellt, sondern auch durch das Tierschutzgesetz, das den Einsatz von Wirbeltieren nur unter strengen Auflagen zuläßt und das von den Behörden zunehmend restriktiver ausgelegt wird. Darüber hinaus lassen die eingangs erwähnten neu entwickelten Testverfahren mit Muscheln, Algen und Bakterien erwarten, daß sie zusammen mit dem Daphnientest ausreichend vor Gewässerverunreinigungen warnen können.

Die Erfahrungen am Rhein sind beim Aufbau des Gewässergüteüberwachungsnetzes Elbe berücksichtigt worden. So wurden alle neuen Meßstationen, für die Wirkungstests vorgesehen sind, zunächst mit Daphnientests ausgestattet. Nur in Magdeburg und Berlin sind zusätzlich Fischtests vorhanden. Auch für die Oder sind Kontrollstationen mit Daphnientests vorgesehen.

Eine Verwendung im Emissionsbereich zur Eigenüberwachung von Kläranlagenabläufen oder von Kühlwassereinleitungen findet der Dynamische Daphnientest bei einigen Unternehmen der Großchemie. Aber auch behördlicherseits wird er in dieser Funktion beispielsweise in Niedersachsen eingesetzt. Dort ist auch an eine Überwachung der Weser und anderer Flüsse mit dem System gedacht.

Das emissionsseitige Biomonitoring sollte grundsätzlich flächendeckend eingeführt werden. Wenn Schadstoffe unmittelbar am Entstehungsort detektiert werden, erlaubt dies ein direktes Eingreifen zur Behebung von Störungen, bevor Gewässer belastet werden. In den Meßstationen entlang der Flüsse ist nur ein Reagieren auf bereits erfolgte Einleitungen möglich. Eine Schadensbegrenzung ist, wenn überhaupt, nur mit Zeitverzögerung zu erreichen. Dennoch haben Immissionsmeßstationen auch einen Schutzzweck, wie es am Rhein zu beobachten ist. Seit Errichtung des dichten Meßstellennetzes melden Einleiter durch innerbetriebliche Ursachen aufgetretene erhöhte Stofffrachten in ihren Ableitungen sofort selbst den Behörden [9], weil das Risiko entdeckt zu werden, inzwischen zu groß geworden ist.

## Literatur

1. Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen: Brand bei Sandoz und Folgen für den Rhein in NRW. LWA Sonderbericht, Düsseldorf, November 1986
2. KNIE, J.: Der Dynamische Daphnientest - praktische Erfahrungen bei der Gewässerüberwachung. Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 102, 1988, 341-356
3. Bund/Länder Arbeitskreis "Wirkungstests Rhein (WIR)": Kontinuierliche Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins. 3. Entwurf (Stand 19.11.93) zum Gesamtabschlußbericht der FuE-Vorhaben 102 05 145/07 (UBA) und 0339299 D (BMFT), Umweltbundesamt Berlin, 1993
4. Projektträger Biologie, Energie, Ökologie des Bundesministeriums für Forschung und Technologie: Biomonitor zur kontinuierlichen Überwachung von Wasser und Abwasser. KFA Jülich, 1993
5. STOCK, H.-D.: Gewässergüteüberwachungssystem - Strategien in Nordrhein-Westfalen. Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 131, 1992, 189-198
6. Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen: Rheingütebericht NRW '90. Düsseldorf, August 1991
7. KNIE, J.: Biologische Teststationen am Rhein. Umwelt 20 (10), 1990, 517-519, 1990
8. KNIE, J.: Überwachung von Fließgewässern mit dem Dynamischen Daphnientest. Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 127, 1991, 13-22
9. VON DANWITZ, B., MERSCHHEMKE, C., LÖBBEL, H.J., STEIN, P.: Zeitnahe Gewässerüberwachung mit kontinuierlichen Biostests. Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 134, 1992, 55-65
10. DEVENTER, K.: Der Dynamische Daphnientest: Erste Erfahrungen in der Immissions- und Emissionsüberwachung an Gewässern und Einleitungen in Hessen. Hessische Landesanstalt für Umwelt, Umweltpolitik, Arbeits- und Umweltschutz, Heft 112, Wiesbaden, 1990.
11. MATTHIAS, U., PUZICHA, H.: Erfahrungen mit dem Dynamischen Daphnientest. Zeitschrift für Wasser und Abwasserforschung 23, 1990, 193-198
12. DE VRIES, R.: INES-Informationsnetz Elbe-Sanierung - Die Belastungssituation der Elbe und Ansätze zur Sanierung. Zeitschrift für Vermessungswesen 117, Heft 8/9, 1992, 585-592

13. Umweltbehörde Hamburg: Kontinuierliche Messungen an Oberflächengewässern in Hamburg. Automatische Wassergütemeßsysteme. Hamburger Umweltberichte 31, Dezember 1990.
14. HENDRIKS, J.A., STOUTEN, M.D.A.: Monitoring the response of microcontaminants by dynamic *Daphnia magna* and *Leuciscus idus* assays in the rhine delta: Biological early warning as a useful supplement. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1993 (im Druck)
15. Umweltbehörde Hamburg: Wassergütenetz Elbe und Nebengewässer - Biologisches Frühwarnsystem. Monatsberichte September/Oktober 1993

# Erprobung des WRc-Fischmonitors zur Störfallüberwachung am Rhein

P. Stein, P.-D. Hansen und J. Löbbel

## Zusammenfassung

Zur kontinuierlichen Überwachung von Oberflächengewässern eignen sich im Durchfluß arbeitende biologische Testsysteme, die eine Änderung der Gewässergüte schnell und empfindlich erfassen können. Der WRc-Fischmonitor, der die Atemfrequenzänderungen (Kiemendeckelschlag) bei Regenbogenforellen registriert, ist ein solches System.

In Großbritannien wird der WRc-Fischmonitor bei den Wasserbehörden (Water Authorities) zur Überwachung der Oberflächengewässer eingesetzt, die der Trinkwassergewinnung dienen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es zu prüfen, ob der Einsatz des WRc-Fischmonitors am Rhein zur Erfassung von Störfällen sinnvoll ist. Dabei sollte das System hinsichtlich seiner Brauchbarkeit am Gewässer überprüft und Lösungsmöglichkeiten für die Probleme erarbeitet werden; hierbei sollten auch andere Fischarten neben der Forelle hinsichtlich ihrer Möglichkeit zur Exposition in Rheinwasser überprüft werden.

## Summary

The WRc-fish monitor uses eight rainbow trouts, each placed in its own separate tank supplied with a continuous through-flow of water. The ventilation frequency is measured as the number of gill beats per second. Sensing electrodes, fixed at the rim of the basin, detect and amplify the movements of the gill muscles. The results of the fish monitor (FM) are obtained by statistical calculations determined from a comparison between recent data in 10 min intervals with historical data of the last 2 h of all eight fishes. If the values exceed a defined limit (defined here as a value of 12 for fish monitor [FM]) for more than 15 min, an alarm is given.

For interpretation and validation of alarm events, the following biological parameters are evaluated: fish status (number of frequencies with a value of zero), power ratio (ratio of gill muscle signals to the signals from the rest of all muscles), fish strength (intensity of the signal over the full range of frequency). Additionally, physical-chemical parameters like conductivity, pH, oxygen content, chloride content, and temperature are recorded on-line.

The WRc-fish monitor was installed at monitoring station WKSt.-Nord at the River Rhine for water control in 1991. Here we discuss the problems with this system, its alarm detection and the use of rainbow trout at the River Rhine.

## Material

### WRc - Fischmonitor

Der WRc-Fischmonitor wurde vom Water Research Centre (WRc) in Medmenham [1,2,3] entwickelt, wobei die Auswertung der vorliegenden Untersuchungen ebenfalls vom Water Research Center begleitend betreut wurde. Der WRc-Fischmonitor besteht im Expositionsteil aus 8 Testbecken, in denen je eine Regenbogenforelle exponiert ist. Über drei Silber/Silberchloridelektroden, die jeweils an den Innenwänden der Testbecken angebracht sind, wird die Änderung des Kiemendeckelschlags gemessen [4].

Der WRc-Fischmonitor ist ein mobiles, in einem Caravan installiertes Überwachungssystem [5]. Der Caravan (Abb. 1) besteht aus einem Raum für die Elektrik, dem Computer mit Datenlogger (Data Tracker 1600, Data Track Technology) und Drucker für die Steuerung und Auswertung sowie Kontrollmonitore zur Kontrolle der Rohdaten; zwei weitere Naßräume dienen der Exposition der Fische (Kontrolltiere und die im Gewässerdurchfluß exponierten Fische). An der Außenseite des Caravan befindet sich ein selbstreinigender Filter sowie der Zu- und Abfluß des Rheinwassers.

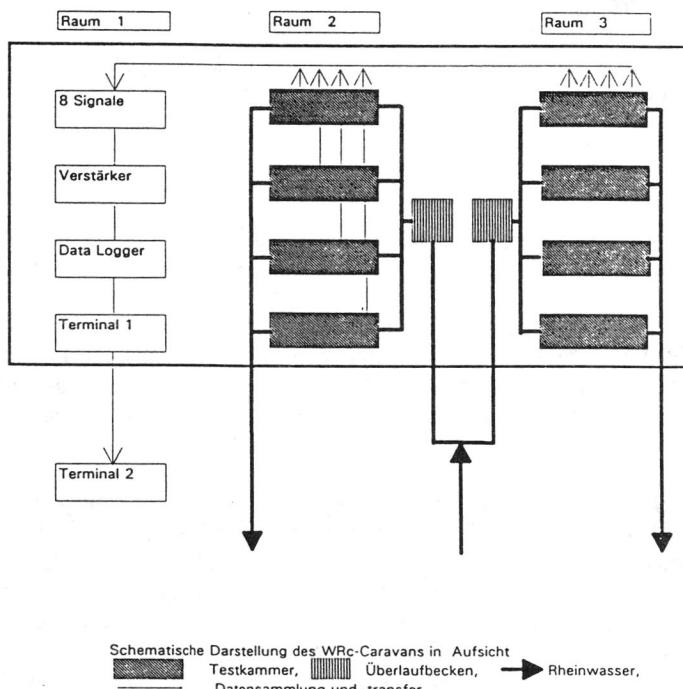


Abb. 1: Übersicht zum WRc-Fischmonitor

Zusätzliche chemikalisch-physikalische Parameter werden über den WRc-Rechner erfaßt und in die Bewertung miteinbezogen. Gemessen wurden neben Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff und Leitfähigkeit auch der Chloridgehalt und die Trübung im On-line Betrieb. In den Hälterungsbecken, die zur Bevorratung der zu exponierenden Fische dienten, wurde der Nitrat-, Phosphat- und Ammoniumgehalt kontrolliert. Im Falle einer Alarm-Meldung des WRc-Fischmonitors wurde zusätzlich zur Beweissicherung eine Rheinwasserprobe im Gaschromatographen auf leichtflüchtige organische Substanzen und chlorierte Kohlenwasserstoffe untersucht.

### **Funktionsweise des WRc-Fischmonitors**

Die Versorgung des WRc-Fischmonitors mit Rheinwasser wurde über die Versorgung der Wasserkontrollstation sichergestellt. Es wurde kontinuierlich der Rhein beprobt und aus zwei Überlaufbecken das zu prüfende Rheinwasser zur kontinuierlich Versorgung des WRc-Fischmonitors mit seinen 8 Testkammern entnommen; die Durchflußgeschwindigkeit in den jeweiligen Testkammern betrug 1 L/Min. Als Testfisch wurde die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) im Rheinwasser exponiert. Die in den Expositionskammern eingesetzten Fische wurden jeweils über 3 Wochen vor Testbeginn an das Rheinwasser adaptiert; im Falle einer WRc-Alarmgebung wurde der Zulauf zu den Hälterungsbecken durch ein vom Rechner gesteuertes Ventil geschlossen.

Die Durchfluß-Expositionskammern waren jeweils mit einer Regenbogenforelle von ca. 15 cm Länge bestückt. Während des kontinuierlichen On-line Monitorings über den Zeitraum von einer Woche werden die Fische nicht gefüttert. Es wurden immer jeweils nur 4 Fische ausgewechselt (Abb.1), damit auch während der Wartungsarbeiten am WRc-Fischmonitor der Überwachungsbetrieb mit den restlichen 4 Fischen aufrechterhalten werden konnte.

### **Meßparameter und Alarmkriterien**

Die Nullfrequenzen der Kiemendeckel werden als Fischstatus (FS) registriert, hierbei werden alle Messungen, bei denen die Kiemendeckelfrequenz Null ist, aufaddiert.

Dies geschieht, wenn mehrere Fische in demselben Meßintervall keine Atemfrequenz zeigen oder wenn ein Fisch über mehrere Meßintervalle keine Atemfrequenz zeigt. Bei Überschreitung eines Grenzwertes (FS= 30) müssen die exponierten Fische überprüft werden, durch die der sogenannte FS-Alarm ausgelöst worden ist. Dieser Parameter soll verhindern, daß die exponierten Fische nach einem extremen Schadstoffeintrag an dessen Folgen sterben. Es werden bei der Überwachung durch den Fischmonitor diejenigen Fische nicht berücksichtigt, deren Atemfrequenz Null ist. Zur Interpretation von Alarmfällen und deren Absicherung werden sowohl die "Power-ratio" (Verhältnis der Signalstärke der Kiemenmuskulatur zur restlichen Muskulatur) als auch die "Fisch Power" (Stärke des Signals über den gesamten Bereich der Atemfrequenz) ermittelt. Aus dem Verhältnis der Kiemendeckelmuskulatur zur gesamten Muskulatur

(einschließlich der Schwanzflossenmuskulatur) läßt sich die Schwimmaktivität der exponierten Fische abschätzen. Geht das Verhältnis gegen den Wert 1, ist die Aktivität gering, geht der Wert jedoch gegen Null, so wird eine hohe Schwimmaktivität angezeigt. Für einen Alarm bedeutet dieses, daß man hier eine Fluchtreaktion der exponierten Fische parallel zu der ansteigenden Atemfrequenz erkennen kann [6].

## Ergebnisse

Der WRc-Fischmonitor war seit dem 15.01.1991 an der WKSt. Nord des Landesamtes für Wasser und Abfall in Kleve-Bimmen implementiert. Dort wurde mit dem Testsystem eine kontinuierliche Gewässerüberwachung über einen Jahreszyklus bis Anfang des Jahres 1992 durchgeführt [5,7].

Störungen an der Anlage traten nur bei den Ausdrucken durch eine fehlerhafte serielle Schnittstelle am Drucker auf. Verstopfungen wurden von Zeit zu Zeit an den direkten Einleitungen zu den Testbecken beobachtet. Alle Störungen werden durch das Biotestsystem aufgenommen und dokumentiert.

Die kontinuierliche Datenaufzeichnung ermöglichen eine sehr gute Kontrolle über äußere Störungen und bieten somit eine schnelle Möglichkeit, Falschalarme von signifikanten Änderungen des Gewässerzustandes durch "gefährliche Stoffe" Substanzen zu unterscheiden.

Der on-line Betrieb am Niederrhein bei Fließkilometer 865 konnte im Jahr 1991 bis auf den frostbedingten Ausfall von 7 Tagen im Februar, in der eine Lufttemperatur bis zu -16 °C gemessen wurde, aufrechterhalten werden; unter diesen schon extremen Temperaturbedingungen froren verschiedene Außenleitungen zu, so daß die Wasserversorgung der Anlage gefährdet war.

Bei gemäßigten Wassertemperaturen zwischen 8 - 15 °C kann ein Einsatz der Testfische über zwei Wochen erfolgen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, alternierend einen der beiden Testräume zu warten. Bei Wassertemperaturen größer als 22-23 °C ist ein Betrieb des Monitors kritisch, eine Auswertung der Alarne nicht möglich, da die Forellen einem großen physiologischen Streß ausgesetzt sind.

Zur Darstellung des Normalverhaltens der Regenbogenforellen wurden unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen mit Rheinwasser mit dem Fischmonitor über wahllos gewählte Zeitintervalle von 4-8 h im Jahr 1991 mit unterschiedlichen Individuen Versuche durchgeführt. Wichtig war, daß in diesen Zeiträumen keine äußerlichen Störungen, kein Fischstatusalarm und kein Fischmonitoralarm auftreten durfte.

Das so ermittelte Normalverhalten wurde mit einem unbelasteten Testwasser im Vergleich zum Rheinwasser überprüft (Tab. 1); es wurden keine wesentlichen Unterschiede festgestellt.

Zeitraum	Fisch-Monitorergebnis				
	Mittelwert	Min.	Max.	$\sigma$	Alarmschwelle
17.05. - 24.05.91	2.24	-2.98	16.0	2.73	10.43
26.05. - 31.05.91	3.37	-2.62	15.3	3.04	12.49
01.06. - 07.06.91	2.63	-2.70	14.2	2.68	10.73
06.08. - 17.08.91	1.87	-2.98	17.2	2.73	10.06
12.09. - 17.09.91	2.32	-2.77	17.7	2.60	10.12
28.02. - 04.03.92	3.03	-2.94	17.3	2.85	11.58

Tab.1 Normalverhalten der Regenbogenforellen mit Rhein und Testwasser Schwellenwert: 3 \* sigma plus Mittelwert. Berechnung aus minütlichen Meßwerten

\* = Leitungswasser

Eine Alarmgebung bei einem "Störfall" im Gewässer wird durch die Änderung der Atemfrequenz ausgelöst. Das Meßintervall beträgt 1 Minute; aus einem statistischen Vergleich der aktuellen Ventilationsfrequenz eines 10 Minuten-Intervalls der davorliegenden 2 Stunden berechnet sich das "Fischmonitor Ergebnis = FM". Jede Abweichung der Daten aus dem aktuellen Fenster von Referenzwerten über 2 Stunden wird aufgezeichnet, und ergibt nach dem Vergleich mit der Normalverteilung das zur Bewertung der Störung gemessenen FM. Bei Überschreiten des FM-Ergebnisses über die vorgegebene Alarmschwelle wird der Fischstatus kontrolliert, dabei wird festgestellt, ob alle Fische in die Berechnung des FM aufgenommen wurden (FS=0).

Durch die Darstellung der Atemfrequenzen der einzelnen Fische kann gezeigt werden, welche der exponierten Forellen für die Überschreitung des FM-Alarms verantwortlich waren; für eine Alarmgebung sind mindestens zwei in ihrer Atemfrequenz gesteigerte Forellen erforderlich.

Durch Aufteilung in je 4 separate Expositionskammern lässt sich eine Störung einfach ermitteln. Durch den Parameter "power ratio" lässt sich bei einem FM-Alarm eine starke Schwimmaktivität erkennen, so ist zusätzlich eine Abschätzung über das Fluchtverhalten der Forellen möglich.

## Erprobung der Toxizität des Rheinwassers

Um eine Aussage über die Toxizität des Normalzustand des Rheinwassers zu geben, wurde der WRc-FM über den Zeitraum von einer Woche mit Testwasser versorgt. Nach dieser Woche wurde das Testsystem auf Rheinwasser umgestellt, um die Toxizität des Rheinwassers gegenüber dem Testwasser aufzuzeichnen.

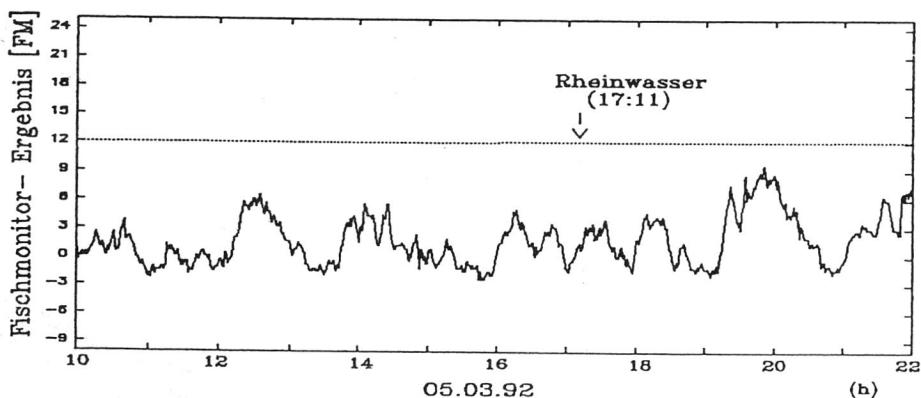


Abb. 2: Fischmonitor - Ergebnisse von Testwasser mit anschließendem Umschalten auf Rheinwasser am 05.03.92, Standort Rhein km 865

Es ist bei der Umstellung von Testwasser auf Rheinwasser keine signifikante Änderung des FM-Wertes zu erkennen. Es kann hiermit gezeigt werden, daß die Exposition im WRc-Fischmonitor für die Fische keine akute Belastung durch das Rheinwasser bedeutet.

Bei der Untersuchung wurde darauf geachtet, daß es möglichst keinen Temperaturunterschied zwischen Test- und Rheinwasser gab.

## Auftreten von Alarmfällen

Während des on-line Betriebs am Niederrhein, wurde in 10 Fällen eine signifikante Änderungen der Ventilationsfrequenz aufgezeichnet [5]. Der Schwellenwert betrug bis zum 24.05.1991  $FM = 10$  und wurde in der Folgezeit auf einen Wert von  $FM = 12$  erhöht, wobei dieser Wert für die Dauer von 15 Minuten überschritten sein mußte, um als Alarmfall zu gelten. Es konnten keine erhöhten Stoffkonzentrationen bei den durchgeführten gaschromatographischen Analysen im Gewässer gefunden werden. Die Abbildung 3 zeigt den Kurvenverlauf (FM-Wert) zur Alarmgebung vom 31.01.91 in der Zeit von 18.00 Uhr bis 0.00 Uhr.

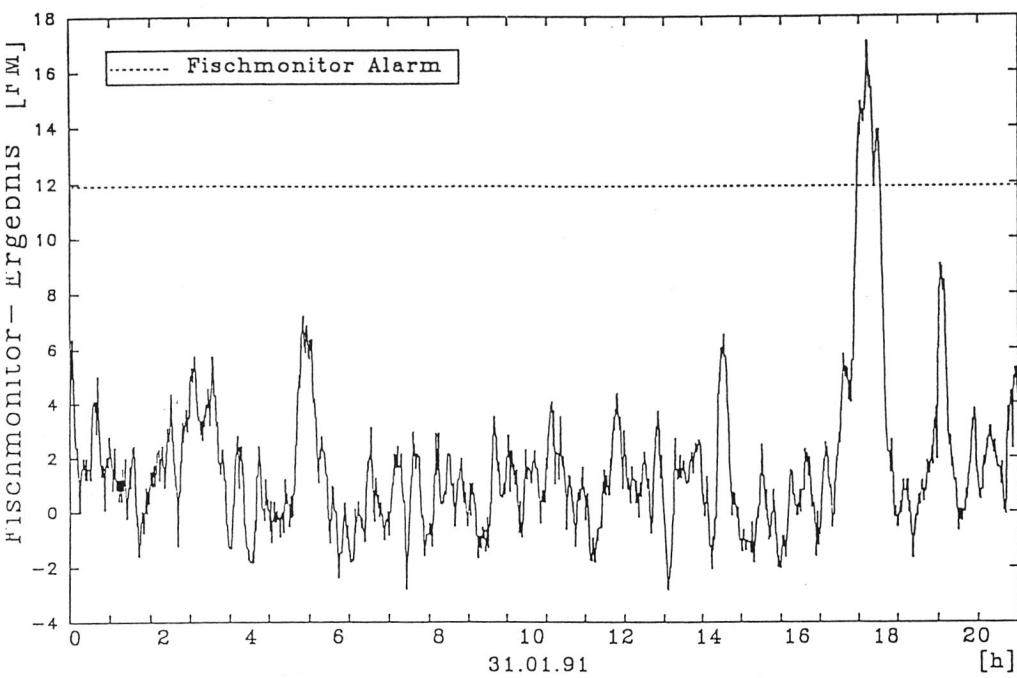


Abb. 3: Fischmonitor- Ergebnis am 31.01.1991

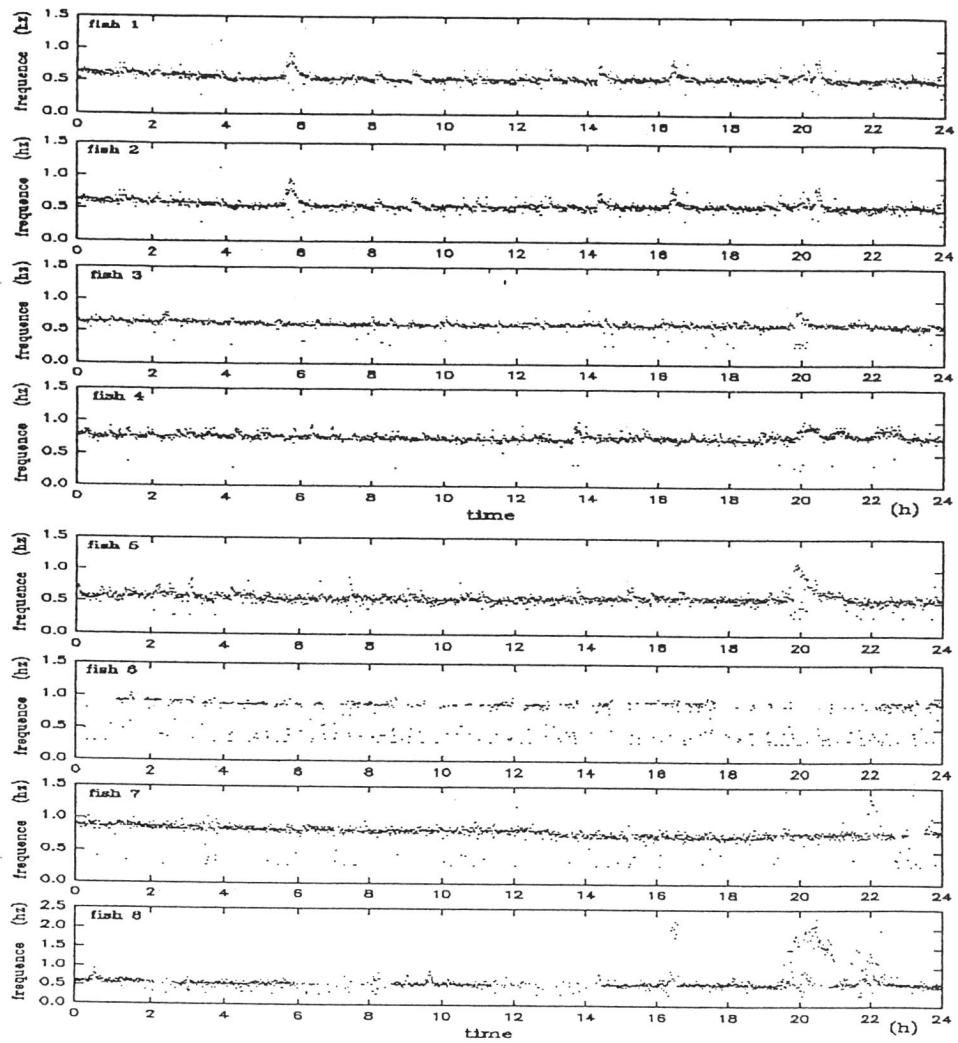


Abb. 4: Fischfrequenzen der 8 Regenbogenforellen am 31.01.1991.  
 Der Anstieg der Atemfrequenz der Fische 1,2,3,4,5 und 8  
 führte zum Überschreiten des Alarmwerts.

Die Abbildung 4 zeigt den deutlichen Anstieg der Atemfrequenzen bei den Fischen 1, 2, 3, 4, 5, und 8. Die Erfassung der "Störfälle" bzw. der Alarm-Meldungen im Jahre 1991 zeigt, daß das Testsystem sich für die Überwachung des Rhein eignet; es wird hier eine kurzfristige Änderung des Gewässerzustandes gegen im Vergleich zum Normalverhalten durch die im Rheinwasser exponierten Fische angezeigt.

### Eignung von Regenbogenforellen als Testfische im WRc-FM am Rhein

Es stellt sich die Frage, ob die Forellen sich für den Einsatz zur Exposition im Rheinwasser eignen oder nicht.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß eine Hälterung der Forellen im Rheinwasser möglich ist; es treten auch bei einer längerfristigen Exposition von über einem dreiviertel Jahr keine Schädigungen bei den Tieren auf; die exponierten Fische hatten über den gesamten Expositionzeitraum eine normale Gewichtszunahme. Auch Wassertemperaturen von bis zu 22 °C waren nicht problematisch.

Auf den Austausch der Testtiere nach einem Alarm wurde verzichtet, da keine dauerhaften Änderung der Atemfrequenz festzustellen waren. Die Alarmgebungen vom 29.06.91 und 01.07.91 wurden mit derselben Gruppe von Testtieren aufgezeichnet.

Es konnte gezeigt werden, daß auch nach einem Alarm der Fischtest bei weiteren toxischen Veränderungen am Gewässer empfindlich reagiert. Bei Atemfrequenzänderungen über einen längeren Zeitraum jedoch oder einem Absinken der Atemfrequenz auf null nach einem Alarm müssen die Testtiere ausgewechselt werden.

	Minima	Maxima
Sauerstoff [mg/l]	6.0	12.5
Temperatur [°C]	4.0	23.0
pH	7.0	8.0
Leitfähigkeit [ms/m]	50.0	140.0

Tab. 2: Minima und Maxima verschiedener physikalischer und chemischer Parameter aus minütlichen Messungen für das Jahr 1991 bei Rheinkilometer 865.

Innerhalb der in Tabelle 2 aufgeführten Schwankungsbreite für Sauerstoffgehalt, Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit konnte ein störungsfreier Betrieb des WRc-Fischmonitors gewährleistet werden. Aus der Tab. 2 geht weiterhin hervor, daß die minimale Sauerstoffkonzentration im Rhein im Jahre 1991 [9] nicht unter 6 mg/L lag; eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr in den Expositionskammern war daher nicht erforderlich.

Der kontinuierliche Betrieb bei niedrigen Temperaturen  $\leq 5^{\circ}\text{C}$  am Rhein zeigte keine Hinweise für eine verminderte Empfindlichkeit der Fische im Vergleich zu gemäßigten Temperaturen von  $6 - 18^{\circ}\text{C}$ . In der Abb. 3 konnte gezeigt werden, daß auch bei einer Temperatur von  $5^{\circ}\text{C}$  der Fischtest eine gute Empfindlichkeit gegenüber einer toxischen Veränderung des Rheinwassers anzeigt.

Es kam auch durch allein erhöhte Temperaturen zu keiner Alarmgebung; Baldwin et. al. [3] konnte zeigen, daß auch bei erhöhten Temperaturen von bis zu  $24^{\circ}\text{C}$  im on-line Betrieb für kurze Perioden keine erhöhten FM Werte auftreten.

### **Ganzjährige Einsatzfähigkeit des WRc-Fishtest mit den Regenbogenforellen**

Da das Rheinwasser für den Test nicht vorher temperiert wurde, ist die Frage der ganzjährigen Einsatzfähigkeit des Fischmonitors mit dem Besatz von Regenbogenforellen zu überprüfen. Im Jahr 1991 lag die minimal gemessene Rheintemperatur in Bimmen im Februar bei  $1,5^{\circ}\text{C}$  und im August bei ca.  $24,5^{\circ}\text{C}$ . Diese Temperaturschwankungen spielen für den Betrieb des Fischmonitors keine wesentliche Rolle, da die Fische sich jeweils an die Temperaturen adaptieren konnten. Bei extremen Temperaturen über  $22^{\circ}\text{C}$  waren geeignete Maßnahmen erforderlich zu kühlen bzw. in der Fischhälterung die Fische vor der direkten Sonneneinstrahlung zu schützen.

### **Schlußfolgerungen**

Der WRc-Fischmonitor eignet sich gut für die Überwachung von Oberflächengewässern, das Testsystem hat während des Einsatzes hinreichend empfindlich Veränderungen des Gewässerzustandes angezeigt. Die am Gewässer auftretenden "Störfälle" werden als Alarmgebung (FM-Wert) im Sinne einer "Frühwarnung" erfaßt.

Das Testsystem ist über das gesamte Jahr einsatzfähig, nur extrem hohe Temperaturen können den Testverlauf stören. Diese Situationen können am Rhein über ca. 4 Wochen im Jahr auftreten. Als Alternative könnte die Regenbogenforelle durch einen anderen Testfisch für extreme Temperaturbereiche ersetzt werden.

### **Danksagung**

Wir bedanken uns bei dem Umweltbundesamt für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens und bei den Mitarbeitern des LWA der Wasserkontrollstation-Nord für die umfangreiche Unterstützung.

## Literatur

1. EVANS, G. M.: Development of the WRc Mk III Fish Monitor: description of the system and its response to some commonly encountered pollutants. WRc Publication (TR 233), 1986
2. BALDWIN, I.G.; HARMAN, M.M.I. & NEVILLE, D.A.: Performance characteristics of a fish monitor for detection of toxic substances: part 1-laboratory trials. Water Research
3. BALDWIN, I.G; HARMAN, M.M.I, NEVILLE, D. & GEORGE, S.G.: Performance characteristics of a fish monitor for detection of toxic substances: part 2-field trials. Water Research
4. SLOOF, W.: Detection limits of a biological monitoring system based on fish respiration. Bull. Envi. Cont. Tox. 23, 1979, 517
5. LÖBBEL, H.-J. und STEIN, P.: Messung der Kiemendeckelbewegung mit dem WRc-Fischmonitor im on-line Betrieb am Niederrhein. Schriftenreihe des Vereins Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1993, 323-332
6. WATER RESEARCH CENTRE: Manual WRc-Fishmonitor ,Introduction to the intake protection system, Version 2.03; 1989, 2
7. DANWITZ, B.V., MERSCHHEMKE, C., LÖBBEL, H.-J., STEIN, P.: Zeitnahe Gewässerüberwachung mit kontinuierlichen Biotests, Biologische und Biochemische Meßverfahren-Methoden, Anwendungsbereiche und Interpretationen,16. Aachener Seminar 19.-20.03.92 55-65, 1992
8. BASS, M.L.: Cardiovascular and respiratory changes in Rainbow Trout exposed intermittently to Chlorine. Water Res. 11, 1976, 497-502
9. Jahresbericht'92 des Landesamtes für Wasser und Abfall NRW, Düsseldorf, 1993



# **Der Koblenzer Verhaltensfischtest, ein auf dem Meßsystem BehavioQuant beruhender Biomonitor zur Gewässerüberwachung**

E. Blübaum-Gronau, M. Hoffmann, O.H. Spieser, F. Krebs

## **Zusammenfassung**

Zum Schutz der aquatischen Lebensgemeinschaften und des Trinkwassers ist eine biologische Gewässerüberwachung mit ausgewählten Testorganismen notwendig. Wasserwerke müssen rechtzeitig gewarnt werden, wenn das Rohwasser Schadstoffe enthält. Hierfür eignen sich in erster Linie Biomonitor, deren Testorganismen möglichst viele Gemeinsamkeiten mit dem Menschen haben. Unter den aquatischen Organismen erfüllen Fische als Wirbeltiere diese Bedingungen am besten. Dabei ist es jedoch unerlässlich, daß Testkriterien angewandt werden, mit denen die Wirkungen einer großen Vielfalt von Schadstoffen festgestellt werden können. Bei den zur Zeit häufig eingesetzten Fischtestanlagen sollen die Schadstoffe an Hand einer reduzierten positiven rheotaktischen Reaktion der Versuchsfische registriert werden. Dies setzt aber eine massive physiologische Schädigung der Fische voraus, so daß in vielen Fällen die Indikation von Schadstoffen im subletalen Konzentrationsbereich nicht möglich ist. Der Koblenzer Verhaltensfischtest benutzt das Meßsystem BehavioQuant. Eine deutliche Steigerung der Testempfindlichkeit wird bei diesem computergesteuerten, bildverarbeitenden Verhaltensmeßsystem durch die Registrierung von Änderungen im Verhaltensmuster eines kleinen Testfischschwärms erreicht. Durch die für die kontinuierliche Gewässerüberwachung automatisierte Aufzeichnung und separate Bewertung der sechs Verhaltensparameter Motilität, Bewegungssinkonstanz, Anzahl der Wendungen, Schwimmhöhe, mittlere horizontale Position und Abstandsverhalten wird die Indikation biologisch relevanter Schadstoffe ermöglicht. Eine differenzierte Alarmwertgebung wird durch den statistischen Vergleich der aktuellen Meßwerte mit denen eines Bezugszeitraumes von sechs Stunden (24 Einzelmessungen) vor der aktuellen Messung ermöglicht. Dabei werden aus den Meßdaten der 24 Einzelmessungen separat für jeden Verhaltensparameter dynamische Grenzwerte errechnet.

Die substanzbedingten Änderungen der Verhaltensmeßgrößen bei der Goldorfe *Leuciscus idus melanotus* L. werden an Hand der Ergebnisse aus Aufstockungs-experimenten mit Natriumpentachlorphenolat dokumentiert.

## Summary

To protect both the aquatic symbiosis and drinking water resources it is necessary to monitor surface waters with the help of selected test organisms. Waterworks must be warned in time if the surface water becomes contaminated. To monitor the quality of drinking water, it is preferable to use biomonitor with test organisms which are similar to humans in their physiology. In this regard fish, being vertebrates, are the most suitable aquatic organisms. It is essential, however, that test criteria be used by which a large variety of contaminants can be determined. With the fish tests frequently used at present, contaminants are supposed to be detected by a reduced positive rheotactic reaction of the test fish. This presupposes massive physiological damage to the fish, so that in many cases it is not possible to detect contaminants in sublethal concentrations. The Koblenz behavioural fish test uses the behavioural measurement system BehavioQuant. A distinct increase in test sensitivity can be obtained by analysing the changes in the behaviour patterns of a small shoal of test fish by the help of the computer-controlled image processing system BehavioQuant. For continuous river monitoring with the Koblenz behavioural fish test, the water is directed through two test tanks, in each of which there are six golden orfes (5-8 cm). Since the continuous water flow is very low (5 L/min) the fish can move around freely in the tank. They are surveilled round the clock two minutes at 15-minute intervals by two video cameras through a mirror, which is set at a 45° angle in front of the tanks. The cameras are connected by a multiplexer to the image processing unit, which together with a personal computer evaluates the continuous video signals. Between these single measurements, the movement traces of all fishes are computed. These traces provide the basis for quantifying the behaviour, that has already been shown to be suitable in many fish toxicology tests. The indication of the biological relevant pollution is the result of in the evaluation of the six behavioural parameters i.e. motility, irregularity of swimming velocity, number of turnings, swimming height, mean horizontal position and shoaling behaviour. The differentiated alarm signal is attained by statistical comparison of the current measuring values with previous data six hours (24 single measurements) before. These 24 single measurements form the basis for calculating separate dynamic limit values for the six behavioural parameters.

The changes in the behaviour patterns of golden orfes caused by chemicals are documented by tests with Sodiumpentachlorphenolate.

## Biomonitore in der Gewässerüberwachung

Die Detektion einer plötzlich auftretenden Schadstoffwelle in Oberflächengewässern hat insbesondere im Hinblick auf die Trinkwassergewinnung in den letzten Jahren einen immer größeren Stellenwert eingenommen. In der Praxis kann sich ein effizientes Überwachungssystem nicht allein auf die physikalisch-chemischen Analysen stützen, denn zum einen sind nicht immer geeignete Analyseverfahren verfügbar und zum anderen ist eine kontinuierliche Vollanalyse vom Aufwand und Zeitbedarf sowie unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten kaum durchführbar [1,2,3]. Außerdem geben die gemessenen Konzentrationen immer noch keinerlei Information über die

biologische Disponibilität der gefundenen Verbindung. Ebensowenig kann festgestellt werden, welche Wirkung die betreffende Verbindung in Kombination mit anderen Stoffen auf aquatische Organismen hat, die mehreren Stoffen gleichzeitig ausgesetzt sind. So konnten z.B. im Rhein immerhin 288 Chemikalien nachgewiesen werden [4], von denen routinemäßig ca. 150 bis 200 Stoffe wahrgenommen werden [5]. Schätzungen hinsichtlich der insgesamt im Rhein vorkommenden umweltfremden Verbindungen liegen bei einer Größenordnung von 30 bis 50 Tausend [6]. Außerdem ist eine Bewertung der Ergebnisse der routinemäßigen, chemikalischen Analyse an Hand der vorliegenden Toxizitätsdaten problematisch; denn neuerdings hat sich gezeigt, daß Toxizitätsdaten, die unter Standardbedingungen erhoben wurden, schon deswegen auf Feldbedingungen nur schwer zu übertragen sind, weil die Gewässermatrix einen erheblichen Einfluß auf die Toxizität eines Stoffes hat. So kann die Anwesenheit der nahezu ubiquitären Humussäuren die biologische Wirksamkeit von Schadstoffen um Größenordnungen verändern [7]. Aus diesem Grund wurden in der letzten Zeit vermehrt Biosonden, d.h. Systeme, die aus in Kultur gehaltenden Organismen, Zellen oder Organellen (Bioindikatoren) und einer Registriereinheit bestehen [8], eingesetzt. Diese Bioalarmsysteme bilden eine sinnvolle Ergänzung zur chemischen Überwachungstechnik, wenngleich das Signal aus einem Bioalarmsystem nur einen indizierenden Wert für die Toxizität des Wassers hat. Für die Verwendung von Biosonden spricht weiterhin, daß die meisten chemischen Analysen eine relativ lange Zeit (Stunden bis Tage) benötigen, während Organismen häufig innerhalb von Minuten reagieren [9], wobei eine Kombination von Bioalarmsystemen mit Organismen unterschiedlicher Systemzugehörigkeit und folglich auch unterschiedlicher Toleranzbereiche (wie Bakterien, Algen, Daphnien, Muscheln und Fische) eine Erhöhung der Sicherheit in der summarischen Erkennung gesundheitsbeeinträchtigender Substanzen im Wasser bringt [10,5]. Denn durch physiologisch grundlegend unterschiedliche Lebensformen (Bakterien, Pflanzen, Tiere) kann eine größere Anzahl verschiedenartiger Wirkungsformen eventuell vorhandener Umweltchemikalien erfaßt werden [8,11].

Prinzipiell könnten alle Charakteristika des Normalverhaltens eines Gesamtorganismus für die Beobachtung herangezogen werden. Es stellt sich nur die Frage, wieviele und welche möglicherweise auftretenden Chemikaliengruppen die ausgewählten Charakteristika beeinflussen. Damit also möglichst viele, unterschiedliche chemikalieninduzierte Effekte am selben Organismus detektiert werden können, ist es sinnvoll solche Testkriterien auszuwählen, die von einem breiten Spektrum physiologischer Vorgänge abhängen. Es liegt also auf der Hand die integrative Verhaltensreaktion auf der Ebene des Gesamtorganismus als Anzeiger der Wirkungen von Chemikalien sowie von Umweltveränderungen heranzuziehen.

Schon aus ökonomischen Sachzwängen heraus muß die Auswahl geeigneter Testorganismen gut überlegt sein. Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß im Hinblick auf die Sicherung des Rohwassers für die Trinkwassergewinnung Testorganismen ausgewählt werden sollten, die in ihren Körperfunktionen mit dem Menschen möglichst viel gemeinsam haben. Dies trifft unter den aquatischen Organismen vor allem für die Fische zu, die wie der Mensch zu den Wirbeltieren zählen. Obwohl sich die toxikologische Wirkung auf Fische nicht uneingeschränkt mit denen bei Säugetieren

vergleichen läßt, so ist doch nicht zu vernachlässigen, daß innerhalb der Wirbeltiere grundlegende Gemeinsamkeiten im Stoffwechsel bestehen. Dies gilt beispielsweise für das Hormonsystem, die Fremdstoffe umbauenden Enzyme, die Gewebestruktur der meisten Organe und die Überträgerstoffe im Nervensystem. Besonders hervorzuheben ist, daß die Nerven- und Sinnessysteme der Wirbeltiere einander homolog sind, d.h. daß sie nicht nur in der Stammesgeschichte aus einer gemeinsamen Wurzel entstanden sind, sondern daß ihnen gleiche Basisstrukturen und -funktionen zu Grunde liegen [12,13]. So haben die Hirnnerven der Fische nicht ohne Grund dieselben Bezeichnungen wie die des Menschen und auch einander entsprechende Typen von Nervenfasern. Es sei nicht unerwähnt, daß selbst eine Sonderbildung wie das Seitenliniensystem, das Fischen die Wahrnehmung von Strömungen ermöglicht, nicht nur eine phylogenetische Vorstufe des Innenohres [14] darstellt, sondern darüberhinaus weitgehende physiologische und zellmorphologische Übereinstimmungen mit diesem aufweist, so daß beide Organe zusammen als Acustico-lateralis-System bezeichnet werden. Folglich kann davon ausgegangen werden, daß mit dem Einsatz von Fischen als Testorganismen zumindestens eine Abschätzung des Gefährdungspotentials für den Menschen möglich ist [10]. Dies ermöglicht eine Übertragung der Ergebnisse von aquatischen Verhaltenstests auf höhere Tiere und den Menschen.

Verhaltensänderungen repräsentieren nicht nur primäre Wirkungen auf das Nervensystem, sondern sie spiegeln auf dem Umweg über eine Beeinträchtigung des Gesamtorganismus außerdem sekundäre Effekte auf andere Organe wider.

Die Verhaltensantwort von aquatischen Organismen wurde bereits häufig als Anzeiger von Schadstoffen eingesetzt [15,16,17,18,19]. Dabei können bei der Analyse vom Verhalten aquatischer Organismen vier prinzipielle Linien unterschieden werden [20]: Erstens die lokomotorische Antwort, die sich vorwiegend in Präferenz- und Vermeidungsreaktionen und Aktivitätsänderungen widerspiegelt. Zweitens Veränderungen im Atmungsverhalten (Opercularbewegungen und "cough"-Reaktionen). Drittens Verhaltensänderungen, denen Räuber/Beute- Beziehungen zugrunde liegen, und viertens schadstoffinduzierte Änderungen im konditionierten Verhalten.

Die bereits seit drei Jahrzehnten in der Überwachung von Oberflächengewässern eingesetzten Strömungsfischtestsysteme [21, 2, 23], basieren auf der positiven Rheotaxis. Positiv rheotaktische Reaktionen - Ausrichtung der Körperlängsachse parallel zur Wasserströmung - lassen sich bei vielen Fischarten beobachten. Diese Reflexbewegung umfaßt sowohl eine reizbezogene Wendebewegung als auch das Fixieren der Körperlage zur Reizrichtung durch kräftige Schwimmbewegungen. Diese Reaktion scheint aber im Fisch zentralnervös so fest programmiert zu sein, daß sie als Indikator subletaler Schädigungen zu insensitiv ist, denn wenn der Fisch seine korrekte Lage im Raum, welche durch komplexe sensorische, zentralnervöse und motorische Funktionen sichergestellt wird, nicht aufrecht erhalten kann, liegen meist letale Schädigungen vor [24]. Eine Steigerung der Empfindlichkeit kann durch eine Analyse des lokomotorischen Verhaltens bzw. in einem weiteren Schritt in der Untersuchung von intra- und interartlichen Antworten erreicht werden [24,25]. Auf der anderen Seite lassen sich Verhaltensabnormalitäten bereits während der Expositionszeit erkennen,

während Veränderungen in der Schwimmgeschwindigkeit von Fischen nach Stunden bzw. eine Reduzierung ihrer Bewegungsaktivität erst nach Tagen zu beobachten sind [26].

Der Vorteil der lokomotorischen Antwort im Zusammenhang mit subletalen Biotests ist die auf einer höheren Ebene erfolgte Integration einer Vielzahl von "simplen Reflexen" (z.B. die Gleichgewichts- und taktischen Reaktionen), die die Voraussetzung für das lokomotorische Verhalten bringen. Zu solch leicht zu quantifizierenden Bewegungsvariablen zählen das Wendeverhalten (Größe, Richtung, Häufigkeit, Folge der Winkel der Wendungen und die Länge der Strecken, die die Wendungen trennen), Geschwindigkeit und die Zeit, die sich die Tiere in einzelnen Bereichen aufhalten [27].

Die intra- und interartlichen Reaktionen repräsentieren die höchste Ebene der zentralnervösen Integration. Zu diesen komplexen Verhaltensmustern gehören unter anderem Rangordnungen, territoriale Balz- und Laichrituale sowie Räuber/Beute-Beziehungen. Für einige dieser Verhaltensweisen konnte bereits eine Empfindlichkeit gegenüber subletalen Schädigungen gezeigt werden, und der Überlebenswert einer Fluchtreaktion vor einem Räuber steht außer Frage. Somit ist für einen Biotest, der das lokomotorische sowie das intra- und interspezifische Verhalten aquatischer Organismen analysiert, die höchste Sensitivität zu erwarten. Die detaillierte Analyse von Verhaltensweisen war über lange Jahre ein sehr arbeitsintensiver, und damit ineffektiver Versuchsansatz. Problematisch war weiterhin die Quantifizierung der Daten. Ein möglicher Ansatz ist hier der Einsatz der Videotechnik wie sie z.B. von Lubinski et al. [28], Miller et al. [29] oder auch Smith und Baily [11] beschrieben werden. Aber erst die heute zur Verfügung stehenden leistungsfähigen und schnellen PC's erlauben eine automatische 24-Stunden Überwachung von aquatischen Organismen. Solch eine Methode zur objektiven Quantifizierung des Verhaltens von Fischen, die keinen physischen und psychischen Strapazen ausgesetzt werden, bietet das von Spieser und Yediler [30] vorgestellte BehavioQuant Meßsystem [31,32,33]. Bei diesem System werden mit Hilfe der Bildverarbeitung simultan sowohl lokomotorisches Verhalten als auch intraspezifische Beziehungen analysiert. Daß die einzelnen Verhaltensparameter durch Substanzen z.B. durch das Herbizid Atrazin in unterschiedlichem Maße beeinflußt werden, konnten Spieser und Freitag bereits 1984 zeigen [34]. In Koblenz wurde dieses Meßsystem zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung eingesetzt. Die dabei in Koblenz gewonnenen Erfahrungen forderten fortlaufende Änderungen der Ausgangsprogramme, die jeweils in Zusammenarbeit zwischen der Metacom Gesellschaft für Datensysteme, München und dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg durchgeführt wurden. Das Ergebnis dieser Entwicklung wird im folgenden beschrieben.

## **Grundlagen des Koblenzer Verhaltensfischtests**

### **Testorganismen**

In diesem Biomonitor kann prinzipiell jede Fischart eingesetzt werden. Für eine erste Überprüfung der Praxistauglichkeit dieses in der Toxikologie schon erprobten [7,35,36] neuen Fischtests für die Überwachung von Oberflächengewässern wurde als Versuchsfisch die Goldorfe *Leuciscus idus melanotus* L. gewählt, die mit einer Länge von 5-8 cm den im statischen Fischtest nach DIN 38412 (Teil 15 und 20) eingesetzten Fischen entspricht [37,38]. Bei der Goldorfe handelt es sich ursprünglich um örtlich begrenzt, spontan auftretende Umwandlungen der jungen Silberorfe in Goldorfen, der weißgoldenen Spielart des Alands *Leuciscus idus*. Dieser einheimische Karpfenfisch kommt, wie auch seine in vielen Gewässern eingebürgerte Farbvariante, hauptsächlich in der Brassenregion fließender Gewässer in Mittel- und Nordeuropa vor. Für den Einsatz dieser Art in einem kontinuierlich betriebenen Testsystem zur Oberflächengewässerüberwachung spricht weiterhin, daß der Aland in seiner ökologischen Valenz der  $\beta$ -mesosaproben Zone eines Fließgewässers entspricht, und damit zu einer Fischwelt zählt, wie sie in den meisten Gewässern Mitteleuropas unter natürlichen Verhältnissen vorkommt, während z.B. die Regenbogenforelle *Salmo gairdneri* ihren Lebensraum in der oligosaproben Zone hat [39].

Weiterhin sind die einsömmerigen Goldorfen (5-8 cm) den größeren Tieren, wie sie z.B. für den Strömungsfischtest Aqua-Tox-Control vom Hersteller laut Handbuch benötigt werden, vorzuziehen, da Alter bzw. Größe und Gewicht des Fisches eine wesentliche Rolle bezüglich ihrer Reaktion auf eine giftige Substanz spielen [40]. So konnte Marchetti [41] am Beispiel unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Regenbogenforelle nachweisen, daß ältere Tiere höhere Konzentrationen vertragen als frisch geschlüpfte Brut.

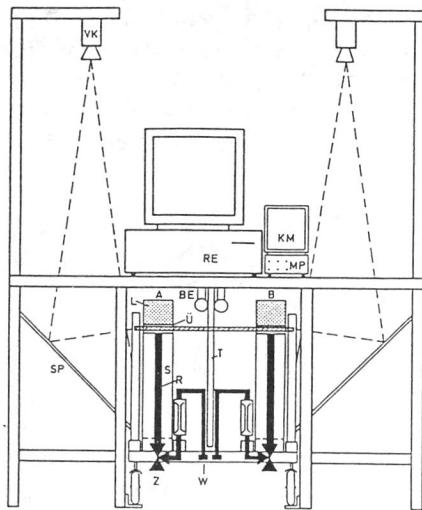
### **Funktionsweise des Biomonitor**

Der hier vorgestellte Verhaltensfischtest wertet zur Indikation von Schadstoffwellen in Oberflächengewässern sechs Verhaltensparameter eines Testfischschwärms - bestehend aus sechs Goldorfen - aus. Der Testaufbau (Abb. 1) umfaßt zwei Meßaquarien (zur parallelen Beobachtung von zwei Fischschwärm) mit den entsprechenden zu- und abführenden Leitungen. Zur Registrierung und Auswertung der Verhaltensparameter werden zwei Videokameras, ein Multiplexer (Kopplungseinheit zwischen Kameras und bildverarbeitender Karte) und eine bildverarbeitende Steckkarte BHQ-1 (zur Auswertung der Videosignale), die in einen IBM-kompatiblen Personal Computer eingebaut ist, benötigt. Weiterhin gehört zum BehavioQuant Meßsystem die entsprechende Software zur Steuerung der Videoaufnahmen, der Auswertung und Berechnung der einzelnen Verhaltensparameter, sowie zur statistischen Überprüfung und Alarmgebung. Ein im System integrierter Kontrollmonitor dient der Justierung der Kameras und der Überprüfung der Objekterkennung im kontinuierlichen Meßbetrieb. Mit dem Meßsystem BehavioQuant können über den Multiplexer bis zu 16 Videokameras angesteuert

werden. Dies bietet in der Praxis eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten wie z.B. die Kombination mit zusätzlichen Meßkammern zur Beobachtung des Schwimmverhaltens von Daphnien.

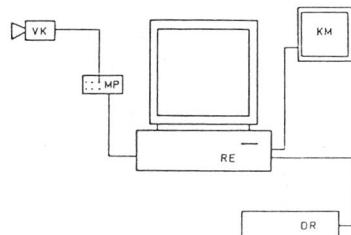
Die in dem hier beschriebenen Verhaltensfischtest installierten Meßaquarien (Abb. 1) wurden für einen Testfischschwarm aus sechs 5-8 cm langen Goldorfen entwickelt. Der Schwimmraum hat eine Breite von 50 cm, eine Höhe von 40 cm und die Meßraumtiefe beträgt 10 cm. Die Meßaquarien wurden den besonderen Anforderungen in der kontinuierlichen Gewässerüberwachung angepaßt. So ermöglicht ihre geringe Tiefe von 10 cm auch die Registrierung der Fische zu Zeiten hoher Schwebstofffrachten.

#### Aufbau:

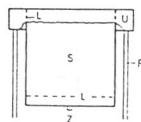


A, B Meßaquarien  
 (Schwimmraum 50 x 40 x 10 cm)  
 BE Beleuchtung  
 DR Drucker  
 KM Kontrollmonitor  
 L Lochblech (Edelstahl)  
 MP Multiplexer  
 R Rücklauf  
 RE Rechner  
 S Schwimmraum

#### Schalschema:



#### Meßaquarium:



SP Spiegel  
 T Trennwand  
 Ü Überlauf (beidseitig)  
 VK Videokamera  
 W Wasseranschluß  
 Z Zufluß (über 3-Wegehahn)  
 zentral im Beckenboden

Durchflußmesser

Abb.1: Schemazeichnung des auf dem Meßsystem BehavioQuant basierenden Koblenzer Verhaltensfischtest.

Daß es zu keiner Verhaltensänderung der Tiere in Aquarien dieser Ausmaße kommt, wurde zuvor in Versuchsserien, in denen der Schwimmraum immer weiter eingeengt wurde, sichergestellt [42]. In den Untersuchungen hat sich gezeigt, daß quantitative Verhaltensänderungen erst bei einem auf 4 cm Tiefe reduzierten Schwimmraum registriert werden.

Weiterhin ist bei der Konstruktion der Meßaquarien berücksichtigt worden, daß die sich in den Becken ausbildenden Strömungsverhältnisse zu keiner Beeinträchtigung des Schwimmverhaltens der Testfische führen. Der Wasserzufluß erfolgt zentral über den Beckenboden. Die in einer Höhe von fünf Zentimetern über dem Beckenboden lose eingehängte Edelstahl-Lochplatte (Lochdurchmesser: 5mm) hat die Funktion eines Gleichrichters. Der Zufluß des Testwassers wird mit Hilfe von vorgesetzten Schwebekörper-Durchflußmessern auf 5 L/min reguliert. Der Wasserzufluß von 5 L/min gewährleistet einerseits - unter Berücksichtigung der Durchmischung des 20 Liter Beckenvolumens - einen nahezu vollständigen Ersatz des Wasserkörpers innerhalb von 30 min, andererseits konnte an Hand von Meßreihen gezeigt werden, daß keine signifikanten Verhaltensänderungen durch die sich ausbildenden Strömungsverhältnisse induziert werden. Das Wasser tritt über die beidseitig verkürzten Seitenwände aus dem Meßaquarium aus.

Die Überwachung der Fische erfolgt mit je einer Videokamera pro Becken. Die Videokamera hängt über einem Spiegel, der in einem Winkel von 45° vor der Frontscheibe angebracht ist, wobei sichergestellt ist, daß die horizontalen und vertikalen Grenzen des Schwimmraumes im Spiegelbild erkennbar sind. Der Einsatz von Spiegeln hat gegenüber früher beschriebenen Testaufbauten [42] den Vorteil, daß der benötigte Raumbedarf in einer Meßstation deutlich reduziert werden konnte.

Das fortlaufende Signal der Videokamera wird über einen Multiplexer der bildverarbeitenden Steckkarte zugeführt. Der in der Karte integrierte Prozessor wertet die Videosignale hinsichtlich der Position und der Größenausdehnung aller im Bild erkannten Objekte in X- und Y-Richtung aus. Die Daten werden in Form von Positionskoordinaten auf der Festplatte abgelegt.

Die Erkennung der Fische wird dadurch ermöglicht, daß sie sich optisch vom Hintergrund des Testbeckens abheben. Vor Beginn der ersten Messung wird ein Referenz-Hintergrundbild erstellt, mit dem später die fortlaufenden Bilder fünfundzwanzigmal in der Sekunde verglichen werden. Dieses Referenz-Hintergrundbild wird aus einhundert Einzelbildern aufgemittelt. Ihr zeitlicher Abstand wird so gewählt, daß alle zu beobachtenden Fische während der Aufnahme mehrere Ortswechsel vornehmen. So wird eine Integration der zu beobachtenden Fische in das Hintergrundbild verhindert. Für die Praxis bedeutet dies, daß der zeitliche Abstand zwischen den Einzelbildern bei Tieren, die kaum eine Ortsveränderung vornehmen, größer gewählt werden muß. Dies kann z.B. im Winter bei niedrigen Temperaturen notwendig werden, weil dann die Bewegungsaktivität der Fische deutlich reduziert ist.

Die Auswertung der Daten einer Zwei-Minuten-Messung erfolgt in der Pause zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen mit Hilfe eines Spurverfolgungsprogramms.

Das benutzte Spurverfolgungsprogramm des BehavioQuant Meßsystems unterscheidet sich von vergleichbaren Programmen durch seine Fähigkeit, eine Vielzahl unmarkierter Objekte im selben Meßraum zu beobachten. Hierbei wird die Zuordnung der Objekte zu den aktuellen Positionskoordinaten auf Grund von Plausibilitätskriterien für ihre Fortbewegung vorgenommen. Die Ausdehnungs-koordinaten der Objekte werden daraufhin überprüft, ob es sich um Objekte des vorgebenen Größenbereichs handelt. Die Größe eines zu registrierenden Objektes wird vom Anwender unter Berücksichtigung der Größe der eingesetzten Fische vorgegeben. Partikel wie Fischkot und andere Verunreinigungen werden auf diesem Wege aussortiert. Durch die Mittelung zwischen den Anfangs- und den Endkoordinaten werden die Objektmittelpunkte festgelegt.

Entsprechend den zugrundeliegenden Plausibilitätskriterien kann auf Grund der schnellen Bildfolge von 40 Millisekunden davon ausgegangen werden, daß einem Koordinatenpaar im ersten Bild das nächstliegende Koordinatenpaar des zweiten Bildes zugeordnet werden kann. Der Vektor, der die beiden Punkte verbindet, charakterisiert eine Bewegungsrichtung und eine Bewegungsgeschwindigkeit. Zusammen mit den Positionen der Objekte im zweiten Bild bilden die so entstandenen Vektoren die Grundlage für die beim dritten Bild vorzunehmende Zuordnung. Überlagern sich zwei Objekte kurzzeitig, geht man von der Annahme aus, daß Bewegungsrichtung und Geschwindigkeit eines Objekts vor und nach dem Kreuzen eines anderen Objekts ähnlich sind. In Verbindung mit einigen anderen Kriterien wird auf diese Weise eine Rekonstruktion des Bewegungsverhalten der Fische abgeleitet. Die berechneten Bewegungsbahnen sind allerdings mit dem Fehler der Streckenverkürzung durch die Flächenprojektion behaftet. Dieser Fehler wird aber umso kleiner gehalten, je kleiner die Meßraumtiefe ist. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit bzw. der Bewegungsrichtung von der Meßraumtiefe haben gezeigt, daß der Fehler mit abnehmender Beckentiefe kleiner wird; denn es besteht eine enge Korrelation zwischen abnehmender Beckentiefe und der Wahrscheinlichkeit, daß sich die Fische parallel zur Frontscheibe ausrichten [42]. Dadurch, daß für die Fische die Möglichkeit, in die 3. Dimension auszuweichen, reduziert ist, wird auch der Fehler der Streckenverkürzung, mit dem die Motilitätswerte behaftet sind, minimiert.

## Verhaltensparameter

Die differenzierte Alarmauswertung stützt sich auf **sechs Verhaltensparameter**, die sich den unterschiedlichen Qualitäten Bewegungsaktivität, Präferenzen der Aufenthaltsorte im Becken und den intraspezifischen Beziehungen innerhalb des Schwarms zuordnen lassen. Die Bewegungsaktivität wird über die Parameter Motilität, Zahl der Wendungen und Bewegungskonstanz analysiert; die Ortspräferenzen werden in Form von Häufigkeitsverteilungen für die Schwimmhöhe und die Positionen in Horizontalrichtung ausgedrückt und die intraspezifischen Beziehungen innerhalb des Schwarms durch das Abstandsverhalten charakterisiert.

Die Berechnung der **Motilität** erfolgt für jeden Fisch auf Grund des pro Zeiteinheit zurückgelegten Weges (Koordinatenabstände/sec). Die für jeden Fisch angegebene Streuung der Motilität macht ersichtlich, ob ein Fisch die ganze Meßdauer über gleichmäßig aktiv war, oder ob er zwischen Phasen höherer Aktivität größere Pausen eingelegt hat. Diese Information wird allerdings bei dem Einsatz als kontinuierliches Monitorsystem nicht berücksichtigt, sie hat eine größere Bedeutung im Zusammenhang mit dem Einsatz in der Forschung. Zur Minimierung des durch die Flächenprojektion hervorgerufenen Fehlers wird ergänzend die **Zahl der Wendungen** als Änderungen in der X-Achse registriert. Für weitere statistische Berechnungen stehen die Daten als Mittelwert mit Standardabweichung zur Verfügung. Außerdem wird die **Bewegungskonstanz** bestimmt, indem aus den rekonstruierten Bewegungsbahnen aller Fische für jede Zwei-Minuten-Messung die Schwimmgeschwindigkeiten jedes Fisches für fortlaufende 10-Sekunden-Abschnitte berechnet wird. Diese Daten werden für alle Fische gemeinsam in Häufigkeitsverteilungen mit der X-Achse "gerasterte Schwimmgeschwindigkeit" und der Y-Achse "Häufigkeit" innerhalb eines Größenrasters von 10-Sekunden-Schwimmgeschwindigkeiten normiert.

Zur Bestimmung der **Schwimmhöhe** wird der auf eine Fläche projizierte dreidimensionale Schwimmraum des Meßaquariums in Koordinaten gerastert. Aus den Y-Koordinaten werden 10 Klassen gebildet, die den Schwimmhöhenklassen entsprechen, wobei die Schwimmhöhe 0 dem Bereich direkt unter der Wasseroberfläche entspricht. Die mittlere Schwimmhöhe der einzelnen Fische ergibt sich aus ihren aufgemittelten Positionen in der Y-Achse.

Für die weiteren statistischen Berechnungen werden die Schwimmhöhen aller Fische entsprechend dem für die Konstanz der Bewegungsgeschwindigkeit genannten Verfahren in Häufigkeitsverteilungen mit der X-Achse "Schwimmhöhe" und der Y-Achse "Häufigkeit" übertragen.

Der **mittlere horizontale Aufenthaltsort** ergibt sich aus der über alle Tiere aufgemittelten Position in der X-Achse. Auch im Falle der Bestimmung der mittleren horizontalen Position der Testfische wurden die Koordinatenpunkte der X-Achse in 10 Klassen unterteilt. Analog den Berechnungen zum Schwimmhöhenverhalten werden auch für die horizontale Position Häufigkeitsverteilungen erstellt.

Der Parameter **Abstandsverhalten** ermöglicht eine Aussage über Veränderungen der Abstände zwischen in Gruppen gehaltenen Tieren. Basierend auf dem von Spieser und Frisch 1985 beschriebenen Verfahren, wird dabei von der Überlegung ausgegangen, daß die auf eine Fläche projizierte Strecke zwischen zwei sich im Raum mit einem konstanten Abstand bewegenden Objekten, zwischen der realen Entfernung und Null liegt [31]. Nimmt man eine Strecke an, die kürzer als die tatsächliche Entfernung der Objekte ist, so ist die statistische Wahrscheinlichkeit konstant, daß das Projektionsbild kürzer als die vorgewählte Strecke ist. Die ermittelten Abstandswerte gestatten zwar keine Aussage über die tatsächliche räumliche Entfernung der Objekte, aber erlauben eine relative Quantifizierung des Abstandsverhaltens. Die Abbildung 2A bis F erläutert die Auswertung des Abstandsverhaltens an Hand eines fiktiven

Beispiels. Dargestellt wird die Auswertung des ersten, zehnten und zwanzigsten Bildes einer Messung (eine Zwei-Minuten-Messung setzt sich aus 3000 Bildern zusammen). Zur Berechnung des Abstandsverhaltens der beobachteten Gruppe werden die Anzahlen von benachbarten Objekten innerhalb bestimmter Radien um jedes Objekt gezählt (Abb. 2A). Dazu werden um die erkannten Objekte jeweils die gleichen konzentrischen Kreise mit zunehmenden Radien (Plane 0 bis Plane 3) berechnet, und innerhalb jedes Planes wird die Anzahl aller darin befindlicher Objekte gezählt (Abb. 2B). Auf diese Weise werden für jedes Objekt alle Nachbarn bestimmt, und zwar für jedes Bild der Messung. Eine Anordnung der Nachbarschaftszahlen nach steigenden bzw. fallenden Rängen für jeden der vier Kreise (Abb. 2C+D) ermöglicht nach einer entsprechenden Auswertung Aussagen über das Abstandsverhalten enger benachbarter (oberer Abschnitt der Zahlenreihe bei absteigender Reihung) bzw. jener sich isolierender (oberer Abschnitt der Zahlenreihe bei aufsteigender Reihung) Objekte. Dazu werden die Zahlenreihen entsprechend ihren Rängen Bild für Bild aufgemittelt, d.h. erst alle meisten Nachbarn im Plane 0 dann alle zweitmeisten Nachbarn im Plane 0 dann alle drittmeisten usw.. Die Planes 1-3 werden in gleicher Weise behandelt. Zusätzlich zu allen Mittelwerten werden die Standardabweichungen berechnet (Abb. 2E+F). Ein Vergleich zwischen den ersten drei Werten der absteigenden und der aufsteigenden Zahlenfolgen gibt Auskunft darüber, ob das Abstandsverhalten der Objekte der beobachteten Gruppe eher homogen oder sehr unterschiedlich ist. Um Aussagen über Unterschiede im Abstandsverhalten zweier zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgezeichneter Messungen machen zu können, werden jeweils die Testwerte der einzelnen Positionen pro Kreis der aktuellen Messung von den entsprechenden Positionen der Testwerte einer zum früheren Zeitpunkt aufgezeichneten Messung abgezogen.

### A. Einzelbilder

Bild 1:

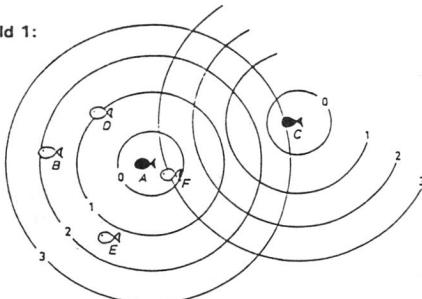


Bild 10:

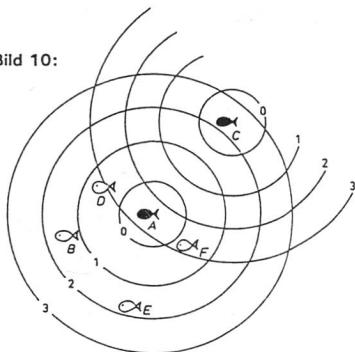
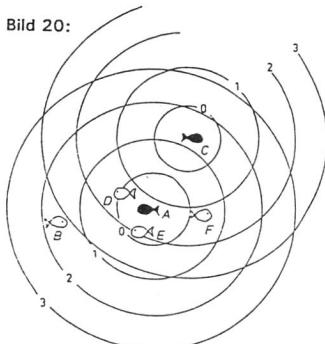


Bild 20:



### B. Einzelbildauswertung

Bild 1:

	Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
A	2	3	5	5
B	1	2	4	5
C	1	1	1	2
D	1	2	3	5
E	1	1	3	5
F	2	2	4	5

Bild 10:

	Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
A	1	3	5	6
B	1	2	4	5
C	1	1	1	4
D	1	2	4	6
E	1	1	4	5
F	1	2	4	6

Bild 20:

	Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
A	3	4	6	6
B	1	1	4	5
C	1	1	5	5
D	2	3	6	6
E	2	4	6	6
F	1	4	6	6

Abb.2A: Exemplarische Darstellung des Auswertungsverfahrens - bei einem Schwarm aus sechs Testfischen - zur Bestimmung des Abstandsverhaltens. Um jedes erkannte Objekt werden die gleichen vier Kreise (Plane 0 - Plane 3) gelegt. Dann werden die zu jedem Objekt gehörenden Nachbarn Plane für Plane ausgezählt.

Abb.2B: Auszählung der Nachbarschaftsanzahlen für die Einzelbilder, wobei das zentrale Objekt jeweils mitgezählt wird.

### C. Anordnung der Nachbarschaftsanzahlen in absteigender Reihung

Bild 1:

Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
A 2	A 3	A 5	A 5
F 2	B 2	B 4	B 5
B 1	D 2	F 4	D 5
.....	.....	.....	.....
C 1	F 2	D 3	E 5
D 1	C 1	E 3	F 5
E 1	E 1	C 1	C 5

Bild 10:

Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
A 1	A 3	A 5	A 6
B 1	B 2	B 4	D 6
C 1	D 2	D 4	F 6
.....	.....	.....	.....
D 1	F 2	E 4	B 5
E 1	C 1	F 4	E 5
F 1	E 1	C 1	C 4

Bild 20:

Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
A 3	A 4	A 6	A 6
D 2	E 4	E 6	D 6
E 2	F 4	D 6	E 6
.....	.....	.....	.....
B 1	D 3	4 6	F 6
C 1	B 1	C 5	C 5
F 1	C 1	B 4	B 5

### D. Anordnung der Nachbarschaftsanzahlen in aufsteigender Reihung

Bild 1:

Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
B 1	C 1	C 1	C 2
C 1	E 1	D 1	A 5
D 1	B 2	E 3	B 5
.....	.....	.....	.....
E 1	D 2	B 4	D 5
A 2	F 2	F 4	E 5
F 2	A 3	A 5	F 5

Bild 10:

Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
A 1	C 1	C 1	C 4
B 1	E 1	F 4	B 5
C 1	B 2	B 4	E 5
.....	.....	.....	.....
D 1	D 2	D 4	A 6
E 1	F 2	E 4	D 6
F 1	A 3	A 5	F 6

Bild 20:

Plane 0	Plane 1	Plane 2	Plane 3
B 1	B 1	B 4	B 5
C 1	C 1	C 5	C 5
F 1	D 3	A 6	A 6
.....	.....	.....	.....
D 2	A 4	D 6	D 6
E 2	E 4	E 6	E 6
A 3	F 4	F 6	F 6

ob.2C+D: Anordnung der Nachbarschaftsanzahlen innerhalb der 4 Plane's in absteigender (C) bzw. aufsteigender Reihung (D).

. Vier gemittelte Abstandsmeßkurven:

Plane 0 MW SA	Plane 1 MW SA	Plane 2 MW SA	Plane 3 MW SA
2.00 1.00	3.33 0.58	5.33 0.58	5.67 0.58
1.67 0.58	2.67 1.15	4.67 1.15	5.67 0.58
1.33 0.58	2.67 1.15	4.67 1.15	5.67 0.58

F. Vier gemittelte Abstandsmeßkurven:

Plane 0 MW SA	Plane 1 MW SA	Plane 2 MW SA	Plane 3 MW SA
1.00 0.00	1.00 0.00	2.00 1.73	3.67 1.53
1.00 0.00	1.00 0.00	4.00 1.00	5.00 0.00
1.00 0.00	2.33 0.58	4.33 1.53	5.33 0.58

ob.2E+F: Mittelung der Nachbarschaftsanzahlen (Rang 1-3) - maximal bis zur Anzahl der im Mittel registrierten Objekte - über alle Bilder einer Messung (exemplarisch für die Bilder 1, 10 und 20). Gemittelt wird jeweils der erste Rang aller Bilder, gefolgt von der Mittelung des zweiten Ranges und der des dritten Ranges. MW= Mittelwert, SA=Standardabweichung aus der Mittelung aller Bilder einer Messung des jeweiligen Ranges.

## Automatische Registrierung, statistische Auswertung und Alarmwertgebung

Der Koblenzer Verhaltensfischtest basiert auf dem Meßsystem BehavioQuant. Dabei handelt es sich um ein computergesteuertes, bildverarbeitendes Datenerfassungssystem. Sowohl die Datenerfassung als auch die Auswertung und Bewertung der zwischengespeicherten Positionskoordinaten der Steuerung wird durch entsprechende Software-Programme vollzogen. Hierdurch ist der vollautomatische Betrieb des Verhaltensfischtest möglich. Über einen beliebig langen Zeitraum kann in mehreren Meßaquarien das Verhalten der Testfische in zyklischen Folgen beobachtet und berechnet werden. Die Länge des Überwachungszeitraumes wird vom Anwender bestimmt, indem er zur turnusmäßigen Wartung (z.B. alle 7 Tage) das System anhält. Ohne den Eingriff von außen erfolgt die Aufzeichnung der Daten und ihre Auswertung und Alarmgebung kontinuierlich. Im Automatikbetrieb können maximal 100 Messungen pro 24 Stunden durchgeführt werden, was einer minimalen Zykluslänge von 14.4 Minuten entspricht. In diesem Zeitraum werden die Daten aller Meßaquarien aufgezeichnet und ausgewertet. Dabei werden die beiden Meßaquarien einer Anlage nacheinander angesprochen. Bei der sukzessiven Ansprache der einzelnen Testbecken werden die Informationen über Bildhintergrund, Bildhelligkeit, Kontrast, Erkennungslevel, Größenbereich und Anzahl der zu beobachtenden Objekte, Positiv- oder Negativbild (dunkle Objekte vor hellem Hintergrund bzw. helle Objekte vor dunklem Hintergrund) kamerabezogen mitgeführt.

Weiterhin können die der Objekterkennung zugrundeliegenden Hintergrundbilder in frei wählbaren Zeitabständen automatisch neu generiert werden. Auf diesem Wege wird verhindert, daß Verschmutzungen, die innerhalb eines Wartungszyklus auftreten können, zwischenzeitlich als Scheinobjekte die Bilderkennung stören bzw. als Objekte registriert werden. Auch kann so vermieden werden, daß der langsam zunehmende Bewuchs der Scheiben des Meßaquariums im Laufe einer Woche die Objekterkennung beeinträchtigt.

Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Überwachung eines Oberflächengewässers bringt seine schwankende Trübung mit sich. Aus diesem Grund wurde die BehavioQuant-Aufnahmesoftware derart modifiziert, daß eine automatische Überprüfung der Einstellungen erfolgt. So wird zwischen den Einzelmessungen oder beim turnusgemäßen Kamerawechsel überprüft, ob der bisherige Erkennungslevel - im Hinblick auf die momentane Trübung - noch korrekt ist. Wird eine Nachregulierung des Erkennungslevel notwendig, so nimmt das System diese automatisch vor. Bleibt eine solche Nachregulierung nach einer bestimmten Anzahl von Versuchen erfolglos, z.B. weil die Trübung drastisch zugenommen hat oder die Kamera leicht verschoben wurde, so wird ein neues Hintergrundbild generiert. Der Anwender hat jederzeit die Möglichkeit - z.B. im Falle einer Alarmauslösung - die vom System vorgenommenen Einstellungen in einer Protokolldatei einzusehen.

Die statistische Bearbeitung bei der fortlaufenden Gewässerüberwachung wird im Routinebetrieb automatisch nach jeder Einzelmessung durchgeführt. Sie folgt der Strategie, zu prüfen, ob die Meßdaten weniger, aktueller Einzelmessungen sich von denen vor einer möglichen Exposition liegenden Messungen unterscheiden. Hierbei

wird die Möglichkeit circadianer Einflüsse ebenso bedacht wie die einer sehr langsamem kontinuierlichen Intoxikation. Da Fehlalarme in jedem Falle vermieden werden müssen, sind die Vergleichsberechnungen so angelegt, daß äußere Einflüsse auf das Verhalten nicht ins Gewicht fallen. Zu den äußeren Einflüssen zählen unter anderem die jahreszeitlich bedingten Schwankungen der physikalischen Parameter des Gewässers wie z.B. der Temperatur. Hierfür ist ein Bezugszeitraum von sechs Stunden - dies entspricht 24 Einzelmessungen - vor der aktuellen Messung sinnvoll, der eine halbe Stunde vor der zu betrachtenden Messung zuendegegangen ist. Zusätzlich soll auch ein schleichender Anstieg einer Vergiftung detektiert werden, indem ein weiterer statistischer Vergleich der aktuellen Meßdaten mit dem entsprechenden sechsständigen Bezugszeitraum, der 24 Stunden vor der aktuellen Messung liegt, vorgenommen wird. Als Sicherheitsmaßnahme gegen Fehlalarme werden beim statistischen Vergleich zu den aktuellen Messungen die beiden vorhergehenden Messungen hinzugezogen, so daß drei "aktuelle" Sätze von Meßwerten den 2 x 24 Sätzen von Referenz-Meßwerten gegenüberstehen. Die statistischen Vergleiche werden für alle sechs Verhaltensparameter unabhängig voneinander durchgeführt. Nur wenn Überschreitungen der Norm durch mehrere Verhaltensparameter registriert werden, werden unter Einbeziehung des Grades der Abweichung von der Norm gestaffelte Alarmmeldungen - z.B. an den zentralen Rechner einer Meßstation - ausgegeben. Ausschlaggebend für die Weiterleitung eines Voralarmes oder eines Hauptalarms ist die Anzahl der berechneten signifikanten Unterschiede zwischen den aktuellen Meßdaten der letzten drei Messungen und denen der davorliegenden 24 Messungen unter zusätzlicher Berücksichtigung der Ergebnisse der beiden unmittelbar davor liegenden Auswertungen. Nach Durchführung der statistischen Berechnungen wird die Anzahl der signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der drei letzten Messungen (während der letzten 45 Minuten) gesondert für jede Meßgröße addiert. Dann erfolgt unter Berücksichtigung der für den jeweiligen Meßparameter durchgeführten Vergleiche (Beispiel: Anzahl der untersuchten Größenklassen bei der Bewegungskonstanz) eine Gewichtung dieser Summen, so daß eine Gleichbehandlung der unterschiedlichen Meßgrößen unabhängig von der Rasterung der berechneten Größenklassen gewährleistet ist. Die gewichteten Signifikanzen werden sodann addiert und das Ergebnis mit drei Alarmgrenzwerten verglichen, die den Voralarm und den Hauptalarm 1 bzw. 2 repräsentieren. Die Alarmgrenzwerte können vom Anwender modifiziert werden. Bei Überschreitung des höchsten Schwellenwertes wird direkt Alarm ausgelöst (Beispiel: Nahezu totaler Zusammenbruch jeglichen Verhaltens, wobei eine permanente Selbstüberprüfung des Systems hier Falschmeldungen verhindert). Bei Überschreitung des mittleren Schwellenwertes wird Voralarm gemeldet. Sollte bei den beiden unmittelbar vorhergehenden Berechnungen bereits die Voralarmstufe erreicht worden sein, wird direkt nach der Berechnung der dritten Messung Hauptalarm 1 gegeben. Wird der niedrigste Alarmgrenzwert überschritten, so wird dies lediglich registriert. Erfolgt dies dreimal unmittelbar hintereinander, so führt dies zu Voralarm.

Soweit eine nicht exponierte Kontrollgruppe parallel gemessen wird, kann diese (mit Einschränkungen) als Referenz hinzugezogen werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß sich die eingesetzten kleinen Testfischschwärme, z.B. in ihrem Grundaktivitätslevel oder in Abhängigkeit von der sozialen Struktur des Schwarms

(z.B. verursacht durch einzelne sehr dominante Tiere im Schwarm) signifikant unterscheiden können. Für die Routineüberwachung mit der hier dargestellten Auswertemethode spielt dies keine Rolle, weil sich die statistischen Vergleiche jeweils auf die Referenzdaten und die aktuellen Daten von identischen Schwärmen beziehen.

Bei den unten beschriebenen Aufstockungsexperimenten entfällt der zusätzliche Vergleich mit den 24 Stunden alten Meßwerten, da die Substanz zu einem definierten Zeitpunkt zugegeben wurde und eine Überprüfung auf eine schleichende Intoxikation überflüssig ist.

Der statistischen Auswertung liegen folgende Überlegungen zugrunde: Man kann **nicht** davon ausgehen, daß die für die Verhaltensparameter berechneten Werte normalverteilt sind. Ganz besonders gilt dies für die Schwimmhöhe, bei der je nach Charakter und Intensität einer Substanzwirkung Abweichungen nach oben **und** unten oder nach oben **oder** unten zu erwarten sind. Außerdem beeinflussen eine gewisse Grenzflächenappetenz und Ortspräferenzen sowie Interaktionen der Tiere die horizontale und die vertikale Verteilung im Raum und das Abstandsverhalten.

Eine statistische Bewertung von Verhaltensreaktionen ermöglicht z.B. der Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney - auch U-Test genannt - für nicht gepaarte Stichproben [43]. Timms et al. setzten den Rangsummentest nach Wilcoxon zur Charakterisierung der einzelnen Parameter im Bewegungsverhalten des Goldfisches *Carassius auratus* in Gegenwart von Kupfer ein [44]. Als verteilungsfreien Test für Veränderungen der hier betrachteten Verhaltensweisen führt das Meßsystem BehavioQuant den U-Test mit 2-seitiger Fragestellung sowohl für die Häufigkeitsverteilungen der Konstanz der Bewegungsgeschwindigkeit, der horizontalen und vertikalen Positionen als auch für die Abstandsmeßkurven durch. Zusätzlich werden noch die Mittelwerte der Motilität, der Schwimmhöhe und der mittleren horizontalen Positionen dem U-Test unterzogen.

Zur Prüfung auf einen Unterschied in der Bewegungskonstanz werden die normierten Häufigkeitsverteilungen von denen der Kontrollkurven subtrahiert. Die entstandenen Differenzkurven liegen in allen Größenklassen nahe der Nulllinie, wenn kein Unterschied zwischen den Häufigkeitsverteilungen besteht. Ein Maß für den Unterschied zwischen den Häufigkeitsverteilungen ist der Absolutwert der Fläche zwischen der Differenzkurve und der Nulllinie. Die statistische Sicherung möglicher Unterschiede zwischen den aktuellen und den Bezugsmessungen erfolgt mit Hilfe des U-Tests mit 2-seitiger Fragestellung gesondert für jede Größenklasse der Bewegungsgeschwindigkeit innerhalb der Häufigkeitsverteilungen. Somit entsteht für jede Größenklasse ein eigener U-Wert. Dies ist auch sinnvoll, da Änderungen in der Häufigkeitsverteilung der Bewegungsgeschwindigkeit sich zunächst in der Zu- und Abnahme einzelner Größenklassen manifestieren. Die Analyse des Schwimmhöhenverhaltens und der horizontalen Position werden in gleicher Weise behandelt.

Die statistischen Vergleiche (Berechnung der U-Werte) für das Abstandsverhalten erfolgen zwischen den nicht gemittelten Abstandswerten auf der Ebene der einzelnen Ränge der Nachbarschaftsanzahlen Plane für Plane, wobei die Berechnung sowohl für

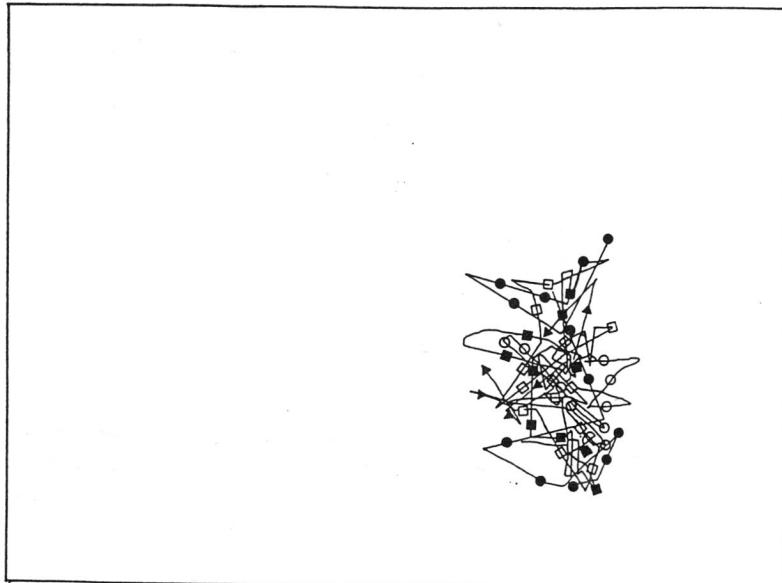
die absteigend als auch für die aufsteigend gereihten Abstandsmeßkurven erfolgt. Die Anzahl der signifikanten Unterschiede zwischen der aktuellen Messung und den Vergleichswerten spiegelt die Veränderung des Abstandsverhaltens des Testfischschwärms wider. Die Richtung der Änderung, d.h. ob sich der Abstand zwischen den Tieren vergrößert oder verkleinert hat, kann an Hand des Vorzeichens der normierten Abstandsdifferenz erkannt werden. Die substanzbedingte Richtung der Änderung ist nur von wissenschaftlichem Interesse, denn ausschlaggebend für eine Alarmauslösung ist ausschließlich die Tatsche, daß sich das Abstandsverhalten des beobachteten Schwärms signifikant verändert hat.

### **Verhaltensänderungen bei *Leuciscus idus melanotus* induziert durch Natriumpentachlorphenolat im Aufstockungsexperiment**

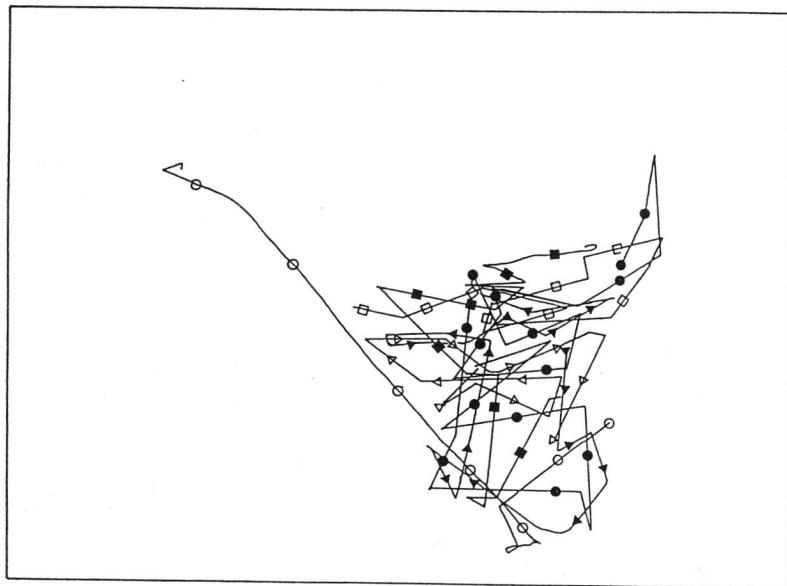
Zur Charakterisierung des Koblenzer Verhaltensfischtests wurden Aufstockungsexperimente mit Natriumpentachlorphenolat durchgeführt. Die Beeinflussung der einzelnen Verhaltensparameter konnte an Hand von Untersuchungen mit 120, 240 und 480 µg pro Liter Rheinwasser (Nominalkonzentration) gezeigt werden. Die Chemikalie wurde nach einer Vorlaufzeit von zwei Stunden, in der die Normalwerte aufgezeichnet wurden, für 30 Minuten im Kreislauf gepumpt. Im Anschluß an die Chemikalienapplikation wurde das Verhalten der Testfische für weitere zwei Stunden aufgezeichnet (Nachlauf).

Damit sichergestellt werden konnte, daß die Verhaltensänderungen nicht auf abiotische Faktoren zurückzuführen ist, wurden über den Versuchszeitraum der Sauerstoffgehalt, der pH-Wert und die Temperatur aufgezeichnet. Diese physikalischen Parameter sollten in jedem Alarmfall zur Validierung der Daten hinzugezogen werden, da bekannt ist, daß Verhaltensänderungen auch die Folge sich verändernder physikalischer Faktoren sein können. So lösen pH-Wert-Änderungen Vermeidungsreaktionen aus [45] und in Abhängigkeit von der O<sub>2</sub>-Konzentration zeigt der Bachsaibling *Salvelinus fontinalis* innerhalb von Minuten eine gesteigerte Aktivität und wenn der gelöste Sauerstoff unter 7 mg/L sinkt, verändert sich zusätzlich das Schwarmverhalten [45]. Daß das Schwarm-verhalten unter anderem auch temperaturabhängig ist, wurde von Breder und Nigelli gezeigt, die beobachteten, daß sinkende Temperaturen die Formation von Schwärmen induziert [46].

Eine Darstellung der berechneten Spuren, die die Testfische eines Schwärms während einer Zwei-Minuten-Messung zurückgelegt haben, zeigt die Abbildung 3. Während in der Vorlaufszeit alle Testfische in einem eng begrenzten Bereich schwimmen (Abb.3A), wird der Verband nach der Zugabe von 120 µg/L Natriumpentachlorphenolat deutlich lockerer (Abb.3B). Daß es sich hier - bei Zugrundelegung des gesamten Meßzeitraums - um signifikante Änderungen handelt, macht die Berechnung der U-Werte deutlich. So bilden sich 3 signifikante Unterschiede mit der Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% für die Abstandsmeßkurven der isolierten Objekte aus. Eine Verringerung des Schwarmzusammenhalts wird weiterhin durch einen positiven Wert der normierten Abstandsdifferenz deutlich.



A.



B.

Abb.3: Darstellung der berechneten Spuren eines Testfischschwärms während einer Zwei-Minuten-Messung vor (A) und während (B) der Zugabe von 120 µg Natriumpentachlorphenolat pro Liter Rheinwasser. Der eingezeichnete Rahmen repräsentiert den zur Verfügung stehenden Schwimmraum.

Neben der Änderung des Abstandsverhaltens spiegeln auch die einzelnen Parameter des Bewegungsverhaltens die Wirkung der Chemikalie auf den Gesamtorganismus wider.

Eine konzentrationsabhängige Änderung wird bei der Betrachtung der **Motilität** deutlich. In Abb. 4 wurde die relative Häufigkeit mit den Bewegungsgeschwindigkeiten von 0-50 Koordinatenabständen pro Sekunde (in 20 Klassen) aufgetragen. Eine Einwirkung der Chemikalie (120  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) hat eine Verschiebung der Kurve nach links zur Folge. War im Vorlauf die Klasse 10 (25-27,5 Koordinatenabstände/sec.) am häufigsten besetzt, so treten im Versuch vermehrt Geschwindigkeiten der Klasse 7 (15-17,5 Koordinatenabstände/sec.) auf. Die Betrachtung der Werte 30 Minuten nach Beendigung der Chemikalienzugabe zeigt, daß die Häufigkeitsverteilung wieder im Bereich derjenigen des Vorlaufs liegt.

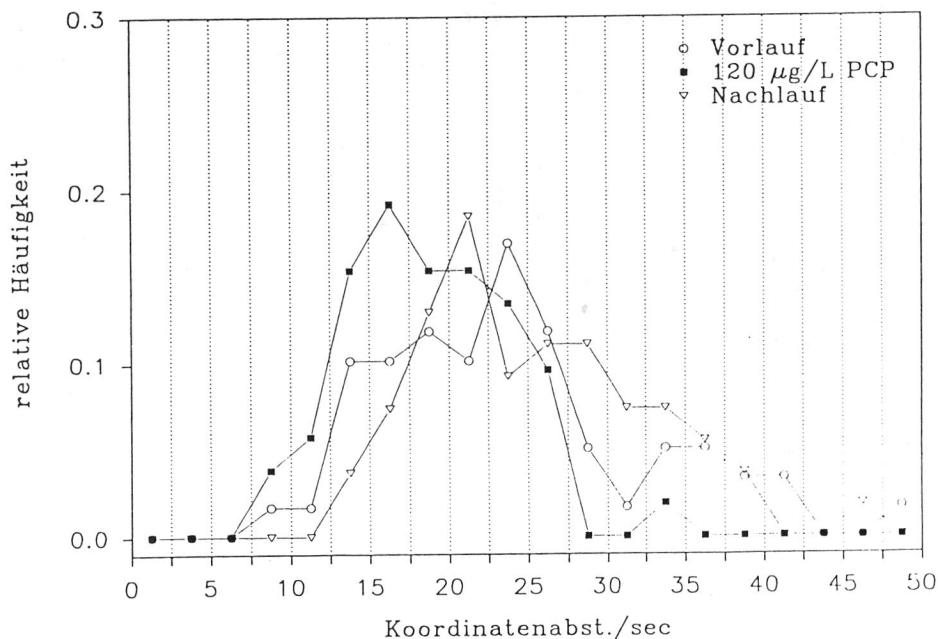


Abb.4: Relative Häufigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit vor, während und nach der Zugabe von 120  $\mu\text{g}/\text{L}$  Natriumpentachlorphenolat.

Anders verhält es sich nach der Zugabe von 240 µg/L (Abb.5). Auch bei der höheren Konzentration werden die Fische signifikant langsamer (auf dem 0,01% Niveau). Auffällig ist bei der Betrachtung der Werte 30 Minuten nach Beendigung der Chemikalienzugabe, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen bei 120 µg/L noch keine Erholung der Tiere, d.h. Rückkehr zur normalen Bewegungsgeschwindigkeit registriert werden kann (Abb.5A). Das Gleiche gilt nach einer Erholungszeit von 45 Minuten (Abb.5B). Nach 45 Minuten wird allerdings bereits die Tendenz in Richtung der Kontrollwerte (Vorlauf) deutlich, die sich nach 60 Minuten noch weiter verstärkt (Abb.5C).

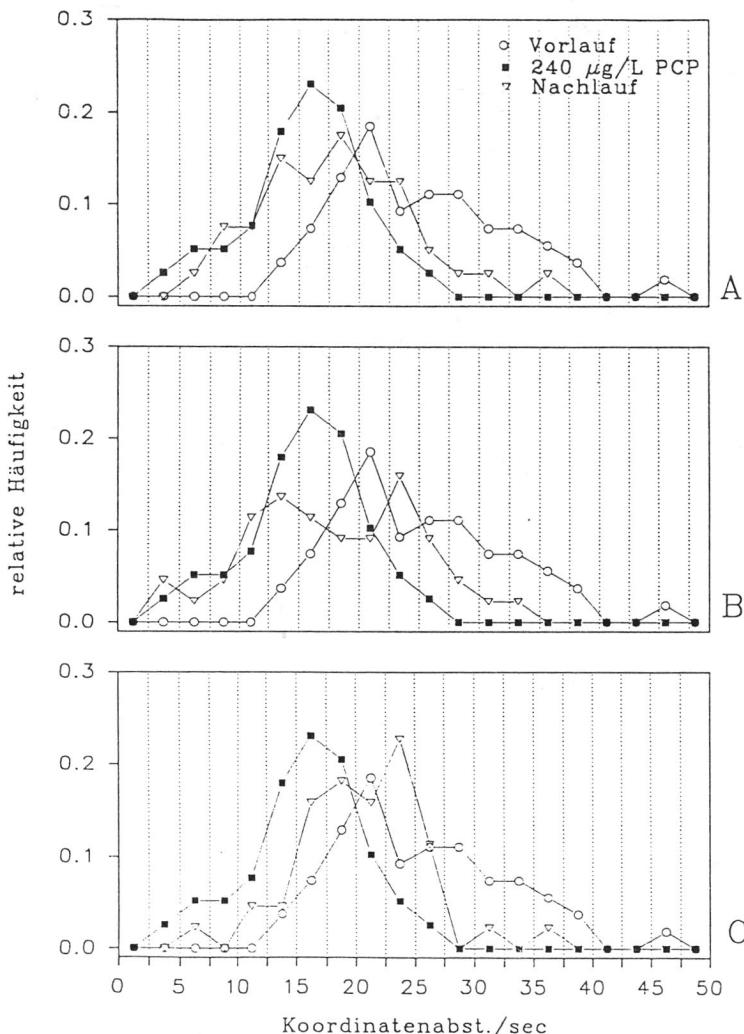


Abb.5: Relative Häufigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit im Vorlauf, während der Natriumpentachlorphenolat Zugabe und in der Nachlaufphase 30 (A), 45 (B) bzw. 60 (C) Minuten nach Beendigung der Chemikalienzugabe.

Nach der Zugabe von 480 µg Natriumpentachlorphenolat kommt es zu einer Umkehrung der Reaktion, und zwar verschiebt sich die Häufigkeitsverteilung zu höheren Geschwindigkeiten (Abb. 6). Lag vor Substanzzugabe das Maximum in der Klasse 6 (12,5-15 Koordinatenabstände/sec.), so verschiebt es sich unter dem Substanzeinfluß zur Klasse 7. Betrachtet man die Daten, die 30 Minuten nach Beendigung der Chemikalienzugabe aufgezeichnet wurden, so läßt sich bereits eine Normalisierung der Bewegungsgeschwindigkeit erkennen.

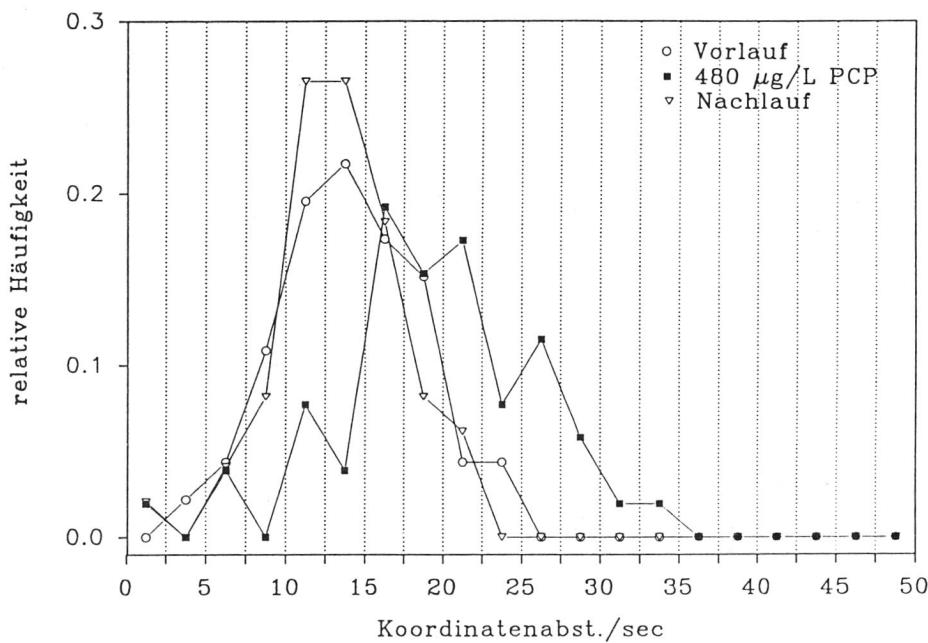


Abb.6: Relative Häufigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit im Vorlauf, während der Zugabe von 480 µg/L Natriumpentachlorphenolat und in der Nachlaufphase.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal des Schwimmverhaltens ist die **Schwimmhöhe**, die angibt, ob sich die Fische mehr zur Wasseroberfläche orientieren, oder ob sie sich mehr in Bodennähe aufhalten. Während unter dem Einfluß von 120 µg/L Natriumpentachlorphenolat eine Verschiebung der Häufigkeitsverteilung in Richtung Wasseroberfläche, die auf dem 0,5% Niveau noch signifikante Unterschiede aufweist, zu beobachten ist (Abb.7A), fällt bei 240 µg/L (Abb.7B) und 480 µg/L (Abb.7C) auf, daß die Häufigkeitsverteilung breiter wird, d.h. die Fische halten sich nicht bevorzugt in mittleren Regionen des Schwimmraumes auf, sondern sie besetzen nahezu alle vertikal verfügbaren Bereiche. Ausgeschlossen bleiben in jedem Fall - wie auch ohne Chemikalieneinwirkung - die nahen Bodenbereiche.

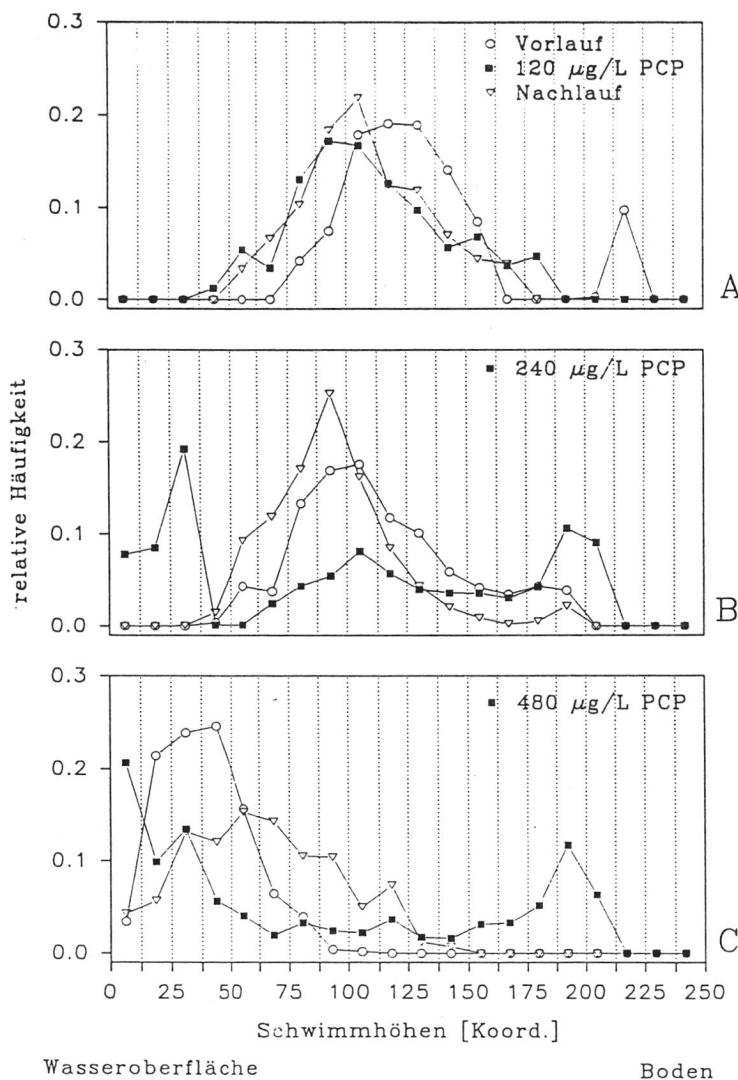


Abb.7: Relative Häufigkeit der Schwimmhöhenverteilung bei 120 µg/L (A), 240 µg/L (B) und 480 µg/L (C) Natriumpentachlorphenolat

Hinsichtlich der Normalisierung dieses Parameters läßt sich sagen, daß sich die Veränderung dieses Verhaltensparameters im Vergleich zur Motilität über einen längeren Zeitraum manifestiert, denn nach 30 Minuten besetzten die Fische noch nicht wieder die gleichen vertikalen Bereiche wie vor der Substanzgabe.

Ein weiterer Parameter bezüglich des Schwimmverhaltens ist die **mittlere horizontale Position**, die im weiteren betrachtet werden soll. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, verschiebt sich die mittlere horizontale Position zwar bereits bei 120 µg/L (signifikante

Unterschiede auf dem 0,1% Niveau). Drastische Veränderungen der horizontalen Position der Tiere im Becken lassen sich aber erst bei 240  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Abb. 8B) bzw. 480  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Abb. 8C) erkennen. Während sich die Tiere ohne eine Chemikalienzugabe immer mehr im rechten Bereich des Beckens aufzuhalten, wechseln die Fische nach der Substanzzugabe auf die linke Seite. In dieser neuen Position verbleiben sie auch über einen längeren Zeitraum nach Beendigung der Chemikalienzugabe (hier dargestellt 30 Minuten nach der 30-minütigen Natriumpentachlorphenolat-Einleitung).

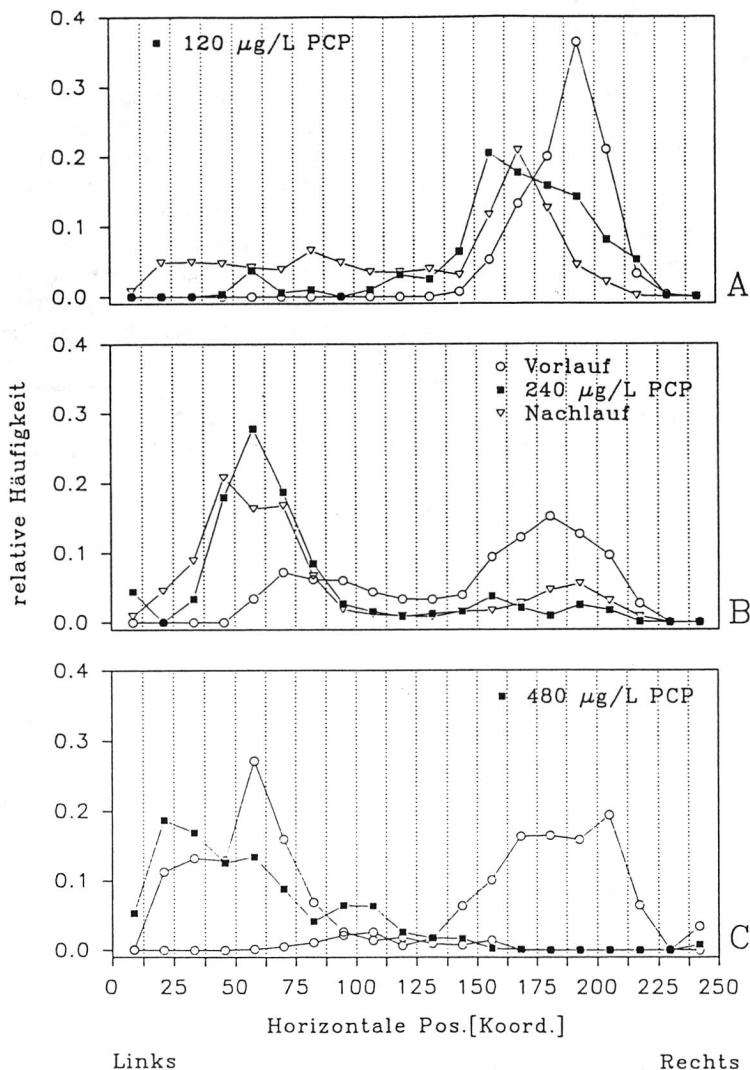


Abb.8: Relative Häufigkeit der Verteilung der mittleren horizontalen Position bei 120  $\mu\text{g}/\text{L}$  (A), 240  $\mu\text{g}/\text{L}$  (B) und 480  $\mu\text{g}/\text{L}$  (C)  $\mu\text{g}$  Natriumpentachlorphenolat.

Die dargestellten Ergebnisse der Aufstockungsexperimente mit Natriumpentachlorphenolat machen eine umfangreiche Beeinträchtigung des Bewegungs- und Abstandsverhalten der Goldorfe *Leuciscus idus melanotus* deutlich. Eine Veränderung im Bewegungsmuster der Testfische war aufgrund der normalen Reaktion von Fischen im Freiland, wo sie in verschmutzten Bereichen ein anderes Verhaltensmuster zeigen, zu erwarten. Denn Flucht- oder Meidereaktionen aufgrund eines frühzeitigen Erkennens der Verschmutzung sichert ihr Überleben und ihr Wohlfühlgefühl [47]. So gehen erste Versuche der quantitativen Analyse des durch Chemikalien ausgelösten Meideverhaltens bereits auf das Jahr 1913 zurück [48]. Denn wenn die Chemikalie nicht sofort einen physiologischen Schock produziert, besteht mit einer Verhaltensantwort (Vermeidung) für das Tier die Möglichkeit sich zu schützen [49]. In dem von Beitingen und Freeman gegebenen Überblick konnten bei 46 von 75 Chemikalien (61,3%) Verhaltensantworten von 23 Fischarten beobachtet werden, wobei die Mehrzahl der Schwellenwerte, die für die Vermeidungsreaktion erhalten wurden, deutlich unter den Schwellenwerten der Letalkonzentration lagen [49]. Wichtig ist bei der Beurteilung der hier vorgestellten Ergebnisse die Erkenntnis, daß die Verhaltensänderungen innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten erkennbar waren, so daß bei dem Koblenzer Verhaltensfischtest mit Recht von einem Frühwarnsystem gesprochen werden darf. Ein weiterer nicht vernachlässigbarer Aspekt ist die Tatsache, daß die Schadstoffe im Wasser durch die Versuchstiere bereits zu einem Zeitpunkt angezeigt wurden, an dem die Tiere keine Schädigungen aufwiesen, d.h. wie auch bei den Vermeidungsreaktionen können Substanzen in subletalen Konzentrationen erkannt werden. Auch wurde deutlich, daß die einzelnen Parameter des Schwimmverhaltens wesentlich empfindlicher sind als die Reduzierung der Schwimmleistung; denn in Untersuchungen von Webb und Brett hat sich gezeigt, daß die Schwimmleistung erst in Konzentrationsbereichen nahe der Letalkonzentration beeinträchtigt wird [50]. So kam es unter dem Einfluß von Natriumpentachlorphenolat neben einem verändertem Bewegungsverhalten - langsamere Schwimmgeschwindigkeiten - zu deutlichen Veränderungen im Schwarmverhalten. Bei der Betrachtung des Schwarmverhaltens von Fischschwärmern wird nach der Definition von Pitcher zwischen einer "shoal" und "school" differenziert [51]. Die Bezeichnung "shoal" ist dem fakultativen Schwarmverhalten gleichzusetzen, daß nach einer Definition von Pitcher [51,52,53] eine Gruppe von Fischen beschreibt, die sich auf Grund sozialer Anziehungsmomente formiert, während sich der Begriff "school" nur auf synchronisiert und polarisiert schwimmende Gruppen bezieht [51]. Zu Fischen, die ein fakultatives Schwarmverhalten zeigen, zählen z.B. die Goldfische. Für den Goldfisch bestätigten Weis und Weis, daß auch ein fakultatives Schwarmverhalten ein sensibler Parameter ist, der den physiologischen Status eines Tieres widerspiegelt [54].

Für die Goldorfe *Leuciscus idus melanotus* konnten die hier vorgestellten Untersuchungen mit 120 µg/L Natriumpentachlorphenolat eine Auflockerung der "shoal" zeigen, d.h. der Abstand zu den nächsten Nachbarn hat sich vergrößert.

Betrachtet man die Zu- und Abnahme des Abstands zwischen den Nachbarn, so wird deutlich, daß es sich hier um eine substanzspezifische Reaktion handelt. So induzierten 100 µg/L des Carbamat-Insektizids Sevin(Carbaryl) bei dem Gezeiten-Ährenfisch *Menidia menidia* [55] genauso wie 100 µg/L DDT beim Goldfisch [56] eine

Auflösung des Schwarmverhaltens, während sich durch 100 µg/L Kupfer bei *Menidia menidia* die Distanz zum nächsten Nachbarn innerhalb des Schwarms verringert [57].

Dieser Effekt wurde von Bengtsson [58] ebenfalls für *Phoxinus phoxinus* unter dem Einfluß von Zink gezeigt. Die Tiere bildeten auch hier eine dichtere "shoal", die sich nahe dem Boden aufhielt.

Die Untersuchungen mit dem Koblenzer Verhaltensfischtest haben gezeigt, daß die toxischen Wirkungen von Wasserinhaltsstoffen durch die Registrierung von Verhaltensänderungen erkannt werden können. Die deutlich höhere Empfindlichkeit dieses Verhaltensfischtest gegenüber den klassischen Strömungsfischtests zeigt das Ergebnis paralleler Aufstockungsexperimente mit Natriumpentachlorphenolat. So konnte auch bei der höchsten getesteten Konzentration von 480 µg/L (Expositionszeit 30 Minuten) keine Reduktion der positiven rheotaktischen Reaktion registriert werden.

Eine Gegenüberstellung mit den Ergebnissen aus dem statischen Goldorfentest erweist sich als sehr problematisch, da die Angaben je nach Literaturstelle um bis zu 300% schwanken. Während Wellens [59] den LC50 (96h) Wert mit 400 µg/L angibt, werden von Knie et al. [60] der LC50 mit 100 µg/L (48h) angegeben. Die Versuchsdurchführung entsprach in beiden Fällen der DIN 38412 (Teil 15) [37]. Im Aufstockungsexperiment mit Pentachlorphenol liegen die LC50 (96h) Werte für die Fettkopfelfritze *Pimephales promelas* und den Sonnenbarsch *Lepomis macrochirus* nach Hettke und Arthur bei 200 µg/L [61]. Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus dem statischen Goldorfentest mit demjenigen aus dem hier vorgestellten Koblenzer Verhaltensfischtest ist zu beachten, daß die signifikanten Verhaltensänderungen - bei 120 µg/L Natriumpentachlorphenolat - bereits nach einer 30-minütigen-Expositionszeit registriert wurden.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Aussage von Mello: "The behavior of the organism is the endpoint of the functional integration of the nervous system encompassing sensory, motor, and cognitive aspects. The functional capacity of the central nervous system cannot be determined by histological or even physiological studies independent of behavioral analysis." [62]. Mit Hilfe der Interpretation von Veränderungen im Verhaltensmuster eines Testfischschwams lassen sich schädigende Wasserinhaltsstoffe frühzeitig erkennen.

Die Arbeiten wurden im Rahmen des vom Bundesministerium für Forschung und Technologie geförderten Forschungsvorhabens 0339299D "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins- Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination" durchgeführt [63].

Für die tatkräftige Unterstützung bei den Aufstockungsexperimenten sowie seinen fachkundigen Diskussionsbeiträgen zur statistischen Bearbeitung der Daten sei cand.rer.nat. Stefan Ziegler an dieser Stelle gedankt.

## Literaturverzeichnis

1. JUHNKE, I. und BESCH, W.K.: Eine neue Testmethode zur Früherkennung akut toxischer Inhaltsstoffe im Wasser. *Gewässer und Abwässer* 50/51, 1971, 107-114
2. VAN HOOF, F.: Evaluation of an automatic system for detection of toxic substances in surface water using trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 1980, 221-225
3. NUSCH, E.: Biologische Testverfahren - Aussagekraft und Grenzen der Übertragbarkeit. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 5, 1993, 155-161
4. NAGEL, R.: Toxizität von Pflanzenschutzmitteln für aquatische Vertebraten - dargestellt am Beispiel der Fische. In: DFG (Hrsg.): *Beurteilung von Pflanzenschutzmitteln in aquatischen Ökosystemen*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992, 88-104
5. BOTTERWEG, J., VAN DE GUCHTE, C. en VAN BREEMEN, L.W.C.A.: Bio-alarmsystemen: een aanvulling op de traditionele bewaking van de waterkwaliteit. *H<sub>2</sub>O* 22, 1989, 788-794
6. BOTTERWEG, J.: Continue signalering van toxicke stoffen in het aquatisch milieu met behulp van biologische bewakingssystemen - literatuurstudie. In: *Publikaties en rapporten van het project "Ecologisch Herstel Rijn"*. Publikatie no.5, 1988
7. MAYR, C.: Kombinationswirkung von Terbutyazin und Humussäure - Untersuchung biologischer Wirkungen mittels quantitativer Verhaltensmessung und der Akkumulation am Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*). Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1992
8. PEICHL, L. und SCHMIDT-BLEEK, F.: Biosonden zum Früherkennen von Umweltschäden. *Umwelt. Z. des Vereins Deutscher Ingenieure für Immissionsschutz, Abfall, Gewässerschutz* (Düsseldorf). Sonderausgabe Biotechnologie 4, 1986, 285-288
9. KRAMER, K.J.M. and BOTTERWEG, J.: Aquatic biological early warning systems: an overview. In: D.W. Jeffrey and B. Madden (eds.) *Bioindicators and Environmental Management*. Acad. Press, London, 1991, 95-126
10. MÄCKLE, H. und STABEL H.-H.: Bioteste - Einsatz und Auswirkungen im Wasserwerksbetrieb. In: *Qualitätsüberwachung von Roh- und Trinkwasser - Messung, Analyse und Bewertung. Berichte aus Wassergütewirtschaft und Gesundheitsingenieurwesen*, Technische Universität München, 1989, 175-188

11. SMITH, E.H. and BAILEY, H.C.: Development of a system for continuous biomonitoring of a domestic water source for early warning of contaminants. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.) *Automated Biomonitoring: Living Sensors as Environmental Monitors*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1988, 182-205
12. PORTMANN, A.: *Einführung in die vergleichende Morphologie der Wirbeltiere*. Benno Schwabe & Co Verlag, Basel/Stuttgart. - Zweite, überrarbeitete und erweiterte Auflage, 1959
13. ROMER, A.S.: *Vergleichende Anatomie der Wirbeltier*. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, 1959
14. BERGEIJK, W.A.: The evolution of vertebrate hearing. In: Neff,W. (ed.) *Contributions to sensory physiol 2*. Academic Press, New York, 1967, 1-49
15. WARNER, R.E.; PETERSON, K.K. and BORGMAN, L.: Behavioural pathology in fish: a quantitative study of sub-lethal pesticide toxication. In: N.W. Moore (ed.) *Pesticides in the Environment and their effects on wildlife*. Journal of Applied Ecology. 3, Suppl., 1966, 223-247
16. ANDERSON, J.M.: Assessment of the effects of pollutants on physiology and behavior. Proc. R. Soc. Lond B 177, 1971, 307-320
17. OLLA, B.L.: Behavioral bioassays - Behavioral meaures of enviromental stress. In: Olla,B.L. (ed.) *Proceedings of a workshop on Marine Bioassays*. Marine Technology Society, Washington D.C., 1974, 24-31
18. DICKS, B.: The applicability of the Milford Haven experience for new oil terminals. In: Baker, J.M. (ed.) *Marine ecology and oil pollution*. Applied Science Publishers; Barking, Essex (UK), 1976, 67-87
19. LARRICK, S.R.; DICKSON, K.L.; CHERRY, D.S. and CAIRNS, J. Jr.: Determining fish avoidance of polluted water. *Hydrobiologia* 61, 1978, 257-265
20. GIATTINA, J.D. and GARTON, R.R.: A review of the preference-avoidance responses of fishes to aquatic contaminants. *Residue Reviews* 87, 1983, 43-45
21. ZAHNER, R.: Über die Wirkung von Treibstoffen und Ölen auf Regenbogenforellen. *Vom Wasser* 29, 1962, 142-177
22. ERMISCH, R. und JUHNKE, I.: Automatische Nachweisvorrichtung für akut toxische Einwirkungen im Strömungstest. *Gewässer und Abwässer* 52, 1973, 16-23

23. BESCH, W.K., LOSERIES, H.G. MEYER-WARDEN, K. und SCHMITZ, W.: Eine automatische Warnanlage zum Nachweis von Giften in akut toxischen Konzentrationen durch Fische. *gwf-Wasser/Abwasser* 115, 1974, 501-503
24. SCHERER, E.: Behavioural assays - principles, results and problems. *Proc. 3rd Aquatic Toxicity Workshop. Environmental Protection Service Technical Report No. EPS-5AR-77-1*, Halifax, Canada, 1977, 33-40
25. SCHERER, E.: Behavioural responses as indicators of environmental alterations: approaches, results, developments. *J. Appl. Ichthyol.* 8, 1992, 122-131
26. DIAMOND, J.; COLLINS, M. and GRUBER, D.: An overview of automated biomonitoring - past developments and future needs. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.) *Automated Biomonitoring: Living Sensors as Environmental Monitors*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1988, 23-39
27. GRUBER, D.: A historical perspective. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.) *Automated Biomonitoring: Living Sensors as Environmental Monitors*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1988, 21-22
28. LUBINSKI, K.S.; DICKSON, K.L.; CAIRNS, J. Jr.: Microprocessor-based interface converts video signals for objekt tracking. *Computer Design/Dec.* 16, 1977, 81-87
29. MILLER, D.C.; LANG, W.H.; GREAVES, J.O.B. and Wilson, R.S.: Investigations in aquatic behavioral toxicology using a computerized video quantification system. In: Pearson, J.G.; Foster, R.B.; Bishop (eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, ASTM STP 766*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1982, 206-220
30. SPIESER, O.H. und YEDILER, A.: Empfindliche Parameter bei der Entwicklung von Langzeittests an Fischen. *Umweltforschungsplan des Bundesministers des Inneren (10603030)*. Institut für Toxikologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, 1986
31. SPIESER, O.H. und FRISCH, H.P.: Verfahren zur Messung der Bewegungsweisen und Konfigurationen von biologischen und nicht biologischen Objekten. *Deutsche Patentschrift P 3543515.1*, 1985
32. SPIESER, O.H. und FRISCH, H.P.: Method of measuring the types of motion and configuration of biological and non biological objects. *United States Patent No. 4,780,907*; 1988
33. SPIESER, O.H. und SCHOLZ, W.: Verfahren zur quantitativen Bewegungsanalyse von mehreren Objekten im selben Medium. *Deutsche Patentschrift P. 4224750.0*, 1992

34. SPIESER, O. H. und FREITAG, D.: 28-Day Fish Test. In: Überprüfung der Durchführbarkeit von Prüfvorschriften und der Aussagekraft der Stufe I und II des E. Chem. G.. Umweltforschungsplan des Bundesministers des Inneren (10604011/02). Institut für Toxikologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, 1984, 132-169
35. LORENZ, R.: Quantitative Verhaltensuntersuchungen an Zebrabärblingen (*Brachydanio rerio*) unter Langzeiteinwirkung des Herbizids Atrazin alleine und in Kombination mit Humussäuren. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1993
36. SPIESER, O.H.; LEHNBERGER, A., FREITAG, D. und BALLHORN: Quantifizierung von Verhaltensparametern unter Schadstoffeinwirkung bei Fischen. Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und reaktorsicherheit (10603068). Institut für Toxikologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, 1993
37. DIN 38412 Teil 15: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Fische - Fischtest (L15). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Beuth Verlag, Berlin, 1982
38. DIN 38412 Teil 20: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Bestimmung der Giftwirkung von Abwässern auf Fische - Fischtest (L20). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Beuth Verlag, Berlin, 1980
39. MANN, H.: Die Goldorfe (*Leuciscus idus melanotus*) im Fischtoxizitätstest. In: Reichenbach-Klinke, H.-H. und Akne, W. (Hrsg.) Beiträge zur Fischtoxikologie und -histologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1981, 7-14
40. MANN, H.: Der Goldorfentest. Deutscher Vorschlag zur Prüfung der Wirkung von chemischen Stoffen auf Fische. Vom Wasser 44, 1975, 1-13
41. MARCHETTI, R.: The toxicity of nonyl-phenol-ethoxylate to the developmental stages of the rainbow trout. *Salmo gairdneri* Richardson. Ann. appl. Biol. 55, 1965, 425-430
42. BLÜBAUM-GRONAU, E.; SPIESER, O.H. und KREBS, F.: Bewertungskriterien für einen Verhaltensfischtest zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe Verein Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, 1992, 333-348
43. SACHS, L.: Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984, 230-238 - 6. Auflage

44. TIMMS, A.M.; KLEEREKOPER, H. and MATIS, J.: Locomoter Response of Goldfish, Channel Catfish, and Largemouth Bass to a 'copper-polluted' mass of water in an open field. *Water Resources Research* 8, 1972, 1574-1580
45. ALABASTER, J.S. and LLOYD, R.: Water quality criteria for freshwater fish. Food and agriculture organization of the united nations by Butterworths, London - Boston, 1980
46. BREDER Jr., C.M. and NIGRELLI, R.F.: The influence of temperature and other factors on the winter aggregations of the sunfish, *Lepomis auritus*, with critical remarks on the social behaviour of fishes. *Ecology* 16, 1935, 33-47
47. CHERRY, D.S. and CAIRNS, J. Jr.: Biological monitoring part V-preceference and avoidance studies. *Water Res.* 16, 1982, 263-301
48. SHELLFORD, V.E. und ALLEE, W.C.: The reactions of fishes to gradient of dissolved atmospheric gases. *J. Exp. Zool.* 14, 1913, 107-166
49. BEITINGER, T.L. and FREEMAN, L.: Behavioral avoidance and selection responses of fishes to chemicals. *Residue Reviews* 90, 1983, 35-55
50. WEBB, P.W. and BRETT, J.R.: Effects of sublethal concentration of Sodium Pentachlorphenate on growth rate, food conversion efficiency, and swimming performance in underyearling Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Fish Res. Board Can.* 30, 1973, 499-507
51. PITCHER, T.J.: Functions of shoaling behaviour in teleosts. In: Pitcher, T.J. (Ed.): *The behaviour of teleost fishes*, Croom Helm, London & Sydney, 1986, 294-337
52. PITCHER, T.J.: Sensory information and the organization of behaviour in a shoaling cyprinid fish. *Anim. Behav.* 27, 1979, 126-149
53. PITCHER, T.J.: Heuristic definitions of shoaling behaviour. *Anim. Behav.* 31, 1983, 611-613
54. WEIS, J.S. and WEIS, P.: Behavioral changes in the goldfish, *Carassius auratus*, produced by treatment with nerve growth factor. *Physiol. Behav.* 9, 1972, 367-372
55. WEIS, P. and WEIS, J.S.: Schooling behavior of *Menidia menidia* in the presence of the insecticide Sevin(Carbaryl). *Marine Biology, Berlin* 28, 1974, 261-263
56. WEIS, P. and WEIS, J.S.: DDT Causes Changes in Activity and Schooling Behavior in goldfish. *Environmental Research* 7, 1974, 68-74
57. KOLTES, K.H.: Effects of sublethal copper concentrations on the structure and activity of Atlantic Silverside schools. *Trans. American Fish. Society* 114, 1985, 413-422

58. BENGTSSON, B.-E.: Effect of Zinc on the movement pattern of the Minnow, *Phoxinus phoxinus* L. Water Research 8, 1974, 829-833
59. WELLENS, H.: Vergleich der Empfindlichkeit von *Brachydanio rerio* HAMILTON-BUCHMANN und *Leuciscus idus melanotus* L. bei der Untersuchung der Fischtoxizität von chemischen Verbindungen und Abwässern. Z. Wasser Abwasser Forsch. 15, 1982, 49-52
60. KNIE, J.; HÄLKE, A.; JUHNKE, I. und SCHILLER, W.: Ergebnisse der Untersuchungen von chemischen Stoffen mit vier Biotests. Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen 27, 1983, 77-79
61. HEDTKE, S.F. and ARTHUR, J.W.: Evaluation of a site-specific water quality criterion for Pentachlorphenol using outdoor experimental streams. In: R.D. Cradwell, R. Purdy, R.C. Bahner (eds.) Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium. ASTM STP 854, Philadelphia, 1985, 551-564
62. MELLO, N.K.: Behavioral toxicology: A developing discipline. FASEB 34, 1975, 1832-1834.
63. KREBS, F.; BLESSING, B.; FRITZ-LANGEN, H.; BLÜBAUM-GRONAU, E.; HOFFMANN, M. und SCHMITZ, P.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins. Teilvorhaben 2: Bakterien-toximeter, Verhaltensfischtest und Koordination/ Zentrale Auswertung. Forschungsbericht. Forschungsmaßnahme des Bundesministers für Forschung und Technologie (0339299D). Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, 1994, in Vorbereitung0



## **Der "Dreissena-Monitor" - Erfahrungen mit dem neuen biologischen Frühwarnsystem**

Jost Borcherding & Markus Volpers

Biologische Frühwarnsysteme in der kontinuierlichen Gewässerüberwachung sollen eine Reihe von Anforderungen erfüllen. Hierzu gehören z.B. eine lange Standzeit bei einem möglichst geringen Wartungsaufwand und bei gleichzeitig einfacher Bedienung. Insbesondere gilt es aber zwei wichtige Anforderungen zu erfüllen, nämlich eine möglichst hohe Sensibilität und die Vermeidung jeder Art von Fehlalarmen. Diese beiden letzten Anforderungen stehen sich in der Regel konträr entgegen, d.h. hier ist vom Entwickler solcher Frühwarnsysteme die meiste Arbeit zu leisten, um einen sinnvollen und praktikablen Kompromiß zwischen beiden Anforderungen zu erzielen. Unabhängig von der Art des Systems kann sich nur dann ein guter Kompromiß erarbeiten lassen, wenn erstens das Normalverhalten des Systems auch unter wechselnden Einsatzbedingungen und zweitens die Reaktionen des Systems gegenüber Schadstoffen hinreichend bekannt sind [1]. Beide Informationen müssen nun in eine für den Computer nutzbare Form überführt werden, beispielsweise einen mathematischen Algorithmus, der den Zusammenhang zwischen den Umweltbedingungen und dem Normalverhalten beschreibt. Schließlich gilt es diese Funktionen so in das System zu implementieren, daß der Computer in der Praxis 'online' mit großer Sicherheit die normalen Veränderungen der untersuchten Parameter von jenen Verhaltensvariationen unterscheiden kann, die auf einer toxikologischen Veränderung des Milieus beruhen, also echte Alarmfälle darstellen.

Der "Dreissena-Monitor" basiert auf den Schalenbewegungen der heimischen Zebramuschel *Dreissena polymorpha* [2]. In zwei parallelen Durchflußrinnen wird der Schalenöffnungszustand von jeweils bis zu 42 Muscheln mit Hilfe von Reed-Schaltern kontinuierlich erfaßt (vgl. Abb. 1), wobei zwei verschiedene Parameter gemessen werden, nämlich erstens die Anzahl der Schalenbewegungen in einem Zeitintervall und zweitens der Prozentsatz von Muscheln der untersuchten "Population", die während eines Zeitintervalls ihre Schalen geöffnet hatten. Auf einem angeschlossenen Computer übernimmt eine umfangreiche Software die ständige Auswertung der Daten hinsichtlich eines möglichen Störfalls im Gewässer. Dynamische Grenzwerte und komplexe Alarmkriterien tragen zu einer hohen Sensibilität des "Dreissena-Monitors" bei und minimieren gleichzeitig die Möglichkeit eines Fehlalarms [3]. Das Computerprogramm zum "Dreissena-Monitor" ist mit einem übersichtlichen Menusystem versehen, das dem Benutzer auf einfache Weise den Zugang zu allen Funktionen des Systems ermöglicht. Hierzu gehört unter anderem auch die graphische Darstellungen aller aufgezeichneten Meßwerte auf dem Bildschirm oder einem angeschlossenen Drucker. Des weiteren erlaubt das System dem Benutzer gleichzeitig bis zu 5 analoge Meßwerte einzulesen und aufzuzeichnen, beispielsweise für die wichtigen abiotischen Parameter Temperatur oder Sauerstoffgehalt.

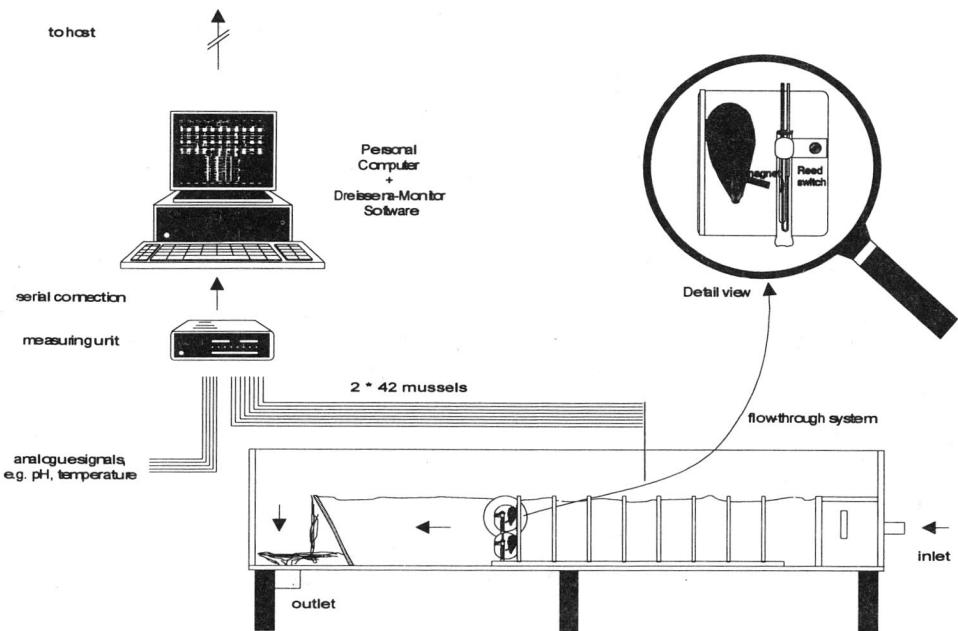


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hardware des "Dreissena-Monitors" (nur eine der beiden Fließwasserrinnen ist dargestellt)

Ein Einsatz der Muscheln über ca. 6 Monate in den Fließwasserrinnen verlief bisher problemlos. Die naturnahe Testsituation für *Dreissena* in den Rinnen wurde hierbei besonders am auffälligen Wachstum der Muscheln deutlich. Der oben genannte Wert von 6 Monaten ergibt sich aus einer theoretischen Betrachtung, bei der die natürliche Mortalität der Muscheln im "Dreissena-Monitor" am Rhein in Bad Honnef solange kumulativ aufaddiert wurde, bis jede der 84 Muscheln in der Rinne theoretisch einmal nach ihrem Tode ersetzt worden wäre (während der wöchentlichen Wartungsarbeiten) [4]. In ausgedehnten Labor- und Freilanduntersuchungen erwies sich der "Dreissena-Monitor" als äußerst robust, zuverlässig und wartungsarm [z.B. 4, 5]. Bei einer Standzeit von 7 Tagen beschränken sich die wöchentlichen Wartungsarbeiten auf die Reinigung der Rinnen, das Nachjustieren einzelner Muscheln und das Ersetzen eventuell gestorbener Muscheln. Hierfür werden in der Regel nicht mehr als ca. 2-3 Stunden pro Woche benötigt.

Der qualitative Schritt von einem reinem Meßsystem (wann bewegt sich welche Muschel) zu einem biologischen Frühwarnsystem wie dem "Dreissena-Monitor" basiert letztendlich auf weitreichenden Untersuchungen erstens zum Normalverhalten der Muscheln und zweitens zu deren Reaktionen gegenüber Schadstoffen. Beide Arten von Informationen müssen schließlich ins Bewertungsprogramm implementiert werden. Dabei gilt selbstverständlich, wie bei fast allen biologischen Fragestellungen, daß die

aus dem Verhalten der Tiere abgeleiteten Alarmfunktionen artspezifisch sind [6], d.h. sie gelten wie im Falle des "Dreissena-Monitors" nur für die Zebramuschel *Dreissena polymorpha*, nicht aber für andere Muschelarten, selbst wenn die vorhandene Meßtechnik problemlos auf andere Arten anwendbar wäre. Beim Einsatz des niederländischen Mosselmonitors® in der Gewässerüberwachung werden dem Anwender keine Muschelarten vorgeschrieben, d.h. der Benutzer kann sowohl die Zebramuschel *Dreissena polymorpha*, als auch die Flußmuschel *Unio pictorum* einsetzen, ja sogar im marinen Bereich mit der Miesmuschel *Mytilus edulis* soll das System vergleichbar gute Ergebnisse liefern [vgl. 7, 8]. Dieser Sachverhalt erscheint zumindest fragwürdig, da im System keine Muschelart-spezifische, sondern lediglich eine allgemeine Alarmfunktion implementiert wurde, die für alle Arten gelten soll (vgl. Handbuch zum Mosselmonitor®). Unserer Erfahrung nach kann auf diese Weise nicht die optimale Lösung zwischen einer möglichst hohen Sensibilität und einer großen Sicherheit gegenüber Fehlalarmen erreicht werden, zumal dann nicht, wenn der Benutzer des Mosselmonitors® die verschiedenen Alarmschwellen selbst einstellen soll, und dies in der Regel ohne die jahrelange Erfahrung, die der Hersteller in der Forschung mit dem System erlangt hat. Diese Erfahrungen aus Forschung und Praxis direkt in das Computerprogramm einfließen zu lassen erscheint uns dagegen als der bessere Weg, weshalb diese Lösung beim "Dreissena-Monitor" verwirklicht wurde.

Inzwischen konnte der "Dreissena-Monitor" über insgesamt mehr als 5½ Jahre in der kontinuierlichen Gewässerüberwachung an verschiedenen Standorten seine Einsatztauglichkeit beweisen [4]. Dabei lieferte das System nicht nur Erfahrungen über z.B. Standzeiten und notwendige Wartungsarbeiten (s.o.), sondern insbesondere auch eine Vielzahl von Grundlagendaten zum Normalverhalten [vgl. 2, 9, 10, 11]. Darüber hinaus wurden inzwischen eine ganze Reihe von Aufstockungsversuche mit ausgewählten Xenobiotika im Labor und natürlich auch im Freiland durchgeführt [vgl. z.B. 2, 5, 9]. Beispielhaft seien an dieser Stelle die im Labor bei 15° C ermittelten, auf nominalen Konzentrationen beruhenden Nachweisgrenzen des "Dreissena-Monitors" für 3 Xenobiotika dargestellt.

Tabelle 1: Nachweisgrenzen und prozentuale Standardabweichungen der Versuchsergebnisse im Bereich der Nachweisgrenze gegenüber verschiedenen Chemikalien beim "Dreissena-Monitor" unter Laborbedingungen.

Substanz	Anzahl der Versuche	% offene Muscheln		Anzahl Schalenbew.	Standard-abw. [%]
		Nachweis-grenze [µg/l]	Standard-abw. [%]		
PCP	10	20	17	15	24
Lindan	14	170	22	130	23
2-Nitrophe.	8	100	34	270	18

Vor dem Hintergrund des SANDOZ-Unfalls 1986 in Schweizerhalle am Oberrhein wurde der Bund-Länder-Arbeitskreis "Wirkungstests Rhein" im Rahmen des Arbeitsausschuß "Meßmethoden" der Deutschen Rheinschutzkommission gegründet. Ziel dieses Arbeitskreises war die "Entwicklung, Erprobung und Implementation von

Biotoestverfahren zur Überwachung des Rheins" [12], wobei abschließend mehr als 15 Biotoestgeräte bewertet wurden. Als Endergebnis dieses Arbeitskreises wurden 4 biologische Frühwarnsysteme für den Einsatz in den Meßstationen der Deutschen Rheinschutzkommission empfohlen, darunter auch der "Dreissena-Monitor". Gerade für solch einen Einsatz in der Immissionsüberwachung unserer Fließgewässer wurde der "Dreissena-Monitor" konzipiert. Denkbar wäre der Einsatz des "Dreissena-Monitors" jedoch auch in der Emissionsüberwachung von z.B. kommunalen Kläranlagen (hier liegen erste Testergebnisse bereits vor, [10]) oder industriellen Einleitern.

## Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Prof. Dr. D. Neumann für die uneingeschränkte Unterstützung der Arbeiten. Herzlich bedanken wir uns auch bei Frau R. Widdig für Ihre vorbildliche technische Assistenz. Dem Landesamt für Wasser und Abfall in NRW danken wir für die bereitwillige Unterstützung der *in-situ* Messungen in Bad Honnef, insbesondere dem in der Station tätigen Personal, allen voran Herrn Willemsen und Herrn Schlehbach. Diese Untersuchungen wurden durch das "Umweltbundesamt Berlin" gefördert (F+E Vorhaben 108 02 088, an Prof. Dr. D. Neumann).

## Literatur

1. CASPERS, N.: Kritische Betrachtung des "Dynamischen Daphnientests". - Z. Wasser-Abwasser-Forsch., 21, 1988, 152-154
2. BORCHERDING, J.: Another early warning system for the detection of toxic discharges in the aquatic environment based on the valve movements of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. In: Limnologie aktuell - Vol. 4 - "The Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* - Ecology, Biological Monitoring and First Applications in Water Quality Management", D. Neumann & H.A. Jenner (eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1992 a, 127-146
3. BORCHERDING, J.: The "Dreissena-Monitor" - improved evaluation of dynamic limits for the establishment of alarm-thresholds during toxicity tests and for continuous water control. In: "Freshwater Field Test for Hazard Assessment of Chemicals", I.A. Hill, F. Heimbach, P. Leeuwangh & P. Matthiessen (eds.), Lewis Publishers, Michigan, (in press)
4. BORCHERDING, J. & VOLPERS, M.: The "Dreissena-Monitor" - First results on the application of this biological early warning system in the continuous monitoring of water quality. Accepted for publication in the conference proceedings "Rehabilitation of the River Rhine", Arnhem, March 1993, (in press)

5. MATTHIAS, U. & RÖMPP, S.: Erprobung des Dreissena-Monitors, einem neuen Biotestsystem mit der Zebramuschel (*Dreissena polymorpha*) in der Rhein-Gütemeßstation Karlsruhe, (in prep.)
6. NUSCH, E.A.: Ökologische Testverfahren - Anforderungsprofile in Abhängigkeit vom Anwendungszweck. UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox., 3, 1991, 12-15
7. KRAMER, K.J., JENNER, H.A. & De ZWART, D.: The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. - *Hydrobiologia*, 188/189, 1989, 433-443
8. JENNER; H.A., AERSSEN, G.H.F.M. van & TERWOERT, J.: Valve Movement behaviour of the mussel *Dreissena polymorpha* and the clam *Unio pictorum* for use in an early warning system. In: *Limnologie aktuell - Vol. 4 - "The Zebra Mussel Dreissena polymorpha - Ecology, Biological Monitoring and First Applications in Water Quality Management"*, D. Neumann & H.A. Jenner (eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1992, 115-126
9. BORCHERDING, J.: Die Schalenbewegungen der Muschel *Dreissena polymorpha* als Monitorsystem zur Gewässerüberwachung. In: "Biologische Testverfahren. Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992", K.G. Steinhäuser & P.-D. Hansen (eds.), Schr.-Reihe Verein WaBoLu 89, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, 1992 b, 361-373
10. MADER, E.: Verhaltensregistrierungen bei der Zebramuschel *Dreissena polymorpha* mit Hilfe eines Muschelmonitors. Diplomarbeit an der Universität Köln, 1993
11. RÖMPP, S.: Untersuchungen zum Verhalten der Zebramuschel (*Dreissena polymorpha* PALL.) unter Berücksichtigung verschiedener chemisch-physikalischer Faktoren, sowie unter Einfluß verschiedener Schadstoffe - Experimente mit einem neuen Bioalarmsystem. Diplomarbeit an der Universität Tübingen, 1993
12. SCHMITZ, P., IRMER, U. & KREBS, F.: Einsatz kontinuierlicher Biotestsysteme zur Überwachung des Rheins. In: "Biologische Testverfahren. Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992", K.G. Steinhäuser & P.-D. Hansen (eds.), Schr.-Reihe Verein WaBoLu 89, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, 1992, 233-246



# Die Schalenbewegung von Muscheln als Indikator von Schadstoffen in der Gewässerüberwachung

Michael Hoffmann, Elke Blübaum-Gronau, Falk Krebs

## Zusammenfassung

Zur schnellen Indikation toxisch wirkender Schadstoffe in Gewässern wurde von niederländischen Forschungslaboratorien ein Biomonitor entwickelt, der die Schalenbewegung von Muscheln registriert und auswertet. Die Schalenöffnungsweite jeder einzelnen Muschel wird mit Hilfe eines an den Muscheln befestigten Sensorsystems ermittelt. Die Abstandsmessung erfolgt unter Ausnutzung der elektromagnetischen Induktion. Die aufgenommenen Daten werden anhand von 3 Auswertekriterien ("Schalen geschlossen", "Ansteigende Schalenbewegungsaktivität" und "Abnehmende Schalenöffnungsweite") in ihrem zeitlichen Verlauf bewertet. Im schadstofffreien Wasser bewegen die Muscheln ihre Schalen nach einem bestimmten Verhaltensmuster, das hauptsächlich durch die Atmung und die Nahrungsaufnahme bestimmt wird. In Abhängigkeit von der Art und Konzentration des Schadstoffes zeigen die Muscheln ein geändertes Schalenbewegungsmuster.

Das Meß- und Auswertesystem wird unter der Bezeichnung "MOSSELMONITOR®" von der Firma Delta Consult (Kapelle, Niederlande) als biologisches Frühwarnsystem hergestellt und vertrieben. Die Laborversion dieses Muschelmonitors mit *Dreissena polymorpha* als Testorganismus wurde in der Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz erprobt. Ergebnisse von Aufstockungsversuchen mit Natriumpentachlorphenolat werden mitgeteilt und über Erfahrungen mit diesem Biomonitor wird berichtet.

## Summary

For fast indication of toxic pollutants in surface waters, several Dutch research laboratories developed an automated biological system which registers and evaluates the valve movement of mussels. The valve opening position of every mussel is ascertained by a sensor system which is attached to the mussels. For distance measurement the principle of electromagnetic induction is used. The temporal variations of the recorded data are evaluated by three evaluation criteria ('valve closure', 'increasing valve movement activity' and 'decreasing width of valve opening'). In unpolluted water the mussels move their valves in a distinct pattern which is mainly determined by their respiration and nutrient uptake. Depending on the type and concentration of contamination in the water, the mussels display a different valve movement pattern.

The registration and evaluation system, called MOSSELMONITOR, is manufactured and marketed by the company Delta Consult (Kapelle, Netherlands) as a biological early warning system. The laboratory version of this mussel monitor is tested with the test organism *Dreissena polymorpha* in the Federal Institute of Hydrology (Koblenz, Germany). Results of chemical tests with sodiumpentachlorophenolate and the experiences made with this system will be presented.

## Einleitung

Seit einigen Jahren werden Muscheln als Indikatororganismen beim Biomonitoring von Schadstoffen im Wasser eingesetzt [1,2]. Im marinen Bereich werden Schadstoffmonitoringprogramme vor allem mit der Miesmuschel *Mytilus edulis* und im limnischen Bereich mit der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* durchgeführt [3-6]. Bioakkumulationsstudien dienen der Überwachung des Gewässerzustandes; den Anforderungen nach einer Schnellindikation von Schadstoffwirkungen genügen sie nicht. Plötzlich auftretende Wasserqualitätsänderungen müssen jedoch - u.a. wegen der Nutzung von Oberflächenwasser für die Trinkwassergewinnung - frühzeitig erkannt werden. Aus diesem Grund werden neben physikalisch-chemischen Analysenverfahren kontinuierlich arbeitende Biertestverfahren in der Gewässerüberwachung eingesetzt und vielerorts intensiv weiterentwickelt [7-10]. Die biologischen Testsysteme können die oft teure und zeitintensive chemische Analytik unterstützen, da von ihnen eine schnelle Indikation toxisch wirkender Substanzen oder Stoffgemische zu erwarten ist. Durch die Kombination physikalischer und chemischer Meßwerte aus verbesserten und schnelleren Meß- und Analysenverfahren mit den biologischen Wirkungsdaten wird die Wirksamkeit eines komplexen Überwachungssystems zur Früherkennung von Gewässerverunreinigungen gesteigert. Dabei sollten mehrere, automatisierte Biertestverfahren mit jeweils unterschiedlichen Organismen - z.B. Algen, Bakterien, Daphnien, Muscheln und Fische - parallel eingesetzt werden, damit eine Beeinflussung der Wasserqualität durch einzelne oder synergistisch wirkende Schadstoffe schnell und sicher entdeckt werden kann [10-13]. In den letzten Jahren sind daher auch Biomonitoring entwickelt worden, in denen Muscheln, insbesondere die Süßwassermuschel *Dreissena polymorpha*, als Testorganismen eingesetzt werden [14,15].

In den vergangenen Jahrzehnten wurden bereits viele physiologische Studien an Muscheln durchgeführt. So wurde sowohl der Einfluß physikalischer und chemischer Umgebungsparameter [16] als auch die Wirkung unterschiedlicher Chemikalien auf die Filtrationsrate, Respirationsrate und auf die Herzschlagaktivität bei verschiedenen Muschelarten untersucht [17-19]. Viele Untersuchungen ergaben auch, daß der Einfluß verschiedener Faktoren bereits an der Änderung der Schalenbewegung zu erkennen ist. Hiscock [20] untersuchte die Schalenbewegung der Süßwassermuschel *Hyridella australis* unter sich ändernden Temperaturbedingungen. Higgins [21] zeigte die Zusammenhänge zwischen Futtermenge bzw. Futterqualität und der Schalenbewegung bei *Crassostrea virginica* auf. Von besonderer Bedeutung für die Gewässerüberwachung ist die durch Schadstoffe bewirkte Schalenbewegung. Salánki und Varanka [22, 23] untersuchten den Einfluß von Schwermetallen und Insektiziden

auf die Schalenaktivität der Süßwassermuschel *Anodonta cygnea* und Manley und Davenport [24] den Effekt von Kupfer auf die Schalenbewegung verschiedener mariner Muscheln.

Seit den ersten Versuchen, die Schalenbewegung mit mechanischen Systemen zu erfassen [25], sind weitere vielfältige Methoden, u.a. die Benutzung von Dehnungsmeßstreifen [21,26] oder Reed-Schaltern [15], angewendet worden. Eine andere Entwicklung ist die Messung der Schalenbewegung mit Hilfe der elektromagnetischen Induktion. Diese Untersuchungsmethode wurde im niederländischen Institut für angewandte naturwissenschaftliche Forschung (TNO, Den Helder) entwickelt und in Zusammenarbeit mit den Instituten KEMA (Arnhem, Niederlande) und RIVM (Bilthoven, Niederlande) erprobt und verbessert. Die Erfahrungen, die mit diesem System gemacht wurden, führten zu der Entwicklung eines vollautomatischen biologischen Frühwarnsystems für die kontinuierliche Überwachung von Gewässern [27-30]. Mit diesem Muschelmonitor sind in den Niederlanden umfangreiche Laborversuche mit Chemikalien unterschiedlicher Stoffklassen durchgeführt worden. Seine Praxistauglichkeit konnte in Wasserkontrollstationen am Rhein und anderen niederländischen Flüssen sowie bei der Einleiterüberwachung und der Rohwasserkontrolle bei der Trinkwassergewinnung unter Beweis gestellt werden. Dabei wurden sowohl die Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* als auch die Miesmuschel *Mytilus edulis* als Testorganismen eingesetzt [31].

Die Laborversion des Muschelmonitors, mit *Dreissena polymorpha* als Testorganismus, wird in der Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz zur Überwachung des Rheins eingesetzt. Erfahrungen und Ergebnisse aus Aufstockungsexperimenten mit Natriumpentachlorphenolat werden vorgestellt.

### **Das biologische Frühwarnsystem "MOSSELMONITOR®"**

Anfang der achtziger Jahre sind die Schalenbewegungen der Süßwassermuschel *Dreissena polymorpha* unter Einwirkung unterschiedlicher Chemikalien mittels der in den Niederlanden entwickelten, auf induktive Abstandsmessung basierenden Meßelektronik untersucht worden. In einer einfachen, automatischen Auswertung wurde nur berücksichtigt, ob eine Muschel offen oder geschlossen ist. Dennoch reagierte dieses neue biologische Testsystem auf eine Vielzahl der getesteten Chemikalien ähnlich sensiv wie einige damals bereits vorhandene Biotestgeräte mit anderen Testorganismen [27].

Eine frühe, einfachere Version des heutigen Muschelmonitors wurde 1986 zur kontinuierlichen Abwasserüberwachung eingesetzt [28]. Das batteriebetriebene, mikrocomputergesteuerte Meß- und Registriersystem war bereits in einem wasserdichten PVC-Gehäuse untergebracht. Das mit acht Muscheln bestückte Testgerät wurde komplett in das zu untersuchende Wasser eingetaucht. Das Gerät erwies sich als durchaus praktikabel im Hinblick auf die zu erfüllenden Anforderungen an ein biologisches Frühwarnsystem. Doch auch bei dieser Version wurde nur

ausgewertet, ob die Muscheln ihre Schalen geschlossen oder geöffnet hatten. Als Indiz für das Vorhandensein eines Schadstoffes sollten 6 von 8 Muscheln ihre Schalen gleichzeitig für länger als 5 min geschlossen halten.

Die Weiterentwicklung und Verbesserung der Meßelektronik zu einem noch komplexeren, hochfrequenten elektromagnetischen Induktionssystem führte zu einem sensitiveren Gerät sowohl für den Labor- als auch für den Feldeinsatz. Dabei wurde der Abstand der beiden Schalenhälften zueinander mit Hilfe zweier kleiner an dünnen, flexiblen Koaxialkabeln befestigten Spulen, die auf den Schalen der Muscheln angebracht wurden, ermittelt. Durch die Verwendung von flexiblen Kabeln konnten auch sich frei bewegende Muschelarten als Testorganismen eingesetzt werden.

Die in frühen Untersuchungen gefunde geringere Empfindlichkeit ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die einfache Verhaltensbewertung - es wurde lediglich ausgewertet, ob und wie lange eine Gruppe von Muscheln nach der Applikation der Testchemikalie ihre Schalen geschlossen hielten - zurückzuführen. Die Reaktion der Muscheln auf Schadstoffe, insbesondere auf Einträge niedrigerer Konzentrationen, ist aber wesentlich differenzierter, wie es die in Rheinwasser gehaltenen Muscheln auf Zugabe von Hypochlorit zeigen (Abb. 1). In Abb. 1a ist das normale Schalenbewegungsverhalten von *Dreissena polymorpha* dargestellt. Meistens sind die Schalen fast vollständig offen. Ab und zu ist eine kurze Schließbewegung zu erkennen. Im Vergleich mit diesem normalen Verhalten zeigt die Dreikantmuschel bereits bei einer Zugabe von 37 µg/L Hypochlorit eine gesteigerte Aktivität, d.h. ein häufigeres Öffnen und Schließen der Schalen; gelegentlich folgt ein längeres Schließen (Abb. 1b). Wird die Konzentration der Chemikalie erhöht, stellen sich häufiger längere Phasen des kompletten Schließens ein. Die Öffnungsphasen sind dabei immer mit einer hohen Aktivität verbunden (Abb. 1c-d). Auf noch höhere Konzentrationen reagieren die Muscheln dann mit einem anhaltenden Schließen der Schalen, was nur gelegentlich durch kurzes Öffnen unterbrochen wird (Abb. 1e). Über einen angeschlossenen Personalcomputer wurde die relative Position der Schalenhälften zur direkten Beobachtung graphisch ausgegeben und diese Daten weiter auf Bewegungshäufigkeit (Öffnen und Schließen der Schalen pro Stunde) und dem Schließverhalten (Verhältnis der Zeit, in der eine Muschel geschlossen ist, zu der Zeit, in der sie ihre Schalen geöffnet hat) ausgewertet [29].

Mit Hilfe dieser neuen Meßtechnik konnten Kramer et al. 1989 [30] zeigen, daß neben dem häufigeren Öffnen und Schließen der Schalen und dem kompletten Schalenschluß auch die Abnahme der durchschnittlichen Schalenöffnungsweite einer Muschel ein Hinweis auf das Vorhandensein eines Schadstoffes sein kann. Basierend auf der Tatsache, daß Muscheln die meiste Zeit ihre Schalen zur Respiration und Nahrungsaufnahme geöffnet halten, lassen sich in Abhängigkeit vom vorhandenen Schadstofftyp und seiner Konzentration Änderungen gegenüber diesem Normalverhalten beobachten, aus denen dann - im Vergleich zu den früheren Geräteversionen - differenziertere Alarmkriterien ermittelt werden konnten.

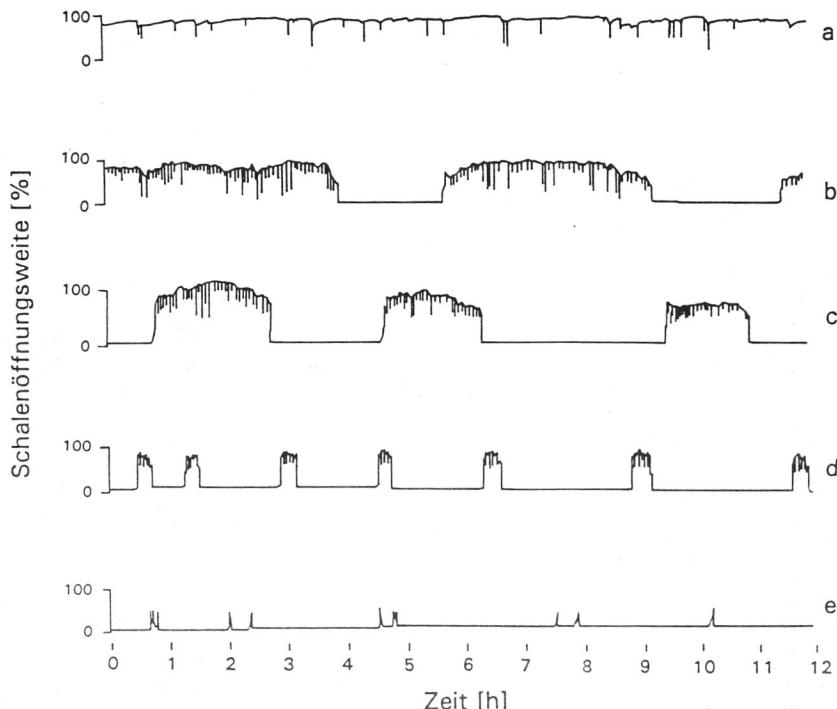


Abb. 1: Schalenbewegungsverhalten von *Dreissena polymorpha*:

a) ohne Substanzzuggabe und während der Chlorierung mit b) 37 µg/L, c) 55 µg/L, d) 180 µg/L und e) 550 µg/L Hypochlorit (modifiziert nach Jenner et al.[29]).

Nach einer ausführlichen Erprobungsphase in mehreren niederländischen Instituten wurden die endgültigen Hardware- und Software-Spezifikationen festgelegt und eine kommerzielle stand-alone Version für den in-situ Einsatz und zusätzlich eine Laborversion entwickelt. Dieser MOSSELMONITOR, wird als biologisches Frühwarnsystem von der Firma Delta Consult (Kapelle, Niederlande) hergestellt und vertrieben.

### Der Testorganismus

Prinzipiell kann jede Muschelart als Testorganismus im MOSSELMONITOR, verwendet werden. Untersuchungen wurden z.B. mit der Miesmuschel *Mytilus edulis* und der Flussmuschel *Unio pictorum* durchgeführt. Für Überwachungsaufgaben im limnischen Bereich wurde hauptsächlich die Wander- oder Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* PALLAS, die in der englisch-amerikanischen Sprache "zebra mussel" genannt wird, eingesetzt.

Diese Molluskenart stammt ursprünglich aus dem Gebiet zwischen dem Aralsee, dem Kaspischen und dem Schwarzen Meer. Seit über 200 Jahren breitet sie sich, begünstigt durch die zunehmende Schifffahrt und den Bau zusätzlicher Kanalverbindungen zwischen den Gewässern, in nordwestliche Richtung weiter aus. Mitte des neunzehnten Jahrhunderts erreichte sie bereits das Rheinland, seit den sechziger Jahren dieses Jahrhunderts auch den Bodensee und Österreich. Sie gehört zu den sich schnell verbreitenden Neozoen Europas [32,33].

Nachdem die Dreikantmuschel im Mittel- und Niederrhein Anfang der siebziger Jahre infolge der starken Wasserverschmutzung und dem damit zusammenhängenden Sauerstoffdefizits fast vollständig verschwunden war, ist sie heutzutage wieder nahezu überall im Rhein, in rheinnahen Baggerseen, in Nebenflüssen und Kanalsystemen anzutreffen [34,35,36]. *Dreissena polymorpha* weist heute sowohl in stehenden als auch in fließenden Gewässern hohe Populationsdichten auf. Neumann [37] konnte 1986 an einigen Stellen am Niederrhein bis zu 40000 Jungtiere pro Quadratmeter feststellen. Putzer und Matter [5] sowie Tittizer et al. [36] fanden 1987 einige hundert bis über 5000 adulte Muscheln pro Quadratmeter im Rhein. Seit Jahren ist *Dreissena polymorpha* Gegenstand biologischer, ökologischer und ökotoxikologischer Untersuchungen [33,38,39], da diese Art wichtige Forderungen erfüllt, die an einen Testorganismus im allgemeinen gestellt werden. Dazu gehören u.a. ihr häufiges Vorkommen, die sessile Lebensweise, eine lange Lebensspanne (bis zu 5 Jahre und mehr) und eine gewisse Anspruchslosigkeit an die Hälterungsbedingungen. So wurde die Dreikantmuschel auch als Wächterorganismus in die Umweltprobenbank der Bundesrepublik Deutschland aufgenommen [40].

Wegen ihrer weiten Verbreitung und ihres häufig flächendeckenden Vorkommens in den unterschiedlichsten Habitaten hat sie einen großen Anteil an der Schwebstoff- und Nährstofffiltration in einem Gewässer. Darüber hinaus ist die *Dreissena polymorpha* Hauptnahrungsquelle für einige Fisch- und Tauchenten-Arten und stellt somit ein wichtiges Bindeglied in der Nahrungskette aquatischer Lebensgemeinschaften dar [6,40].

Die Dreikantmuschel ist eine der dominanten Makrozoobenthos-Arten, die - unter Anwendung des für Fließgewässer geltenden Saprobiensystems - in mäßig belasteten (β-mesosaproben) Regionen vorkommt [41]. Sie lebt somit - im Gegensatz zu einigen anderen in Biostestgeräten verwendeten Organismen - in den Gewässern, die mit einem biologischen Warnsystem überwacht werden sollen.

Für den Einsatz in einem kontinuierlichen Überwachungssystem sprechen neben den bereits genannten Eigenschaften ihre ganzjährige Verfügbarkeit und die relativ einfache Möglichkeit, sie aufgrund der hohen Siedlungsdichte im Uferbereich von Fließgewässern und Seen in ausreichender Menge einsammeln zu können. Die Hälterung des Muschelvorrates kann problemlos in Durchflussteichen erfolgen. Das für jedes Biostestsystem geltende Ziel, mit selbstgezogenen und damit unter kontrollierten Bedingungen aufgewachsenen Organismen zu arbeiten, konnte bei der Dreikantmuschel nicht verwirklicht werden, da eine erfolgreiche Laboraufzucht bisher in keinem Institut glückt.

Die sessile Lebensweise der Dreikantmuschel lässt sie speziell für den Einsatz in dem hier vorgestellten Testgerät als geeignet erscheinen, da die frei lebende Muschel auf negative Veränderungen sich nicht mit einer Fluchtreaktion, sondern nur durch das Schließen der Schalen zu schützen versucht. Die im Aufstockungsexperiment verwendeten, direkt von den Steinschüttungen im unteren Uferbereich des Mittelrheins gesammelten Muscheln hatten eine Schalenlänge von nur 22 bis 25 mm. Durch Einsatz kleiner Exemplare wird einerseits die Vorbelastung - wegen der Kürze der mit Größe und Lebensalter zunehmenden Integrationszeit für akkumulierende Schadstoffe - möglichst klein gehalten [5], andererseits reagieren kleinere Muscheln schneller und empfindlicher auf giftige Substanzen [15].

## Die Funktionsweise des Muschelmonitors

Das Gerät wird vom Hersteller in zwei Ausführungen angeboten. Beide Versionen arbeiten nach demselben Funktionsprinzip.

Die robuste Feld-Einheit ist für den stand-alone Betrieb konzipiert. Die erforderliche Meßelektronik und das Mikrocomputersystem mit der integrierten Auswertesoftware sind in einem wasserdichten Gehäuse untergebracht. Die Versorgung der kompletten Elektronik wird durch die eingebauten, wiederaufladbaren Batterien sichergestellt. Am oberen Teil des Gehäuses werden unter einem Schutzwinkel die Muscheln befestigt. Als Testorganismen sind besonders sessil lebende Muscheln geeignet wie *Mytilus edulis* oder *Dreissena polymorpha*. Da das Gerät komplett in das zu untersuchende Gewässer eingetaucht wird, sind unmittelbare in-situ Messungen bis zu 15 m Tiefe problemlos möglich.

Bei der Laborversion des Gerätes ist die komplette Elektronik in einem spritzwassergeschützten Gehäuse eingebaut, aus dem die Kabel des Sensorsystems herausgeführt sind. Auch bei diesem Gerät ist ein Batteriebetrieb möglich, in der Regel aber wird es direkt mit Netzspannung betrieben. Durch die Herausführung der ca. 1,5 m langen, flexiblen Sensorkabeln kann die Anordnung der Testtiere ebenso wie die Testkammer selbst frei gewählt werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, auch nicht sessile Muscheln einzusetzen. Mit einem Prototyp dieser Laborausführung ist die sich frei bewegende Muschel *Unio pictorum* untersucht worden [29].

Beide Ausführungen arbeiten vollautomatisch und sind jeweils für den Einsatz von 8 Muscheln ausgelegt. Mit einem integrierten Temperatursensor wird ständig die Wassertemperatur gemessen. Bei einem Ausfall der Versorgungsspannung kann die Batteriepufferung für mehrere Tage die Funktionstüchtigkeit des Systems aufrechterhalten. Sinkt die Batteriespannung unterhalb der notwendigen Betriebsspannung, so wird vom Gerät automatisch eine Warnmeldung ausgegeben. Bei der Feldversion ermöglicht eine bis zu 20 m lange Kabelverbindung zum Testgerät das Aufladen der Batterien, wobei für den Aufladevorgang oder auch zur ständigen Stromversorgung Solarzellen eingesetzt werden können. Über dieselbe, mehradrige Kabelverbindung wird sowohl bei der Feld- als auch bei der Labor-Einheit der Alarmkontakt, z.B. zur Aktivierung eines automatischen Probennehmers, bereitgestellt.

Ferner ist eine Kommunikationsschnittstelle (RS232c-Schnittstelle) integriert, die über Schnittstellenkabel, Modem oder per Funkübertragung den Anschluß eines Computers ermöglicht. Eine schematische Darstellung des Muschelmonitors zeigt Abb. 2.

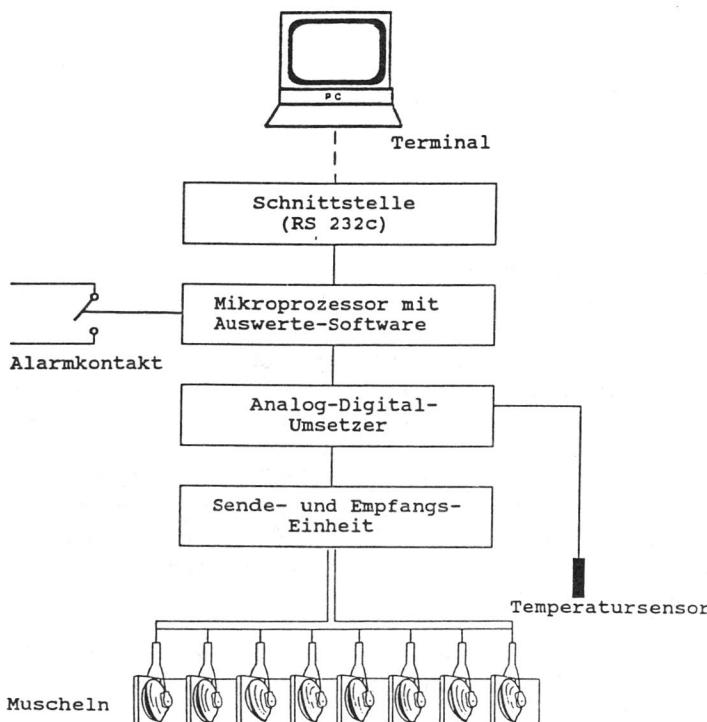


Abb. 2: Funktionsschema des biologischen Frühwarnsystems MOSSELMONITOR®

### Das Meßprinzip

Die Monitorfunktion basiert auf dem Erfassen und Auswerten von Änderungen im Muster der Schalenbewegung. Die eigentliche Meßgröße ist dabei der Abstand der beiden Schalenhälften zueinander. Die Abstandsmessung erfolgt unter Ausnutzung der elektromagnetischen Induktion. Das Sensorsystem besteht - für jede Muschel separat - aus zwei Koaxialkabeln, an deren Enden je eine kleine, wasserdicht verschlossene Spule angebracht ist. Während die eine Spule mit einem hochfrequenten Spannungssignal von einem Oszillator versorgt wird, ist die andere an eine entsprechende Empfängereinheit angeschlossen. Ist die Muschel, wie in Abb. 3 dargestellt, mit einer Schalenhälfte an einem Halter angebracht, dann wird die eine Spule auf die frei bewegliche Schalenhälfte der Muschel und die andere an den Halter geklebt. Werden nicht sessile Muschelarten eingesetzt, so wird die zweite Spule direkt

auf die andere Schalenhälfte der Muschel geklebt. Als Kleber wird ein nichttoxisches, schnellhärtendes Acrylat (GC Uni-Fast, G-C Dental Industrial Corp.) aus dem Dentalbereich verwendet. Wird durch eine der Spulen der hochfrequente Strom gesendet, so bildet sich um diese Spule ein Magnetfeld aus. Die Feldstärke ist in der Nähe des Spulenkörpers am größten und nimmt radial ab. Befindet sich die zweite Spule in dem Magnetfeld, so wird in ihr in Abhängigkeit von der vorhandenen Magnetfeldstärke eine Spannung induziert.

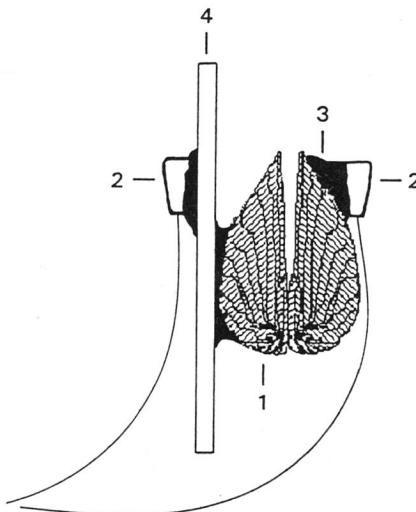


Abb. 3: Muschel mit angeklebtem Sensorpaar:  
1) Muschel, 2) Sensorpaar, 3) Dentalklebemasse und 4) Halterung.

Öffnet die Muschel ihre Schalen, so bewegt sich die darauf befestigte Spule mit. Die Entfernung zu der das Magnetfeld erzeugenden Spule nimmt zu, die Feldstärke des Magnetfeldes und damit die induzierte Spannung werden kleiner. Die Größe des erzeugten Spannungssignals steht im reziproken Verhältnis zum Abstand der beiden Spulen. Durch dieses Meßprinzip und dem im Gerät verwendeten Analog/Digital-Umsetzer wird eine hohe Auflösung der Messung erreicht. So werden Abstandsänderungen von weniger als 10  $\mu\text{m}$  erfaßt.

## Die Datenerfassung

Der Abstand der beiden Schalenhälften einer Muschel wird periodisch gemessen. Dabei sind Meßzyklen von 15 Sekunden bis 10 Minuten frei einstellbar. Voreingestellt ist ein Meßintervall von 1 Minute. Um eine vergleichende Auswertung der Schalenbewegungen der eingesetzten 8 Muscheln zu ermöglichen, berechnet die integrierte Software die aktuelle Schalenöffnungsweite in Prozent. Dies wird dadurch erreicht, indem die tatsächlichen - in einem zurückliegenden Zeitintervall ermittelten - minimalen und maximalen Abstände des Sensorpaars, die durch unterschiedlich große Muscheln und den Platzierungen der Sensoren von Muschel zu Muschel variieren, jeweils als Bezugswerte für 0% bzw. 100% genommen werden.

Das Messen und Auswerten der Schalenpositionen sowie das periodische Speichern von Minimum-, Maximum- und Durchschnittswerten erfolgt vollautomatisch über den eingebauten Mikrocomputer mit der integrierten Software. Datum und Uhrzeit werden ebenfalls vom Mikrocomputersystem erzeugt. Wird die Alarmschwelle erreicht, dann schließt automatisch der Alarmkontakt und die entsprechenden Daten werden in den Alarmspeicher eingetragen.

Nach dem Befestigen der Muscheln und Sensoren kann das Gerät direkt mit den vom Hersteller voreingestellten Parameter betrieben werden. Zur Änderung der Voreinstellungen oder zur Weiterverarbeitung der Daten kann über eine serielle Kommunikationsverbindung ein PC mit einem Terminal-Programm (Kommunikationssoftware, z.B. PROCOMM PLUS, von Datastorm Technologies Inc.) angeschlossen werden. Zwei mögliche Anwendungsfälle für den Anschluß eines Terminals sind zu unterscheiden:

a) kurzzeitige Verbindung mit einem PC

Nachdem die Verbindung hergestellt ist, erscheinen auf dem Computerbildschirm die Menüpunkte der systeminternen, leicht zu bedienenden Software. Der PC-Anschluß ist notwendig, damit beim Anbringen der Sensoren an die Muscheln - nach der Wahl des entsprechenden Menüpunktes - ständig Daten über den Abstand des Sensorpaars angezeigt werden, um die korrekten Klebepositionen bestimmen zu können. Ferner lassen sich die Parameter der einzelnen Auswertekriterien, anhand derer die Verhaltensänderungen ermittelt werden, einstellen. Es kann der Alarmspeicher ausgelesen werden, der alle aufgetretenen Alarme mit Datum und Uhrzeit enthält. In diesen Speicher wird periodisch auch die Nachricht über die korrekte Funktionstüchtigkeit des Mikrocomputersystems eingetragen. Ebenso können die berechneten Prozentwerte, die Aktivitätswerte (siehe Kap. 2.3) und die mittlere Schalenöffnungsweite aus den zurückliegenden Zeitintervallen angezeigt werden. Insbesondere für unbemannte Meßstationen oder für den direkten in-situ Einsatz können also regelmäßig oder im Alarmfall die wichtigsten Informationen beispielsweise mit einem Laptop abgerufen werden, ohne daß ein PC dauernd angeschlossen sein muß.

## b) permanente PC-Verbindung

Zusätzlich zu den unter a) aufgeführten Möglichkeiten bietet der ständige Anschluß eines Terminals den Vorteil, daß alle gemessenen Daten übertragen werden und auf dem PC-Bildschirm erscheinen. Im Abstand des eingestellten Meßintervalls werden Datum, Uhrzeit, die aktuellen Öffnungsweiten der Muscheln (wahlweise als absolute Werte oder in Prozent) und der Buchstaben-Code eines evtl. aufgetretene Alarmfalles sowie die Temperatur und die Batteriespannung an den PC gesendet und in einer Bildschirmzeile dargestellt. Darüber hinaus können die periodisch berechneten Daten wie die durchschnittliche Schalenöffnungsweite, die Schalenbewegungsaktivität und eine etwaige Alarmnachricht an den PC übertragen werden. Alle Daten können mit Hilfe des Terminal-Programms auch gespeichert werden und stehen so anderen Programmen (z.B. Graphik-Software) zur Verfügung. Vom Hersteller wird eine Präsentationssoftware angeboten, die neben der Speicherung der Daten auf Festplatte auch eine graphische On-line-Darstellung der Schalenbewegungen ermöglicht.

## Datenauswertung und Alarmauslösung

Das Meßsystem ermittelt die Distanz der beiden Schalenhälften jeder einzelnen Muschel. Zur Alarmauslösung wird die Änderung der Schalenöffnungsweite in ihrem zeitlichen Verlauf betrachtet. Auf das Vorhandensein von Schadstoffen wird anhand von drei Auswertekriterien geschlossen:

### Auswertekriterium "Schalen geschlossen"

Schließt eine Muschel ihre Schalen für länger als eine vorgegebene Zeitspanne und verhält sich eine bestimmte Anzahl weiterer Muscheln ebenso, dann ist die Bedingung für einen Alarm erfüllt. In dem durchgeführten Aufstockungsexperiment wurde eine 5minütige Zeitspanne mit der Forderung, daß 6 von 8 Versuchstiere die gleiche Reaktion zeigten, kombiniert.

### Auswertekriterium "Ansteigende Schalenbewegungsaktivität"

Eine Muschel öffnet und schließt ihre Schalen häufiger als es dem normalen Verhaltensmuster entspricht. Die Schalenbewegungsaktivität wird kontinuierlich in einem Intervall mit bestimmter, einstellbarer Dauer (in den Aufstockungsexperimenten 30 min) ausgewertet. Unter Aktivität wird die Änderung der Schalenposition zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen verstanden. Der Abstand zwischen den zwei Schalenhälften muß sich dabei um mindestens einen bestimmten, frei wählbaren Wert (hier 20%) ändern, damit diese Schalenbewegung als Aktivität gezählt wird. Erfolgt zwischen der aktuellen und der nächsten Messung eine weitere Abstandsänderung in die gleiche Richtung, so führt dies nicht zu einer Aktivitätsbewertung. Erst wenn die Schalenbewegung wieder in die andere Richtung erfolgt, kann erneut gezählt werden. Die Aktivitätsbewertung richtet sich hier also stets nach alternierenden Schalenbewegungen. Die aktuell ermittelte Aktivitätszahl wird ständig mit der Gesamtaktivitätszahl aus einem früheren Intervall verglichen. Der Vergleich kann dabei

mit Werten aus einem der 6 Intervalle vor dem aktuellen Auswertungsintervall durchgeführt werden. Die Länge der einzelnen Intervalle ist stets gleich und richtet sich nach der gewählten aktuellen Intervalldauer. Ist beispielsweise das aktuelle Auswertungsintervall auf 30 Minuten eingestellt, wird ein Vergleich mit einem bis zu 3 Stunden vor dem aktuellen Auswertungsintervall gelegenen Intervall möglich. Zwischen der aktuellen Auswertung und dem Referenzwert kann somit eine Zeitlücke (hier eine Intervalllänge) gelegt werden, was das Nichtbemerkern einer schleichenden Vergiftung verhindern soll. Damit ein Alarm ausgelöst wird, muß die Anzahl der ermittelten Aktivitäten im aktuellen Meßzeitraum um einen bestimmten, frei einstellbaren Betrag über der Gesamtaktivitätszahl des Vergleichsintervalls liegen und eine bestimmte Anzahl der Muscheln muß sich ebenso verhalten. Für die Aufstockungsversuche wurde als Alarmschwelle eine Aktivitätszahlerhöhung um 4 Aktivitäten festgelegt und mit der Forderung, daß 6 von 8 Muscheln ebenfalls diese Aktivitätserhöhung zeigten, kombiniert.

#### Auswertekriterium "Abnehmende Schalenöffnungsweite"

Der durchschnittliche Wert der Schalenöffnungsweite der einzelnen Muschel nimmt über einen längere Zeitraum aufgrund eines Schadstoffeintrages ab. Hierbei kann es sich einerseits um eine stetige Reduzierung, andererseits um einen sich neu einstellenden, mittleren Wert handeln. Die durchschnittliche Schalenöffnungsweite einer Muschel aus dem aktuellen Meßintervall kann mit dem ermittelten Wert eines der davorliegenden 6 Intervalle verglichen werden. Die Alarmauswertung erfolgt somit nicht wie beim vorherigen Alarmkriterium nach jeder Messung, sondern in den Abständen der gewählten Intervalllänge (hier alle 30 min). Die Länge der Intervalle kann, unabhängig von der Intervalllänge des vorherigen Alarmkriteriums, zwischen 15 und 120 Minuten gewählt werden. Ist der neue Schalenöffnungswert um eine bestimmte, einstellbare Prozentzahl (hier 20%) kleiner als der Referenzwert und zeigen mehrere Muscheln (hier 6 von 8) das gleiche Reaktionsmuster, dann wird ein Alarm ausgelöst.

Das Gerät wertet gleichzeitig die Schalenbewegung von den acht eingesetzten Muscheln aus. Bei der Alarmgebung ist besonders wichtig, daß eine genügende Anzahl von Muscheln nahezu gleichzeitig ein ähnliches Verhaltensmuster zeigt. Ebenso wird - mit Ausnahme des Alarmkriteriums "Schalen geschlossen" - stets das aktuelle Bewegungsmuster einer Muschel mit ihrem früheren Verhaltensmuster verglichen. Die einstellbaren Parameter, anhand deren Werte die Alarmbewertung erfolgt, bestimmen im wesentlichen die Empfindlichkeit des Biomonitor.

Werden die eingestellten Schwellenwerte überschritten, wird ein Alarm generiert (mit entsprechender Eintragung in den Alarmspeicher) und ein potentialfreier Alarmkontakt geschlossen. An diesem Alarmkontakt könnte beispielsweise ein optischer oder akustischer Alarmsignalgeber oder ein Probennehmer angeschlossen sein. Ist über die serielle Schnittstelle ein PC angeschlossen, so erfolgt unmittelbar die Alarmausgabe mit Datum und Uhrzeit auf dem Bildschirm. Für die Dauer des Alarmzustandes wird hinter den weiterhin erfaßten und übertragenen Öffnungsweiten ein Codebuchstabe für

den alarmauslösenden Parameter (z.B. ein "A" für "Ansteigende Schalenbewegungsaktivität") ausgegeben.

Zur Plausibilitätsüberprüfung der erzeugten Alarme kann über den angeschlossenen PC der Alarmspeicher ausgelesen werden, in dem sowohl Art, Beginn und Ende eines Alarms wie auch die Funktionsfähigkeit des Systems dokumentiert sind. Die berechneten Aktivitäts- und mittleren Schalenöffnungswerte sind ebenso wie die absoluten minimalen und maximalen Öffnungsweiten gespeichert und können betrachtet werden. Die Temperatur des Wassers wird in jedem Meßzyklus gemessen und kann ebenfalls zur Beurteilung eines Alarms herangezogen werden.

Zur Berechnung der Prozentwerte der Schalenöffnungsweite werden die aktuellen absoluten Öffnungsweiten einer jeden einzelnen Muschel automatisch auf ein stets neu ermitteltes Bezugswertpaar bezogen. Hierfür werden die in dem vorhergehenden Zeitraum (hier 1 Woche) gemessenen minimalen und maximalen Öffnungsweiten als neue Bezugswerte für den 0%- bzw. 100%-Wert verwendet. Langsame Änderungen der Umgebungsbedingungen (z.B. Temperatur oder Wachstum), die einen Einfluß auf die Schalenöffnungsweite der Muscheln haben, werden somit berücksichtigt und führen nicht zu eventuellen Fehlalarmen.

Neben den drei für die akute Gewässerüberwachung verwendeten Alarmkriterien gibt es noch ein viertes Kriterium, nämlich den "Tod der Muschel": Die Schalenhälften einer toten Muschel sind deutlich weiter geöffnet als die einer lebenden. Erkannt wird das Absterben des Testorganismus durch Vergleich des aktuellen Wertes mit dem Wert aus einem früheren Intervall. Dieses Kriterium hat für die schnelle Indikation einer Schadstoffwelle sicher eine untergeordnete Bedeutung. Selbst wenn der Tod einer Muschel durch einen entsprechendem Giftstoffeintrag verursacht wird, dauert es zu lange, bis das Ligament die beiden Schalenhälften um einen Wert, der deutlich über dem normalen Öffnungswert liegt, geöffnet hält. Die anderen Auswertekriterien hätten bis zu diesem Zeitpunkt längst Alarm ausgelöst. Auch ein loser Sensor könnte Ursache für einen vermeintlich zu großen Öffnungswert sein. Um die volle Funktionsfähigkeit des Systems zu gewährleisten, wird bereits bei einer toten Muschel ein Alarm erzeugt.

#### **Die Schalenbewegung von *Dreissena polymorpha* im Aufstockungsexperiment mit Natriumpentachlorphenolat**

Im Rahmen des F+E-Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" wurden in Koblenz im November 1992 Aufstockungsexperimente mit Natriumpentachlorphenolat (Merck-Schuchardt 820952) durchgeführt [42]. Da die Laborausführung des Muschelmonitors eine freie Anordnung der Versuchstiere erlaubt, konnten die mit Dentalkleber auf einem Glasstück befestigten Muscheln in einem nicht zum Schwimmraum gehörenden Teil des Fischtestbeckens (Koblenzer Verhaltensfischtest [43]) positioniert werden.

Die Chemikalienzugabe erfolgte in aufsteigender Konzentrationsreihe (geometrische Reihe mit dem Faktor 2). Dabei wurde pro Tag immer nur eine Konzentration getestet. Die nominalen Konzentrationen betrugen 120, 240 und 480 µg/L.

Vor der Zugabe der Testchemikalie und nach Abschluß der 30minütigen Testphase wurden die Meßdaten jeweils über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden aufgezeichnet. Die Schalenpositionen wurden minütlich erfaßt. Während der Testphase wurde das mit der Chemikalie kontaminierte Rheinwasser 30 Minuten lang im Kreislauf gepumpt. Die Daten vor dem Chemikalienversuch dienen als Bezugswerte für die Auswertung, die Werte nach dem Test vermögen eine verzögert auftretende Beeinträchtigung der Testtiere und die Rückkehr zum Normalverhalten zu dokumentieren.

Außerdem wurden neben der vom Testgerät aufgenommenen Temperatur auch der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt gemessen, da diese abiotischen Faktoren die Schalenbewegung von Muscheln beeinflussen [44,45].

Bei Rheinwasserdurchfluß halten die Muscheln ihre Schalen nahezu durchgehend geöffnet. Nur ab und zu, für kurze Momente, ist ein Schließen der Schalen zu erkennen. Die Öffnungsweiten liegen zwischen 55 und 95 % (Abb. 4).

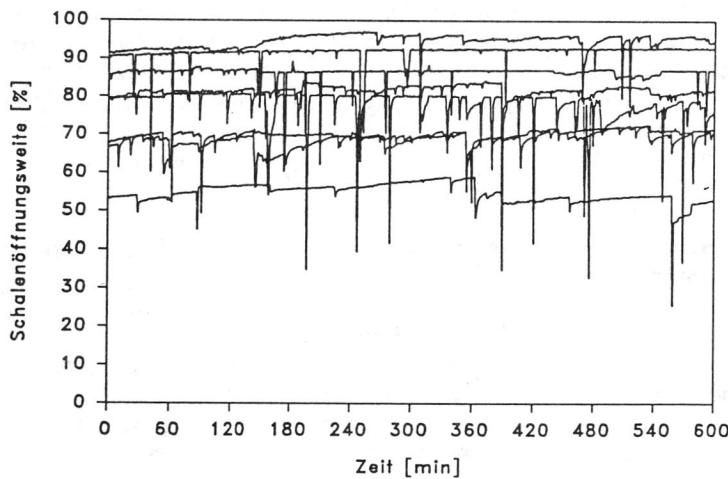


Abb. 4: Normalverhalten der Testmuscheln: prozentuale Schalenöffnungsweiten der 8 Testmuscheln über einen Zeitraum von 10 h.

Beim Durchfluß des mit 120 µg/L Natriumpentachlorphenolat angereicherten Rheinwassers ist weder eine Zunahme der Schalenbewegungsaktivität noch ein komplettes Schließen der Schalen zu beobachten. Die durchschnittliche Schalenöffnung jeder einzelnen Muschel (ermittelt in 30 Minuten Intervallen) ist jedoch um ca. 15 bis 33% gesunken. Kurze Zeit nach der Testphase werden die vor der Chemikalienzugabe eingenommenen Schalenöffnungsweiten wieder erreicht (Abb. 5).

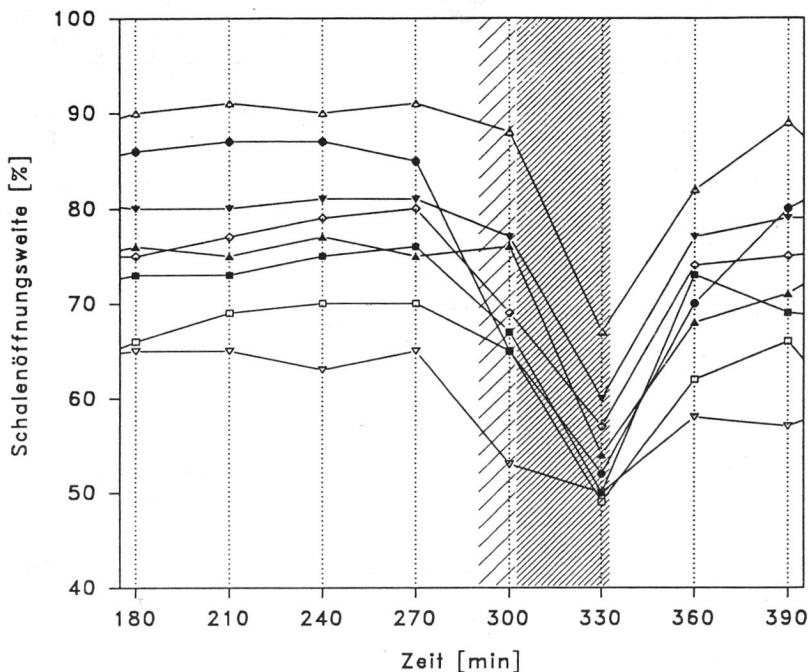


Abb. 5: Abnahme der mittleren Schalenöffnungsweite jeder Testmuschel bei Zugabe von 120 µg/L Natriumpentachlorphenolat. Der weit schraffierte Bereich markiert die Zeitspanne, in der das Testwasser kontinuierlich zugepumpt wurde. Anschließend wurde das Testwasser für 30 Minuten im Kreislauf durch das Testsystem gepumpt (eng schraffierter Bereich).

Eine sehr deutliche Reaktion zeigen die Muscheln auf den eingebrachten Schadstoff bei der Konzentration von 240 µg/L. Unmittelbar nach der Applikation öffnen und schließen die Muscheln ihre Schalen deutlich häufiger als in der Zeit davor (Abb. 6). Dieses Verhalten führte zur Alarmgebung, ausgelöst sowohl durch die ansteigende Schalenbewegungsaktivität als auch durch die Abnahme der mittleren Schalenöffnungsweite. Die vor der Chemikalienzugabe eingenommenen Schalenöffnungsweiten werden erst einige Zeit nach der Testphase wieder erreicht und die Schalenbewegungsaktivität normalisiert sich wieder.

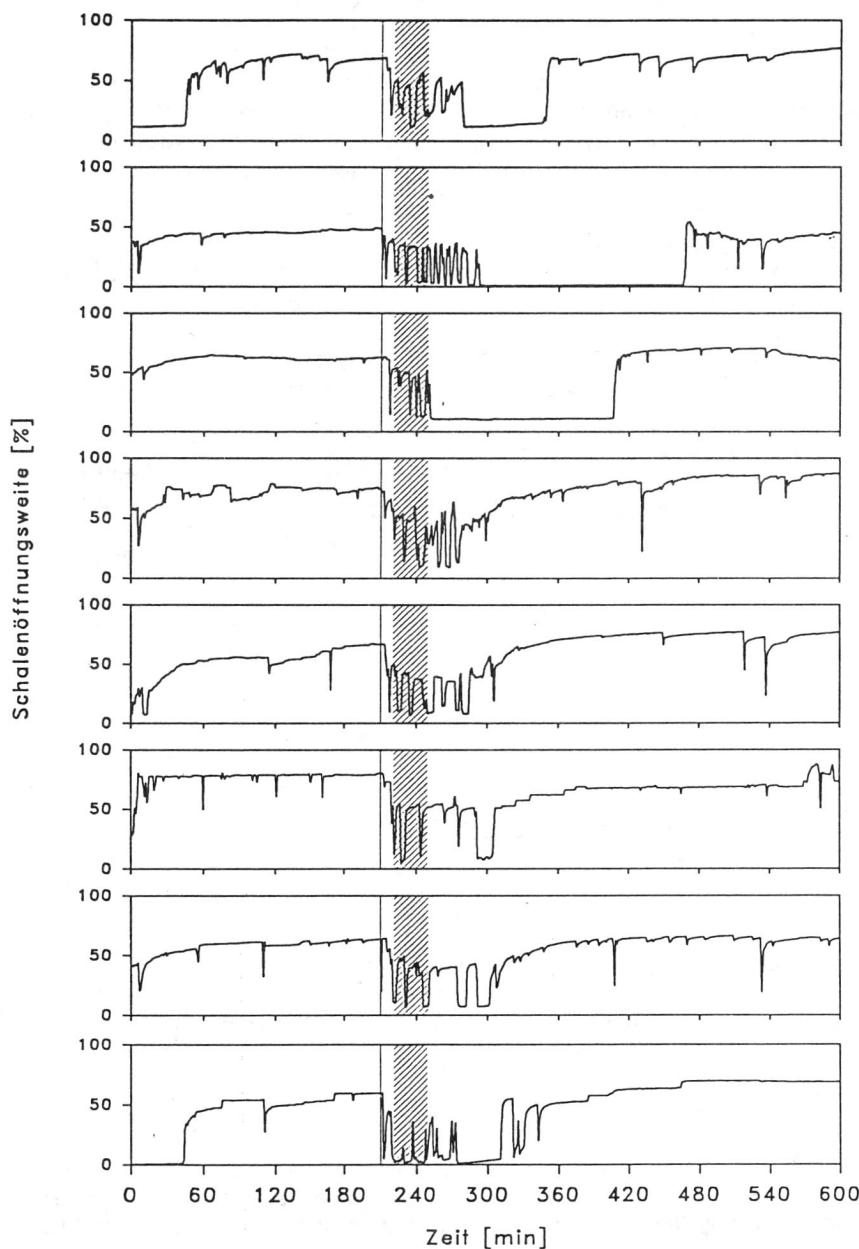


Abb. 6: Schalenbewegungsverhalten vor, während und nach Zugabe von 240 µg/L Natriumpentachlorphenolat. Für jede der 8 Testmuscheln ist die Schalenöffnungsweite über einen Zeitraum von 10 h aufgetragen. Der senkrechte Strich markiert den Beginn der Zupumpphase des Testwassers. Anschließend wurde das Testwasser für 30 Minuten im Kreislauf durch das Testsystem gepumpt (schräffierter Bereich).

Das Muster der Schalenbewegungen nach der Zugabe von 480 µg/L entspricht ungefähr dem bei 240 µg/L. Nach einer anfänglichen Zunahme der Schalenbewegungen haben sich allerdings die Zeitspannen, in denen die Muscheln ihre Schalen nahezu völlig geschlossen hatten, verlängert.

Die Muscheln wurden während der Aufstockungsexperimente nicht ausgetauscht. Trotzdem zeigten sie bei wiederholten Zugaben der Testchemikalien immer wieder ähnlich verlaufende Bewegungsmuster.

Dreikantmuscheln haben normalerweise ihre Schalen weit geöffnet, um Sauerstoff und Nahrung aufnehmen zu können (Abb. 4). Dafür ist ein die Muschel durchfließender Wasserstrom erforderlich, der bei Blattkiemern - zu denen die Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* gehört - durch den Cilienschlag des Kiemen- und Mantelepithels erzeugt wird. Dieser Wasserstrom führt der Muschel einerseits den zur Atmung notwendigen Sauerstoff, andererseits suspendierte Partikel, z.B. Plankton und Detritus, zu. Von Zeit zu Zeit dienen bei vielen Muschelarten spontane Schalenbewegungen dazu, den ausströmenden Wasserdurchfluß zu verstärken, um Pseudofaeces und Faeces zu entfernen [45]. Yonge [46] stellte diese "unerwünschte" Partikel ausstoßenden Schalenbewegungen auch an *Spisula subtruncata* fest. Bei der Auster *Ostrea edulis* ist ebenfalls ein ähnliches Schalenbewegungsmuster, wie es die Dreikantmuschel zeigt, zu erkennen. Auch bei der Auster ist ein mehr oder weniger regelmäßiges Schließen und wieder Öffnen der Schalen verbunden mit der Produktion von Pseudofaeces und dem Entfernen weiterer, nicht verwertbarer Partikel von den Kiemen und aus der Mantelhöhle [47]. Speziell im Fall der Dreikantmuschel könnte die Schalenbewegungsaktivität - insbesondere in der Zeit nach dem Ankleben der Muschel - auch durch die Bildung von Byssus-Fäden, mit denen sich die Muschel normalerweise auf festem Substrat anheftet, erklärt werden [14].

Das Ansteigen der Aktivität unter dem Einfluß eines Schadstoffes wird von Jenner [14] so gedeutet, daß die Muschel versucht, durch schnelle Schalenbewegungen ihre Mantelhöhle stärker durchströmen zu lassen, da eine hohe Wasseraustauschrate im Normalfall mit einer reinigenden Wirkung verbunden ist. Führt dieser Versuch nicht zum gewünschten Erfolg oder ist die schädigende Wirkung des Giftstoffes zu hoch, so bleibt der Muschel als letzte Möglichkeit nur noch das komplette Schließen der Schalen übrig, um ihr Inneres vor der toxischen Umgebung zu schützen.

Ist die Muschel einer hohen toxischen Konzentration ausgesetzt, dann ist es verständlich, daß sie zu ihrem eigenen Schutz die Schalen ganz schließt. Bei geringeren Verunreinigungen aber genügt es vielleicht schon, die Filtrationsrate zu senken oder ganz einzustellen, was nicht notwendigerweise bedeuten muß, daß die Schalen vollständig geschlossen werden. Untersuchungen an verschiedenen Muschelarten zeigten jedoch, daß eine Reduzierung der Filtrationsrate mit einer Abnahme der Schalenöffnungsweite korreliert [47,48]. Dies könnte die Reaktion der Dreikantmuscheln bei der Zugabe von nominal 120 µg/L Natriumpentachlorphenolat erklären, da auch die von Kramer [30] mit *Mytilus edulis* durchgeführten Versuche zeigten, daß eine Reduktion der durchschnittlichen Schalenöffnungsweite

insbesondere bei niedrigen (und über längere Zeitspannen wirkenden) Schadstoffkonzentrationen festzustellen ist.

Die hier gewonnenen Ergebnisse sind nicht mit den in Laborversuchen gewonnen [27,49] zu vergleichen, da Verluste durch Adsorption der Testchemikalie an den verwendeten Materialien der Testanordnung und an den vorhandenen Schwebstoffen - während der Aufstockungsversuche waren unterschiedliche und teilweise sehr hohe Schwebstoffkonzentrationen im Rhein - nicht ausgeglichen wurden. Eine antagonistische Wirkung von hohen Schwebstoffkonzentrationen, welche sich in einer verzögerten oder schwächeren Reaktion der Testtiere bemerkbar machte, konnte auch Borcherding (pers. Mittl.) bei seinen Aufstockungsversuchen mit dem "Dreissena-Monitor" beobachten. Während Slooff [27] in einem Laborversuch mit einer kleinen Gruppe von Dreikantmuscheln eine Nachweisgrenze von 140 µg/L Pentachlorphenol ermittelte, die wahrscheinlich darauf zurückführen ist, daß hier das Auswertekriterium der komplette Schalenschluß über einige Minuten war, konnte Jenner [14] in einem ähnlichen Versuch bereits bei 10 µg/L eine Aktivitätsänderung bei den exponierten Muscheln beobachten. Borcherding [49] konnte ebenfalls mit *Dreissena polymorpha* ein gesichertes Detektionslimit von 20 µg/L unter Laborbedingungen und 50 µg/L Pentachlorphenol in einem mit Rheinwasser durchgeführten Aufstockungsversuch nachweisen.

In den Niederlanden wurde eine Vielzahl von Chemikalienprüfungen, meistens in einem Standardmedium (Dutch Standard Water [50]), durchgeführt. Oftmals konnte anhand der aufgezeichneten Kurven festgestellt werden, daß schon bei geringeren Konzentrationen eine deutliche Änderung im Verhaltensmuster der Schalenbewegungen zu erkennen war. Aufgrund der eingestellten Alarmkriterien (z.B. 6 von 8 Muscheln müssen länger als 5 min geschlossen sein) wurden jedoch höhere Konzentrationen als Grenzwerte angegeben [31]. Ergebnisse von Chemikalienuntersuchungen, die von mehreren niederländischen Instituten mit Prototypen, Laborversionen oder der kommerziellen Ausführung des Muschelmonitors durchgeführt wurden, sind von de Zwart et al. [31] zusammengefaßt worden (Tab. 1).

Die in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Bewegungsmuster der Schalen durchaus von der Art und der Konzentration des Schadstoffes abhängig ist. Bei der Untersuchung von Abwasser ist es wichtig, die von Umgebungsparametern - wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Wasserhärte, Salzgehalt oder Schwebstoffe - herrührenden Effekte zu kennen, um diese von einer Schadstoffwirkung differenzieren und damit Fehlalarme begrenzen zu können. Auf der anderen Seite können aber auch gerade Abnahmen im Sauerstoffgehalt oder pH-Wert-Änderungen mit Giftstoffeinträgen in Verbindung stehen. Ein wichtiger abiotischer Faktor ist die Temperatur. So konnte Borcherding [49] eine signifikante Abhängigkeit der Schalenbewegungen von der Temperatur feststellen, und Jorgensen [44] beobachtete, daß Wasserdurchströmung und Schalenöffnung durch die Temperatur beeinflußt werden. Da allerdings Temperaturänderungen unter den natürlichen Bedingungen, in denen *Dreissena polymorpha* lebt, sehr langsame Vorgänge sind, sollten diese keinen Einfluß auf die Funktion des Biomonitor haben. Die für eine Alarmerzeugung kritische Aktivitätszahl wird ja immer durch die zuvor gemessene

Aktivität bestimmt. Eine langsam durch die Temperatur bewirkte Änderung der Schalenöffnungsweite wird durch die regelmäßige automatische Selbstjustierung des Systems ausgeglichen. Sollten kurzfristige Änderungen der Umgebungstemperatur - wie sie bei Einleiterüberwachungen auftreten können - einen Alarm auslösen, kann dieses mittels eingebauter Temperaturmessung erkannt werden.

Einen tageszeitlichen Rhythmus, wie ihn Borcherding [49] bei seinen Untersuchungen an einer Population von Dreikantmuscheln, insbesondere bei schlechten Futterbedingungen, feststellte, konnte bisher nicht beobachtet werden (vgl. auch [39]).

Substanz	Nachweisgrenze mg/l (nominal)		
	limnische Muscheln		marine Muschel
	Dreissena polymorpha	Unio pictorum	Mytilus edulis
Ammoniak			0.6
Cyanid (KCN)	0.4		
Selen (Selenit)	0.1		
Cadmium (CdCl <sub>2</sub> )	0.15		0.1
Kupfer (CuSO <sub>4</sub> )	0.01	0.01	0.005
Blei (PbCl <sub>2</sub> )	0.25		0.25
Zink (ZnCl <sub>2</sub> )	0.5		0.5
Atrazin	0.5	0.5	
Bentazon	0.75	0.75	
Chloroform	50.0 / 43.0*		
Chlorpyrifos	0.05	0.05	
1,3-Dichlorbenzol	11.0 / 1.4*		
Dichlormethan			150.0
Formaldehyd	150.0		10.0
Hexachlorbutadien	1.6 / 0.15*		
γ-Hexachlorcyclohexan	0.06		
Hypochlorit (Chlor)	0.04		0.005
Öl (dispergiert)			6.0
Pentachlorphenol	0.4 / 0.01*	0.01	
Phenol	15.0		
Tetrachlorkohlenstoff			2.5
Toluol	15.0 / 6.0*		
Bis(tributylzinn)-oxid, TBTO	0.006		0.01
Trichlorethylen	50.0 / 8.0*		
Xylol	1.0 / 16.0*		

Tab. 1: Nachweisgrenzen verschiedener Substanzen (Werte entnommen de Zwart et al. 1993 [31]. Die mit \* gekennzeichneten Werte sind Jenner et al. [14] entnommen).

## Praktische Erfahrungen mit dem Muschelmonitor

Aufgrund des vollautomatischen Betriebs des MOSSELMONITOR®-Systems beschränken sich die wöchentlichen Wartungsarbeiten auf das Säubern der verwendeten Durchflußbecken von Bewuchs und Schwebstoffablagerungen sowie einer visuellen Kontrolle der aufgeklebten Muscheln und Sensoren mit einem Arbeitsaufwand von insgesamt höchstens einer Stunde. Gelegentlich ist eine tote Muschel zu ersetzen. Der Umgang mit dem Muschelmonitor ist unkompliziert; die Software ist leicht zu bedienen und das Austauschen einer Muschel, d.h. das Ankleben des Tieres und der Sensoren, ist selbst für den ungeübten Benutzer innerhalb einer halben Stunde zu bewerkstelligen. Die Dreikantmuschel hat sich als ein äußerst robuster Testorganismus erwiesen. Nicht nur das Anbringen der Muscheln im Testsystem ist unproblematisch, auch sind bei Untersuchungen von natürlichen Gewässern keine besonderen Anforderungen an die Umgebung zu stellen. Das Testwasser muß im Normalfall weder gefiltert noch temperiert werden. Eine Fütterung ist bei solch einem Einsatz ebenfalls nicht notwendig, da die Muscheln ihre Nahrung aus dem Wasser selbst filtrieren. Die bisherigen Erfahrungen zeigen, daß die Muscheln über mehrere Monate hinweg einsatzfähig bleiben. Die Muschel schützt sich durch das Schließen ihrer Schalen vor einer stark toxischen Schadstoffwelle und kann im Extremfall (ebenso bei verminderten Sauerstoffgehalten durch Pumpenausfall) tagelang unter anaeroben Bedingungen weiter existieren und nach Rückkehr normaler Bedingungen weiter im Testsystem verbleiben. Sollten allerdings ständig stark belastete Gewässer überwacht werden (z.B. in der Nähe eines Einleiters), empfiehlt es sich, die Muscheln häufiger auszuwechseln. Slooff et al. [27] konnten zeigen, daß sich die Sensitivität von Muscheln beispielsweise auf Cadmium nach vorheriger 16tägiger Exposition in einem schwach cadmiumhaltigen Wasser (ca. 10% der mit unbelasteten Muscheln ermittelten niedrigsten effektiven Konzentration) um das 4fache verringert. Um derartigen Adaptationsprozessen entgegen zu wirken, ist ein häufigerer Austausch der Muscheln mit solchen aus möglichst unbelasteten Gewässern notwendig. Aufgrund der überschaubaren Anzahl von 8 Testorganismen ist der regelmäßige Austausch mit einem verhältnismäßig geringem Zeitaufwand durchführbar.

Der MOSSELMONITOR® erfüllt die an biologische Frühwarnsysteme gestellten Anforderungen im hohen Maße [51,52,53,54]. Die natürliche sessile Lebensweise der *Dreissena polymorpha* wird im wesentlichen beibehalten, dadurch wird die durch das Testsystem bedingte Streßsituation vermindert. Dies ermöglicht einen nahezu artgerechten Einsatz der Tiere als Überwachungsorganismen, mit denen eine schnelle und zuverlässige Indikation von Schadstoffen im aquatischen Bereich möglich sein sollte.

Die Arbeiten wurden vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit sowie vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert. Durchgeführt wurden sie im Rahmen des Forschungsvorhabens 0339299D "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins, Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination/Zentrale Auswertung".

## Literaturverzeichnis

1. GOLDBERG, E.D.; BOWEN, V.T.; FARRINGTON, J.W.; HARVEY, G.; MARTIN, J.H.; PARKER, P.L.; RISEBROUGH, R.W.; ROBERTSON, W.; SCHNEIDER, E. and GAMBLE, E.: The mussel watch. *Environmental Conservation* 5, 1978, 101-125
2. SCHULZ-BALDES, M.: Tiere als Monitororganismen für Schwermetalle im Meer - Ein Überblick. *Decheniana-Beihefte* (Bonn) 26, 1982, 43-54
3. Arge Elbe: Biologisches Effektmonitoring mit der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* in der Meßstation Schnackenburg. -Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe der Länder Hamburg - Niedersachsen - Schleswig-Holstein (ARGE Elbe). Wassergütestelle Elbe, Hamburg, 1991
4. IKSR: Anreicherung von Schadstoffen in Dreikantmuscheln: Dreikantmuscheluntersuchung der IKSR im Jahre 1988. Internationale Kommission zum Schutze des Rheins gegen Verunreinigung, Koblenz, 1989
5. PUTZER, D. und MATTER, L.: Zum Biomonitoring von Blei und Cadmium im Rheinabschnitt Köln-Nord - Duisburg - Emschermündung mit Hilfe der Süßwassermuschel *Dreissena polymorpha*. *VDI Berichte* 609, 1987, 177-187
6. KRAAK, M.H.S.; SCHOLTEN, M.C.T.; PEETERS, W.H.M. and de KOCK, W.C.: Biomonitoring of heavy metals in the western european rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 74, 1991, 101-114
7. KRAMER, K.J.M. and BOTTERWEG, J.: Aquatic biological early warning systems: an overview. In: D.W. Jeffrey et al. (eds.) *Bioindicators and Environmental Management*. Acad. Press, London, 1991, 95-126
8. BOTTERWEG, J.; VAN DE GUCHTE, C. en VAN BREEMEN, L.W.C.A.: Bio-alarmsystemen: een aanvulling op de traditionele bewaking van de waterkwaliteit. *H<sub>2</sub>O* 22, 1989, 788-794
9. MÄCKLE, H. und STABEL, H.-H.: Biogene - Einsatz und Auswirkungen im Wasserwerksbetrieb. In: Qualitätsüberwachung von Roh- und Trinkwasser - Messung, Analyse und Bewertung. Berichte aus Wassergütewirtschaft und Gesundheitsingenieurwesen, Technische Universität München, 1989, 175-188
10. SCHMITZ, P.; IRMER, U. und KREBS, F.: Einsatz kontinuierlicher Biotestsysteme zur Überwachung des Rheins. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene* 89, 1992, 233-246
11. VAN HOUT, P.: Sichere Überwachung von Flussystemen. *umwelt & technik* 10, 1992, 8-13

12. NUSCH, E.: Biologische Testverfahren - Aussagekraft und Grenzen der Übertragbarkeit. UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 5, 1993, 155-161
13. PEICHL, L. und SCHMIDT-BLEEK, F.: Biosonden zum Früherkennen von Umweltschäden. Umwelt. Z. des Vereins Deutscher Ingenieure für Immissionsschutz, Abfall, Gewässerschutz (Düsseldorf). Sonderausgabe Biotechnologie 4, 1986, 285-288
14. JENNER, H.A.; VAN AERSSEN, G.H.F.M. and TERWOERT, J.: Valve movement behaviour of the mussel *Dreissena polymorpha* and the clam *Unio pictorum* for use in an early warning system. In: D. Neumann and H.A. Jenner (eds.) *The Zebra Mussel Dreissena polymorpha. Ecology, Biological Monitoring and First Applications in Water Quality Management*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1992, 116-126
15. BORCHERDING, J.: Another early warning system for the detection of toxic discharges in the aquatic environment based on valve movements of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. In: D. Neumann and H.A. Jenner (eds.) *The Zebra Mussel Dreissena polymorpha. Ecology, Biological Monitoring and First Applications in Water Quality Management*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1992, 127-146
16. AKBERALI, H.B. and TRUEMAN, E.R.: Effects of environmental stress on marine bivalve molluscs. *Advances in Marine Biology* 22, 1985, 101-198
17. ABEL, P.D.: Effect of some pollutants on the filtration rate of *Mytilus*. *Marine Pollution Bulletin* 7, 1976, 228-231
18. AKBÉRALI, H.B. and BLACK, J.E.: Behavioural responses of the bivalve *Scrobicularia plana* (Da Costa) subjected to short-term copper (Cu II) concentrations. *Marine Environmental Research* 4, 1980, 97-107
19. SABOURIN, T.D. and TULLIS, R.E.: Effect of three aromatic hydrocarbons on respiration and heart rates of the mussel *Mytilus californianus*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 26, 1981, 729-736
20. HISCOCK, I.D.: Shell movements of the freshwater mussel *Hyridella australis* Lam. (Lamellibranchiata). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 1, 1950, 260-268
21. HIGGINS, P.J.: Effects of food availability on the valve movements and feeding behavior of juvenile *Crassostrea virginica* (Gmelin). I. Valve movements and periodic activity. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 45, 1980, 229-244
22. SALÁNKI, J. and VARANKA, I.: Effect of copper and lead compounds on the activity of the fresh-water mussel. *Annal. Biol. Tihany* 43, 1976, 21-27

23. SALÁNKI, J. and VARANKA, I.: Effect of some insecticides on the periodic activity of the fresh-water mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Acta biol. Acad. Sci. hung.* 29, 1978, 173-180
24. MANLEY, A.R. and DAVENPORT, J.: Behavioural responses of some marine bivalves to heightened seawater copper concentrations. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 22, 1979, 739-744
25. MARCEAU, F.: Recherche sur la morphologie, et l'histologie, et la physiologie comparées des muscles adducteurs des mollusques acéphales. *Arch. Zool. Exp. Gén. (Série 5)* 2, 1909, 295-469
26. DJANGMAH, J.S.; SHUMWAY, S.E. and DAVENPORT, J.: Effects of fluctuating salinity on the behaviour of the West African blood clam *Anadara senilis* and on the osmotic and ionic concentrations of the hemolymph. *Marine Biology* 50, 1979, 209-213
27. SLOOFF, W.; DE ZWART, D. and MARQUENIE, J.M.: Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 30, 1983, 400-405
28. DE ZWART, D. and SLOOFF, W.: Continuous effluent monitoring with an early warning system. In: B.E. Bengtsson, T.J. Norbert-King and D.I. Mount (eds.) *Effluent and Ambient Toxicity Testing in the Göta Älv and Viskan Rivers, Sweden*. Naturvårdsverket Rapport 3275, 1987, 20-21
29. JENNER, H.A.; NOPPERT, F. and SIKKING, T.: A new system for the detection of valve-movement response of bivalves. *Kema Scientific & Technical Reports* 7 (2), 1989, 91-98
30. KRAMER, K.J.M.; JENNER, H.A. and DE ZWART, D.: The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 188/189, 1989, 433-443
31. DE ZWART, D.; KRAMER, K.J.M. and JENNER, H.A.: Practical experiences with the biological early warning system "MOSSELMONITOR®". Sixth Int. Symposium on Toxicity Assessment and On-line Monitoring. Berlin, 10-14 May 1993, 1993
32. KINZELBACH, R.: The main features of the phylogeny and dispersal of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. In: D. Neumann and H.A. Jenner (eds.) *The Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*. Ecology, Biological Monitoring and First Applications in Water Quality Management*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1992, 5-17
33. WALZ, N.: Untersuchungen zur Biologie von *Dreissena polymorpha* PALLAS im Bodensee. *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 42, 1973, 452-482

34. SCHILLER, W.: Die Entwicklung der Makrozoobenthonbesiedlung des Rheins in Nordrhein-Westfalen im Zeitraum 1969-1987. In: R. Kinzelbach und G. Friedrich (Hrsg.) Biologie des Rheins. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1990, 259-275.
35. BLESS, R.: Beobachtungen zur Muschelfauna des Rheins zwischen Köln und Koblenz. *Decheniana* (Bonn) 134, 1981, 234-243
36. TITTIZER, T.; SCHÖLL, F. und SCHLEUTER, M.: Beitrag zur Struktur und Entwicklungsdynamik der Benthosfauna des Rheins von Basel bis Düsseldorf in den Jahren 1986 und 1987. In: R. Kinzelbach und G. Friedrich (Hrsg.) Biologie des Rheins. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1990, 293-323
37. NEUMANN, D.: Makrozoobenthos-Arten als Bioindikatoren in Rhein und seinen angrenzenden Baggerseen. In: R. Kinzelbach und G. Friedrich (Hrsg.) Biologie des Rheins. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1990, 87-105
38. NEUMANN, D. and JENNER, H.A. (eds.): The zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Ecology, biological monitoring and first applications in water quality management. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1992
39. WALZ, N.: The energy balance of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* PALLAS in laboratory experiments and in Lake Constance. *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 55, 1978, 83-105
40. KLEIN, R. und ALTMAYER, M.: The zebra mussel *Dreissena polymorpha* as a specimen in the Environmental Specimen Banking Programme of the Federal Republik of Germany. In: D. Neumann and H.A. Jenner (eds.) The Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*. Ecology, Biological Monitoring and First Applications in Water Quality Management. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1992, 255-262
41. FRIEDRICH, G.: Eine Revision des Saprobiensystems. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* 23, 1990, 141-152
42. KREBS, F.; BLESSING, B.; FRITZ-LANGEN, H.; BLÜBAUM-GRONAU, E.; HOFFMANN, M. und SCHMITZ, P.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins. Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination/Zentrale Auswertung. Forschungsbericht. Forschungsmaßnahme des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (0339299D). Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, 1994 (in Vorbereitung)
43. BLÜBAUM-GRONAU, E.; HOFFMANN, M.; SPIESER, O.H. und KREBS, F.: Der Koblenzer Verhaltensfischtest, ein auf dem Meßsystem BehavioQuant beruhender Biomonitor zur Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, 1994, dieser Band

44. JORGENSEN, C.C.B.: On the water transport through the gills of bivalves. *Acta Physiologica Scandinavica* 5, 1943, 297-304
45. FLÜGEL, H. und SCHLIEPER, C.: Der Einfluß physikalischer und chemischer Faktoren auf die Ciliaktivität und Pumprate der Miesmuschel *Mytilus edulis* L.. *Kieler Meeresforschungen* 18, 1962, 51-66
46. YONGE, C.M.: Cleansing mechanisms and the function of the fourth pallial aperture in *Spisula subtruncata* (Da Costa) and *Lutraria lutaria* (L.). *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 27, 1948, 585-596
47. DRINNAN, R.E.: An apparatus for recording the water-pumping behaviour of lamellibranchs. *Netherlands Journal of Sea Research* 2, 1964, 223-232
48. FAMME, P.; RIISGÅRD, H.U. and JORGENSEN, C.B.: On direct measurement of pumping rates in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 92, 1986, 323-327
49. BORCHERDING, J.: Die Schalenbewegung der Muschel *Dreissena polymorpha* als Monitorsystem zur Gewässerüberwachung. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene* 89, 1992, 361-373
50. NNI, Nederlandse Praktijkrichtlijn (NPR 6503): Benodigdheden, werkwijzen en medium voor het kweken van *Daphnia magna* en van de hiervoor als voedsel benodigde algen. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1980
51. KOEMAN, J.H.; POELS, C.L.M. and SLOOFF, W.: Continuous biomonitoring systems for detection of toxic levels of water pollutants. In: O. Hutzinger et al. (eds.) *Aquatic Pollutants: Transformation and Biological Effects*. Pergamon Press, Oxford, 1978, 339-347
52. CAIRNS, J. Jr. and VAN DER SCHALIE, W.H.: Biological monitoring Part I - Early warning systems. *Water Research* 14, 1980, 1179-1196
53. CAIRNS, J. Jr. and GRUBER, D.: A comparison of methods and instrumentation of biological early warning systems. *Water Resources Bulletin* 16, 1980, 261-266
54. DIAMOND, J.; COLLINS, M. and GRUBER, D. (1988) An overview of automated biomonitoring - past developments and future needs. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.) *Automated Biomonitoring: Living Sensors as Environmental Monitors*. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988, 23-39



R. Gerresheim

## Zusammenfassung

Die Beurteilung der Güte eines Abwassers erfolgt aus biologischer Sicht auch durch die Kontrolle der Wachstumshemmung die auf Algen ausgeübt wird. Die Automatisierung und Miniaturisierung dieses Testes ermöglicht es, mehr Proben als bisher auf gleicher Fläche zu messen. Mit einer standardisierten Beleuchtungseinrichtung ist eine gute Reproduzierbarkeit des Wachstums der Algen schnell und einfach zu erreichen. Die Auswertesoftware erlaubt eine einfache Auswertung der Meßergebnisse.

## Summary

Waste water quality may be evaluated under biological aspects by measuring its inhibitory effect on the growth of algae. The automation and miniaturization of the growth inhibition test permits measurement of a higher number of samples than hitherto using the same space. A good reproducibility of algal growth can be rapidly and easily achieved by installing standardized lighting. The software used for the evaluation of the measuring results is easy to apply.

## Einleitung

Die Qualität eines Abwassers wird anhand vieler Parameter bestimmt. Neben den physikalischen und chemischen Kriterien werden auch verschiedene biologische Testverfahren angewendet um ein Abwasser in seiner möglichen Schadwirkung für die Umwelt zu klassifizieren. Algen werden dabei schon seit längerer Zeit als kleinste Vertreter der Pflanzen für die Abwasserbeurteilung verwendet, zeigen sie doch, bedingt durch ihr großes Oberfläche/Masse-Verhältnis, am ehesten eine mögliche Schadwirkung für die Fauna eines Gewässers an.

Als Maßzahl verwendet die DIN das Wachstum der Algen. Bestimmte Stoffe können in Abhängigkeit von ihrer Konzentration die Biomasseproduktion hemmen. Die Algenbiomasseproduktion wird gemessen über die Chlorophyll-a-Fluoreszenz: Grüne Pflanzen fangen mit Hilfe ihres aus Chlorophyll-Molekülen bestehenden Pigmentsystems sichtbares Licht ein, dessen Energie an den photosynthetischen Apparat abgegeben wird. Dieser wandelt sie in chemisch gebundene Energie um (Biomasse). Die Umwandlung von Lichtenergie in chemisch gebundene Energie geschieht jedoch nicht vollständig, ein Teil dieser Energie wird vom Pigmentsystem als rotes Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 685 nm abgestrahlt.

Für die Ermittlung des GA-Wertes, der Verdünnungsstufe ab der das Wachstum einer Algensuspension um nicht mehr als einen bestimmten, tolerierten Betrag (20%) gehemmt wird, werden viele verschiedene Verdünnungsstufen des betreffenden Abwassers mit einer Algensuspension und Nährösung versetzt und unter genau definierten Bedingungen 3 Tage inkubiert. Anschließend wird das Wachstum der einzelnen Verdünnungsstufen verglichen mit dem Wachstum einer Algensuspension der kein Abwasser zugegeben wurde. (Näheres zur Zusammensetzung der Verdünnungsstufen und der Nährösung s. DIN).

### Messaufbau

Der Messaufbau zur Bestimmung der Algenfluoreszenz ist in der nachstehenden Abbildung 1 schematisch dargestellt.

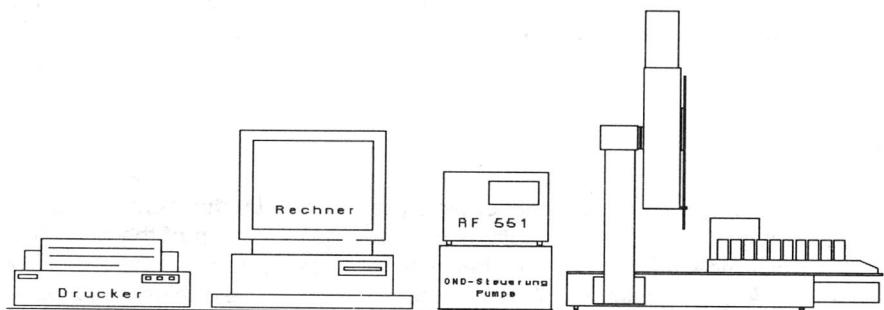


Abb. 1: Schematischer Meßaufbau zur Bestimmung der Algenfluoreszenz

Zentraleinheit der Messeinrichtung ist der Shimadzu Fluoreszenzdetektor RF-551. Ausgerüstet mit einer speziellen Durchflußküvette können die Suspensionen schnell und zuverlässig gemessen werden. Eine Sammellinse fängt das durch die Algensuspension stark gestreute Fluoreszenzlicht ein und leitet es zum Detektor. Die Probenzuführung geschieht über einen speziell für die Messung entwickelten Probengeber. Die Probengestele aus der Inkubationseinrichtung können dabei direkt auf den Probengeber aufgesetzt werden. Damit ist ein erneutes plazieren und die damit verbundene Gefahr der Verwechslung der Proben nicht mehr gegeben. Während der Messung werden die Algen mit Hilfe eines Vielfach-Magnetrührers in Suspension gehalten.

## **Beleuchtung**

Die Beleuchtung der Verdünnungsstufen geschieht in einem Inkubationsschrank der Platz für 2 Probengestelle bietet. Die in der DIN vorgeschriebene Beleuchtungsintensität wird in Höhe der Probengestelle exakt eingehalten. Dies wird unter anderem durch weiße Seitenwände und ein weiß gefärbtes Probengestell erreicht. Die Abdeckplatte, die zur Verringerung der Verdunstung die Gefäße nach oben abschließt, ist aus durchsichtigem Kunststoff. Die Proben werden über eingebaute, steuerbare Magnetrührer in Suspension gehalten und über ein Wasserbad mit Umlämppumpe exakt temperiert.

Die Steuerung des Inkubationsschrankes geschieht über eine einheitliche Bedienoberfläche. Die Magnetrührer können getrennt angesteuert werden. Dabei kann eine Rührzeit von 0 bis 10 Minuten eingestellt oder auf Dauerbetrieb gestellt werden. Ebenfalls einstellbar ist eine Pausenzeit von 0-10 Minuten.

Für die Inkubation bewährt hat sich eine kurze Rührzeit, gefolgt von einer mehrminütigen Pausenzeit. Damit wird wirksam ein Absetzen der Algen verhindert, auf der anderen Seite aber eine Zerstörung der Algen durch zu langes oder zu intensives Rühren verhindert. Auch besteht dann nicht die Gefahr, dass Algen an der Flüssigkeitsoberfläche an der Gefäßwand anhaften.

## **Auswertung**

Die Besonderheit bei der Auswertung dieses Testes besteht darin, daß zu 2 verschiedenen Zeitpunkten Daten gemessen werden müssen. Die Daten der ersten Messung müssen dann zum Zeitpunkt der zweiten Messung wieder zur Verfügung stehen, da sie für die Berechnung der Hemmwirkung benötigt werden.

Zum Testbeginn werden die Eigenfluoreszenz der unverdünnten Abwasserprobe und die Fluoreszenz der Kontrollproben gemessen. Übersteigt die Eigenfluoreszenz dabei einen bestimmten Betrag muß dies mit berücksichtigt werden. Nach 3 Tagen Inkubationszeit wird die Fluoreszenz der Verdünnungsstufen der Abwasserproben und der Kontrollproben gemessen. Die Fluoreszenz der Kontrollproben muß dabei mindestens um den Faktor 30 gestiegen sein.

Während der Messung zeigt eine Grafik an, welche Position auf dem Probengeber gerade ausgemessen wird. Gleichzeitig wird der Messwert graphisch dargestellt. Erkennt das Programm, dass der Messwert stabil ist, wird die Messung beendet und die nächste Probe ausgemessen. Ist der Messwert für die vorgegebene Diagrammskalierung zu klein, erfolgt nach 10 Sek. automatisch eine Reskalierung auf ca. die doppelte Höhe des zuletzt gemessenen Wertes. Damit befindet sich der Messwert in der Mitte der Grafik und es ist noch ausreichend Raum zur Verfügung für eventuell sich ändernde Werte bis zum Ende der Messung.

Überschreitet der Fluoreszenzwert den Meßbereich, wird vom Programm automatisch die Empfindlichkeit des Detektors verringert. Der dann gemessene Fluoreszenzwert wird dann mit dem vorher bestimmten, exakt ausgemessenen Faktor, multipliziert der dem Empfindlichkeitsunterschied entspricht.

Alle Meßwerte einer Probe werden mit Mittelwert und Variationskoeffizient in einer kleinen Tabelle auf dem Bildschirm angezeigt.

Aus den Fluoreszenzwerten der einzelnen Verdünnungsstufen werden die jeweiligen Hemmwirkungen errechnet. Das Programm bestimmt danach automatisch die Verdünnungsstufe bei der die Hemmwirkung kleiner als 20% ist. Dabei wird auch eine eventuelle, mehrfache Unterschreitung des Grenzwertes berücksichtigt und dann die größte Verdünnungsstufe angegeben.

Alle Meßergebnisse sowie die Auswertung des Testes (Gültigkeit, GA-Wert) können auf dem Bildschirm oder als Textdatei ausgegeben werden. Auf einem Drucker erfolgt ein vollständiger Protokollausdruck.

### Linearitätstest

Die wohl wichtigste Voraussetzung für die Messung überhaupt ist der lineare Zusammenhang zwischen der Zellzahl der Algen und der Fluoreszenz. Zu berücksichtigen ist dabei insbesondere, daß sich der Messbereich über mehrere Zehnerpotenzen erstreckt. Grundvoraussetzung ist daher eine sehr gute Linearität des Detektörs.

Abb. 2 zeigt, daß das System in der Lage ist, von sehr niedrigen Algenkonzentrationen bis hin zu extrem hohen Konzentrationen zu messen.

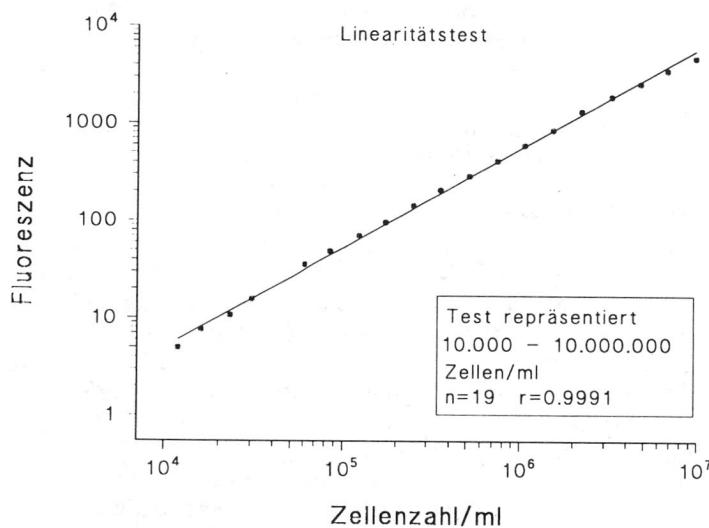


Abb. 2: Graphische Darstellung einer Linearitätstsmessung mit dem Testsystem

# Das BIOSENS-Algentoximeter in der Gewässerüberwachung

Udo Noack und Jürgen Walter

## Zusammenfassung

Für Daueruntersuchungen am Gewässer eignet sich das automatisierte Biosens-Algentoximeter, das quasikontinuierlich algentoxische Effekte detektiert und Gewässeralarmfälle per Datenfernübertragung übermittelt. Mit dem kompakten Biosens-Algentoximeter AT01, das aus den Einheiten Fluorosensor, Algenkulturautomat und MSR-Computer besteht, lassen sich Herbizide schnell und zuverlässig im ppb-Bereich nachweisen, wie Versuche in Daueruntersuchungen am Rhein gezeigt haben.

Das Meßprinzip des Biosens-Algentoximeters basiert auf der Anregung der Chlorophyll-Moleküle in den Algen mit energiereichem Licht (435 nm) sowie der Detektion der damit verbundenen charakteristischen in vivo-Fluoreszenz (685 nm). Das Ausmaß der Fluoreszenzemission ist jedoch erheblich vom physiologischen Zustand der Algen abhängig. So emittieren vitale und intakte Algen nur geringe Mengen an Fluoreszenz, während geschädigte und absterbende Algen eine signifikant höhere Fluoreszenzemission aufweisen. Aus der Intensitätsänderung der spontanen Fluoreszenz kann auf algengiftige Schadstoffe geschlossen werden.

Exemplarisch werden Ergebnisse von Aufstockungsexperimenten mit Herbiziden von Schadstoffwellen und Alarmfällen (Synchronalarm) in Meßstationen am Rhein sowie von Stoffprüfungen an unterschiedlichen Algenspezies vorgestellt und diskutiert.

Gegenüber der personal- und kostenintensiven chemischen Analytik, die nur punktuell durchgeführt werden kann, liegen die Vorteile des Algentoximeters als Frühwarnsystem in der kontinuierlichen Messung.

## Summary

The automated Biosens algae toximeter is suitable for permanent use in waters. Toxic effects on algae are detected in a quasi-continuous mode and cases of alarm are transmitted by remote transmission of data. With the compact Biosens algae toximeter AT01 consisting of the units, fluorosensor, algal culture automat, and MSR computer, herbicides can be rapidly and reliably detected in the ppb range, as has been demonstrated by continuous operation tests along the Rhine river.

The measuring principle of the Biosens algae toximeter is based on the excitation of algal chlorophyll molecules using light rich in energy (435 nm) and the detection of the

resulting characteristic in vivo fluorescence (685 nm). The extent of fluorescence emission, however, largely depends on the physiological state of the algae. Thus, viable and intact algae will emit only small amounts of fluorescence while algae which have been damaged or are dying show a significantly increased emission of fluorescence. The change of intensity in spontaneous fluorescence indicates the presence of contaminants which are toxic for algae.

As an example, results are presented and discussed which have been obtained from standard addition experiments with herbicides in cases of contaminant waves and alarm (synchronous alarm) at measuring sites along the Rhine river as well as the testing of substances in various algal species.

As compared to methods of chemical analysis which require high expenditure on staff and equipment and which are restricted to defined sites, the algae toximeter is an early warning system whose advantages are those of continuous measurement.

## **Einleitung**

Die Belastung unserer Gewässer mit wassergefährdenden Stoffen führt zu einem steigenden Bedarf an kontinuierlichen Meßverfahren. Für die Schnellindikation von Herbiziden ist das ALGENTOXIMETER der Fa. Biosens, Hildesheim (Abb. 1) geeignet, das quasikontinuierlich für ein Effektmonitoring in Gewässerüberwachungsstationen eingesetzt werden kann. Unter dem Einfluß von algiziden Wasserinhaltsstoffen zeigen vitale Algen eine charakteristische Änderung in der Chlorophyll-Fluoreszenzemission [1].

Entscheidend für eine Überwachung ist die völlige Automatisierung der Messungen. Im Algentoximeter wird durch einen MSR-Computer der Meßzyklus in einem Zeitintervall von 20 Minuten permanent wiederholt. Die Meßdaten werden an einen Zentralrechner in der Station gegeben und per Datenfernübertragung übermittelt.

Als biologischer Sensor dienen einzellige Grünalgen, die im Algentoximeter in einem integrierten Turbidostat bereitgehalten werden. Eine Algensuspension von *Chlamydomonas reinhardtii* wird in dem Turbidostat über einen Zeitraum von 14 Tagen in einem konstanten physiologischen Zustand gehalten. Infolge einer Temperatur- und Nährstoffkonstanz sowie gleichbleibender Lichtqualität, wird eine hohe Sicherheit in der Reproduzierbarkeit von photosynthesehemmenden Effekten in Gewässern oder Abwasserströmen erreicht.

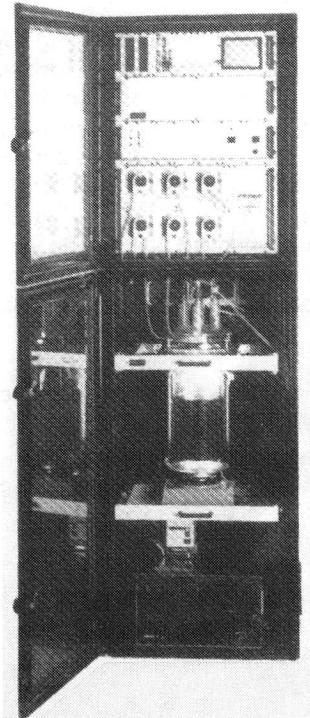


Abb. 1 BIOSENS-Algentoximeter

## **Methode**

### **Funktionsweise des Biomonitor**

Das Meßprinzip des Algentoximeters basiert auf der Anregung des Chlorophyll a mit energiereichem monochromatischen Licht (435 nm) sowie der Detektion der damit verbundenen charakteristischen in vivo-Chlorophyll a-Fluoreszenz (685 nm). Mit Hilfe optoelektronischer Methoden ist es möglich, die Fluoreszenz quantitativ über die Intensität zu erfassen und zu normieren [2,3,4].

Chlorophyll a dient zur Aufnahme von Lichtenergie für die Photosynthese. Ein Teil der aufgenommenen Energie wird aber auch wieder in Form von Wärme und Fluoreszenz abgestrahlt (Abb.2). Das Ausmaß der Fluoreszenzemission ist jedoch erheblich vom physiologischen Zustand der Algen abhängig. So emittieren vitale und intakte Algen nur eringe Mengen an Fluoreszenz, während geschädigte und absterbende Algen eine wesentlich höhere Fluoreszenzemission aufweisen. Diese Tatsache, daß in Abhängigkeit von bestimmten Schadstoffen die Fluoreszenz spontan erhöht wird, ist die Grundlage des Toximeter-Prinzips.

Im Algentoximeter werden Testalgen z.B. der Art *Scenedesmus subspicatus* aus einem Kulturautomaten in eine Glasküvette dosiert und dort mit dem zu untersuchenden Wasser im Verhältnis 1:2 kontaminiert. Nach einer definierten Dunkelphase (10 min) werden sie mit energiereichen Lichtblitzen (Xenon-Hochdruckblitzröhre) bestrahlt und die Chlorophyllfluoreszenz-Emission detektiert.

Infolge einer Schadstoffintoxikation steigt die prompte Chlorophyll-Fluoreszenz signifikant an. Zur Effektbewertung wird dann die *in vivo*-Chlorophyll a-Fluoreszenz mit der Chlorophyll-Fluoreszenz nach Intoxikation verrechnet. Mit einem geeigneten Algorithmus kann dann nach einer Grenzwertüberschreitung ein Gewässeralarm gemeldet werden.

Eine Erhöhung der Chlorophyllfluoreszenz kann aber auch durch physiologische Faktoren induziert werden, wie Seneszenz, Schädigung oder Stress [5,6,7].

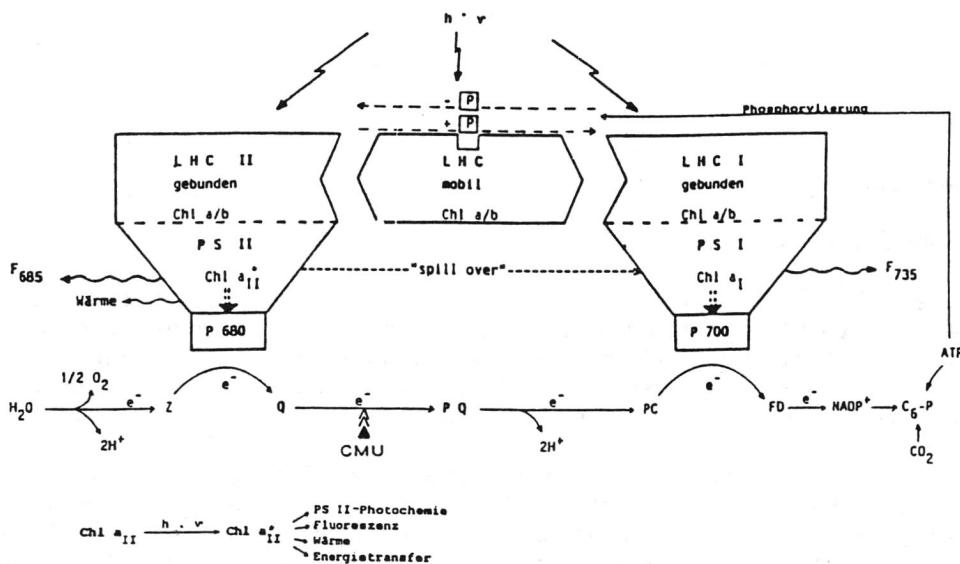


Abb.2: Schematische Darstellung zum Energietransfer, zur Fluoreszenzemission und zum Angriffsort des Herbizids CMU in der Elektronentransportkette [8]

## Fluorosensor

Die Fluoreszenzmeßeinrichtung umfaßt eine Xenon-Hochdruck-Blitzlampe zur Impulslichtanregung bei 435 nm und eine Silizium-Photodiode zur Detektion des Fluoreszenzsignals bei 685 nm. Die Fluoreszenzmessung wird in einer offenen Glasdurchflußküvette durchgeführt.

Es wird eine Blitzfolge von 8 Einzelblitzen in einem Abstand von 8 sec ausgelöst (Dauer eines Blitzes ca. 1 ms). Kurz nach Zündung des Blitzes (0,5-2,5 ms später) erfolgt die Detektion des Fluoreszenzsignals.

Zu Beginn der Blitzfolge (Blitz 1-3) ist ein Intensitätsmaximum zu verzeichnen, dem sich ein Abklingen der Fluoreszenzintensität anschließt, die dann ein stationäres Niveau erreicht. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgt in diesem stationären Bereich als Mittelwert aus den Fluoreszenzintensitäten der Blitze F4 bis F8 [9,10].

## Algenkulturautomat

In einem doppelwandigen 4 L Glas-Fermenter wird die Grünalge nach einem turbidostatischen Verfahren kultiviert. Die Algen befinden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Kultivierung erfolgt unter ständigem Rühren, Belüftung, Temperierung (17 [°C]) und Dauerbeleuchtung mit 2 Leuchtstoffröhren (L8 W/25). Schlauchpumpen übernehmen das Fördern von Kultursuspension, Probenwasser, Leitungswasser zum Spülen sowie das Abpumpen des Testgemisches.

## Testorganismen

Die Testorganismen werden im integrierten Kulturautomaten gehältert (Turbidostat). Die Kultur wird über einen Thermostaten konstant temperiert. Die Durchmischung der Kultur erfolgt mit Hilfe eines Magnetrührers. Die Beleuchtung der Kultur erfolgt über 2 Leuchtstoffröhren mit einer Belichtungsstärke von ca. 25  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Folgende Algenarten sind für die Kultivierung geeignet:

<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Zelldichte ca.1,0 · 105 [N/mL]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Zelldichte ca.2,2 · 105 [N/mL]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Zelldichte ca.2,2 · 105 [N/mL]

Für *Scenedesmus subspicatus* sowie *Chlorella vulgaris* wird Nährmedium nach KUHL, für *Chlamydomonas reinhardtii* Nährmedium nach KNOB verwendet. Die Algen sind ganzjährig konstant verfügbar.

## **MSR-Computer**

Der MSR-Computer steuert den Ablauf der Meßzyklen (Gesamtdauer pro Zyklus 20 min). Jeder Meßzyklus besteht aus 3 Meßvorgängen, die durch Spülvorgänge getrennt sind:

- Meßvorgang 1: Messung der Fluoreszenzintensität der Wasserprobe
- Meßvorgang 2: Messung der Fluoreszenzintensität der Algenkultur
- Meßvorgang 3: Messung der Fluoreszenzintensität des Tests (= Wasserprobe + Algenkultur)

Nach jedem Meßzyklus werden die Daten automatisch auf 720 kByte-Disketten (3,5") gespeichert und an einen zentralen PC weitergeleitet. Alternativ kann eine Datenfernübertragung angeschlossen werden. Die Dunkelphase/Einwirkzeit kann auf 10 bis 20 min eingestellt werden, der Meßzyklus verlängert sich dadurch auf 30 Minuten.

## **Meßablauf und Automatisierung**

Der gesamte Meßablauf wird über einen MSR-Computer gesteuert. Aufgrund der völligen Automatisierung sämtlicher Arbeitsschritte wird eine Standzeit von 14 Tagen gewährleistet. Das Biosens-Algentoximeter erfaßt die Fluoreszenzsignale über einen Photodetektor. Es wird die nach der Anregung der Chlorophyllmoleküle durch die Blitzlampe emittierte Fluoreszenz über einen Zeitraum von 2 ms gemessen. Mit einem Abstand von 8 sec werden 8 Blitze ausgelöst. Die vom Photodetektor gemessenen Signale in Millivolt werden von einem Analog/Digital-Wandler in einen Zahlenwert umgewandelt und als Rohdaten auf einer Diskette abgespeichert.

Nacheinander werden die leere Küvette (nur ein Blitz), Wasserprobe, Algenkultur und Test (Kultur + Probe) nach diesem Schema vermessen. Außerdem werden Datum und Uhrzeit abgespeichert. Zur ET-Wert-Berechnung werden die Mittelwerte (F4 - F8) jeder Meßreihe herangezogen. Dazu wird rechnerintern ein geeigneter Algorithmus benutzt [10,11].

## **Auswertung und Störfallmeldung**

Anhand der Einzelmessungen vor und nach Applikation der Wasserprobe sowie von Vergleichsmessungen wird aus der unterschiedlichen Chlorophyll-Fluoreszenzemission für die zu untersuchende Wasserprobe, die Algenkultur und die Testprobe die "Effektive Toxizität" in Prozent nach (1) errechnet:

$$ET [\%] = \frac{FT - FP - FK}{FT - FP} \times 100 \quad (1)$$

FT; Test-Fluoreszenz (nach Applikation der Wasserprobe zur Algenkultur)

FP; Fluoreszenz der Wasserprobe (algenbürtige bzw. stoffspezifische "Eigenfluoreszenz")

FK; Fluoreszenz der Algenkultur

Dauermessungen weisen natürlicherweise ein Oszillieren der Fluoreszenz um einen Grundzustand auf, der als Basislinie definiert wird (Abb.3). Mit statistischen Mitteln lassen sich dann Grenzwertüberschreitungen, die durch Schadstoffe induziert wurden, von systemimmanenten Fehlern und der gewässerspezifischen Schwankungsbreite unterscheiden. Dazu wird aus einer genügenden Anzahl von Messungen der gleitende Mittelwert gebildet. Weichen zwei der nächsten aufeinanderfolgenden Meßwerte um mehr als die 3-fache Standardabweichung ( $3\sigma$ ) von diesem Mittelwert ab, so wird von einem "Störfall" gesprochen. Die Wahrscheinlichkeit eines Fehlalarms beträgt bei dieser Vorgehensweise 1:10 Jahre.

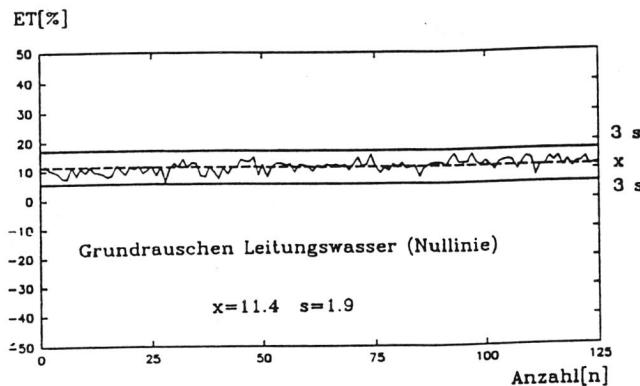
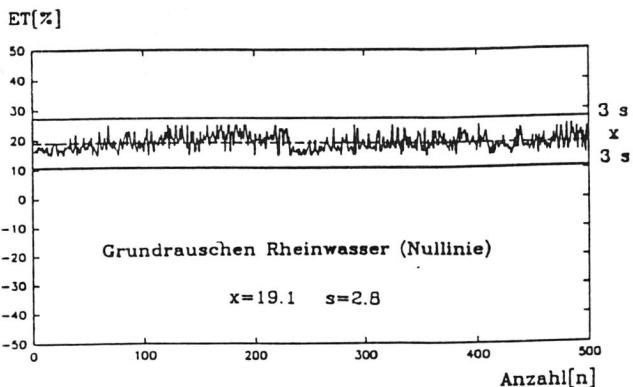


Abb.3: Grundrauschen bei Messungen mit Leitungswasser (a)  
und mit Rheinwasser (b), BIOSENS-Algentoximeter

## **ET-Wert**

Zur Bewertung einer Schadstoffintoxikation wird die Zunahme der Chlorophyllfluoreszenz nach einer bestimmten Einwirkzeit herangezogen. Die Fluoreszenzparameter in [relativen Einheiten] werden als ET-Wert berechnet, der die Erhöhung der Fluoreszenzintensität in [%] beschreibt (1). Die Erhöhung der Algenfluoreszenz infolge einer Inhibition der photosynthetischen Elektronentransportkette durch Herbizide wird hier zur Störfallerkennung herangezogen [3].

## **Nulleffekt**

Zur Bestimmung des Nulleffektes wurden Leermessungen ohne Schadstoff durchgeführt. Die Messungen erfolgen über einen Zeitraum, der eine statistisch abgesicherte Anzahl von Meßwerten liefert und in etwa dem Austauschintervall der Testorganismen (Erneuerung der Kultur) entspricht. Damit werden Schwankungen im physiologischen Zustand der Organismen über ihren Einsatzzeitraum berücksichtigt. Verändert sich bei einem Testverfahren die Normalaktivität (Aktivität ohne Schadstoffeinfluß) der Organismen im Laufe der Zeit, so muß mit dynamischen Grenzwerten gearbeitet werden. Als momentane Normalaktivität wird dabei der Mittelwert der Aktivität einer bestimmten Zahl vorangegangener Messungen betrachtet.

## **Festlegung von Alarmschwellen**

Um die Wahrscheinlichkeit für die Auslösung eines Fehlalarms zu begrenzen, wird eine obere Alarmschwelle festgelegt, die bei der dreifachen Standardabweichung vom Nulleffekt liegt. Zusätzlich verfügt das Biosens-Algentoximeter über eine untere Warnschwelle. Die Anordnung der oberen und unteren Alarmschwelle ist dabei symmetrisch.

## **Bestimmung der Schwellenwerte**

Der Schwellenwert ist die Konzentration einer Substanz, die mit einer geforderten Wahrscheinlichkeit noch nachgewiesen werden kann. Die Wirkung der Schwellenkonzentration soll im Mittel die Alarmschwelle überschreiten. Berücksichtigt man die Schwankung der Reaktion der Algen auf jeweils gleiche Substanzkonzentrationen, so erreicht man eine Wahrscheinlichkeit von über 50 % für die Erkennung eines Störfalls. Dazu muß die Wirkung bei der Schwellenkonzentration um die einfache Standardabweichung über der Alarmschwelle liegen.

## **Bestimmung der EC-Werte**

In einer Versuchsreihe wird eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung angenommen. Der zu bestimmende Bereich beginnt mit der Konzentration gerade erkennbarer Wirkung und endet in der Sättigung. Es werden mindestens vier Wiederholungen durchgeführt. Bei der Auswertung wird eine Interpolation (Kurvenfit) zwischen den Meßpunkten ausgeführt. Zur Bestimmung der EC-Werte wird ein numerisches Verfahren angewendet. Dabei wird entweder ein sigmoidaler oder ein einfacher exponentieller Kurvenverlauf zugrunde gelegt.

## **Validität der Meßdaten (Dauerbetrieb)**

Die Meßgenauigkeit ist abhängig vom apparativen Fehler und der natürlichen biologischen Schwankungsbreite. Für das Algentoximeter beträgt die Meßgenauigkeit am Rhein ET-Wert:  $13\% \pm 5\%$  bei einem möglichen Wertebereich von - 60 % bis + 60 %. Für die Meßempfindlichkeit bedeutet das, daß Schadstoffeffekte bei Abweichungen von mehr als 5 % vom Mittelwert erkannt werden können.

Bei der Bestimmung der Schwellenkonzentration wurde durch Berücksichtigung der einfachen Schwankungsbreite bei gleicher Substanzkonzentration die Mindestforderung von über 50 % Wahrscheinlichkeit einer auftretenden Wirkung erfüllt. Die Wiederholbarkeit am Gewässer entspricht 95 %.

## **Plausibilität der Meßdaten**

Das Algentoximeter verfügt über eine Auto-Control Funktion, die technische Störungen registriert und entsprechende Meldungen codiert ausgibt. Die Plausibilität der ET-Werte bzw. auftretender Effekte wird am Algentoximeter selbst, durch Vergleich mit den verschiedenen Fluoreszenzparametern (NK, Probe, Kultur, Test) geprüft. Eine Prüfung auf Synchronalarm mit anderen biologischen Systemen kann automatisch nur im Zentralrechner erfolgen.

## **Standzeit und Wartung**

Das Wartungsintervall beträgt unter Normalbedingungen 14 Tage. Der monatliche Wartungsbedarf beträgt < 8 Stunden.

## **Alarmschwelle**

Es werden Alarmschwellen festgelegt, die einer Differenz in Höhe der dreifachen Standardabweichung des Nulleffekts entsprechen. Die Wahrscheinlichkeit für eine statistisch bedingte Grenzwertüberschreitung in zwei aufeinanderfolgenden Messungen beträgt 4·10·6. Dieser Fall tritt damit nur noch einmal in zehn Jahren auf. Um

Fehlalarm zu vermeiden, wird als Kriterium für einen Alarmfall eine Grenzwert-überschreitung von mindestens zwei aufeinanderfolgenden Messungen festgesetzt. Arbeiten mehrerer Geräte in einer Meßstation, so gilt auch das gleichzeitige Ansprechen zweier unterschiedlicher Testgeräte als Alarmfall ("Synchronalarm").

## Ergebnisse

Nachfolgend werden Untersuchungsergebnisse vorgestellt, die Unterschiede in den verwendeten Medien sowie Algenspezies und den geprüften Herbiziden darstellen.

### Unterschiedliche Aufstockmedien

Während der Untersuchungsreihen im Labor wurde ATRAZIN sowohl in Leitungswasser als auch in Rheinwasser parallel geprüft. Hierbei konnte festgestellt werden, daß anhand der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen, ATRAZIN in Rheinwasser einen stärkeren algentoxischen Effekt verursacht, als ATRAZIN in Leitungswasser (Abb. 4).

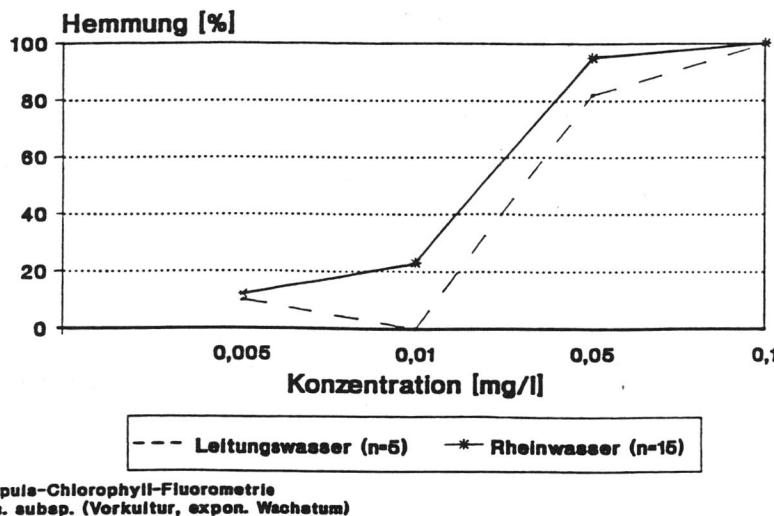


Abb. 4: Wirkung von Atrazin in Leitungswasser und Rheinwasser auf *Scenedesmus subspicatus*

## Stofftests an verschiedenen Algenspezies

Von besonderer Bedeutung war die Fragestellung, inwieweit verschiedene Algenspezies unterschiedlich auf Herbicide reagieren und ob besonders sensitive Arten auch für derartige automatisierte Verfahren geeignet sind.

Im Labor wurden mit ATRAZIN an verschiedenen Algen-Spezies Stofftests durchgeführt und Konzentrations-Wirkungsbeziehungen hergestellt. Ziel dieser Untersuchungen war es zu prüfen, ob mit noch nicht näher geprüften Algenspezies ähnlich gute Intoxikationserfolge erzielt werden können, wie mit *Scenedesmus subspicatus* [12].

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die folgenden Algenspezies einem Vergleich unterzogen und bewertet:

- *Chlorella vulgaris*
- *Chlamydomonas reinhardtii*
- *Scenedesmus subspicatus*

Ziel der Untersuchungen war es, die Algenspezies mit der größten Empfindlichkeit gegenüber ATRAZIN zu ermitteln, bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten. Hierbei wurden im Laborversuch verschiedene Konzentrationen des Herbicides ATRAZIN appliziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 1 und Abb. 5 dokumentiert.

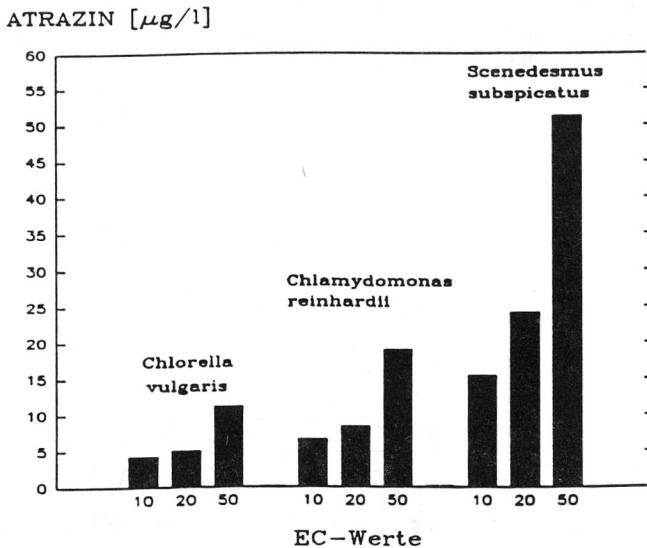


Abb.5: Wirkung von Atrazin auf verschiedene Algenspezies

Zum Vergleich und zur Bewertung der Sensitivität verschiedener Algenspezies gegenüber Herbiziden wird der in der Projektgruppe "Photosynthesetests" als Bewertungskriterium festgelegte EC20-Wert herangezogen. Als empfindlichste Algenspezies wurde *Chlorella vulgaris* mit einem EC20-Wert von 5,0 [µg/L] ermittelt, während *Chlamydomonas reinhardtii* und *Scenedesmus subspicatus* um das 2- bis 5-fache unempfindlicher reagierten (Abb. 5, Tab. 1).

Tab. 1: ATRAZIN-Effekte an unterschiedlichen Algenspezies im Labor

[µg/l]	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Scenedesmus subspicatus</i>
Schwellen	3,8	4,6	14,6
EC <sub>0</sub>	0,02	0,04	0,12
EC <sub>10</sub>	4,2	6,6	15,4
EC <sub>20</sub>	5,0	8,4	24,2
EC <sub>50</sub>	11,2	19,0	51,2

### Störfallsimulation

Als Beispiel für einen Störfall wurde eine Applikationsreihe in situ mit 10 [µg/L] MONURON (CMU) simuliert (Abb. 6). Die Grenzwertüberschreitung von zwei aufeinanderfolgenden Signalen indiziert einen Störfall.

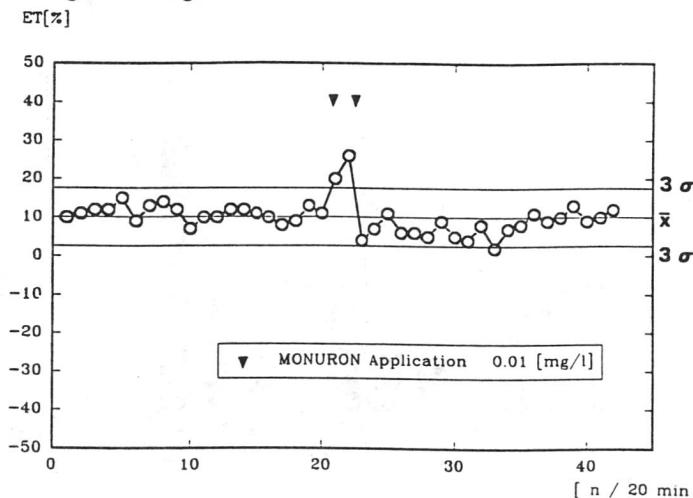


Abb. 6: Störfallsimulation mit MONURON, Anerkennung von Störfällen nur nach zwei aufeinanderfolgenden Signalen (> oder < 3s)

## Wiederholbarkeit und Refraktärzeit

Die unter Wiederholungsbedingungen durchgeföhrten Messungen im Labor zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95 %. Bei einer Konstanz der Zusammensetzung des Rheinwassers innerhalb kleinerer Zeiträume ist auch im Aufstockungsexperiment eine gute Wiederholbarkeit zu verzeichnen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die im Rheinwasser enthaltenen Stoffe in ihrer Konzentration ständigen Änderungen unterworfen sind. Daher ist eine längerfristige Gewährleistung der Wiederholbarkeitskriterien unter in situ-Bedingungen nicht möglich. Man kann einige spezifische Merkmale in den Kurven unterschiedlicher Gewässer finden. Die Basislinie und das Kurvenverhalten der Wochengänge sind gewässertypisch und vom Gewässerklima geprägt.

### Refraktärzeit

Nach Neueinsatz einer Algenkultur beträgt die Eingewöhnungszeit 2:00:00 h Stunden entsprechend 6 Meßzyklen. Nach einer Kontamination beträgt die Refraktärzeit i.d.R. ein Meßzyklus (konzentrationsabhängig). Bei Berücksichtigung dynamischer Grenzwerte für Alarmmeldungen beträgt die Refraktärzeit 1:40:00 h entsprechend 5 Meßzyklen zur Mittelwertbildung. Als Beispiel (Abb. 7) für eine optimale Refraktärzeit des Prüfsystems, nach jeder Intoxikation (20 min) ist eine neue Meßserie möglich, wird die Versuchsserie mit Rheinwasser in der Meßstation Bimmen demonstriert.

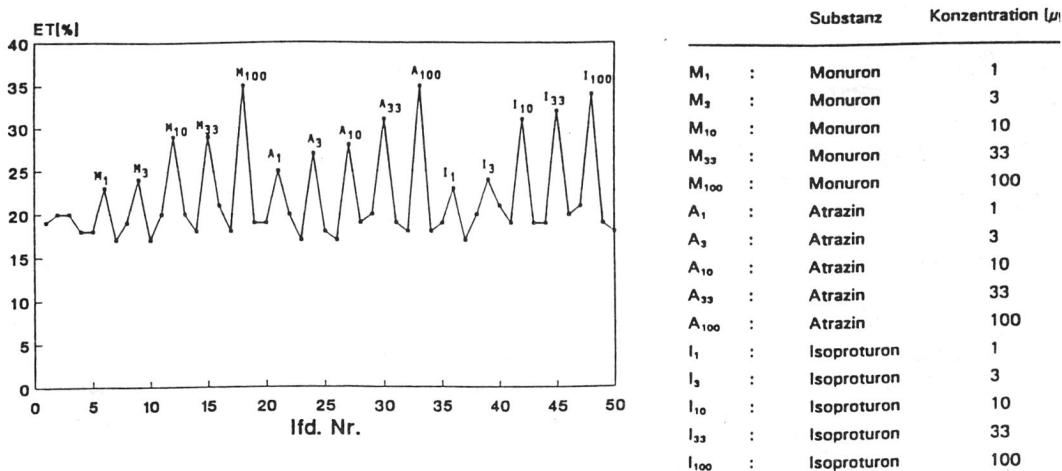


Abb. 7: Beispiel für die Refraktärzeit des Prüfsystems nach Applikationen von Monuron, Atrazin, Isoproturon in Rheinwasser, Bimmen, 26.02.1992

## Stoffprüfung im Aufstockungsexperiment am Rhein

In der Zeit vom 18.08.92 - 19.08.92 fanden in der Wasserkontrollstation in Bimmen/Rhein abschließende Aufstockungsexperimente mit ATRAZIN in Rheinwasser an der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* statt. Es wurde mit den Testgeräten aus TV 1, TV 4 sowie TV 5 synchron gemessen.

TV 1:	FLUOX-System, Düsseldorf
TV 4:	Biosens-Algentoximeter, Hildesheim
TV 4:	IfW-Fluorometer, Schwerin
TV 5:	DF-Algentest, Regensburg

Als Testalge wurden in allen Geräten *Chlamydomonas reinhardtii* aus einem gemeinsamen Kulturautomaten verwendet.

Diese gemeinsame Testaktion stellt einen bedeutenden Teil des Vorhabens dar, da im direkten Vergleich mit den anderen Fluoreszenzverfahren die gerätespezifische Sensitivität überprüft und verglichen werden konnte. Es wurde in der Meßstation eine Konzentrationsreihe von ATRAZIN in Rheinwasser aus einer Stammlösung (10 [mg/L]) angesetzt und synchron appliziert. Folgende Nominalkonzentrationen wurden appliziert: 1, 2, 4, 8, 16, 32 und 64 [ $\mu$ g/L], siehe Abb. 8. Anhand der Abb. 9 wird der konzentrationsabhängige Anstieg der Algenfluoreszenz als ET-Wert in [%] bis zur Sättigung sowie die Ermittlung der Schwellenkonzentration mit Hilfe der Hemmung in [%] dargestellt. Die Hemmung wird dazu im Wahrscheinlichkeitsnetz (Probit) gegen die Konzentration in logarithmischer Skalierung eingetragen (Abb. 10).

Verfahren	: Impulsfluorometrie
Gerät	: Algentoximeter (Fa. Biosens, Hildesheim)
Prüfsubstanz	: ATRAZIN
Prüftemperatur	: 20 [°C]
Prüfvolumen	: 20 [mL]
Algenkultur	: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Algendichte	: ca. $4 \cdot 10^5$ [N/mL]
Prüfmedium	: Rheinwasser, kontinuierlicher Zulauf
Konzentrationen	: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 [ $\mu$ g/L]
Prüfansätze	: 4 Ansätze pro Konzentration
Einwirkzeit	: 20 Minuten (während Dunkelphase)

Nachfolgend werden die EC-Werte in [ $\mu$ g/L] des Chemikalentestes mit ATRAZIN an verschiedenen Algenspezies und die für eine Alarmauslösung relevanten Schwellenkonzentrationen (Schwelle) in [ $\mu$ g/L] dargestellt (Abb. 8-10, Tab. 2).

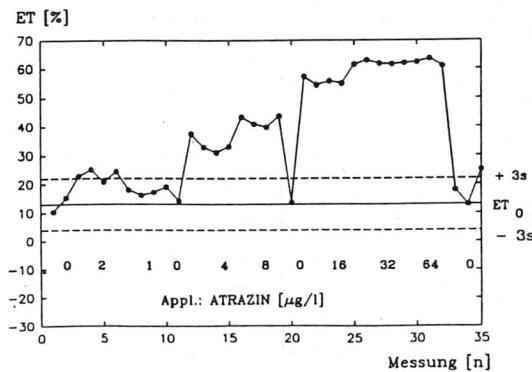


Abb.8: ET-Wert-Verlauf der Aufstockungsexperimente mit ATRAZIN in Rheinwasser an *Chlamydomonas reinhardtii*, 0 = Leermessung (ohne ATRAZIN), 1 ... 64 = ATRAZIN- Konzentration in [ $\mu\text{g/L}$ ]

Die einzelnen ATRAZIN-Applikationen während der Aufstockungsexperimente in der Meßstation Bimmen werden anhand des ET-Wert-Verlaufes in der Abb. 8 dokumentiert. Die Zeitpunkte der Applikationen sowie die ATRAZIN-Konzentrationen werden dargestellt. Zusätzlich ist zur Störfallerkennung nötige dreifache Standardabweichung von der ET0-Linie aufgetragen. Die ET0-Linie stellt den ET-Wert für reines Prüfmedium (Rheinwasser) ohne Prüfsubstanz dar (Mittelwert aus einer statistisch abgesicherten Anzahl von Messungen, ET = 13 [%]).

Die EC-Werte sowie die für eine Alarmauslösung relevante Schwellenkonzentration (Schwelle) in [ $\mu\text{g/L}$ ] werden in Tab. 2 den anderen Testgeräten gegenübergestellt. Für das BIOSENS-Algentoximeter wurde eine Sättigungskonzentration von 52 [ $\mu\text{g/L}$ ] ermittelt. Der Schwellenwert lag bei 1,9 [ $\mu\text{g/L}$ ], die EC50 bei 5,3 [ $\mu\text{g/L}$ ].

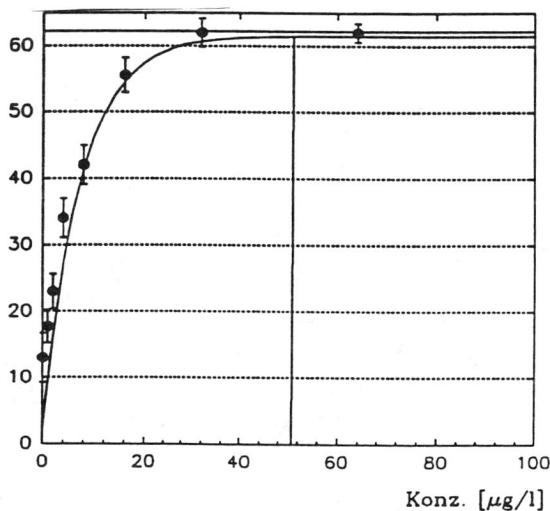


Abb. 9: Sättigungskurve, Konzentrations-Wirkungsbeziehung von ATRAZIN in Rheinwasser, Meßstation Bimmen, Nominalkonzentrationen in [µg/L]

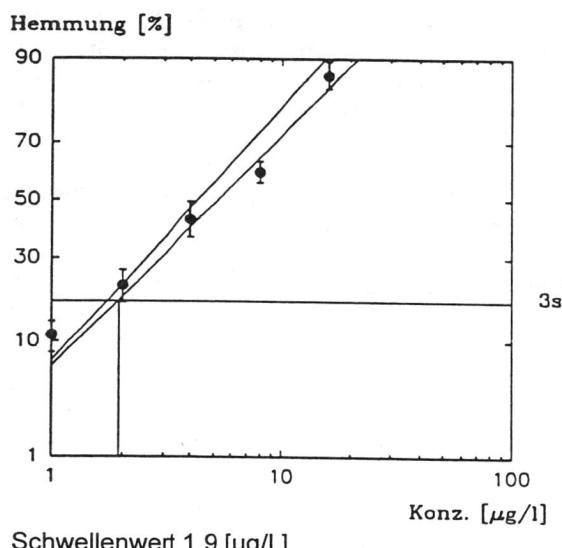


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von ATRAZIN in Rheinwasser, Meßstation Bimmen, EC-Bestimmung mit SigmaPlot (Jandel Scientific)

Tab.2 : Vergleich der Schwellen- und EC-Werte, Ergebnis des Aufstockungs-experimentes

Schwellenwerte und effektive Wirkkonzentrationen für ATRAZIN unter in situ-Bedingungen im Aufstockungsexperiment am Rhein

Testalge *Chlamydomonas reinhardtii*

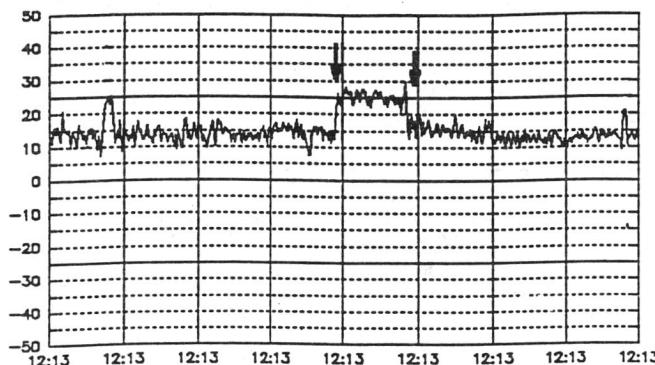
Testsystem	Schwellenwert [µg/l]	EC <sub>20</sub> [µg/l]	EC <sub>50</sub> [µg/l]
Biosens-Algentoximeter	1,9	2,5	5,3
DF-Algentest	0,4	4,6	14,6
EuCyano	33,0	-	-
FluOx	0,85	3,6	11,1
IfW-Fluorometer	5,0	-	7,8

#### Auftreten von Alarmfällen und Synchronalarmen

Bei einem Störfall oder einer ungewöhnlichen Änderung der ET-Wert-Kurve wird eine Plausibilitätsprüfung vorgenommen. Die Zeitpunkte dieser Effekte werden mit denen anderer Biotestgeräte verglichen. Hier finden insbesondere Vergleiche mit dem dynamischen Daphnientest sowie den beiden Fischtestgeräten Kerren und Passavant statt. Sofern eine Übereinstimmung mit einem oder mehreren Testgeräten ermittelt werden konnte, sind diese nachfolgend in den zu den jeweiligen Wochengängen angegebenen Datierungen mit (F) für "Fischtest" bzw. (D) für "Dynamischen Daphnientest" gekennzeichnet.

Exemplarisch wird ein Synchronalarm am gemeldeten Störfall vom 28.04.1991 mit 1,2-Dichlorethan (Abb. 11) dargestellt.

Ein Synchronalarm konnte zu diesem Zeitpunkt bei Algen, Daphnien und Fischen aufgezeichnet werden.



Synchronalarm Gewässermeßstation Mainz / Rhein 24.04 - 02.05.1991

Datum	Uhrzeit	signifikantes Signal (> 3s)	Plausibilität (synchron)
28.04.1991	9:33	Niveauänderung	+ Daphnientoximeter + Fischtest

Abb. 11: Beispiel für einen Synchronalarm am 28.04.1991 am Rhein

Tab. 3: Zusammenfassung der Meßergebnisse

Untersuchungen	Schwellen- konzentration	[µg/l]	EC <sub>20</sub>
Laboruntersuchungen mit <i>Scenedesmus subspicatus</i>			
Lindan	n.b.	> 10.000	
Na-Pentachlorphenol	n.b.	> 5.000	
2-Nitrophenol	n.b.	> 50.000	
ATRAZIN	12,4	27,0	
MONURON	6,2	19,0	
Laboruntersuchungen mit ATRAZIN an verschiedenen Algenspezies			
<i>Chlorella vulgaris</i>	3,8	5,0	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4,6	8,4	
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	14,6	24,2	
Eigene Aufstockungsexperimente mit <i>Scenedesmus subspicatus</i> am Rhein			
ATRAZIN	7,8	17,0	
MONURON	3,6	11,0	
ISOPROTURON	5,8	9,0	
Gemeinsame Aufstockungsexperimente mit ATRAZIN am Rhein			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,9	2,5	

n.b. = nicht bestimmt

## Schlußbetrachtung

Das Biosens-Algentoximeter zeichnet sich durch eine hohe Nachweisempfindlichkeit gegenüber bestimmten Herbiziden aus (Photosyntheseblocker). Die gleichbleibende Qualität des Prüfsystems "Alge", infolge einer turbidostatischen Kultureinheit, gewährleistet eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen. Zahlreiche Synchronalarme mit anderen Biostest-Geräten dokumentieren die zuverlässige Erfassung von Schadstoffwellen während der Meßphasen im Rhein. Die gespeicherten Meßdaten und Alarmsignale können per Datenfernübertragung an eine Meßzentrale übermittelt werden.

Gegenüber der personal- und kostenintensiven chemischen Analytik, die nur stichprobenartig durchgeführt werden kann, liegen die Vorteile des BIOSENS-Algentoximeters als Frühwarnsystem in der kontinuierlichen Messung.

## Literatur

1. NOACK, U., HERDEN, N., LÖFFLER, J., WARCUP, C. & GORSLER, M.: Kontinuierliche Messung der Algen-Biomasse mittels Chlorophyll-Fluoreszenz in Gewässerüberwachungsstationen des Landes Niedersachsen. Z.Wasser-Abwasser-Forsch. 18, 4, 1985, 177-182
2. ERNST,D.; SCHULZE,E. : Ein netzunabhängiges Fluorometer zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz mit Einzelimpulsen. Arch.Hydrobiol.Beih., Ergbn.Limnol., 29, 1987, 68 - 75
3. NOACK, U.; WALTER, J.: Algae-Toximeter an automatic biosensor for effect monitoring. Vortrag (Skript): Joint meeting of SETAC-Europe, 21.-24.06.1992, Potsdam, 1992
4. NOACK, U.; HAPKE, S; Walter, J.: Vergleichende Schadstoffprüfung mit der spontanen Chlorophyll-Fluorometrie. 3.Magdeburger Gewässerschutzseminar, GKSS Geesthacht, 1990, 300-301
5. HARRIS, G.: Photosynthesis, productivity and growth: The physiological ecology of phytoplankton. Arch.Hydrobiol.Beih.,Ergbn.Limnol.,10, 1978, 1 - 171
6. ENRST,D.: Ökologische Anwendungen der Impulsfluoreszenztechnik. Arch. Hydrobiol. Beih., Ergbn.Limnol., 29, 1987, 63-68
7. NOACK, U.: Quasi-kontinuierliche Chlorophyllfluoreszenz-Messung in der Gewässerüberwachung. Arch. Hydrobiol.Beih., Ergbn.Limnol.,10, 1987, 99-105

8. NOACK, U.: Beurteilung der Phytoplanktonodynamik durch quasi-kontinuierliche Chlorophyll a-Fluoreszenzmessungen in der Meßstation "Seemitte-Dümmer". Dissertation Universität Hannover, 127 S., 1986
9. NOACK, U.: Algen-Toximeter zur Gewässer- und Abwasserüberwachung. 79-86. In: Ernst, D. & Schmidt, C. (Hrsg.): Grundlagen und Anwendungsbereiche der Chlorophyllfluoreszenz, Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH und der Hydrologischen Abteilung der Dortmunder Stadtwerke AG, 1989
10. NOACK, U.; WALTER, J.: Ein automatisierter Algen-Biotest zur Gewässerüberwachung. 3. Magdeburger Gewässerschutzseminar; GKSS Geesthacht, 1990, 302-303
11. SCHREIBER, F.: Implementation und Vergleich von zwei automatisierten Chlorophyllfluoreszenz-Biosensoren in einer Wasserkontrollstation. Diplomarbeit der FH Ostfriesland (FB NWT), 89 S., 1992
12. TSCHIRNER, E.; KRIENTZ, L.; ARNDT, H. & Böhm, H.: Untersuchungen zur Chlorophyll a-Fluoreszenz an Grünalgenstämmen. Colloquia Pflanzenphysiologie, 7, I, 1984, 125-127

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministers für Forschung und Technologie unter dem Förderkennzeichen 0339299A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Wir danken dem BMFT für die finanzielle Unterstützung.

## Das 1-Hz-Fluorometer

Christian Moldaenke, Ulf Peter Hansen

### Zusammenfassung

Das 1-Hz-Fluorometer ist ein Gerät zur Erfassung und Auswertung von Chlorophyllfluoreszenz in Gewässern. Es zeichnet sich aus durch extrem hohe Auflösung (kleiner als 5 ng/l Chlorophyll A unter Berücksichtigung von Rauschen und Drifteffekten), durch seine Unterscheidungsfähigkeit von lebender und toter Fluoreszenz und seine außerordentlich gute Einsatzfähigkeit bei Schadstofftests. Veränderbare obere Meßgrenze ist 500  $\mu\text{g/l}$ . Das Gerät weist außerdem eine extrem hohe Festigkeit gegen Verschmutzungen und anderen lichtabsorbierenden Effekten vor, die eine genaue Feststellung eines Chlorophyllgehaltswertes beeinträchtigen könnten. Zudem ist die benötigte Probenmenge mit 25 ml sehr klein. Ein eingebauter Rechner ermöglicht Langzeitmessungen über mehrere Wochen, ein automatisches Säuberungsverfahren sorgt dabei für die Wartungsfreiheit. Bedingt durch die hohe Auflösung ist das Gerät sehr geeignet, Wirkungen festzustellen, die durch Schad- oder andere Stoffe hervorgerufen werden. Als Beispiel ist die Erkennung von 100 ng/l Atrazin angeführt.

### Summary

The 1-Hz fluorometer is a device for the recording and evaluation of chlorophyll fluorescence in waters. Its main characteristic is its extremely high dissolution (less than 5 ng/chlorophyll A taking into account effects of noise and drift), its capacity of differentiating between living and dead fluorescent matter, and its extreme suitability for testing contaminants. The upper adjustable measuring limit is 500  $\mu\text{g/l}$ . Moreover, the device is highly insensitive to contamination and other light-absorbent effects which may impair measurement of the precise chlorophyll content. Also the amount of the sample required (25 ml) is very small. An integrated computer enables long-term measurements over several weeks and an automatic cleaning procedure guarantees maintenance-free operation. Owing to its high dissolution, this device is suitable to establish effects caused by contaminants and other substances. The detection of as little as 100 ng/l atrazine is given as an example.

## **Einführung**

Die Chlorophyllfluoreszenz gewinnt eine wachsende Bedeutung bei der Erkennung von Algendichten und Schadstoffbelastungen. Verschiedene Parameter dienen dabei der quantitativen Beschreibung der gemessenen Fluoreszenz. Zwei Extremwerte sind durch die Größen  $f_0$  und  $f_m$  gegeben.  $f_0$  ist die schwache Fluoreszenzantwort auf ein Meßlicht, das auf dunkeladaptierte Algen trifft. Sie sind für Licht voll aufnahmefähig und geben nur ein Minimum des empfangenen Lichtes als Fluoreszenz wieder ab. Bei der  $f_m$ -Messung hingegen sorgt ein sättigendes Hintergrundlicht dafür, daß der photosynthetische Apparat der Algen für weitere Energie nicht mehr aufnahmefähig ist. Die von einem dann gegebenen Meßlichtlichtimpuls hervorgerufene Fluoreszenz ist maximal, da die Photosysteme die empfangene Energie nur noch über Wärme und Fluoreszenz abgegeben können [1].

Zwischen diesen Extremen liegt der Parameter  $f$ , der keinen konstanten Wert annimmt, sondern sich zeitlich verändert und dabei stark von äußerer Umständen abhängt.  $f$  zeigt beispielsweise in seiner Antwort auf einen Lichtsprung Anstiege und Abfälle, die sich in über 10 Zeitkonstanten über mehrere Stunden festmachen lassen [2]. Eine schnelle Zeitkonstante, genannt  $\tau_1$  (im Bereich von einigen 100 ms) beschreibt dabei die Änderungen des Redoxzustandes des Primärakzeptors vom Photosystem II. Die Reduktion dieses Akzeptors, die in der Fluoreszenz einen Anstieg hervorruft, wird zur Bestimmung der Algendichte herangezogen. Da dieser Prozeß direkt auf die primäre Ladungstrennung folgt, gibt er auch die Sauerstoffentwicklung wieder.

Um das Gerät zu normieren, wird der zu diesem Prozess gehörende Anstieg in der Fluoreszenz als Antwort auf einen Lichtsprung in Beziehung gesetzt zu dem Anstieg einer Algenprobe, die unter optimalen Bedingungen gezogen und nahezu 100%ig aktiv ist. Daraus errechnet sich der in der Probe tatsächlich vorhandene Gehalt an aktivem Chlorophyll.

Andere Geräte benutzten die sogenannte verzögerte Fluoreszenz oder Lumineszenz [3]. Das 1 Hz-Fluorometer nutzt wie jene Geräte die Aktivität des photosynthetischen Apparates der Algen, um zwischen totem und lebendem Material zu unterscheiden. Der Vorteil der Fluoreszenzmessung gegenüber der Lumineszenzmessung ist jedoch eine 10 bis 100-fach höhere Intensität, die ein erheblich besseres Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht.

## **Material und Methoden**

### **Einführung in die Funktionsweise des 1-Hz-Fluorometers**

Das 1-Hz-Fluorometer erzeugt zwei verschiedene Lichtsignale, ein mit einem Kilohertz amplitudenmoduliertes Meßlicht und ein mit einem Hertz moduliertes Licht, das die photosynthetischen Reaktionen anregt. Die oberen beiden Bilder der Abbildung 1 zeigen die Zeitverläufe beider Lichter, das dritte Bild darunter die Summe der beiden

Lichtsignale, wie sie am zu untersuchenden "Objekt" auftritt. Photosynthetisch nicht aktives oder totes Material erzeugt eine Fluoreszenz, die zur Summe der Lichter proportional ist. Teil B, linke Spalte oben, zeigt eine solche Fluoreszenzantwort. Die Fluoreszenzantwort wird verarbeitet, und zwar durch ein sogenanntes Doppelkorrelationsverfahren. Die erste Korrelation wird durchgeführt mit der Fluoreszenzantwort und dem Meßlichtausgangssignal. Die Korrelation isoliert aus dem Gesamtignal den Anteil, der von dem **Kilohertz**-Eingangssignal hervorgerufen wird. Durch diese Korrelation fällt sowohl der Sockel als auch die 1-Hz-Schwingung heraus. Übrig bleibt ein Maß für die Fluoreszenz, die vom Meßlicht hervorgerufen wird. Dieses Signal ist unter "Fluorescence yield" dargestellt und ist bei toter Materie konstant. In der zweiten Korrelation wird nun unter "activity signal" das Ergebnis der zweiten Korrelation dargestellt. Korreliert wird der "Fluorescence yield" mit dem Steuersignal für das 1-Hz-Licht. Da diese Signale -bei totem Material- nichts gemein haben, ist das Korrelationsergebnis gleich null.

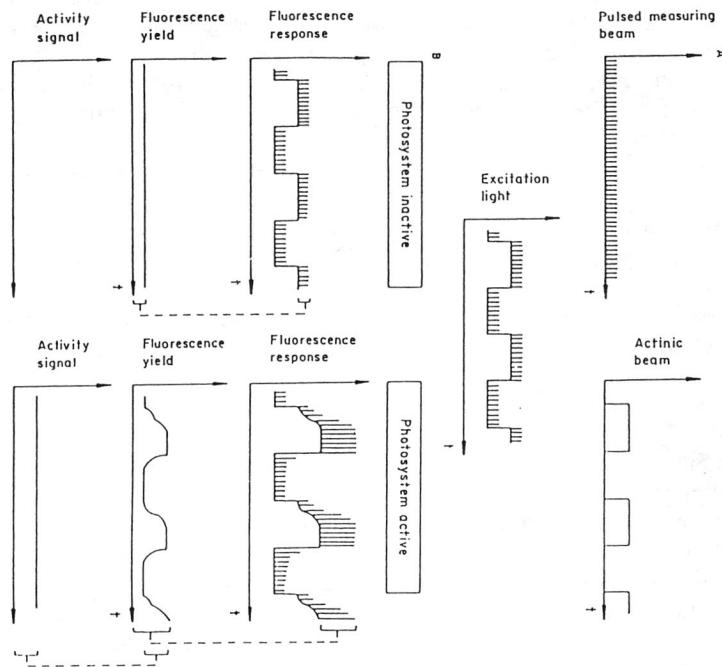


Abb. 1 Signalverläufe

- A: Das Meßlicht und das aktinische (Fluoreszenzkinetik auslösende) Licht  
B: Die Fluoreszenzsignale (stark vergrößert) als Antwort auf das anregende Licht. Links bei inaktivem oder toten Material, rechts bei aktiven Photosystemen

Anders verhält sich die Fluoreszenz, wenn sich photosynthetisch aktives Material in der Probe befindet. Diesen Fall zeigt die rechte Spalte (Photosystem active). Auf dieses Fluoreszenzsignal wird wiederum das Korrelationsverfahren mit dem 1-KHz-Ausgangssignal angewandt. Man beachte, daß der 1-Hz-modulierte Fluoreszenz-"Sockel" durch die Korrelation verschwindet, korreliert ist nur die direkte Antwort auf das Kiloherz-Licht. Allerdings ist die Amplitude der Antwort auf das Kiloherz-Licht nicht immer gleich, sondern abhängig vom anregenden 1-Hz-Licht moduliert. Diese Modulation ist eine direkte Folge des Arbeitens der photosynthetischen Elektronentransportkette der lebenden Algen. In starker Vereinfachung geschieht folgendes:

Excitonen treffen auf das Photosystem II, in dem die Ladungstrennung ausgelöst wird. Diese Elektronen werden weitergeleitet auf den Akzeptor  $Q_A$  und erzeugen Änderungen seines Redoxzustandes im Zeitbereich von 100 ms. Die Weiterleitung der Elektronen zum Photosystem I läuft mit Zeitkonstanten im Sekundenbereich, so daß bei halbsekündiger Beleuchtung und damit Anregung des Elektronentransports ein "Stau" um  $Q_A$  entsteht. Dieser Stau erhöht die Exitonenanzahl im PS II, und führt damit zu erhöhter Fluoreszenz. Die Veränderung des Energieabflusses betrifft jedoch nicht nur das anregende 1-Hz-Licht, sondern auch das Kiloherz-Licht.

In totem Material tritt diese Modulation des Wirkungsgrades der PS II-Antenne nicht auf. Die Antwort auf eingestrahltes Licht kann dort immer nur proportional zum eingestrahlten Licht sein.

Der Fluoreszenzyield aktiver Photosysteme ist in der rechten Spalte erklärt, das zweite Bild zeigt das erhöhte Korrelationssignal, wenn das 1-Hz-Licht eingeschaltet wird. Dieses Signal besitzt deutliche Gemeinsamkeiten mit dem 1-Hz-Lichtsignal, so daß eine Korrelation mit diesem zu einem Ergebnis, einem "Aktivitätssignal", größer null führt.

Das Aktivitätssignal ist normiert auf das Doppelkorrelationsergebnis einer Lösung, dessen Inhalt chemisch und mikroskopisch auf seinen Algengehalt (Scenedesmus) untersucht worden ist. Sind tote und lebende, modulierbare und nichtmodulierbare Objekte in einer Lösung, so addieren sich deren Fluoreszenzantworten. Das Aktivitätssignal jedoch entspricht tatsächlich nur dem Inhalt der Lösung an aktivem photosynthetischen Material. Dieses Signal ist auf Grund der speziellen Auswertung sehr stark an den zu messenden Sauerstoffyield geknüpft.

Eine präzise Chlorophyllgehaltsbestimmung kann durch die Absorption von Meß-, Anregungslicht und Fluoreszenz durch die Gesamtheit der Teilchen in der Lösung beeinträchtigt werden. Eine zusätzlich eingebaute 4 cm lange Meßstrecke nimmt diesen Wert auf und korrigiert die empfangenen Fluoreszenzwerte entsprechend.

Zu achten ist außerdem auf eine genügend lange Dunkelperiode vor Beginn der Messung, da eine Lichtadaptation an hohe Meßlichtintensitäten vor der Messung zu niedrigeren Werten in der Fluoreszenzantwort führen kann. Der Durchflußbetrieb dagegen nutzt den unveränderten Status der Algen und liefert ein Ausgangssignal proportional zum Sauerstoffyield.

Abb. 2 zeigt den Prinzipaufbau des Meßsystems. 1-Kilohertz-Meßlicht und 1-Hz-Licht werden erzeugt und als Leuchtdiodenlicht in die Meßkammer gesendet. Die Photodiode empfängt Signale, wie sie in Abb.1 beschrieben sind. Das Doppelkorrelationsverfahren errechnet das Ausgangssignal, das Maß der Veränderung in der Kilohertzfluoreszenz, das durch das 1-Hz-Licht hervorgerufen wird. Zusätzlich wird die Absorption durch die 4 cm lange Meßzelle ausgemessen.

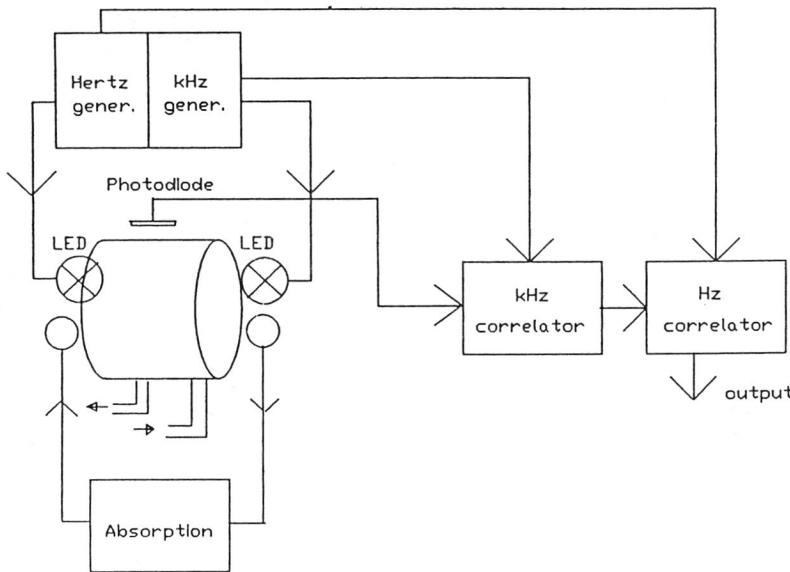


Abb.2: Aufbau des Meßsystems und Auswertung

Die Abbildung zeigt oben die Hz- und Kilohertz-Generation mit der Ansteuerung der Leuchtdioden. Die Photodiode empfängt die Fluoreszenz und führt das verstärkte Signal auf die Korrelatoren.

Abb.3 stellt das Blockschaltbild eines Aufbaus für Dauermessungen dar. Spülwasser, meist reicht schon einfaches Leitungswasser, wird nach jeder Messung in die Meßzelle gepumpt und hält so das System sauber.

Zur Eichung wurde *Scenedesmus quadricarda* benutzt, die in einem Turbidostaten in der exponentiell wachsenden Phase gehalten wurde (Firma LAR, Berlin). Diese Algenlösung wurde photometrisch auf ihren Chlorophyllgehalt ausgemessen, der erhaltene Wert dem Meßsignal des 1-Hz-Fluorometers gleichgesetzt.

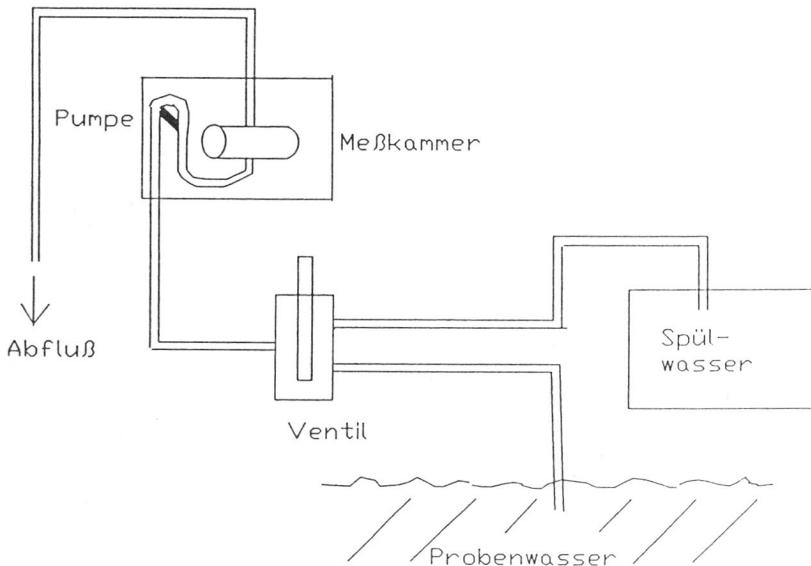


Abb.3: Aufbau einer Langzeitmessung, Blockschaltbild

Die Pumpe zieht abwechselnd Proben und Spülwasser in die Meßkammer, gesteuert über ein Ventil

## Resultate

Abb.4 zeigt eine Verdünnungsreihe im Vergleich mit gemessenen DIN-Chlorophyllgehaltswerten, die die Umweltbehörde Hamburg im Aug.93 gemessen hat. Ausgezeichnete Linearität ist sichtbar.

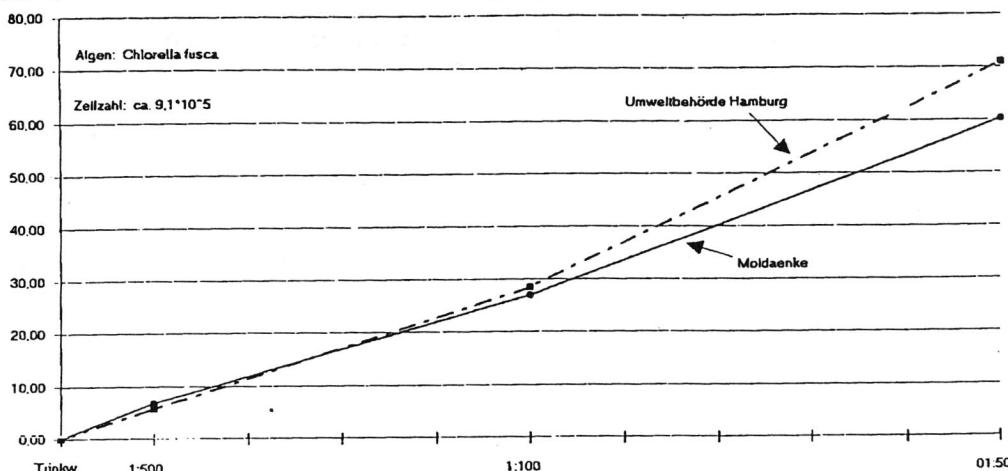


Abb.4 A: Verdünnungsreihe mit DIN-Gegenprobe zur Chlorophyllgehaltsbestimmung

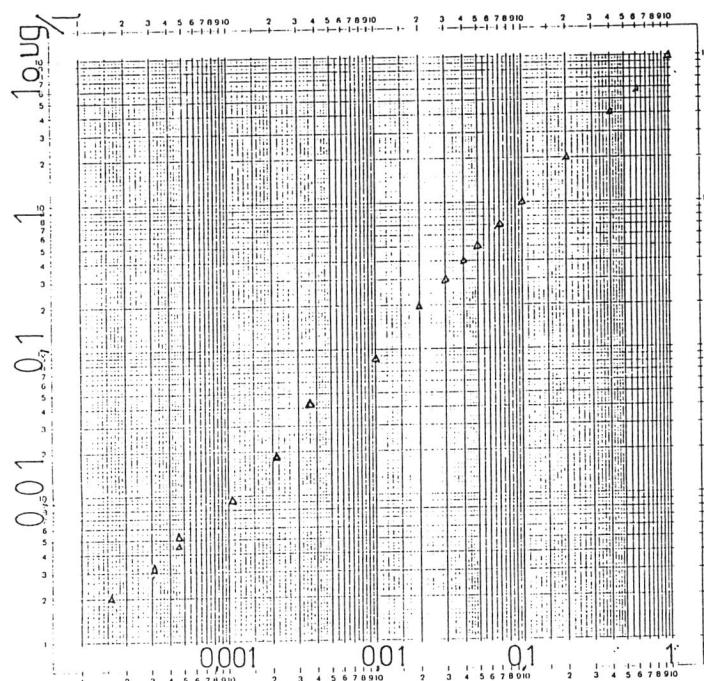


Abb.4 B: Verdünnungsreihe

Abb.5 gibt ein Beispiel für die Anwendung des Systems bei der Algengehaltsüberwachung im Gewässer. Die Daten hat das Amt für Wasserwirtschaft Minden zur Verfügung gestellt. Es zeigt den Lebend-Chlorophyllgehalt der Weser über einen Zeitraum von zwei Wochen mit 1400 Datensätzen.

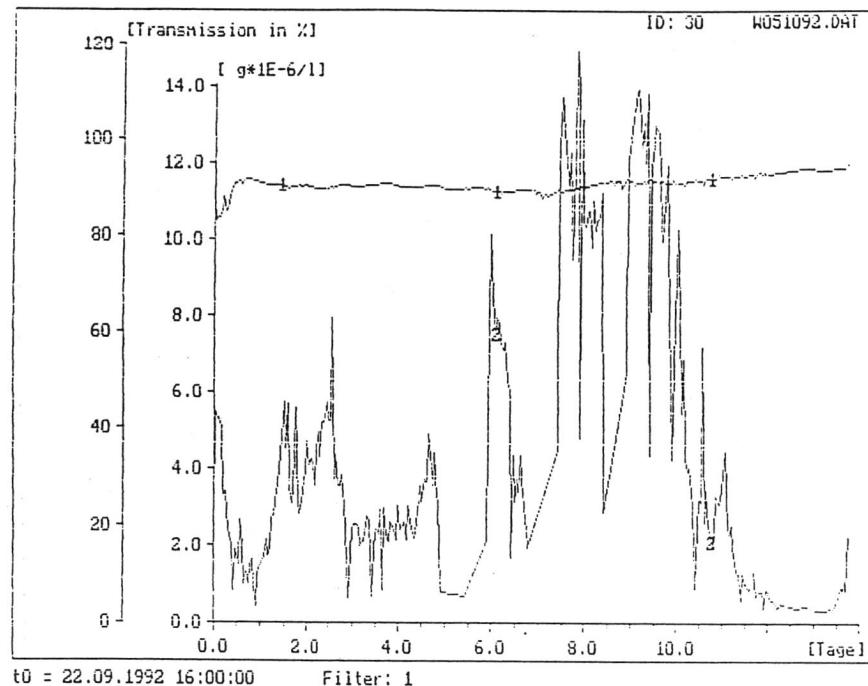


Abb.5: Zweiwöchiger Verlauf des Chlorophyllgehaltes in der Weser in der Nähe von Minden. Kurve 1: Transmission, Kurve 2: Chlorophyllgehalt

Abb.6 beschreibt die Einsatzmöglichkeiten des 1-Hz-Fluorometers als Schadstoffmonitor. Im Augenblick wird in Zusammenarbeit mit der Firma LAR (Berlin) ein Toxikometer entwickelt, das diese Empfindlichkeit nutzen soll. Das Gerät ist ab Ende November dieses Jahres bei der Firma LAR erhältlich.

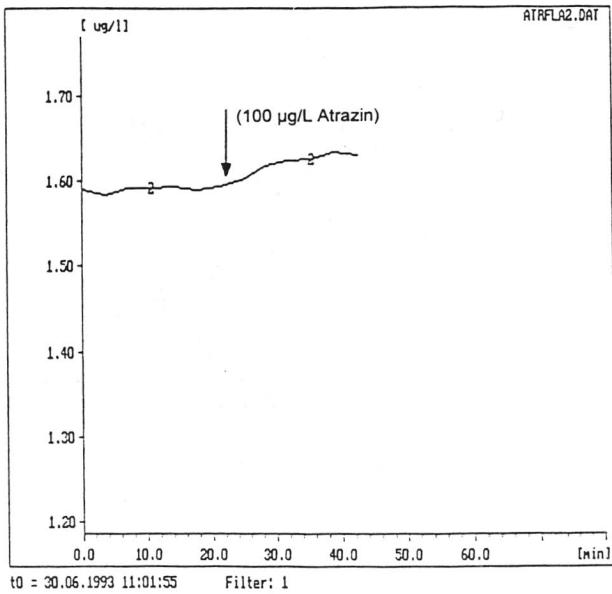


Abb.6: Wirkung von Atrazin. Die Zugabe von Atrazin auf 100 ng/l ist deutlich in einer Veränderung der Aktivität erkennbar.

Die Tauglichkeit des Gerätes zur Umweltüberwachung ist mit den aufgezeigten Fähigkeiten gegeben und lässt eine große Anzahl neuer Erkenntnisse erwarten.

## Literatur

1. SCHREIBER, U., SCHLIWA, U. and BILGER, W.: Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10, 1986, 51-62
2. HANSEN, U.P., DAU, H., BRÜNING, B., FRITSCH, T. and MOLDAENKE, C.: Linear analysis applied to the comparative study of the I-D-P phase chlorophyll fluorescence as induced by actinic PS-II light, PS-I light and changes in CO<sub>2</sub>-concentration. *Photosynth. Res.* 28, 1991, 119-130
3. GERHARDT, V. und KRETSCH, G.: Entwurf eines Biotestverfahrens zum Schadstoffnachweis mittels der verzögerten Fluoreszenz von Algen. In: Grundlagen und Anwendungsbereiche der Chlorophyllfluoreszenz. D. Ernst und C. Schmidt, eds. Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH Dortmund und der Hydrologischen Abteilung der Dortmunder Wasserwerke AG 37, 1989, 87-95



**DF-Algentest:  
Ein Biotest zur Gewässerüberwachung auf der Grundlage  
der verzögerten Fluoreszenz von einzelligen Algen**

V. Gerhardt und J. Putzger

### **Zusammenfassung**

Beim DF-Algentest handelt es sich um ein Biotestgerät zur Überwachung von Gewässern auf Immission bzw. von Abwässern (Kläranlagen) auf Emission von Schadstoffen. Als Testorganismen werden einzellige Algen aus einem Bioreaktor verwendet. Gemessen wird das Abklingen der verzögerten Fluoreszenz bei 685 nm nach Belichtung mit weißem Licht. Das schwache Nachleuchten im Dunkeln ist eine intrinsische Eigenschaft aller photosynthetisch aktiven Pflanzenzellen. Photosynthesegifte, die in die Biomembran eingebaut werden, verändern die Abklingkinetik der verzögerten Fluoreszenz. Die Unterschiede in der Abklingkinetik zwischen Referenz und Probe sind das Testkriterium. Das Gerät ist für den automatischen Betrieb am Gewässer konzipiert und liefert Meßwerte im Abstand von 30 Minuten. Gleichzeitig wird auch der photosynthetisch aktive Chlorophyll-Gehalt im Gewässer bestimmt, sodaß das Phytoplankton-Wachstum im Gewässer mitüberwacht werden kann. Der Biotest ist auch einsetzbar für schnelle Screening-Tests im Labor oder als Fluoreszenz-Meßgerät an Batch-Kulturen im 72h - Zellvermehrungshemmtest nach DIN.

Der Test entstand im Rahmen des Forschungsprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" [1], das vom Bundesministerium für Forschung und Technologie und dem Umweltbundesamt gefördert wurde.

### **Summary**

The DF-Biomonitor (DF=Delayed Fluorescence of algae) is an On-Line-Bioassay for controlling freshwater-pollutions and the efficiency of wastewater-plants. The measurement is automatic and takes samples all 30 minutes. The monitoring organisms are single cell-green algae (*Chlamydomonas rheinhardtii*). The changes of the photosynthetic reactions, caused by pollutions are measured by means of the DF. The DF is an intrinsic fluorescence label of all green cells. The origin of this red light emission (685 nm) is a charge recombination at the reaction-center P680 of photosystem II during the dark-adaption of the cells. The DF-Biomonitor compares the decay-kinetics of the DF between those algae, that are exposed to the test-water and those, that are exposed to unpolluted water. The decay-kinetic of the DF is changed by pollutions, especially by photosynthetic poisons like herbicides, because this molecules change the transport of electrons of photosynthesis by electron-trapping. The lowest detectable concentration for Atrazine is 0.4 µg/l. The DF-Biomonitor was tested on-line at the river Rhein and Main for several months.

## Grundlagen der verzögerten Fluoreszenz

Bringt man belichtete Algenzellen vom Hellen ins Dunkle, so kann ein im Verlauf von einigen Minuten abklingendes dunkelrotes Nachleuchten ( $\lambda = 680\text{nm}$  bis  $720\text{nm}$ ) gemessen werden. Diese sogenannte *verzögerte Fluoreszenz* (*Delayed Fluorescence = DF*) [2-4] entsteht im Reaktionszentrum P680 des Photosystem II durch die Rekombination der am wasserspaltenden Komplex gespeicherten positiven Ladungen mit Elektronen aus der Elektronentransportkette.

Ort der Primärprozesse der Photosynthese ist die Thylakoidmembran, in die die Photosysteme I und II sowie weitere Moleküle der photosynthetischen Elektronentransportkette eingebaut sind (Abb.1). Durch Belichtung wird an den Reaktionszentren P680 und P700 der beiden Photosysteme der Ladungstrennungsprozeß in Gang gesetzt. Das Reaktionszentrum P680 gibt über seinen primären Akzeptor  $Q_A$  ein Elektron an die Elektronentransportkette ab. Daraufhin entzieht das oxidierte Reaktionszentrum ein Elektron dem wasserspaltenden  $Mn^{n+}$ -Komplex. Wenn durch Wiederholung des Vorgangs dem Mn-Komplex insgesamt vier Elektronen entzogen wurden, ist er in der Lage zwei Moleküle Wasser in Elektronen, Protonen und Sauerstoff zu spalten. Die Protonen reichern sich im Innenraum der Thylakoidmembran an und bauen so einen Protonengradienten auf. Die Elektronen werden in die Elektronentransportkette eingespeist. Dort werden Sie in einer zweiten lichtgetriebenen Reaktion durch PSI auf NADPH übertragen, das der Calvin-Zyklus zur  $CO_2$ -Fixierung benötigt.

Wird die Arbeit der Photosysteme durch Unterbrechung der Lichtzufuhr gestoppt, kehren sich die Reaktionen der Lichtphase teilweise um. Die am wasserspaltenden Komplex gespeicherten positiven Ladungen und eventuell auch die Protonen im Thylakoidinnenraum können das Reaktionszentrum des PSII oxidiieren. Elektronen aus der Elektronentransportkette fließen zurück zum oxidierten Reaktionszentrum und rekombinieren mit diesem. Dabei bildet sich ein angeregter Singulett-Zustand P680\*, der unter Abgabe eines Fluoreszenzlichtquants bei  $680\text{nm}$  Wellenlänge in den Grundzustand P680 zerfällt. Die Intensität des Fluoreszenzlichts nimmt langsam ab, bis das Ladungsungleichgewicht zwischen der Donatorseite (wasserspaltender Mn-Komplex, Innenseite der Thylakoidmembran) und der Akzeptorseite (Plastochinon, PSI und Membranaußenseite) durch die Rekombination abgebaut ist. Das Abklingen der verzögerten Fluoreszenz lässt verschiedene charakteristische Zeitbereiche erkennen (Abb.2). Der schnelle Abfall in den ersten Sekunden wird durch zwei Exponentialfunktionen A und B beschrieben, dann folgen zwei ansteigende Komponenten C und D, die sich dem Rückfluss von Elektronen von der Akzeptorseite des PSI und der Membranaufladung zuordnen lassen.

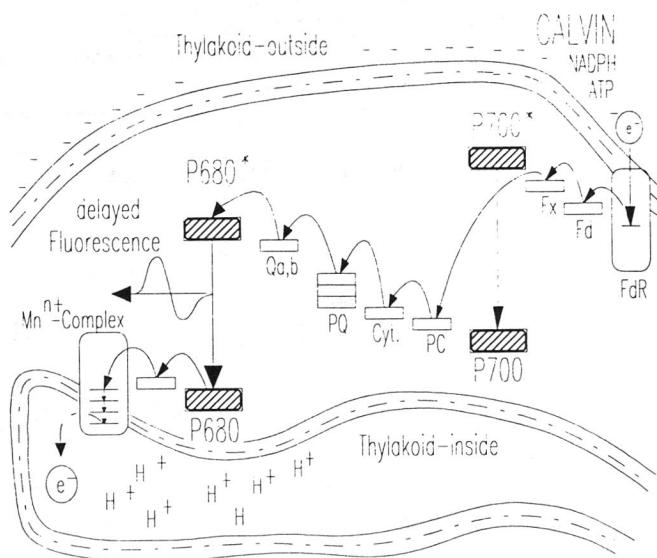


Abb. 1: Vereinfachtes Z-Schema, Entstehung der DF: Umkehr des Ladungstransportes der Photosynthese während der Dunkeladaptation: Die Elektronen sorgen durch rückwärtiges Durchlaufen des Z-Schemas für einen Ladungsausgleich zwischen der Thylakoid-Innenseite und -Außenseite. Dabei führt der Einfang von Elektronen durch  $P680^+$  zur Bildung von  $P680^{\cdot}$ . Dieser angeregte Zustand zerfällt unter Aussendung eines verzögerten Fluoreszenz-Lichtquants. Neutrales  $P680$  wird im Dunkeln solange wieder oxidiert, bis das chemische Potential der positiven Ladungen des wasserspaltenden  $Mn^{n+}$ -Komplexes und der Thylakoid-Innenseite aufgebraucht ist. Dieser Ausgleichsvorgang dauert je nach Temperatur mehrere Minuten und kann an der lebenden Zelle durch die DF gemessen werden.

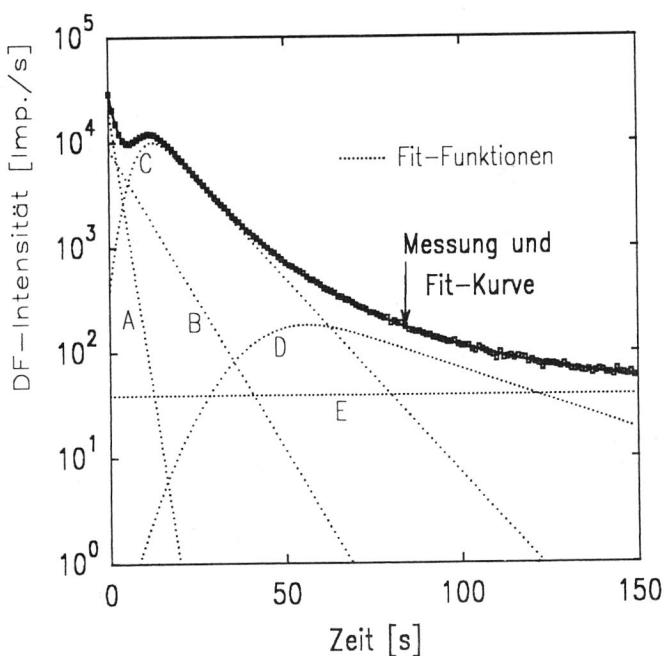


Abb. 2: Halblogarithmische Darstellung einer Abklingkurve der verzögerten Fluoreszenz. Die Messung lässt sich sehr gut anpassen mit zwei abklingenden Exponentialfunktionen A und B und zwei Anklingfunktionen C und D mit exponentiellem Abfall. E ist der konstante Dunkelimpuls-Anteil des Photomultipliers. A und B sind Anteile der DF, die durch Rekombination von Elektronen und Löchern entsteht, die sich nach der Lichtabschaltung in nächster Nähe zum Rekombinationszentrum  $P680^+$  befinden. Elektronen-Lochpaare, die zu diesem Zeitpunkt weit entfernt (am PS I und am Mn-Komplex bzw. auf der Innen- und Außenseite der Thylakoidmembran) vom  $P680$  sind, erzeugen die Fluoreszenzanteile C und D.

Störungen der Photosynthese durch Schadstoffe ändern das Abklingverhalten: Beispielweise werden die Komponenten C und D verkleinert, wenn der Elektronentransport zwischen den Reaktionszentren P700 und P680 (siehe Abb. 1) durch den Einbau von Atrazin-ähnlichen Herbizidmolekülen gehemmt oder unterbrochen wird. Das Abklingverhalten der DF lässt sich berechnen mit Hilfe eines Systems von gekoppelten Differentialgleichungen, die den Elektronenrückfluss durch das Z-Schema beschreiben. Die Abb. 3a zeigt eine Lösungsfunktion der Differentialgleichungen für den ungestörten Elektronenrückfluss und die Abb. 3b das Verhalten bei teilweiser Hemmung des Elektronentransports zwischen  $Q_{a,b}$  und  $PQ$ .

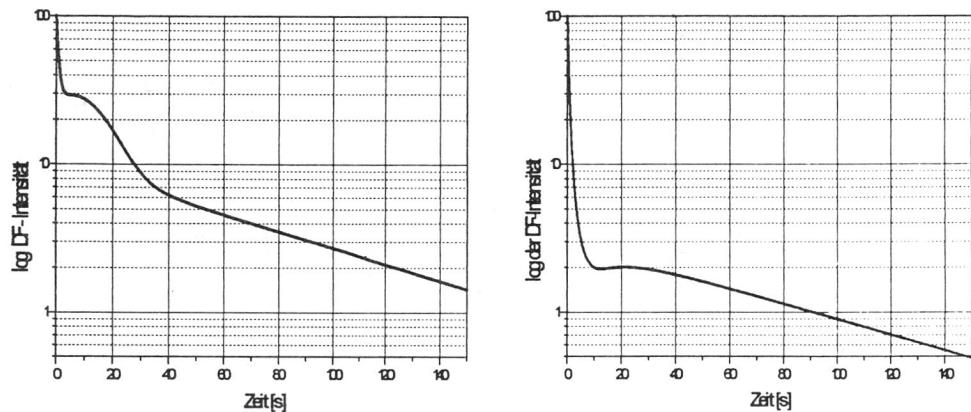


Abb. 3a und 3b:

Simulation des Abklingens der DF mit einem Differentialgleichungssystem für den Elektronenrücktransport im Z-Schema (halbilogarithmische Darstellung). Abb. 3a: Normalverhalten, Abb. 3b: Teilweise Hemmung des Elektronen-Rücktransports bei Einwirkung eines Atrazin-ähnlichen Herbizids, dadurch sinkt ab ca. 10s die DF-Intensität von ursprünglich 30 % auf 2 % herab.

Die individuelle Form der DF-Abklingkurve der verzögerten Fluoreszenz hängt, ebenso wie die individuelle Form der Kautsky-Kinetik (prompte Fluoreszenz) - von äußeren Einflüssen wie Temperatur, Lichtstärke,  $\text{CO}_2$ -Gehalt, pH-Wert, Nährstoffsituation und dem inneren Zustand der Organismen ab. Mathematisch entspricht dieser Sachverhalt dem Auftreten unterschiedlicher Lösungsfunktionen bei unterschiedlichen Anfangsbedingungen für das System der gekoppelten Differentialgleichungen des Elektronentransports [5]. Möchte man eine "Normkurve" ungeschädigter Algen definieren, um Abweichungen davon als Schadstoffeinfluss zu interpretieren, so müßte man einen hohen Aufwand treiben, um die Kulturbedingungen der Algen über lange Zeit konstant zu halten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde

der DF-Algentest als zweikanaliges Meßsystem mit Referenz- und Probenkanal konzipiert [6]. In beiden Meßkanälen wird die verzögerte Fluoreszenz von Algen, die gleichzeitig derselben Kultur entnommen wurden, gemessen. Im Referenzkanal werden diese Algen einem schadstofffreien Vergleichswasser zugesetzt, im Probenkanal der zu untersuchenden Wasserprobe. Für Chemikalentests im Labor wird das gleiche Wasser wie im Referenzkanal mit der Chemikalie versetzt. Man erhält zwei Abklingkurven, die unter Einwirkung eines Schadstoffs differieren.

Bei der Anwendung des Tests am Gewässer besteht die Schwierigkeit, daß ein geeignetes Vergleichswasser gefunden werden muß, das in seiner Wirkung auf die Algen dem unbelasteten Flußwasser entspricht. Deshalb verwendet der DF-Algentest eine Rückstellprobe des Gewässers als Referenzwasser. Es wird also fortlaufend der Zustand des Gewässers mit dem zum Zeitpunkt der Rückstellprobennahme verglichen. Für die Überwachung der Teilströme von Kläranlagen kann der Referenzkanal mit dem geklärten Abwasser, mit Flußwasser oder Leitungswasser betrieben werden.

### Aufbau des Meßsystems

Die Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau des DF-Algentestgerätes. Sämtliche Flüssigkeitsbewegungen werden über Schlauchpumpen bewirkt, die unter der Kontrolle des im Meßgerät integrierten Steuerungscomputers stehen. Die Pumpen von Referenz- und Probenkanal laufen jeweils synchron.

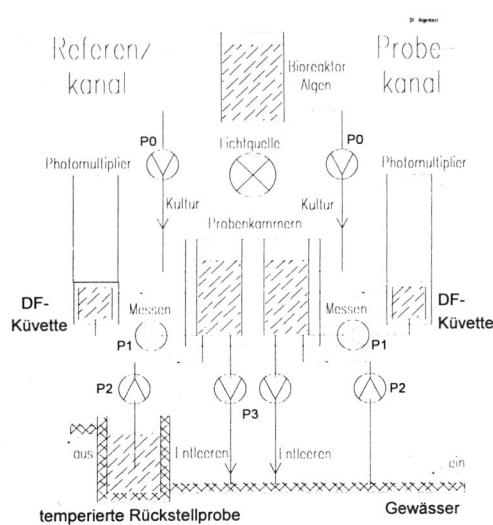


Abb. 4: Schematische Darstellung des DF-Algentestgerätes

Das Übersichtsschema des DF-Algentests zeigt die symmetrische Anordnung der Probenkammern und der Abklingküvetten aus Edelstahl mit den Pumpkreisläufen für den Referenz- und den Probenkanal. Die Schlauchpumpen P0 - P3 werden durch Schrittmotoren angetrieben und sind für genaue Dosierungen vom Rechner gesteuert. Das DF-Signal wird durch Photonenzählung detektiert. Die Pumpe P2 liefert Flußwasser direkt in die rechte Probenkammer, während die linke Probenkammer Referenzwasser aus einem temperierten Rückstellgefäß erhält. Das Rückstellgefäß wird in einem einstellbaren Zyklus (alle 12 Stunden oder kürzer) durch Rückwärtslauf der Probenpumpe mit neuem Flußwasser beschickt. Die direkte Versorgung des Referenzkanals z.B. mit Verdünnungswasser oder Leitungswasser ist ebenfalls möglich. Nach Füllen der Probenkammern mit Referenz- und Probewasser werden die Testalgen aus der Kultur zudosiert (1 Teil Algensuspension auf 9 Teile Referenz- bzw.

Probenwasser) und beleuchtet. Nach einer einstellbaren Inkubationszeit werden durch die Pumpen P1 die DF-Küvetten gefüllt und nach Pumpenstop das Abklingen der DF gemessen. Der Steuerrechner enthält den zweikanaligen Photonenzähler, steuert den zeitlichen Ablauf des Meßvorganges und ist mit einem handelsüblichen PC verbunden, der die Differenz D berechnet, die Meßwerte darstellt, ausdruckt und Meßwerte und Alarne an einen Zentralrechner weiterleitet.

Der Meßzyklus (Abb.5) beginnt damit, daß die Pumpen P2 zur Probennahme anlaufen und circa 60 ml in die Probenkammern fördern. Die Probe für den Referenzkanal wird dem Rückstellprobengefäß entnommen, der Probenkanal wird mit der aktuellen Gewässerprobe beschickt. Das Gefäß für die Rückstellprobe ist mit einem Temperiermantel umgeben, der vom Flußwasser durchstömt wird. Dadurch soll vermieden werden, daß die Rückstellprobe sich aufgrund von Temperaturunterschieden gegenüber dem Flußwasser physikalisch-chemisch verändert. Um restliche Temperaturunterschiede auszugleichen, schließt sich an die Probennahme eine Temperaturadoptionsphase an. Die Edelstahl-Probenkammern sind in einem massiven Aluminiumblock eingebettet, der aufgrund seiner guten Wärmeleitung einen Wärmeaustausch zwischen den Kammern vermittelt.

Während der Temperaturadaption wird der photosynthetisch aktive Chlorophyllgehalt der Gewässeralgen gemessen. Danach werden die Testalgen aus dem Bioreaktor zudosiert (Pumpen P0). Das Mischungsverhältnis Gewässerprobe zu Algenkultur beträgt 1:9. Damit wird der Anteil des Kulturmédiums an der Probe klein gehalten. Die Algen werden nun unter ständiger Belichtung dem Einfluß der Gewässerprobe ausgesetzt. Diese Inkubationsphase dauert 10 Minuten.

Dauer:	30s	100 s	3 s	10 min.	20 s	100 s	30 s
Pumpe 0: Meßkreislauf							
Pumpe 1: Kultur							
Pumpe 2: Probe							
Pumpe 3: Entleeren							
Phase:	Probennahme	Messung Chl.a der Probe	Testalgen zugeben	Inkubation	Abklingküvette füllen	Abklingkurve messen	Probenkammern entleeren

← 3 Wiederholungen →

Abb.5: Ablauf des Meßzyklus im DF-Algentestgerät. Ausgewertet wird die Aufsummierung über drei Abklingkurvenmessungen. Vor Zugabe der Testalgen aus dem Bioreaktor wird der photosynthetisch aktive Chlorophyllgehalt des Gewässers bestimmt.

Zur Messung der Abklingkurven wird die Probe durch die Pumpen P1 im Meßkreislauf in die Abklingküvetten gefördert. Die Pumpen im Meßkreislauf werden schlagartig gestoppt, von da ab wird für jeweils eine Sekunde die Zahl der von der Probe emittierten Photonen registriert. Die Messung der Abklingkurve erstreckt sich über 100 Sekunden. An der gleichen Probe werden 3 Wiederholungsmessungen der Abklingkurve durchgeführt. Das Meßgerät übermittelt über eine serielle Schnittstelle die Meßdaten an einen IBM-kompatiblen PC. Auf diesem läuft ein Programm zur graphischen Darstellung und Auswertung der Meßdaten. Überschreitet die Schadwirkung die

Alarmschwelle, so wird über eine weitere serielle Schnittstelle die Alarmmeldung zu einem Zentralrechner der Meßstation weitergeleitet.

Nach Ablauf des Meßzyklus werden durch gleichzeitigen Lauf der Pumpen P3 der Gruppe "Entleeren" und "Messen" (P1) sowohl die Abklingküvetten als auch die Probenkammern entleert. Damit steht der Apparat für einen neuen Meßzyklus bereit. Der Abstand der einzelnen Meßzyklen beträgt 30 Minuten. Er kann durch Verkürzung der Adoptionsphasen auf 20 Minuten verringert werden. Die Entnahme der Rückstellprobe geschieht in der Regel alle 4 Stunden, kann aber per Programm verändert werden. Für den Einsatz des Gerätes im Labor an Batch-Kulturen im 72h-Zellvermehrungshemmtest nach DIN wird ein anderer Meßzyklus gewählt. Es entfällt die Zumischung der Testalgen aus dem Bioreaktor, die Inkubationsphase und die zwei Wiederholungsmessungen. Dadurch verkürzt sich der Meßzyklus auf 5 Minuten.

In den DF-Algentest ist ein Bioreaktor integriert, der im automatischen Betrieb das Gerät über mehrere Wochen mit Algen versorgt. Der Bioreaktor arbeitet nach dem Prinzip eines Chemostaten und hat ein Fassungsvermögen von 10 l.



Abb. 6:  
Ansicht des DF-Algentests (rechts) mit Bioreaktor für die Algen (links).

Kriterium für die Schadstoffwirkung ist die Flächendifferenz zwischen den Abklingkurven von Referenz und Probe. Hierzu werden die Meßkurven zunächst auf gleiche Anfangshöhe normiert und anschließend voneinander subtrahiert:

$$D = 100 \cdot \frac{\sum_{i=1}^{100} |I_{ref}(i) - I_{prob}(i)|}{\sum_{i=1}^{100} I_{ref}(i)} [\%]$$

$I_{ref}$  : Normierte Fluoreszenzintensität der Referenz  
 $I_{prob}$  : Normierte Fluoreszenzintensität der Probe

Die Differenz wird in Prozent der Fläche unter der Referenzkurve angegeben. Durch die Normierung spielt die absolute Höhe des Signals keine Rolle, nur die Form der Kurven wird verglichen. Damit haben Konzentrationsschwankungen durch unterschiedliche Förderleistung der Pumpen keinen Einfluß auf das Ergebnis. Die Abbildungen 7a-d zeigen Meßbeispiele für die Wirkung von Atrazin auf die DF (Labortests). Dargestellt sind die DF-Abklingkurven und die Differenzkurven. Als Testorganismus wurde *Microcystis aeruginosa* verwendet.

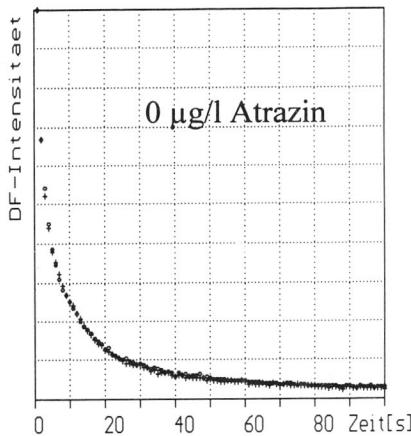


Abb. 7a:

Gleichlaufkontrolle für Probe- und Referenzkanal vor Zugabe von Atrazin. Beide Abklingkurven sind deckungsgleich (oberes Teilbild). Als Bewertungskriterium dient die Differenzkurve (unteres Teilbild). Die Abweichungen zwischen Probe und Referenz sind kleiner als 2 %.

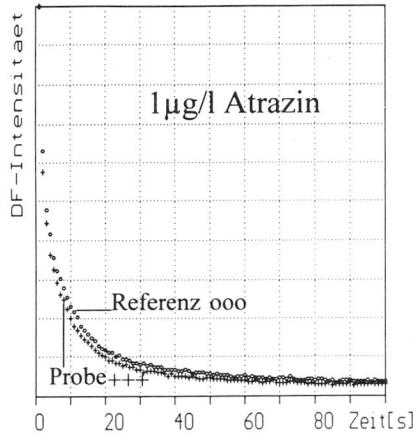


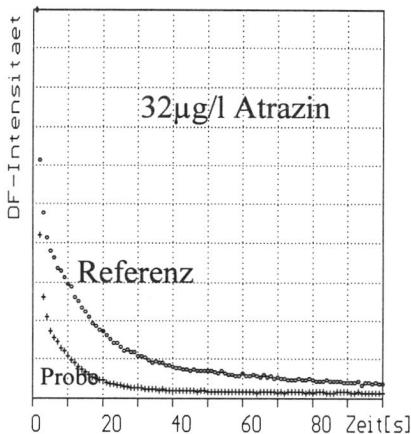
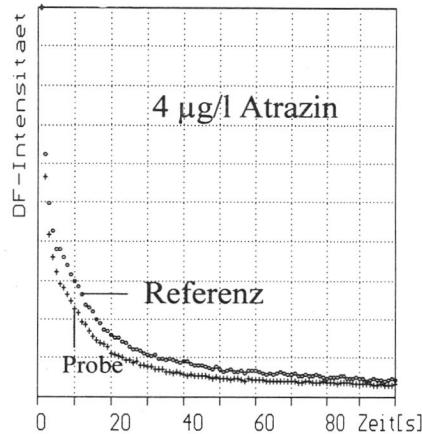
Abb. 7b:

Zugabe von **1 µg/l** Atrazin zum Probekanal (+++); 2 Minuten Einwirkzeit: Die Differenzkurve zeigt positive Abweichungen bis zu **5,5 %** (unteres Teilbild).

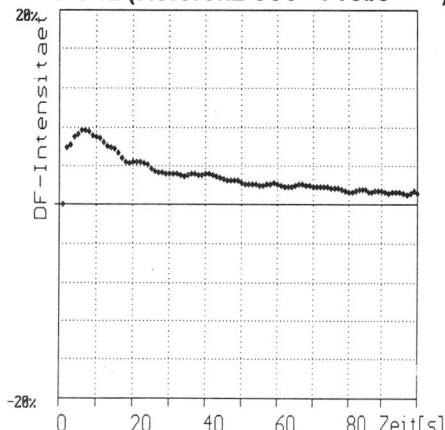
4. Reihe ATRAZIN

4. Reihe ATRAZIN

Bei Zugabe von Atrazin ergeben sich nach 2-minütiger Einwirkzeit Unterschiede zwischen Referenz-(oooo) und Probe-(++++)kanal (siehe Abb. 7b - d).



Differenz (Referenz ooo - Probe +++)



Differenz (Referenz ooo - Probe +++)

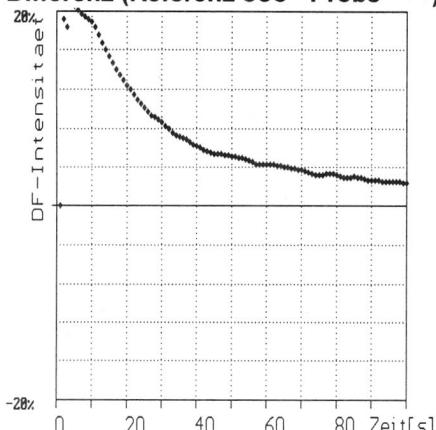


Abb. 7c:

Zugabe von **4 µg/l Atrazin** zum Probe-kanal (++++); 2 Minuten Einwirkzeit: Die Differenzkurve zeigt positive Abweichungen bis zu **8 %** (unteres Teilbild).

Abb. 7d:

Zugabe von **32 µg/l Atrazin** zum Probekanal (++++); 2 Minuten Einwirkzeit. Da Atrazin den Elektronenrückfluß zwischen PQ und Q hemmt, klingt die DF-Kurve schneller ab. Die Differenzkurve zeigt positive Abweichungen über **20 %** (unteres Teilbild).

Es wurden folgende einzellige Algen hinsichtlich ihrer Eignung für das Testverfahren untersucht: *Microcystis aeruginosa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Ansprechgeschwindigkeit der Testorganismen. Die Blaualge *Microcystis aeruginosa* sprach bereits innerhalb weniger Minuten auf sämtliche Chemikalien an. Dagegen erstreckt sich der Anstieg der Wirkung bei den Grünalgen *Scenedesmus subspicatus* und *Chlorella vulgaris* über bis zu zwei Stunden (Abb.8). Sie sind daher für einen Schnelltest auf akute Schadstoffwirkungen weniger geeignet.

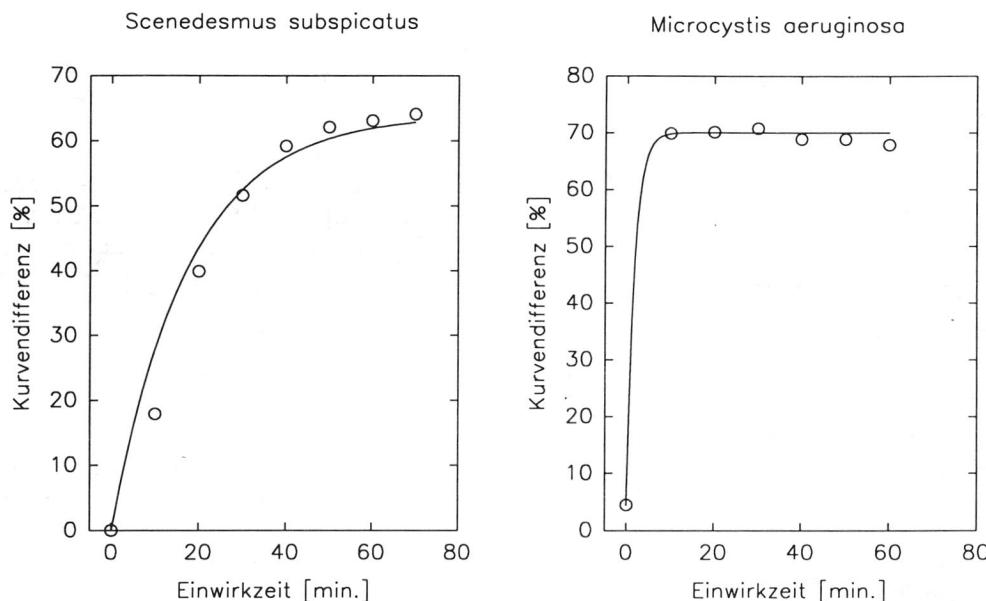


Abb. 8: Zeitlicher Anstieg der Wirkung nach Zugabe von 64 µg/l Atrazin. Die Blaualge *Microcystis aeruginosa* zeigt gegenüber der Grünalge *Scenedesmus subspicatus* ein wesentlich schnelleres Ansprechen auf den Schadstoff.

Bei Versuchen mit weiteren Blaualgenspezies wurde festgestellt, daß diese insgesamt schneller auf die applizierten Chemikalien reagierten als die untersuchten Grünalgen. Die systematisch höhere Ansprechgeschwindigkeit der Blaualgen dürfte auf deren Zellstruktur zurückzuführen sein. Es fehlt gegenüber den Grünalgen die Chloroplastenwand als zweite Diffusionsbarriere für Schadstoffe. Unter den Grünalgen zeigte *Chlamydomonas reinhardtii* die kürzeste Ansprechzeit.

Eine besonders hohe Atrazinsensivität zeigte die Blaualge *Microcystis aeruginosa* mit einem EC10-Wert von rund 1 µg/l und einem EC50-Wert von rund 6 µg/l. Dafür dominiert *Chlamydomonas* in der Empfindlichkeit gegenüber Nitrophenol und Pentachlorphenol. Auch auf das Insektizid Lindan sprach *Microcystis* an.

Die unterschiedliche Wirkung der Testchemikalien äußerte sich nicht nur in der Höhe der Hemmwirkung, sondern es wurden auch charakteristische Verläufe der Abklingkurven erkennbar. In Gegenwart von Atrazin wird die Anfangsintensität der Fluoreszenz gesteigert, anschließend erfolgt ein rascher Abfall unter die Intensität der Referenzprobe. 2-Nitrophenol dämpft selektiv die ansteigenden Komponenten der Abklingkurve.

Effektive Wirkkonzentrationen ermittelt im Laborversuch für verschiedene Testorganismen und Chemikalien und die Schwellenkonzentrationen für Atrazin sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Tabelle 1: Effektive Wirkkonzentrationen

Testorganismus	Chemikalie	EC10 [ $\mu\text{g/l}$ ]	EC20 [ $\mu\text{g/l}$ ]	EC50 [ $\mu\text{g/l}$ ]
Microcystis aeruginosa	Atrazin	1,0	1,8	6,0
	Na-PCP	33,9		223,6
	Lindan	500,0		3200,0
	2-Nitrophenol		3300,0	10500,0
Scenedesmus subspicatus	Atrazin		12,8	25,5
Chlamydomonas rheinhardii	Atrazin	8,5		56,0
	Na-PCP		27,6	90,9
	2-Nitrophenol		1300,0	4000,0

Tabelle 2: Die Schwellenkonzentrationen für den Nachweis von Atrazin.

für Atrazin im Labortest: (gemessen 1990, Laborgerät)	a) Scenedesmus subspicatus	5,7 $\mu\text{g/l}$ Atrazin
	b) Microcystis aeruginosa	1,8 $\mu\text{g/l}$ Atrazin
für Atrazin am Gewässer: (gemessen mit Automat, Aufstockung mit Rheinwasser- Bimmen, 1992)	a) Chlamydomonas reinhardtii	0,4 $\mu\text{g/l}$ Atrazin

### Untersuchungen an einer Kläranlage

Im Labor wurde teilgeklärtes Abwasser aus einer Kläranlage eines Herbizidherstellenden Betriebes untersucht. Als Testorganismus wurde die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet. Als Referenzwasser und zur Verdünnung diente das Verdünnungswasser aus dem Daphnientest. Diesem gegenüber zeigte das

unverdünnte Abwasser eine Kurvendifferenz von rund 70%. Bei der Abwasserprobe ergab sich der für PSII-hemmende Herbizide typische Verlauf der Abklingkinetik der DF. Daraufhin wurde eine Probe des Abwassers mit pulverisierter Aktivkohle geschüttelt und anschließend mit einem Glasfaserfilter abfiltriert. Das filtrierte Abwasser zeigte keinen toxischen Effekt, so daß naheliegt, daß es sich bei den algentoxischen Substanzen im Abwasser um organische Verbindungen (Herbizide) handelt.

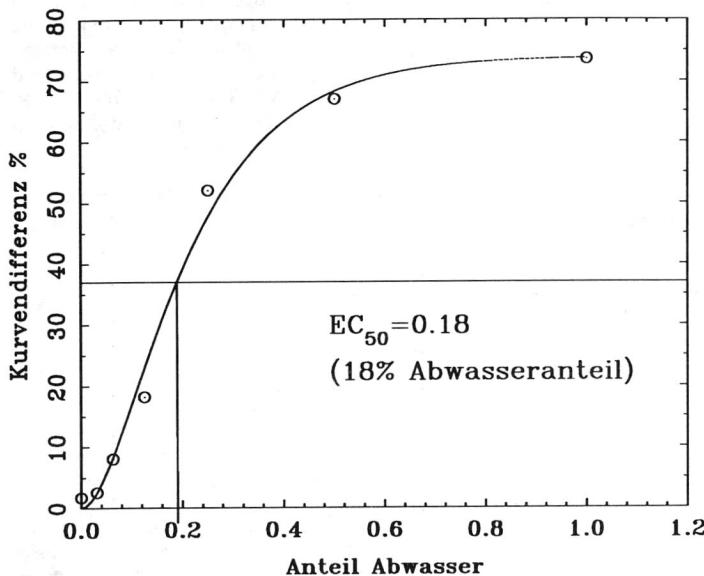


Abb. 9:  
Verdünnungstest mit teilgeklärtem Abwasser mit stark herbizider Wirkung:  
Das unverdünnte teilgeklärte Abwasser hat ein  
Toxizitätsäquivalent von  
140 µg/l Atrazin

Es wurde eine Verdünnungsreihe des teilgeklärten Abwassers vermessen. Die Wirkung lag bis zur 16-fachen Verdünnung über der Alarmschwelle von 6,5% (Abb. 9). 50% Wirkung werden bei einem Abwasseranteil von 18% erreicht. Durch den Vergleich mit dem EC50-Wert für Atrazin ergibt sich, daß das teilgeklärte Abwasser eine Photosynthese-Toxizität besitzt, die einem Gehalt von rund 140 µg/l Atrazin entspricht.

### Betriebserfahrungen am Gewässer

Ein Testgerät des DF-Algentest befindet sich seit Dezember 1991 zur Erprobung am Gewässer. Es konnten wertvolle Betriebserfahrungen gesammelt werden und Vorschläge zur Geräteverbesserung berücksichtigt werden. Die geforderte Standzeit von 7 Tagen wurde erreicht und teilweise übertroffen. Der Wartungsbedarf betrug während der Erprobungsphase ca. 2,5 Stunden/Woche. Als Testorganismus wurde die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet, die dem Bioreaktor (Chemostat) entnommen wird. Gemessen wurde mit einem Abstand von 30 Minuten. In den

folgenden Abbildungen sind einige typische Tagesgänge ohne besondere Vorkommen zur Dokumentation der Stabilität des Nullpunktes dargestellt:

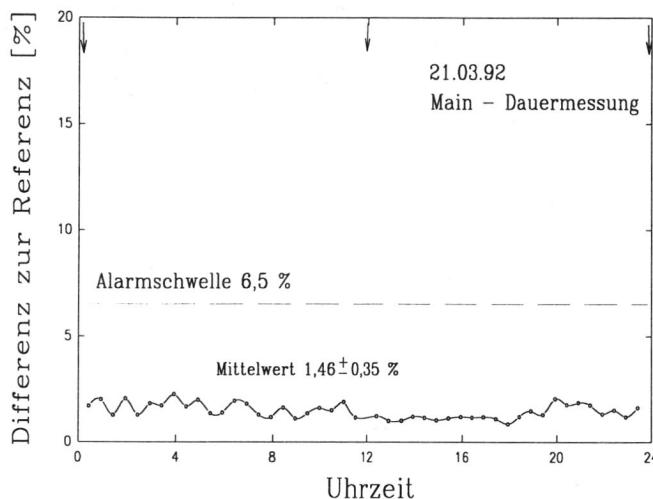


Abb. 10:  
Normalverhalten am Ge-  
wässer:

Standort Höchst, Main, Tagesgang vom 21.3.92 mit geringer Streuung des Nullpunktes. Die Normalwerte mit einem Mittelwert von  $(1,46 \pm 0,35)\%$  liegen deutlich unter der Alarmschwelle von 6,5%. Die senkrechten Pfeile markieren den Zeitpunkt des Referenzwasser-Wechsels (hier alle 12 Stunden)

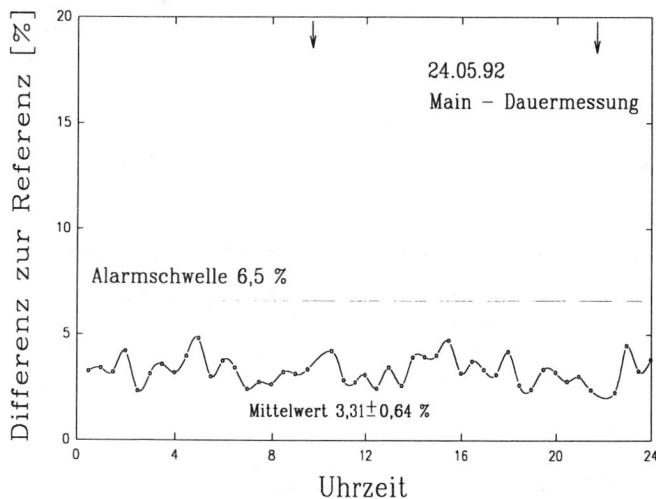


Abb. 11:  
Normalverhalten nach mehr-  
monatiger Betriebszeit.

Durch die Abnutzung der Pumpen-Schläuche zeigt sich ein leicht verschlechtertes Nullpunktsverhalten: Der Mittelwert liegt jetzt bei  $3,31 \pm 0,64\%$ . Aus diesen aktuellen Werten errechnet sich folgende "Tagesalarmschwelle": Mittelwert +  $3 \cdot s = 3,31\% + 3 \cdot 0,64\% = 5,23\%$ . Sie liegt noch unter der im Gerät gespeicherten Alarmschwelle von 6,5%.

## Messungen mit Alarmmeldungen

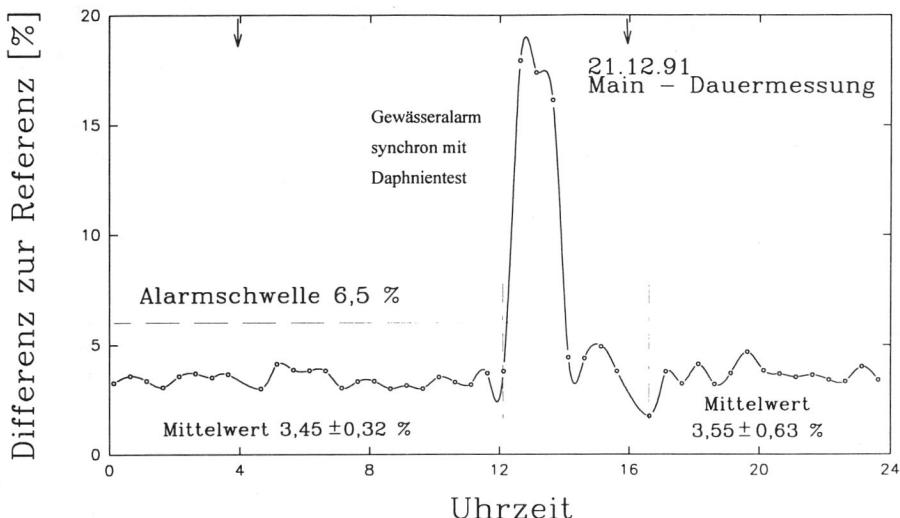


Abb. 12: Tagesgang vom Sonnabend, den 21.12.1991, (Main): Für drei Messungen zwischen 12.38 und 13.38 Uhr wird die Alarmschwelle überschritten. Der Alarm wird ebenfalls vom Daphnien-Monitor, nicht aber vom Fischtest angezeigt.

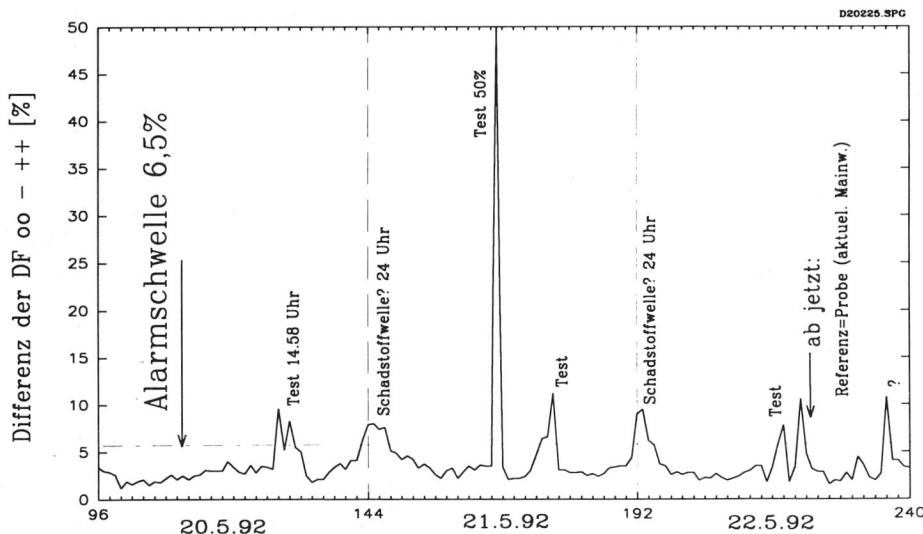


Abb. 13: Tagesgänge vom 20.5. bis 22.5.92: In einem mobilen Meßcontainer wurden verschiedene Tests durchgeführt (H. Puzicha und I. Kolland, Landesamt für Wasserwirtschaft Rheinland Pfalz): z.B. ergibt der Test mit Herbizid-belastetem Wasser mit 50% Differenz sehr deutliche Signale. Jeweils ab 24.00 Uhr am 20.5. und am 21.5.92 treten mehrmalige Überschreitungen der Alarmschwelle auf, deren Ursache unbekannt sind.

## Aufstockungsexperimente in der Wasserkontroll-Station Bimmen

Für den Vergleich verschiedenen Algentestgeräte unter gleichen Bedingungen wurden am 18. und am 19. 8. 1992 in der Wasserkontrollstation Bimmen am Rhein Aufstockungsexperimente mit Rheinwasser durchgeführt. Alle Algentests verwendeten *Chlamydomonas rheinhardii*, die aus einem Bioreaktor entnommen wurden. Der Testansatz wurde für alle aus Rheinwasser und einer ATRAZIN-Stammlösung hergestellt. Es wurden vier Wiederholungsmessungen für eine Konzentrationsstufe mit dem gleichen Ansatz nacheinander ausgeführt.

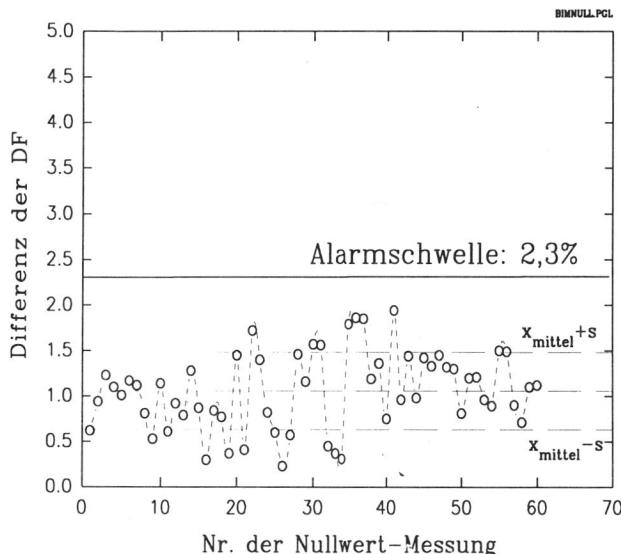


Abb. 14:  
Bestimmung des Nulleffekts  
für die Aufstockexperimente  
in Bimmen mit Rheinwasser.

**Mittelwert:**  
1,05%

**Standardabweichung:**  
0,42 %

**Alarmschwelle:**  
2,3%

Der DF-Algentest wurde am 17.8.92 installiert, um über Nacht den Nulleffekt zu ermitteln. Auch am nächsten Tag wurden über Nacht Nulleffektmessungen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 14 dargestellt. Aus Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung des Nulleffekts ergibt sich die Alarmschwelle zu 2,3%.

Mit den Daten der Aufstockexperimente wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve gezeichnet. (Siehe Abb. 15). Die Meßwerte der Wiederholungen bei gleicher Konzentration zeigen sehr geringe Streuung (siehe Fehlerbalken in Abb. 15).

Durch die Meßpunkte wurde eine einfache-exponentielle Sättigungsfunktion als Fitfunktion gelegt. Die EC-Werte wurden aus den Fitparametern berechnet. Die Angabe der Standardabweichung der EC-Werte stammen ebenfalls aus der Standardabweichung der Fitparameter.

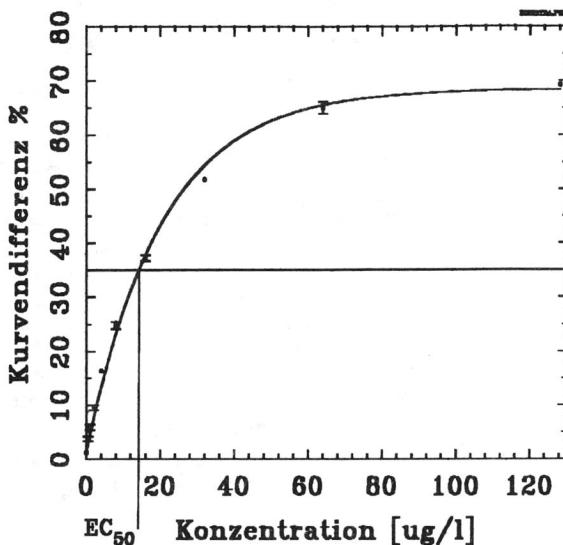


Abb. 15:

Aufstockungsexperiment mit Rheinwasser in Birmen: Konzentrations-Wirkungskurve für Atrazin.

$$EC_{50} = 14,6 \pm 1,2 \mu\text{g/l}$$

$$EC_{20} = 4,6 \pm 0,4 \mu\text{g/l}$$

$$EC_{10} = 2,2 \pm 0,2 \mu\text{g/l}$$

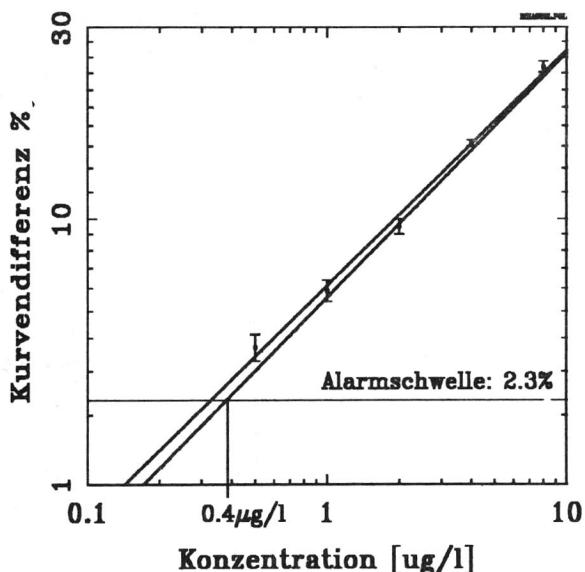


Abb. 16:

Bestimmung der Nachweisschwelle aus dem Schnittpunkt zwischen Alarmschwelle (2,3%) und der Fitgeraden durch die unteren Enden der Fehlerbalken.

Die Nachweisschwelle liegt bei  $0,4 \mu\text{g/l}$  ATRAZIN.

Zur Bestimmung der Nachweisschwelle wurde der Kurvenbereich niedriger Atrazin-Konzentrationen durch eine Probit-Darstellung linearisiert (Abb. 16). Aus dem Schnittpunkt zwischen der Alarmschwelle von 2,3% und der Fitgeraden durch die unteren Enden der Fehlerbalken ergibt sich eine Nachweisschwelle von  $0,4 \mu\text{g/l}$  ATRAZIN.

Verglichen mit unseren im Labor gewonnenen Daten ist diese im Aufstockexperiment mit Rheinwasser gewonnene Nachweisschwelle sehr niedrig. Dieses hat zwei Gründe:

1. Im Labor wurden stets unabhängige Verdünnungsreihen an verschiedenen Tagen durchgeführt. Damit ist der Einfluß der Dosierungsgenauigkeit beim Herstellen der entsprechenden Schadstoff-Konzentration und die Schwankung der Kulturempfindlichkeit in den Labordaten im Gegensatz zu den Aufstockexperimenten enthalten. Durch die größere Streuung der Labordaten liegt die Nachweisschwelle höher.
2. Für die Chemikaliertest im Labor, die vor ca. 2 Jahren durchgeführt wurden, wurde eine Laborversion des DF-Algentests verwendet. Dieses Gerät zeigte größere Nullpunktsschwankungen, da es noch nicht mit der vollautomatischen Zudosierung für die Testalgen und das Referenz- bzw. Probenwasser ausgerüstet war. Außerdem konnte der Gleichlauf zwischen beiden Kanälen durch geänderte Elektronik und Temperierung für die jetzt verwendete Version des DF-Algentests verbessert werden.

## **Danksagung**

Dieses Projekt wurde vom Bundesminister für Forschung und Technologie (Forschungs-vorhaben 0339299b) gefördert.

Wir danken dem BMFT für die großzügige Förderung und dem Umweltbundesamt Berlin, insbesondere Herrn Dr. U. Irmer, für die Unterstützung dieses Projektes.

## **Literatur:**

1. IRMER, U.: Biologische Warnsysteme zur Erfassung von Störfällen am Rhein. In: K. G. Steinhäuser und P.-D. Hansen (Hrsg) Biologische Testverfahren, Gustav Fischer Verlag Stuttgart/New York, Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, 89, 1992, 203 - 210
2. STREHLER, B.L., ARNOLD, W.: Light Production by Green Plants, J. Gen. Physiol., 34, 1951, 809 - 820
3. GERHARDT, V. KRAUSE, H.: Delayed Fluorescence of Algae, J. of Luminescence, 31 & 32, 1984, 895 - 898 und  
KRAUSE, H., GERHARDT, V.: Application of Delayed Fluorescence of Phytoplankton in Limnology and Oceanography, J. of Luminescence 31 & 32, 1984, 888 - 891
4. KRAUSE, H., GERHARDT, V., GEBHARDT, W. Verzögerte Fluoreszenz lebender Pflanzenzellen, Physik in unserer Zeit, 15, 1984, 182 - 190

5. HOFFMANN, D., PUTZGER, J., GERHARDT, V.: A Comparison between the Kinetics of Oxygen- and Fluorescence-Induction of Chlorella Algae, in M. Maltscheffsky (Hrsg), Current Research in Photosynthesis, Proceedings of the VIIIth International Conference on Photosynthesis Stockholm, Sweden, 1989, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/ London, Vol. I, 1990, 853 - 860
6. GERHARDT, V. und KRETSCH, G.: Entwurf eines Biotestverfahrens zum Schadstoffnachweis mittels der verzögerten Fluoreszenz von Algen. In: D. Ernst und C. Schmidt (Hrsg): Grundlagen und Anwendungsbereiche der Chlorophyllfluoreszenz. Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung 37, 1989, 87 - 95
7. DIN 38412 Teil 33: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L); Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus Zellvermehrungs-Hemmtest) über Verdünnungsstufen (L33). Beuth-Verlag, Berlin, 1989



# Regensburger Leuchtbakterientest - Erweiterung des DF-Algentests zum on-line-Monitor mit *Bacterium Phosphoreum*

J.Putzger und V.Gerhardt

## Einleitung

Bestimmte Meeresbakterien wie *photobacterium phosphoreum* sind in der Lage, einen Teil ihrer Stoffwechselenergie in Licht umzusetzen. Die Leuchtreaktion kann als ein Nebenweg der aeroben Atmung angesehen werden. Schadstoffe, die die Atmung blockieren, führen zu einer Verminderung des Leuchtens. Hierauf beruht der Abwassertest mit Leuchtbakterien nach DIN 38412 Teil 34. Kriterium für die Toxizität der Probe ist die Hemmung des Leuchtens im Vergleich zu einer unbelasteten Referenzprobe. Die zur Durchführung eines Leuchtbakterientests nötige Meßtechnik ist ähnlich der zur Messung der verzögerten Fluoreszenz von Algen. Ein Versuch, die Signale der Leuchtbakterien mit einem DF-Algentestgerät zu messen, verlief erfolgreich, und so wurde beschlossen, den DF-Algentest zum Leuchtbakterientest zu erweitern. Bei der Entwicklung des Leuchtbakterientests konnte weitgehend auf die bewährte Technik des DF-Algentests zurückgegriffen werden. Die folgenden Arbeiten mußten durchgeführt werden, um den DF-Algentest zum Leuchtbakterientest zu modifizieren:

- Der Algenkulturautomat wurde durch eine Vorratshaltung für eine Leuchtbakterienkultur ersetzt.
- Da Leuchtbakterien marine Organismen sind, mußte eine Einrichtung zur Zudosierung von Salzlösung zugefügt werden.
- Die Software des Testgeräts wurde dem anderen Testablauf angepaßt.

## Summary

The sensitive light detectors needed to measure the delayed fluorescence of algae are also capable of detecting the light emission of luminescent bacteria. Therefore we attempted to convert our biomonitor "DF-Algentest" based upon the delayed fluorescence of green algae into a luminescent bacteria test. Luminescent bacteria of the species *photobacterium phosphoreum* are grown in batch cultures and stored at +3°C in a peltier-cooled chamber.

The apparatus has two identical measurement channels: One for the sample and one reference channel operating with pure water. Every 30 minutes a new sample is taken from the river and mixed with concentrated salt solution. Then luminescent bacteria are added. A sample of pure water is treated in the same way in the reference channel of the apparatus. The light intensity is measured every 30 seconds by single photon counting over a time period of 15 minutes. The shape of the luminescence curves are compared. If the deviation exceeds the preset limit, an alarm report is generated. The sensitivity of the apparatus is similar to the static luminescent bacteria test. The minimum detectable concentration of Pentachlorphenolate is 50µg/l at a detection probability of 84%.

## Aufbau des Testgerätes

Abbildung 1 zeigt ein Photo des Gerätes, dessen Aufbau in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist. Im oberen Teil des Gerätes befinden sich der Kühlthermostat für den Leuchtbakterienvorrat und die Dosierpumpe für die Leuchtbakterien. Diese werden als Batchkultur gezogen und nach dreitägiger Anwachphasen in den Kühlthermostaten überführt. Die Flasche mit dem Leuchtbakterienvorrat für eine Woche (80ml) befindet sich in einem durch Peltierelemente gekühlten Metallblock. Ein elektronischer Thermostat hält die Temperatur auf 3°C konstant. Unter der Temperaturanzeige befinden sich die Stellknöpfe für die Temperatur. Rechts neben der Anzeige befindet sich eine zweikanalige Schlauchpumpe zur Dosierung der Leuchtbakterien. Die Leuchtbakterien werden aus der Vorratsflasche, die in die obere Abdeckung des Gerätes eingelassen ist, angesaugt und nach unten in die Mischkammern gefördert.

Unter der Leuchtbakterienvorratshaltung befindet sich das eigentliche Meßsystem. Der Apparat ist symmetrisch in einen Referenzkanal (links) und Probenkanal (rechts) aufgeteilt. In der Mitte befinden sich die Probenmischkammern. Darum gruppiert sind die Förderpumpen. Die oberste Pumpengruppe (jeweils linke und rechte Pumpe) dient der Zudosierung von Salzlösung. Die zweite Pumpengruppe von oben fördert das Referenz- bzw. Probenwasser. Die dritte Pumpengruppe von oben fördert den Testansatz in die Meßkammern im Inneren des Gerätes. Die unterste Pumpengruppe schließlich entleert die Mischkammern.

Der RBT belegt eine Stellfläche von 50x50 cm bei einer Höhe von 60 cm. Neben dem Gerät wird noch Stellfläche für einen 50 Liter Referenzwasserkanister und einen 5 Liter Salzlösungskanister benötigt. Das Gerät benötigt fließendes Probenwasser aus der Ringleitung der Meßstation.

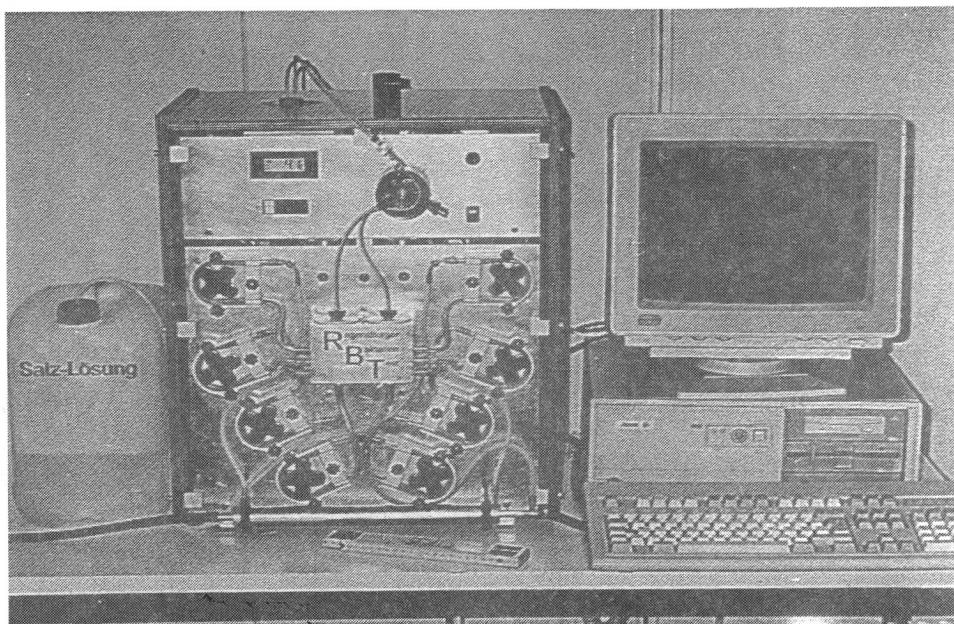


Abb.1: Das Leuchtbakterientestgerät im Labor. Das eigentliche Meßsystem ist identisch mit dem DF-Algentest, darüber befinden sich die thermostasierte Vorratshaltung und die Förderpumpe für die Leuchtbakterienkultur. Die Schlauchpumpen sind rings um die Probenmischkammern angeordnet, um die Schlauchlängen möglichst kurz zu halten.

### Ablauf der Messung

Abbildung 3 stellt schematisch den Ablauf der Messung dar. Die Messung beginnt mit dem Befüllen der Kammern für Probe und Referenzprobe. Als Referenzprobe wird entionisiertes Wasser aus einem Vorratsgefäß verwendet. Anschließend wird eine 22%ige Salzlösung im Verhältnis 1:9 zudosiert. Da die Intensität der Lumineszenz stark temperaturabhängig ist (Optimum bei 20°C), schließt sich eine Temperaturausgleichsphase an. Dabei führt der die Probenkammern umgebende Metallblock zu einem Temperaturangleich von Referenz und Probe. Erst dann werden die Leuchtbakterien zudosiert. Sofort nach Zugabe der Leuchtbakterien wird ein Teil des Volumens von den Mischküvetten in die Meßkammer gepumpt. Nun wird über einen Zeitraum von 15 Minuten alle 30 Sekunden die Lumineszenzintensität von Referenz und Probe gemessen. Die Intensitäten werden auf dem Bildschirm als Funktion der Zeit grafisch dargestellt (Abb.4). Alle Rohdaten werden im Meßcomputer gespeichert. Nun folgt die automatische Auswertung des gemessenen Intensitätsverlaufs. Das Programm entscheidet, ob die eingestellte Alarmschwelle überschritten wurde. Die Ergebnisse werden auf einem fortlaufenden

Protokollausdruck festgehalten. Das Testergebnis sowie eine eventuelle Alarmsmeldung können über eine serielle Datenleitung weitergegeben werden. Schließlich wird der Meßzyklus mit dem Entleeren und Spülen der Probenkammern beendet.

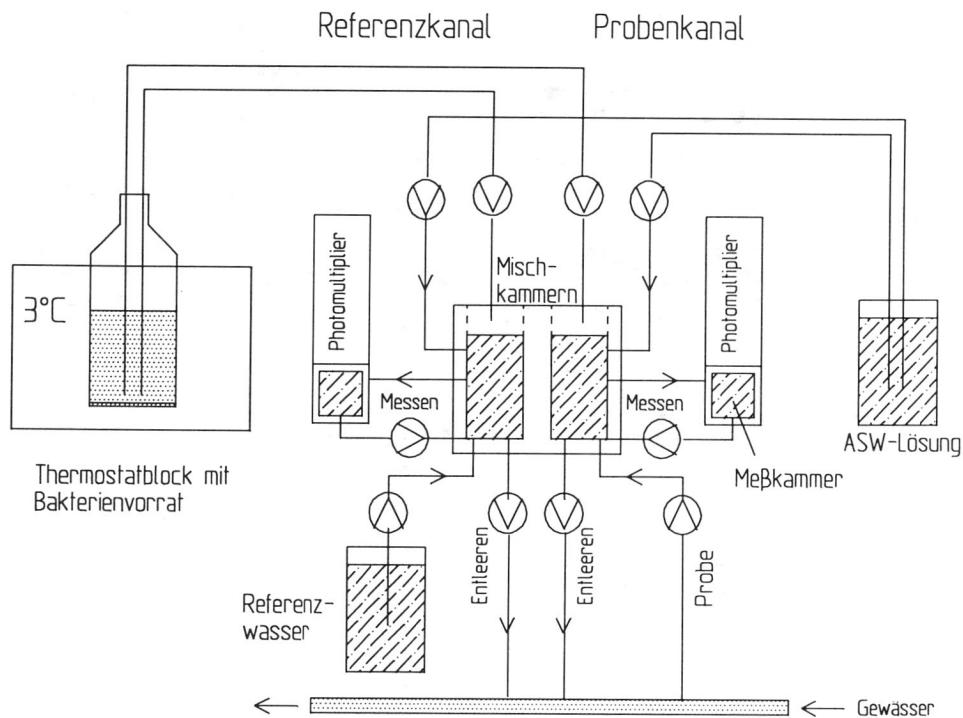


Abb.2: Schematische Darstellung des Regensburger Leuchtbakterientests. Der Apparat besitzt zwei identische Meßkanäle für Referenz und Probe. Die Probe wird dem Gewässer entnommen, die Referenz aus einer Vorratsflasche mit Reinwasser. Der Leuchtbakterienvorrat für eine Woche befindet sich in einem Thermostatblock bei einer Temperatur von 3°C.

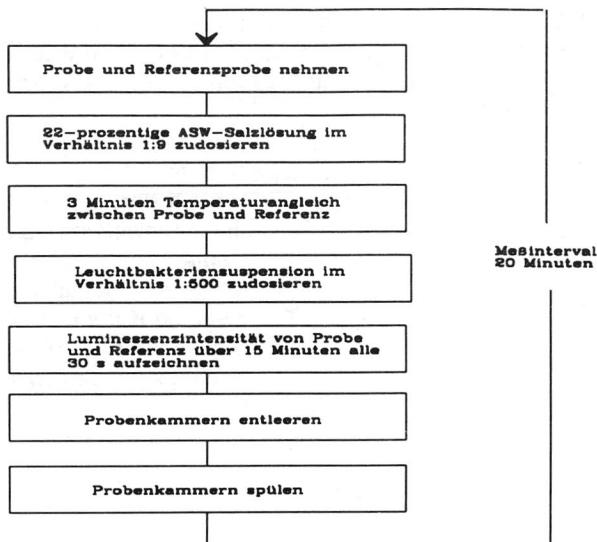


Abb.3:  
Ablauf des automatisierten Meßzyklus. Die Gesamtdauer beträgt 20 Minuten, so daß Messungen minimal in diesem Abstand stattfinden können.

## Auswertung der Lumineszenzkurven

Zur Auswertung der Meßsignale wurde das Auswertverfahren aus dem DF-Algentest übernommen. Wie beim Algentest dient die Fläche, die von den beiden Lumineszenzkurven von Referenz und Probe eingeschlossen wird, als Maß für die Wirkung. Dazu werden beide Kurven zunächst auf gleiche Anfangshöhe normiert. Dann wird die Summe über alle Differenzen der normierten Intensitäten von Referenz und Probe gebildet. Das Ergebnis wird in Prozent der Gesamtfläche unter der Referenzkurve angegeben:

$$D = 100 \cdot \frac{\sum_{i=1}^{100} |I_{\text{ref}}(i) - I_{\text{prob}}(i)|}{\sum_{i=1}^{100} I_{\text{ref}}(i)} [\%]$$

D : Differenz  
 I<sub>ref</sub>: Normierte Lumineszenzintensität  
     der Referenz  
 I<sub>prob</sub>: Normierte Lumineszenzintensität  
     der Probe

Sind die Kurven identisch, ist die Flächendifferenz Null. Sie wird umso größer, je stärker die Kurven voneinander abweichen. Bei diesem Verfahren wird im Gegensatz zur Auswertung nach DIN der gesamte Verlauf der Lumineszenzintensität während der Einwirkdauer in die Auswertung einbezogen.

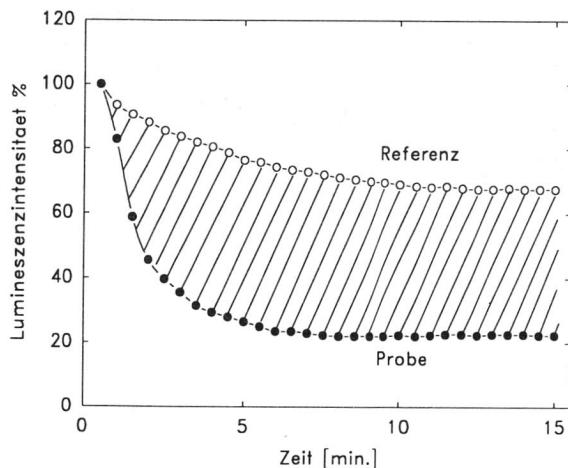


Abb. 4:  
Verlauf der Lumineszenzintensität unter Einwirkung von 200 $\mu$ g/l Na-Pentachlorphenolat. Ohne Einwirkung von Schadstoffen wird ein gleicher Kurvenverlauf in beiden Meßkanälen erwartet. Maß für die Wirkung ist die zwischen beiden Kurven eingeschlossene, hier schraffierte Fläche.

## Ergebnisse der Chemikalentests im Labor

Mit dem Gerät wurden Chemikalentests im Labor mit den Schadstoffen Na-PCP (Natrium-Pentachlorphenolat) und 2-Nitrophenol durchgeführt, um die Nachweisempfindlichkeit zu ermitteln. Neben der Reaktion auf die Schadstoffe ist der Nulleffekt, das heißt die natürliche Schwankung der Meßwerte in Abwesenheit von Schadstoffen, maßgebend für die Nachweisempfindlichkeit. In einer längeren Meßreihen ohne Schadstoffzugabe schwankte der Nulleffekt zwischen ein bis vier Prozent Flächendifferenz. Es ergab sich ein Mittelwert des Nulleffekts von 2.3% bei einer Standardabweichung von 1.0%. Nach den Richtlinien der Arbeitsgruppe "Wirkungstests Rhein" resultiert hieraus eine Alarmschwelle von Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung, gleich 5.3%. Die Wirkung der Schadstoffe wurde in vier unabhängigen Testreihen bestimmt. Abbildung 5 zeigt die Lumineszenzkurven einer Testreihe mit Na-PCP. Die Lumineszenzintensität wird ab 50 $\mu$ g/l deutlich sichtbar gehemmt. Aus den vier Testreihen wurden Mittelwert und Standardabweichung der Wirkung berechnet und als Konzentrations/Wirkungsbeziehung dargestellt (Abb.6). Es ergab sich ein EC<sub>50</sub>-Wert von 50 $\mu$ g/l Na-PCP. Die Bestimmung der Nachweischwelle zeigt Abbildung 7. Als Nachweisschwelle wurde diejenige Konzentration betrachtet, bei der die Wirkung um die einfache Standardabweichung der Wirkung über der Alarmschwelle liegt. Dies bedeutet, daß bei Vorliegen dieser Konzentration, die Alarmschwelle mit 84-prozentiger Wahrscheinlichkeit überschritten wird. Die Auswertung in Abb.7 ergibt eine Nachweisschwelle von 50 $\mu$ g/l Na-PCP.

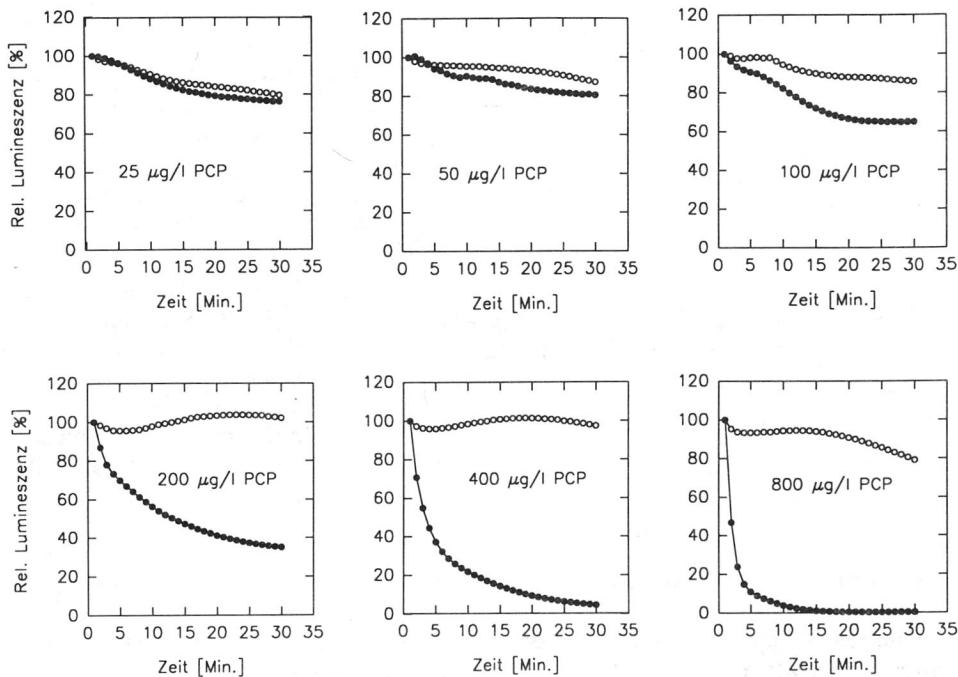


Abb.5:Lumineszenzkurven einer Testreihe mit Na-PCP. Die Einwirkzeit betrug 30 Minuten. Symbole: • = Probe, ° = Referenz. Die Wirkung beginnt sich bei 50µg/l deutlich vom Nulleffekt abzuheben. Die Sättigung der Wirkung wird ab etwa 800µg/l erreicht.

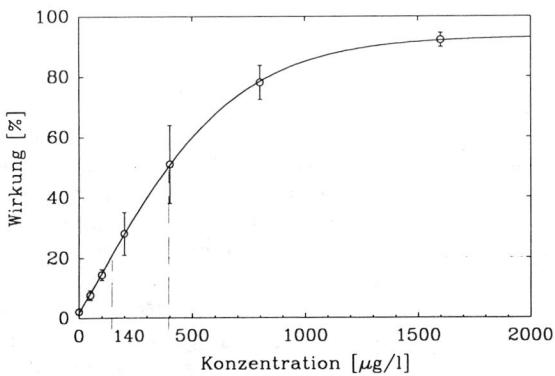
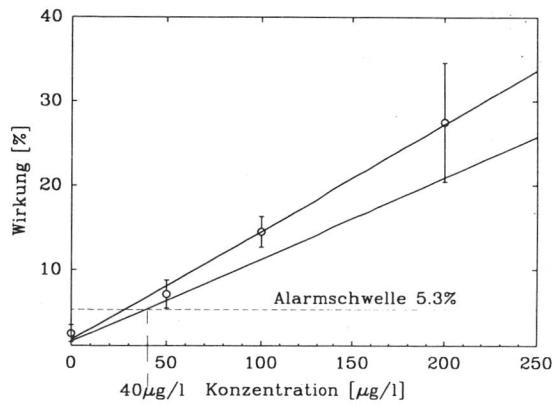


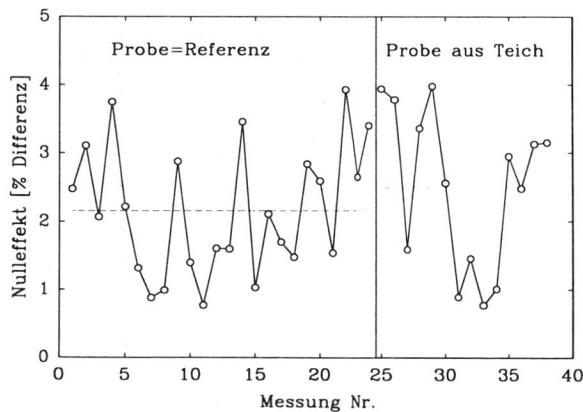
Abb.6:  
Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Na-PCP bei 15 Minuten Einwirkdauer. Es ergibt sich eine EC<sub>50</sub> von 400µg/l sowie EC<sub>20</sub> von 140µg/l. Diese Werte liegen im Rahmen der in der Literatur genannten Werte für den statischen Leuchtbakterientest.



**Abb.7:**  
Bestimmung der Nachweigrenze für Na-PCP nach den Richtlinien der Arbeitsgruppe "Wirkungstests Rhein". Die untere Gerade liegt um die einfache Standardabweichung unter dem Mittelwert der Wirkung. Die Nachweigrenze liegt am Schnittpunkt mit der Alarmschwellen. Da eine Extrapolation nicht zulässig ist, gilt die Konzentration des ersten Meßpunktes oberhalb des Schnittpunktes (50µg/l) als Nachweigrenze.

### Testergebnisse mit Gewässerproben

Erfahrungen im Dauerbetrieb mit dem Gerät am Gewässer liegen derzeit (Mai 1993) noch nicht vor. Es wurden aber Versuche unternommen, um abzuschätzen, inwieweit der Nulleffekt durch natürliche Wasserproben beeinflußt wird. Dazu wurden, wie in Abbildung 8 dokumentiert, zunächst Nulleffektmessungen mit entionisiertem Wasser als Probe durchgeführt. Dann wurde diese durch eine Schöpfprobe aus einem Gewässer ersetzt. Dabei zeigte sich stets nur eine geringe Zunahme des Nulleffekts. Dies ist bemerkenswert, da es sich in Abbildung 8 um eine Probe aus einem Teich mit hohem Phytoplanktongehalt handelte, und daher eine Störung durch die verzögerte Fluoreszenz von Algen zu erwarten war. Versuche ohne Zugabe von Leuchtbakterien zeigten jedoch, daß die Algen in der Probe durch die hohe Salzkonzentration so geschädigt werden, daß sie keine verzögerte Fluoreszenz mehr emittieren.



**Abb. 8:**  
Einfluß einer Gewässerprobe mit hohem Phytoplanktongehalt auf den Nulleffekt. Zunächst wurde sowohl im Referenz- wie auch Probenkanal entionisiertes Wasser verwendet. Beim Wechsel auf die Gewässerprobe erhöht sich der Mittelwert des Nulleffekts (gestrichelte waagerechte Linie) nur geringfügig.

Weiterhin wurden mit dem Gerät Aufstockungsexperimente mit Rheinwasser durchgeführt. Hierbei wurden die Gewässerproben mit Na-PCP in verschiedenen Konzentrationen aufgestockt. Auch im Rheinwasser ergab sich eine Nachweisschwelle von 50µg/l Na-PCP.

### **Zusammenfassung**

Aufbauend auf der Technik des DF-Algentests wurde ein kontinuierlicher Leuchtbakterientest zur Gewässerüberwachung entwickelt. Die damit erreichte Empfindlichkeit gegenüber den untersuchten Schadstoffen liegt im Bereich des statischen Leuchtbakterientests. Die Nachweisschwelle für Na-PCP beträgt 50µg/l. Das Testgerät lässt sich mit wenigen Handgriffen von Leuchtbakterientest auf Algentest umstellen. Somit ergibt sich die Möglichkeit, Bioteests auf zwei verschiedenen Trophieebenen mit demselben Gerät durchzuführen.

**Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für die Bereitstellung von Fördermitteln zur Entwicklung des Leuchtbakterientests.**



# Automatische Biotestsysteme zur kontinuierlichen Rheinüberwachung: Biolum, ein kontinuierlicher Leuchtbakterientest, und FluOx, ein Algenteestautomat

C. Merschhemke

## Zusammenfassung

Zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung wurde je ein Algen- und ein Leuchtbakterientestautomat entwickelt. Beim Algenteestautomaten werden Sauerstoff- und Fluoreszenzsignale einzelliger Blau- oder Grünalgen synchron erfaßt. Testkriterium beim Leuchtbakterientestautomaten ist die Biolumineszenz von Photobakterien. Alle Ablaufschritte sind vollautomatisch geregelt. Beide Testsysteme haben eine Standzeit von mindestens 10 Tagen.

## Summary

Two automated tests using algae and luminescent bacteria have been developed for continuous water quality monitoring. In the automated test using algae, oxygen and fluorescence signals of single-cell blue-green or green algae are recorded synchronically. In the automated test using luminescent bacteria, the bioluminescence of photobacteria is taken as a test criterion. All steps in the process are completely automatic. Both test systems have a maintenance-free period of at least 10 days.

## Einleitung

Der Schutz der Gewässer vor Umweltbelastungen gerät in zunehmendem Maße ins Bewußtsein der Öffentlichkeit. Obwohl sich die Wasserqualität des Rheins in den letzten Jahren aufgrund verbesserter technischer Maßnahmen der Gemeinden und der Industrie gebessert hat, hat doch der Sandoz Unfall im November 1986 in drastischer Weise gezeigt, wie empfindlich das Rheinökosystem auf Gewässerverunreinigungen reagiert. Aufgrund dieser Erfahrungen sollen Biologische Frühwarnsysteme die bestehende chemisch-physikalische Rheinüberwachung ergänzen.

Am Landesamt für Wasser und Abfall des Landes Nordrhein-Westfalen wurden in Kooperation mit der Kolibri GmbH (Hattingen, Ruhr) je ein Algen- und ein Leuchtbakterientestautomat entwickelt.

Ein wesentlicher Vorteil biologischer Frühwarnsysteme gegenüber chemischen Analyseverfahren liegt darin, daß plötzliche Veränderungen der Wasserqualität nahezu ohne Zeitverzögerung nachgewiesen werden können.

Prinzipiell besteht eine unbegrenzte Nachweismöglichkeit drastischer Konzentrationserhöhungen von Einzelstoffen oder Stoffgemischen durch biologische Testsysteme. Da Organismen unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit auf toxische Substanzen unterschiedlich empfindlich reagieren, ist es sinnvoll, Organismen aus verschiedenen trophischen Stufen einzusetzen, um ein möglichst engmaschiges Überwachungsnetz zu konstruieren.

Algen sind in der letzten Zeit in den Ruf geraten, durch ein Massenaufkommen in anthropogen beeinflußten Gewässern zusätzliche Belastungen hervorzurufen. Das Aufkommen massiver Algenblüten in den Gewässern führt dabei zu organischer Belastung und zur Sedimentbildung und in deren Folge zur Bildung anaerober Gewässerbereiche, zu Fischsterben und zu Hautreizungen beim Menschen.

Auf der anderen Seite tragen Algen zur Selbstreinigung der Gewässer bei, indem sie Sauerstoff produzieren und dem Wasser Nährstoffe entziehen, die sie zum Aufbau ihrer Biomasse benötigen. Sie sind die wichtigsten Primärproduzenten der Gewässer, die mit Sonnenenergie aus anorganischen Nährstoffen organisches Substrat produzieren und damit eine grundlegende Bedeutung für das aquatische Nahrungsnetz einnehmen.

Auf der Basis physiologischer Parameter ist ein Algentestautomat zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung entwickelt worden, mit dessen Hilfe Gewässerverunreinigungen schnell, empfindlich und reproduzierbar nachgewiesen werden sollen [1]. Als Grundlage für einen automatisierten Biotest wurden schnell registrierbare Änderungen im Algenmetabolismus gewählt. Dabei interessierten vor allem Einflüsse auf den Photosyntheseapparat. Die photosynthetische Aktivität wird durch kombinierte Messung von Fluoreszenz- und Sauerstoffsignalen der zum Test eingesetzten Algen bestimmt. Durch die Erfassung der Fluoreszenzinduktionskurve und der Sauerstoffbildungsraten können theoretisch nahezu alle Informationen über den Zustand des Photosyntheseapparates entschlüsselt werden. In Analogie zum EKG oder EEG der Medizin könnten die mit dem Testsystem gewonnenen Signalmuster als "Fluoroassimilatogramm" [2] bezeichnet werden.

Erwartungsgemäß werden mit dem Algentestautomaten vor allem Herbizide empfindlich nachgewiesen. In Deutschland gibt es zur Zeit etwa 3000 zugelassene Herbizide mit 300 Wirkstoffen. Schätzungen gehen davon aus, daß die Zahl der Metabolite der 300 Wirkstoffe bei einigen 1000 liegt [3]. Der Grenzwert der Trinkwasserverordnung (gemäß der am 1.10.1989 in Kraft getretenen Trinkwasserordnung darf für die Summe der PBSM ein Grenzwert von 0,5 µg/l und für die Einzelstoffe ein Wert von 0,1 µg/l nicht überschritten werden) bezieht sich auch auf diese Hauptabbauprodukte.

Beim Leuchtbakterientest macht man sich die Tatsache zunutze, daß biolumineszierende Bakterien einen Teil ihrer Stoffwechselenergie in einer enzymatischen Reaktion zur Lichtemission nutzen. Es ist bereits seit etwa 100 Jahren bekannt, daß Gifte die Biolumineszenz von Leuchtbakterien verringern. Mit einem automatischen Leuchtbakterientest wird daher die durch Schadstoffe induzierte Abnahme der Leuchttintensität gemessen.

## Beschreibung der Testsysteme

### A. Algentestautomat

Tests werden mit einzelligen Grün- oder Blaualgen durchgeführt. Aus einem Algenfermenter wird Algensuspension zusammen mit dem zu untersuchenden Wasser in Mischgefäße gepumpt, die in gleichmäßigen Abständen an einem horizontal drehbaren, kreisförmigen Aufsatz angeordnet sind. Durch schrittweises Weiterdrehen des Drehaufsatzes wird nacheinander je eine Station angesteuert, an der das Testgemisch zudosier, an der es entnommen und in die Meßzelle gepumpt wird und an der die Mischgefäß gespült werden (Abb. 1).

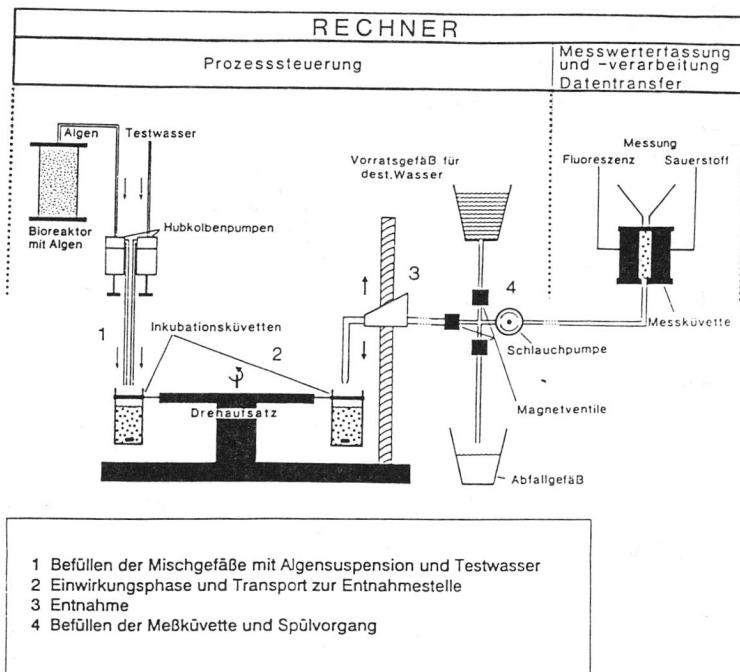


Abb. 1: Schematische Darstellung des Gesamtablaufverfahrens für Kontinuierliche Messungen

Eine spezielle Routine ermöglicht die Entnahme des zu untersuchenden Testwassers in Abständen von 7 Minuten. Die Einwirkzeit des Testwassers auf die Algensuspension beträgt 30 Minuten. Die im 7 Minuten-Takt durchgeführten Messungen spiegeln jeweils die um die Einwirkungszeit von 30 Minuten zurückliegende Gewässersituation wider.

### Meßverlauf/Funktionsweise

Jeder Meßzyklus dauert 360 Sekunden (Abb. 2). Zunächst wird das Fluoreszenzmeßlicht eingeschaltet, um als erste Bezugsgröße die Grundfluoreszenz  $F_0$  (1) der dunkeladaptierten Algen zu messen.

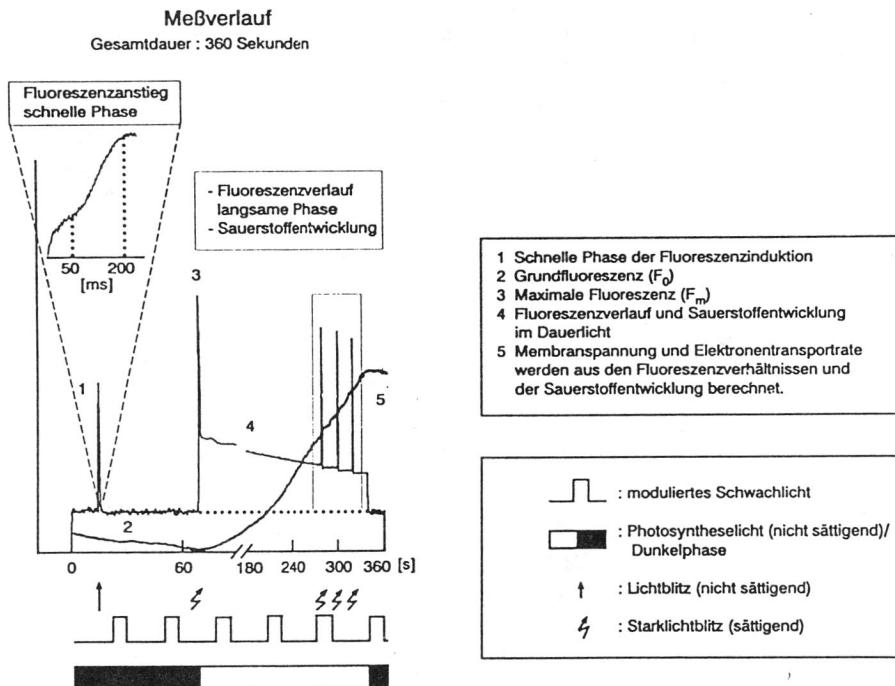


Abb. 2 Meßverlaufsschema

Während der Belichtung mit einem Rotlichtblitz (2) von 750 ms Dauer (Photodiode;  $80 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) wird der **schnelle Anstieg** der Fluoreszenz im Millisekunden-Bereich gemessen. Für die resultierende Fluoreszenzinduktionskurve werden die Flächenintegrale und Kurvenmaxima für die Zeitintervalle von 0 - 50 ms, von 50 - 200 ms und von 200 - 400 ms sowie die Erfassung der größten Steilheit in der Anstiegsphase berechnet.

Nach einer Relaxationsphase von 53 Sekunden wird die dunkeladaptierte Algenprobe zur Messung der maximalen Fluoreszenzausbeute  $F_m$  mit einem sättigenden Starklichtblitz belichtet (3).

Gleichzeitig mit dem Starklichtblitz wird das photosynthetisch aktive Dauerlicht zugeschaltet. In dieser Phase werden nebeneinander die **langsame Abnahme** der Fluoreszenz auf ein steady-state Niveau und die **Sauerstoffentwicklung** gemessen (4).

Am Schluß dieser Dauerbelichtung werden zusätzlich drei weitere Lichtblitze gegeben. Aus den Daten für die maximale variable Fluoreszenz vor und während der photosynthetisch aktiven Belichtung, der steady-state Fluoreszenzausbeute sowie der Grundfluoreszenz (5) werden die Fluoreszenzparameter  $q_p$  und  $q_{nP}$  bestimmt.

## B. Leuchtbakterientestautomat

Als Testorganismus dient *Photobacterium phosphoreum* (NRRLB-11177). Für die Tests werden gekühlte Flüssigkulturen ( $0^\circ \text{ C}$ ) verwendet. Leuchtbakterien sind in Flüssigkultur leicht zu kultivieren, das Verfahren ist deutlich weniger kostenintensiv als der Einsatz lyophilisierter Kulturen. Die zur Zeit verwendeten gekühlten batch-Kulturen mit einem Füllvolumen von 500 ml ermöglichen einen ununterbrochenen Testbetrieb von mindestens 10 Tagen.

Testparameter ist die bakterielle Leuchtintensität, die mit dem Photomultiplier erfaßt wird. Verglichen wird die Leuchtintensität der Photobakterien im Testansatz direkt nach Zugabe der Bakterien zum aufgesalzenen Test- bzw Kontrollwasser mit der Leuchtintensität nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten (Einwirkungszeit frei wählbar). Die Leuchtintensität der Bakterien zu Beginn und am Ende der Einwirkungszeit wird über einen Zeitraum von 2 Minuten erfaßt (Photoncounting, zwei Photomultiplier).

## Meßverlauf/Funktionsweise

Die Funktionsweise ist grundsätzlich ähnlich wie die des Algenteestautomaten (FluOX-System) (Abb. 3).

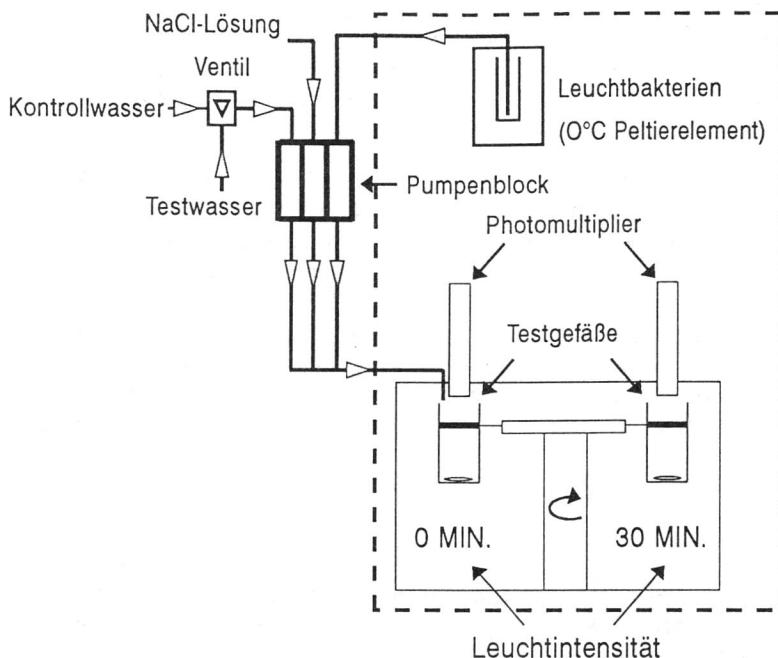


Abb.3 Schematische Darstellung des Gesamtablaufverfahrens

Test- bzw. Kontrollwasser und NaCl-Lösung (3% im Testansatz) werden mittels Hubkolbenpumpe und einem dazwischengeschalteten Ventil (siehe Schemazeichnung) in ein Mischgefäß gepumpt, das sich in gleichmäßigem Abstand mit weiteren drei Mischgefäßen an einem horizontal drehbaren, kreisförmigen Aufsatz befindet. Die Leuchtbakteriensuspension wird aus einer gekühlten Vorlage zum Testansatz zugegeben. Das Mischungsverhältnis ist frei wählbar. Die zur Zeit eingegebene Voreinstellung ergibt ein Mischungsverhältnis für Leuchtbakterien zum Test- bzw. Kontrollwasser von 1:20. Der Drehaufsatz ist in einem thermostatisierbaren Schrank untergebracht. Messungen werden zur Zeit bei konstant 20°C durchgeführt. Die Temperierung des Testansatzes ist durch den gestrichelten Rahmen in der Schemazeichnung dargestellt.

Nach der 2-minütigen Anfangsmessung der Leuchtentfernung wird die Probe über eine Warteposition zu einer Position transportiert, an der die abschließende Messung durchgeführt wird. Abschließend wird die probeführende Glasküvette über eine Kippvorrichtung entleert und ausgespült.

## Ergebnisse

### Algatestautomat

Schadstoffe aus unterschiedlichen Schadstoffgruppen führen zu charakteristisch unterschiedlichen Wirkungsmustern. Anhand der Signalmusteranalyse ergeben sich dadurch Hinweise auf die Art der Schädigung der untersuchten Testorganismen. Durch eine auf diese Weise gewonnene spezifizierte Diagnose einer vorliegenden Schädigung kann eine Eingrenzung der Substanzen vorgenommen werden, die den Wirkeffekt verursacht haben.

Abb. 4 und Abb. 5 zeigen unterschiedliche Wirkungsmuster, die auf der einen Seite durch die Intoxikation mit PS II Herbiziden (Atrazin; Abb.4) und auf der anderen Seite durch Schwermetalle (Zn, Abb.5) hervorgerufen wurden.

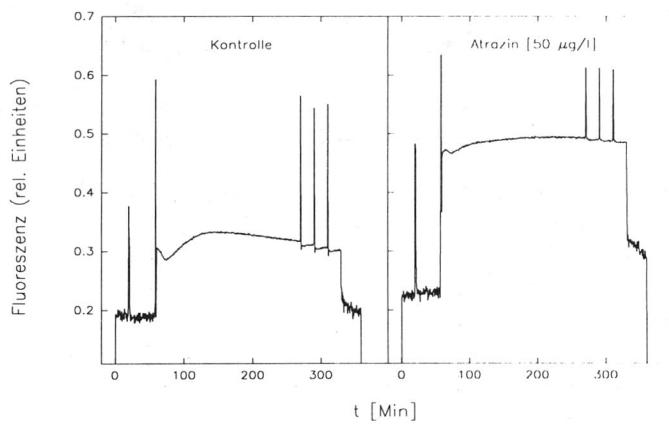


Abb. 4 Änderung des Fluoreszenzmusters der langsamen Phase der Fluoreszenzinduktion durch Herbizide bei *Chlamydomonas rheinhardtii*. Verglichen wird ein Kontrollansatz mit einem Testansatz mit Atrazin (50 µg/l).

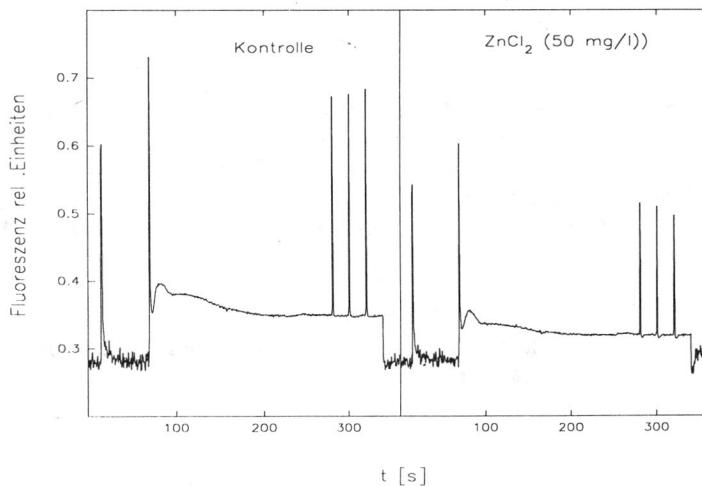


Abb. 5 Änderung des Fluoreszenzmusters der langsamen Phase der Fluoreszenzinduktion durch  $ZnCl_2$  (50 mg/l) bei *Chlamydomonas rheinhardtii*.

In Tab. 1 sind die Toxizitätsdaten für verschiedene Testsubstanzen dargestellt. Als empfindlichster Testorganismus hat sich die Blaualge *Microcystis aeruginosa* erwiesen.

Tab. 1 Nachweisgrenze und EC<sub>50</sub> für *Microcystis aeruginosa*. Toxizitätsdaten ermittelt mit dem Algatestverfahren. Die angegebenen Daten beziehen sich jeweils auf die empfindlichsten Meßparameter.

Substanz	Nachweisgrenze		EC <sub>50</sub>	
	nmol/l	µg/l	nmol/l	µg/l
Diuron	0,55	0,13	2,53	0,59
Metamitron	0,79	0,16	5,97	1,21
Isoproturon	1,45	0,30	12,5	2,60
Chlortoluron	4,2	0,90	16,0	3,40
Atrazin	4,40	1,0	25,0	5,40
Simazin	4,95	2,30	101,3	8,90
Terbutylazin	5,2	1,20	21,3	4,90
Cyanazin	6,64	1,6	24,0	5,80

Substanz	Nachweisgrenze		EC <sub>50</sub>	
	µmol/l	mg/l	µmol/l	mg/l
Na-PCP	0,6	167,0	1,7	458,0
$ZnCl_2$	13,9	1,9	19,8	2,7

Die dargestellten Chemiklientests wurden während der Erprobungsphase des Algentestautomaten im Labor durchgeführt. Weiterhin ist der Geräteprototyp über mehrere Monate im kontinuierlichen Betrieb am Gewässer erprobt worden. In Abb. 6 ist eine Alarmsmeldung aus der Erprobungsphase in der Rhein-Wasserkontrollstation Kleve-Bimmen des Landes Nordrhein-Westfalen dargestellt. Dabei wurden für die dargestellten Meßparameter Alarmschwellenüberschreitungen festgestellt.

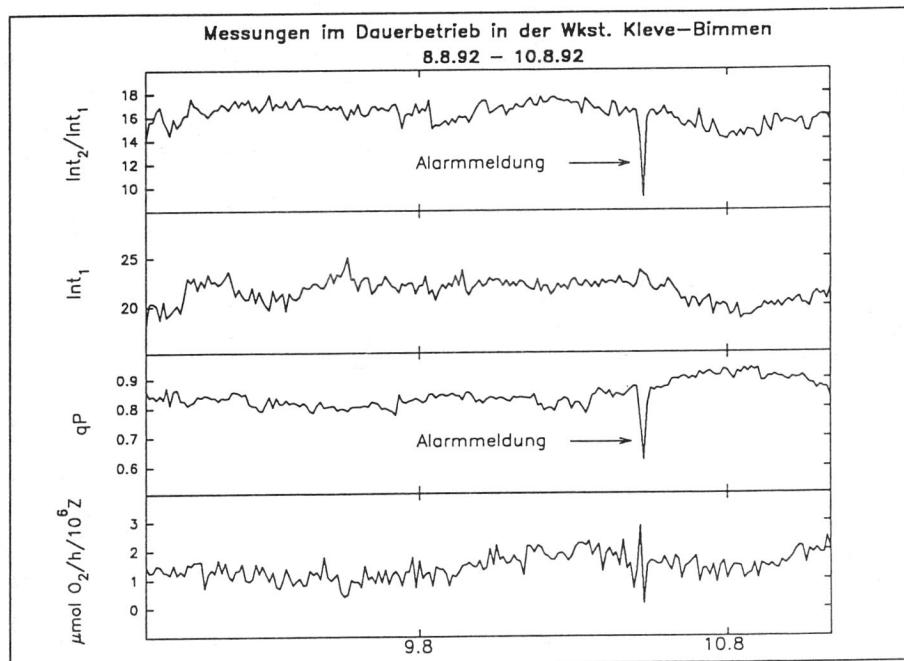


Abb. 6 Meßverlaufsdiagramme für die schnelle Fluoreszenz ( $\text{Int}_2/\text{Int}_1$ ;  $\text{Int}_1$ ), für die langsame Fluoreszenz (qp) und für die Sauerstoffbildungsraten. Messungen im kontinuierlichen Dauerbetrieb mit Anschluß an Rheinwasser in der Wkst. Kleve-Bimmen. Alarmüberschreitung am 9.8.92 für die Meßparameter  $\text{Int}_2/\text{Int}_1$  und für qp. Messungen mit *Chlamydomonas rheinhardtii*.

## Leuchtbakterientestautomat

Für den Leuchtbakterientestautomaten liegt nur wenig Datenmaterial über den kontinuierlichen Betrieb am Gewässer vor. Das Testsystem wird seit einigen Wochen in der Rhein-Wasserkontrollstation Bad-Honnef des Landes Nordrhein-Westfalen erprobt.

In Abb. 7 wird die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Wirkung von Na-PCP auf die Leuchttintensität von *Photobacterium phosphoreum* dargestellt. Die in Tab. 2 dargestellten Toxizitätsdaten für die Hemmung der Leuchttintensität wurden aus Messungen mit 3 Wochen alten Flüssigkulturen ermittelt. Grundsätzlich konnte keine altersabhängige Veränderung der Empfindlichkeit der Leuchtbakterien gegenüber Na-PCP festgestellt werden.

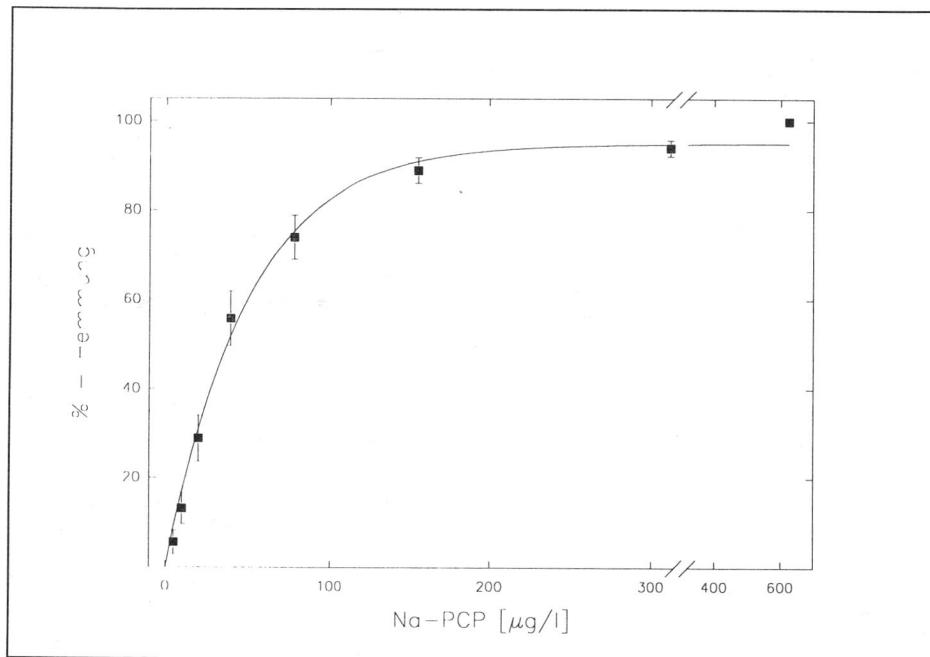


Abb. 7 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Hemmung der Lumineszenz von *Photobacterium phosphoreum* durch Na-PCP.

Tab.2 Toxizitätsdaten für die Hemmung der Leuchtintenität von *Photobacterium phosphoreum* durch die Einwirkung von Na-PCP.

Nachweisgrenze	7,8 µg/l
EC20	11,0 µg/l
EC50	34,3 µg/l
EC80	79,7 µg/l

## Aussicht

Die im Rahmen des Forschungsvorhabens "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestautomaten zur Überwachung des Rheins" am Landesamt für Wasser und Abfall entwickelten Testsysteme (Algen- und Leuchtbakterientestautomat) werden zur Zeit in der Rhein-Wasserkontrollstation erprobt. Nach Abschluß der Erprobungsphase sollen sie integraler Bestandteil der biologischen Gewässerüberwachung am Rhein werden.

## Literatur

1. MERSCHHEMKE, C., JENSEN, M.: Das FluOx-Meßsystem: Ein automatisches Algentestgerät zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Limnologica 23, Heft 4, 1993 (in press)
2. RENGER, G., DOHNT, G., KEYED, A., GRÄBER, P.: Die Chlorophyll-a-Fluoreszenz als Indikator des Funktionszustandes des Photosyntheseapparates in Pflanzen Arch. Hydrobiol. Beih., 29, 1987, 1-24
3. FLINSPACH, D.: Die Konfrontation der öffentlichen Wasserversorgung mit der Pestizidpolitik. Gwf-Wasser/Abwasser 130, Nr. 10, 1989

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden im Rahmen eines F + E - Vorhabens (BMFT 0339299C) im Landesamt für Wasser und Abfall NRW mit finanzieller Unterstützung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie durchgeführt.



U. Pilz

## Das Meßprinzip des Bakterientoximeters ToxAlarm

Das Meßprinzip des Bakterientoximeters ToxAlarm beruht auf der Erfassung der Sauerstoffzehrung von Bakterien im Kontakt mit dem zu untersuchenden Testwasser. Die für die Messung benötigten Bakterien werden im Gerät kontinuierlich kultiviert [1,2,3,4].

Da neben toxischen Wasserinhaltsstoffen auch Nährstoffgehalt und Temperatur, die Sauerstoffkonzentration des Testwassers sowie Dichte und Art der Bakterien den Meßprozeß beeinflussen, müssen diese Parameter im Toximeter kontrolliert bzw. konstant gehalten werden:

- Der **Nährstoffgehalt** wird im Meßprozeß auf einem hohen Niveau gehalten, da die dem Testwasser zugeführte Bakteriensuspension einen erheblichen Substratüberschuß mitbringt. Auf diese Weise wird vermieden, daß zu geringe Substratgehalte auftreten und über einen zu geringen Sauerstoffumsatz eine toxische Wirkung vortäuschen.
- Die **Temperatur** wird sowohl in der Meßzelle als auch im Zuchtgefäß für die Bakterien konstant auf 25 °C gehalten. Auch die Belüftung zur Sättigung des Testwassers mit Sauerstoff ist thermostatisiert. Dadurch ist die **Sauerstoffkonzentration des Testwassers** definiert.
- **Dichte und Art der Bakteriensuspension** werden über das trübungsgeregelte Kulturverfahren stabil gehalten. Die Bakterien wachsen in einem für Pseudomonaden selektiven, synthetischen Nährmedium. Die Trübung der Suspension wird optoelektronisch durch die Fermenterwand erfaßt und veranlaßt die Zudosierung frischer Nährlösung, sobald der gewünschte Schwellenwert überschritten wird.

Dieses Prinzip hält nicht nur die Organismendichte in der Kulturflüssigkeit konstant sondern erzeugt auch einen Selektionsdruck zugunsten der Bakterien, die sich unter den gegebenen Lebensumständen am schnellsten vermehren können. Dadurch ist es möglich, unter unsterilen Bedingungen eine technische Reinkultur der durch die Nährstoffe gezielt begünstigten Bakterien zu erhalten.

Die Erfahrungen, die in einem Zeitraum von 6 Jahren mit dem ToxAlarm gesammelt wurden, umfassen Anwendungen im Gewässerschutz, in kommunalen Kläranlagen und mit Industrieabwässern. Wegen des technisch sehr präzisen Gerätekonzepts - im Unterschied zu anderen Bakterientest sind praktisch alle Einflußgrößen bis hin zur Sauerstoffkonzentration und Dichte der Testbiomasse definiert - sind Präzision und Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse sehr gut. Auch die Empfindlichkeit des Meßsystems gegenüber Giftstoffen ist im Vergleich zu anderen Atmungshemmtests mit Bakterien in der Regel höher, da die Kultur keine Flocken sondern ausschließlich vitale Einzelzellen enthält.

### **Verwendung von Grünalgen, Bakterien oder Belebtschlamm als Testorganismen**

Während die Verwendung von Belebtschlamm aus Kläranlagen technisch eher eine Vereinfachung des Toximeters bedeutet und daher relativ unkompliziert durchführbar ist, stößt die kontinuierliche Kultur von Grünalgen auf eine Reihe von Schwierigkeiten, die durch die Entwicklung geeigneter Kulturverfahren gelöst werden mußten. Wie bereits für das Bakterientoximeter bestand die Zielvorstellung, daß die Algenkultur langfristig stabil - jedoch unter unsterilen Bedingungen - im Gerät selbst für den Toxizitätstest zur Verfügung gestellt werden muß.

Als Testorganismus wurden Algen der Gattung Chlorella gewählt, da diese aufgrund ihrer Morphologie und Robustheit sehr gut für die kontinuierliche Kultur geeignet sind. Durch umfangreiche Versuche wurde die Fermenterbeleuchtung optimiert und der Einfluß verschiedener Lichtquellen und der Lichtintensität untersucht.

Als weiteres wesentliches Element des Kulturverfahrens ist die Zusammensetzung der Nährlösung anzusehen. Das Medium muß zur Unterdrückung des Wachstums von Bakterien frei von organischen Verbindungen sein und darf lediglich mineralische Komponenten erhalten. Die nach umfangreichen Tests gefundene Zusammensetzung führt im turbidostatischen Fermenter zu Lebensbedingungen, die die gewünschte Algenart begünstigen und für Chlorella sehr hohe Vermehrungsraten sicherstellen.

Im Unterschied zu Bakterien bzw. Belebtschlamm wird bei dem Algentoximeter nicht die Sauerstoffzehrung sondern die Sauerstoffproduktion bestimmt. Die Verringerung der Sauerstoffproduktion, die für unbelastetes Wasser ermittelt wird (Referenzmessung) zeigt an, daß sich im Testwasser ein Stoff befindet, der die Photosynthese hemmt und als Schadstoff die Testorganismen schädigt. Da die Sauerstoffproduktion der Grünalgen unter den Bedingungen bei Organismendichten in der Meßzelle um  $10^8$  Zellen / ml relativ gering ist und nur zwischen 0,1 und 0,2 mg/l  $\times$  min beträgt, mußte das Prinzip der Messung den Erfordernissen der Algen angepaßt werden. Das dabei angewandte Prinzip der differentiellen Gelöstsauerstoffmessung ermöglicht es, sehr geringe Sauerstoffumsätze zu erfassen und führt darüber hinaus zu einer Vereinfachung der Technik des Toximeters.

## **Vereinfachung des Gerätekonzepts durch die differentielle Gelöstsauerstoffmessung**

Die trübungsgeregelte Kulturtechnik, die die meßtechnische Leistungsfähigkeit des Geräts sehr stark mitbestimmt, wurde bei der Weiterentwicklung des Toximeters als bewährte Baugruppe beibehalten. Der turbidostatische Fermenter arbeitet vollkommen wartungsfrei und garantiert nicht nur ein enges Artenspektrum für den Toxizitätstest sondern auch gut reproduzierbare Meßergebnisse.

Im Unterschied dazu wurde das eigentliche Meßverfahren, das in der Meßzelle des Toximeters abläuft, neu konzipiert. Die Meßzelle wird dabei nicht mehr kontinuierlich mit der Probe und den Testorganismen beschickt, sondern arbeitet nach einem sequentiellen Prinzip:

- Zunächst wird ein Ventil im Zulauf zur Meßzelle geöffnet und eine Pumpe saugt frisches, belüftetes Probenwasser durch die Meßzelle wobei diese gleichzeitig intensiv gespült wird. Nachdem das Ventil im Meßzellenzulauf geschlossen ist, wird die Verbindung zum Zuchtgefäß geöffnet und die Testorganismensuspension dosiert.
- In der folgenden Meßphase wird der Verlauf der Sauerstoffkonzentration in der Meßzelle erfaßt, ohne daß diese durchströmt wird. Bakterien verursachen dabei einen linearen Abfall der Sauerstoffkonzentration (Sauerstoffzehrung) während Grünalgen in der belichteten Meßzelle eine Sauerstoffproduktion vollziehen. Die Steilheit der Änderung der Sauerstoffkonzentration wird erfaßt (Zehrung bzw. Produktion im mg/l × min), und dient als Maß für durch Schadstoffe verursachte Hemmeffekte.

Das veränderte technische Verfahren der Messung führt zu einer extremen Vereinfachung der Leitungsführung im Gerät; dadurch wird die Betriebssicherheit des Toximeters stark verbessert und der Wartungsaufwand verringert. Überraschenderweise ergibt sich aus der Vereinfachung der Technik aber auch eine Reihe von Vorteilen für die Schnelligkeit der Messung und die Genauigkeit der Ergebnisse:

- Durch die Spülung der Meßzelle vor dem Meßprozeß ist in der Meßzelle das unmittelbar aktuelle Testwasser enthalten. Totzeiten, wie sie im Schlauchsystem kontinuierlich durchströmter Geräte entstehen, werden vermieden.
- Da in der Meßphase die Pumpe zur Versorgung der Meßzelle nicht läuft, hat ihre Fördergenauigkeit keinen Einfluß auf das Meßergebnis.
- Der Sauerstoffumsatz des Testwassers läßt sich vor der Dosierung der Testorganismen in die Meßzelle in einer vorgeschalteten Meßphase erfassen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zur Korrektur des Meßwertes bei Wässern, die bereits einen starken Sauerstoffumsatz - meistens eine Zehrung - haben.

- Die Sauerstoffkonzentration des Testwassers muß nicht mehr eng definiert sein, da für die Auswertung der Konzentrationsänderung der Startpunkt der Messung unerheblich ist. Es ist lediglich dafür zu sorgen, daß die Konzentration ausreichend hoch ist, um eine Zehrung in der Meßphase unter 0,5 mg/l zu vermeiden.

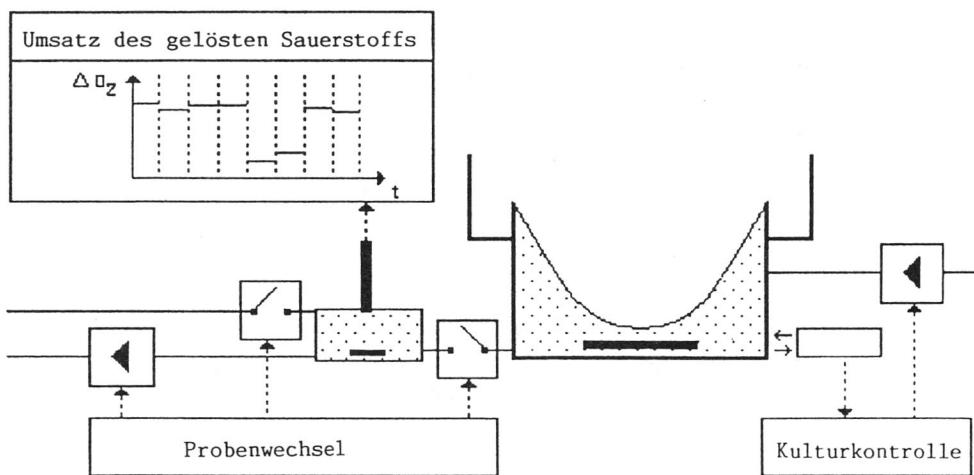


Abb. 1: Funktionsschema des Toximeters mit differentieller Gelöstsauerstoffmessung

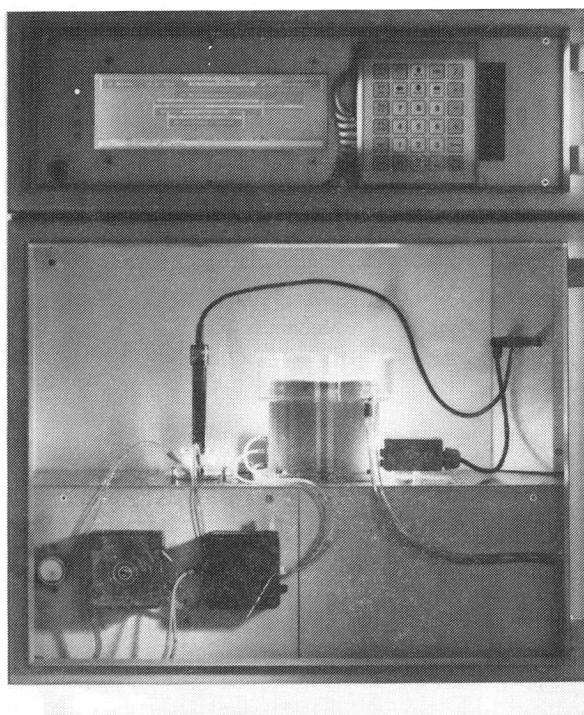
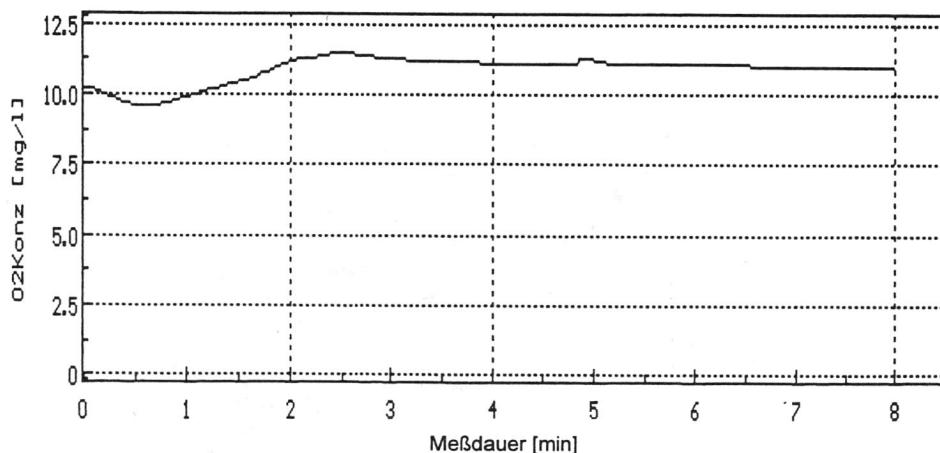


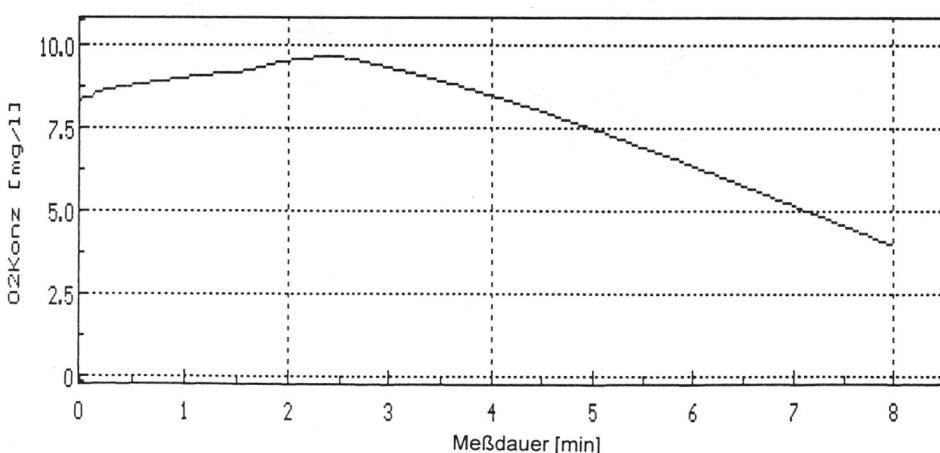
Abb. 2: Das Toximeter ToxAlarm »pro« (als Algentoximeter)

Die Abbildungen 1 und 2 zum Toximeter illustrieren das Funktionsprinzip des Geräts und zeigen die übersichtliche Prozeßebene mit der Meßzelle im Vordergrund und dem Fermenter. Die Abbildungen 3 und 4 geben die Meßverläufe für die Messung mit Bakterien bzw. mit Grünalgen wieder. In beiden Fällen ist zu erkennen, daß bei schadstofffreien Referenzproben ein deutlicher Sauerstoffsumsatz in der Meßphase registriert wird, während im Fall von toxischen Einwirkungen während der Meßphase weder eine Sauerstoffproduktion (Grünalgen) noch eine Sauerstoffzehrung (Bakterien) beobachtet wird. Bei den gezeigten Beispielen wurden im Bakterientest 200 mg/Kupfer (als Sulfat), im Grünalgentest 10 µg/l Atrazin dosiert.

Messung: Do. 22.04.93 16:36

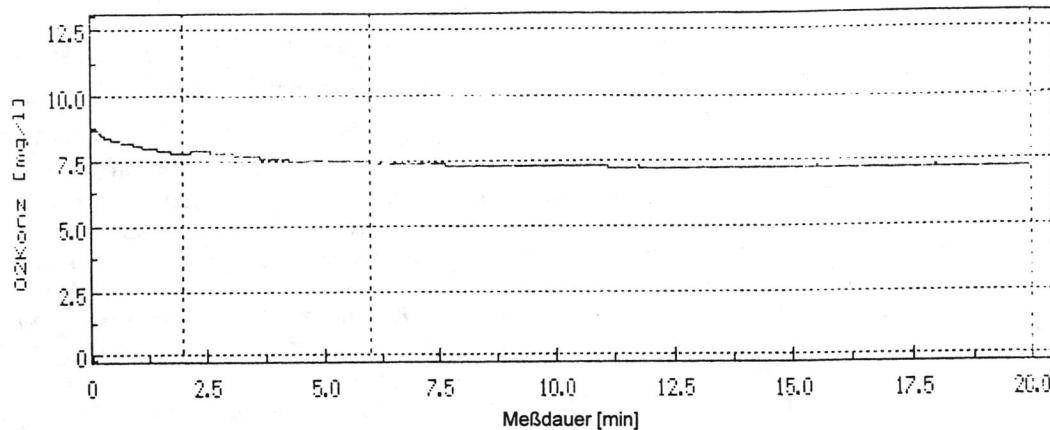


Messung: Do. 22.04.93 15:46



- Abb. 3: Vergleich des Meßverlaufs für Bakterien als Testorganismen  
oben: Totalvergiftung (200 mg/l Kupfer als Sulfat)  
unten: Referenzmessung

Messung: Fr. 23.04.93 12:38



Messung: Fr. 23.04.93 08:50

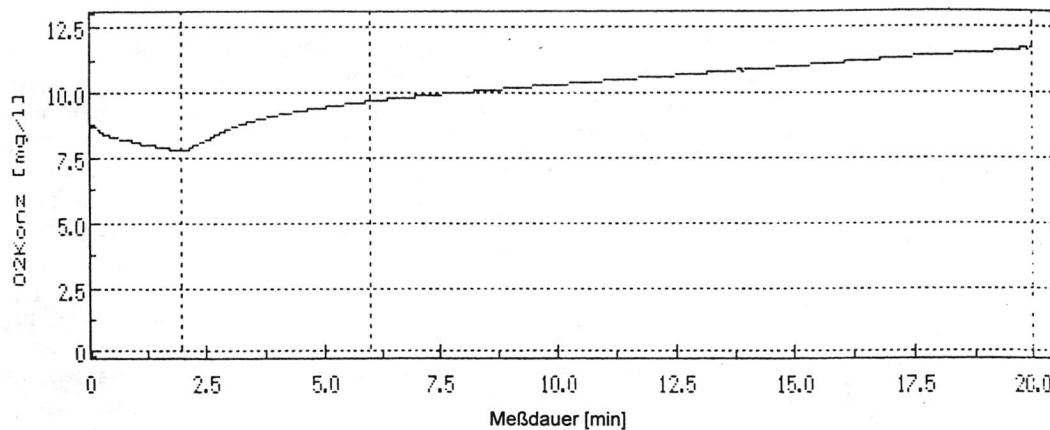


Abb. 4: Vergleich des Meßverlaufs für Grünalgen als Testorganismen  
oben: Totalvergiftung (10 µg/l Atrazin)  
unten: Referenzmessung

## Einsatzmöglichkeiten und Ansätze für zukünftige Entwicklungen

Die Geräte der ToxAlarm »pro«- Familie sind recht vielseitig einsetzbar, wobei der zu verwendende Testorganismus der jeweils vorliegenden Situation anzupassen ist:

- Für **Gewässergütemeßstationen** scheint insbesondere das Algentoximeter besonders interessant zu sein. Mit dem Prinzip der Erfassung der Sauerstoffproduktion werden Biozide - insbesondere Herbizide - sehr empfindlich erfaßt. Für Atrazin beträgt die EC 20 beispielsweise 6,3 µg/l bezogen auf die Konzentration im Testwasser; andere Gewässerschadstoffe (z.B. PCP, metallorganische Verbindungen) werden ebenfalls in sehr geringen Konzentrationen detektiert. Von der in naher Zukunft zur Verfügung stehenden Chlorophyllfluoreszensdetektion kann eine weitere Absenkung der Meßempfindlichkeit erwartet werden, wobei Vorversuche für die Modellsubstanz Atrazin EC 20-Werte um 20 ng/l wahrscheinlich erscheinen lassen.

Für den Gewässerschutz haben aber auch Bakterientests große Bedeutung - besonders dort, wo industrielle Abwässer in die Oberflächengewässer gelangen. Zwar sind Bakterien - von einigen Ausnahmen abgesehen - unempfindlicher als Grünalgen; aufgrund ihrer außerordentlich hohen Stoffwechselleistung kommt ihnen in industriell belasteten Vorflutern eine große Bedeutung beim Abbau organischer Verunreinigungen zu.

- In **Kläranlagen**, bei denen mit toxischen Stoffen im Zulauf zu rechnen ist, sind sicherlich Bakterien die geeignetesten Testorganismen. Da Belebtschlamm wegen der Undefiniertheit seiner biologischen Aktivität und der Artenzusammensetzung Probleme bei der Interpretation der Meßergebnisse aufwerfen kann, sollte möglichst eine standardisierte Bakterienkultur eingesetzt werden. Die Verwendung von Belebtschlamm erscheint nur in seltenen Fällen sinnvoll, z.B. wenn sich Adoptionsprozesse an bestimmte Giftstoffe nicht anders in das Testergebnis einbeziehen lassen.
- Ein Bereich, der für den Einsatz von Bakterien- oder Algentoximetern sehr interessant ist, ist die **Erkundung von Bodenverunreinigungen** und **Grundwasserkontamination** sowie die Überwachung von Bodenwaschanlagen. ToxAlarm »pro« wurde für das Screening von belasteten Grundwasserproben sowohl als Bakterientoximeter als auch als Algentoximeter bereits sehr erfolgreich eingesetzt. Es ließ sich verfolgen, daß die Toxizität der Einzelproben mit dem Abstand der Bohrorte von der Schadquelle sehr gut korrelierte; auch die Ergebnisse der parallel durchgeföhrten chemischen Analytik auf Benzol, Toluol, Xylol sowie auf Phenole und aromatische Amine ergaben zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Toximeter [5].

Konzeptionell ist das vorgestellte Toximeter sehr stark hinsichtlich einfacher Handhabung, geringer Wartung und hoher Betriebssicherheit optimiert. Weiterentwicklungen werden in der Zukunft die Einführung anderer Detektionsmethoden in der Meßzelle betreffen, aber auch die Erweiterung der Palette der in diesem Meßgerät einsetzbaren Mikroorganismen. Dadurch daß sich Biotestverfahren als einfache Wirkungstests in der Umweltanalytik durchzusetzen beginnen, steigen die Ansprüche sowohl an die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse als auch an die Wahlmöglichkeit zwischen verschiedenen Testorganismen, mit denen sich spezifische Bereiche der Toxizitätsmessung abdecken lassen. Beiden Aspekten wird das hier vorgestellte Toximeter in hohem Maße gerecht.

## Literatur

1. PILZ, U.; AXT, G.: Weiterentwicklung eines kontinuierlich arbeitenden Bakterientoximeters. *Vom Wasser*; Band 62; 1984, 91-100
2. PILZ, U.: Entwicklung eines Meßgeräts zur kontinuierlichen Erfassung giftiger Wasserinhaltsstoffe mit Hilfe gewässertypischer Bakterien. *VDI Fortschrittberichte Reihe 15 (Umwelttechnik)* Band 41; VDI Verlag, Düsseldorf, 1986
3. PILZ, U.: Erfahrungen mit dem Bakterientoximeter bei der Untersuchung giftstoffhaltiger Lösungen und schadstoffbelasteter Wasserproben. *Vom Wasser*; Band 66; 1986, 85-96
4. PILZ, U.: Kontinuierliche Toxizitätsmessung mit dem Bakterientoximeter. *GIT Supplement Umwelt 4/89*; 1989, 24-27
5. LÜRING, C., PILZ, U., LEHMANN, S.: Schadstoffen auf der Spur - Biotests zur Emissionsüberwachung und zum Probenscreening bei Altlasten. *Entsorgungstechnik*, im Druck



# Biosensoren im Umweltmonitoring am Beispiel der EuCyano-Bakterienelektrode

P.-D. Hansen und P. Stein

## Introduction

There is a generally accepted need for rapid, simple and low cost on-line water quality monitors. Besides the chemo-physical analytical methods the biological and biochemical methods are of increasing importance for the integral monitoring of pollutants. Electrodes made up of cyanobacteria, i.e. *Synechococcus* and *E. coli*, for immediate detection of acute toxic effects of pollutants, are used as a biosensor. The measurements of the photosynthetic electron transport system PETs under alternating light - dark conditions, are conducted in a flow-through cell against reference electrodes (Ag/AgCl). A mediator (Fe (II) / Fe (III)) makes the flow of current possible. The time which the electrode takes to react is about two minutes, and a multiple confirmed result is available after ten minutes (detection limit for Atrazine =  $< 10 \mu\text{g/L}$  Atrazine). Similar investigations were done with an *E. coli*- electrode. For extended examination of waterways the biosensor can be linked up to an on-line system for monitoring the sub-lethal effects of exposed organisms caused by waste water outlets which transport critical and hazardous substances.

## Einleitung

Unter einem Biosensor versteht man eine Meßanordnung, die durch eine geeignete Kombination eines selektiven biologischen Systems (Enzym, Antikörper, Organell, Zelle) mit einem Transducer (Thermistor, potentiometrische oder amperometrische Elektrode, Feldeffekttransistor, piezoelektrischer Empfänger, optischer oder optoelektrischer Empfänger) ein der Konzentration einer definierten Substanz proportionales Meßsignal erzeugt. Der Biosensor bezieht somit seine Selektivität, Empfindlichkeit und Stabilität aus dem biologischen System. Auf der Zellebene ist die EuCyano-Bakterienelektrode von Bedeutung. Die EuCyano-Bakterienelektrode ist die Kombination mehrerer Cyanobakterien-Elektroden (*Synechococcus*) und Bakterien-Elektroden (*E. coli*) in einer Durchflußzelle mit entsprechenden Referenzelektroden (Ag/AgCl). Gemessen wird der Elektronenfluß des Elektronen-Transport-Systems (ETS) in den auf der Elektrode angebrachten Organismen (Blaulalgen oder Bakterien) unter Verwendung eines elektrochemischen Vermittlers (Mediators).

Die Bestimmungsgrenze für Einzelstoffe liegt für Herbizide z.B. bei  $< 10 \mu\text{g/L}$  Atrazin; mit der Bakterienelektrode mit *E. coli* beträgt die Wirksschwelle für Pentachlorphenol im günstigsten Fall 9  $\mu\text{g/L}$  PCP. Das Tributylzinn (Chlorid) lässt sich mit der Bakterien-Elektrode bei einer Wirksschwelle von 11  $\mu\text{g/L}$  Tributylzinn ebenfalls gut erfassen. Betrachtet man die Leistung für den am Gewässer bereits erprobten mikrobiellen Biosen-

sor der EuCyano-Bakterienelektrode hinsichtlich Atrazin, so ist zu berücksichtigen, daß diese Konzentration bereits weit oberhalb der real im Gewässer vorkommenden Konzentrationen liegt. Damit relativiert sich auch die praktische Anwendung dieses on-line Biosensors, sein überzeugender Vorteil ist im Gewässerschutz die Früherkennung von Störfällen und damit ist sein Einsatz insbesondere bei der Emissionskontrolle zu sehen.

Eine interessante Entwicklung stellen z.Zt. die Immunoreaktoren (Immunosensoren) dar, die über antikörperspezifische Systeme einerseits detektieren und gleichzeitig die Spurenstoffe (u.a. Pestizide) anreichern; eine Kombination des Immunoreaktors mit der EuCyano-Bakterienelektrode ermöglicht dann auch einen Einsatz im Umweltmonitoring am Oberflächengewässer oder sogar im Grundwasser.

Es besteht ein Bedarf für schnelle, einfache und preiswerte Durchflußmeßsysteme zur umweltrelevanten Gewässerüberwachung. Es sind Meßsysteme erforderlich, die eine Abschätzung der Wirkung von Schadstoffen auf eine konkrete Gewässersituation ermöglichen.

Neben den chemisch-physikalischen, Einzelstoff bezogenen Meßmethoden gewinnen hierbei die biologischen und biochemischen Meßmethoden zur integralen Erfassung von Schadstoffen und insbesondere deren Wirkungen zunehmend an Bedeutung.

### **Erfassung und die "ökotoxische" Bewertung**

Zur Erfassung der ökotoxischen Wirkung eines Schadstoffeintrages in das Gewässer wurde ein für das Gewässer relevantes Prüfsystem entwickelt, das über die verschiedenen Verdünnungsschritte des belasteten Flußwassers mit einem unbelasteten Kontrollwasser gewissermaßen im Sinne einer Dosis- Wirkungsbeziehung die gewässernahen Prüfung ermöglicht. Das System, das diese Aufgaben erfüllt, ist das "WaBoLu-Aquatox" Überwachungssystem [1,2]; es ermöglicht die Durchführung von in-situ Biertestverfahren und damit eine längerfristige Exposition in den entsprechenden Verdünnungsverhältnissen der zu überwachenden Gewässerabschnitte.

Das "WaBoLu-Aquatox" Überwachungssystem besteht aus einer Vorrichtung zur Einstellung der Verdünnungsverhältnisse von Abwasser und Flußwasser sowie aus mehreren 600 L- Rundstrombecken, in denen die Organismen exponiert werden können.

Die Einstellung der Verdünnungsverhältnisse in den jeweiligen Expositionsbecken sowie der Durchfluß richten sich jeweils nach der Wasserführung des Gewässers. Die Messung und Einstellung der durch das Gewässer vorgegebenen Randbedingungen zu den Verdünnungsverhältnissen erfolgt über Rotameter und wird elektrisch über entsprechende Ventileinstellungen geregelt; die Standzeit des "WaBoLu-Aquatox"- Überwachungssystems beträgt ohne zwischenzeitlichen technischen Service mehr als 3 Wochen. Die Stellfläche des als Container gebauten Überwachungssystems beträgt  $6,5 \text{ m}^2$ , so daß es leicht mit einem LKW zu dem jeweiligen zu überwachenden Gewässerabschnitt transportiert werden kann, um dort als Monitor eingesetzt zu werden. Die

im Langzeitmonitoring zu überwachenden Zielvorgaben bzw. nutzungsbezogenen Qualitätsziele [2] zum Schutz des Gewässers vor "gefährlichen Stoffen" (§7a WHG) erfordern eine gewässernahe in-situ Überwachung. Das Gewässer wird über Schlauch- und Rohrverbindungen an die Mischvorrichtung des "WaBoLu-Aquatox" Überwachungssystems herangeführt. Im Expositionsteil für die Organismen sind Rundstrombecken (Füllvolumen je 600 L) aufgebaut; der Durchfluß in den Rundstrombecken beträgt jeweils 1 m<sup>3</sup> pro Stunde. Die Einstellung des Mischungsverhältnisses von Abwasser und Gewässer in den Expositionsbecken ergibt sich aus den Wassermen- genverhältnissen entsprechend der Wasserführung des Vorfluters (mittlere Wasserführung MQ, mittlere Niedrigwasserführung MNQ etc.).

Die Organismen werden in Küvetten [1,2], die mit einem Schwimmkörper ausgestattet sind, exponiert. Es können so Fischeier, Fischlarven [1,2] und Muscheln [3,4] untersucht werden. Die im Gewässer exponierten Fischeier werden zum Schutz vor dem UV-Licht in mit Aluminiumfolie abgedunkelten Schwimmküvetten erbrütet.

Zur Bewertung der subletalen Schädigung werden Kriterien wie die Verzögerung bei der Embryonal- und Larvalentwicklung und die Wachstumshemmung herangezogen. Auch eventuelle Schädigungen des Kiemengewebes (Primärlamellendefizite, Überwucherung des Kiemengewebes etc.) lassen sich gut quantifizieren [1]. In dem Weichkörpergewebe der exponierten Muscheln werden die "akkumulationsfähigen" chlorierten Kohlenwasserstoffe des Gewässers über den Summenparameter AOX bestimmt [3,4,5]. Die im "WABoLu-Aquatox"-Überwachungssystem unter kontrollierbaren Bedingungen exponierten Muscheln (*Dreissena polymorpha*) haben quasi die Funktion eines automatischen Probenehmers unter kontrollierten Bedingungen. Als Kontrolltiere werden Muscheln dem weitgehend unbelasteten Gatower See (Referenzgewässer) entnommen.

Bei exponierten Fischen ist die Messung der Biotransformation in den Entgiftungsorganen (z.B. in der Fischleber) über die Messung der Induktion der mischfunktionellen Oxygenasen (MFO) möglich [2,6,7,8,9]. Ergänzend zu den Messungen der Entgiftungsaktivität (MFO) in den Zielorganen der exponierten Fische ist auch die Erfassung des gentoxischen Potentials von großem Interesse [10,11].

Das gentoxische Potential lässt sich erfassen über die alkalische Filterelution (AFE), den DNS-Aufwindungstest (DNS-Denaturierungstest), sowie den umu-Test. Der umu-Test ermöglicht darüber hinaus die Erfassung des Mutagenitätspotentials des Abwassers bzw. des Gewässers. Der AFE-Test, DNS-Aufwindungstest und der umu-Test lassen sich mit dem Gewebe der Fischleber oder aber mit dem Kiemengewebe der Muscheln durchführen.

Die Hämozyten von Muscheln eignen sich für Messungen zur immunologischen Abwehr [3,5,11,12,13,14]. Die immunologische Abwehr wird durch die Phagozytoseaktivität der Muschel-Hämozyten erfaßt.

Die Phagozytoseaktivität kann einerseits mit Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) [14,15], andererseits aber mit in der Routine sehr viel einfacher zu handhabenden

Leuchtbakterien (*Photobacterium phosphoreum*) durchgeführt werden; es wird hierzu der Stamm NRRL B-11177 (MICROTOX-System) mit den Muschelhämocyten inkubiert [14]. Dieser Leuchtbakterien-Stamm wird auch zum Leuchtbakterientest nach DIN 38412 Teil 34 verwendet. Als Meßvorrichtung dient ein Mikrotiterplatten-Luminometer oder ein Fluorimeter [14]. Eine weitere Neuentwicklung zur Messung der Phagozytose ist die Durchführung des Testes mit FITC-konjugierter Hefe.

Die hier gemessene Immunsuppression ist ein Wirkparameter mit hoher ökologischer Relevanz. Es können sowohl die Muscheln als auch die Hämocyten z.B. in einem "WaBoLu-Aquatox"- Überwachungssystem am Gewässer exponiert werden. Das "WaBoLu-Aquatox"-Überwachungssystem läßt sich durch die unterschiedlichsten biologischen Testsysteme und Biosensoren ergänzen. Tritt ein Störfall am Gewässer auf, lassen sich die Zuläufe zum "WaBoLu-Aquatox"-Überwachungssystem automatisch schließen, so daß zur Beweissicherung eine Probe von ca. 2.400 L des belasteten Flußwassers mit den darin exponierten Organismen für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung steht.

Zur Erfassung eines solchen Störfalls eignen sich besonders gut Biosensoren.

In Abb. 1 ist in einer Übersicht dargestellt, in welcher Zeitfolge die einzelnen biologischen Reaktionen im Organismus erfolgen. Es wird deutlich, daß insbesondere den Biosensoren mit einer Ansprechzeit von weniger als 10 Minuten die Rolle der Frühwarnsysteme zufällt.

#### **Biologische Reaktionen - von Spurenschadstoffen in Abhängigkeit von der Zeit**

**[min.]**

$10^6$	[> 2a]	<b>Ökosystem:</b> <b>Selbst-/Neuorganisation des Systems -</b> Neuentwicklung von Systemelementen u. -strukturen
	[0.5-1a]	<b>Population:</b> Populationsdynamische Reaktionen
	[0.5-1a]	
$10^5$	[1-12 mon.]	<b>Wachstumsänderungen</b> der Einzelorganismen- Adaptation
	[20-120 d]	<b>Organismus (Expositionsexperimente):</b> - Wachstum, Reproduktion (ELST), Akkumulation, DNS-Reparatur, Mutagenität (= fehlerhafte Reparatur)
$10^4$		<b>Suborganismische Ebene:</b> <b>Reaktionen in den Organismen</b> - Entgiftung und Kompensationsreaktionen
	[1-3d]	- biochemische Reaktion. Biotransformation: mischfunktionelle Oxygenasen (MFO) - Aktivität und DNS-Schäden, Mutagenität, Hemmung der RNS-Synthese (als Parameter für die Wachstumshemmung), Acetylcholinesterase Hemmung, Immunsuppression (Phagozytose)
$10^3$		
$10^2$		
$10^1$	[10 min.]	<b>Frühwarnsysteme - On Line Effektmonitoring - "Biosensoren"</b>
$10^0$		<b>Schadstoffeintrag im subletalen Bereich</b>

Abb. 1: Zeitliche Abfolge biologischer Reaktionen in gewässerexponierten Organismen

## Welche Anforderungen muß ein Biosensor für ein Umweltmonitoring erfüllen?

Besonders wichtig sind die Verfügbarkeit der Elektroden mit den Mikroorganismen, sogenannte "whole cell sensors", sowie die Standzeit der Sensoren im Freiland am Gewässer. Die Sensoren für bestimmte Stoffgruppen besonders empfindlich sein: z.B. für Herbizide oder für Tenside, in der Regel wird eine Wirkung gemessen, wie z.B. in diesem Beispiel hier die Wirkung auf das Elektronen-Transport-System.

In Tab. 1 sind am Beispiel eines Biosensors mit einer Blaualge und einer Bakterien-Elektrode die Anforderungen für den On-line Betrieb eines Sensors dargestellt.

**Tabelle 1: Anforderungen an einen Biosensor im On-line Betrieb**

---

### 1. Verfügbarkeit der Testorganismen am Beispiel von *Synechococcus* und *E. coli*

<b>Synechococcus:</b>	<b>Röhrenbatchkultur oder Immobilisat</b>
<b>E. coli:</b>	<b>Als Lyophilisat auf den Fertig-Bakterienelektroden</b>
<b>Lagerfähigkeit:</b>	<b>Synechococcus-Immobilisat, 3 Monate</b> <b>E. coli, Fertig-Elektroden, 6-9 Monate</b>
<b>Standzeit des Biosensors:</b>	<b>Synechococcus, 5 Tage</b> <b>E. coli, 14 Tage</b>
<b>Wartungsaufwand:</b>	<b>5 - 6 Stunden pro Woche</b>
<b>Probenmenge:</b>	<b>2,5 L / Stunde</b>
<b>Maße:</b>	<b>140 x 70 x 60 cm</b>
<b>Anschlüsse:</b>	<b>Gewicht: ca. 60 kg</b> <b>220 V</b>

In der Abb. 2 ist ein Biosensor als Durchflußzelle dargestellt, der die in Tabelle 1 aufgeführten Anforderungen erfüllt. Es ist eine mit Blaualgen (Cyanobakterien) belegte Elektrode dargestellt. Diese sogenannte "Cyanobakterien-Elektrode" ist Teil einer Durchflußzelle, die insgesamt mit bis zu 16 solcher Elektroden und entsprechender Referenzelektroden (Ag/AgCl) bestückt sein kann.

## Meßprinzip der "Cyanobakterien-Elektrode"

Bei der "Cyanobakterien-Elektrode" sind immobilisierte Zellen der Blaualge *Synechococcus 6301* (EEC 2689-M) auf einer Graphitelektrode fixiert. Es wird gegen eine Referenzelektrode (Ag/AgCl) der photosynthetische Elektronentransport (PETS) im Wechsel von Licht und Dunkel in einer Durchflußzelle gemessen (siehe Abb. 2). Die Elektrode wird über einen sogenannten Mediator (Fe II/Fe III) nach jeder Messung ( $\mu$ A) wieder rekonstituiert.

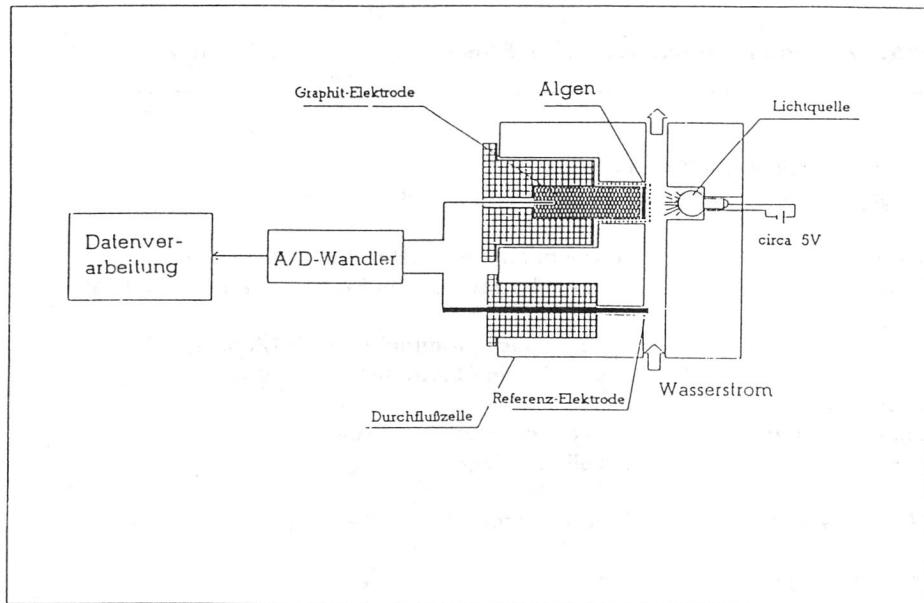


Abb.: 2 Schematische Darstellung der EuCyanobakterien-Elektrode mit Durchflußzelle und Datenverarbeitung

Die Reduktion des Fe (III) findet bei den Cyanobakterien der EuCyanobakterien-Elektrode an der Plasmamembran statt. Es ist anzunehmen, daß dieses durch die NADPH-Dehydrogenase geschieht, die wiederum als Ferricyanidreduktase fungiert. Die NADPH-Produktion steigt proportional mit der Reduktion von Ferricyanid. Die Ansprechzeit der Elektrode beträgt ca. 2 Minuten; es liegt bereits nach 10 Minuten ein über 5 Meßzyklen abgesichertes Ergebnis vor. Ein Beispiel mit 4 Elektroden und den dazugehörigen Meßzyklen (Hell-/Dunkelphase) ist ebenfalls in Abb. 1 dargestellt. Die Standzeit der Elektrode beträgt ca. 5-6 Tage.

## Die "EuCyanobakterien-Elektrode" als Frühwarnsystem

Die Cyanobakterien-Elektrode erfaßt bevorzugt solche Stoffe, die auf das photosynthetische Elektronentransportsystem (PETS) wirken. Es sind also in der Hauptsache Herbizide, aber auch andere Stoffe (wie z.B. Pentachlorphenol =100 µg/L), die mit einer entsprechenden Empfindlichkeit nachzuweisen sind.

Eine ideale Meßanordnung ist die Kombination mehrerer Cyanobakterien-Elektroden (*Synechococcus*) mit entsprechenden Bakterien-Elektroden (*E. coli*) in einer Durchflußzelle und entsprechenden Referenzelektroden (Ag/AgCl). Ein Vergleich der Bestimmungsgrenzen mit der Cyanobakterien- und der Bakterien- Elektrode ist in Tabelle 2 dargestellt. Eine mit beiden Elektroden ausgerüstete Durchflußzelle läßt sich gut als Frühwarnsystem mit einem "WaBoLu-Aquatox"-Überwachungssystem koppeln. Tritt eine Alarmgebung auf, läßt sich der Zulauf zu dem im Durchlauf betriebenen "WaBoLu-Aquatox"-Überwachungssystem schließen. Damit ist eine Rückstellprobe von 2.400 L Flußwasser zusammen mit den darin exponierten Organismen (Fische, Muscheln, Plankton etc.) für weiterführende Untersuchungen, für gezielte biologische und chemische Untersuchungen, gesichert.

## Meßergebnisse

Die Bestimmungsgrenze für Einzelstoffe liegt nach den bisherigen Erkenntnissen für Atrazin z.B. bei < 20 µg/L (Tab. 2). Die Bestimmungsgrenzen variieren etwas mit der Qualität der Elektrodenbelegung.

Trägt man die Hemmung des photosynthetischen Elektronen-Transportsystems (PETS) als relative Veränderung der Peakhöhen in Abhängigkeit von der dosierten Atrazin-Konzentration (10 µg/L-250 µg/L Atrazin) auf , dann zeigt sich, daß die Hemmung des PETS in Abhängigkeit von der Atrazinkonzentration einer linearen Dosis-Wirkungsbeziehung folgt.

Die verhältnismäßig hohe Wirksschwelle für PCP (100 µg/L PCP), die mit der Cyanobakterien-Elektrode (*Synechococcus*) gemessen wird, gilt jedoch nicht für die Bakterienelektrode mit *E. coli*; in diesem Fall beträgt die Wirksschwelle nur 9 µg/L PCP. Das Tributylzinn (Chlorid) läßt sich mit der Bakterien-Elektrode (Tab. 1) mit einer Wirksschwelle von 11 µg/L Tributylzinn ebenfalls gut erfassen. Schwermetalle lassen sich mit den hier vorgestellten Meßsystemen nicht zufriedenstellend erfassen; hier wird ein z.Zt. entwickelter Urease-Biosensor das bereits vorhandene Meßsystem in der Durchflußzelle sinnvoll ergänzen.

Tab. 2:Chemikalienprüfung mit der EuCyanobakterien-Elektrode und *Synechococcus*; LOEC - Werte (LOEC = Lowest Observed Effect Concentration)

*Synechococcus*

Atrazin	10	µg/L
Chlortoluron	10	
Metamitron	200	
Diuron	2.5	
Terbutylazin	25	
Simazin	10	
Crimidin	25	
Isoproturon	25	

*Microcystis aeruginosa*

Atrazin	10	µg/L
Chlortoluron	10	
Metamitron	50	

<i>Anabaena</i> :	Atrazin	20	µg/L
<i>Nostoc</i>			
<i>communis</i> :	Atrazin	60	
<i>Prochlorotrix</i>			
<i>hollandica</i> :	Atrazin	50	

Organismen, die sich als Elektrodenbelegung für die Biosensorik eignen (erste Erfahrungen liegen bereits vor):

*Dunaliella euchlora* (mariner Organismus)  
*E. coli*  
*Pseudomonas putida*  
*Acetobacter*  
*Saccharomyces cerevisiae*

## Diskussion und Ausblick

Der hier beschriebene Biosensor wurde bisher erfolgreich in Kombination mit dem "WaBoLu-Aquatox"-Überwachungssystem am Teltowkanal in Berlin eingesetzt; anschließend wurde er im Rahmen eines Forschungsvorhabens am Rhein in der IKS-R-Meßstation Bimmen an der holländischen Grenze erprobt. Beim Einsatz in der Meßstation wurde die Cyanobakterien-Elektrode bzw. Bakterien-Elektrode weiter optimiert und automatisiert bis hin zu einem kompakten Meßgerät.

In Abb. 3 und Abb. 4 sind Ergebnisse zu dem Einsatz der EuCyanobakterien-Elektrode am Gewässer dargestellt.

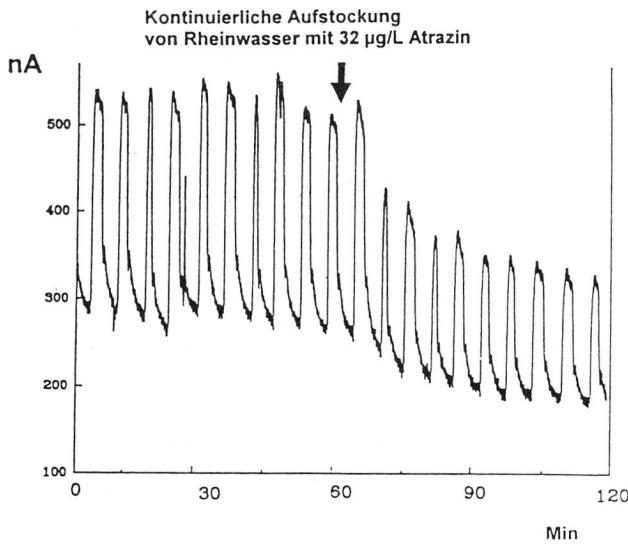


Abb. 3: Aufstockungsexperimente mit Rheinwasser und der On-line Messung mit dem Biosensor (EuCyanobakterien-Elektrode)

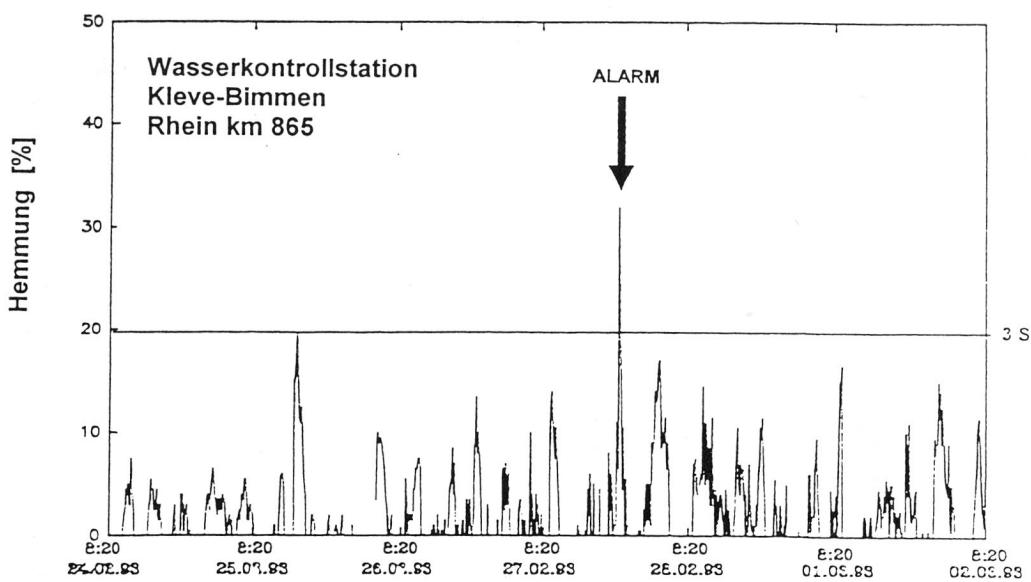


Abb.4: Beispiel einer Alarmgebung durch den Biosensor (EuCyanobakterien-Elektrode) am Rhein.

Zur Festlegung der oberen Alarmschwelle (3S): Mittelwert des Nulleffekts + 3S (dreifache Standardabweichung des Nulleffekts)

Am Gewässer bereits einzusetzende Biosensoren gibt es bisher wenige. Der hier vorgestellte Biosensor liefert in der Einzelstoffprüfung gut reproduzierbare Ergebnisse. Der mit *Synechococcus* belegte Biosensor spricht hauptsächlich auf Herbicide an; die Kombination mit einer mit *E. coli* belegten Bakterien-Elektrode bietet sich an. Die Vorteile des Biosensors sind seine kurzen Ansprechzeiten (2 Min.), die kontinuierliche Messung und die Möglichkeit zur Automatisierung sowie die Standzeit von 6 Tagen. Der Nachteil bei dem hier beschriebenen Sensor ist, daß er unspezifisch auf mehrere Stoffe und Stoffgruppen im Gewässer anspricht; er ist daher zwar gut als Frühwarnsystem einzusetzen, aber kaum zur Detektion von Einzelstoffen. Der Forderung zur Einzelstoffdetektion kann allerdings kaum eines der herkömmlichen Biostestverfahren gerecht werden; im speziellen Fall des Cholinesterase-Hemmtests [12] handelt es sich um ein Verfahren, daß sich einerseits zur Detektion von Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden eignet, andererseits aber auch die Wirkung dieser Stoffe bzw. Stoffgruppe, nämlich die Cholinesterase-Hemmung detektiert und damit eine toxische Wirkung auf das Nervensystem.

Der automatisierte Cholinesterase-Biosensor als FIA (FIA = Flow Injection Analyser) [18] ist eine vielversprechende Entwicklung der Zukunft; auf dieser Basis lassen sich auch andere Enzymsysteme auf Membranen immobilisieren und als Biosensor einsetzen.

Enzymsensoren zeigen entscheidende Unterschiede im Vergleich zu den teilweise schon erhältlichen mikrobiellen Sensoren [22]. Bei den Enzymsensoren haben die Enzyme in dem Sensor einen direkten Zugriff zum Substrat; im mikrobiellen Sensor muß das Substrat erst in die Zelle (Zellmembran) transportiert werden, dieses erfordert Energie, für deren Bereitstellung die Atmung eine entscheidende Rolle spielt. Die Messung erfolgt somit in der Regel bei den mikrobiellen Sensoren mit einer amperometrischen Sauerstoffmessung. Eine interessante Entwicklung stellen z.Zt. die Immunoreaktoren dar, die über antikörperspezifische Systeme einerseits Detektieren und gleichzeitig die Spurenstoffe (Pestizide) anreichern: immuno-absorbent analyte-trapping device.

Betrachtet man die Leistung für den am Gewässer bereit erprobten Biosensor (Cyanobakterien-Elektrode) hinsichtlich Atrazin mit einer Nachweisgrenze von < 10 µg/L Atrazin, so ist andererseits aber auch zu berücksichtigen, daß diese Konzentrationen bei weitem oberhalb der real im Gewässer vorkommenden Pestizidkonzentrationen liegen. Damit relativiert sich die praktische Anwendung dieses on-line Biosensors, sein überzeugender Vorteil ist im Gewässerschutz die Früherkennung von Störfällen, und damit ist sein Einsatz insbesondere bei der Emissionskontrolle zu sehen.

## Literatur

1. HANSEN, P.-D.: Das "Wabolu-Aquatox" zur integralen Erfassung von Schadstoffen im Wasser. *Vom Wasser*, Bd. 67, 1986, 221-235
2. HANSEN, P.-D.: Wirkungsbezogene Biertestverfahren - Gefährliche Stoffe - Qualitätsziele zum Schutz oberirdischer Gewässer. *Vom Wasser*, Bd. 70, 1988, 187-196
3. CHRISTMANN, W., U. HAGENDORF, J. HAHN, P.-D. HANSEN und H. REINCKE: Nachweis organischer Halogenverbindungen im Gewässer durch Gewerbeabwasser. *Korrespondenz Abwasser*, 38, 8, 1991, 1028-1032.
4. ARGE ELBE: Schadstoffüberwachung der Elbe bei Schnackenburg mit der Dreikantmuschel - Aktives Biomonitoring - 1990-1991. 1993, 61-63
5. HANSEN, P.-D.: Phagocytosis in *Mytilus edulis*, a System for Understanding the Sublethal Effects of Anthropogenic Pollutants and the Use of AOX as an Integrating Parameter for the Study of Equilibria between Chlorinated Organics in *Dreissena polymorpha* Following Long Term Exposures. In: *Limnologie aktuell*, Vol. 4, Eds. Neumann & Jenner: The Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 1992
6. HANSEN, P.-D., R.F. ADDISON & D.E. WILLIS: Hepatic Microsomal O-De-Ethylases in cod (*Gadus morrhua*): Their induction by Aroclor 1254 but not by Aroclor 1016. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 74C, 1, 1983, 173-175
7. HANSEN, P.-D. & R. F. Addison: The use of mixed function oxidases (MFO) to support biological effect monitoring in the sea. *ICES. C.M.*, 1990, 1990/E.33
8. ADDISON, R.F., H.-J. PLUTA & P.-D. HANSEN: Absence of MFO-Induction in several species of North Sea flatfish (*Platichthys flesus*, *Limanda limanda* and *Solea solea*) following treatment with PCB substitute with Ugilec 141, *Mar. Env. Res.* Vol. 31, 1991, 137-144
9. ADDISON, R.F., P.-D. HANSEN & E.C. Wright: Hepatic Mono-Oxygenase Activities in American Plaice (*Hippoglossoides Platessoides*) from the Miramichi Estuary, N.B. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences No. 1800, 1991
10. HERBERT, A. & P.-D. HANSEN: Erfassung des erbgutverändernden Potentials von Gewässern durch Messung von DNS-Schäden mittels alkalischer Denaturierungsverfahren. *Schriftenreihe Wasser-, Boden- und Lufthygiene* 89, 745-754, 1992

11. HANSEN, P.-D.: Suborganismische Testverfahren - Anwendungsbereich und Bewertungsfrage. Schriftenreihe Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 705-720, 1992
12. HANSEN, P.-D.: Mikroorganismen als biologische Warnsysteme. - Ihre Verwendung in der Überwachung der aquatischen Umwelt. Bundesgesundheitsblatt, 32, 4, 1989, 137-139
13. HANSEN, P.-D.: Biologische Toxizitätsteste, Teil III: Ausgewählte Testverfahren. Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 1989, 26-27
14. HANSEN, P.-D., R. Bock & F. Brauer: Investigations of Phagocytosis concerning the immunological defence mechanism of *Mytilus edulis* using a sublethal luminescent bacterial assay (*Photobacterium phosphoreum*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 100C, No 1/2, 1991, 129-132
15. ERNST, W., H. WEIGELT, H. ROSENTHAL & P.-D. HANSEN: Testing Bioconcentration of Organic Chemicals with the Common Mussel (*Mytilus edulis*). In: Bioaccumulation in Aquatic Systems. Hrsg. Nagel, R., VCH-Verlag, Weilheim, 1991
16. KITTSTEINER-EBERLE, R. und H.-L. SCHMIDT: Wirkungsweise und Möglichkeiten von Biosensoren. Technische Rundschau, 13, 1986, 68-71
17. SCHELLER; F. und F. SCHUBERT: Biosensoren, in: Beiträge zur Forschungstechnologie Bd. 18, 6-8, Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, 1989
18. KINDERVATER, R., W. KÜNNECKE und R.D. SCHMID: Exchangable immobilized enzyme reactor for enzyme inhibition tests in flow-injection analysis using nagnetic device. Determination of pesticides in drinking water. Anal. Chim. Acta, 234, 1990, 113-117
19. ZIMMERMANN, G.M., L. WEIL und K.-E. QUENTIN: Biotest als Summenparameter zur Bestimmung von Herbiziden im Wasser - Empfindlichkeit und Erfassungsvermögen. Vom Wasser, 74, 1990, 195-206
20. RAWSON, D.M., A.J. WILLMER: The development of whole cell biosensors for on-line screening of herbicide pollution of surface waters. Toxicity Assessment. 2, 1987, 325-340
21. HANSEN, P.-D.: On-Line Monitoring mit Biosensoren am Gewässer zur ereignisgesteuerten Probenahme. Acta hydrochim. hydrobiol. 20, 2, 1992, 92-95
22. RIEDEL K., NEUMANN, B. und Scheller, F.: Mikrobielle Sensoren auf der Basis von Respirationsmessungen. Chem.-Ing.-Tech. 64, 6, 1992, 518-528

**Bakterientoximeter mit Reinkulturen  
(*Photobacterium phosphoreum* und *Pseudomonas putida*)  
in der Gewässerüberwachung**

Heidi Fritz-Langen, Brigitte Blessing, Falk Krebs

### **Zusammenfassung**

Drei mit Reinkulturen betriebene, kommerzielle Bakterientoximeter wurden zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung am Rhein eingesetzt. Das Gerät Auto-Microtox (Hydro Environnement S.A., Poissy, Frankreich) wird mit dem Leuchtbakterium *Photobacterium phosphoreum* als Testorganismus betrieben. Meßparameter ist die Hemmung der Biolumineszenz. Das Gerät arbeitet mit gefriergetrockneten Bakterienpräparaten (Microbics Corporation, Carlsbad, California, USA). Neben dem vom Hersteller empfohlenen NaCl-Medium wurde das Leuchtbakterien-ASW (Artificial Sea-Water)-Medium nach Klein als Testmedium erprobt. Durch die Zugabe von Alkali- und Erdalkalitionen konnten die auf die Lichtemission positiv wirkenden Matrixeffekte des Flußwassers vollständig kompensiert werden. Die Ionenzusammensetzung des Testmediums beeinflußt neben der Leuchttintensität auch die Sensitivität der Bakterien. Die Verwendung von L-ASW-Medium führte für Natriumpentachlorphenolat zu einer markanten Empfindlichkeitssteigerung, für Zink dagegen zu einer deutlichen Empfindlichkeitsabnahme gegenüber der nur Natriumchlorid als osmotisches Medium enthaltenden Testdurchführung.

Im Vergleich zum Leuchtbakterientestautomaten wurden zwei Geräte mit separater Zellanzucht getestet: Toxalarm (LAR, Berlin) und Stiptox-norm (Siepmann und Teutscher, Groß-Umstadt). Meßparameter ist die Atmungshemmung des Teststammes *Pseudomonas putida*. In einer vergleichenden Untersuchung wurde die Empfindlichkeit der Geräte gegenüber Natriumpentachlorphenolat ermittelt.

Die Möglichkeit des Einsatzes von Bakterientoximetern in der kontinuierlichen Gewässerüberwachung wird anhand praxisbezogener Kriterien (z.B. Standzeit, Wartungsbedarf) diskutiert.

### **Summary**

Three commercially available bacterial toxicity monitors operating with pure cultures were employed in on-line water quality monitoring of the River Rhine.

The test system Auto-Microtox (Hydro Environnement S.A., Poissy, France) uses luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* as test organisms. The measuring parameter is the inhibition of bioluminescence. Freeze-dried bacteria (Microbics Corporation, Carlsbad, California, USA) are employed in this system. Beside the

sodium chloride medium, which is recommended by the producer, the ASW (artificial sea-water) luminescent bacteria medium according to Klein was used for reducing enhancement effects of samples from the River Rhine. The ASW medium contains, besides sodium, potassium, magnesium, and calcium ions, and brings stimulation of light intensity to both samples and controls. The experiments show that the matrix effects that exert a positive influence on the light emission is compensated by addition of alkaline and alkaline-earth ions. The disadvantage of this procedure is that the ASW medium influences the sensitivity of the luminous bacteria. The sensitivity increases for sodium pentachlorophenolate and decreases for zinc sulphate.

For comparison two systems with separate cell cultivation were tested: Toxalarm (LAR, Berlin) and Stiptox-norm (Siepmann und Teutscher, Groß-Umstadt). Here the measuring parameter is the inhibition of respiration of the test bacteria *Pseudomonas putida*. The sensitivity of the systems to sodium pentachlorophenolate was tested and compared.

The possibility of using bacterial toxicity test systems in on-line monitoring is critically discussed with regard to their practical operation in the field, including service life and maintenance requirements.

## Einleitung

Ziel einer kontinuierlichen Gewässerüberwachung ist die schnelle und zuverlässige Erfassung von Schadstoffwellen. Da die chemische Analytik dieses wegen der Vielfalt der potentiellen Schadstoffe nicht zu leisten vermag, werden biologische Testverfahren für diese Aufgabe herangezogen. Um die unterschiedlichen Wirkungsspezifitäten von Schadstoffen erfassen zu können, wurden im Rahmen des Forschungsprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" kontinuierlich arbeitende Biomonitoring mit Testorganismen aus verschiedenen Trophieebenen entwickelt und erprobt [1, 2, 3]. Auf der Ebene der Bakterientoximeter standen schon zu Beginn des Projektes mehrere kommerzielle Geräte zur Verfügung.

Der Einsatz von Bakterien als Testorganismen in der Gewässerüberwachung rechtfertigt sich einerseits durch ihre zentrale Rolle im Stoffhaushalt der Flüsse [4, 5], andererseits durch ihre leichte Verfügbarkeit und Handhabbarkeit. Im Prinzip kann zwischen zwei Gerätetypen mit verschiedenen Arbeitsprinzipien unterschieden werden: zwischen Toximetern, die mit Reinkulturen [6, 7], und solchen, die mit Mischkulturen - sei es mit Submerskulturen [8] oder Aufwuchsorganismen [9, 10, 11] - arbeiten.

Ein Vorteil von Reinkulturen ist die Einhaltung gleichbleibender Testbedingungen während des gesamten Überwachungszeitraumes. Durch die separate Anzucht wird eine Unabhängigkeit vom zu untersuchenden Gewässer erreicht, Adaptationseffekte werden dadurch ausgeschlossen [12]. Genau definierte Bedingungen lassen reproduzierbare Antworten bei Stoffprüfungen erwarten.

Als Reinkulturen wurden folgende Stämme eingesetzt:

*Pseudomonas putida* ist ein ubiquitär verbreiteter Wasser- und Bodenorganismus. Das Bakterium wird in den DIN-genormten Prüfverfahren (Sauerstoffverbrauchs- [13] und Zellvermehrungshemmtest [14]) routinemäßig bei Wasseruntersuchungen eingesetzt. Über diesen Stamm liegen zahlreiche Daten zur Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Chemikalien vor [15].

*Photobacterium phosphoreum* ist ein mariner Organismus. In gefriergetrockneter, flüssiggetrockneter oder frisch gezüchteter Form wird dieses Leuchtbakterium für Testzwecke eingesetzt [16, 17]. Es liegen zahlreiche Untersuchungen über die Empfindlichkeit von Photobakterien vor [18-22].

In dieser Arbeit werden drei Geräte verglichen, von denen zwei (Toxalarm und Stiptox-norm) mit *Pseudomonas putida* und das dritte (Auto-Microtox) mit *Photobacterium phosphoreum* arbeiten. Die Geräte waren gleichzeitig in der Biologischen Meßstation der Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz installiert. Über die praktische Erprobung am Gewässer und über Chemikalienversuche in Rheinwasser wird berichtet. Ergebnisse aus Aufstockungsexperimenten mit Natriumpentachlorphenolat und Zinksulfat werden vorgestellt.

## Material und Methode

### Geräte

#### Auto-Microtox

Das Bakterientoximeter Auto-Microtox (Hydro-Environnement S.A., Poissy, Frankreich) ist die automatisierte Version des Microtox-Leuchtbakterientests. Als Testorganismus dient das Leuchtbakterium *Photobacterium phosphoreum* (gemäß neuerer Bestimmungen ist der Stamm *Vibrio fischeri* zuzuordnen [23]). Meßgröße ist das Eigenleuchten dieser Organismen. Enthält das Testwasser bakterientoxische Substanzen, so wird die Leuchttintensität reduziert.

Die Testorganismen werden als gefriergetrocknete Präparate (Microbics Corporation, Carlsbad, USA) bezogen. Unmittelbar nach der Rehydratation (hier: mit 2%iger NaCl-Lösung oder mit Leuchtbakterien-Artificial-Sea-Water (L-ASW)-Medium nach Klein [24], Tab. 1) besitzen sie wieder ihre ursprüngliche, volle Leuchtkraft.

Das Auto-Microtox-Gerät besteht aus 3 Untereinheiten (Abb. 1 und 2):

- Elektronische Einheit
- Manipulator
- Computereinheit

Tab. 1: Leuchtbakterien-ASW (Artificial-Sea-Water)-Medium nach Klein (L-ASW-Medium) zur Herstellung der Testsuspension im optimierten Leuchtbakterientest (L-ASW-Test)

Salze	Molarität mmol/l	Kationen g/l	Einwaage g/l
NaCl	250	5,747	14,610
KCl	10	0,391	0,746
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	50	1,216	10,165
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	10	0,401	1,470

Tab. 2: Auto-Microtox: Aufstockungsexperimente in Rheinwasser mit Zinksulfat und Natriumpentachlorphenolat in Abhängigkeit vom Rekonstitutions- und Testmedium

Testbedingungen	Leuchthemmung in %	
	2,5 mg/l Zink <sup>1)</sup>	100 µg/l Na-PCP
Rekonstitution: NaCl-Lsg. Test: NaCl-Lsg.	91,2 ± 1,4	-8,3* ± 11,9
Rekonstitution: NaCl-Lsg. Test: L-ASW-Medium	22,8 ± 4,5	n.b.
Rekonstitution: L-ASW-Medium Test: L-ASW-Medium	18,0 ± 4,6	24,9 ± 9,1

1) Die Konzentrationsangaben für Zink sind auf das Wirkion bezogen.

Na-PCP: Natriumpentachlorphenolat, n.b.: nicht bestimmt, \*: Förderung der Leuchttintensität.

Die **elektronische Einheit** steuert die Temperatur der Thermoblöcke (+4 und +15 °C) und die am Photomultiplier angelegte Spannung. Die **Manipulator-Einheit** setzt sich aus einem programmierbaren Manipulator (der eine Kanüle dreidimensional bewegen kann), einer Dosierpumpe (dem Diluter) und einem Mischpult zusammen. Die Koordination aller Untereinheiten und Speicherung aller Daten erfolgt über die **Computereinheit**.

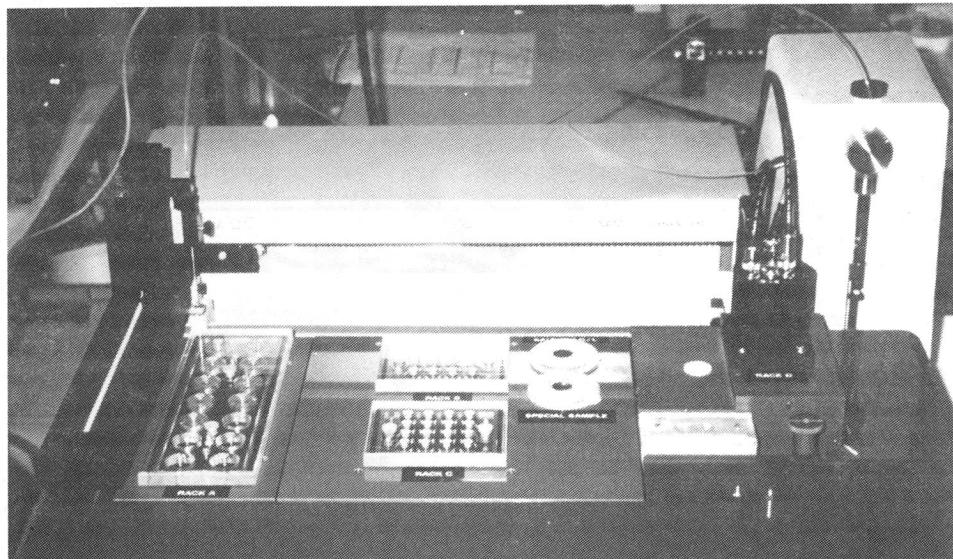


Abb. 1: Bakterientoximeter Auto-Microtox

Das Mischpult (Abb. 2) besteht aus 4 Kompartimenten (3 Thermoblöcke, eine Meß- und Inkubatoreinheit): Kompartiment A enthält die lyophilisierten Bakterienpräparate (maximal 14 Fläschchen) und ist auf 4 °C gekühlt, im Kompartiment B werden die rekonstituierten Bakterien und die Rekonstitutionslösung bei 4 °C aufbewahrt, im Kompartiment C werden die Wasserproben und das Verdünnungswasser temperiert (15 °C), das Kompartiment D besteht aus der Meß- und Inkubatoreinheit (Photomultiplier und Küvettenrevolver mit 4 Küvetten, 15 °C). Es besteht die Möglichkeit, Proben sowohl aus der Durchflußzelle (hier Rheinwasser) als auch aus dem separaten Probengefäß (in der Abb. 2 "toxische Probe" genannt) zu entnehmen. Außerdem befindet sich im Mischpult noch ein Vorratsgefäß mit einer zehnfach konzentrierten Salzlösung, die zur Bereitung der Rekonstitutionslösung und des Verdünnungswassers dient.

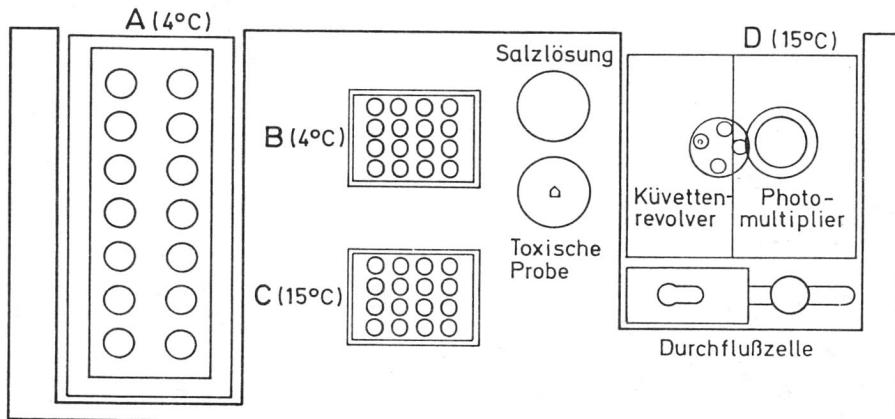


Abb. 2: Bakterientoximeter Auto-Microtox: Schematischer Aufbau des Mischpults. A, B, C und D sind Kompartimente des Mischpults (s. Text).

Der automatische Testablauf ist in mehrere Phasen unterteilt:

**Vorbereitungsphase (Initialization):** Spülen und Bereitung der Rekonstitutionslösung (2% NaCl-Lsg. oder isoosmotisches L-ASW-Medium) in Kompartiment B.

**Rekonstitution (Regeneration):** Spülen, Rehydratation des Bakterienpräparates mit 2 ml Rekonstitutionslösung in Kompartiment A (der Inkubationsblock wird nach Zugabe der Rekonstitutionslösung automatisch kopfüber geschüttelt). Überführen der Vorratssuspension von Kompartiment A nach B und Bereitung neuer Rekonstitutionslösung.

**Bereitung des Testgutes (Analysed waters treatment):** Spülen, Bereitung des Verdünnungswassers (2% NaCl-Lsg. oder isoosmotisches L-ASW-Medium), Probenahme (900 µl) und Aufsalzen der Probe mit 100 µl 20% NaCl-Lsg. oder zehnfach konzentriertem L-ASW-Medium in Kompartiment C.

**Bereitung der TestSuspensionen (Reagent preparation):** 10 µl Vorratssuspension plus 90 µl Verdünnungswasser werden in den 4 Meßküvetten (Kompartiment D) angesetzt. Das TestSuspensionsvolumen beträgt somit 100 µl.

**Bestimmung der Leuchtintensität  $I_0$  (Initial luminescence):** Die Leuchtintensitäten der TestSuspensionen werden während der 15 minütigen Stabilisierungsphase kontinuierlich gemessen und auf dem Bildschirm angezeigt. Die Leuchtintensitäten aller Kontroll- und Testansätze werden unmittelbar vor Zugabe des Verdünnungswassers resp. des Testgutes als Ausgangswerte  $I_0$  gespeichert.

**Testgutzugabe (Analysed waters addition):** 900 µl Testgut werden zu 100 µl Testsuspension pipettiert. Der Kontrollansatz erhält 900 µl Verdünnungswasser. Die Belegung der Testküvetten ist frei wählbar. So können beispielsweise die 4 Plätze belegt werden mit 2 Kontrollansätzen, einem Testansatz mit Rheinwasser und einem Testansatz mit einem Referenzstandard (toxische Probe, Abb. 2).

**Messung (Measurement):** Kontinuierliche Messung der Leuchtintensität über eine Kontaktzeit von 30 min.

**Auswertung (Evaluation):** Die Hemmung der Lichtemission wird aus der zeitlichen Änderung der Leuchtintensität ermittelt. Die Auswertung erfolgt auf die gleiche Art und Weise wie in der DIN-Norm zum Leuchtbakterientest [16] beschrieben:

$$H_{30} = \frac{I_{T0} \cdot [I_{K30} / I_{K0}] - I_{T30}}{I_{T0} \cdot [I_{K30} / I_{K0}]} \cdot 100 = \frac{I_{c30} - I_{T30}}{I_{c30}} \cdot 100$$

$H_{30}$ : Hemmwirkung auf die Lichtemission eines Testansatzes nach der Kontaktzeit von 30 min in %.

$I_{K0}$ : Leuchtintensität im Kontrollansatz unmittelbar vor der Zugabe des Verdünnungswassers (zum Zeitpunkt  $t=0$ ).

$I_{K30}$ : Leuchtintensität im Kontrollansatz nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 min.

$I_{T0}$ : Leuchtintensität der Testsuspension im Testansatz unmittelbar vor der Zugabe des Testgutes (zum Zeitpunkt  $t=0$ ).

$I_{T30}$ : Leuchtintensität im Testansatz nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 min.

$I_{c30}$ : Theoretische Leuchtintensität eines Testansatzes nach der Kontaktzeit, die aufgetreten wäre, wenn das Testgut keine Wirkstoffe enthalten hätte. Der  $I_{c30}$ -Wert dient als Bezugsgröße (100%-Wert) für die Auswertung.

Nach der Messung startet ein neuer Meßzyklus, der mit der **Bereitung des Testgutes** beginnt. Ist die Vorratssuspension verbraucht (nach ca. 14 Stunden), so beginnt der Zyklus mit dem Arbeitsschritt der **Rekonstitution** eines neuen Bakterienpräparates. Wird während der Messung eine vorgewählte statische Alarmschwelle überschritten, so wird vom Gerät Alarm angezeigt.

Das Auto-Microtox-Gerät wurde für eine kontinuierliche Gewässerüberwachung konzipiert [25]. Erprobt wurde ein Leihgerät der ersten Fabrikationsserie. Es war in der Bundesanstalt für Gewässerkunde installiert von Januar bis Mai 1993.

## Toxalarm

Das Bakterientoximeter Toxalarm (LAR Analytik & Umweltmeßtechnik GmbH, Berlin) arbeitet nach dem Prinzip eines Sauerstoffverbrauchs hemmtests [26-31]. Bei schadstofffreiem Testwasser ist durch die hohe Atmungsaktivität der Testorganismen die Sauerstoffkonzentration in der Meßzelle niedrig. Enthält das Testwasser bakterientoxische Substanzen, so steigt der Sauerstoffgehalt in der Meßzelle im Vergleich zur unvergifteten Probe an. Übersteigt der Sauerstoffgehalt in der Meßzelle einen Grenzwert, dann wird Alarm angezeigt.

Als Testorganismus dient *Pseudomonas putida*. Die Anzucht erfolgt in einem nicht sterilen Turbidostaten mit Glutaminat als selektiver Kohlenstoffquelle. Die Messung erfolgt kontinuierlich und das Gerät arbeitet vollautomatisch (Abb. 3). Die Testdurchführung und Berechnung der Atmungshemmung erfolgte wie von Fritz-Langen et al. beschrieben [31]. Das Gerät war in der Bundesanstalt für Gewässerkunde von 1990 bis 1993 installiert.

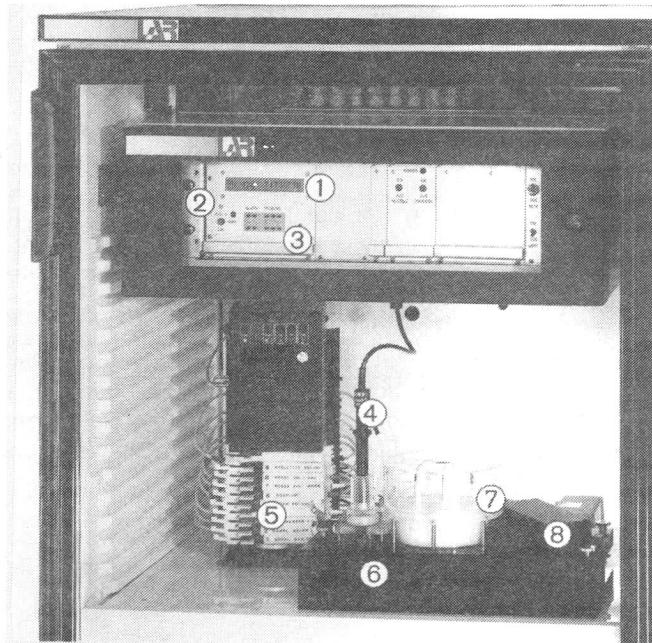


Abb. 3: Bakterientoximeter Toxalarm (Werkphoto): ① LCD-Display, ② Auswerte-Elektronik, ③ Eingabe von Alarmschwellen, Trübungssollwert im Fermenter und Service-Funktionen, ④ Sauerstoff-Meßelektrode, ⑤ Schlauchpumpe, ⑥ Meßzelle, ⑦ Fermenter (Turbidostat), ⑧ Trübungsmeßkopf.

## Stiptox-norm

Das Bakterientoximeter Stiptox-norm (Siepmann und Teutscher GmbH, Groß-Umstadt) arbeitet nach einem dem Toxalarm vergleichbaren Prinzip. Meßparameter ist auch hier die Hemmung der bakteriellen Atmung. Die Anzucht des Testorganismus *Pseudomonas putida* erfolgt in einem unsterilen Chemostaten mit Glutaminat als selektiver Kohlenstoffquelle. Die Messung erfolgt kontinuierlich und das Gerät arbeitet vollautomatisch und verfügt über eine statische Alarmwerterkennung (Abb. 4). Die Testdurchführung und Berechnung der Atmungshemmung erfolgte wie von Fritz-Langen et al. beschrieben [31].

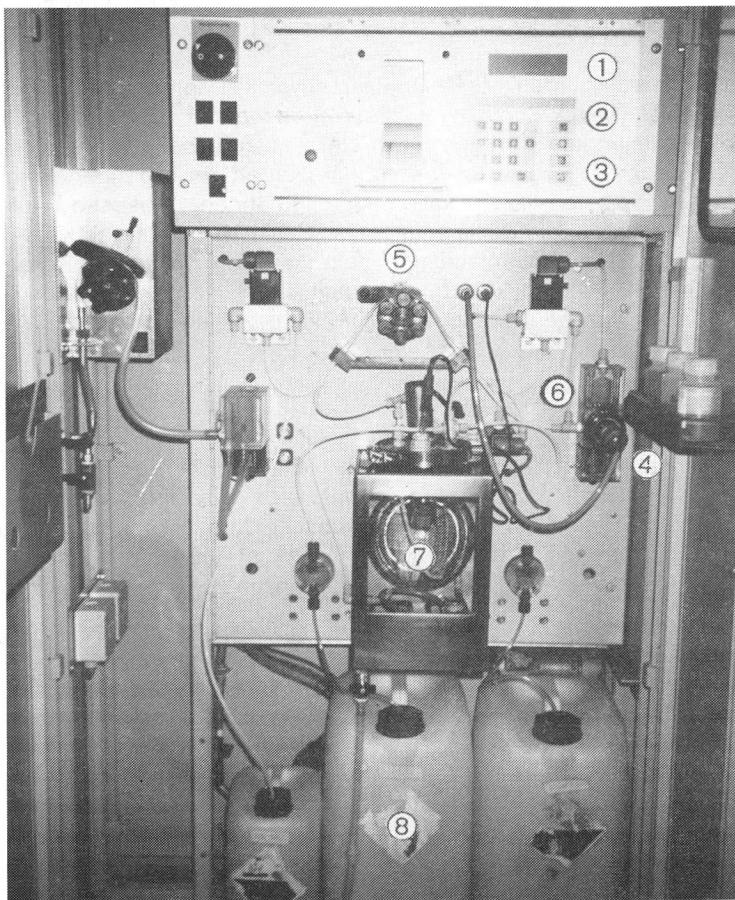


Abb. 4: Bakterientoximeter Stiptox-norm: ① LCD-Display, ② Auswerte-Elektronik, ③ Eingabe von Alarmschwellen und Service-Funktionen, ④ Sauerstoff-Meßelektrode, ⑤ Schlauchpumpe, ⑥ Meßzelle, ⑦ Fermenter (Chemostat), ⑧ Nährösungsbehälter.

Das Analyseverfahren des Stiptox-norm wurde für eine kontinuierliche Abwasser- und Gewässerüberwachung konzipiert [11]. Erprobt wurde ein Leihgerät der ersten Fabrikationsserie. Es war in der Bundesanstalt für Gewässerkunde installiert von August 1991 bis Mai 1993. Am 27. Februar 1992 registrierte das Gerät einen Rheinalarm [31].

## Testdurchführung

Der Normalverlauf der Meßparameter wurde bei Betrieb mit Rheinwasser aufgenommen. Die gerätespezifischen Testbedingungen (physikalische und chemische Veränderungen des Testwassers) sind hierbei zu berücksichtigen.

Als Testchemikalien wurden Zinksulfat-Heptahydrat (Merck 8883) und Natriumpentachlorphenolat (Merck-Schuchardt 820952) verwendet. Von beiden Substanzen wurden Stammlösungen hergestellt, die entsprechend der eingesetzten Testkonzentrationen mit Rheinwasser verdünnt wurden. Im folgenden werden die in Rheinwasser gelösten Chemikalien durchgeführten Versuche Aufstockungs-experimente genannt. Für die Bestimmung des LOEC-Wertes (Lowest Observed Effect Concentration) für Natriumpentachlorphenolat wurden folgende Konzentrationen getestet: 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 und 1,5 mg/l. Alle Konzentrationsangaben sind Nominalwerte. Die Konzentrationsangaben für Zink beziehen sich auf das Wirkion.

## Auswertung

Für die statistische Auswertung von Meßdaten kontinuierlicher Biotestverfahren gab es bislang keine einheitlich festgelegte Vorgehensweise. Um einen Alarmfall sicher von natürlichen Schwankungen der Meßwerte unterscheiden zu können, wurden von der Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein" Bewertungsschemata zur Beurteilung der Meßdaten entwickelt und Alarmgrenzen zur Alarmauslösung festgelegt [32, 33].

## Basislinie und Nulleffekt

Beim Monitoring zeigt jede Meßgröße einen mehr oder minder schwankenden Verlauf auf. Auch wenn die Schadstoffkonzentration "Null" ist, so sind doch die Testorganismen im zeitlichen Verlauf unterschiedlich aktiv. Der Meßwertverlauf wird Basislinie genannt. Der aus diesen Meßwerten errechnete Effekt wird als Nulleffekt bezeichnet und wird als prozentuale Hemmung der Meßgröße angegeben.

Bei den Geräten Toxalarm und Stiptox-norm ist die Meßgröße die Sauerstoffkonzentration in der Meßzelle. Die Transformation der Sauerstoffkonzentrationsmeßwerte in prozentuale Atmungshemmewerte legt den Nulleffekt des jeweiligen Biomonitor offen. Hierzu wird der aus der Basislinie der Sauerstoffzehrung errechnete Mittelwert (der beim Toxalarm zwischen 4 und 6 % Sauerstoffsättigung und beim

Stiptox-norm zwischen 0,3 und 0,6 mg/l O<sub>2</sub> liegt [31]) als Mittelwert des Nulleffektes "mit 0 %iger Hemmung" definiert. Danach werden die die Schwankungsbreite der Basislinie bestimmenden einzelnen Meßwerte nach folgender Gleichung in prozentuale Hemmwerte umgerechnet:

$$H = \frac{S_E - S_M}{S_V - S_M} \cdot 100$$

H : relative Hemmung in %.

S<sub>M</sub>: Mittelwert der Sauerstoffkonzentrationen in der Meßzelle über einen Bezugszeitraum. Er wird aus der Sauerstoffverbrauchsbasislinie errechnet.

S<sub>E</sub>: Sauerstoffkonzentration in der Meßzelle zu einem bestimmten Meßzeitpunkt t (E=Einzelwert).

S<sub>V</sub>: maximal erreichbare Sauerstoffkonzentration in der Meßzelle bei voller Vergiftung.

Die Berechnung des Nulleffektes wird von keinem der beiden Geräte durchgeführt. Die Testauswertung im Sinne der Projektgruppe muß sowohl beim Toxalarm als auch beim Stiptox-norm separat ausgeführt werden.

Die Meßgröße des Auto-Microtox-Gerätes ist die Leuchtintensität. Diese wird automatisch in Beziehung zu den I<sub>0</sub>- und Kontrollansatz-Werten gesetzt und als prozentuale Hemmwirkung berechnet. Die Hemmwirkung kann einerseits vom Nullwert stark abweichen, andererseits ein positives oder negatives Vorzeichen tragen. Der Nulleffekt des Auto-Microtox-Gerätes wird nicht aus einer Basislinie heraus errechnet, sondern resultiert aus dem Meßwertevergleich von Testansätzen zu parallelen Kontrollansätzen. Da das Gerät den Nulleffekt direkt anzeigt, verfügt es über eine im Sinne der Projektgruppe perfekte Testauswertung.

#### Schwankungsbreite eines Testsystems

Die Abweichung vom Mittelwert des Nulleffektes wird als Schwankungsbreite des Testsystems bezeichnet. Sie wird als einfache Standardabweichung in Absolutzahlen mit entsprechender Einheit angegeben.

#### Alarmschwelle

Um die natürlichen Meßwertschwankungen von schadstoffbedingten Meßwertniveaus unterscheiden zu können, werden mit jedem Testsystem zunächst Kontrollmessungen ohne Schadstoffzugabe vorgenommen. Eine bestimmte Anzahl von Messungen (n ≥ 30), die der aktuellen Messung vorangehen, werden als Nulleffektmessungen betrachtet. Aus den Werten des Bezugszeitraumes wird auf den aktuell zu

erwartenden Nulleffekt, die Normalaktivität, extrapoliert. Eine Schadstoffwirkung zeigt sich als Abweichung der aktuellen Aktivität von der berechneten "theoretischen" Normalaktivität.

Ändern sich die Meßwerte eines Testsystems während der Prüfung von schadstofffreiem Testwasser nur geringfügig - wie es bei den hier beschriebenen Bakterientoximetern der Fall ist - dann reichen statische Alarmgrenzen aus. Eine Überschreitung indiziert eine Schadstoffwelle und löst ein Alarmsignal aus. Weist dagegen der Nulleffekt eine Drift oder stärkere zeitliche Schwankungen auf, so sind veränderliche, dynamische Alarmgrenzen zur Alarmauslösung erforderlich, um Fehlalarme zu vermeiden.

Um die Wahrscheinlichkeit für die Auslösung von Fehlalarmen zu verringern, wird als Alarmschwelle der Wert festgelegt, der um die dreifache Standardabweichung über dem Mittelwert des Nulleffektes liegt [32].

### Sensitivität eines Testsystems

Die Sensitivität wird beschrieben durch die Schadstoffkonzentration, die bei einem Testsystem innerhalb einer testspezifischen Einwirkzeit eine bestimmte, statistisch signifikante Wirkung hervorruft. Zur Kennzeichnung dienen Schwellen- oder LOEC-Werte, die in Aufstockungsexperimenten mit ausgewählten Referenzchemikalien ermittelt werden.

### Schwellenwert

Der Schwellenwert ist die errechnete Konzentration eines Schadstoffes, bei der mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit eine vom Normalverhalten abweichende Wirkung gemessen werden kann. Der Schwellenwert wird im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz aus dem Schnittpunkt zweier Geraden ermittelt. Die eine Gerade verläuft parallel zur x-Achse im Abstand der 3fachen Standardabweichung des Nulleffektes über dem Mittelwert des Nulleffektes, die andere ist die Regressionsgerade durch die unteren Fehlerbalkenwerte (einfache Standardabweichung) der Meßwerte. Die Bestimmung von Schwellenwerten erfordert mindestens vier Wiederholungen je Konzentrationsstufe [32].

### LOEC-Wert

Der LOEC-Wert (Lowest Observed Effect Concentration) ist die erste geprüfte Konzentrationsstufe in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe, bei der eine vom Normalverhalten abweichende Wirkung beobachtet wird. Statistisch gesichert wird dieser experimentelle Wert durch die Forderung nach einer Signifikanzschwelle. Als Signifikanzschwelle wird der Wert festgelegt, der um die vierfache Standardabweichung über dem Mittelwert des Nulleffektes liegt. Als LOEC-Wert wird

diejenige Konzentrationsstufe definiert, bei der in mindestens drei von vier Wiederholungen die Alarmschwellen überschritten wird [32].

Der LOEC-Wert wird zur Charakterisierung der Testgerätsensitivität immer dann herangezogen, wenn sowohl die Anzahl der getesteten Konzentrationsstufen als auch die Anzahl der Wiederholungen so limitiert sind, daß eine statistisch gesicherte Berechnung von Schwellenwerten nicht möglich ist.

## Ergebnisse

### Normalverlauf bei Betrieb mit Rheinwasser

#### Auto-Microtox

Der Nulleffekt des Auto-Microtox-Gerätes mit Rheinwasser als Testwasser wurde für zwei verschiedene Betriebsbedingungen bestimmt:

- Rekonstitution der gefriergetrockneten Bakterien und Verdünnung der Probe mit 2%iger NaCl-Lsg.: Der Mittelwert des Nulleffektes (prozentuale Leuchthemmung) lag bei 12,2 % Leuchtförderung, die Standardabweichung betrug 8,3 Prozentpunkte,
- Rekonstitution der gefriergetrockneten Bakterien und Verdünnung der Probe mit L-ASW-Medium: Der Mittelwert des Nulleffektes (prozentuale Leuchthemmung) betrug 3,8 %, die Standardabweichung 5,7 Prozentpunkte.

Die geräteinterne Auswertung setzt alle negativen Hemmwerte (also die Förderungen des Leuchtens) gleich Null. Da die leuchtkraftfördernden Matrixeffekte eines Gewässers für die Beurteilung der Meßergebnisse von Bedeutung sind, wurden sie hier in die Betrachtung mit einbezogen. Die negativen Werte werden vom Auto-Microtox nicht als Meßergebnis abgespeichert, sie können nur dem ausführlichen Meßprotokoll entnommen werden.

#### Toxalarm

Bei der Rheinwassertestung lag die Sauerstoffbasislinie bei  $5,8 \pm 0,49$  % Sauerstoffsättigung (Abb. 5). Die Standardabweichung des Nulleffektes (prozentuale Atmungshemmung) betrug 0,62 %.

#### Stiptox-norm

Die Sauerstoffbasislinie des Stiptox-norm lag - abgesehen von dem Peak, der sich regelmäßig durch die automatische Säurespülung um Mitternacht ergab - bei 0,33 mg/l Sauerstoff (Abb. 6). Sie schwankte im Normalbetrieb mit Rheinwasser um maximal 0,02 mg/l Sauerstoff. Die Standardabweichung des Nulleffektes (prozentuale Atmungshemmung) betrug 0,13 %.

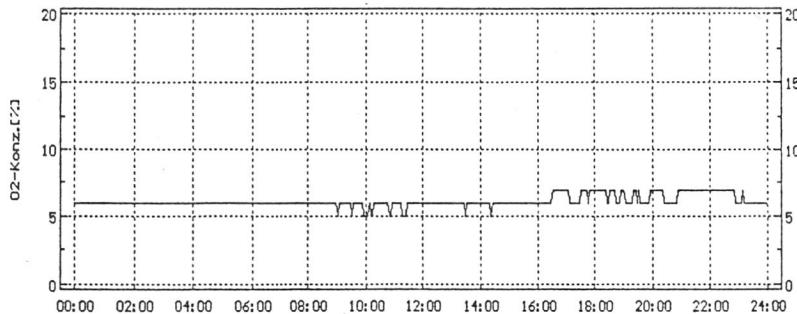


Abb. 5: Bakterientoximeter Toxalarm: Sauerstoffkonzentration in der Meßzelle bei Betrieb mit Rheinwasser als Testwasser.

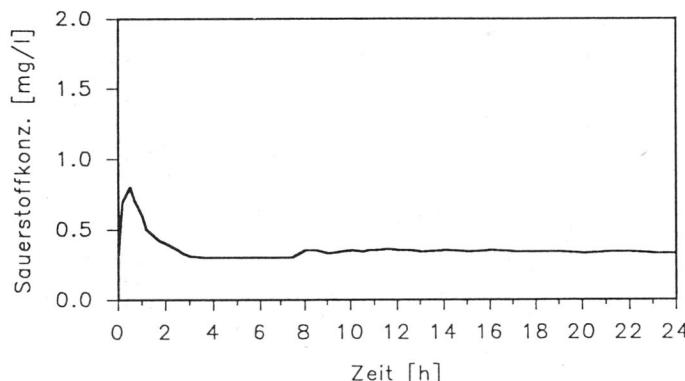


Abb. 6: Bakterientoximeter Stiptox-norm: Normalverhalten der bakteriellen Sauerstoffzehrung bei der Überwachung von Rheinwasser. Um 0 Uhr erfolgte eine automatische Säurespülung.

## Aufstockungsexperimente

### Auto-Microtox

Werden gefriergetrocknete Bakterienpräparate (Microtox-Bakterien) zur Gewässerüberwachung eingesetzt, dann wird zur Vermeidung von leuchtintensitätsfördernden Matrixeffekten von Klein [24] und Krebs [34] die Anwendung des L-ASW-Mediums empfohlen. Wie stark der Sensitivitätsverlust durch Matrixbestandteile des Rheinwassers bei Testung mit NaCl-Medium sein kann, ist der Abb. 7 zu entnehmen. Um eine x-prozentige Hemmung zu erzielen, ist es zunächst erforderlich, die durch das Flußwasser hervorgerufene Leuchtintensitätsförderung, hier 12,2 %, zu unterdrücken. Die Aufstockungsexperimente wurden daher parallel mit NaCl- und L-ASW-Medium durchgeführt (Tab. 2).

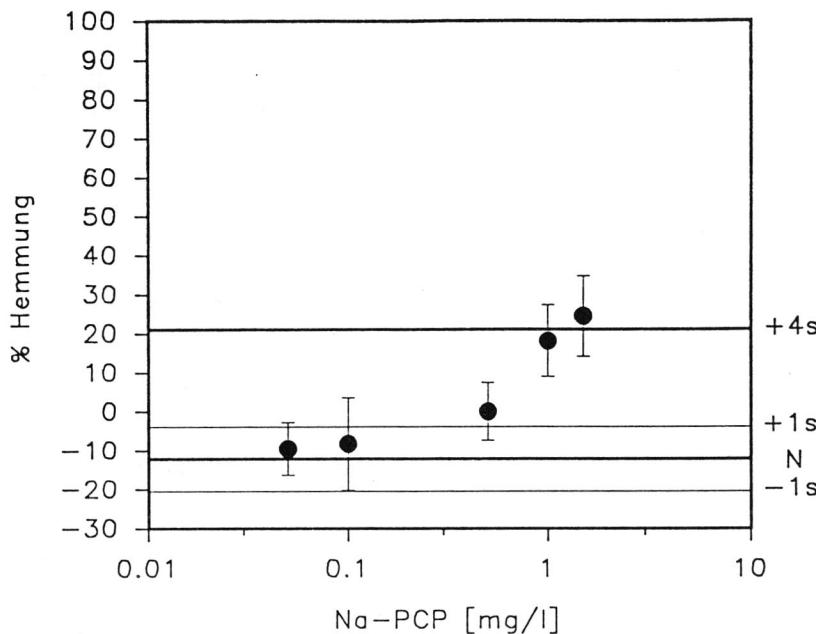


Abb. 7: Bakterientoximeter Auto-Microtox: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im Aufstockungsexperiment mit Rheinwasser: prozentuale Hemmung der Leuchttintensität von *Photobacterium phosphoreum* in Abhängigkeit von der Natriumpentachlorphenolat-Konzentration. Rekonstitutions- und Testmedium ist die 2%ige NaCl-Lösung. Eine Gerade im Abstand der vierfachen Standardabweichung des Nulleffektes (+4s) über dem Mittelwert des Nulleffektes (N) ist eingezeichnet. Die einfache Standardabweichung vom Mittelwert des Nulleffektes ( $\pm 1s$ ) beschreibt die Schwankungsbreite des Testsystems.

Im Aufstockungsexperiment mit Zink führte die Verwendung von L-ASW-Medium - im Vergleich zum NaCl-Medium - zu einer starken Empfindlichkeitsabnahme der Testbakterien. Die Kombination von "Rekonstitution mit NaCl-Lösung" und "Testdurchführung mit L-ASW-Medium" bewirkte den gleichen negativen Effekt. Entgegengesetzt veränderte sich die Empfindlichkeit für Natriumpentachlorphenolat. Bei Verwendung von L-ASW-Medium trat eine markante Empfindlichkeitssteigerung gegenüber der nur NaCl als osmotisches Medium enthaltenden Testdurchführung auf.

## **Empfindlichkeitsvergleich der Bakterientoximeter**

Die Ergebnisse des vergleichenden Aufstockungsexperiments mit Natriumpentachlorphenolat sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Empfindlichkeitsvergleich der Bakterientoximeter: Überblick über die LOEC-Werte für Natriumpentachlorphenolat in Aufstockungsexperimenten mit Rheinwasser

Testsystem	LOEC Na-PCP [mg/l]
Toxalarm	1
Stiptox-norm	1,5
Auto-Microtox	1,5 <sup>1)</sup>

1) Das Auto-Microtox-Gerät wurde nicht zeitgleich mit den anderen Geräten getestet. Rekonstitutions- und Verdünnungswasser war die 2%ige NaCl-Lsg.

## **Diskussion**

### **Auto-Microtox**

Die Leuchtintensität von Leuchtbakterien wird sowohl von der Osmolarität als auch von der Ionen Zusammensetzung des Testmediums beeinflußt. So vermögen Kalium-, Magnesium- und Calciumionen die in einer Natriumchlorid-Lösung erreichbare Leuchtintensität erheblich zu steigern. Befinden sich diese Stoffe in den erforderlichen Konzentrationen im Testgut, dann wird das Leuchten in den Testansätzen höher sein als in den ausschließlich Natriumchlorid enthaltenden Kontrollansätzen (wie es gemäß DIN 38412 Teil 34 [16] der Fall ist). Diese physiologische Abhängigkeit führt bei der Untersuchung von Oberflächenwasser, in welchem normalerweise diese Ionen vorhanden sind, zu Leuchtintensitätssteigerungen, die im ungünstigsten Fall zu falsch-negativen Befunden führen können. Ziel muß es deshalb sein, das Testmedium dagegen zu optimieren, daß im Regelfall keine Leuchtintensitätsförderungen vom Testgut mehr ausgehen können.

Da die Testdurchführung im Auto-Microtox-Gerät eng an den statischen Microtoxtest angelehnt ist, ist von Seiten des Herstellers als Rekonstitutions- und Testmedium eine 2%ige NaCl-Lösung vorgesehen. Die Untersuchungen von Klein [24, 35] und Krebs [34] an Microtox-Bakterien lassen den Schluß zu, daß es zur Steigerung der Sensitivität und zur Verhinderung falsch-negativer Ergebnisse notwendig ist, das Auto-Microtox-Gerät mit L-ASW-Medium zu betreiben. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden,

welches von beiden Medien für eine kontinuierliche Gewässerüberwachung besser geeignet ist. Im Unterschied zu der von Krebs [34, Seite 670] gewählten Verfahrensweise betrug die L-ASW-Konzentration in den 90%-Ansätzen der hier beschriebenen Versuche 1, d.h. die Testansatzkonzentrationen entsprachen den in Tab.1 aufgeführten Molaritäten.

Es wurden Parallelversuche unter verschiedenen Testbedingungen sowohl mit Zink als auch mit Natriumpentachlorphenolat durchgeführt (Tab. 2). Bei Verwendung von L-ASW-Medium nimmt die Empfindlichkeit des Testsystems gegenüber Zink sehr stark ab. Im Gegensatz dazu führt die Verwendung des L-ASW-Mediums beim Test mit Natriumpentachlorphenolat zu einer markanten Erhöhung der Testempfindlichkeit. Aufgrund dieser gegensätzlichen Ergebnisse und des allgemeinen Wissens über mikrobielle Toxizitätsteste kann keine gezielte Aussage über eine optimale Betriebsweise des Auto-Microtox-Gerätes gemacht werden. Der erste notwendige Optimierungsschritt muß in der Kompensation der auf die Lichtemission positiv wirkenden Matrixeffekte bestehen. Die Ergebnisse mit dem L-ASW-Medium weisen in diese Richtung. Der Mittelwert des Nulleffektes konnte bei der Rheinwasserüberwachung von einer 12%igen Förderung auf eine 3,8%ige Hemmung mit Hilfe der Alkali- und Erdalkaliionen-Zugabe verschoben werden.

Mit dem Auto-Microtox-Gerät wurde unter Verwendung der NaCl-Lösung als Rekonstitutions- und Verdünnungsmedium für Natriumpentachlorphenolat ein LOEC-Wert von 1,5 mg/l bestimmt (Tab. 3). Bei dieser Konzentration betrug die Leuchttintensitätshemmung 24,4 %. Die Signifikanzschwelle für den LOEC-Wert lag aufgrund der Schwankungsbreite des Nulleffektes sehr hoch (Abb. 7). In der Literatur werden für Natriumpentachlorphenolat unter Verwendung der NaCl-Lösung ein 30 min EC10-Wert von 83 µg/l [21] und ein 15 min EC10-Wert von 150 µg/l [36] angegeben. Die Literaturdaten sind mit den hier dargestellten Ergebnissen nur schwer zu vergleichen, da der vom Forschungsprojekt definierte LOEC-Wert nicht mit den EC-Werten einer Substanz gleichzusetzen ist.

Es fehlen die parallelen Untersuchungen mit dem L-ASW-Medium. Aufgrund der in Tab. 2 aufgezeigten Effekte müßte der LOEC-Wert bei Verwendung des L-ASW-Mediums bedeutend niedriger liegen. Darüber hinaus ist die Schwankungsbreite des Testsystems bei Betrieb mit L-ASW-Medium geringer als mit NaCl-Medium (s. o.), was wiederum die Signifikanzschwelle für den LOEC-Wert erniedrigen würde.

Mögliche durch Alkali- und Erdalkaliionen-Zugabe ausgelöste konträre Effekte, wie die Aufhebung der fördernden Wirkung von Matrixbestandteilen des Gewässers und die gleichzeitige Senkung der Testempfindlichkeit gegenüber einer bestimmten Substanz (z.B. Zink), müssen eingehend untersucht werden. Es gilt Chemikalienversuche - sowohl mit Oberflächenwasser als auch mit deionisiertem Wasser - jeweils parallel mit NaCl- und mit L-ASW-Medium durchzuführen.

Durch die semikontinuierliche Betriebsweise - eine 15minütige Anpassungszeit und eine 30minütige Kontaktzeit - ist es innerhalb von 50 Minuten nur möglich, einen einzigen Probensatz auszumessen. Ob dieser Zeitraum für die Überwachung von

Oberflächengewässern ausreicht, ist fraglich. Andere semikontinuierlich arbeitende Leuchtbakterientestgeräte liefern bereits nach 10 Minuten einen Meßwert ([37] und Firma Kolibri, pers. Mitteilung). Der Hersteller des Auto-Microtox könnte dieses Problem bei Beibehaltung der 30 minütigen Kontaktzeit dadurch lösen, daß zwei parallele, zeitversetzt arbeitende Meßeinheiten im Gerät integriert werden. Eine einfachere Lösung wäre die Erhöhung der Inkubationsstellen im Küvettenrevolver. Der große Vorteil der semikontinuierlichen Messung besteht in der im Vergleich zu kontinuierlich arbeitenden Geräten langen Verweilzeit. Eine Kontaktzeit von 30 min bewirkt bei langsam wirkenden Schadstoffen eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung [38]. Eine 30minütige Kontaktzeit ist deshalb die ideale Testweise für einen Leuchtbakterientestautomaten.

### Vergleich der Sensitivität der Bakterientoximeter

Die drei Geräte Auto-Microtox, Toxalarm und Stiptox-norm zeigten in vergleichenden Aufstockungsexperimenten nahezu gleiche LOEC-Werte für Natriumpentachlorphenolat. Im Rahmen des Forschungsprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins" wurden unter den gleichen Testbedingungen fünf weitere Bakterientoximeter in der Bundesanstalt für Gewässerkunde getestet. Darunter befanden sich drei Biertestgeräte, die gleichfalls mit Reinkulturen betrieben werden (EuCyano-Bakterienelektrode: *Escherichia coli*; Biotoximeter: *Photobacterium phosphoreum* und der Regensburger Leuchtbakterientest: *Photobacterium phosphoreum*, hier mit Microtox-Bakterien der Firma Microbics Corporation betrieben) und zwei Aufwuchstoximeter (Biofilmgeräte), die mit bakteriellen Mischkulturen arbeiten (Toxiguard und Biox 1000T). Folgende LOEC-Werte wurden für Natriumpentachlorphenolat bestimmt: EuCyano-Bakterienelektrode 1 mg/l, Biotoximeter 1,5 mg/l, Regensburger Leuchtbakterientest 0,05 mg/l, Toxiguard 0,05 mg/l und Biox 1000T >1 mg/l [39, Tab.3].

Die Geräte Toxiguard und Regensburger Leuchtbakterientest schnitten im Vergleichsexperiment gleich gut und verglichen mit allen anderen Geräten am besten ab. Sie waren um den Faktor 20-30 empfindlicher als alle anderen Geräte. Die beiden vom Testprinzip vergleichbaren Geräte mit separater Anzucht (Toxalarm und Stiptox-norm) zeigten erwartungsgemäß ähnliche Ergebnisse. Überraschend waren die voneinander abweichenden Ergebnisse der beteiligten Aufwuchstoximeter (Toxiguard und Biox 1000T) sowie die der drei Leuchtbakterientestautomaten (Regensburger Leuchtbakterientest, Biotoximeter und Auto-Microtox). Der Vergleich zeigt, daß nicht nur die biologischen Komponenten (Wahl des Testorganismus und Testparameters, Verwendung einer Rein- oder Mischkultur), sondern vor allem auch die technische Versuchsdurchführung entscheidenden Einfluß auf die Sensitivität eines Biomonitor auszuüben vermögen.

## Vergleich der Bakterientoximeter anhand von praxisorientierten Kriterien

Alle drei beschriebenen Biomonitor erfüllen die Forderung nach einer vollständigen Automatisierung. Auch die kontinuierliche Probenahme ist bei allen Geräten, wenn auch in unterschiedlicher Weise, gewährleistet. Die beiden Geräte Stiptox-norm und Toxalarm (nicht so das Nachfolgemodell Toxalarm "pro" [40]) arbeiten mit einem Probendurchflußsystem. Dies bedeutet, daß das Testwasser ständig durch die Meßzelle fließt. Diese Art der kontinuierlichen Messung ist bezogen auf weitere im Projekt getestete mikrobiologische Biotests einzigartig [32, 39]. Das Biotoximeter arbeitet mit 15-Minuten-Mischproben. Der Regensburger Leuchtbakterientest nimmt im Abstand von 15 min Gewässerproben. Zwar arbeitet die EuCyano-Bakterienelektrode auch im kontinuierlichen Durchfluß, sie kann aber bedingt durch die Art der Auswertung (Peakintervalle) nur diskontinuierliche Werte (Peakamplituden) liefern [41]. Auto-Microtox arbeitet diskontinuierlich, das Gerät nimmt nur alle 50 min eine Probe. Weitere wichtige Parameter, die in die Beurteilung der drei getesteten Geräte mit eingehen, sind in Tab. 4 dargestellt.

Die Entscheidung für den Einsatz eines der beschriebenen Geräte in der Gewässerüberwachung ist abhängig von der Art der Betreuung in der jeweiligen Meßstation. So sind in einer unbemannten Station eine Standzeit von 7 Tagen sowie die Möglichkeit zur Datenfernübertragung und Fernsteuerung von Vorteil.

Die Frage nach der erforderlichen Empfindlichkeit eines Gerätes muß differenziert betrachtet werden. Wichtige Aspekte sind hier der zu erwartende Verschmutzungsgrad des Gewässers und die Verdünnung des Testwassers in der Meßzelle. Nicht minder nehmen Anschaffungs- und Betriebskosten Einfluß auf eine Kaufentscheidung. Eine generelle Empfehlung für ein bestimmtes Gerät kann nicht ausgesprochen werden, da jeder Anwender die verschiedenen Beurteilungskriterien auf seine Überwachungsbedingungen beziehen und damit anders werten muß.

Tab. 4: Vergleich der getesteten Bakterientoximeter mit Reinkulturen

	Stiptox-norm	Toxalarm	Auto-Microtox
Organismus	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>
Meßparameter	Atmungshemmung	Atmungshemmung	Leuchthemmung
Anzucht	Chemostat	Turbidostat	keine (gefriergetrocknete Bakterien)
Testwasserverbrauch	300 ml/min	5 ml/min	350 ml/min, frei regulierbar
Verdünnung des Testwassers	1:1,6	1:1,4	1:1,1
Probenahme	kontinuierlich	kontinuierlich	diskontinuierlich
Kontaktzeit	ca. 4,6 min	ca. 6 min	30 min
Alarmwerterkennung	statisch	statisch	statisch
Datenfernübertragung/Fernsteuerung	-/-	+/+	+/+
Standzeit	3-4 Tage	3-4 Tage	7 Tage
Wartungsbedarf	2 h/Woche	1-2 h/Woche	0,5-1 h/Woche
Platzbedarf (HxBxT)	180x105x50 cm	147x76x72 cm	120x75x140 cm

## Danksagung

Die Arbeiten wurden im Rahmen des vom Bundesministerium für Forschung und Technologie geförderten Forschungsvorhabens 0339299D "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins - Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination/Zentrale Auswertung" durchgeführt.

Wir danken der Firma Siepmann und Teutscher GmbH (Groß-Umstadt) für die Zurverfügungstellung des Stiptox-norm, der Firma Hydro-Environnement S.A. (Poissy, Frankreich) für die Bereitstellung des Auto-Microtox und der Firma Microbics Corporation (Carlsbad, California, USA) für die zur Verfügung gestellten gefriergetrockneten Bakterienpräparate.

## Literaturverzeichnis

1. IRMER, U.: Biologische Warnsysteme zur Erfassung von Störfällen am Rhein. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 203-210
2. SCHMITZ, P.; IRMER, U. und KREBS, F.: Einsatz kontinuierlicher Biotestsysteme zur Überwachung des Rheins. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 233-246
3. KREBS, F.; BLESSING, B.; FRITZ-LANGEN, H.; BLÜBAUM-GRONAU, E.; HOFFMANN, M. und SCHMITZ, P.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins, Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination / Zentrale Auswertung. Forschungsbericht. Forschungsmaßnahme des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (0339299D). Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, 1994 (in Vorbereitung)
4. LAWS, E.A.: Food Chain Theorie. In: E.A. Laws (ed.): Aquatic Pollution. John Wiley & Sons, New York, 1981, 1-12
5. LAMPERT, W. und SOMMER, U.: Limnoökologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 1993
6. AXT, G.: Ergebnisse kontinuierlicher Toxizitätstests mit Bakterien. Vom Wasser 41, 1973, 409-414
7. PILZ, U. und AXT, G.: Entwicklung eines kontinuierlich arbeitenden Bakterientoximeters. Vom Wasser 62, 1984, 91-100
8. MÜLLER, D. und WELLNER, B.: Zur kontinuierlichen Messung der Schädigung von Mikroorganismen. Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen 19 Sonderheft, 1975, 120-123

9. SOLYOM, P.: Industrial experiences with Toxiguard, a toxicity monitoring system. *Prog. Wat. Tech.* 9, 1977, 193-198
10. BLESSING, B.; FRITZ-LANGEN, H. und KREBS, F.: Einsatz von Bioreaktoren zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene* 89, 1992, 247-254
11. SIEPMANN, F.W.: Methoden und Instrumente zur Messung der Intoxikation von biologischen Systemen der Abwasserreinigung. *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser* 134, 1992, 191-204
12. PILZ, U.: Meßprinzip und Anwendungsmöglichkeiten des Bakterientoximeters. *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser* 111, 1989a, 440-458
13. DIN 38412 Teil 27: Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf den Sauerstoffverbrauch von *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas*-Sauerstoffverbrauchs-Hemmtest) (L 27). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Beuth Verlag, Berlin, und VCH-Verlag, Weinheim, 1992
14. DIN 38412 Teil 8: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltstoffen auf Bakterien. (*Pseudomonas*-Zellvermehrungs-Hemmtest) (L 8). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Beuth Verlag, Berlin, und VCH-Verlag, Weinheim, 1991
15. BRINGMANN, G. and KÜHN, R.: Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae and protozoa in the cell multiplication inhibition test. *Water Res.* 14, 1980, 231-241
16. DIN 38412 Teil 34: Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum* (Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien) (L 34). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Beuth Verlag, Berlin, und VCH-Verlag, Weinheim, 1991
17. DIN 38412 Teil 341: Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum* (Leuchtbakterien-Abwassertest, Erweiterung des Verfahrens DIN 38412 Teil 34) (L 341). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Beuth Verlag, Berlin, und VCH-Verlag, Weinheim, 1993
18. BULICH, A.A.: Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In: L.L. Marking and R.A. Kimerle (eds.): *Aquatic toxicology: second conference*. American Society of Testing and Materials, Philadelphia, ASTM STP 667, 1979, 98-106

19. BULICH, A.A. and GREENE, M.W.: The use of luminescent bacteria for biological monitoring of water quality. Int. Symp. Analyt. Appl. Bioluminescence Chemiluminescence (Brüssel), 1978, 193-211
20. BULICH, A.A.; GREENE, M.W. and ISENBERG, D.L.: Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents. In: D.R. Branson and K.L. Dickson (eds.): Aquatic toxicology and hazard assessment. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, ASTM STP 737, 1981, 338-347
21. KREBS, F.: Toxizitätstest mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien. Gewässerschutz, Wasser, Abwasser 63, 1983, 173-230
22. KAISER, K.L.E. and PALABRICA, V.S.: *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. Water Poll. Res. J. Canada 26, 1991, 361-431
23. FARMER, J.J. III and HICKMAN-BRENNER, F.W.: The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: A. Balows et al. (eds.): The Prokaryotes. 2nd Edition. Springer-Verlag, New-York, Berlin, 1991, 2953-3011
24. KLEIN, B.: Die Rolle des Kaliums bei Toxizitätstests mit Leuchtbakterien. Zeitschrift für Angewandte Zoologie 79, 1992/1993, 199-220
25. LEVI, Y.; HENRIET, C.; COUTANT, J.P.; LUCAS, M. and LEGER, G.: Monitoring acute toxicity in rivers with the help of the Microtox Test. Water Supply 7, 1989, 25-31
26. PILZ, U.: Entwicklung eines Meßgerätes zur kontinuierlichen Erfassung giftiger Wasserinhaltsstoffe mit Hilfe gewässertypischer Bakterien. Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 15, Nr. 41, VDI-Verlag, Düsseldorf, 1986a
27. PILZ, U.: Erfahrungen mit dem Bakterientoximeter bei der Untersuchung giftstoffhaltiger Lösungen und schadstoffbelasteter Wasserproben. Vom Wasser 66, 1986b, 85-96
28. PILZ, U.: Verbesserung der Betriebssicherheit und Meßempfindlichkeit des Bakterientoximeters. Vom Wasser 74, 1990, 351-359
29. KLEESIEK, W.: Optimierung eines kontinuierlich arbeitenden Bakterientoximeters. Diplomarbeit. Fachhochschule Braunschweig-Wolfsbüttel. Fachbereich Versorgungstechnik, Umwelt und Hygienetechnik, 1988
30. KRAUSE, R.: Störfallsimulation und Auswertungsmöglichkeiten am dynamischen Daphnien- und Fischttest und Toxalarm. Diplomarbeit. Fachhochschule Lübeck. Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften, 1991

31. FRITZ-LANGEN, H.; BLESSING, B. und KREBS, F.: Einsatz von Bakterien-toximetern mit separater Zellanzucht zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 255-268
32. Bund/Länder-Projektgruppe "Wirkungstests Rhein (WIR)": Kontinuierliche Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins. Abschlußbericht des BMFT/UBA-Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins". Umweltbundesamt, Berlin. UBA-Berichte, 1994 (in Vorbereitung)
33. SCHMITZ, P.; KREBS, F. und IRMER, U.: Development, testing, and implementation of automated biotests for the monitoring of the River Rhine, demonstrated by bacteria and algae tests. Water Science and Technology, 1993 (im Druck)
34. KREBS, F.: Gewässeruntersuchung mit dem durch Alkali- und Erdalkalitionen-Zugabe optimierten DIN-Leuchtbakterientest, dargestellt am Beispiel der Saar. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 657-674
35. KLEIN, B.: Umweltmonitoring mit dem Leuchtbakterientest: das Problem falsch negativer Befunde - Kurzmitteilung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 653-655
36. De ZWART, D. and SLOOFF, W.: The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. Aquatic Toxicology 4, 1983, 129-138
37. PETROMATION: Monitox dual biomonitor: new tool for automatic wastewater control. Firmenprospekt. Petromation Analytical, Petromation bv, Rijswijk, Niederlande, 1993
38. KREBS, F.: Der Leuchtbakterientest für die Wassergesetzgebung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 591-624
39. SCHMITZ, P.; IRMER, U. und KREBS, F.: Vergleichende Erprobung und Beurteilung von automatischen Biotestverfahren für den Einsatz in Meßstationen. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 93, 1993
40. PILZ, U.: ToxAlarm "pro", die LAR-Toximeter der 2. Generation für Abwasser-kontrolle und Gewässerschutz. Firmenprospekt. LAR Analytik & Umweltmeßtechnik GmbH, Berlin, 1993

41. STEIN, P.: Bakterienelektroden mit *Synechococcus* und *Escherichia coli*: Ein kontinuierliches Testsystem zur Online-Überwachung von Oberflächengewässern. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 269-275



# Bakterientoximeter mit Aufwuchsorganismen in der Gewässerüberwachung

B. Blessing, H. Fritz-Langen und F. Krebs

## Zusammenfassung

Bakterientoximeter mit natürlichem Aufwuchs (Biofilm) werden zur Abwasserüberwachung eingesetzt. Über die Möglichkeit, derartige Testautomaten bei der Gewässerüberwachung zu verwenden, wird berichtet. Am Beispiel der Toximeter Toxiguard (BTG Anlagentechnik, Bochum) und Biox 1000T (Siepmann & Teutscher, Groß-Umstadt) werden zwei Konstruktionsmöglichkeiten zum Aufbau eines stabilen Biofilms vorgestellt.

Bedingt durch die niedrigeren BSB-Gehalte in Oberflächengewässern müssen zum Aufbau der erforderlichen Biomasse Nährstoffe zudosiert werden. Der durch die Nährstoffe entstehende Selektionsdruck übt einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Mischpopulation und somit auf die Empfindlichkeit des Biofilms gegenüber Schadstoffen aus. So konnte bei dem Bakterientoximeter Toxiguard bei Verwendung von Citronensäure als Kohlenstoffquelle in Aufstockungsexperimenten mit Natriumpentachlorphenolat ein im Gerätevergleich besonders niedriger LOEC-Wert von 50 µg/l ermittelt werden.

Modifikationen, die die Einsatzmöglichkeiten in Meßstationen verbessern, werden diskutiert.

## Summary

Bacterial toxicity tests using biofilms are employed in the monitoring of waste waters. The possibility of using such automated test systems for monitoring surface water quality is discussed. For illustration, two possible designs for forming a stable biofilm are introduced: the automatic toxicity tests Toxiguard (BTG Anlagentechnik, Bochum) and Biox 1000T (Siepmann & Teutscher, Groß-Umstadt).

Because of the relatively low BOD load in surface waters, it is necessary to add nutrients to the samples to allow the formation of sufficient biomass. The selective pressure caused by these nutrients influences the composition of the bacterial population and thus influences the sensitivity of the biofilm with regard to contaminants. For instance, with the Toxiguard system a very low LOEC value, compared to other bacterial test systems, of 50 µg/l was determined when citric acid was used as a carbon source in spiking experiments with sodium-pentachlorophenolate.

Modifications that improve the application of these systems for use in monitoring surface waters are discussed.

---

Diese Arbeit widmen wir Herrn Dr. P. Kothé zum 65. Geburtstag.

## Einleitung

Während Biomonitoring kontinuierlich die integrale Schadstoffwirkung von Wasser und Abwasserproben erfassen, mißt die chemische Analytik Einzelstoffe und Stoffgruppen. Wegen der nahezu unbegrenzten Vielfalt chemischer Wasserinhaltsstoffe vermag selbst das umfangreichste Meßprogramm stets nur einen kleinen Teil der potentiell vorkommenden Schadstoffe zu erkennen. Besteht eine Schadstoffwelle aus nicht zum Meßprogramm gehörenden Stoffen, so bleibt sie unentdeckt. Der Vorteil der biologischen Überwachung liegt somit im integralen Erfassen der akuten Gesamttoxizität eines Gewässers.

Beim Biomonitoring wird die von einem Schadstoff ausgehende Toxizität organismenspezifisch detektiert. Um die unterschiedlichsten Wirkungsspezifitäten von möglichst vielen Schadstoffen erfassen zu können, ist der Einsatz einer breiten, aus den verschiedensten Monitoringorganismen zusammengesetzten Testpalette erforderlich [1, 2, 3].

Im Rahmen des Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" werden kontinuierliche Biomonitoring mit Testorganismen aus verschiedenen Trophieebenen (Bakterien, Algen, Daphnien, Muscheln und Fische) entwickelt und erprobt [4]. In dem von der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, durchgeführten Teilvorhaben [5] werden Bakterientoximeter zur Rheinüberwachung eingesetzt, die einerseits mit separater Zellanzucht [6,7], andererseits mit Biofilmen [8] arbeiten. In der Bundesanstalt besitzen Bakterien wegen der zentralen Rolle, die sie im Stoffhaushalt der Gewässer einnehmen, und wegen ihrer leichten Handhabbarkeit eine bevorzugte Stellung bei der Gewässerüberwachung [9,10,11].

Die hier vorgestellten kommerziellen Geräte Toxiguard und Biox 1000T sind zwei Beispiele von Bakterientoximetern, die die Sauerstoffzehrung eines Biofilms [12,13] in einem kontinuierlich durchflossenen Bioreaktor messen. Werden dem Bioreaktor schädigende Substanzen zugeführt, wird die mikrobielle Atmung gehemmt. Dies wiederum lässt den gelösten Sauerstoffgehalt im Ablauf des Bioreaktors ansteigen. Eine verminderte Sauerstoffzehrung weist somit auf toxische Wasserinhaltsstoffe hin [14,15].

Beide Testgeräte wurden für die Überwachung von Abwasser entwickelt. Die Möglichkeit, sie auch bei der Oberflächengewässerüberwachung einzusetzen, wurde untersucht.

## **Material und Methoden**

### **Testgeräte**

#### **Funktionsweise der Bakterientoximeter**

Bakterientoximeter mit Aufwuchsorganismen arbeiten mit Testorganismen aus dem zu untersuchenden Medium (Oberflächenwasser, Klärschlamm etc.). Ein Bioreaktor mit Aufwuchskörpern wird kontinuierlich vom Testwasser durchflossen. Die natürlichen Organismen aus dem Testwasser siedeln sich dabei auf den Aufwuchskörpern an und bilden einen aus einer bakteriellen Mischkultur bestehenden Biofilm [16-19]. Der Vorteil dieses Testsystems besteht darin, daß die Testorganismen identisch sind mit den zu schützenden Organismen [20].

Da die Aufwuchskörper im Bioreaktor des Biox 1000T ständig durchmischt werden, wird auf allen Aufwuchskörpern eine gute Homogenität der Mischkultur erreicht. Anders verhält es sich beim Toxiguard. Bei diesem Bakterientoximeter fließt das Testwasser durch einen oder mehrere Scheibenreaktoren (Reihenschaltung), wobei sich die Testwasserzusammensetzung im Verlauf des Durchflusses durch die Zehrungsaktivität der Bakterien ändert, was wiederum Einfluß auf die Zusammensetzung der Mischkultur hat.

#### **Das Bakterientoximeter TOXIGUARD**

Das Bakterientoximeter wurde vom schwedischen Wasser- und Luftverschmutzungs-Forschungslaboratorium (IVL) entwickelt [21] und wird unter dem Namen TOXIGUARD von der Firma BTG Anlagentechnik GmbH, Bochum, vertrieben. Sauerstoffreiches Flusswasser wird durch einen Bioreaktor geleitet, in dem sich innerhalb von ca. zwei Wochen ein stabiler Aufwuchs (Biofilm) bildet. Der 220 ml fassende Bioreaktor besteht aus 11 festen (incl. den beiden Grundplatten) und 10 dazwischen rotierenden PVC-Platten (Abb. 1-4). Durch diese Konstruktion ergibt sich ein Verhältnis von Zylinderoberfläche zu aktiver Oberfläche von 1:8. Bedingt durch die Strömung (40 ml/min) und die Schwingung der Bioreaktorwelle wird nach der Anlaufphase die Schichtdicke des Aufwuchses konstant gehalten. Das Toxiguard ermittelt die Sauerstoffzehrungsaktivität des Biofilms durch kontinuierliche Messung des Restsauerstoffgehaltes im Testwasser nach Durchströmung des Bioreaktors. In frei wählbaren Zeitabständen wird durch eine Bypass-Schaltung der Sauerstoffgehalt im Testwasser vor dem Durchströmen des Bioreaktors gemessen (direkte Bezugsgröße). Bei giftigen Wasserinhaltsstoffen steigt der Sauerstoffgehalt im Bioreaktor an, da entsprechend zum Vergiftungsgrad eine reduzierte Zehrung stattfindet. Die mittlere Verweilzeit beträgt ca. 6 Minuten pro Bioreaktor. Das Gerät wird nicht temperiert.

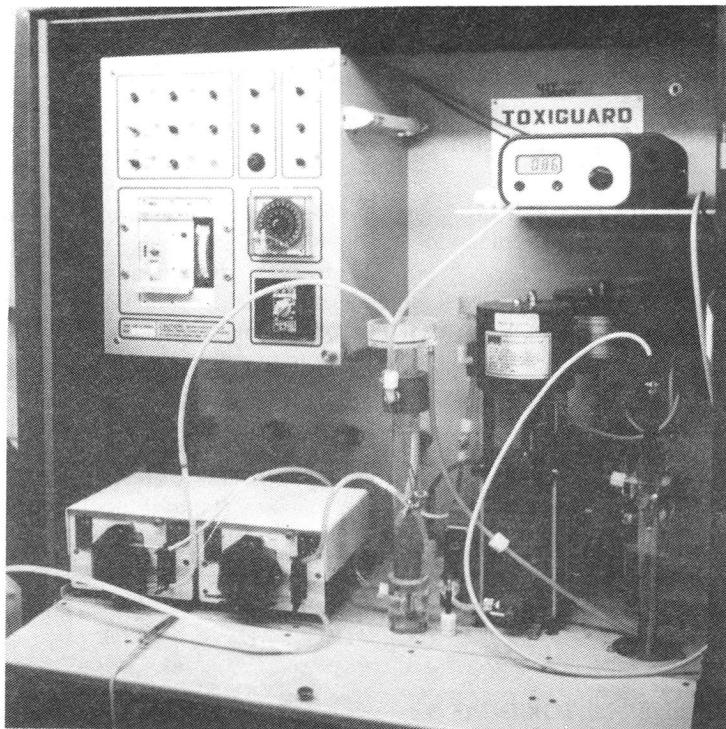


Abb. 1: Bakterientoximeter Toxiguard

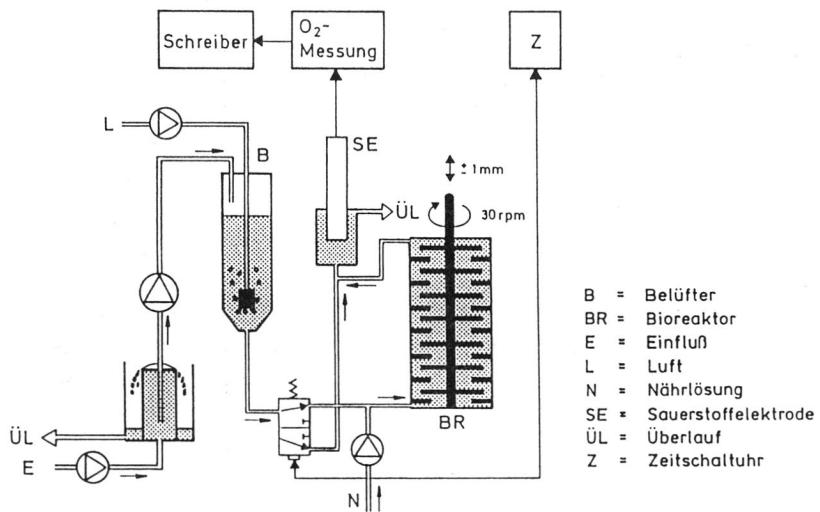


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Bakterientoximeters Toxiguard  
(in Anlehnung an Firmenzeichnung)

Abb. 3: Bakterientoximeter Toxiguard:  
Scheibenkörper des Bioreaktors ohne Aufwuchs

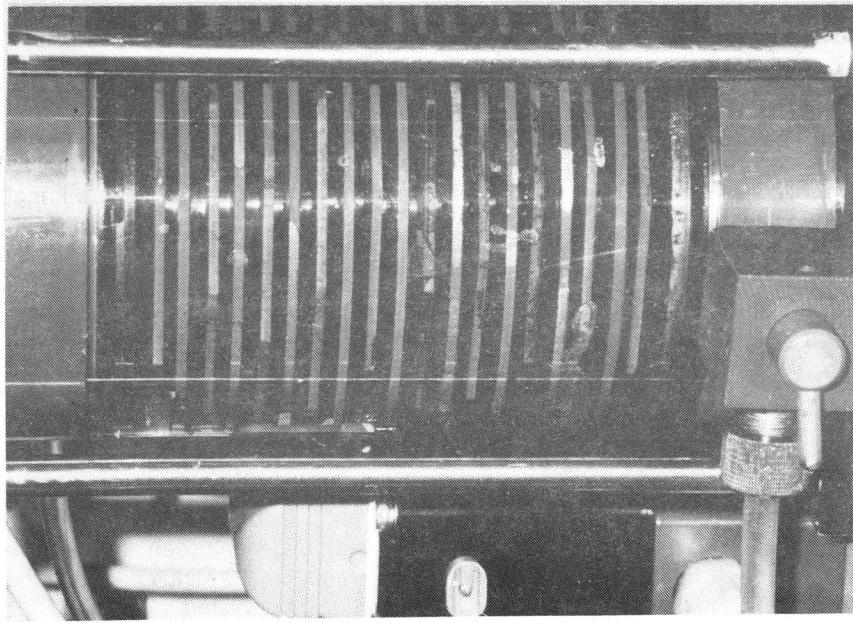
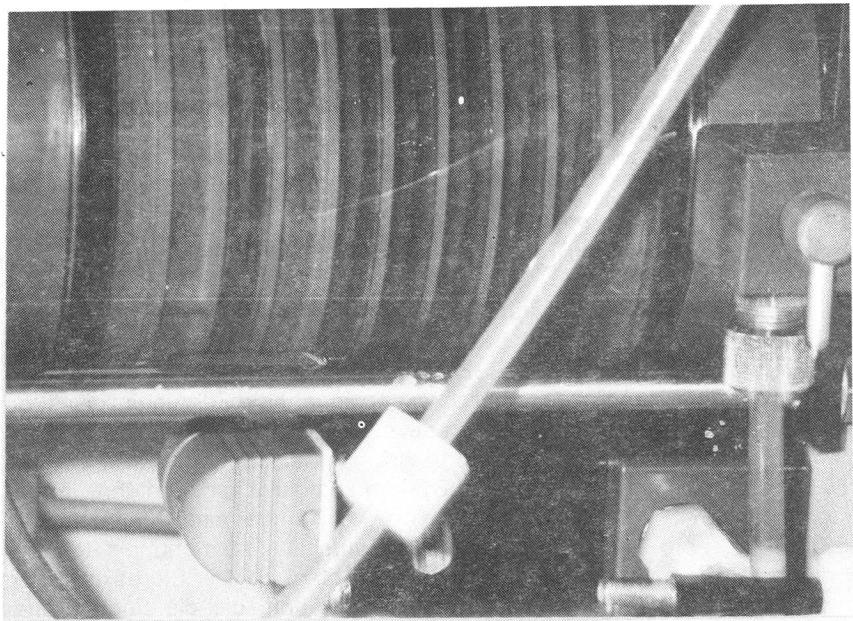


Abb. 4: Bakterientoximeter Toxiguard: Bioreaktor mit Aufwuchs



Modifikationen zum käuflichen Modell: Da das natürliche Rheinwasser schon einen Sauerstoffgehalt von ca. 8 mg/l besitzt, wird auf eine zusätzliche Belüftung verzichtet. In die Meßzelle wurde ein Sauerstoffmeßsystem mit integriertem Nullabgleich eingebaut. Ein zweiter Bioreaktor wurde in Reihe geschaltet, um die Zehrungsaktivität des Gesamtsystems zu erhöhen. Zur Lärmdämmung wurden die Membranpumpen gegen Schlauchpumpen ausgetauscht. Die Datenerfassung (Uhrzeit und Sauerstoffgehalt des Testwassers vor und nach Durchfluß durch die Bioreaktoren) erfolgt mit Hilfe eines Personalcomputers oder Schreibers.

## **Das Bakterientoximeter Biox 1000T**

Das Bakterientoximeter Biox 1000T wurde von der Firma Siepmann & Teutscher GmbH, Groß-Umstadt, entwickelt [22] und wird auch von ihr vertrieben. Biox 1000T ist die Toximeter-Version des Biox 1000/(BSB-M3)-Meßverfahrens zur Kurzzeit-BSB-Messung [23,24]. Das Biox 1000T zeigt ähnlich wie Toxiguard die Zehrungsaktivität eines Biofilms an. Zur Toxizitätsmessung werden beim Biox 1000T Flußwasser und sauerstoffgesättigtes Verdünnungswasser (Leitungswasser) in einem konstanten Verhältnis (hier: 450 ml + 50 ml) gemischt und dem System kontinuierlich zugeführt. Im gesamten System befinden sich ca. 5 Liter Testwasser, welche über eine Pumpe ständig umgewälzt werden (30 l pro Minute). Das Testwasser durchläuft so mehrmals den Bioreaktor, ehe es das System über die Meßzelle verläßt (Abb. 5, 6). Der Bioreaktor ist zu 2/3 gefüllt mit Aufwuchskörpern aus abriebfestem Kunststoff, die die Form kleiner Hohlzylinder haben. Innerhalb von ca. drei Wochen sind die Aufwuchskörper mit einem Biofilm von konstanter Biomasse ausgekleidet. Durch die Bewegung der Teilchen im Bioreaktor (Wirbelbettreaktor) wird eine Biofilmbildung am Außenmantel der Aufwuchskörper und der Bioreaktorwand verhindert. Citronensäure wird als zusätzliche Kohlenstoffquelle zudosiert.

Beim Biox 1000T wird die Atmungsaktivität als Differenz vom Sauerstoffmaximalwert (theoretischer Sauerstoffgehalt im Kreislaufsystem ohne bakterielle Zehrung) zum gemessenen Sauerstoffgehalt in der Meßzelle (Testwasserablauf) berechnet und auf einer Schreiberrolle ausgedruckt. Der Sauerstoffgehalt im Ablauf des Bioreaktors hängt von der Atmungsaktivität der Biofilmorganismen ab. Bei einem schadstofffreien Testwasser wird eine nahezu gleichmäßige Zehrungsaktivität erreicht und damit eine relativ konstante Zehrungsbasislinie. Die Höhe der Basislinie hängt vom Nährstoffgehalt des Testwassers ab. Bei bakterientoxischen Wasserinhaltsstoffen steigt der Sauerstoffgehalt in der Meßzelle an, da entsprechend zum Vergiftungsgrad der Bakterien eine reduzierte Zehrung stattfindet; der Differenzbetrag zum Sauerstoffmaximalwert wird kleiner. Ist die Differenz kleiner als ein eingestellter Schwellenwert (hier: 2 mg/l), wird Alarm gegeben. Werden die Bakterien des Biofilms so stark geschädigt, daß ein vorgewählter Schwellenwert (hier: 1 mg/l) nicht mehr erreicht wird, ändert das Gerät stufenlos das Mischungsverhältnis von Testwasser zu Verdünnungswasser zu Gunsten des Verdünnungswassers. Hierdurch wird die Kultur vor Giftstößen etwas geschützt. Eine Adaptation an Schadstoffe kann dadurch aber nicht ausgeschlossen werden. Die mittlere Verweilzeit beträgt bei einem Zulauf von 500 ml/min ca. 10 Minuten. Über eine Heizung wird eine konstante Temperatur von 30°C im System gehalten.

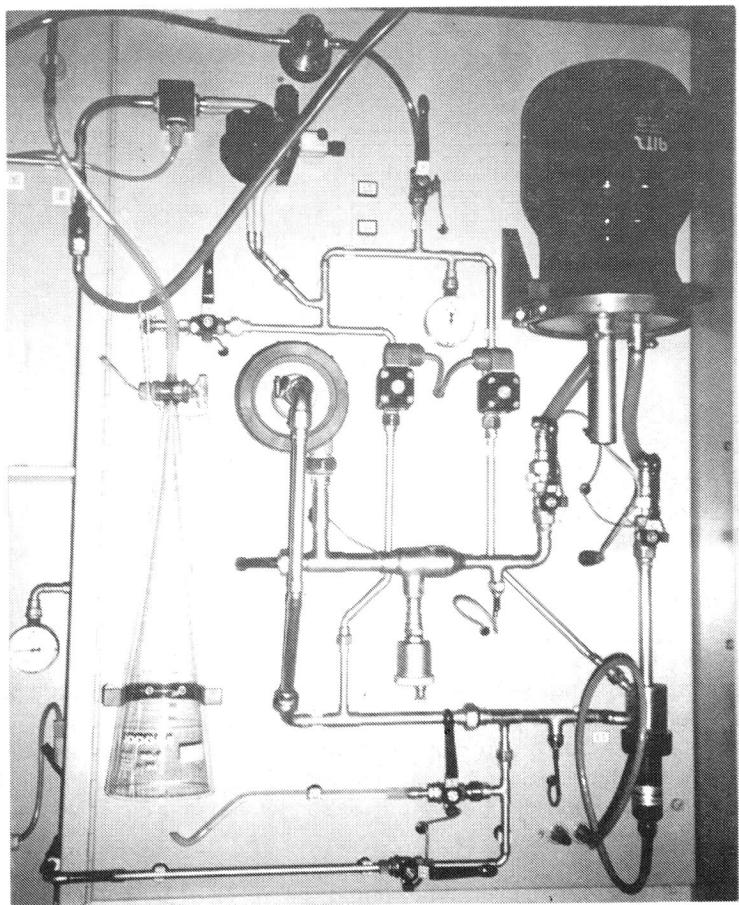


Abb. 5: Bakterientoximeter Biox 1000T

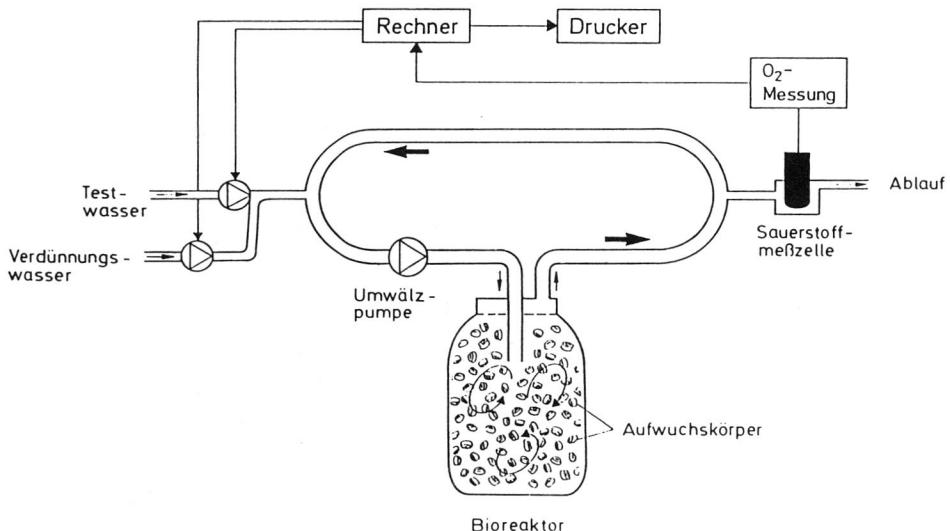


Abb. 6: Schematischer Aufbau des Bakterientoximeters Biox 1000T  
(in Anlehnung an Firmenzeichnung)

### Testdurchführung

Bei beiden kontinuierlich arbeitenden Bakterientoximetern Toxiguard und Biox 1000T dient das Sauerstoffzehrungsverhalten als Alarmindikator. Beim Toxiguard werden in der kommerziellen Geräteausführung die Meßwerte (Restsauerstoffgehalt des Testwassers nach Durchlauf durch den Bioreaktor) aus der Schreiberkurve abgelesen und auf die während der Bypass-Schaltung gemessene Sauerstoffkonzentration bezogen [4,5]. Beim Biox 1000T kann der Betrag der Sauerstoffzehrung direkt von der Schreibrolle abgelesen werden.

Zur Steigerung der Zehrungsaktivität wurden beim Toxiguard Succinat, Acetat, Citronensäure und Ammonium - jeweils einzeln in verschiedenen Konzentrationen - dem Rheinwasser kontinuierlich zugegeben. Die Nähr- und Testchemikalien wurden im Testwasser gelöst, der pH-Wert wurde nicht eingestellt.

Zur Hemmung der nitrifizierenden Bakterien wurden beim Toxiguard 0,5 mg/l N-Allylthioharnstoff als Testchemikalie zugegeben.

Die Aufstockungsexperimente wurden mit Natriumpentachlorphenolat (Merck-Schuchardt 820952) durchgeführt. Als niedrigste Konzentration der aufsteigenden Reihe wurde 100 µg/l eingesetzt. Die bereits bei dieser Konzentration ansprechenden Testgeräte wurden anschließend mit 50 µg/l ausgetestet. Als weitere Konzentrationsstufen wurden 500 µg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l und 2 mg/l Natriumpentachlorphenolat eingesetzt. Geräte, welche auf zwei hintereinanderfolgende Konzentrationsstufen ansprachen, wurden nicht mehr getestet [5].

## Ergebnisse

Für die Gewässerüberwachung mußte wegen der niedrigeren Nährstoff- und Schadstoffkonzentrationen im Testwasser bei beiden Geräten die Betriebsweise angepaßt werden. Bei einem niedrigen Nährstoffgehalt wird zwar ein Biofilm aufgebaut, die Sauerstoffzehrung der Bakterien im Biofilm ist aber sehr schwach. Das wirkt sich negativ auf die Auswertung aus, da bei einer geringen Sauerstoffzehrung eine schwache Hemmung nicht mehr vom Grundrauschen zu unterscheiden ist. Um beim Einsatz der Geräte eine bessere Sauerstoffzehrung und somit eine bessere Auswertbarkeit zu erreichen, war eine Zudosierung von Nährstoffen notwendig. Zur Auswahl eines geeigneten zehrungssteigernden Nährstoffes wurden mit dem Bakterientoximeter Toxiguard verschiedene Nährlösungen ausgetestet [8].

Durch die Zudosierung von Nährstoffen wird ein Selektionsdruck auf die Mischkultur in Richtung derjenigen Bakterienstämme ausgeübt, die diesen Nährstoff besonders gut verwerten können [25]. Die Zusammensetzung einer Mischkultur wird von dem dosierten Nährstoff bestimmt. Gezeigt werden konnte dies am Toxiguard bei einem Versuch mit N-Allylthioharnstoff. N-Allylthioharnstoff hemmt bei der eingesetzten Konzentration von 0,5 mg/l spezifisch nitrifizierende Bakterien. Je nach verwendetem Nährstoff bestand der Biofilm aus einem unterschiedlich starken Anteil an Nitrifizierern. Ein Biofilm, der mit einer Nährlösung von Ammoniumsulfat/Magnesiumsulfat aufgebaut und betrieben wurde, enthält einen weitaus höheren Anteil an Nitrifizierern als ein Biofilm, der mit Acetat aufgebaut wurde (Tab. 1).

Tab. 1: Effekt von N-Allylthioharnstoff auf die Sauerstoffzehrung der Biofilmorganismen im Toxiguard unter verschiedenen Nährstoffbedingungen

Nährstoff	Nährstoffkonz. [mg/l]	Hemmung der Sauerstoffzehrung unter Ein- fluß von N-Allylthioharnstoff (0,5 mg/l)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / Mg <sup>2+</sup>	5/0,5	100%
Succinat	5	5%
Acetat	6	3%
Citronensäure	5	15%

Wenn nun der Nährstoff das Artenspektrum bestimmt, so müßte sich dies auch auf die Empfindlichkeit des Biofilms gegenüber Schadstoffen auswirken. Um diese These zu belegen, wurde am Toxiguard mit Natriumpentachlorphenolat eine Versuchsreihe durchgeführt. Die höchste Empfindlichkeit konnte bei durch Citronensäure induzierte und ernährte Biofilme erreicht werden (Tab. 2). Für den Überwachungsbetrieb am Rhein wurde Citronensäure als zusätzliche Kohlenstoffquelle ausgewählt, da mit ihr einerseits eine gute Zehrungssteigerung, andererseits ein hoher Anteil an Nitrifizierern

erzielt werden konnte. Daß dieser spezielle Biofilmtyp über eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Natriumpentachlorphenolat verfügt, konnte eine vergleichende Untersuchung mit verschiedenen Bakterientoximetern zeigen.

Tab. 2: Effekt von Natriumpentachlorphenolat auf die Sauerstoffzehrung der Biofilmorganismen im Toxiguard unter verschiedenen Nährstoffbedingungen

Nährstoff	Nährstoffkonz. [mg/l]	Hemmung der Sauerstoffzehrung unter Einfluß von Natriumpentachlorphenolat (12,5 mg/l)		
		0,5h	3h	4-5h
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	5/0,5	4%	15%	44%
Succinat	5	11%	39%	43%
Acetat	6	19%	42%	44%
Citronensäure	5	-11%*	65%	69%

\* negativer Wert = Förderung

Im Rahmen des Forschungsprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins" wurden alle Bakterientoximeter des Verbundprojektes in der Biologischen Meßstation der Bundesanstalt für Gewässerkunde in Koblenz an Rheinwasser angeschlossen und einem vergleichenden Aufstockungsexperiment mit Natriumpentachlorphenolat unterzogen [4]. Die EuCyanobakterienelektrode, der Regensburger Leuchtbakterientest Photox, das Biotoximeter, Stiptox-norm, Toxalarm, Toxiguard und Biox 1000T wurden dabei mit einer aufsteigenden Natriumpentachlorphenolat-Reihe ausgetestet (s. o.). Toxiguard zeigte ebenso wie das Regensburger Leuchtbakterientestgerät Photox bei einer Konzentration von 50 µg/l eine deutliche Hemmreaktion (Abb. 7). Alle weiteren Testsysteme konnten erst ab einer Natriumpentachlorphenolat-Konzentrationen von 1,0 mg/l und höher signifikant gehemmt werden [26,27]. Aufgrund der Adaptation des Biox 1000T an die Testchemikalie konnte nur bis zu einer Konzentration von 1 mg/l Natriumpentachlorphenolat getestet werden. Bei dieser Konzentration war noch keine signifikante Hemmung sichtbar.

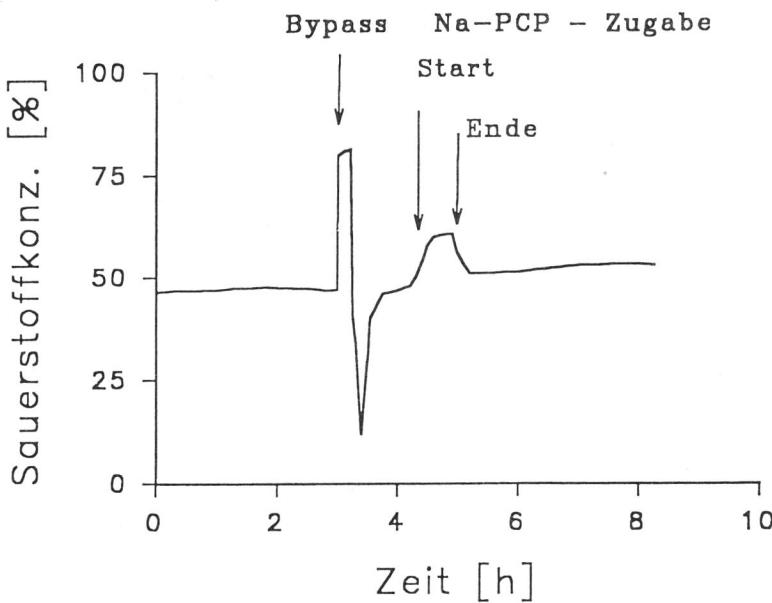


Abb. 7: Bakterientoximeter Toxigard:

Wirkung von 50 µg/l Natriumpentachlorphenolat (Na-PCP) auf die Sauerstoffzehrung im Toxigard bei ständiger Nährstoffzudosierung von 5 mg/l Citronensäure zum Rheinwasser. Während der Bypass-Schaltung wird die Sauerstoffkonzentration des Rheinwassers vor Eintritt in den Bioreaktor erfaßt.

## Diskussion

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß der Einsatzbereich der Aufwuchstoximeter prinzipiell auf die Oberflächengewässerüberwachung ausweitbar ist. Es ist jedoch erforderlich, die Geräte an den Standort anzupassen und standortsgemäß zu betreiben.

Die Betriebsweise muß entsprechend der Nährstoffsituation des Testwassers modifiziert werden. In der Regel müssen Nährstoffe zudosiert werden. Um eine Verschiebung der Empfindlichkeit durch den Einfluß der Nährstoffe zu erkennen, müssen zwingend Voruntersuchungen durchgeführt werden. Hierbei sollten die Hemmreaktionen von häufig auftretenden Schadstoffen bei Betrieb mit und ohne Nährstoffzugabe untersucht und verglichen werden.

Je nach Standort ist eine Modifikation der Geräte notwendig, um den Anforderungen besser entsprechen zu können: Die Testgeräte sollten dem heutigen technischen

Standard angepaßt werden (z.B. moderne Sauerstoffelektrode und Computeranschluß im Toxiguard). Da bei der Überwachung von Oberflächengewässern die Testgeräte häufig in unbemannten Kontrollstationen stehen, sollte eine Standzeit von mindestens einer Woche gewährleistet werden. Um als Warnsystem eine gute Empfindlichkeit zu erreichen, muß eine kurze Ansprechzeit (kurze Wege vom Oberflächengewässer zum Testgerät) mit einer relativ kurzen Verweilzeit im Testgerät gekoppelt werden. Die kurze Verweilzeit führt aber bei Testgeräten mit separater Bakterienanzucht, bei denen die Testorganismen ständig ausgetauscht werden (z.B. Toxalarm, Stiptox-norm), zu einem Empfindlichkeitsverlust [27, 28]. Da Bakterien im Biofilm nicht ausgetauscht werden, sind sie solange in Kontakt mit dem Schadstoff, wie die Giftwelle an der Kontrollstation vorbeifließt. Es besteht somit ausreichend Zeit, die Testorganismen zu schädigen und eine meßbare Hemmreaktion zu erzeugen. Der Empfindlichkeitsverlust durch eine kurze Verweilzeit tritt bei Aufwuchstoximetern somit nicht ein.

Um eine hohe Verfügbarkeit zu erzielen, wird ein geringer Wartungsaufwand, eine geringe Störanfälligkeit und eine schnelle Wiederinbetriebnahme nach Wartung, Störung und Alarm gefordert [4, 27]. Das Biox 1000T schneidet mit einer mittleren Wartungszeit von unter einer Stunde in der Woche im Vergleich mit den anderen Geräten sehr gut ab; das Toxiguard benötigt ca. drei Stunden Wartungsarbeit pro Woche.

Bei beiden Geräten tritt das Problem der Giftadaptation des Biofilms auf. Nach einem Alarmfall kann der Biofilm unempfindlicher auf denselben Schadstoff reagieren als beim ersten Kontakt [5]. Daher wird nach einem Alarmfall ein neuer Biofilm benötigt, um eine gleichbleibend sensitive Überwachung zu gewährleisten. Da der Aufbau eines neuen Biofilms ca. zwei Wochen benötigt, ist eine Bereitstellung von Reserveeinheiten bei der Arbeit mit Biofilmen notwendig. In der Praxis kann dies so verwirklicht werden, daß die in Reserve gehaltenen Bioreaktoren aus einem großvolumigen Reservebecken gespeist werden. Durch den Verdünnungseffekt ist im Alarmfall genügend Zeit, sie von dem belasteten Testwasser abzukoppeln.

## **Danksagung**

Die Arbeiten wurden im Rahmen des vom Bundesministerium für Forschung und Technologie geförderten Forschungsvorhabens 0339299D "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biertestverfahren zur Überwachung des Rheins, Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination/Zentrale Auswertung" durchgeführt.

Wir danken der Firma Siepmann und Teutscher GmbH, Groß-Umstadt, für die Bereitstellung des Testgerätes Biox 1000T.

## Literatur

1. BRANSON, D.R.; ARMENTROUT, D.N.; PARKER, W.M.; VAN HALL, C. and BONE, L.I.: Effluent monitoring step by step. Env. Sci. Technol. 15, 1981, 513-518
2. IRMER, U.: Biologische Warnsysteme zur Erfassung von Störfällen am Rhein. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 203-210
3. SCHMITZ, P.; IRMER, U. und KREBS, F., Automatische Biotestverfahren in der Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, 1993, dieser Band
4. Bund/Länder-Arbeitskreis "Wirkungstests Rhein (WIR)": Kontinuierliche Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins. Abschlußbericht des BMFT/UBA-Verbundprojektes "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins". Umweltbundesamt, Berlin. UBA-Berichte, 1994, (in Vorbereitung)
5. KREBS, F.; BLESSING, B.; FRITZ-LANGEN, H.; BLÜBAUM-GRONAU, E.; HOFFMANN, M. und SCHMITZ, P.: Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins, Teilvorhaben 2: Bakterientoximeter, Verhaltensfischtest und Koordination/Zentrale Auswertung. Forschungsbericht. Forschungsmaßnahme des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (0339299D). Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, 1994 (in Vorbereitung)
6. FRITZ-LANGEN, H.; BLESSING, B. und KREBS, F.: Einsatz von Bakterientoximetern mit separater Zellanzucht zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 255-268
7. FRITZ-LANGEN, H.; BLESSING, B. und KREBS, F.: Bakterientoximeter mit Reinkulturen (*Photobacterium phosphoreum* und *Pseudomonas putida*) in der Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, 1993, dieser Band
8. BLESSING, B.; FRITZ-LANGEN, H. und KREBS, F.: Einsatz von Bioreaktoren zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 89, 1992, 247-254
9. MÜLLER, D. und WELLNER, B.: Zur kontinuierlichen Messung der Schädigung von Mikroorganismen: Ein "Giftschreiber" als Gerät zur Alarmauslösung und Beweissicherung. Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen 19 Sonderheft, 1975, 120-123

10. PLÖTZ, J.: Über ein neues Verfahren zur kontinuierlichen Erfassung der biogenen O<sub>2</sub>-Produktions- und Zehrungsaktivität im Gewässer. Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen 19, 1975, 6-11
11. REUTER, W. und NÖTHLICH, I.: Patentschrift: Biotechnischer Monitor zur kontinuierlichen Bestimmung von Schadwirkungen auf Mikroorganismen in Wasser. Erfinder und Patentinhaber: Wilhelm A. Reuter und Ingo Nöthlich. Europäisches Patentamt, München. Europäisches Patent 0319604. Anmeldetag 09.12.1987, Veröffentlichungstag der Anmeldung 14.06.1989, Veröffentlichung der Patentschrift 29.09.1993, 1993
12. FLEMMING, H.-C.: Biofilme und Wassertechnologie. Teil I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. gwf Wasser / Abwasser 132, 1991, 197-207
13. COSTERTON, J.W. and LAPPIN-SCOTT, H.M.: Behavior of bacteria in biofilms. ASM News 55, 1989, 650-654
14. LE CHEVALLIER, M.W.; CAWTHON, C.D. and LEE, R.G.: Inactivation of biofilm bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1988, 2492-2499
15. SHIEH, W.K. and YEE, C.J.: Development of a microbial toxicity monitor. Toxicity Assessment 1, 1986, 301-313
16. CHARACKLIS, W.G. and MARSHALL, K.C. (eds.): Biofilms. John Wiley & Sons, 1990, New York
17. CHARACKLIS, W.G. and WILDERER, P. (eds.): Structure and function of biofilms. John Wiley & Sons, 1989, New York
18. LAWRENCE, J.R.; KORBER, D.R.; HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W. and CALDWELL, D.E.: Optical sectioning of microbial biofilms. J. Bacteriol. 173, 1991, 6558-6567
19. LE CHEVALLIER, M.W.; BABCOCK, T.M. and LEE, R.G.: Examination and characterization of distribution system biofilms. Appl. Env. Microbiol. 53, 1987, 2714-2724
20. SOLYOM, P.: Industrial experiences with Toxiguard, a toxicity monitoring system. Prog. Wat. Tech. 9, 1977, 193-198
21. MARTIN, J.V.: Biomonitoring of polluted waters: three systems. In: D. Gruber and J. Diamond (eds.) Automated biomonitoring:living sensors as environmental monitors. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988, 172-181

22. SIEPMANN, F.W.: Methoden und Instrumente zur Messung der Intoxikation von biologischen Systemen der Abwasserreinigung. *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser* 134, 1992, 191-204
23. RIEGLER, G.: Kontinuierliche Kurzzeit-BSB-Messung: Ein neues Verfahren mit vielseitigen Möglichkeiten zur aussichtsreichen Anwendung. *Korrespondenz Abwasser* 31, 1984, 369-377
24. KÖHNE, M.; SIEPMANN, F.W. und te HEESEN, D.: Der BSB5- und der kontinuierliche Kurzzeit-BSB (BSB-M3) im Vergleich. *Korrespondenz Abwasser* 33, 1986, 787-793
25. HAACK, T.K. and McFETERS, G.A.: Nutritional relationships among micro-organisms in an epilithic biofilm community. *Microb. Ecol.* 8, 1982, 115-126
26. SCHMITZ, P.; KREBS, F. und IRMER, U.: Development, testing, and implementation of automated biotests for the monitoring of the river Rhine, demonstrated by bacteria and algae tests. *Water Science and Technology*, 1993, in press
27. SCHMITZ, P.; IRMER, U. und KREBS, F.: Vergleichende Erprobung und Beurteilung von automatischen Biotestverfahren für den Einsatz in Meßstationen. *Schriftreihe des Vereins für Wasser-, Boden-, und Lufthygiene*, 1993, dieser Band
28. MÜLLER, D.: Zum Stand der Entwicklung von Toxizitätsregistriergeräten. *Korrespondenz Abwasser* 26, 1979, 660-662



# **Der PROTOPLASTEN BIOTEST - ein Wirkungstest zur summarischen Schadstofferfassung in der Umwelt**

S. Overmeyer , E. Hostert , S.E. Lindner , H. Schnabl und L. Peichl

## **Zusammenfassung**

Pflanzliche Protoplasten besitzen die Fähigkeit, im Zuge der Photosynthese Sauerstoff zu produzieren. Diese äußerst sensitive physiologische Reaktion kann zur Bestimmung der Kontamination eines Gewässers herangezogen werden. Die Sauerstoffentwicklung der Protoplasten wird bei Anwesenheit von herbiziden Wirkstoffen in einer Gewässerprobe reduziert. Herbizid-Wirkstoffe können im Bereich von einigen  $\mu\text{g/l}$  nachgewiesen werden. Es wurde ein Test entwickelt, der als kostengünstiges, empfindliches Prescreening-Verfahren eingesetzt werden kann. Dabei geht es nicht um die Qualifizierung von Stoffen, sondern um die Erfassung einer kumulierten Schadstoffwirkung.

## **Summary**

Protoplasts of plant origin are capable of producing oxygen in the course of photosynthesis. This extremely sensitive physiological reaction may be used to establish the contamination of a water body. Oxygen development of protoplasts in a water sample is reduced in the presence of herbicidal agents. It is possible to detect herbicidal agents in the range of a few  $\mu\text{g/l}$ . A test was developed which can be used as a cost-effective sensitive prescreening method for the recording of cumulative effects of contaminants rather than for the identification of substances.

## **Einleitung**

Zur Ergänzung der biologischen Testsysteme, die auf dem Einsatz von Fischen [1, 2], Muscheln [3], Bakterien [4, 5], Daphnien [6] oder Algen [7, 8, 9] beruhen, wurde ein Biotest entwickelt, der auch den Stoffwechsel der höheren Pflanze in den Dienst der biologischen Gewässerüberwachung stellt.

Pflanzliche Zellen sind von einer Zellwand umgeben, die eine Barriere für die in die Zelle eindringenden Stoffe darstellt. Um diese Barriere zu beseitigen und die Empfindlichkeit für einwirkende Substanzen zu erhöhen, werden sie mittels enzymatischen Abbaus entfernt. Man erhält dann zellwandlose pflanzliche Zellen, sogenannte Protoplasten. Protoplasten sind als biologisches Testsystem besonders geeignet, solche Stoffe nachzuweisen, die unmittelbar in den photosynthetischen Elektronen-

transport eingreifen. Unter dem Einfluß von verschiedenen Herbizidwirkstoffen, wie zum Beispiel Atrazin, Terbuthylazin, Diuron oder Isoproturon, ist bereits bei 6,25 µg/l eine Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion der Protoplasten feststellbar [10, 11].

## **Gewinnung und Immobilisierung der Protoplasten**

Ausgangsmaterial der Mesophyllzellprotoplasten sind drei Wochen alte Blätter der Ackerbohne (*Vicia faba L.*). Die Isolierung der Protoplasten erfolgt durch eine enzymatische Ein-Schritt-Methode mit anschließender Reinigung durch einen diskontinuierlichen Mannit-Saccharose-Dichtegradienten [12, 13, 14]. Suspendierte Protoplasten können im Labor direkt als Bioindikatoren eingesetzt werden. Wird jedoch eine längere Verfügbarkeit der biologischen Einheit verlangt, wie es bei einem automatisch arbeitenden Biotest der Fall ist, müssen die Protoplasten durch Einbettung in Alginat immobilisiert werden. Durch dieses Vorgehen erhält man kugelförmige Protoplastenimmobilisate von ca. 3,5 mm Durchmesser, die über einen Zeitraum von einer Woche verwendet werden können [10, 11].

## **Verfahren der Sauerstoffbestimmung**

Die Sauerstoffproduktion im Licht (Photosynthese) bzw. der Sauerstoffverbrauch im Dunkeln (Atmung) wird polarographisch in einem 30-minütigen Meßzyklus mit Clark-Elektroden gemessen. Bei der verwendeten Meßanordnung (*OXYTEC GmbH, Bochum*) wird der während der Sauerstoffmessung auftretende Meßstrom unmittelbar hinter dem jeweiligen Sensor verstärkt und in eine Spannung konvertiert. Von einem Meßwertaufnehmer werden die Signale erneut verstärkt und an einen A/D-Wandler übergeben, der bereits eine Mittelwertbildung durchführt. Auswertung und Steuerung erfolgen durch einen Rechner. Die Sauerstoffentwicklung der Protoplasten kann gleichzeitig in vier verschiedenen Ansätzen durch in Serie geschaltete, temperierbare Reaktionskammern ermittelt werden.

Für jedes 30 minütige Meßintervall werden 100 µl einer Protoplastensuspension oder 4 Kugeln - beides entspricht ca. 25 µg Chlorophyll - eingesetzt. Um alle Meßküvetten mit der gleichen Lichtstärke zu belichten, wird eine 150 W Halogen-Kaltlichtquelle (*OXYTEC GmbH, Bochum*) verwendet, an die ein 4-armiger Glasfaser-Lichtleiter angeschlossen ist.

## **Praktische Anwendungen des Protoplastenbiotests**

Die grundsätzliche Eignung des PROTOPLASTEN-BIOTESTS zum Nachweis von Herbiziden in Gewässern wurde mit der automatisierten Version und der Laborversion durch Versuche mit verschiedenen Wirkstoffen [10, 11] und natürlichen Proben nachgewiesen. In Abbildung 1 sind die Ergebnisse einer Untersuchung mit

Regenwasserproben, die in einer landwirtschaftlich stark genutzten Gegend in wet-only Kollektoren gesammelt wurden, im Jahresverlauf dargestellt. Die signifikante Hemmung der Sauerstoffproduktion von suspendierten Protoplasten deutet auf eine deutliche Belastung des Regenwassers als mögliche Folge der Ausbringung von Pflanzenschutzmittel im Frühjahr und Frühsommer hin.

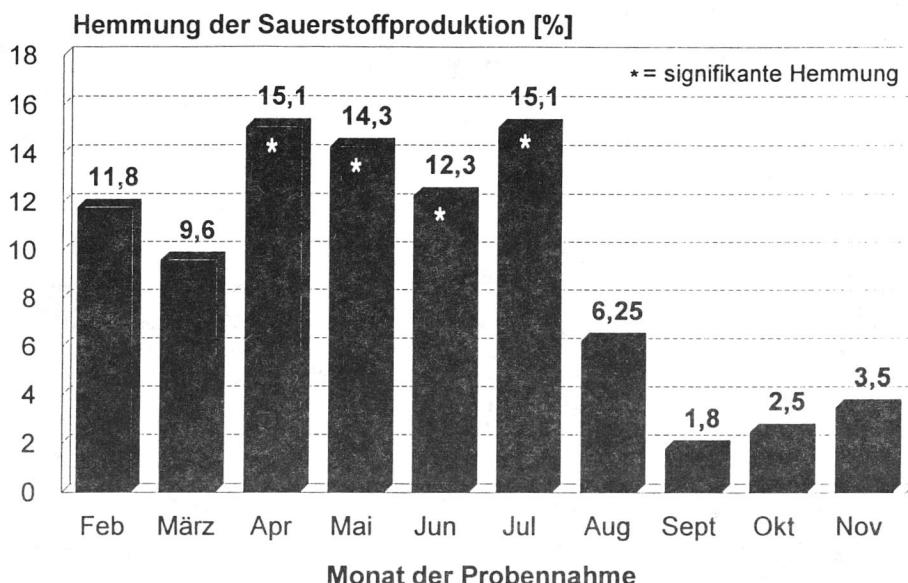


Abb. 1: Wirkung von Regenwasser einer landwirtschaftlich genutzten auf suspendierte Protoplasten. Gegenüber den Kontrollen statistisch abgesicherte Hemmungen sind mit einem \*\* gekennzeichnet (n=8).

Pflanzenschutzmittel wurden neben einer Vielzahl anderer organischer Chemikalien in letzter Zeit wiederholt im Regenwasser gefunden [15, 16, 17, 18]. Die ermittelten Konzentrationen betrugen für Einzelsubstanzen in der Regel weniger als 1 µg/l, weshalb davon ausgegangen werden muß, daß nicht ein Wirkstoff, sondern das Zusammenwirken von mehreren Stoffen zu den ermittelten Hemmungen führte.

#### Der automatisierte PROTOPLASTEN-BIOTEST

Um eine online Überwachung eines Gewässers zu ermöglichen, wurde ein automatisiertes Gerät entwickelt, das über einen Zeitraum von einer Woche wartungsfrei arbeitet.

Die regelmäßige Be- und Entladung der Meßküvetten mit den kugelförmigen Protoplasten-immobilisaten wurde durch ein aus mehreren Komponenten bestehendes System realisiert (Abbildung 2). Ein Verteiler gewährleistet, daß für jede Messung 4 Protoplastenkugeln von der Protoplastengarage einem Beladungsschlitten (Vorschubeinheit) zugeführt werden, der die Kugeln in die Meßküvette schiebt. Nach dem Ende der Messung werden die Kugeln durch Zurückfahren des Schlittens entfernt. Die Dosierung des Puffers sowie des Kontroll- bzw. Testwassers erfolgt durch zwei 4-Kanal-Casettenschlauchpumpen. Das Abpumpen wird von einer Membran-Flüssigkeitspumpe übernommen. Die Ansteuerung der Teilkomponenten erfolgt durch einen industriefähigen 19"-Rechner unter TOS.

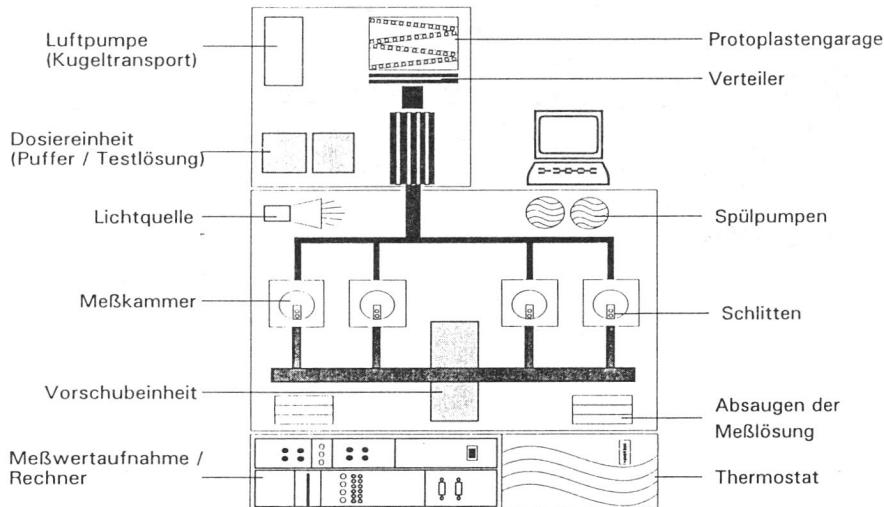


Abb. 2: Der PROTOPLASTEN-BIOTEST in einer schematischen Darstellung

Der vollständige, in zwei Intervalle unterteilte Meßzyklus (Abbildung 3) des automatisierten PROTOPLASTEN-BIOTESTS beträgt 60 Minuten. Während des ersten Meßintervalls wird für die vier Meßkammern die Aktivität unter Idealbedingungen gemessen. Danach folgt die Beladung aller Meßkammern mit neuem Puffer, wobei je zwei Kammern nur mit Puffer (Referenzen), die anderen mit Testwasser beschickt werden. Das zweite Intervall wird jetzt bei gleichem Zeitablauf durchgeführt.

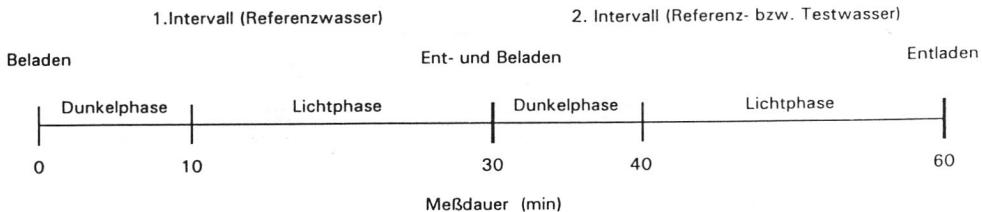


Abb. 3: Zeitschema des automatisierten PROTOPLASTEN-BIOTESTS

Für die Ermittlung der Hemmwirkung unter dem Einfluß der Gewässerprobe wird ein variables Berechnungsprinzip herangezogen. Hierbei werden die Werte der Referenzproben einer 100%igen Aktivität gleichgesetzt. Die unter dem Einfluß der Inhaltsstoffe des Testwassers auftretende, geringere Produktionsleistung wird als prozentuale Hemmung bezogen auf die Referenzen angegeben. So errechnet sich beispielsweise aus einer angenommenen Aktivität der Referenzen von 50 und einer Aktivität der Testproben von 40 eine Hemmung von 20%.

## Diskussion

Durch Chemikalientests konnte gezeigt werden, daß Protoplasten besonders sensitiv auf Herbizidwirkstoffe reagieren, die unmittelbar in den photosynthetischen Elektronentransport eingreifen. Diese Stoffe bewirkten bereits in einer Konzentration von wenigen  $\mu\text{g/l}$  eine Hemmung der lichtabhängigen Sauerstoffproduktion [10, 11]. Die Empfindlichkeit des PROTOPLASTEN-BIOTESTS reicht jedoch nicht aus, um Einzelsubstanzen im Bereich der Trinkwasserverordnung ( $0,1 \mu\text{g/l}$ ) zu detektieren. Im Gegensatz zu chemischen Nachweisverfahren besteht die Einsatzmöglichkeit des Testsystems in einer schnellen, ökotoxikologischen Bewertung von Gewässerproben. Damit wird unter Einbeziehung auch synergistischer und additiver Effekte die Gesamtwirkung aller im Wasser befindlichen, die Photosynthese hemmenden Substanzen erfaßt.

Durch die Automatisierung ist das System in der Lage, ein Gewässer kontinuierlich zu überwachen. Der PROTOPLASTEN-BIOTEST ermöglicht damit die Erweiterung des bereits bestehenden Spektrums an Testsystemen um die höheren Pflanzen bzw. eine ihrer Untereinheiten, hier Mesophyllprotoplasten.

Neben dem Einsatz an einem Oberflächengewässer ist auch ein Einsatz des Biotests als Frühwarnsystem zur Anzeige von Störfällen bei der Abwassereinleitung möglich. Eine Analyse von Regenwasser, das zur Charakterisierung von Luftimmissionen herangezogen werden kann, ist ebenfalls mit dem PROTOPLASTEN-BIOTEST möglich.

### **Danksagung:**

Das Forschungsvorhaben wurde vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit und dem Umweltbundesamt, Berlin (Forschungsvorhaben Wasser 102 05 146/07, H. Schnabl), unterstützt.

### **Literatur**

1. LÖBBEL, H. J. und STEIN, P. : Messung der Kiemendeckelbewegung mit dem WRC- Fischmonitor im on-line Betrieb am Niederrhein. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 323-332.
2. BLÜBAUM-GRONAU, E., SPIESER, O. H. und KREBS, F.: Bewertungskriterien für einen Verhaltensfischtest zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 333-348.
3. BORCHERDING, J.: Die Schalenbewegung der Muschel *Dreissena polymorpha* als Monitorsystem zur Gewässerüberwachung. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 361-373.
4. BLESSING, B., FRITZ-LANGEN, H. und KREBS, F.: Einsatz von Bioreaktoren zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 247-254.
5. STEIN, P.: Bakterienelektroden mit *Synechococcus* und *Escherichia coli*. Ein kontinuierliches Testsystem zur Online-Überwachung von Oberflächengewässern. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 269-275
6. PUZICHA, H.: Der dynamische Daphnientest: Erfahrungen aus dem Meßstationsbetrieb am Gewässer. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 349-359
7. MERSCHHEMKE, C. und REGH, W.: Das FluOx-Meßsystem: Ein automatisches Algентestgerät zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 285-292

8. GERHARDT, V. und PUTZGER, J.: Ein Biotest zur Gewässerüberwachung auf der Grundlage der verzögerten Fluoreszenz von Algen. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 277-284
9. NOACK, U. und WALTER, W.: Das Algentoximeter in der kontinuierlichen Gewässerüberwachung. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 305-309
10. LINDNER, S. E., OVERMEYER, S. und SCHNABL, H.: Der Protoplastenbiotest - ein Wirkungstest zur Herbizid detektion in Gewässern. Angew. Bot. 66, 1992, 79 - 84
11. OVERMEYER, S., LINDNER, S. und SCHNABL, H.: Der Protoplastenbiotest. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, 1992, 293-303
12. SCHNABL, H., SCHEURICH, P. and ZIMMERMANN, U.: Mechanical stabilization of guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Planta* 149, 1980, 280 - 282
13. SCHNABL, H. and ZIMMERMANN, U.: Immobilization of plant protoplasts. In: Bajaj, Y.S.P. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 8, *Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*, 1989, 63 - 96. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
14. LINDNER, S. E.: Entwicklung einer geeigneten Technologie zur Immobilisierung von Protoplasten der *Vicia faba L.* zum Zwecke der Aufdeckung von Gewässer- kontaminationen. Diplomarbeit, Universität Bonn, 1990
15. BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR WASSERFORSCHUNG: Neue Unter- suchungen zur Analytik und Verbreitung von Polychlorbiphenylen (PCB) und Pflanzenbehandlungsmitteln. Bericht, München, 1990
16. BUSER, H. R.: Atrazine and other s-Triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1990, 1049 - 1058
17. LANDESAMT FÜR WASSER UND ABFALL NORDRHEIN WESTFALEN (Hrsg.): Jahresbericht '91. Düsseldorf, 1992
18. SCHARF, J. WIESIOLLEK, R. and BÄCHMANN, K.: Pesticides in the atmosphere. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 342, 1992, 813 - 816



# **Elektrophysiologisches Monitoring mittels einer Ionen-Transportkammer zur Schadstoffwirkung und Epitheliophysiologie von Wassertieren**

H.-J. Schwarz

## **Zusammenfassung**

- Diese Arbeit verwendet die "Voltage-Clamp-Meßtechnik" zur Erfassung des Kurzschlußstromes ( $I_{Sc}$ ), der transepithelialen Potentialdifferenz ( $PD_{Te}$ ) und der transepithelialen Transportwiderstände ( $R_{Te}$ ), die als Indikatoren für die Erfassung der Schadstoffwirkung von Schwermetallen dienen. Dafür wurde eine speziell modifizierte Ionen-Transportkammer verwendet, die insbesondere auch die Untersuchung sehr kleiner Epithelflächen ( $\leq 0,5 \text{ mm}^2$ ) ermöglicht.
- Es wurde die Wirkung von Cadmium (Cd) und Kupfer (Cu) auf die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Kiemenepithel isolierter, halbierter Kiemenglättchen der Chinesischen Wollhandkrabbe (*Eriocheir sinensis*) untersucht, im Vergleich zur Wirkung von Ouabain, den spezifischen Hemmstoff der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Dabei stellt sich durch Belastung mit Schwermetallen eine offenbar irreversible Inhibition der Aktivität des Transportenzymes ein, was als Information über die Toxizität zu verwenden ist.
- Die Inhibition führt zur nahezu vollständigen Reduktion des  $-I_{Sc}$ , der dem Ionentransport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  proportional ist. Der Ionentransport ist maßgeblich an der Ionen- und Osmoregulation sowie dem Erhalt der Homöostase beteiligt.

## **Summary**

- In this study, the voltage clamp measuring technique was applied to record the short circuit current ( $I_{Sc}$ ), the transepithelial potential difference ( $PD_{Te}$ ), and the transepithelial transport resistors ( $R_{Te}$ ) which serve as indicators of the hazardous effects of heavy metals. An ion transport chamber modified for this particular purpose was used which permitted, in particular, the examination of very small surfaces of epithelium ( $\leq 0.5 \text{ mm}^2$ ).
- The effects of cadmium (Cd) and copper (Cu) on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase in gill epithelium of isolated, halved gill lamellae of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*) were investigated and compared to the effect of ouabain, the specific inhibitory substance of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. An obviously irreversible inhibition of activity of the transport enzyme occurred under conditions of exposure to heavy metals which is used as an information on toxicity.
- Inhibition resulted in an almost complete reduction of  $-I_{Sc}$  which is proportional to the ion transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . The ion transport contributes essentially to ion and osmo regulation and the maintenance of homeostasis.

## **Einleitung**

Vergleichende physiologisch-pharmakologische und ökotoxikologische Forschung an Transportsystemen der Epithelien verschiedener "Wasserspezies" (z. B. Wollhandkrabben, Flußkrebse, Fische) mit einer speziellen Bioverfahrenstechnik hat gezeigt, daß bereits Epithelien bestimmter Organe eine hohe Sensibilität gegen über Pharmaka, aber auch Schadstoffen, z. B. Schwermetallen aufweisen [1, 2, 3].

Epithelphysiologische Forschung ist in elementarem Maße mit der Ökotoxikologie/Ökophysiologie verbunden, denn ausschließlich Epithelien sind die "Barrieren" der Organe sowie des gesamten Organismus gegenüber den Wirkfaktoren der Umwelt. Belastete Epithelien liefern daher - neben gefundener Kompensationsfähigkeit des Gesamtorganismus - bereits deutliche Hinweise über zuerwartende Sekundärfolgen.

Diese Untersuchungsmethode ermöglicht es, über den Meßparameter "des zellulär generierten, aktiven epithelialen Ionentransports", durch die elektrophysiologisch gemessenen proportionalen Strom-Spannungsverläufe, die Schadstoffwirkung meßdatentechnisch aufzuzeichnen. Dabei werden innerhalb weniger Minuten bis Stunden (epithelspezifisch) reversible bzw. toxisch irreversible Effekte ableitbar. Präparativ werden dazu geeignete Epithelien von Organismen isoliert und in einer Ionen-Transportkammer untersucht, die speziell für sehr kleine Epithelflächen entwickelt wurde (1987). Diese Methode dient als Nachweisverfahren sowohl der Erfassung der schadstoffspezifischen, als auch der konzentrationsabhängigen Wirkung (Bestimmung von Minimalkonzentrationen) unter modifizierbaren Bedingungen. Zudem ist die Selektion geeigneter Indikatorepithelien spezieller Organismen möglich. Hohe Reproduktionsgenauigkeit über biologisch-physiologische Transportsysteme (epitheliale Regelkreisläufe), zudem mit sehr wenig Versuchstieren, reduziert die Experimentenhäufigkeit und genügt als adäquate Bioverfahrenstechnik selbst der biologischen und ökonomischen Bewertung.

Bereits frühere Forschung an Gesamtkiemen von Crustaceen hat gezeigt, daß deren Kiemenepithelien als Untersuchungsobjekte zur Ableitung elektrophysiologischer Meßparameter dienen können [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Zudem sind diese Organe als Orte der Ionen- und Osmoregulation direkt mit dem belasteten Wasser konfrontiert.

## **Material und Methoden**

Mit einer 1987/88 entwickelten Präparationsmethode zur Isolierung sehr kleiner Epithelflächen der Kiemen von Krabben, mit einer sehr komplizierten Kiemmorphologie, wurde es erstmals möglich, die  $P_{D_{TE}}$ , den spezifischen Rte [10] und später auch den  $I_{SC}$  abzuleiten [11] siehe Abb. 1. Dafür wurde eine speziell entwickelte, symmetrisch-vertikale Ionen-Transportkammer mit Meßöffnungen von 1 mm  $\varnothing$  bis  $\varnothing$  0.5 mm  $\varnothing$  verwendet, entwickelt 1987, [ 12, 13 ], siehe Abb. 2.

Diese "flow-chamber" kann auch für die Untersuchung unter physiologischen Normalbedingungen, also unter Anwesenheit von elektrochemischen Gradienten verwendet werden, wenn auf den Seiten des jeweiligen Epithels die physiologische Hämolympfkonzentration der Konzentration des Umgebungsmediums gegenübersteht. In dieser Untersuchung wurde unter Ausschluß von Gradienten gearbeitet, mit einer 300 mmol/l NaCl enthaltenden hämolympphysiologischen Lösung. Dabei wurden Cd  $^{2+}$  und Cu  $^{2+}$  als Ionen der Salze von -Cl und -acetat auf ihre Schadstoffwirkung hin getestet, jeweils im Vergleich zur Wirkung von Ouabain als spezifischen Inhibitor der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

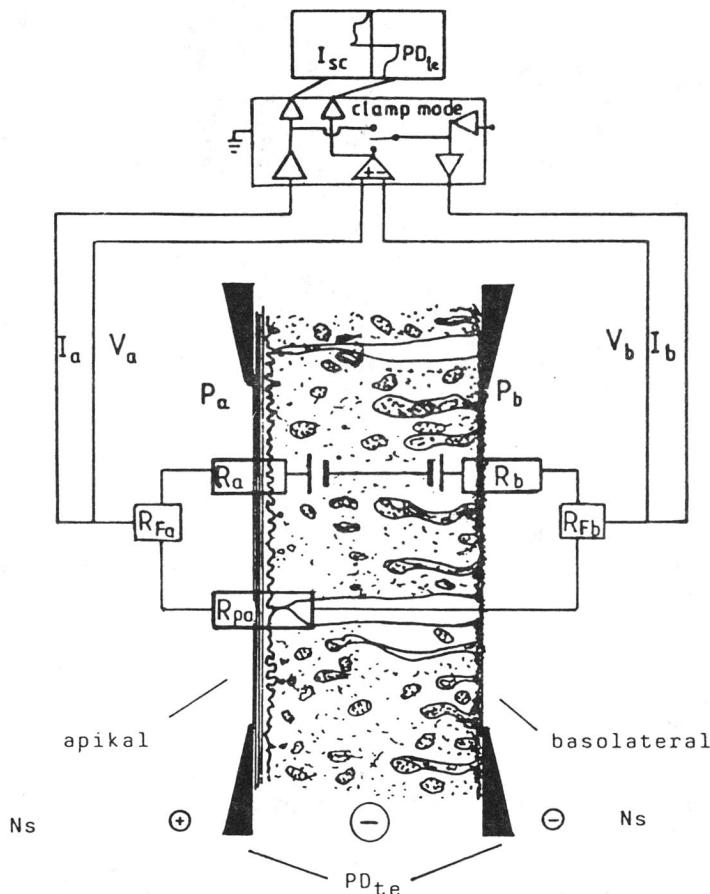


Abb. 1: Voltage-Clamp-Meßeinrichtung mit vereinfachtem Schaltbild. Das Epithel zeigt hier die typische Epithelstruktur (Mitochondrien und basolaterale Membraneinfaltungen, apikal die Cuticula und die Zellmembran). Das Epithel befindet sich abgedichtet in der Ionen-Transportkammer. Es können die elektrophysiologischen Meßgrößen abgeleitet werden, für Kiemenepithelien mit Werten von  $-I_{sc} = 80 \text{ mA/cm}^2$ ,  $PD_{te} = 20 \text{ mV}$  und  $R_{te} = 220 \text{ Wcm}^2$ .

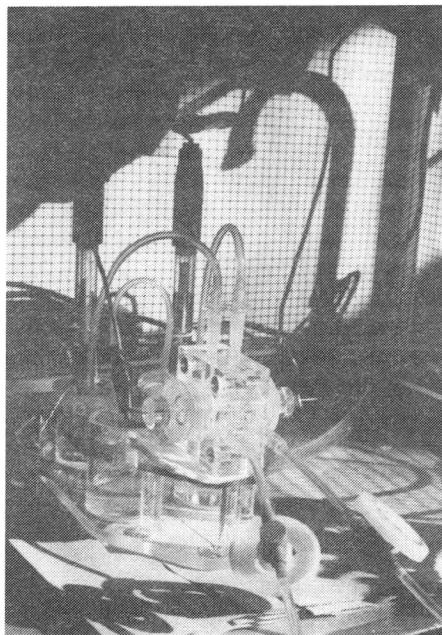


Abb. 2: Die Ionen-Transportkammer als vertikale und symmetrische Konstruktion. Sie ist im Frontteil mit einem Perfusionssystem verbunden und im oberen Teil mit "Voltage"-Meßelektroden (KCl-Agar-Brücken) versehen, die apikal und basolateral mit Kalomel-Elektroden verbunden sind. Ebenso stehen die Ag/AgCl-Elektroden beidseitig mit der Voltage-Clamp-Meßeinrichtung in Verbindung.

### Ergebnisse und Diskussion

Untersuchungen mit o. g. Ionen-Transportkammer führten bereits zum Nachweis apikal (a) lokalisierter  $\text{Na}^+$ -Kanäle im Kiemenepithel der hinteren Kiemen von *Eriocheir sinensis* [12,14], was durch weiterführende Untersuchungen nochmals bestätigt wurde [15]. Zudem ist für Kiemenepithelien von Crustaceen ein aktiver  $\text{Na}^+$ -Transport und sekundär abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Transport bekannt [16,17]. Ein vereinfachtes Transportmodell der hinteren, osmoregulierenden Kiemen von *Eriocheir sinensis* wurde im Laufe der Zeit entwickelt, überarbeitet und hier als Arbeitshypothese [12, 18, 19,20] mit Abb. 3 dargestellt.

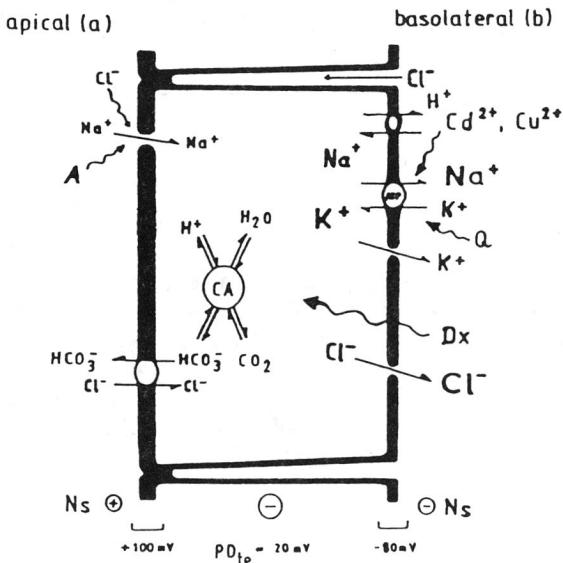


Abb. 3: Transportmodell für hintere, osmoregulierende Kiemen von *Eriocheir sinensis* (Schwarz 1990 [12], modifiziert). Der  $\text{Na}^+$ -Transport erfolgt über apikal lokalisierte  $\text{Na}^+$ -Kanäle<sub>a</sub> und wird aktiv durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase<sub>b</sub> generiert. Dieses Transportenzym erhält zudem einen  $\text{K}^+$ -Gradienten von der zellulären Seite zur basolateral gelegenen Hämolympfseite aufrecht, wodurch der  $\text{Cl}^-$ -Eintritt zur Hämolympfseite als sekundär abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Transport begünstigt wird. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase<sub>b</sub> kann durch Ouabain<sub>b</sub> inhibiert werden (Q, reversibel), aber ebenso durch  $\text{Cd}_b$  und  $\text{Cu}_b$  (jedoch irreversibel), wodurch der  $\text{NaCl}$ -Transport in gleicher Weise reduziert wird. Dadurch wird die Ionen- und Osmoregulation und in der Folge die Homöostase gestört. Effekte mit Acetazolamid (Dx, Diamox) auf die Carboanhydratase (CA) und von Amilorid (A) auf  $\text{Na}^+$ -Kanäle, schließen nicht aus, daß der bisher nicht genau lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher kurzgeschlossen zusammen mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase agiert.

Ouabain wirkt spezifisch inhibierend auf die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [12, 20, 21, 22, 23]. Histochemische Untersuchungen bestätigen zudem, daß die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Kiemenepithel basolateral (b) lokalisiert ist [24]. Die Daten geben an, daß ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Transport vorliegt, der im Zusammenhang mit Amilorid- und Ouabain-sensitiven Transportmechanismen steht [12, 14, 23, 25]. Der an diesem Epithel abgeleitete  $-I_{sc}$  ist dem Netto-Ionentransport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  proportional.

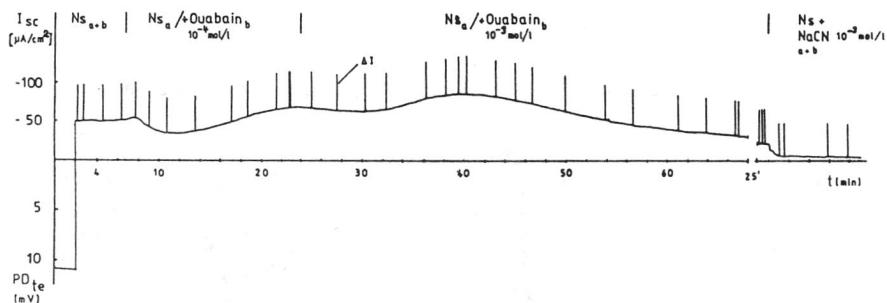


Abb. 4: Wirkung von Ouabain<sub>b</sub> unter Normalbedingungen (Ns a+b). 10<sup>-3</sup> mol/l Ouabain<sub>b</sub> bewirken eine Reduktion des -I<sub>SC</sub>, regelmäßig nach einer initialen Erhöhung, die mit niedrigeren Konzentrationen (10<sup>-4</sup> mol/l) zunächst zeitabhängig konstant bleibt. Dieser Anstieg des -I<sub>SC</sub> ist Ausdruck des Wegfalls des positiven Na<sup>+</sup>-Ionentransportes, da noch immer Cl<sup>-</sup> transportiert wird. Mit 10<sup>-3</sup> mol/l Ouabain wird auch dieser Cl<sup>-</sup>-Transport schnell inhibiert. (10 mV-Impulse ® D I).

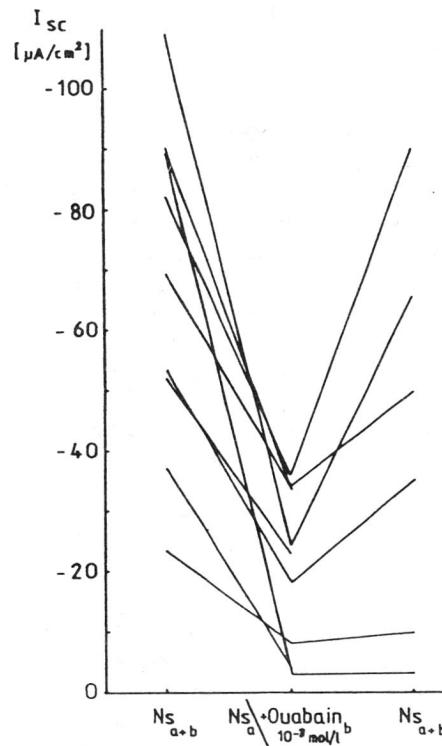


Abb. 5: Ouabain<sub>b</sub> mit 10<sup>-3</sup> mol/l induziert eine Reduktion des -I<sub>SC</sub> (mit ~ 70%, n = 9, p < 0,00025), die beim Auspülen mit Normalsaline reversibel ist.

Diese Untersuchung vergleicht die Wirkungen von Ouabain (Abb. 4 und 5) mit der Wirkung von Cadmium (Abb. 6, 7, 8) und der Wirkung von Kupfer (Abb. 9, 10, 11) jeweils unter Kurzeitwirkung am Kiemenepithel.

Während der Effekt von Ouabain<sub>b</sub> mit  $10^{-3}$  mol/l (Abb. 4) zu einer reversiblen Inhibition der Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase führt (Abb. 5), mit ~ 70% reduzierten  $-I_{\text{SC}}$ , zeigt sich eine irreversible Hemmung der Aktivität dieses Transportenzymes bei Applikation von  $10^{-3}$  mol/l Cd<sub>b</sub> (Abb. 6) mit vergleichbarem Kurvenverlauf bei ~ 90% des  $-I_{\text{SC}}$  (Abb. 7).

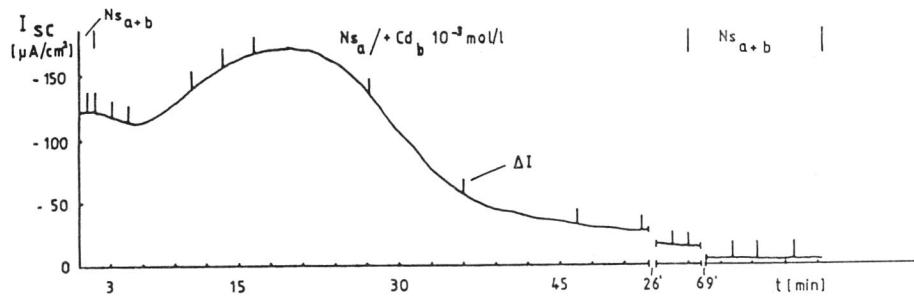


Abb. 6: Mit  $10^{-3}$  mol/l Cd<sub>b</sub> wird der  $-I_{\text{SC}}$  nach einer initialen Erhöhung regelmäßig gegen reduziert. Dieser Effekt zeigt einen vergleichbaren "Wirkstoffzeitverlauf" wenn die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Ouabain<sub>b</sub> inhibiert wurde (5 mV-Impulse ® D I).

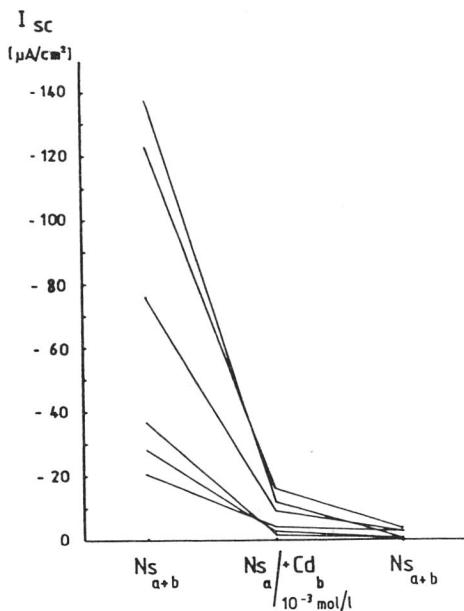


Abb. 7: Durch  $10^{-3}$  mol/l Cd<sub>b</sub> wird der  $-I_{\text{SC}}$  deutlich reduziert (mit ~ 90%, n = 6, < 0,00001) und zeigt, daß der  $\text{Na}^+$ - und abhängige  $\text{Cl}^-$ -Transport vollständig blockiert ist. Der Effekt mit Cd<sub>b</sub> ist irreversibel, beim Spülen mit Saline fällt der  $-I_{\text{SC}}$  weiterhin gegen 0.

Ein Ausspülen von  $Cd_b$  ist offenbar nicht möglich. In gleicher Weise tritt die Inhibition der Aktivität des Transportenzymes mit Reduktion des  $-I_{Sc}$  nach Applikation von  $10^{-6}$  mol/l  $Cd_b$  ein (Abb. 8). Zu beachten bleibt, daß der Effekt bereits unter Kurzzeitbedingungen eintritt und aus den Kurvenverläufen ist zu deduzieren, daß deutlich niedrigere Konzentrationen von  $Cd_b$  bereits Wirkung zeigen, wie einzelne Versuche mit  $< 10^{-6}$  mol/l  $Cd_b$  bestätigten, wobei die Wirkung deutlich zeitabhängig auftritt. Diese Daten zeigen, daß Cd offenbar als ein starker Blocker der  $Na^+/K^+$ -ATPase gilt, da der von der  $Na^+/K^+$ -ATPase aktiv generierte  $Na^+$ -Transport und sekundär abhängige  $Cl^-$ -Transport irreversibel gegen 0 reduziert werden [1, 22].

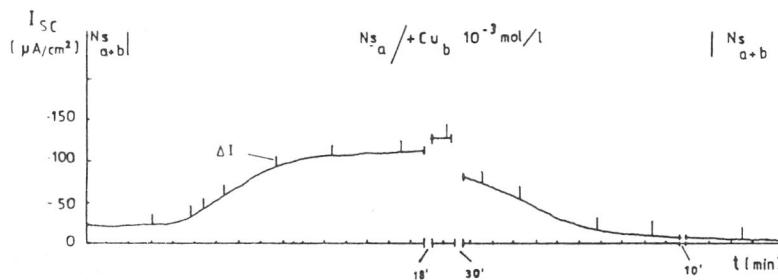


Abb. 8: Deutlich niedrigere Konzentrationen von  $Cd_b$  mit  $10^{-6}$  mol/l verursachen ebenfalls eine deutliche Reduktion des  $-I_{Sc}$ , nur mehr zeitabhängig. Bemerkenswert ist, daß niedrige Transportaktivität durch Theophyllin auch nur noch schwach stimuliert werden kann (5 mV-Impulse ® D I).

Auch von biochemischen Untersuchungen mit Tieren der "Rock crab" *Cancer irroratus* [26] und an der "Indian crab" *Scylla serrata* [27] ist aus Langzeitexperimenten mit Cd bekannt, daß die  $Na^+/K^+$ -ATPase des Kiemeneipithels betroffen ist. Inhibitorische Effekte mit Cd sind auch von gereinigtem Enzym der  $Na^+/K^+$ -ATPase bekannt, sogar mit Konzentrationen bei einem  $I_{50}$  von  $< 10^{-6}$  mol/l, also bei deutlich niedrigeren Konzentrationen zu Beginn der Anfangsinhibition [28].

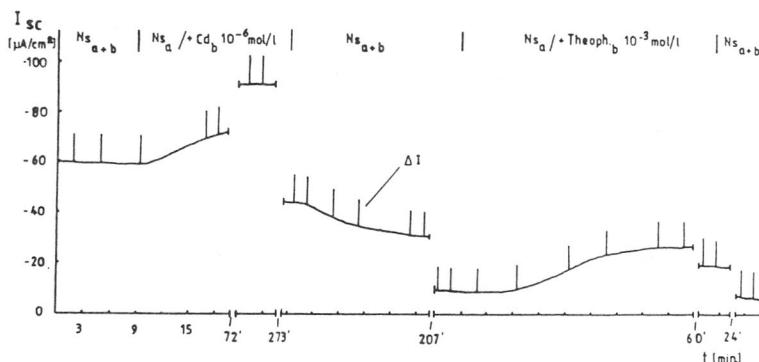


Abb. 9: Bei  $10^{-3}$  mol/l  $Cu_b$  wird der  $-I_{Sc}$  irreversibel gegen 0 reduziert.

Es liegt ein vergleichbarer Zeitverlauf unter Einfluß von  $Cu_b$  vor, wie er von den Effekten mit Ouabain $_b$  und  $Cd_b$  bekannt ist. Dies dient als Hinweis, daß die  $Na^+/K^+$ -ATPase maßgeblich betroffen ist. (5 mV-Impulse ® D I).

Cu wirkt in gleicher Weise wie Cd, wenn Cu von der basolateralen Seite des Kiemeneipithels appliziert wird. Bei  $10^{-3}$  mol/l Cu (Abb. 9) wird der  $-I_{SC}$  mit  $\sim 93\%$  gegen 0 reduziert (Abb. 10) und wirkt offenbar ebenfalls irreversibel auf die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität, wenn eine Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l  $\text{Cu}_b$  eingesetzt wurde (Abb. 11). Auch diese Wirkung belegt eine deutliche Zeitabhängigkeit. Dies läßt wiederum darauf schließen, daß bereits sehr niedrige Konzentrationen, vermutlich schon im Bereich von  $\sim 10^{-9}$  mol/l wirken, wie aus der Dosiswirkungsbeziehung, beginnend bei niedrigen Konzentrationen abzuleiten wäre.

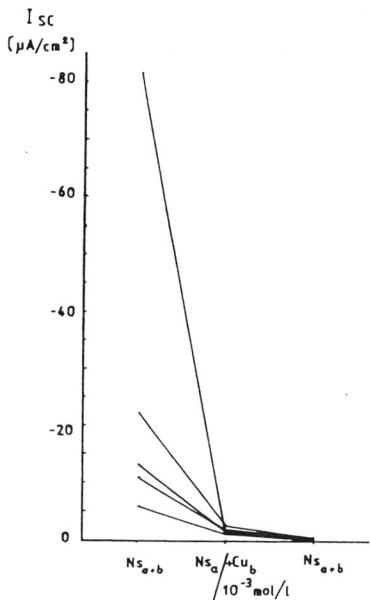


Abb. 10: Mit  $10^{-3}$  mol/l  $\text{Cu}_b$  wird der  $-I_{SC}$  vollständig reduziert (mit  $\sim 93\%$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,000005$ ). Die Wirkung von  $\text{Cu}_b$  bleibt irreversibel, der  $-I_{SC}$  fällt weiterhin gegen 0, wenn mit Normalsaline ausgespült wird.

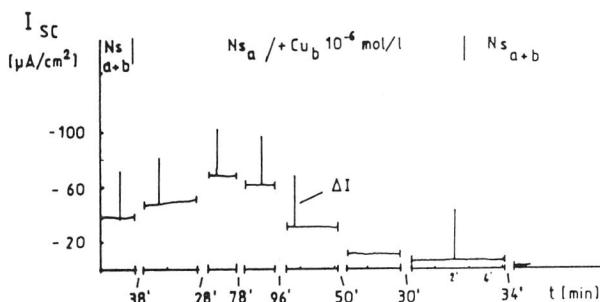


Abb. 11: Unter Einfluß von  $10^{-6}$  mol/l  $\text{Cu}_b$  zeigt sich ebenfalls die starke Reduktion des  $-I_{SC}$ , wiederum deutlich zeitabhängig und unterscheidet sich nicht von der Wirkung durch  $\text{Cd}_b$ . Der Vorgang bleibt irreversibel, wenn mit Normalsaline gespült wird (5 mV-Impulse ® D I).

Irreversible Effekte mit Cu auf die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sind aus elektrophysiologischen Untersuchungen an Kiemen der "sea flounder" *Platichthys flesus* [29] bekannt, ebenso für gereinigte ATPase von Süßwasserfischen [30] und für die "rainbow trouts" *Oncorhynchus mykiss* [31].

Interessanterweise scheint nur Cu auch von der apikalen Seite des Epithels inhibitorisch auf die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase einzuwirken (Abb. 12). Dies könnte mit einer erhöhten Permeabilität der apikalen Seite (Cuticula, subcuticulärer Raum und apikale Membran) für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, im Vgl. zu Cd erklärt werden, da Cu offenbar für die Hämocyaninsynthese essentiell ist. Eine unterschiedliche Permeabilität für Ionen ist bereits aus Untersuchungen der Cuticula der Kiemenepithelien bei Crustaceen bekannt [32].

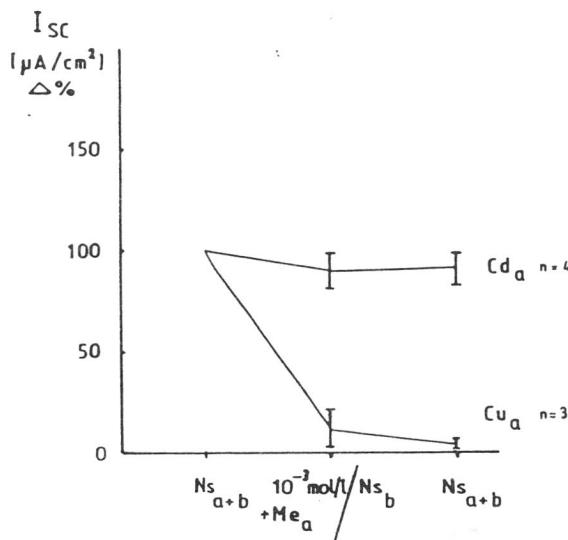


Abb. 12: Unter Einfluß von  $\text{Cd}_a$  bzw.  $\text{Cu}_a$  mit  $10^{-3}$  mol/l, von der apikalen Seite appliziert, treten verschiedene Effekte auf.  $\text{Cd}_a$  wirkt sehr schwach, nur initial und nicht signifikant. Unter Einfluß von  $\text{Cu}_a$  wird dagegen der  $\text{I}_{\text{sc}}$  deutlich und irreversibel gegen 0 reduziert (mit  $\sim 93\%$ ,  $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ).

Verschiedene Untersuchungen haben bereits gezeigt, daß Crustaceen bzw. deren Organe sehr sensibel gegenüber Schwermetallen reagieren können. Daß zweiwertige Schwermetallionen mit den S-S und SH - Gruppen der Proteine interagieren bzw. Bindungen eingehen ist bekannt und wird auch aufgrund von histochemisch-biochemischen Ergebnissen am Kiemenepithel von *Astacus astacus* [33] beschrieben.

Die Konformationsveränderung der durch Schwermetallionen beladenen Proteine, im speziellen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, könnte als allosterischer Effekt die Irreversibilität bei Ausspülversuchen der Schwermetalle am Epithel erklären.

Anzumerken bleibt, die Wirkung von Cd auch auf die Carboanhydratase (CA), als bekanntes stark aktives Enzym, das für die pH-Regulation verantwortlich zu sein scheint, ist zunächst nicht auszuschließen. Aber die Lokalisation dieses Enzyms ist nicht sicher und die Inhibition mit Acetazolamid (Diamox), ein spezifischer Inhibitor der CA, zeigt eine völlig andere Inhibitionskinetik, auch im Zeitverlauf des  $-I_{sc}$  [12].

Schwach beladene Proteine - hier die essentiell wirksame  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase scheinen bereits bei niedrigen Konzentrationen von Cd in ihrer Funktion auszufallen. Der irreversible Effekt wird wahrscheinlich exakt an dem Punkt eintreten, bei dem mehr Proteine funktionell inhibiert werden als neue über die Proteinbiosynthese im Membrantransfer zur Epithelregeneration von der jeweiligen Epithelzelle bereitgestellt werden können (steady-state-Problem). Dabei ist zu beachten, daß in Folge der Epithelschädigung auch Organschädigungen mit entsprechenden Folgen für den Gesamtorganismus (Homöostase) zu erwarten sind. Damit liegt die Bewertung von Schadstoffwirkungen aus Sicht der Prävention nicht bei der Reaktivität des Gesamtorganismus, sondern bereits bei der Belastungsgrenze lebenserhaltender Epithel- und Organfunktionen, die in diesen Experimenten geeignet untersucht werden können. Im Hinblick auf die ökotoxikologische Forschung und die Bemessung von Toxizitäten sollte diesem Aspekt zukünftig vielleicht besondere Beachtung geschenkt werden.

Cd aber auch Cu sind bereits aus den Untersuchungen/Berichten des Umweltbundesamtes [34, 35] als Schadstofffaktoren bekannt, die in den Flüssen sowie in der Nordsee relativ hochkonzentriert auftreten. Ein negativer Einfluß auf die Umwelt, im speziellen auf die ökologischen Gleichgewichte, kann als gesichert gelten. Ob die bestehenden Normen bzw. Grenzwertfestlegungen für derartige Wirkfaktoren auch zukünftiger Bewertung standhalten, wird weiterhin hinterfragt werden müssen.

Die Wirkung von Cd und Cu - bereits in sehr niedrigen Konzentrationen - auf die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (als ein besonders häufig auftretendes Enzym), ist mit diesen Versuchen bereits deutlich abzuleiten und wird neben anderen Schadstoffanalysen weiterhin Gegenstand dieser Forschung sein, wofür sehr verschiedene Epithelien untersuchungstechnisch als geeignet erscheinen (Tab. 1).

Tab. 1: Das bisherige Spektrum der Untersuchungen mit der symmetrischen und vertikalen Ionen-Transportkammer. Es können sehr kleine Epithelflächen mit  $\leq 0,5$  mm Ø untersucht werden [3]

Meßtechnik →	Parameter		Wirkstoffe /Effekte	Bedingung
präpartierte/untersuchte Objekte ↓	epitheliale Meßgrößen ISC, PD <sub>te</sub> , R <sub>te</sub> /G <sub>te</sub> current-noise-analysis <sub>+</sub>	pH-Messung (parallel)	Pharmaka Ouabain u.a. .... Metallionen Cadmium, Kupfer ....	getestet ohne (o), mit (m) Gradienten
<b>Cuticulae von Krabben</b>				
<i>E.sinensis</i> (Schwarz, Graszynski 1989, Schwarz 1990)	x		x	o
<i>Uca tangeri</i> (Schwarz, Graszynski 1989, Schwarz 1990)	x		x	o
<b>Kiemenepithelien von Krabben</b>				
<i>E.sinensis</i> (Schwarz, Graszynski 1989) (Schwarz 1990) (Schwarz 1991, 1992) (Schwarz, Müller. 1992) (Zeiske, Onken, Schwarz, Graszynski 1992) (Riestenpatt, Onken, Graszynski 1992)	x x x x x+ x	x x x x x	x x x x x	o/m o/m o/m o/m
<i>Uca tangeri</i> (Schwarz, Graszynski 1989)	x		x	o
<i>Carcinus maenas</i> (Onken, Siebers 1992 in prep.)	x		x	o
<b>Kiemenlamina vom Krebs</b>				
<i>Astacus leptodactylus</i> (Jammes, 1992 Dipl.) Schwarz 1991 in prep.)	x x		x x	o/m
<b>Opercularepithel beim Fisch</b>				
<i>Oreochromis mossambicus</i> (Kültz, 1992 Diss.)	x		x	o

## Literatur

1. SCHWARZ, H.-J., & MÜLLER, M.: Effects of cadmium on the osmoregulating epithelium of crab gills, a comparative physiological and ecotoxicological study. - Verh. Dtsch. Zool. Ges. 85, 1992, 40
2. SCHWARZ, H.-J.: Toxicological influences in the ecophysiological environment of crab gills induced by cadmium and copper - an electrophysiological investigation. - Intern. Sympos., 100 Years Biologische Anstalt Helgoland, 1992a, 192 -194
3. SCHWARZ, H.-J.: Ecotoxicological research on isolated epithelia by special ion transport chambers and voltage-clamp technique. - Intern. Sympos., 100 Years Biologische Anstalt Helgoland, 1992b, 164-196
4. KOCH, H. J., EVANS, J. & SCHICKS, E.: The active absorption of ions by the isolated gills of the crab *Eriocheir sinensis* (M. EDW.).- Med. Kla. d. Wentensch. J XVI, 5, 1954, 1-18
5. SMITH, D. S., & LINTON, J. R.: Potentiometric evidence for the active transport of sodium and chloride across excised gills of *Callinectes sapidus*.- Comp. Biochem. Physiol. Vol. 39A, 1971, 367-378
6. PEQUEUX, A. & GILLES, R.:  $\text{Na}^+/\text{NH}^+$  co-transport in isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to fresh water. - Experientia 34, 12, 1978, 1593-1594
7. PEQUEUX, A. & GILLES, R.:  $\text{Na}^+$  fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. - J. exp. Biol. 92, 1981, 173-186
8. SIEBERS, D., WINKLER, A., LUCU, C., THEDENS, G. & WEICHART, D.:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase generates an active transport potential in the gills of the hyperregulation shore crab *Carcinus maenas*.- Marine Biology 87, 1985, 185-192
9. GOCHA, N., PEQUEUX, A., WANSON, S. & GILLES, R.:  $\text{Cl}^-$  fluxes across isolated, perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* (M. Edw.) acclimated to fresh water. - Comp. Biochem. Physiol. Vol 88 A, No 3, 1987, 581-584
10. SCHWARZ, H.-J. & GRASZYNSKI, K.: Ion transport in crab gills: A new method using isolated half platelets of *Eriocheir* gills in an Ussing-type chamber. - Comp. Biochem. Physiol Vol 92 A, No 4., 1989a, 601-604
11. SCHWARZ, H.-J. & GRASZYNSKI, K.: Electrophysiological studies on isolated half-platelets of crab gills to investigate ion transport. Arch. int. Physiol. Biochim. 97, 1989b, C 45

12. SCHWARZ, H.-J.: Elektrophysiologische Untersuchungen des transepithelialen Natrium-Transportes isolierter, halbiertter Kiemenplättchen posteriorer Kiemen der Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis* und der Winkerkrabbe *Uca tangeri*. - Dep. Biol., Freie Universität Berlin, PhD-Thesis., 1990a, 1-136
13. SCHWARZ, H.-J.: Vorrichtung einer vertikalen Transportkammer. - Deutsches Patentamt, Offenlegungsschrift DE 40 20013 A1, G 01 N 33/15, 1990b, 1-6
14. SCHWARZ, H.-J. & GRASZYNSKI, K.: Characterization of the  $\text{Na}^+$  -transport from posterior gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* using the voltage-clamp-technique. - Verh. Dtsch. Zool. Ges. 83, 1990, 555-556
15. ZEISKE, W., ONKEN, H., SCHWARZ, H.-J. & GRASZYNSKI, K.: Invertebrate epithelial  $\text{Na}^+$  channels: amiloride-induced current-noise in crab gill. - Biochimica et Biophysica Acta 1105, 1992, 245-252
16. LUCU, C. & SIEBERS, D.: Linkage of  $\text{Cl}^-$  fluxes with ouabain sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -exchange through *Carcinus* gill epithelia. - Comp. Biochem. Physiol. Vol. 87 A, No. 3, 1987, 807-811
17. SIEBERS, D., BÖTTCHER, K., PETRAUSCH, G. & HAMANN, A.: Effects of some chloride blockers on potential differences and ion fluxes in isolated perfused gills of Shore crab *Carcinus maenas*.- Comp. Biochem. Physiol., Vol 97 A, No 1, 1990, 9-15
18. PEQUEUX, A. & GILLES, R.: The transepithelial potential difference of isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to fresh water.- Comp. Biochem. Physiol. Vol 89A, No 2, 1988, 163-172
19. GILLES, R., PEQUEUX, A. & BIANCHINI, A.: Physiological aspects of  $\text{NaCl}$  movements in the gills of the euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*, acclimated to fresh water.- Comp. Biochem. Physiol. Vol 90A, No 1, 1988, 201-207
20. ONKEN, H.: Elektrophysiologische Untersuchung zur transepithelialen  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme über die posterioren Kiemen der Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis*: Von der Untersuchung ganzer Kiemen zur Zellpunktions. - Dep. Biol., Freie Universität Berlin, PhD-Thesis, 1989, 1-174
21. KÜNKER, W.: Elektrophysiologische Untersuchungen zum Ionentransport über das Kiemeneipithel der Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis*. - Dep. Biol., Freie Universität Berlin, Dipl.-Thesis, 1988, 1-78
22. SCHWARZ, H.-J.: Influence of heavy metal ions on transport systems of osmoregulating crab gills from *Eriocheir sinensis* - electrophysiological study.- 13 th Conf. Comp. Physiol. Biochem. P. 7.10, 1991b, 266
23. SCHWARZ, H.-J.: The inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in posterior gills of *Eriocheir sinensis* induces a reduction of the  $\text{Cl}^-$ -ion transport, new data. - Verh. Dtsch. Zool. Ges. 85, 1992, 168

24. BARRA., J. A. & PEQUEUX, A. J. R.: Ultrastructural and biochemical localization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase in salttransporting gills of the Chinese crab.- 8 th Conf. Comp. Physiol. Environm. Adap., 1986, 21
25. SCHWARZ, H.-J.:  $\text{Na}^+$ -channels and  $\text{Cl}^-$  -stimulated  $\text{Na}^+$ -transport in crab gills of *Eriocheir sinensis*. - 13 th Conf., Comp. Physiol. Biochem. C 1.11, 1991a, 64
26. TUCKER, R. K. & MATTE, A.: In vitro effects of cadmium and lead on ATPases in the gill of the Rock Crab, *Cancer irroratus*.- Bull. Environm. Contam. Toxicol. 24, 1980, 847-852
27. DHAVAL, D. M., MASUREKAR, V. B. & GIRIDHAR, B. A.: Cadmium induced inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in tissues of crab *Scylla serrata* (Forskal). - Bull. Environm. Contam. Toxicol. 40, 1988, 759-763
28. RIEDEL, B. & CHRISTENSEN, G.: Effect of selected water toxicants and other chemicals upon Adenosine triphosphatase activity in vitro. - Bull Environm. Contam. Toxicol. 23, 1979, 365-368
29. STAGG, R.M. & SHUTTELWORTH, T.J.: The effects of copper on ionic regulation by the gills of the seawater-adapted flounder (*Platichthys flesus* L.). - J. Comp. Physiol., 149, 1982, 83-90
30. LOCK, R.A.C., LI, J. & WENDELAAR BONGA, S.E.: Research for aquacukluture: fundamental and applied aspects. - ESCPB, 13th Conf., C 7.4, 1991, 252
31. SOLA, F., MASONI, A. & ISAIA, J.: Copper effects on sodium transport systems in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Biochemical, physiological and morphological aspects. - ESCPB, 13th Conf., P.7.11, 1991, 267
32. LIGNON, J. M. & PEQUEUX, A.: Permeability properties of the cuticle and gill ion exchanges in decapod crustaceans. - In: Truchot, J.-P., & Lahlou, B. (Vol. Eds.), Animal Nutrition and transport processes, In: Kinne, R. K. H. et al., (Series Eds.), Comparative Physiology, Vol. 6, 1990, 15-27
33. MEYER, W., KRETSCHMER, M., HOFFMANN, A. & HARISCH, G.: Biochemical and histochemical observations on effects of low-level heavy metal load (Lead, Cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus* L. (Crustacea: Decapoda).- Ecotoxicol. Environm. Saf. 21, 1991, 137-156
34. Umweltbundesamt (Hrsg.): Daten zur Umwelt. - E. Schmidt, Berlin, 1990/91, 1-674
35. Umweltbundesamt (Hrsg.): Jahresbericht. - Hagedorn & Co GmbH Berlin, 1990, 1-294



## Autorenverzeichnis

1. **Blessing**, Brigitte, Dr.; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Kaiserin-Augusta-Anlagen 15-17, 56068 Koblenz
2. **Blübaum-Gronau**, Elke, Dr.; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Kaiserin-Augusta-Anlagen 15-17, 56068 Koblenz
3. **Borcherding**, Jost, Dr.; Außenstelle des Zoologischen Instituts der Universität zu Köln, 46459 Rees-Grietherbusch
4. **Fritz-Langen**, Heidi, Dr.; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Kaiserin-Augusta-Anlagen 15-17, 56068 Koblenz
5. **Gerhardt**, Volkmar, Dr.; Institut II - Festkörperphysik, Universität Regensburg, Universitätsstr. 31, 93040 Regensburg
6. **Gerresheim**, Ralf; Ingenieurgesellschaft für Analytische Messtechnik mbH, Bahnhofstr. 35a, 40764 Langenfeld
7. **Hansen**, Peter-Diedrich, Prof. Dr.; Technische Universität Berlin, FB 7 - Institut für Ökologie, Aquatische Ökotoxikologie, Goerzallee 253, 14167 Berlin
8. **Hansen**, Ulf-Peter, Prof. Dr.; Institut für angewandte Physik, Leibnizstr. 11, 24098 Kiel
9. **Hoffmann**, Michael; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Kaiserin-Augusta-Anlagen 15-17, 56068 Koblenz
10. **Hostert**, E.; OXYTEC Gesellschaft für Sauerstoffanalytik mbH, Universitätsstr. 142, 44799 Bochum
11. **Irmer**, Ulrich, Dr; Umweltbundesamt Berlin, Bismarckplatz 1, 14191 Berlin
12. **Knie**, Joachim, Dr.; Convenio FATMA/GOPA, Rua Felipe Schmidt, 485, 88010-001 Florianópolis SC, Brasilien
13. **Krebs**, Falk, Dr.; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Kaiserin-Augusta-Anlagen 15-17, 56068 Koblenz
14. **Lindner**, Sabine E.; Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 176, 53115 Bonn
15. **Löbbel**, H. J.; Technische Universität Berlin, FB 7 - Institut für Ökologie, Aquatische Ökotoxikologie, Goerzallee 253, 14167 Berlin

16. **Merschhemke**, Christof; Landesamt für Wasser und Abfall NW, Auf dem Draap 25, 40221 Düsseldorf
17. **Moldaenke**, Christian; Fa. BBE Moldaenke, Knooper Weg 49, 24103 Kiel
18. **Noack**, Udo, Dr.; Laboratorium für Angewandte Biologie, Richthofenstr. 29, 31137 Hildesheim
19. **Overmeyer**, S.; OXYTEC Gesellschaft für Sauerstoffanalytik mbH, Universitätsstr. 142, 44799 Bochum
20. **Peichl**, L., Dr.; Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, Postfach 81 01 29, 81901 München
21. **Pilz**, Ulrich; Dr., LAR Analytik & Umweltmeßtechnik GmbH, Tempelhofer 23-24, 10963 Berlin
22. **Putzger** J.; Institut II - Festkörperphysik, Universität Regensburg, Universitätsstr. 31, 93040 Regensburg
23. **Puzicha**, Heike; Landesamt für Wasserwirtschaft, Am Zollhafen 9, Mainz
24. **Schmitz**, Patricia, Dr.; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Kaiserin-Augusta-Anlagen 15-17, 56068 Koblenz
25. **Schnabl**, H., Dr.; Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 176, 53115 Bonn
26. **Schwarz**, H.-J., Dr.;, Institut für Bioökonomie, Umweltberatung, System- und Leistungsphysiologie, Alt-Moabit 43, 10555 Berlin
27. **Spieser**, O.H., Dr.; Bundesanstalt für Gewässerkunde, Kaiserin-Augusta-Anlagen 15-17, 56068 Koblenz
28. **Stein**, Peter; Technische Universität Berlin, FB 7 - Institut für Ökologie, Aquatische Ökotoxikologie, Goerzallee 253, 14167 Berlin
29. **Volpers**, Markus; Außenstelle des Zoologischen Instituts der Universität zu Köln, 46459 Rees-Grietherbusch
30. **Walter**, Jürgen, Dr.; Laboratorium für Angewandte Biologie, Richthofenstr. 29, 31137 Hildesheim

**Schriftenreihe des Vereins für  
Wasser-, Boden- und Lufthygiene e.V.**

Nr. 1*:	Stooff: Chemische und physikalisch-chemische Fragen der Wasserversorgung	
Nr. 2*:	Meinck: Englisch-deutsche und deutsch-englische Fachausdrücke aus dem Gebiete der Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung	
Nr. 3*:	Kisker: Die Überwachung der Grundstückskläranlagen	
Nr. 4*:	Kolkwitz: Ökologie der Saproben	
Nr. 5*:	Beger: Leitfaden der Trink- und Brauchwasserbiologie	
Nr. 6*:	Meinck/Stooff/Weldert/Kohlschütter: Industrie-Abwässer	
Nr. 7*:	Lüdemann: Die Giftwirkung des Mangans auf Fische, Krebse und Fischnährtiere	
Nr. 8:	Büsscher: Untersuchungen über den Aufwuchs in Wasserbecken und seine Bekämpfung mit Kupfersulfat .....	2,60 DM
Nr. 9:	Meinck/Thomaschek: Untersuchungen über den anaeroben Abbau von Viskoseschlamm .....	4,40 DM
Nr. 10:	Beyreis/Heller/Bursche: Beiträge zur Außenlufthygiene .....	9,60 DM
Nr. 11:	Steinkohlenflugasche .....	15,00 DM
Nr. 12*:	Bethge/Löbner/Nehls/Kettner/Lahmann: Außenlufthygiene. 1. Folge	
Nr. 13*:	Bethge/Büsscher/Zinkernagel/Löbner: Außenlufthygiene. 2. Folge	
Nr. 14a*:	Kruse: Einheitliche Anforderungen an die Trinkwasserbeschaffenheit und Untersuchungsverfahren in Europa	
Nr. 14b:	Einheitliche Anforderungen an die Beschaffenheit, Untersuchung und Beurteilung von Trinkwasser in Europa	8,60 DM
Nr. 15:	Löbner: Ergebnisse von Staubniederschlagsmessungen an verschiedenen Orten Deutschlands	2,00 DM
Nr. 16:	Naumann/Heller: Probleme der Verunreinigung von Grund- und Oberflächenwasser durch Mineralöle und Detergentien. Luftverunreinigung und Abhilfemaßnahmen .....	2,50 DM
Nr. 17:	Aurand/Delius/Schmier: Bestimmung der mit Niederschlag und Staub dem Boden zugeführten Radioaktivität (Tropfsammelverfahren) .....	4,00 DM
Nr. 18*:	Naumann: 60 Jahre Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene	

Nr. 19:	Abhandlungen aus dem Arbeitsgebiet des Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene .....	17,60 DM
Nr. 20:	Sattelmacher: Methämoglobinämie durch Nitrate im Trinkwasser .....	4,80 DM
Nr. 21:	Vorträge auf der Jahrestagung des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 1963 in Berlin .....	4,80 DM
Nr. 22:	Langer/Kettner: Vorträge auf der Jahrestagung des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 1964 in Köln .....	5,10 DM
Nr. 23:	Lahmann: Luftverunreinigung in den Vereinigten Staaten von Amerika .....	5,60 DM
Nr. 24*:	Mauch: Bestimmungsliteratur für Wasserorganismen in mitteleuropäischen Gebieten .....	
Nr. 25:	Lahmann/Morgenstern/Grupinski: Schwefeldioxid-Immissionen im Raum Mannheim/Ludwigshafen .....	6,80 DM
Nr. 26:	Kempf/Lüdemann/Pflaum: Verschmutzung der Gewässer durch motorischen Betrieb, insbesondere durch Außenbordmotoren .....	8,50 DM
Nr. 27:	Neuzeitliche Wasser-, Boden- und Lufthygiene .....	10,80 DM
Nr. 28:	Lahmann: Untersuchungen über Luftverunreinigungen durch den Kraftverkehr .....	13,40 DM
Nr. 29:	Heller/Kettner: Forschungsarbeiten über Blei in der Luft und in Staubniederschlägen .....	11,60 DM
Nr. 30:	Meteorologie und Lufthygiene .....	19,80 DM
Nr. 31*:	Die Desinfektion von Trinkwasser .....	
Nr. 32*:	Rattenbiologie und Rattenbekämpfung .....	
Nr. 33:	Beiträge aus dem Gebiet der Umwelthygiene .....	30,80 DM
Nr. 34*:	Gewässer und Pestizide. 1. Fachgespräch .....	
Nr. 35:	Kettner: Geruchsbelästigende Stoffe .....	15,00 DM
Nr. 36:	Durchlässigkeit von Lockersedimenten — Methodik und Kritik .....	9,20 DM
Nr. 37*:	Gewässer und Pflanzenschutzmittel. 2. Fachgespräch .....	
Nr. 38*:	Umweltschutz und öffentlicher Gesundheitsdienst .....	
Nr. 39:	Schadstoff-Normierung der Außenluft in der Sowjetunion — MIK-Werte und Schutzzonen 1972 .....	4,60 DM
Nr. 40:	Hygienisch-toxikologische Bewertung von Trinkwasser-inhaltsstoffen .....	21,50 DM
Nr. 41:	Lufthygiene 1974 .....	26,00 DM
Nr. 42:	Immissionssituation durch den Kraftverkehr in der Bundesrepublik Deutschland .....	70,00 DM
Nr. 43*:	Schwimmbadhygiene (vgl. Nr. 58) .....	

Nr. 44:	Zur Diskussion über das Abwasserabgabengesetz .....	18,00 DM
Nr. 45:	Siedlungshygiene und Stadtplanung .....	31,00 DM
Nr. 46:	Gewässer und Pflanzenschutzmittel. 3. Fachgespräch .....	32,00 DM
Nr. 47:	Dulson: Organisch-chemische Fremdstoffe in atmosphärischer Luft .....	28,00 DM
Nr. 48:	Chemisch-ökologische Untersuchungen über die Eutrophierung Berliner Gewässer unter besonderer Berücksichtigung der Phosphate und Borate .....	35,50 DM
Nr. 49*:	Lahmann/Prescher: Luftverunreinigungen in der Umgebung von Flughäfen .....	
Nr. 50:	Oetting: Hydrogeochemische Laboruntersuchungen an Bergmaterialien und einer Hochofenschlacke .....	43,20 DM
Nr. 51:	Gewässer und Pflanzenbehandlungsmittel IV. 4. Fachgespräch .....	28,50 DM
Nr. 52:	Aktuelle Fragen der Umwelthygiene .....	65,00 DM
Nr. 53*:	Luftqualität in Innenräumen .....	
Nr. 54:	Limnologische Beurteilungsgrundlagen der Wassergüte (Kolkwitz-Symposium) .....	12,50 DM
Nr. 55:	Atri: Schwermetalle und Wasserpflanzen .....	29,00 DM
Nr. 56:	Zellstoffabwasser und Umwelt .....	48,00 DM
Nr. 57*:	Gewässerschutz — Abwassergrenzwerte, Bioteste, Maßnahmen .....	
Nr. 58:	Schwimmabhygiene II .....	33,00 DM
Nr. 59:	Lufthygiene 1984 .....	48,00 DM
Nr. 60*:	Atri: Chlorierte Kohlenwasserstoffe in der Umwelt I .....	
Nr. 61:	Figge/Klahn/Koch: Chemische Stoffe in Ökosystemen .....	48,00 DM
Nr. 62:	Chemical Water and Wastewater Treatment .....	60,00 DM
Nr. 63:	Humanökologie — Umwelt-, Innenraum- und Siedlungs-hygiene .....	38,00 DM
Nr. 64:	Boden- und Grundwasserschutz .....	46,00 DM
Nr. 65:	Umwelthygiene für Ärzte und Naturwissenschaftler .....	78,00 DM
Nr. 66:	Atri: Chlorierte Kohlenwasserstoffe in der Umwelt II .....	65,00 DM
Nr. 67:	Luftverunreinigung durch Kraftfahrzeuge .....	48,00 DM
Nr. 68*:	Grundwasserbeeinflussung durch Pflanzenschutzmittel .....	
Nr. 69:	Smogepisoden .....	58,00 DM
Nr. 70:	Atri: Chlorierte Kohlenwasserstoffe in der Umwelt IV .....	76,00 DM
Nr. 71:	Haaranalyse in der Medizin und Umwelt .....	48,00 DM
Nr. 72:	Legionellen .....	40,00 DM
Nr. 73:	Atri: Nickel — Elemente in der aquatischen Umwelt I .....	54,00 DM

Nr. 74:	Schwermetalle in der Umwelt .....	54,00 DM
Nr. 75:	Atri: Arsen — Elemente in der aquatischen Umwelt II ..	44,00 DM
Nr. 76:	Grenzwerte und Risikobetrachtungen in der Umwelthygiene .....	34,00 DM
Nr. 77:	Landwirtschaftliche Klärschlammverwertung (noch nicht erschienen) .....	ca. 40,00 DM
Nr. 78:	Viren und Plasmide in der Umwelt .....	58,00 DM
Nr. 79:	Pflanzenschutzmittel und Grundwasser .....	78,00 DM
Nr. 80:	Biotechnologische In-situ-Sanierung kontaminiertener Standorte .....	58,00 DM
Nr. 81:	Zusatzstoffe für Trinkwasser .....	48,00 DM
Nr. 82:	Halogenkohlenwasserstoffe in Wasser und Boden .....	46,00 DM
Nr. 83:	Bartel/Bartocha/Grohmann/Seidel: Warmsprudelbecken .....	56,00 DM
Nr. 84:	Nerger: Leichtflüchtige Chlorkohlenwasserstoffe .....	45,00 DM
Nr. 85:	Marschner: Phytotoxizitätsuntersuchungen an Wildkräutern und einer Kulturpflanze (1992) .....	46,00 DM
Nr. 86:	Atri/Mezger: Zink — Elemente in der aquatischen Umwelt III (1992) .....	50,00 DM
Nr. 87:	Hazard: Information und Beteiligung bei Gesundheitsrisiken am Beispiel eines Radonmeßprogramms (1993)	35,00 DM
Nr. 88:	Lärm und Krankheit · Noise and Disease (1993) .....	70,00 DM
Nr. 89:	Biologische Testverfahren (1993) .....	82,00 DM
Nr. 90:	Boden- und Grundwasserverunreinigungen aus Punkt- und Flächenquellen (1993) .....	40,00 DM
Nr. 91:	Legionellen II (1993) .....	42,00 DM
Nr. 92:	Müller-Wegener u.a.: Pflanzenschutzmittelwirkungen auf Trinkwassertalsperren .....	52,00 DM
Nr. 93	Biomonitore in der Gewässerüberwachung .....	50,00 DM

Die genannten Veröffentlichungen können beim Gustav Fischer Verlag, Postfach 72 01 43, D-70577 Stuttgart-Hohenheim, bestellt werden. Vereinsmitglieder können die Veröffentlichungen beim Verein zu Vorzugspreisen erwerben.

Mit \* gekennzeichnete Nummern sind vergriffen.

Der gemeinnützige Verein fördert insbesondere die wissenschaftlichen Arbeiten des Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene.

Wer an Informationen über den Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene e.V. interessiert ist oder Mitglied dieses Vereins werden möchte, wende sich bitte direkt an den Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene e.V., Postfach 31 14 20, 10644 Berlin, Telefon (030) 2706 57 46.

ISBN 3-437-30786-X