



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie



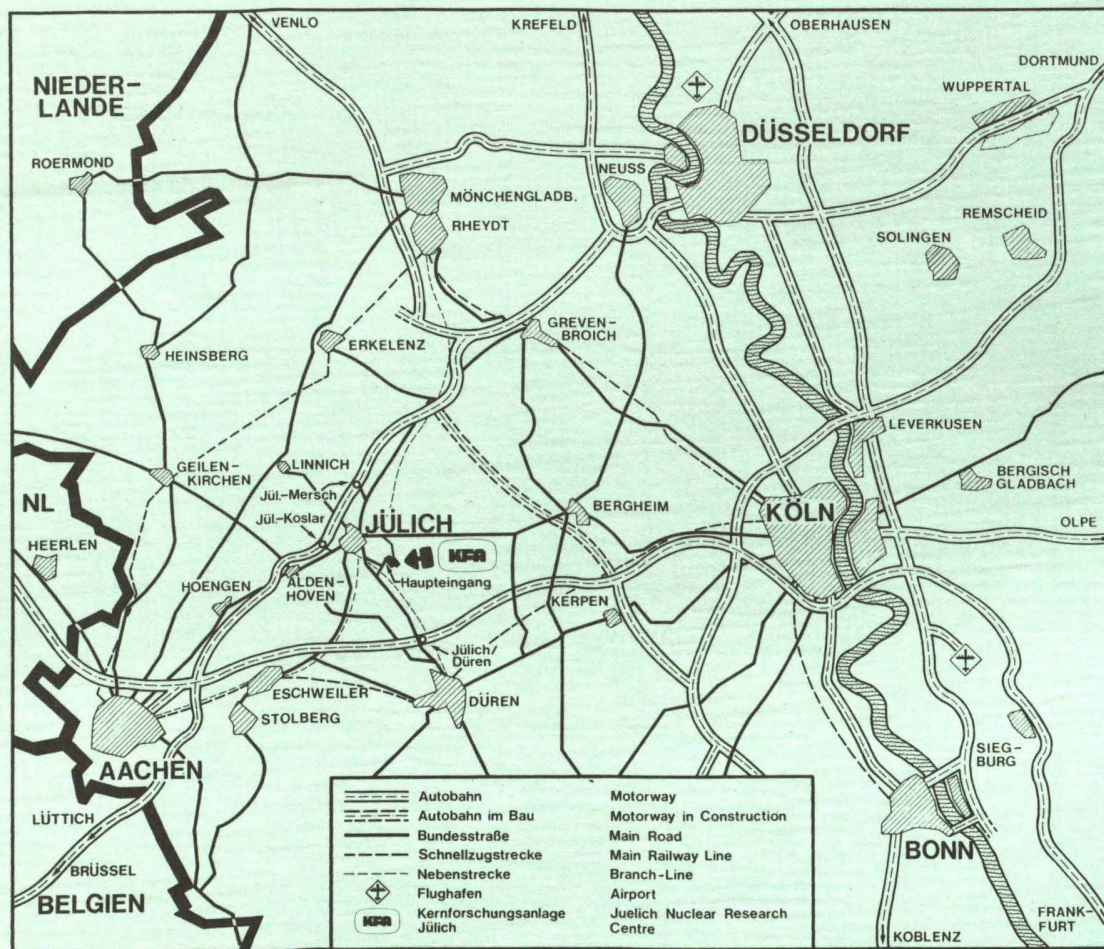
**Kontinuierliche Massenkultur
des planktischen Rotators
Brachionus Rubens**

Verschiedene Aspekte der Biologie und Physiologie
sowie Modellierung im Hinblick auf den Einsatz in
Aquakultur und Abwasserreinigung

von

M. Schlüter

Jül - 1959
November 1984
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1959

Institut für Biotechnologie Jül - 1959

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Kontinuierliche Massenkultur
des planktischen Rotators
Brachionus Rubens**

Verschiedene Aspekte der Biologie und Physiologie
sowie Modellierung im Hinblick auf den Einsatz in
Aquakultur und Abwasserreinigung

von

M. Schlüter

D 465 (Diss. Uni. Essen, GHS)

Rep 170987

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Morphologie und Ökologie von <i>Brachionus rubens</i></u>	5
2.1. <u>Morphologie und Systematik</u>	5
2.2. <u>Ökologie von <i>Brachionus rubens</i></u>	9
2.3. <u>Generationszyklus von <i>Brachionus rubens</i></u>	11
3. <u>Material und Methoden</u>	15
3.1. <u>Auswahl der Versuchsorganismen und Medien</u>	15
3.2. <u>Kultursysteme</u>	21
3.2.1. <u>Vorarbeiten</u>	21
3.2.2. <u>Beschreibung des Kultursystems</u>	22
3.3. <u>Analysen</u>	27
3.3.1. <u>Pigmentmessungen</u>	27
3.3.1.1. <u>Spektralphotometrische Chlorophyllbestimmung</u>	27
3.3.1.2. <u>Pigmentbestimmung mit der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)</u>	32
3.3.2. <u>Trockensubstanz, C-H-N-Analyse</u>	32
3.3.3. <u>Algenzellzahl und Extinktion</u>	33
3.3.4. <u>Bestimmung der Trockenmasse von <i>Brachionus rubens</i></u>	33
3.3.5. <u>Längenmessung von <i>Brachionus rubens</i></u>	34
3.3.6. <u>Rotatorienkonzentration</u>	34
3.3.7. <u>Algen und Fäzes</u>	35
3.3.8. <u>Gelöste Stickstoffverbindungen</u>	35
3.3.9. <u>Gelöster Kohlenstoff</u>	36
3.3.10. <u>Chemischer Sauerstoffbedarf, CSB</u>	36
3.3.11. <u>CO₂-Messung im Abgas der Kulturen</u>	36

3.4.	Mathematische Auswertungen	38
3.4.1.	Stoffbilanzen mit Hilfe der Matrixrechnung	38
3.4.2.	Statistische Auswertungen	39
3.4.3.	Erstellung von Stoffbilanzen	40
3.4.3.1.	Trockensubstanz	40
3.4.3.2.	Stickstoff	40
3.4.3.3.	Kohlenstoff	40
4.	<u>Ergebnisse</u>	41
4.1.	Untersuchungen zur Futteraufnahme und zur Populationsdynamik von <u>Brachionus rubens</u>	41
4.1.1.	Biomassekonzentration	41
4.1.1.1.	Rotatorienkonzentration	41
4.1.1.2.	Pigmentkonzentration	43
4.1.1.2.1.	Gesamtpigment	43
4.1.1.2.2.	Chlorophyll	43
4.1.1.2.3.	Phaeophytin	45
4.1.1.2.4.	Pigmentmessungen mit der HPLC	47
4.1.1.3.	Algenzellzahl	52
4.1.1.3.1.	Gesamtzellzahl	52
4.1.1.3.2.	Einzelzellen	52
4.1.2.	Respiration der Rotatorien	55
4.1.3.	Bestimmung von Freß- und Filtrationsraten	57
4.1.3.1.	Filtrationsrate	57
4.1.3.2.	Freßrate	57
4.1.3.3.	Abhängigkeit der Freß- und Filtrationsrate von der Algenkonzentration	59
4.1.4.	Populationsdynamik von <u>Brachionus rubens</u>	61
4.1.4.1.	Wachstum in der Rotatorienkultur	61
4.1.4.2.	Auswirkungen des Generationswechsels der Rotatorien auf die Vermehrungsraten in kontinuierlicher Kultur	62
4.1.4.3.	Nachweis einer homogenen Altersverteilung der Rotatorien anhand der Schlüpftrate	67
4.1.5.	Nachweis einer Abhängigkeit des Aufschlusses der Algen durch die Rotatorien von der Freßdauer	70

4.1.6.	Abschätzung des pH-Wertes im Verdauungstrakt von <u>Brachionus rubens</u>	72
4.2.	Fütterung von <u>Brachionus rubens</u> mit Albazod	75
4.2.1.	Aufbau des Versuchssystems	75
4.2.2.	Organismen	79
4.2.3.	Populationsdynamik	81
4.2.4.	Ablaufqualität	84
4.2.4.1.	CSB/TOC	84
4.2.4.2.	Stickstoff	85
4.3.	Einfluß von Rotatorien auf die Sukzession von Algenspezies in Algengräben	87
4.3.1.	Ernährung von <u>Brachionus rubens</u> mit der bestachelten Grünalge <u>Micractinium pusillum</u>	88
4.3.2.	Ernährung von <u>Brachionus rubens</u> mit einer Mischung von <u>Micractinium pusillum</u> und <u>Scenedesmus costatogranulatus</u>	92
4.4.	Versuche im 2-stufigen Algen-Rotatorien-Kultursystem	96
4.4.1.	Vergleich einer Stickstoff-limitierten mit einer Licht-limitierten 2-stufigen Nahrungskette	96
4.4.1.1.	Auswirkungen des unterschiedlichen N-Angebots auf das Wachstum der Algenkultur	96
4.4.1.1.1.	Stickstoff-limitiertes System	96
4.4.1.1.2.	Licht-limitiertes System	97
4.4.1.2.	Auswirkungen des unterschiedlichen Stickstoffangebots auf das Wachstum der Rotatorienkulturen	97
4.4.1.2.1.	Rotatorienkonzentration	97
4.4.1.2.2.	Ammoniumexkretion	100
4.4.1.3.	Gelöster organischer Kohlenstoff	102
4.4.1.4.	Berechnung der Futterverwertung der Rotatorien in beiden Kultursystemen	103
4.4.2.	Betrieb der Rotatorienstufe mit 2 und 4 Tagen Aufenthaltszeit	105
4.4.2.1.	Tierzahl, IS	105
4.4.2.2.	Pigmentkonzentration	105

4.4.2.3.	Stickstoffbilanz	106
4.4.2.4.	Kohlenstoffbilanz	107
4.4.3.	Betrieb des Kultursystems mit belichteter 2. Stufe	110
4.4.3.1.	Populationsdynamik und Stickstoffbilanz	110
4.4.3.2.	Trockensubstanz und Kohlenstoffbilanz	113
4.4.4.	Bestimmung des Auswaschpunktes der Rotatorienkultur und Modellierung der Steady-State Parameter als Funktion der Durchflußrate	113
4.4.4.1.	Populationsdynamik der Rotatorien	113
4.4.4.2.	Algenkonzentration	117
4.4.4.3.	NH_4^+ -Exkretion	118
4.4.4.4.	Produktion	119
4.4.4.5.	Futtermittelverwertung/Ertrag	120
4.4.4.6.	Berechnung des Erhaltungs-Stoffwechsels	124
4.4.4.7.	Berechnung der Substratsättigungskonstante	127
4.4.4.8.	Berechnung des Ertragskoeffizienten für Stickstoff	128
4.4.5.	Einsatz des 2-stufigen Chemostatensystems als empfindliches Biotestverfahren. - Ermittlung der NH_4^+ - NH_3 -Toxizität für <u>B. rubens</u>	132
4.4.5.1.	Methode	132
4.4.5.2.	Ergebnisse	134
4.4.5.2.1.	NH_4^+ -Toxizität bei pH 7,0 - 7,5	134
4.4.5.2.2.	Toxizität bei pH 8,0	139
4.4.5.2.3.	Toxizität bei pH 8,5	140
4.4.5.3.	Quantifizierung der pH-Abhängigkeit der NH_4^+ - Toxizität	141
4.5.	Versuche im einstufigen Chemostatensystem	143
4.5.1.	Beschreibung des Kultursystems	143
4.5.2.	Populationsdynamik	143
4.5.2.1.	Rotatorien	145
4.5.2.2.	Chlorophyll	147
4.5.3.	Bilanzierung von N und C während des 14-tägigen Steady States	148
4.5.3.1.	Stickstoffbilanz	148
4.5.3.2.	Kohlenstoffbilanz	149
4.5.3.2.1.	Ergebnisse	149
4.5.3.2.2.	Simulation	151

5.	<u>Diskussion</u>	154
5.1.	Wachstumslimitierung der Lichtmenge und Stickstoffangebot	154
5.1.1.	Algen	154
5.1.2.	Rotatorien	154
5.2.	Wachstumsraten von Rotatorien	160
5.3.	Futtermittelnutzung	161
5.4.	Nährstoff-Recycling	165
5.5.	Einstufiger Chemostat, Mischkultur	165
5.6.	Respiration	167
5.7.	Filtrations- und Freßraten	168
5.8.	NH₄⁺-Toxizität	168
5.9.	Versuche mit Schweinegülle	171
5.10.	<u>Micractinium</u>	171
6.	<u>Schlußbemerkung</u>	175
7.	<u>Zusammenfassung</u>	176
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	178
	Danksagung	194

Abkürzungen

C	Algenzellzahl (Zellen/ μ l)
Ch	Chlorophyllkonzentration (μ g/l)
D	Verdünnungsrate (l/h)
d	Tag
E	Eikonzentration (Eier/ml)
E ₂	Einzelzellen (Zellen/ μ l)
F	Filtrationsrate (μ l/Tier * h)
G	Gesamtpigment (μ g/l)
h	Stunde
J	Freßrate (Zellen/Tier * h)
K ₁	Assimilationskoeffizient = Produktion/Konsumption
K ₂	Produktionseffizienz = Produktion/Assimilation
l	Liter
ml	Milliliter
mmol	Millimol
nm	Nanometer
O	Ökologische Effizienz = Produktion/Futterangebot
P	Wahrscheinlichkeit
Ph	Phaeophytinkonzentration (μ g/l)
r	Korrelationskoeffizient
R	Respirationsrate (μ g CO ₂ /Tier * h)
sd	Standardabweichung
T	Temperatur (°C)
TD	Verdopplungszeit
TS	Trockensubstanz
Upm	Umdrehungen pro Minute
μ	Wachstumsrate
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
μ S	Mikrosiemens
X	Rotatorienkonzentration (Tiere/ml)
Y	Ertragskoeffizient (Yield)

1. Einleitung

Die Erbrütung von Fischlarven in Behältern und die möglichst verlustfreie, kontrollierte Anfütterung der Fischbrut gehören ebenso wie die Hypophysierung mehr und mehr zu den gängigen Arbeitsmethoden der modernen Fischwirtschaft. Dabei erweist sich das Bereitstellen des zur Anfütterung unbedingt benötigten lebenden Zooplanktons vielfach als ein Engpaß, der nicht ohne weiteres zu überwinden ist.

Vielfach wird heute daher versucht, künstliches oder konserviertes (tiefgefroren, lyophilisiert) Futter bei der Anfütterung von Fischbrut einzusetzen. Dieses eignet sich jedoch nicht für die Aufzucht empfindlicher Fisch- und Krebsbrut: Nach Grabner et al. (1981) denaturiert ein großer Teil der im natürlichen Futter enthaltenen und für die Tiere essentiellen Verdauungsenzyme durch die Konservierung oder wird in den ersten Minuten nach Auflösung im Wasser inaktiviert. Auf lebendes Futter kann in diesem Bereich der Aquakultur daher nicht verzichtet werden.

Die gewohnte Aufzucht der Fischbrut mit natürlichem Zooplankton in speziell vorbehandelten kleinen Teichen ist mit unerwünscht großen Risiken behaftet und liefert oft keine befriedigenden Ergebnisse. Dies liegt vor allem an der Abhängigkeit der Zooplanktonentwicklung von Jahreszeit und Witterung, was auch für das Abfiltrieren von Zooplankton (Daphnia usw.) aus Teichwasser gilt. Um jederzeit zu einem sicheren Zuchterfolg zu gelangen erscheint es notwendig, geeignetes Zooplankton unter standardisierten Bedingungen an Ort und Stelle zu produzieren. Dies ist im Bereich der marinen Aquakultur seit Jahren üblich (Kinne 1977).

Zu diesem Zweck wird das Rädertier Brachionus plicatilis eigens kultiviert, wofür man als Futter häufig Mikroalgen einsetzt (Ito 1960, Theilacker & McMaster 1961, Rothbard 1979). Diese sind jedoch derzeit zu teuer. Aus Kostengründen wurden daher Hefen sowie Mischungen aus Hefen und Algen verfüttert (James et al. 1981 a, b, 1983; Hirata et al. 1983; Yufera & Pasqual 1980). Die mit Hefen angezogenen Rotatorien sind aber als Futter für Fischbrut ungeeignet (Kitajima et al. 1979). Erst eine Anreicherung der Hefen mit für die Fischbrut essentiellen un-

gesättigten Fettsäuren (Kitajima et al. 1980, Imada et al. 1979, Watanabe et al. 1979) kompensiert diesen Effekt. Eine Fütterung der Rotatorien mit Trockenfutter führt zu ähnlich unbefriedigenden Überlebensraten der Fischbrut (Gatesoupe & Luquet 1981). Eine weitere Möglichkeit der Bereitstellung von Rotatorien, die Verwendung von Dauereiern, analog den Cysten bei Artemia salina (Sorgeloos et al. 1979), befindet sich bei Rotatorien noch im Versuchsstadium. Gezielte Induktion der Produktion von Dauereiern durch Salinitätsschocks gelang einer israelischen Arbeitsgruppe (Lubzens et al. 1980, Lubzens 1981, Ben Amotz & Fishler 1982).

Die bislang erwähnten Methoden zur Massenproduktion von Rotatorien bezogen sich ausschließlich auf marine Systeme. Über die Massenproduktion limnischer Rotatorien liegen nur einige Arbeiten russischer Autoren vor (Erman 1962, Semenyuk 1982, Vasil'eva 1980), obgleich es auch bei der Süßwasser-Aquakultur einen großen Bedarf an kleinem Zooplankton gibt (Bohl & Schlüter 1978).

Den Anstoß für unsere Arbeiten gab eine Zusammenarbeit unseres Institutes mit der Außenstelle der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung in Wielenbach, wo insbesondere für die Aufzucht von Gras- und Silberfischen Rotatorien benötigt wurden. Dabei dienten Algen, die unter definierten Bedingungen in mineralischer Nährlösung mit Kunstlicht angezogen wurden, als Futter. Wegen des hohen Energieaufwandes kommt dieses Verfahren für die fischereiliche Praxis aber nicht in Frage. Wir beschäftigen uns infolgedessen mit der Ausarbeitung einer billigeren Methode der Massenkultur von Rädertieren. Zu deren Ernährung verwendeten wir "Albazod", das komplexe Gemisch aus Algen, Bakterien, Zooplankton und Detritus, welches sich in abwasserbelasteten Algengräben, d.h. in kontinuierlich umgewälzten, flachen Algenteichen entwickelt (Groeneweg 1980, Soeder 1984). Wir kamen auf diese Weise zu einer Nahrungskette, bei der die Rotatorien als Nebenprodukt der Abwasserbehandlung anfallen. Dabei sparen die Rotatorien die ansonsten notwendige Abtrennung des Albazod von gereinigtem Wasser, indem sie ihre Filtrationsleistung als "biologische Erntemaschinen" nutzbringend einsetzen. Die Abtrennung des Albazod von gereinigtem Wasser ist sehr energieaufwendig (Middlebrooks et al. 1974; Mohn 1978, 1980; Beneman et al. 1980). Sie

wird als der wichtigste Problemfaktor für die gesamte photosynthetische Abwasserbehandlung angesehen. Das meiner Arbeit zugrundeliegende Verfahren ist deshalb auch beim Europäischen Patentamt und in einigen anderen Ländern (USA, Südafrika, Singapur) zum Patent angemeldet und erteilt worden (Groeneweg & Schlüter 1981b).

Um einige grundsätzliche Informationen über die Wachstumsleistung und den Stoffhaushalt des von uns untersuchten Rädertiers Brachionus rubens zu gewinnen, arbeitete ich zu Vergleichszwecken auch mit Rädertierkulturen, die mit Algen aus kontrolliert gezüchteten Reinkulturen gefüttert wurden. Eine kontinuierliche Betriebsweise der Kulturen ist der Batchkultur vorgezogen worden, weil die Erstellung von Massebilanzen wesentlich vereinfacht wird und diese Betriebsweise den Bedingungen im Freiland nahekommt.

Die Kultivierung von Rotatorien im Chemostaten geht auf Droop zurück, der dieses bereits 1969 auf einem Symposium auf Helgoland (Conover 1970) und 1975 in Ostende vorgeschlagen hat (Droop 1975). Er entwickelte die Theorie, daß sich diese Invertebraten im Chemostaten analog den Mikroorganismen verhalten. Die ersten Daten über die Durchführbarkeit eines solchen Systems stammen von seinem Mitarbeiter Scott (1977). Die erste detaillierte Analyse der 2-stufigen Nahrungskette erfolgte 1978 (Droop & Scott 1978, 1982; Scott 1980). Im Bereich der Aquakultur versuchte Trotta (1980) das Chemostatenprinzip im größeren Maßstab auf Rotatorien zu übertragen.

Im limnischen Bereich hat Boraas für Brachionus calyciflorus eine Reihe von Fließgleichgewichtparametern erarbeitet (Boraas 1980, 1983). Rothaupt (1982) hat ein ähnliches Modell zum Wachstum von Brachionus rubens im Chemostaten aufgestellt. Diese Autoren haben den Chemostaten benutzt, um Wachstumsraten und Ertragskoeffizienten der Rotatorien als Funktionen von Futterkonzentration und Durchflußrate zu beschreiben.

In der hier vorliegenden Arbeit ist ein diskontinuierliches, Verdünnungssystem benutzt worden, das eine Reihe technischer Schwierigkeiten beim Betrieb einer zweistufigen Chemostatenkette ausräumt, aber dennoch die Etablierung von Fließgleichgewichten ermöglicht, die analog zu "echten" Chemostatenkulturen interpretiert werden können.

Im Vordergrund der Untersuchungen stehen dabei folgende Problempunkte:

- Untersuchung von Respiration, Freß- und Filtrierraten, sowie der Populationsstruktur der Rotatorien in kontinuierlicher Kultur
- Verhalten der Rotatorienkulturen bei verschiedenen Durchflußraten, Erarbeitung der optimalen Betriebsparameter
- Bilanzierung des N + C-Flusses durch das Kultursystem, Bestimmung der Konversionseffizienzen und Quantifizierung der Sekundärverschnutzung
- Einfluß des Proteingehaltes der Algen auf Wachstum und Futterwertung der Rotatorenkulturen.
- Bestimmung der $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Toxizität für Rotatorien
- Einfluß von Rotatorien auf die Populationsdynamik der Algen im Algengraben
- Übertragung der Labordaten ins Freiland

2. Morphologie und Ökologie von Brachionus rubens

Für die Zooplanktonstufe wurde das Rädertier Brachionus rubens als Versuchsorganismus ausgewählt. Seine Biologie, d.h. Morphologie und Ökologie soll im folgenden kurz vorgestellt werden.

2.1. Morphologie und Systematik

Pylogenetisch lassen sich die Rotatorien als eigene Klasse dem Stamm der Aschelminthes zuordnen. Gemäß dem Bau ihrer Gonaden, es treten einfache und paarige Eierstöcke auf, kann die Klasse in zwei Überordnungen untergliedert werden. Die Monogonata stellen mit ca. 1600 Arten die meisten Vertreter der Rotatorien, so auch fast alle der pelagisch und semipelagisch lebenden Formen, während die Digononta die zumeist festsitzenden und kolonienbildenden Arten umfassen (Voigt & Koste 1978).

Der Bau von Rotatorien zeigt eine klare Gliederung in Kopf, Rumpf und Fuß (Foto 1). Der Kopf ist durch das Räderorgan gekennzeichnet. Dieser Wimpernkranz dient zum Heranstrudeln der Nahrung und der Fortbewegung. Viele Arten besitzen ein oder zwei Zerebralaugen und können phototaktisch reagieren. Die herbeigestrudelte Nahrung gelangt vom Räderorgan durch den Pharynx in einen Kaumagen, den Mastax. Er enthält Hartteile, die Trophi. Durch "kauende" Bewegungen des Mastax können Algenzellen aufgebrochen und für eine Verdauung im Magen und Darm aufgeschlossen werden. Am Fuß münden bei vielen Arten Klebdrüsen. Deren Sekret wird einerseits zur Befestigung der Eier am Panzer benutzt, andererseits ermöglicht es den Tieren, sich an ein Substrat anzuheften. Viele Arten, so auch die Gattung Brachionus, besitzen einen Kutikularpanzer aus einer starren Schicht Skleroproteinen. Häufig trägt der Panzer Fortsätze und Dornen, die einen gewissen Schutz der Tiere vor räuberischen Rotatorien und Copepoden bieten.

2.2. Ökologie von Brachionus rubens

Als Versuchsobjekt diente in meinen Experimenten, ein unter meinen Versuchsbedingungen sich amiktisch vermehrender Stamm von Brachionus rubens. In neuerer Zeit verlor dieser Ökotyp den Rang einer Art; er wird jetzt in der taxonomischen Literatur als Brachionus urceolaris var. rubens geführt (Ruttner-Kolisko 1972, Voigt & Koste 1978). Die Kultivierung von Brachionus rubens unter Laboratoriumsbedingungen bereitet wenig Schwierigkeiten, daher diente die Art schon als Versuchsobjekt bei Experimenten zur Populationsdynamik (Halbach 1969) und Physiologie (Pilarska 1977a-c) der Rotatorien.

Wie die meisten Arten der Gattung Brachionus lebt Brachionus rubens nicht pelagisch sondern semipelagisch im Litoral. Häufig kommt die Art in kleinen, organisch-belasteten und eutrophierten Teichen und Tümpeln sowohl im Süß- als auch im Brackwasser vor. Die Art ist thermophil und toleriert niedrige Sauerstoffpartialdrucke, sowie erhöhte NO_2 -Konzentrationen (Voigt & Koste 1978; s. Abb. 1a, b, c). Bei gemeinsamem Vorkommen mit Daphnia-Arten zeigt Brachionus rubens eine eigenartige Verhaltensweise. Er heftet sich mit seinem Fuß an den Carapax der Crustaceen und profitiert als Epök sowohl von deren Exkrementen, die von den Rotatorien noch verwertet werden können, als auch von der Schwimmfähigkeit der Daphnien. Die Weibchen von Brachionus rubens erreichen eine Panzerlänge von 150 - 290 μm , die Männchen maximal 140 μm .

Als Nahrung dienen nach Voigt & Koste (1978) kleine chlorococcale Grünalgen, Bakterien und Detritus.

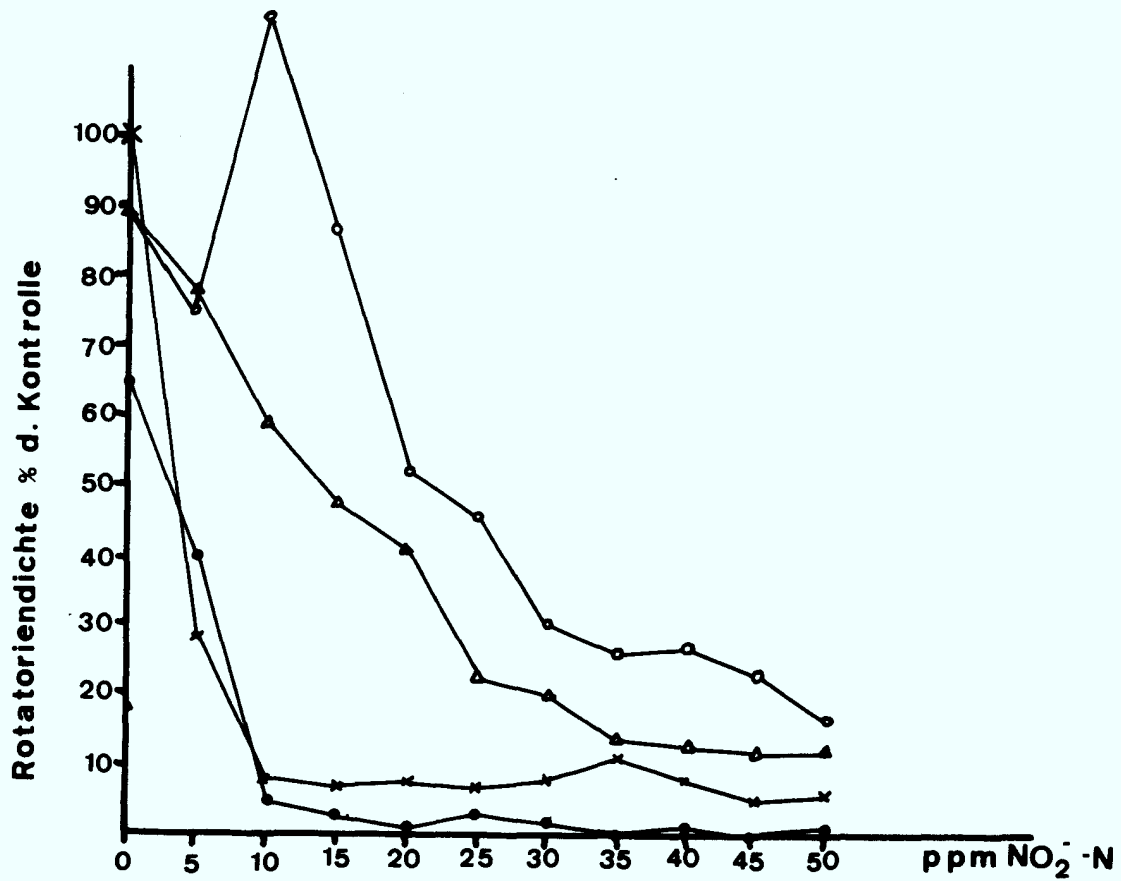


Abb. 1a: Abhängigkeit des Populationswachstums von Brachionus rubens von der Nitritkonzentration im Medium (aus Schlüter 1979).

- Serie 1: unadaptierte Tiere in Nitratmedium + NO₂⁻
- X Serie 2: unadaptierte Tiere in nitratfreiem Medium + NO₂⁻
- △ Serie 3: adaptierte Tiere in nitratfreiem Medium + NO₂⁻
- Serie 4: wie Serie 3.

Versuchsbedingungen:

Startkonzentration:	10 <u>Brachionus rubens</u> /ml
Versuchsdauer:	6 Tage
Algenkonzentration:	80 mg/l TS
Futteralge:	<u>Scenedesmus costato-granulatus</u>
Medium:	modifizierte N8

Die Versuche wurden in 300 ml Kulturröhren durchgeführt. Die Konzentration der Futteralgen in der Rotatorienkultur wurde täglich photometrisch bestimmt und je nach Bedarf ergänzt.

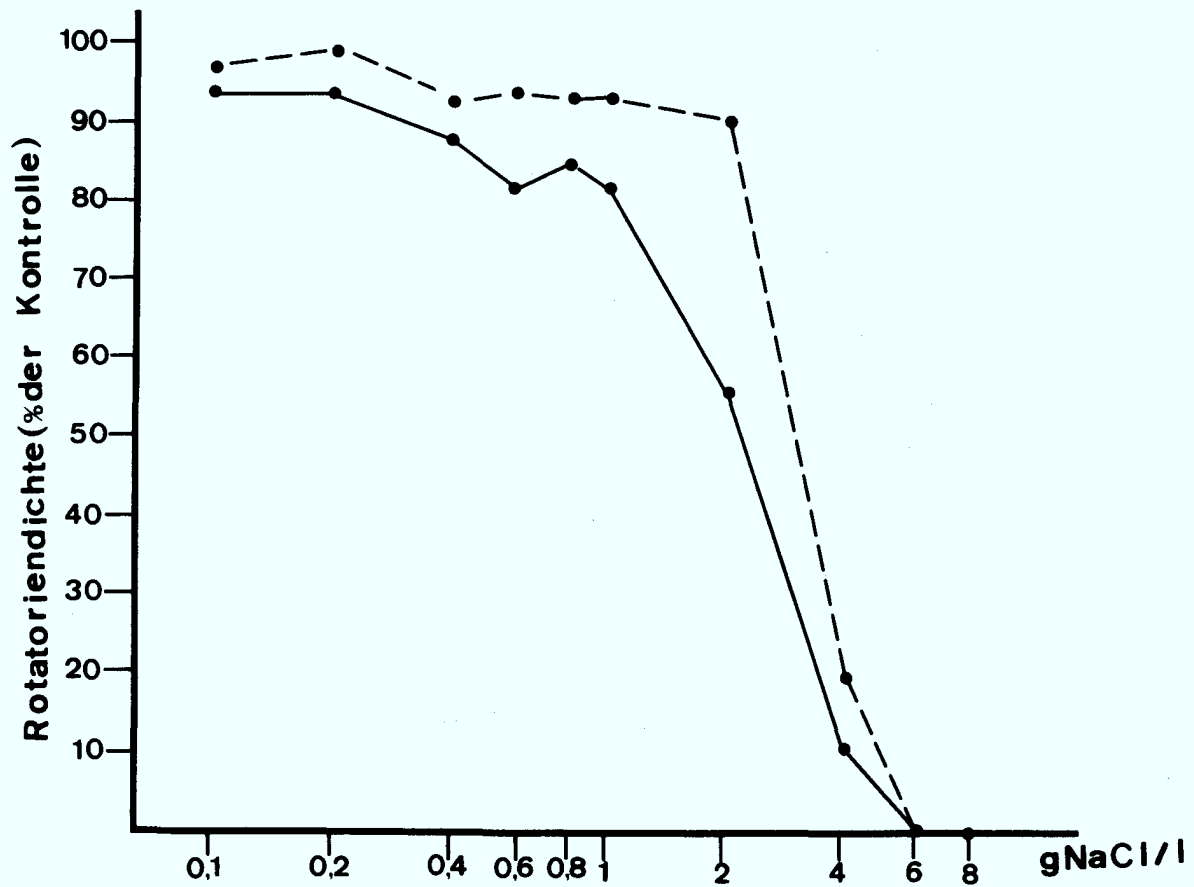


Abb. 1b: Abhängigkeit des Populationswachstums von Brachionus rubens von der Salzkonzentration im Medium (aus Schlüter 1979).
2 Parallelansätze, Versuchsbedingungen wie in Abb. 1a.

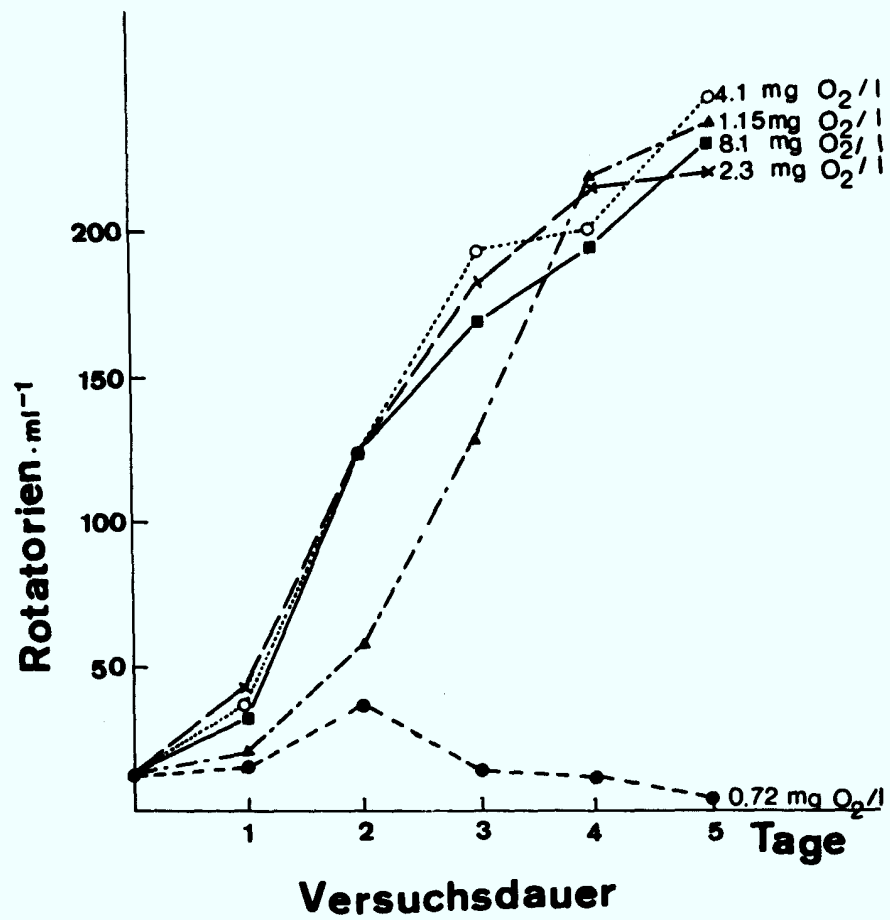


Abb. 1c: Abhängigkeit des Populationswachstums von Brachionus rubens von der Sauerstoffkonzentration im Medium (nach Schlüter 1979).

Versuchsbedingungen wie Abbildung 1a.

2.3. Generationszyklus von Brachionus rubens

Die Vermehrung von Brachionus rubens läuft nach einem für die meisten Rotatorien typischen Zyklus ab (Buchner et al. 1969, Ruttner-Kolisko 1972, Voigt & Koste 1978). Das Schema (Abb. 1d nach Koste & Voigt 1978) zeigt den Fortpflanzungszyklus von Brachionus leydigi, es gilt aber ebenso für Brachionus rubens. Kennzeichnend für diesen Zyklus ist das Auftreten amiktischer, sich parthenogenetisch vermehrender Weibchen. Diese Tiere legen ohne Befruchtung diploide Eier, die bis zum Schlüpfen der Jungtiere am Panzer angeheftet getragen werden (Foto 1). Durch plötzlichen Wechsel der Umweltbedingungen - die auslösenden Faktoren sind im einzelnen noch Gegenstand der derzeitigen Forschung (Buchner et al. 1969; Gilbert 1963, 1968, 1977; Hino 1977; Lubzens 1980; Pourriot 1957, 1967, 1980; Pourriot & Rougier 1977) - schlüpfen aus den Eiern amiktischer Weibchen miktische Weibchen. Äußerlich gleichen sie völlig ihren amiktischen Müttern, sie unterscheiden sich aber durch die Fähigkeit ihrer Oocyten zur Reduktionsteilung (Buchner et al. 1969).

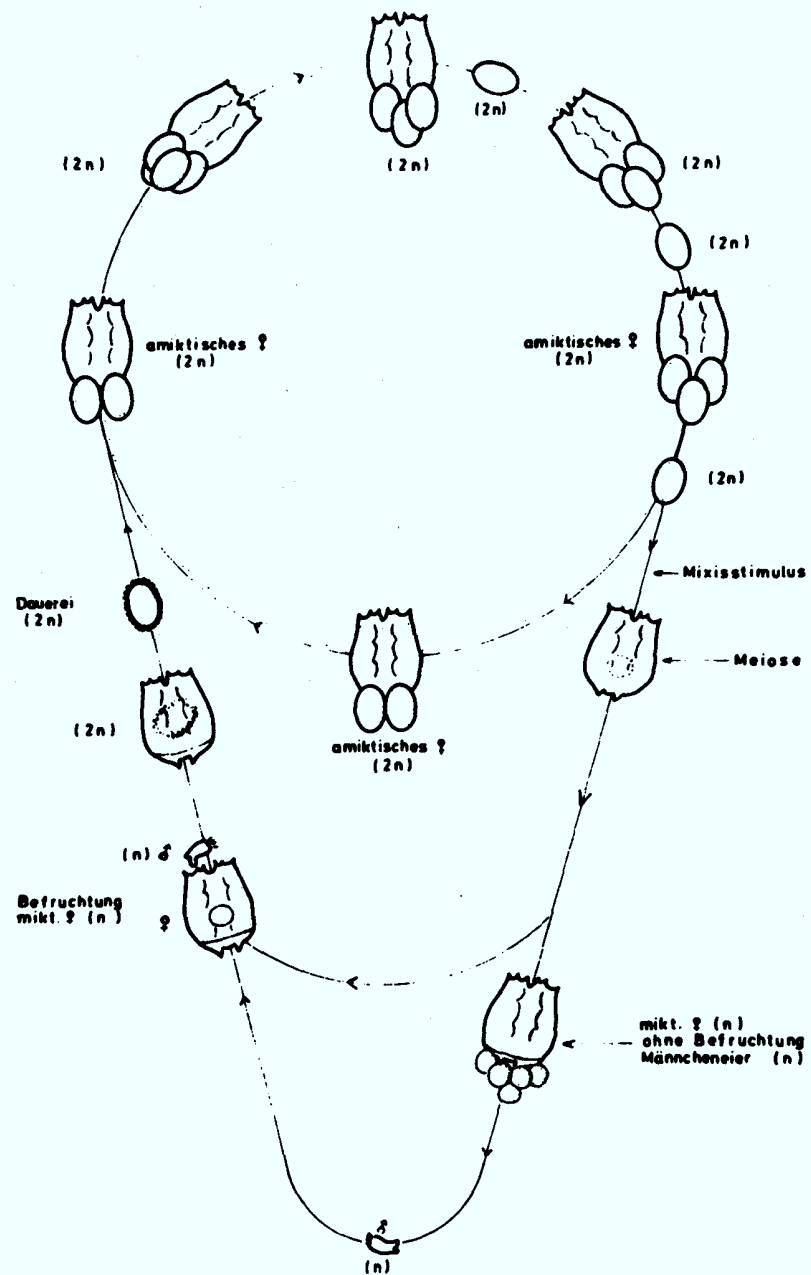


Abb. 1d: Fortpflanzungszyklus von *Brachionus* (aus Voigt & Koste 1978).

amiktische Fortpflanzung

miktische Fortpflanzung

Ohne Befruchtung entwickeln sich aus den Eiern miktischer Weibchen rudimentäre, haploide Männchen. Deren Lebensdauer beträgt nur wenige Stunden, ihr Magen-Darm-Trakt ist völlig reduziert, eine Nahrungsaufnahme daher unmöglich. Werden die miktischen Weibchen von den Männchen begattet, entstehen nach der Befruchtung hartschalige Dauereier, die ungünstige Umweltbedingungen wie Austrocknen oder Gefrieren lange Zeit überdauern können. Bei geeigneten Lebensbedingungen schlüpfen aus den Dauereiern wiederum amiktische Weibchen.

Bei Brachionus rubens treten daher zwei Generationen auf. Eine amiktische, deren parthenogenetische Vermehrung die Rotatorien befähigt, explosionsartig dichte Populationen aufzubauen, und eine miktische, deren Aufkommen durch Änderungen der Umweltbedingungen induziert wird und die der Art durch die Produktion von Dauereiern ein Überleben unter ungünstigen Bedingungen ermöglicht.

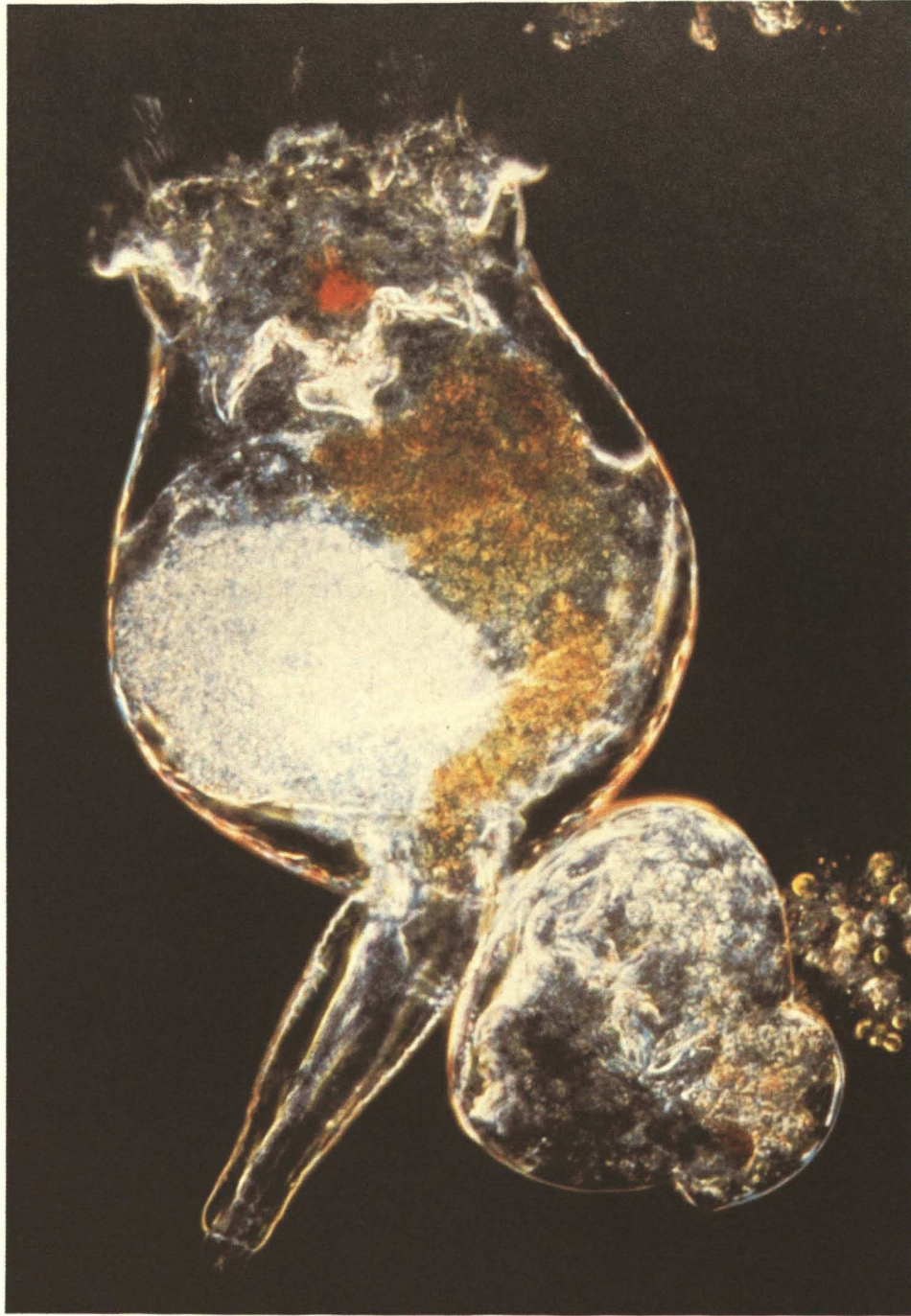


Foto 1: Brachionus rubens. Dunkelfeldaufnahme eines amiktischen Weibchens mit angeheftetem Ei. 100 μm .

3. Material und Methoden

3.1. Auswahl der Versuchsorganismen und Medien

Der verwendete Stamm von Brachionus rubens stammt aus einem Abwasserteich der Zuckerfabrik Pfeifer & Langen in Elsdorf. Durch Isolierung eines amiktischen Weibchens wurde aus der zunächst angelegten Anreicherungskultur ein Klon gewonnen, mit dem alle Laborversuche durchgeführt wurden.

Für die Versuche zur Kultur von Rotatorien im Ablauf eines mit Schweinegülle belasteten Algengrabens wurde ein anderer Stamm von Brachionus rubens benutzt. Er stammt aus dem Zoologischen Institut der Universität Frankfurt/M. und wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. U. Halbach zur Verfügung gestellt.

Als Futterorganismus für Brachionus diente die einzellige kokkale Chlorophyceae Scenedesmus costato-granulatus SKUJA, Stamm Heg. 73-351 (Foto 2).

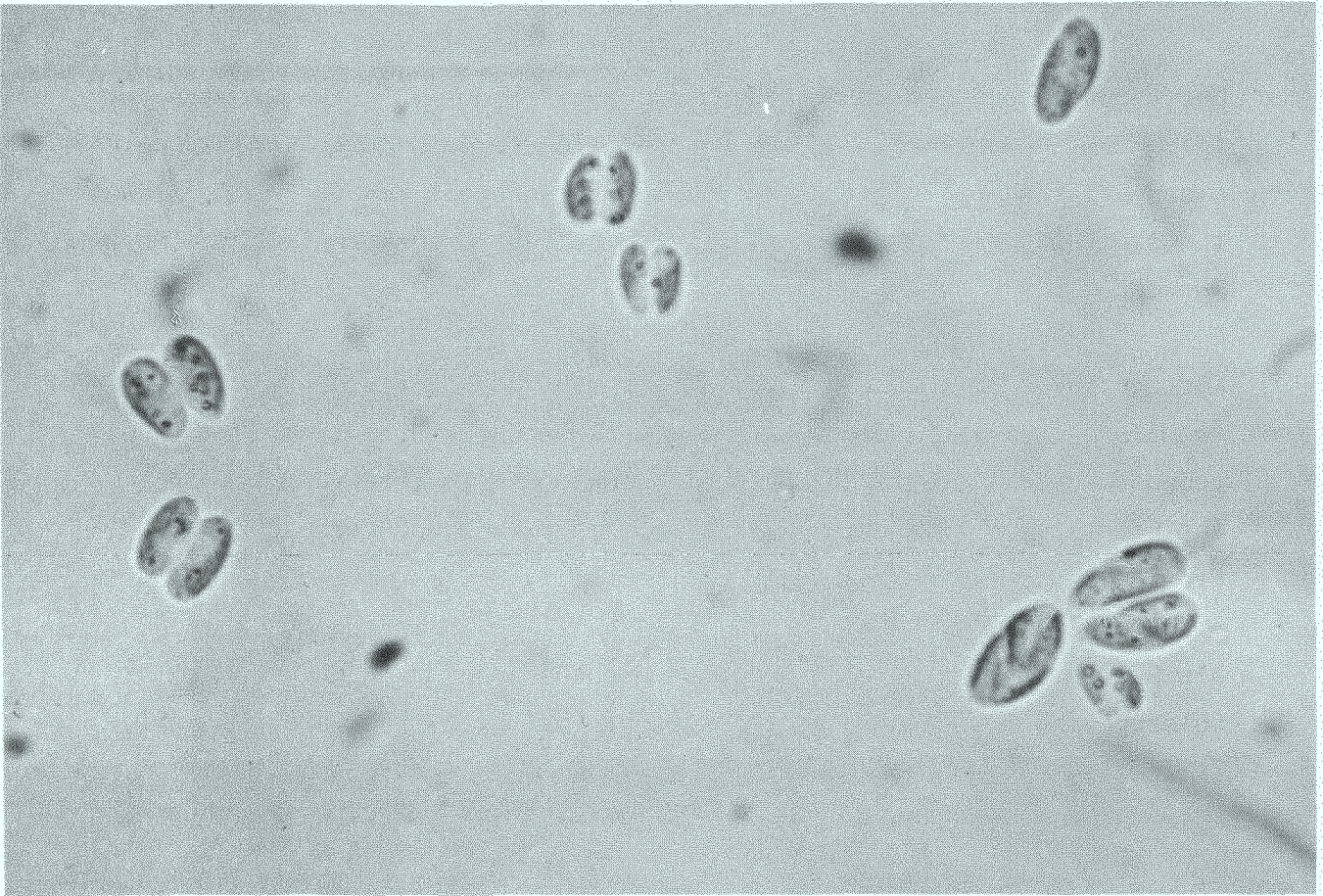


Foto 2: Scenedesmus costato-granulatus. Phasenkontrast, Ölimmersion

10 μm

Diese Alge bildet bis 8 μm messende zweizellige Coenobien und erwies sich in eigenen Versuchen (Schlüter, 1979) als ein sehr gut geeignetes Futter für Brachionus rubens (Abb. 2).

Außerdem wurde die borstentragende kokkale Grünalge Micractinium pusillum als Futter für Brachionus kultiviert. Beide Algenarten stammen aus der Algenstammsammlung des IBT-3.

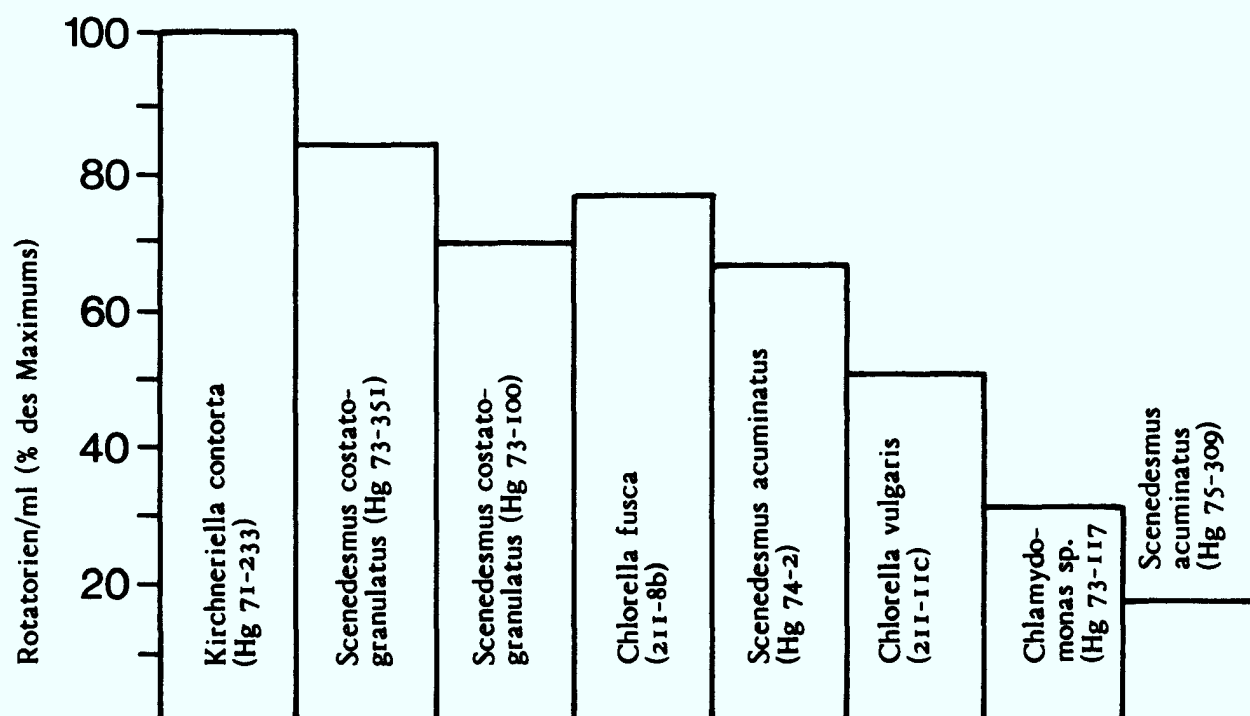


Abb. 2: Testung acht verschiedener Grünalgenstämme als Futter für Brachionus rubens (aus Schlüter 1979)

Versuchsbedingungen:

Startkonzentration: 10 Brachionus rubens/ml

Versuchsdauer: 6 Tage

Algenkonzentration: 80 mg/l TS

Medium: Rotatorienmedium nach Halbach & Halbach-Keup (1974)

Medien

Als Kulturmedium wurde in allen Versuchen ein definiertes anorganisches Medium benutzt. Auf eine organische Belastung wurde verzichtet, weil dann bereits in der 1. Reinigungsstufe, der Algen-Bakterien-Suspension, vielfältige Wechselwirkungen auftreten würden. Da Brachionus rubens nicht in den üblichen hochkonzentrierten Algennährlösungen kultiviert werden kann (Abb. 3; Schlüter 1979), wurde ein Medium entwickelt, das die Rotatorien nicht schädigt und dennoch ein ausreichendes Algenwachstum ermöglicht.

Dieses Medium (s. Tab. 1) stimmt im wesentlichen mit dem in früheren Versuchen benutzten überein (Schlüter, 1979). Lediglich die Stickstoffkonzentration wurde soweit vermindert, daß sie für die Algen im Chemo-
staten zum limitierenden Faktor wurde.

In den Versuchen mit lichtlimitierten Algenkulturen wurde eine höhere N-Konzentration eingesetzt. Die Konzentrationen der Nährstoffe Fe, Mg und S entsprachen den Angaben von Soeder (1980), die Spurenelementdosierung wurde dagegen von Payer und Trültzsch (1972) übernommen.

Das Medium wurde mit entionisiertem Wasser angesetzt; dessen Leitfähigkeit betrug maximal 1 μ S. Vor seiner Verwendung wurde es im Autoklaven bei 121 °C sterilisiert. Da die vorhandenen Ca^{2+} -Ionen bei diesen Temperaturen als Calciumphosphat präzipitieren, wurde das CaCl_2 getrennt autoklaviert und erst nach Abkühlen des Mediums zugegeben.

TABELLE 1: Zusammensetzung des Nährmediums

KNO_3	100 mg/l (N-limitierte Kulturen)
	250 mg/l (Lichtlimitierte Kulturen)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	104 mg/l
KH_2PO_4	296 mg/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	50 mg/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	25 mg/l
NaSiO_4	10 mg/l
Fe-EDTA-Lösung	2 ml/l
Spurenelementlösung	1 ml/l

Fe-EDTA-Stammlösung

$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	3,475 g/l
EDTA (Titriplex III)	4,650 g/l

Spurenelementlösung

$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	99	mg/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	6,3	mg/l
$\text{NiSO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	26,3	mg/l
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,81	mg/l
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	4,99	mg/l
$\text{Al}(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$	6,66	mg/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	1,76	mg/l
NH_4VO_3	2,91	mg/l
KJ	249	mg/l
KBr	238	mg/l
LiCl	8,48	mg/l
H_3BO_3	30,9	mg/l

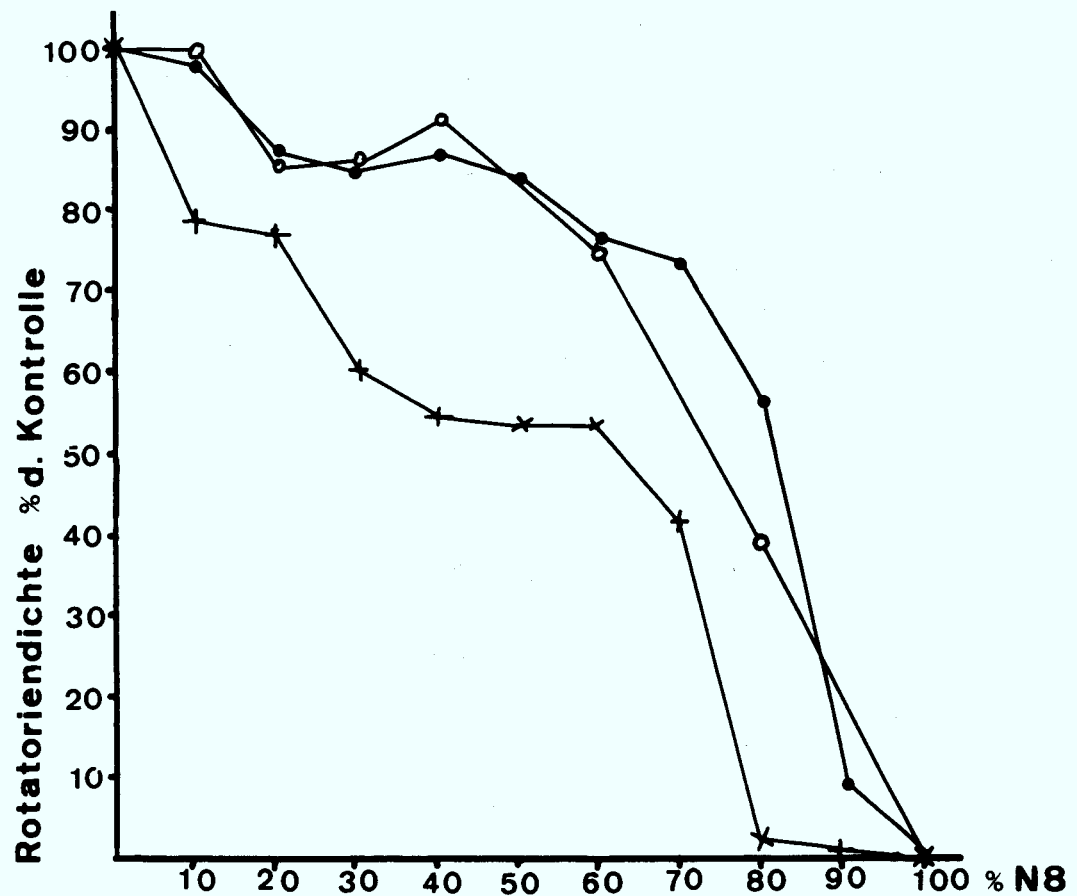


Abb. 3: Abhängigkeit des Populationswachstums von Brachionus rubens von der Konzentration der Algennährflösung N8 (Soeder 1967) (aus Schlüter 1979)

X N8 + Aqua-dest

● N8 + Rotatorienmedium

○ N8 + Rotatorienmedium

Versuchsbedingungen: siehe Abb. 2

Futteralge: Scenedesmus costato-granulatus

3.2. Kultursysteme

3.2.1. Vorarbeiten

Zur Bilanzierung des Stoffhaushaltes der zweistufigen Nahrungskette sollte zur Anzucht der Algen ein Chemostat eingesetzt werden. Nur dieser gewährleistet eine genügende Homogenität an Biomasse und gelösten Verbindungen in der Algenstufe. Eine Batch-Kultur verwirklicht diese Forderung nicht, da sich die Ernährungsbedingungen für die Algen - und damit auch ihr physiologischer Zustand und ihre chemische Zusammensetzung - mit der Algendichte (Lichtgenuß und Nährstoffangebot) ändern.

Die Rotatorienkultur wurde zunächst kontinuierlich gefüttert. Dieses Verfahren führte jedoch wegen einiger technischer Mängel nicht zu stabilen Betriebszuständen. Das geringe Kulturvolumen von 300 ml und die lange Aufenthaltszeit von 4 Tagen in der zweiten Stufe erforderten eine extrem kleine Pumprate (3 ml/h). Trotz der Verwendung dünner Schläuche ($\varnothing = 1,5$ mm) reichte die Durchflußgeschwindigkeit nicht aus, um das Absetzen der Algen im Schlauchsystem zu verhindern; eine exakte Zudosierung der Algen war nicht möglich. Die Verwendung größerer Kulturgefäße für die Rotatorienkultur (> 2 l) war wegen der dann erforderlichen Vergrößerung der Algenkultur technisch nicht realisierbar.

Daher wurde eine semikontinuierliche Betriebsweise gewählt. Dies eliminierte die bei kontinuierlicher Algenzufuhr aufgetretenen Nachteile. Außerdem erreichte hier die Konzentration der Futteralgen im Ablauf deutlich niedrigere Werte als bei kontinuierlicher Betriebsweise.

Eine weitere Forderung an das System war die Möglichkeit zur Automation. Nur sie ermöglicht es in einer kurzen Zeitspanne gleichzeitig mehrere Kulturen zu verdünnen, Proben zu nehmen und zu verarbeiten.

Ausgehend von diesen Voraussetzungen und Erfahrungen verwandte ich etwa ein Jahr darauf, ein neuartiges, zweistufiges Algen-Rotatorien-Kultursystem im Labormaßstab zu entwickeln und zu optimieren. Es besteht aus einer kontinuierlich betriebenen Algenstufe und einer Rotatorienstufe mit periodischer, diskontinuierlicher, pneumatisch gesteuerter

Verdünnung.

3.2.2. Beschreibung des Kultursystems

Die Durchflußraten der Algen- und auch der Rotatorienkultur waren vollständig entkoppelt (Abb. 4). Der Algenchemostat bestand aus einer verdunkelten Medienvorratsflasche mit 10 l Inhalt (1), einer Dosierpumpe (Hubpumpe Fe 211 von Braun Melsungen) (5), einer Pipette zur Messung der Durchflußrate (8), Überlauf (2) und Probennehmer (13). Als Kulturgefäß wurde ein Rührkesselfermenter "Magnaferm" der Firma Biotronic mit einem Nutzvolumen von 5 l eingesetzt (11). Er wurde mit einem Ring von Leuchtstofflampen (Philips TLD 8 W) beleuchtet (Foto 3).

Der Fermenter konnte im Autoklaven sterilisiert werden. Die Verbindungen zu Vorrats- und Auffangflasche sowie zur Rotatorienkultur bestanden aus Teflon-Schläuchen (ID = 1,5 mm). Dieser geringe Durchmesser wurde gewählt, um das Totvolumen in Schläuchen und Glasrohren möglichst gering zu halten. Zur Herstellung dieser Verbindungen an Ort und Stelle wurden Schnellkupplungen entwickelt, die einen infektionsfreien Anschluß ermöglichten.

Zur Kultivierung der Rotatorien dienten eine verdunkelte Kulturröhre von 300 ml Inhalt (Groeneweg und Soeder, 1978) mit Probennehmer und Überlauf (Foto 4).

Die Dosierung der Futteralgen erfolgte mit zwei getrennten Systemen, einer Abpumpeinheit und einer Zudosiereinheit, die über je ein Magnetventil mit Hilfe einer Schaltuhr gesteuert wurden.

- Abpumpen

In Ruhestellung entweicht die zur Sauerstoffversorgung und Turbulenzerzeugung in die Rotatorienkultur eingelassene Luft (19) über den Luftauslaß (3) und das geöffnete Magnetventil (15). Schließt die Schaltuhr dieses Ventil, so drückt der im Kulturgefäß entstehende Überdruck die Kulturflüssigkeit mit Algen und Rotatorien in den Überlauf. Die Überlaufmenge wird über ein Glasrohr (2 mm innerer Durchmesser) reguliert, das so justiert ist, daß exakt 75 ml der Kultur abgepumpt werden. Nach

15 Minuten öffnet die Schaltuhr (10) das Magnetventil (15), und die Luft entweicht wieder über das Abluftfilter (3). Jetzt kann zudosiert werden.

- Zudosieren

Die zweite Uhr (16) schaltet ebenfalls ein Magnetventil (15). In Ruhestellung ist es geöffnet und Luft (19) wird in die Algenkultur geblasen und über die Schlauchpumpe (6) in die Rotatorienkultur gepumpt. Sobald das Ventil (15) schließt, saugt die Pumpe Algensuspension aus der Kultur an und füllt in 15 Minuten die Rotatorienkultur wieder auf 300 ml auf. Über die Vier-Kanal-Schlauchpumpe können drei Rotatorienkulturen gleichzeitig aus einer Algenkultur mit Futter versorgt werden. Die Verwendung unterschiedlicher Pumpenschläuche ermöglicht eine Variation der Durchflußrate in den Parallelansätzen.

Die Parallelansätze sind notwendig, da der Reproduzierbarkeit der Daten in einem so komplexen biologischen System Grenzen gesetzt sind und zur statistischen Absicherung der Ergebnisse eine große Zahl von unabhängigen Meßdaten benötigt wird.

Auch der hohe Zeitaufwand, den solche Arbeiten erfordern, wird hier deutlich. Zur sicheren Beurteilung der Auswirkungen einer Veränderung von nur einem Parameter (z.B. einer technischen Verbesserung der Apparatur) wird wegen der langen Aufenthaltszeit und den Oszillationen der Individuendichte mindestens ein Monat benötigt.

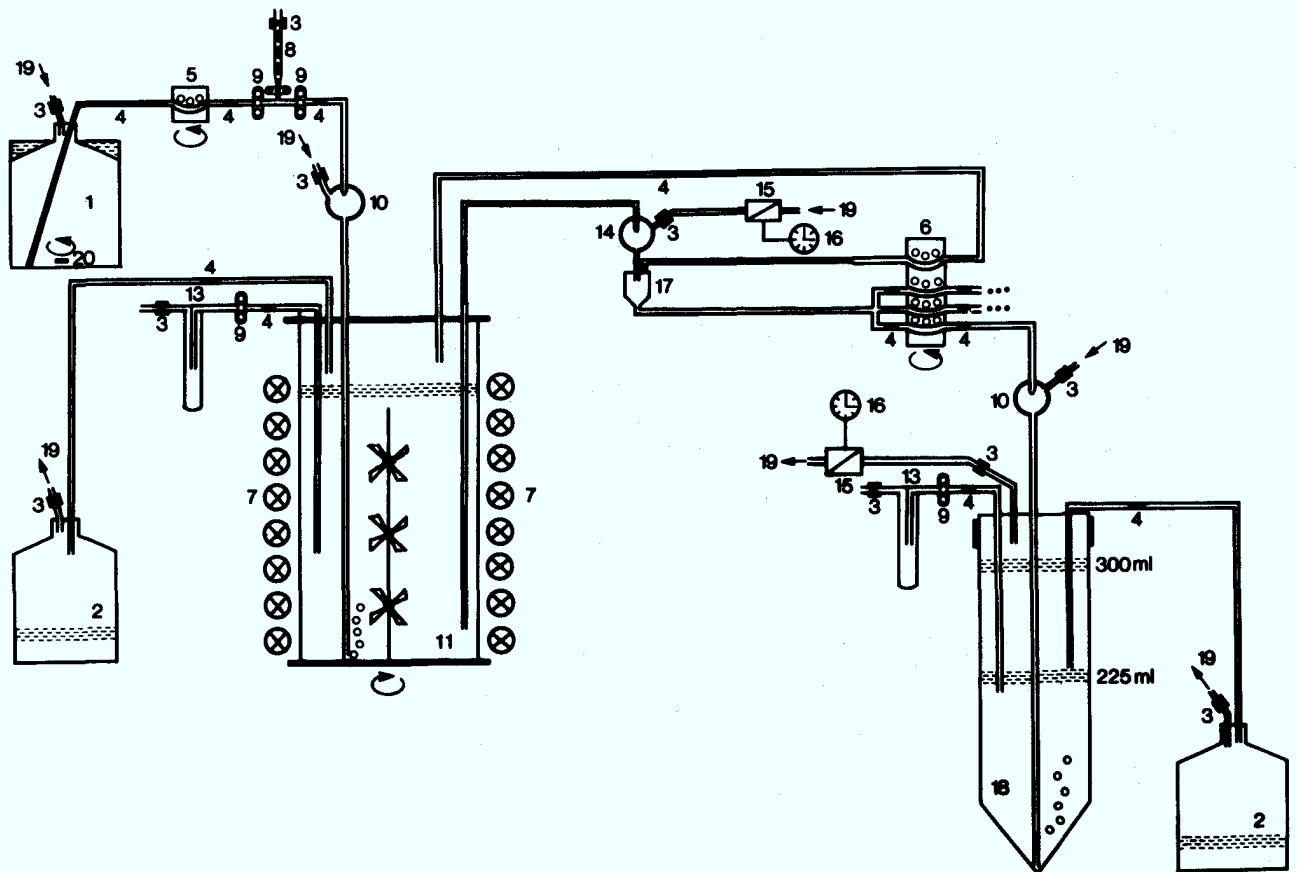


Abb. 4: Zweistufige Algen-Rotatorien-Freßkette mit kontinuierlich betriebener Algenstufe und diskontinuierlicher, automatisierter Fütterung und Verdünnung der Rotatorienkultur.

- | | |
|---|--|
| 1. Nährlösungsflasche, verdunkelt | 11. Fermentergefäß (5 l) zur Algenkultur |
| 2. Auffangflasche für Überlauf | 12. Rührer |
| 3. Luftsterilfilter | 13. Probennehmer |
| 4. Schnellkupplungen | 14. Puffergefäß |
| 5. Schlauchpumpe | 15. Magnetventil |
| 6. Vierkanalschlauchpumpe | 16. Zeitschaltuhr |
| 7. Leuchtstofflampen | 17. Luftblasenabscheider |
| 8. Pipette zur Bestimmung der Durchflußrate | 18. Rotatorienkultur |
| 9. Schlauchklemmen | 19. Luft Ein- bzw. Auslaß |
| 10. Tropfenfänger | 20. Magnetührstäbchen |

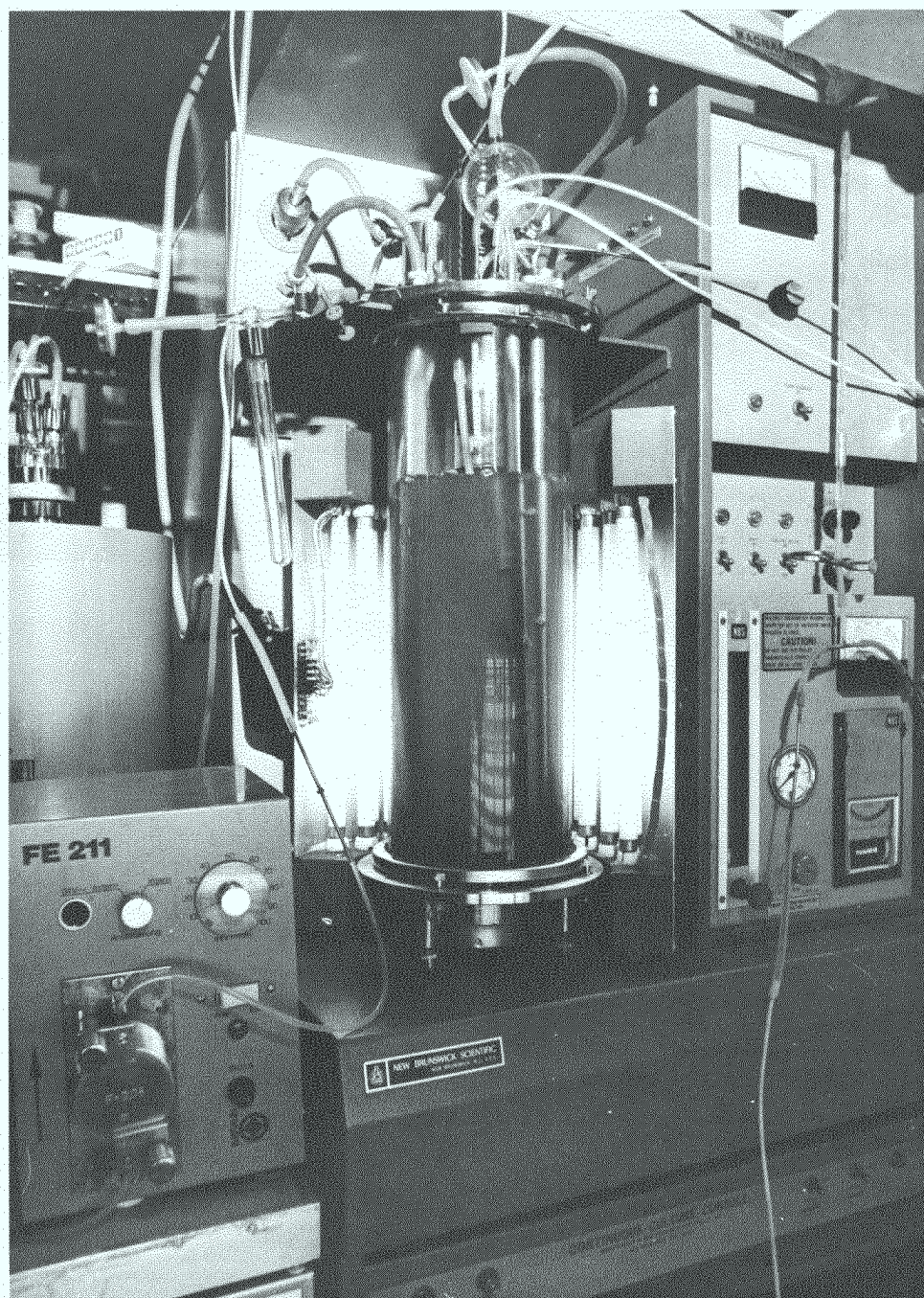


Foto 3: Fermenter zur Algenkultur. V = 5 l

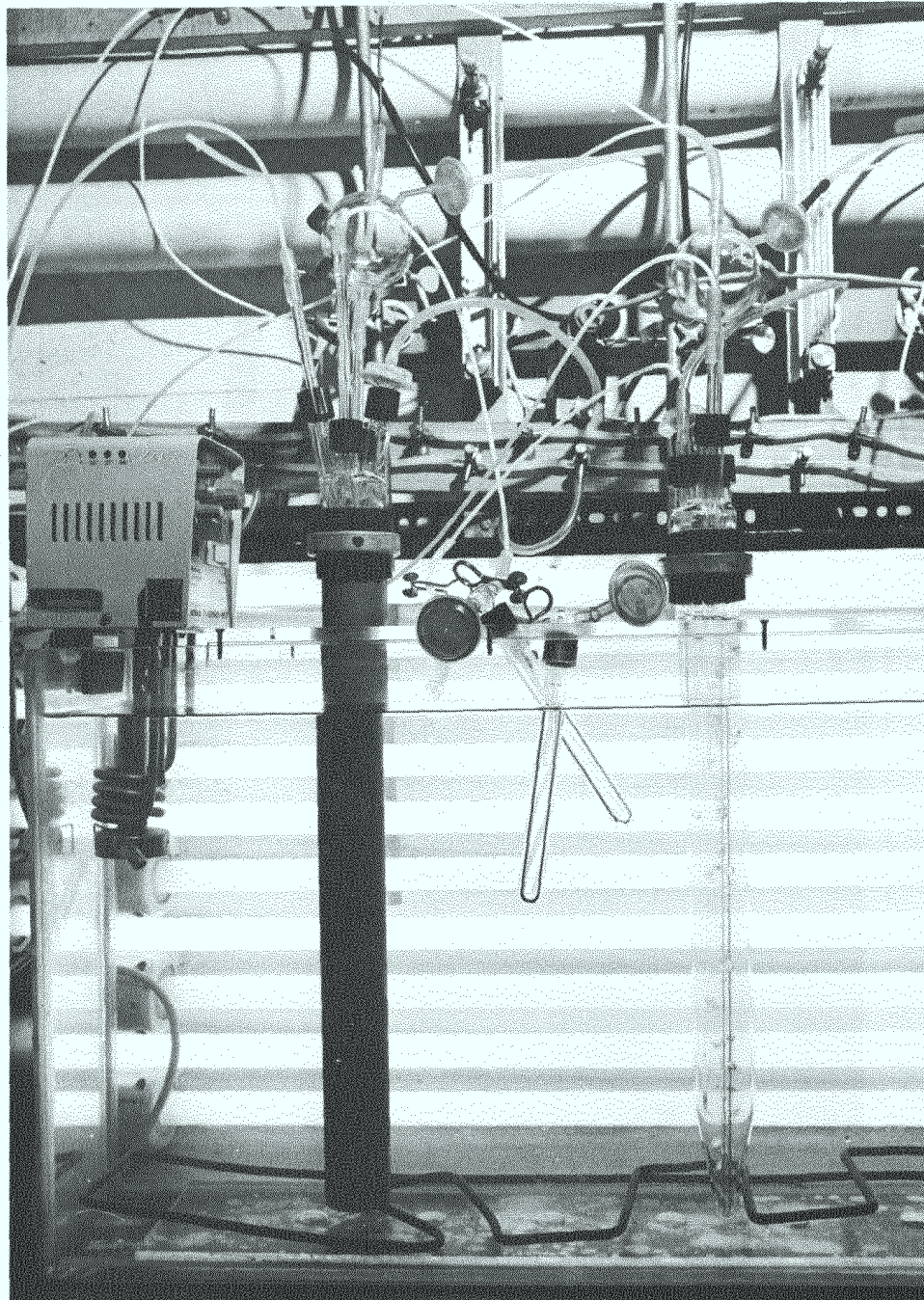


Foto 4: Kulturröhre für Rotatorien (linke Röhre mit Verdunklung).
 $V = 300 \text{ ml}$

3.3. Analysen

3.3.1. Pigmentmessungen

Das Chlorophyll-Phaeopigment-System wurde als Parameter für die Abschätzung der Biomassekonzentration der Algen in den Algen- und Rotatorienkulturen herangezogen. Die Pigmentmessung bietet gegenüber anderen Parametern zur Messung der Algenkonzentration eine Reihe von Vorteilen:

- Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind gewährleistet (s. Eichgerade, Abb. 7)
- Die meisten anderen Verfahren zur Biomassebestimmung (optische Dichte, Trockensubstanzgehalt, partikulärer Kohlen- oder Stickstoff, Bestimmung der Zellzahl im Coulter-Counter etc.) sind nur in reinen Algenkulturen anzuwenden.

Für die Bilanzierung des Biomasseflusses in der zweistufigen Nahrungskette ist aber die Differenzierung zwischen intakten Algen sowie teilweise abgebauten Algen, Fäzes und Rotatorien eine unabdingbare Voraussetzung. Die Pigmentkonzentration erfüllt als algenspezifischer Parameter der Biomassekonzentration weitgehend diese Voraussetzung. Es kann sogar zwischen nicht und unvollständig verwerteter Algenbiomasse differenziert werden. Nach Zerstörung der Algenzellen durch den Kauapparat der Rotatorien zerfällt das Chlorophyll - bevorzugt im sauren Milieu - durch Verlust des zentralen Mg-Atoms in Phaeophytin. Der Anteil von Phaeophytin in der wachsenden Algenkultur im Chemostaten ist 0 ($\pm$ 2 % Meßfehler). In der Rotatorienstufe steigt dieser Anteil je nach Freßaktivität der Tiere auf 10 - 70 % des Gesamtpigmentgehaltes an.

3.3.1.1. Spektralphotometrische Chlorophyllbestimmung

In der Literatur sind eine Reihe verschiedener Methoden zur Chlorophyllbestimmung beschrieben worden (Parsen und Strickland, 1963; Nusch und Palme, 1975; Lorenzen, 1967). Sartory (1982) hat sie verglichen und optimiert. Nach seiner Methode wurden die Proben seit 7/1982 analysiert, die vorhergehenden Messungen erfolgten nach einer modifizierten Methode von Nusch und Palme (1975). Beide Methoden lieferten vergleich-

bare Ergebnisse, die Sartory-Methode zeigte unter unseren Bedingungen jedoch eine geringere Streubreite 3,7 % höhere Werte bei Sartory ± 1 %; Nusch $\pm 1,9$ %).

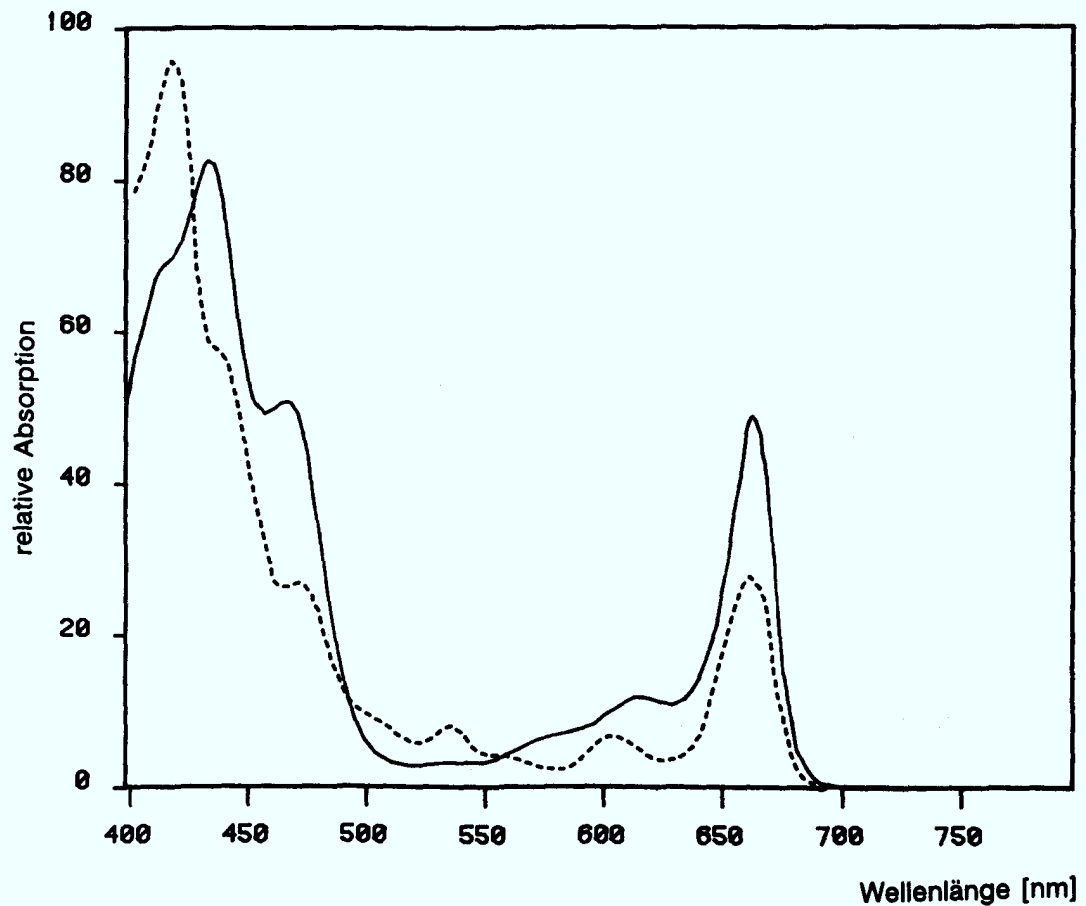


Abb. 5: Absorptionsspektrum einer Chemostatkultur von Scenedesmus costato-granulatus. Extraktion mit Ethanol, — vor und nach — — — Ansäuerung mit HCl

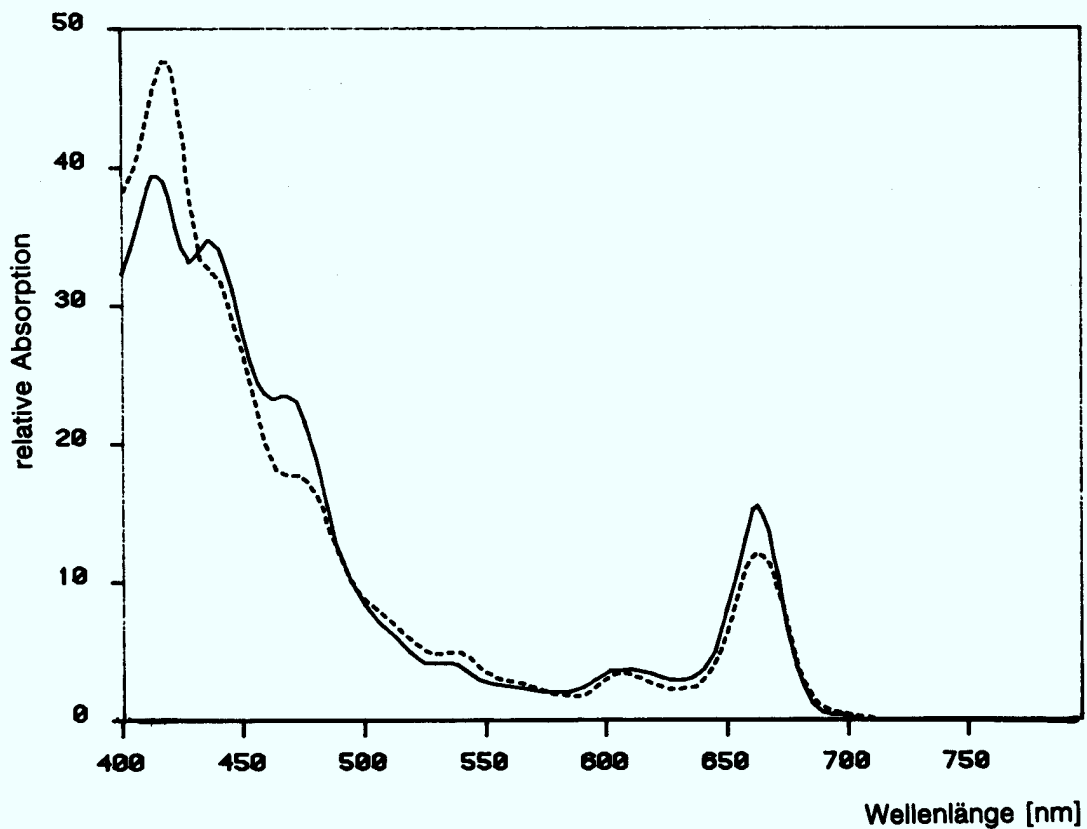


Abb. 6: Absorptionsspektrum einer Rotatorienkultur. Symbole wie in Abb. 3

Methodik:

Ca. 100 µg Chlorophyll (~ 10 ml Kultursuspension aus der Algen- bzw. der Rotatorienkultur) werden abfiltriert (Glasfaserfilter, ausgeglüht). Die Konzentration an Pigmenten im Filtrat ist vernachlässigbar ($\sim 1\%$ des Gesamtpigments, s. Abb. 11d). Die Biomasse wird mit Filter in einem verschraubbaren Reagenzglas mit 3 ml 96 %igem Äthanol versetzt und 5 Minuten bei 78°C inkubiert. Nach Abkühlen wird der Überstand abzentrifugiert und seine Extinktion im Spektralphotometer bei 665 und 750 nm gemessen. Zur Differenzierung zwischen Chlorophyll und Phaeophytin wird das Chlorophyll durch Ansäuerung mit HCl ($5 \cdot 10^{-3}$ mmol/l) in Phaeophytin überführt und nochmals im Photometer gemessen. Die Auswertung erfolgt nach Nusch und Palme (1975):

$$\text{mg Chlorophyll} = (E_{665} \text{ v. As} - E_{665} \text{ nAs}) * 28,67 * \frac{V}{V * L}$$

$$\text{mg Phaeopigment} = E_{665} \text{ n.As} * 21,236 * \frac{V}{V * L} - \text{mg Chlorophyll}$$

Faktoren: Extinktionskoeffizient für Chlorophyll - 12,2 (nach Nusch, 1980)

Faktor: Chlorophyll : Phaeopigment = 1,7406 (eigener Wert)

$E_{665} \text{ v. As}$ = Extinktion vor HCl-Zugabe

$E_{665} \text{ n. As}$ = Extinktion nach HCl-Zugabe

v = Extraktionsvolumen in ml

V = Probevolumen in Liter

L = Küvettenlänge in cm

Chlorophyll/Phaeophytin-Differenzierung

Da die Differenzierung zwischen Chlorophyll und Phaeophytin in den Rotatorienkulturen von ausschlaggebender Bedeutung ist, wurde eine Eichkurve angefertigt, um die in der Formel bei Nusch angegebenen Faktoren zu bestätigen.

Dazu wurde nach oben angegebener Vorschrift ein Rohpigmentextrakt aus einer Chemostatenkultur von Scenedesmus costato-granulatus hergestellt. Die Hälfte dieses Extraktes wurde durch HCl-Zugabe angesäuert und nach 10 Minuten durch eine äquimolare Menge an NaOH neutralisiert (auf pH 7 - 8). Diese Lösung sollte jetzt kein Chlorophyll mehr enthalten; die Ausgangslösung jedoch dagegen kein Phaeophytin (s. Bestimmung mit der HPLC). Durch Mischen beider Extrakte konnten Lösungen mit definiertem Chlorophyll : Phaeophytin-Verhältnis hergestellt werden. Diese Lösungen wurden nach der Standardvorschrift weiterbehandelt. Die erhaltenen Daten sind in Abb. 7 zusammengestellt.

Korrelationen: Chlorophyll $r = 0,9989$
Phaeophytin $r = 0,9974$

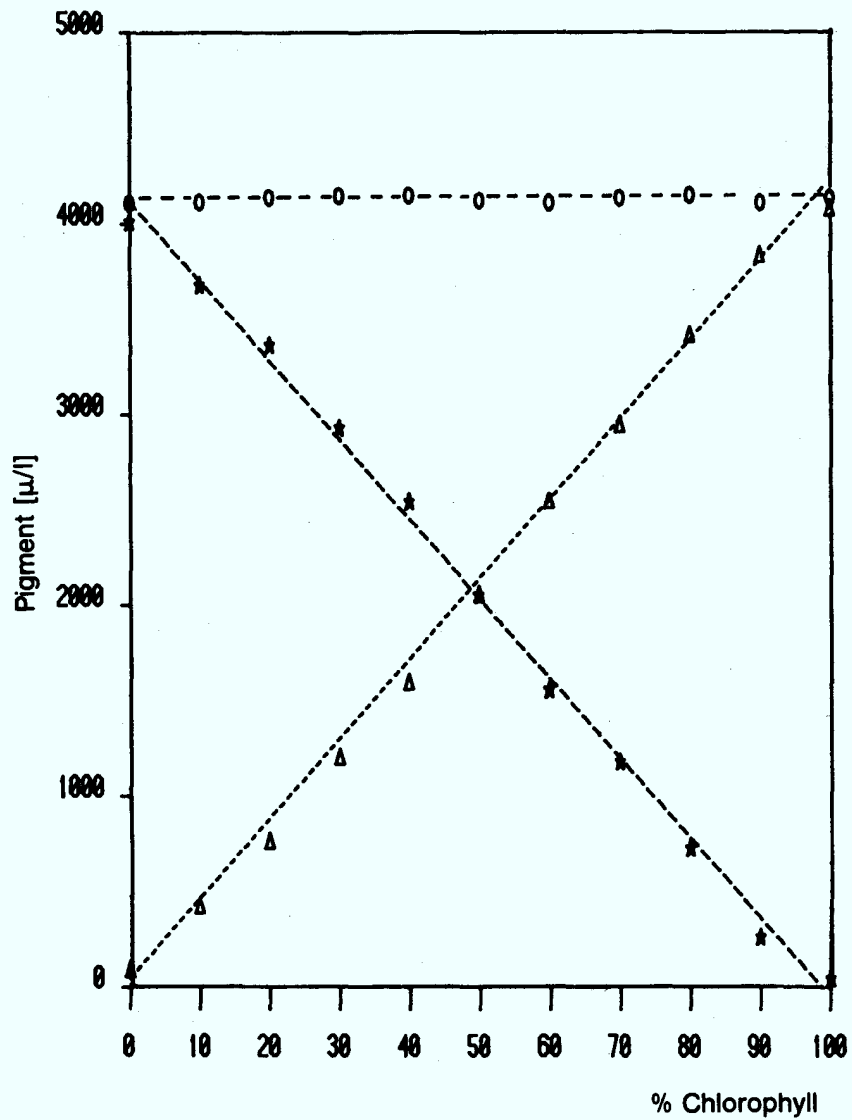


Abb. 7: Eichgeraden zur Chlorophyll/Phaeophytin-Differenzierung.

- △---△ Chlorophyll
- ★---★ Phaeophytin
- Gesamtpigment

3.3.1.2. Pigmentbestimmung mit der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)

Zur Bestätigung der mit dem Spektralphotometer gewonnenen Daten wurde der Pigmentabbau durch die Rotatorien in einem 24 h-Zyklus auch mittels HPLC bestimmt. Der Einsatz der HPLC zur quantitativen Analyse von Pflanzenpigmenten ist ein relativ neues Verfahren (Hoyer und Clasen, 1983). Es ermöglicht die simultane Bestimmung einer ganzen Reihe von Pigmenten. Neben Chlorophyll a und b kann zwischen den zugehörigen Phaeophytinen a und b, sowie 3 Xanthinen differenziert werden.

Probenaufbereitung und HPLC-Meßplatz sind bei Hoyer und Clasen (1983) ausführlich beschrieben. Ein methanolischer Extrakt der Algen- bzw. Rotatoriensuspension wird in einem isokratischen HPLC-Meßplatz aufgetrennt und im Spektralphotometer-Detektor bei 435 nm gemessen.

Die Rotatorienkulturen wurden vor dem Hitzeaufschluß 5 Minuten mit Ultraschall behandelt, um die Tiere zu zerstören. Dies war notwendig, um die Pigmente vollständig aus bereits gefressenen Algen extrahieren zu können.

3.3.2. Trockensubstanz, C-H-N-Analyse

Da wegen der geringen Durchflußrate durch die Rotatorienkulturen täglich nur 75 ml Probevolumen zur Verfügung standen, um alle chemischen Analysen durchzuführen, wurde die Bestimmung der TS und des CHN-Gehaltes mit derselben Biomasse durchgeführt. 50 ml Kultursuspension wurden mit einer Tischzentrifuge (Ecco) bei 5000 Upm abzentrifugiert, das Pellet in wenig destilliertem Wasser resuspendiert und quantitativ in ein vorgewogenes Trockengewichtsgläschen überführt. Da die Beschaffenheit der Trockenmasse bei einfacher Trocknung der Suspension bei 104 °C nicht für die Durchführung der C-H-N-Analyse geeignet war, wurde die Biomasse zunächst lyophilisiert. Nach einer weiteren Trocknung (1 h bei 104 °C) werden die Gläschen auf einer Analysenwaage ausgewogen. Die C-H-N-Analyse dieser Proben erfolgte im C-H-N-Analyser von Perkin-Elmer 240B. Für die C-H-N-Analyse war eine Probenmenge von ca. 1 mg Trockensubstanz erforderlich, die Genauigkeit der Analyse lag bei $\pm 0,1 \%$.

3.3.3. Algenzellzahl und Extinktion

Die Bestimmung der Algenzellzahl erfolgte in einer Zellkammer nach Neubauer. Jede Zählung wurde so oft wiederholt, bis mindestens 800 Zellen gezählt waren, wenigstens jedoch einmal. Der Meßfehler liegt dann bei etwa $\pm 5\%$. Zur Abschätzung der Algenkonzentration kann auch die Extinktion der Zellsuspension benutzt werden. Die Extinktion wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen.

3.3.4. Bestimmung der Trockenmasse von Brachionus rubens

Die genaue Bestimmung der Rotatorientrockenmasse ist für eine Routine-methode sehr aufwendig, da hierzu die Algen und Fäzes sauber von den Rotatorien abgetrennt werden müssen. Andererseits ist die Gesamtmasse der Rotatorien mit der Tierkonzentration direkt korreliert, wenn man die Zahl der angehefteten Eier mitberücksichtigt.

Zur Bestimmung der mittleren Trockenmasse eines Individuums von B. rubens sowie eines Eies, wurden jeweils etwa 2000 Individuen aus Populationen mit unterschiedlichen Prozentsätzen eiertragender Tiere mit einem vorgewogenen Metallsieb mit 50 μm Maschenweite abfiltriert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Sieb bei 105 °C eine Stunde im Trockenschrank getrocknet. Die Gewichtsbestimmung erfolgte nach Abkühlen durch Auswiegen mit einer Mikrowaage der Fa. Mettler.

Aus je 10 Parallelbestimmungen wurden die Gewichte eines einzelnen Tieres bestimmt.

Population mit 10 % eiertragenden Tieren: $0,138 \pm 0,010 \mu\text{g/Tier}$

Population mit 40 % eiertragenden Tieren: $0,151 \pm 0,015 \mu\text{g/Tier}$

Der Unterschied der Mittelwerte kann auf den unterschiedlichen Anteil eiertragender Tiere zurückgeführt werden. Aus den Daten können somit das Gewicht eines Tieres ohne Ei und das Gewicht eines amiktischen Eies berechnet werden. Die gefundenen Werte liegen in dem Bereich, den Pilarska (1977a) für Brachionus rubens an Einzeltieren verschiedenen Alters bestimmt hat (Tabelle 2).

Tabelle 2: Trockenmassen von Brachionus rubens

Tier mit Ei	Tier ohne Ei	Ei	
$0,177 \mu\text{g} \pm 0,015$	$0,134 \mu\text{g} \pm 0,015$	$0,043 \mu\text{g} \pm 0,01$	eigene Werte
$0,13 - 0,1 \mu\text{g}$	$0,11 - 0,14 \mu\text{g}$	$0,04 - 0,06 \mu\text{g}$	Pilarska (1977a)

Für die Bestimmung der Rotatorientrockenmasse für die N- und C-Bilanzen wurden die Tier- und Eikonzentrationen mit den oben angegebenen Tiergewichten multipliziert.

3.3.5. Längenmessung von Brachionus rubens

Die Größenverteilung von Brachionus wurde mit Hilfe eines Morphomaten der Fa. Leitz bestimmt. Dazu wurden fixierte Rotatorien vom Mikroskop über einen Zeichenvorsatz auf die Platte des Morphomaten projiziert und dort vermessen. Mit dieser Methode kann die Körperlänge von Brachionus auf $1 \mu\text{m}$ genau bestimmt werden.

3.3.6. Rotatorienkonzentration

Die Bestimmung der Tierzahl erfolgte durch Zählung der Tiere in einem definierten Volumen ($0,2 - 0,5 \text{ ml}$) in einer Pipette unter dem Stereomikroskop bei 12-facher Vergrößerung. Gleichzeitig wird auch der Prozentsatz der eiertragenden Tiere erfaßt. Die Größe der Pipette wurde so gewählt, daß pro Messung zwischen 80 und 100 Tiere gezählt wurden. Die Messung wurde an 3 Parallelproben durchgeführt, die Schwankungsbreite der Messung betrug ca. $\pm 2,5 \%$.

3.3.7. Algen und Fäzes

Die Konzentration der Algen und Fäzes in der Rotatorienkultur wurde durch Subtraktion der Rotatorienbiomasse (aus Tierzahl und Tiergewicht) von der Gesamttrockensubstanz berechnet.

3.3.8. Gelöste Stickstoffverbindungen

Zur Bestimmung der anorganischen N-Verbindungen (NO_3^- , NO_2^- und NH_4^+) konnte ein Auto-Analyser der Fa. Cenco benutzt werden. Die Analysen wurden nach den "Standard Methods" (1975) durchgeführt.

Vor der Analyse wurde die partikläre Substanz der Kultursuspension abfiltriert (Porenweite des Filters 0,2 μm).

Nitrat und Nitrit:

Nitrat wird mit Hydrazinsulfat im alkalischen Milieu zu Nitrit reduziert. Nitrit geht mit Sulfanylamiden in saurem Milieu eine Diazoverbindung ein, die mit N-1-Naphthyläthylendiaminhydrochlorid eine rotviolette Farbe ergibt. Sie wird im Photometer bei 520 nm gemessen und anhand einer Eichkurve ausgewertet. Die Nitratkonzentration wurde durch Subtraktion der Nitritkonzentration von der Summe (Nitrit und Nitrat) bestimmt. Für die Nitrateichkurve wurden Eichlösungen von 0,5 - 5 mg NO_2^- -N geeicht. Die Fehlergrenzen lagen für unverdünnte Proben im Bereich von $\pm 0,05$ mg N/l für Nitrat und $\pm 0,005$ mg/l für Nitrit.

Ammonium:

Durch Substitutionsreaktionen entstehen beim Einwirken von Hypochlorid-Ionen auf Ammoniak in wässriger Lösung Chloramine, die in Anwesenheit des Katalysators Natriumnitroprussid im basischen Milieu mit Phenol tiefblau gefärbte Indophenole bilden. Die Konzentration dieser Färbung wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Die Bestimmung wurde im Bereich von 0,5 - 5 mg NH_4^+ -N/l geeicht, die Fehlergrenzen für unverdünnte Proben betrug ca. $\pm 0,05$ mg N/l.

3.3.9. Gelöster Kohlenstoff

Zur Bestimmung des gelösten Kohlenstoffes wurde der "Total Carbon Analyzer" der Firma Beckmann benutzt, die Proben wurden zunächst filtriert (Porenweite $0,2\ \mu\text{m}$). Der anorganische Kohlenstoff reagiert bei $300\ ^\circ\text{C}$ im sauren Milieu zu CO_2 und wird so im Infrarotphotometer gemessen. Der organische Kohlenstoff wird bei ca. $1000\ ^\circ\text{C}$ mit Luft-sauerstoff zu CO_2 oxidiert und als Summe von organischem und anorganischem Kohlenstoff im Infrarotphotometer bestimmt. Die Differenz zwischen beiden Messungen gibt die Konzentration an organischem Kohlenstoff im Medium an. Die Eichung wurde im Bereich von $0 - 30\ \text{mg C/l}$ vorgenommen. So konnte die C-Konzentration auf $\pm 1\ \text{mg/l}$ bestimmt werden.

3.3.10. Chemischer Sauerstoffbedarf, CSB

Der CSB wird durch Oxidation der organischen Substanzen mit Kaliumdichromat im schwefelsauren Milieu (50 %), bei Anwesenheit der Katalysatoren Silberchlorid und Quecksilbersulfat bei $170\ ^\circ\text{C}$ bestimmt. Das nicht reduzierte Chrom wird nach Beendigung des Aufschlusses durch Titration mit Ammoniumeisen(II)sulfat gemessen. So kann die Menge des nicht reduzierten Chroms bestimmt werden, die dem CSB umgekehrt proportional ist.

3.3.11. CO_2 -Messung im Abgas der Kulturen

Die Messung der CO_2 -Konzentration im Abgas erfolgte mit dem UNOR 6 Infrarotphotometer von Mayhak. Dieses Gerät erlaubt es, Konzentrationen von wenigen $\mu\text{l CO}_2/\text{l}$ Luft genau zu erfassen. Die 2 l-Chemostatkulturen wurden hierzu mit Luft begast ($0,036\ \text{Vol. \% CO}_2$), die aufgenommene bzw. abgegebene CO_2 -Menge durch Differenzbestimmung zwischen Zu- und Ablauf bestimmt. Die 300 ml-Rotatorienkulturen wurden zur Messung der Respirationsraten mit CO_2 -freier Luft begast. Nur so war es möglich, den empfindlichsten Meßbereich des Analysengerätes auszunutzen und die sehr geringen CO_2 -Konzentrationen zu messen ($0,0010 - 0,0020\ \text{Vol. \% CO}_2$).

Die Eichung des Gerätes erfolgte mit Hilfe von Eichgasen, die definierte CO_2 -Konzentrationen enthielten. Die Eichung wurde 14-tägig wiederholt, die Abweichung in dieser Zeit lag unter 0,0005 Vol. % CO_2 . Diese Ungenauigkeit wurde durch die Differenzmessung zwischen Zulauf und Abgas ebenfalls eliminiert.

Die Luftzufuhr aller Kulturen wurde über Schwebekörper-Durchflußmesser von Fischer und Porter dosiert. Die 300 ml fassende Kulturröhren wurden mit 15 l Luft/h, die 2 l-Kultur mit 20 l Luft/h begast.

Aus der Gasdurchflußrate und der gemessenen CO_2 -Konzentration kann die von den Organismen produzierte bzw. aufgenommene CO_2 -Menge mit Hilfe des Druck- und Temperatur korrigierten Molvolumens und des Molgewichts berechnet werden.

$$\text{mg CO}_2/\text{h} = \frac{\% \text{ CO}_2 * \text{MG} * \text{D}}{\text{V}_{\text{mo}} (\text{P.T.})}$$

D = Gasdurchflußrate (l/h)

$\text{V}_{\text{mo}} (\text{P.T.})$ = Druck- und Temperatur-korrigiertes Molvolumen

MG = Molgewicht von CO_2

3.4. Mathematische Auswertungen

3.4.1. Stoffbilanzen mit Hilfe der Matrixrechnung

Bei der Berechnung von Stoffbilanzen kann das interne Recycling im System (Cycling Index) sowie der Anteil der einzelnen Kompartimente am Gesamtumsatz mit Hilfe einer Produktionsmatrix (Richey et al. 1978) beschrieben werden. Dieses ursprünglich für wirtschaftswissenschaftliche Analysen entwickelte Verfahren ermöglicht auch - durch empirische Veränderungen der Flußraten - eine Vorhersage zum Verhalten des Systems unter den geänderten Bedingungen.

Das Verfahren wurde eingesetzt zur Simulation der Bedeutung der Bakterien bei den Umsetzungen des Kohlenstoffs im einstufigen Chemostaten-system sowie zur Beschreibung der Auswirkung eines N-Recyclings im 2-stufigen System.

Zur Methode (siehe auch Richey et al. 1978):

Zunächst wird eine Rohdatenmatrix aufgestellt. Spalten und Reihen werden durch die einzelnen Kompartimente des Systems repräsentiert, die dazugehörenden Daten bedeuten den Stofffluß vom Kompartiment der Reihe in das Kompartiment der Spalte. In- und Output des Systems werden als zusätzliche Reihe (input) bzw. Spalte (output) aufgenommen, und die Summe der Reihen (e_i) und der Spalten (e_j) wird berechnet (s. Tabelle 3). Die Rohdatenmatrix wird normalisiert und von der Einheitsmatrix subtrahiert. Anschließend wird die Matrix mit Hilfe eines Kleinrechners invertiert. Es entsteht die Strukturmatrix. Die Summe der Reihen der einzelnen Kompartimente gibt deren Bedeutung am Umsatz des Gesamtsystems an. Durch Normalisation kann der Wert als Prozentsatz angegeben werden. Der Cycling-Index wird aus der Strukturmatrix und der Rohdatenmatrix berechnet. Addiert man die Reihensummen der Rohdatenmatrix (e_i), erhält man eine Größe für den gesamten Stofffluß im System. Die Größe des recirculierten Stoffflusses (E_c) kann aus der Strukturmatrix berechnet werden:

$$E_c = \sum e_i (S_{ij} - 1)/S_{ij}$$

S_{ij} sind dabei die Werte der Strukturmatrix, die an der Stelle stehen, wo in der Einheitsmatrix eine 1 steht. Der Cycling-Index wird als Anteil des recirculierten Stoffflusses am Gesamtfluß berechnet.

$$CI = E_c / \sum e_i$$

TABELLE 3: Rohdatenmatrix zur Beschreibung des Stickstoffflusses durch einen einstufigen Algen-Rotatorien-Chemostaten

	NO_3^-	Algen	Rotatorien	NH_4^+	Output	Summe e_i
NO_3^-	-	13,7	-	-	0,3	14
Algen	-	-	12,9	-	4,6	17,5
Rotatorien	-	-	-	4,1	8,5	12,6
NH_4^+	-	3,8	-	-	0,3	4,1
Input	14	-	-	-		48,2
e_j	14	17,5	12,9	4,1	48,5	

3.4.2. Statistische Auswertungen

Sämtliche statistische Berechnungen wie Korrelationen, Kurvenanpassungen, t-Test, Fourier-Analyse etc. wurde mit einem Kleinrechner von Triumph-Adler (Alphatronic P3) durchgeführt. Die zugehörige Software ist im "Stat Pak" einer Statistikprogrammsammlung der Fa. North West Analytical Portland OR enthalten. Außerdem wurden einige kleinere selbstgeschriebenen Basic-Programme benutzt; das Programm zur Matrixinversion erhielt ich von Herrn Prof. Dr. J.U. Grobbelaar.

3.4.3. Erstellung von Stoffbilanzen

3.4.3.1. Trockensubstanz

Die Gesamttrockensubstanz der Kulturen wird nach 3.3.2. bestimmt. Aus der Rotatorienkonzentration (nach 3.3.6.) kann nach 3.3.4. die Trockensubstanz der Rotatorien pro Volumeneinheit berechnet werden. Die Fraktion der nicht gefressenen Algen und Fäzes wird durch Subtraktion der Rotatorienbiomasse von der Gesamttrockensubstanz bestimmt.

3.4.3.2. Stickstoff

Der Gesamtstickstoff der Kulturen wird als Summe von anorganischem gelösten Stickstoff (nach 3.3.8.) und partikulärem organischen Stickstoff (nach 3.3.2.) bestimmt. Organische gelöste N-Verbindungen (z.B. Amine) wurden nicht erfaßt. Ihre Konzentrationen sind für die Stoffbilanzen vernachlässigbar, da die Summe der bestimmten Parameter mit der eingewogenen Stickstoffmenge übereinstimmt ($\pm 3\%$).

Aus der Trockensubstanz der Algen- und Fäzes-Fraktion sowie dem N-Gehalt der Algen in der Algenkultur wird die Stickstoffmenge dieser Fraktion ermittelt. Der Stickstoff in der Rotatorienbiomasse wird als Differenz des gesamten partikulären N und des Stickstoffs der Algen und Fäzes bestimmt.

3.4.3.3. Kohlenstoff

Der partikuläre organische Kohlenstoff wird aus dem Trockengewicht der Kulturen und ihrem C-Gehalt nach 3.3.2. bestimmt. Die Differenzierung zwischen Algen und Fäzes bzw. Rotatorien erfolgt analog zum Stickstoff. Die Trockensubstanz der Algen und Fäzes wird mit dem C-Gehalt der Algen in Algenchemostaten verrechnet, die Kohlenstoffmenge in den Rotatorien als Differenz zwischen gesamten partikulären C und Kohlenstoff in den Algen und Fäzes bestimmt. Der gelöste Kohlenstoff wird nach 3.3.9. ermittelt. Die Respiration der Rotatorien bzw. die CO_2 -Aufnahme der Algen wird durch Integration der CO_2 -Konzentration im Abgas der Kulturen über eine Aufenthaltszeit bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zur Futteraufnahme und zur Populationsdynamik von Brachionus rubens

Die 2. Stufe des Algen-Rotatorien-Kultursystems sollte wegen der periodischen, diskontinuierlichen Substratzudosierung vom Chemostaten abweichen. Die Zugabe von Algen in regelmäßigen Abständen könnte zu einer Synchronisierung von Futteraufnahme und Reproduktion der Rotatorien führen. Zur Überprüfung dieser Zusammenhänge wurden die Biomassekonzentrationen und Respiration sowie Schlüpfraten und Fäzeszusammensetzung im 24-h-Zyklus untersucht. Mit Hilfe eines Rechnerprogramms wurden die Meßwerte an theoretische Verteilungen angepaßt. Dazu wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die Funktion mit der besten Korrelation zu den Originaldaten wurde zur Darstellung der Daten benutzt. Die Regressionsanalyse wurde mit folgenden Modellgleichungen durchgeführt:
 $f(x) = a + b * x$; $f(x) = a * e^{b * x}$; $f(x) = a + b * \ln x$; $f(x) = a * x^b$, sowie einem Polynom 2. bis 4. Grades. Die allgemeinen Formeln mit den gefundenen Konstanten sind in Tab. 4 (S. 60a) zusammenfassend dargestellt.

Für die Versuche wurden Rotatorienkulturen benutzt, die bei einer Aufenthaltszeit von 4 Tagen kultiviert wurden und ein Fließgleichgewicht erreicht hatten.

4.1.1. Biomassekonzentration

4.1.1.1. Rotatorienkonzentration

Die Tierkonzentration stieg über den gesamten Zyklus linear an

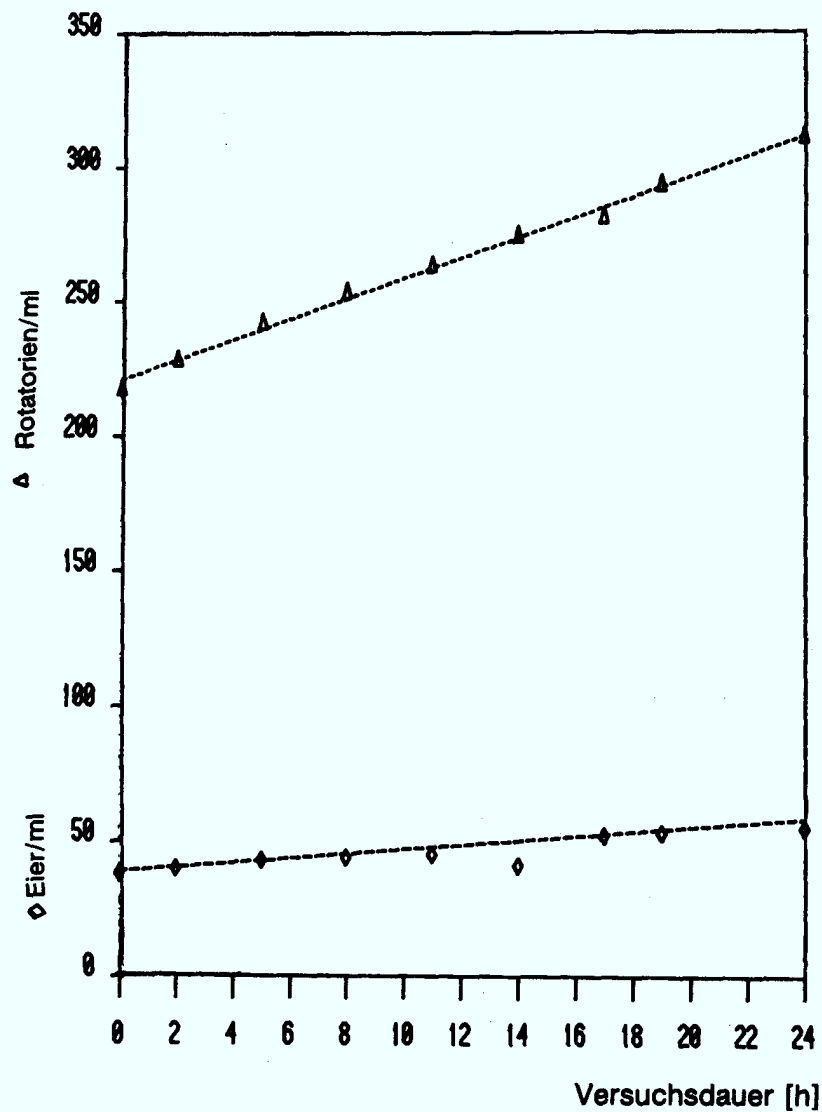
$$X_{(t)}(t) = X_0 + a_R * t \quad (1)$$

Abb. 8 zeigt die Mittelwerte aus drei Meßreihen. Die Korrelation ist sehr gut ($r = 0,996$). Die Steigung der Regressionsgeraden (a_R) beträgt 3,76 Tiere/ml * h, entsprechend einer Produktion von 90 Tieren/ml * d. Die Vermehrungsrate beträgt 0,34/d und liegt über der theoretischen Auswaschrates (0,28/d). Eine Synchronität des Populationswachstums ist

nicht nachzuweisen. Auch die Zahl der an die Tiere angehefteten Eier steigt linear an ($r = 0,890$) von 39 Eier/ml nach der Zugabe der Algen bis 58 Eier/ml nach 24 h. Auch hier ist keine Synchronität nachweisbar.

$$E(t) = E_0 * a_E * t \quad (2)$$

$$E_0 = 39, a_E = 0,8 \text{ Eier/h}$$



Vermehrung von Brubens im 2-stufigen Kultursystem:
Abb. 8: Rotatorienkonzentration Δ--- und Zahl der angeheftet ge-
tragenen Eier ◇--- im Tagesgang.
Mittelwerte aus 3 Kulturen.

4.1.1.2. Pigmentkonzentration

4.1.1.2.1. Gesamtpigment

Das Gesamtpigment, bestimmt als Summe von Chlorophyll und Phaeophytin, nimmt über den 24-Stunden-Zyklus linear mit einer Rate von $g = 55 \mu\text{g Pigment/l} \cdot \text{h}$ ab ($r = 0,9948$), $G_0 = 1758$

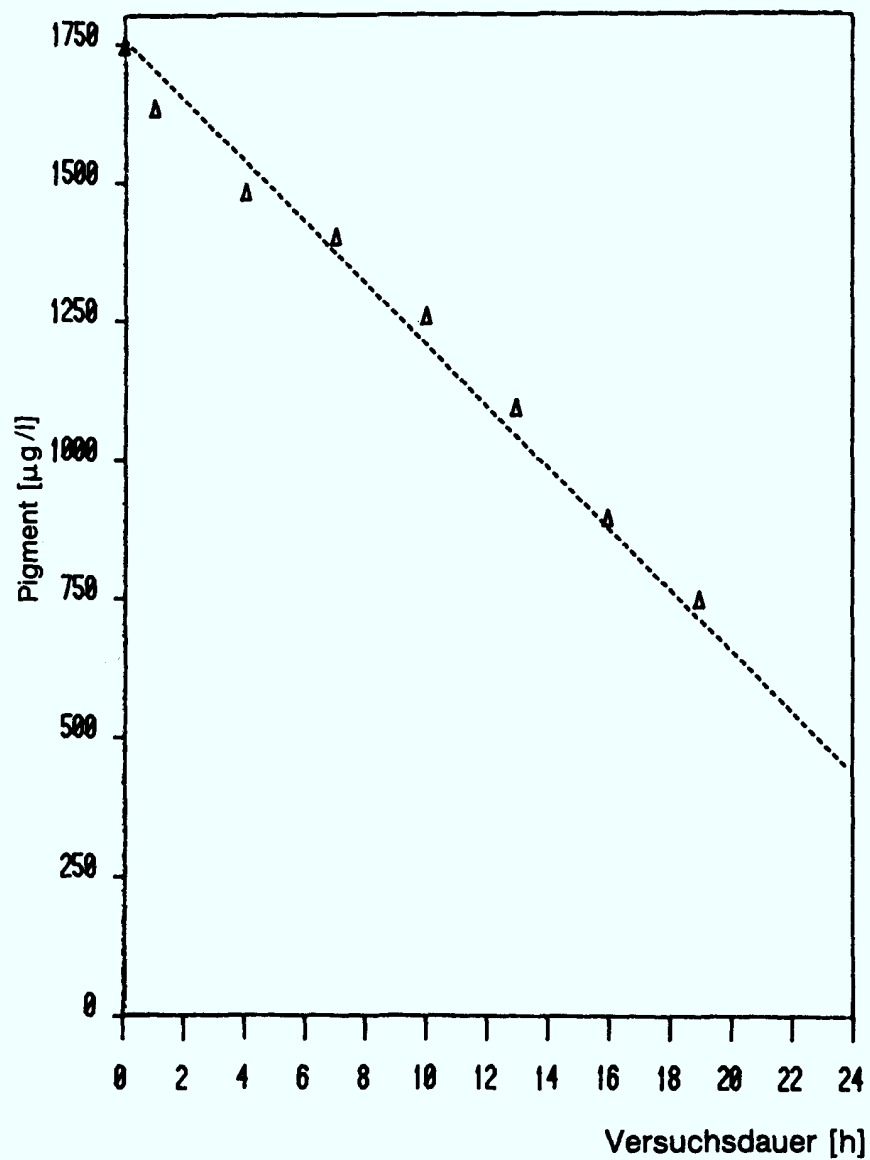
$$G(t) = G_0 + g \cdot t \quad (3)$$

4.1.1.2.2. Chlorophyll

Die Chlorophyllkonzentration nimmt während des 24-Stunden-Zyklus stetig ab. Der Verlauf läßt sich durch folgende empirisch ermittelte Exponentialfunktion ausdrücken:

$$Ch(t) = Ch_0 \cdot e^{a \cdot t} \quad (4)$$

Für die Faktoren $Ch_0 = 1234 \mu\text{g/l}$ und $a = -0,0675$ sind Funktion und Meßwerte gut korreliert ($r = 0,9978$) (Abb. 10).



Freßtätigkeit von Brachionus rubens im 2-stufigen Kultursystem
1:

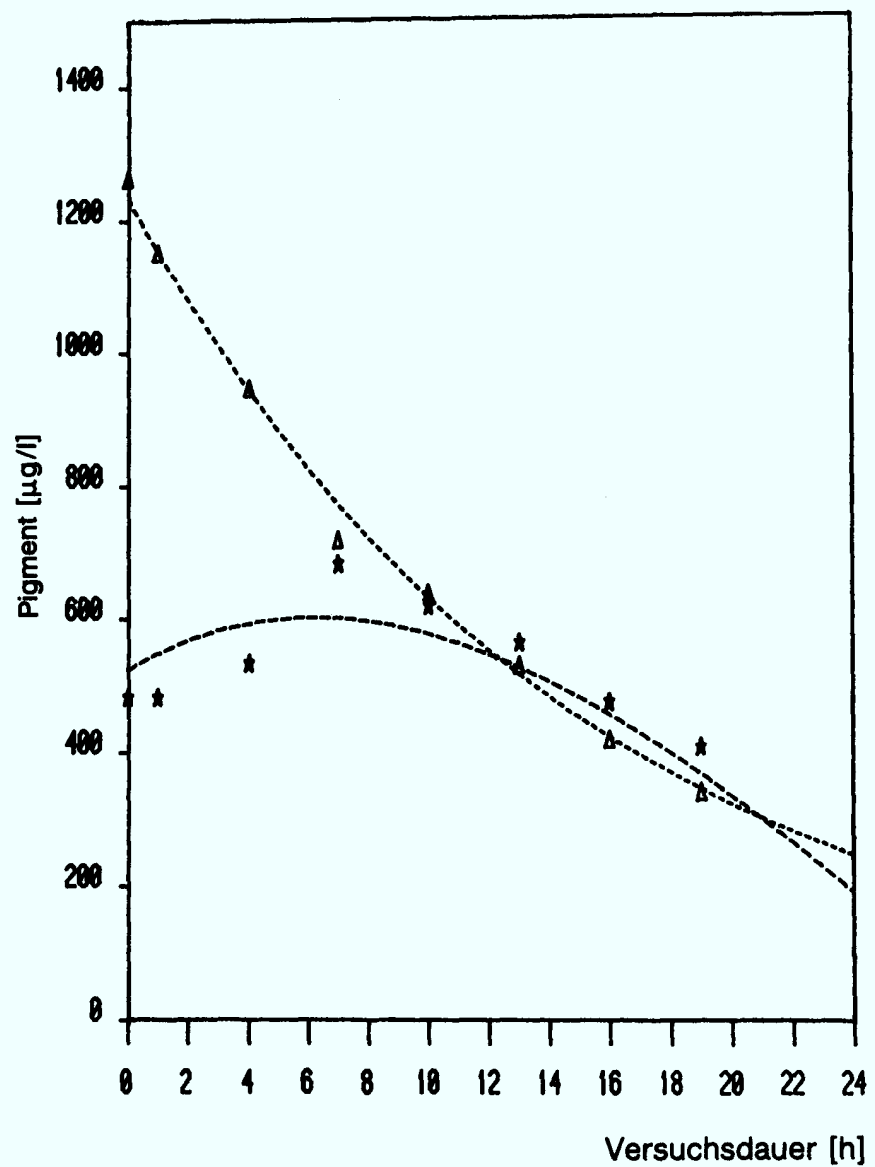
Abb. 9: Verlauf des Gesamtpigments in der Rotatorienkultur im Tagesgang. Mittelwerte aus 3 Kulturen.

4.1.1.2.3. Phaeophytin

Entgegengesetzt zur starken Abnahme des Chlorophylls nimmt das Phaeophytin in den ersten Stunden stark zu. Nach ca. 6 Stunden erreicht es ein Maximum und sinkt dann wieder ab. Der Kurvenverlauf kann als Differenz vom Gesamtpigment (3) und Chlorophyll (4) beschrieben werden:

$$Ph(t) = G(t) - Ch(t) = (G_0 + g * t) - (Ch_0 * e^{a * t}) \quad (5)$$

($r = 0,8141$). Die Kurve verläuft parabelförmig und kann auch als Polynom 2. Grades ausgedrückt werden ($r = 0,9215$).



Freßtätigkeit von Brachionus rubens im 2-stufigen Kultursystem 2:

Abb. 10: Chlorophyll Δ --- und Phaeophytin $\star$ --- im Tagesgang.
Mittelwerte aus 3 Kulturen.

Dieser Befund deutet an, daß in den ersten Stunden bei der Zersetzung der Algen Phaeophytin entsteht, das erst im weiteren Verlauf abgebaut wird.

4.1.1.2.4. Pigmentmessungen mit der HPLC

Algenkultur

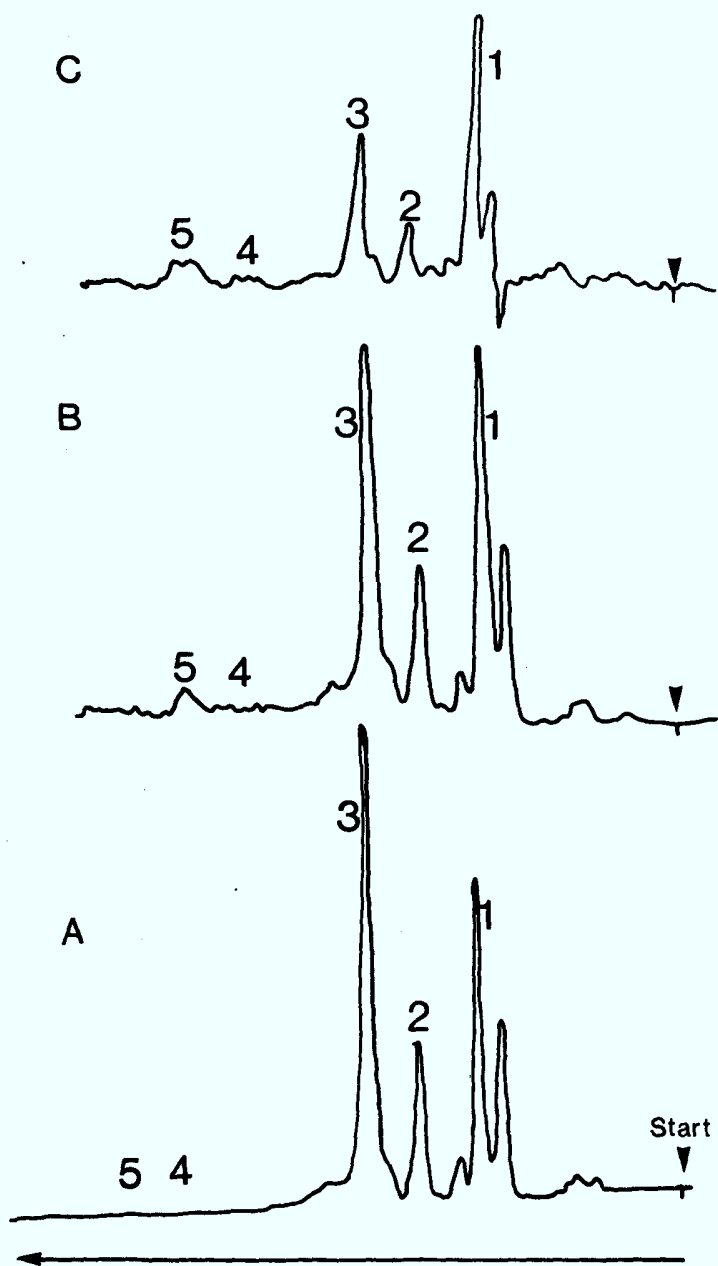
Das HPLC-Chromatogramm der Chemostatkultur von *Scenedesmus costato-granulatus* (Abb. 11a) zeigt das nach Hoyer und Clasen (1983) typische Muster einer Grünalge. Nach 1,6 - 2,3 Minuten werden 3 Xanthine von der Säule eluiert (Lutein sowie zwei nicht näher bestimmte Xanthine). Es folgen Chlorophyll b nach ca. 2,76 Minuten Laufzeit und Chlorophyll a mit seiner typischen Schulter, dem sog. Chlorophyll a (s. Hoyer und Clasen 1983). Phaeophytine und Phaeophorbide sind nicht nachweisbar.

Rotatorienkultur

Die HPLC-Chromatogramme einer Rotatorienkultur direkt nach der Fütterung, sowie 24 Stunden später sind in Abb. 11b und 11c abgebildet. In den ersten 4 Minuten zeigen sie die gleichen Pigmentmuster wie die Algenkulturen. Lediglich die Relation von Chlorophyll b : Chlorophyll a wird etwas zugunsten des Chlorophyll b verschoben (30 % : 40 %). Nach 5,35 Minuten Laufzeit erscheint Phaeophytin a im Chromatogramm. Andere Abbauprodukte des Chlorophyll sind nicht nachweisbar.

Medium der Rotatorienkultur

Auch nach Filtration durch ein Filter mit einer Porenweite von 0,2 μm ist das Medium aus Rotatorienkulturen noch schwach gelblich-grün gefärbt. Zur Analyse seiner Pigmentzusammensetzung wurden 300 ml Kulturfiltrat 24 Stunden nach Algenzugabe im Rotationsverdampfer eingeeengt und in 2 ml Methanol aufgenommen. Im dazugehörenden Chromatogramm (Abb. 11d) kann außer den oben genannten Xanthinen, Chlorophyllen und Phaeophytin a auch noch Phaeophorbid (Abbauprodukt des Chlorophyll a) nachgewiesen werden.



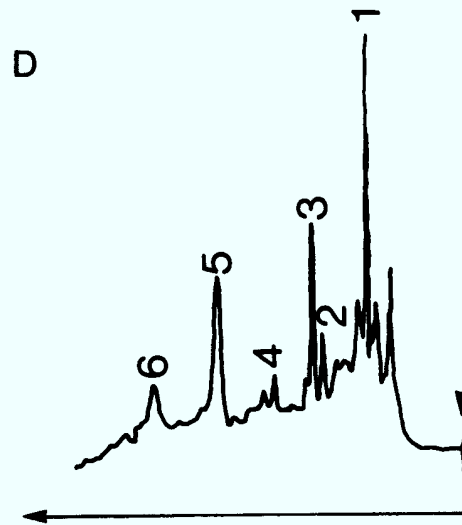


Abb. 11: HPLC-Messungen der Pigmentkonzentration

A - Algenkultur

B - Rotatorienkultur direkt nach Fütterung

C - Rotatorienkultur 24 h nach Fütterung

D - Medium aus Rotatorienkultur 24 h nach Fütterung (ca.
100 x konzentriert)

1 - Xanthine

4 - Phaeophytin b

2 - Chlorophyll b

5 - Phaeophytin a

3 - Chlorophyll a

6 - Phaeophorbid

Tagesgang der Pigmentkonzentration

Die Kinetik der Konzentrationen von Chlorophyll a und b, Lutein sowie Phaeophytin a im 24-Stunden-Zyklus sind in Abb. 12 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Peakhöhe in mm aufgetragen. Die Werte stellen daher nur relative Mengenangaben dar, zur Berechnung der absoluten Mengen müssen die nur zum Teil bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Verbindungen herangezogen werden.

Die Messung von Chlorophyll a ist gut mit den entsprechenden Messungen im Spektralphotometer korreliert ($r = 0,985$). Diese Korrelation ist für Phaeophytin nicht gegeben. Hier liegen die Messungen mit der HPLC wesentlich niedriger. Das Verhältnis von Chlorophyll a : b bleibt annähernd konstant ($1 : 4,5 \pm 0,2$). Dagegen ändert sich das Verhältnis von Chlorophyll a : Lutein leicht zugunsten des Luteins (von 1,22 zu 1,01).

Mit der hier benutzten HPLC-Analytik gelingt die quantitative Darstellung von Phaeophytin nur unvollständig. Die Ursache hierfür kann entweder in der Extraktion (Methanol 65 °C) oder aber bei der Auftrennung in der Säule gesucht werden. Außerdem ist diese Methode weitaus aufwendiger, so daß für die weiteren Untersuchungen die spektralphotometrische Bestimmung vorgezogen wurde, zumal im 24-h-Zyklus keine auffälligen Verschiebungen der Pigmentzusammensetzung gefunden wurde.

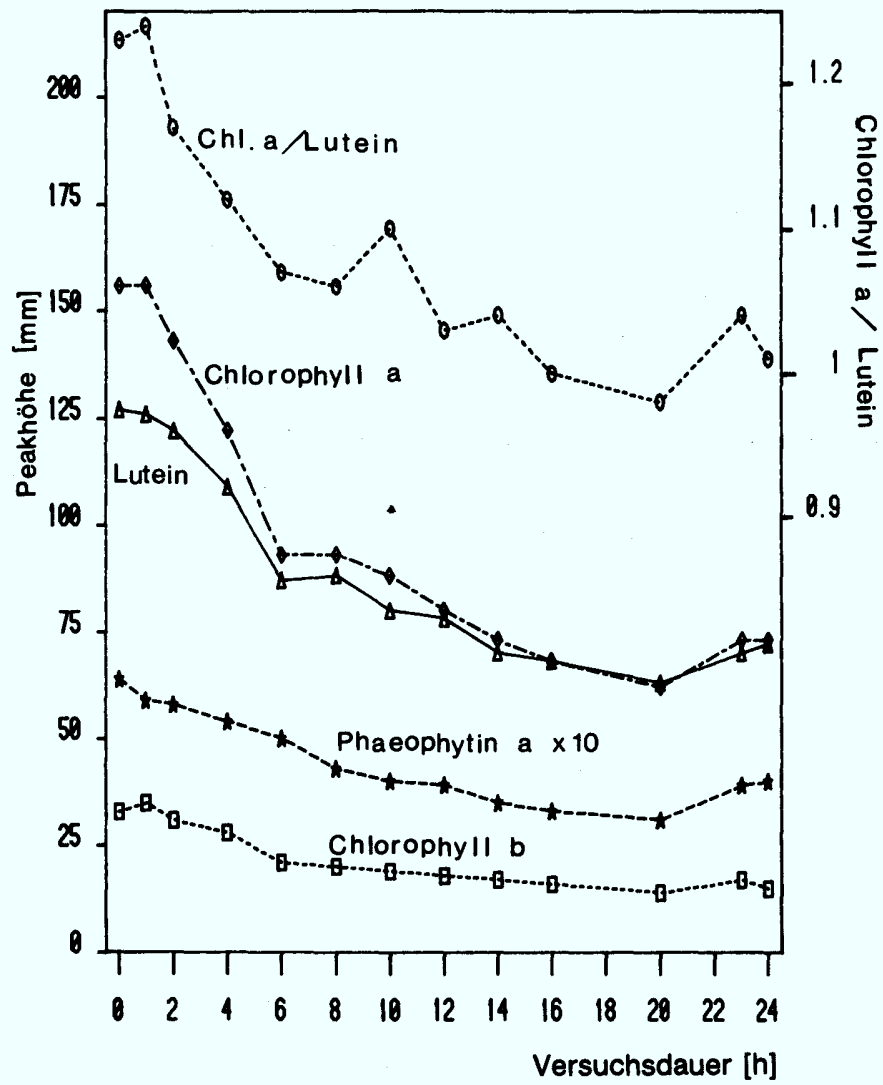


Abb. 12: Kinetik der Pigmentkonzentrationen im Tagesgang gemessen mit der HPLC.

- | | |
|---------------------|-------------------------------------|
| ◇ --- Chlorophyll a | ★ --- Phaeophytin (Peakhöhe x 10) |
| △ --- Lutein | ○ --- Verhältnis Chlorophyll/Lutein |
| □ --- Chlorophyll b | |

4.1.1.3. Algenzellzahl

In der Algenkultur liegt Scenedesmus costato-granulatus als 2-zelliges Coenobium vor. Nur ca. 5 % der Zellen sind Einzelzellen.

4.1.1.3.1. Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl der Algen - berechnet als Summe aus Anzahl der Einzelzellen und der Coenobien mal 2 - nimmt während des 24-h-Zyklus in der Rotatorienkultur hyperbolisch ab, sie gehorcht der gleichen allgemeinen Formel wie die Chlorophyllkonzentration. Die Abnahme der Futterkonzentration durch die Freßtätigkeit filtrierender Organismen ist in der Literatur häufig durch folgende Exponentialfunktion beschrieben worden (z.B. Hirayama & Ogawa 1972). Sie kann auch auf die hier beschriebenen Kulturen angewandt werden.

$$C_{(t)} = C_o * e^{-F * X * t} \quad (6)$$

F und X sind ebenfalls von t abhängig. Ihr Produkt - $F_{(t)}(t) * X(t)$ ist unter den hier gegebenen Bedingungen aber annähernd konstant, daher kann die Algenkonzentration näherungsweise als

$$C_{(t)} = C_o * e^{a_c * t} \quad (7)$$

mit $a_c = -F_{(t)} * X(t)$ beschrieben werden. Für $C_o = 4376$ und $a_c = -0,1865$ sind Meßdaten und Funktion gut korreliert ($r = 0,9950$; Abb. 13). Zwischen Algenzellzahl und Chlorophyllkonzentration besteht erwartungsgemäß eine enge Korrelation ($r = 0,9524$).

4.1.1.3.2. Einzelzellen

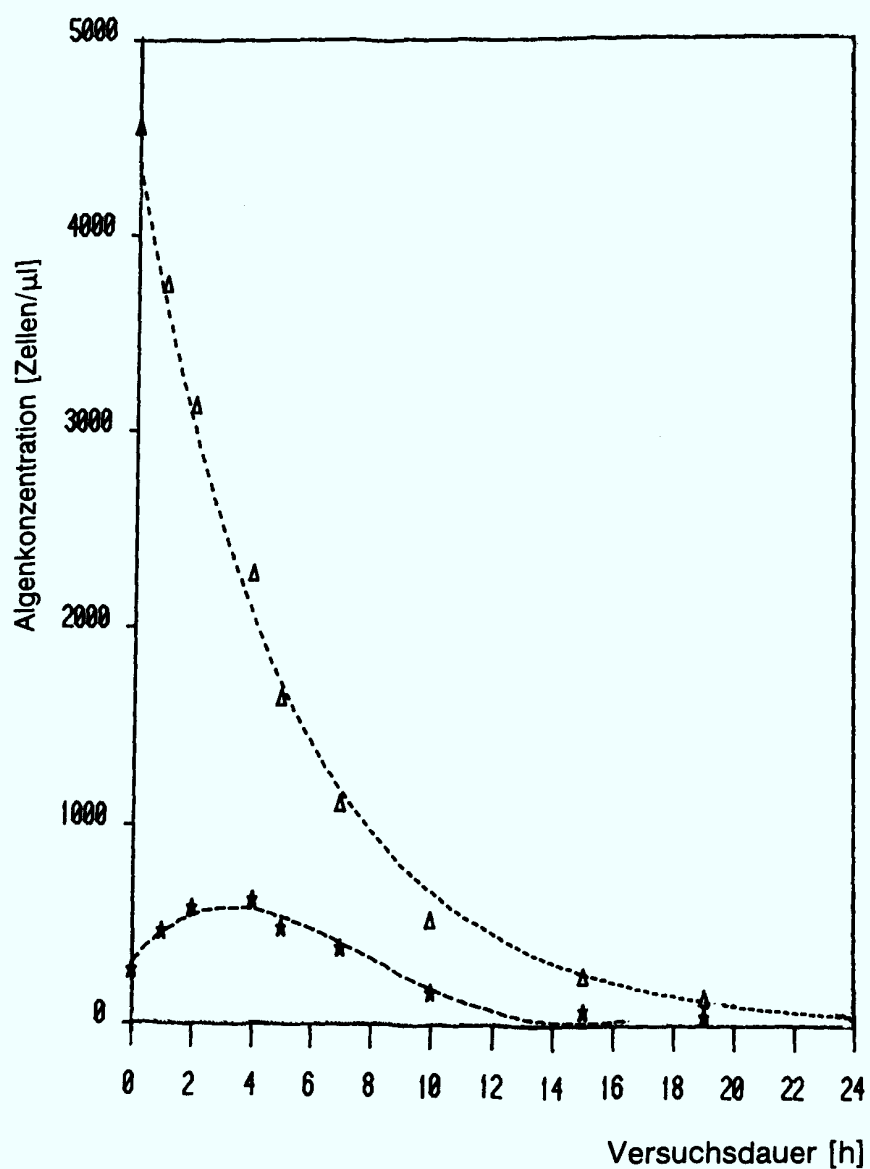
In den ersten Stunden erscheint ein Teil der verschwundenen Algencoenobien als Einzelzellen in der Kultur. Die Zahl der Einzelzellen erreicht nach ca. 4 Stunden ein Maximum und nimmt danach wie die Phaeophytinkonzentration ab. Der Kurvenverlauf läßt sich empirisch als Polynom 4. Grades beschreiben ($r = 0,9824$).

$$E_2(t) = E_{20} + at + bt^2 + ct^3 + dt^4 \quad (8)$$

für $E_{20} = 30,3$; $a = 194$; $b = -4$; $c = 0,24$ und $d = -4,6$.

Die Kinetik der Zahl der Einzelzellen zeigt ein ähnliches Bild wie die des Phaeophytins. Ihr Maximum erscheint aber einige Stunden früher, daher sind beide Parameter nur mäßig korreliert ($r = 0,41$, $P > 95\%$; Abb. 13).

Gegen Ende des Zyklus geht die Gesamtzellzahl gegen null, die wenigen Zellen, die noch gefunden werden, sind zusammen mit Fäzespartikeln ausgeflockt und daher für die Rotatorien schwierig zu erreichen (1,2 % der Zellzahl nach Fütterung).



Freßtätigkeit von Brachionus rubens im 2-stufigen Kultursystem 3:

Abb. 13: Kinetik von Gesamtzellzahl Δ --- und Einzelzellen ($\times 10$) $\star$ ---im Tagesgang. Mittelwerte aus 3 Kulturen.

4.1.2. Respiration der Rotatorien

Die CO_2 -Konzentration im Abgas einer Rotatorienkultur wurde über 24 h gemessen. Die CO_2 -Produktionsrate nimmt hyperbolisch ab - entsprechend der Abnahme der Futterkonzentration. Sie kann durch die folgende, mit Hilfe des Kleinrechners empirisch entwickelte allgemeine Formel ausgedrückt werden:

$$\text{CO}_2(t) = \lim_{t \rightarrow \infty} \text{CO}_2 + \frac{\text{CO}_2(t=1) - \lim_{t \rightarrow \infty} \text{CO}_2}{t} \quad \left[\frac{\text{mg C}}{(1 * \text{h})} \right] \quad (9)$$

$r = 0,9176$

$\lim \text{CO}_2 = 0,55 \text{ mg C/l} * \text{h}$ und $\text{CO}_2(t=1) = 1,38 \text{ mg C/l} * \text{h}$ (s. Abb. 14).

Eine Integration dieser Formel für die Zeit $t = 0$ bis $t = 24$ liefert die pro Tag ausgeschiedene Menge an CO_2 . Diese Menge läßt sich auf eine Aufenthaltszeit hochrechnen. Bei einer Aufenthaltszeit von 4 d erhält man

$$\int_{t=0}^{t=24} \text{CO}_2(t) dt = 65.15 \text{ mg C/4d} \quad (10)$$

Dieser Wert stimmt mit dem aus den Originaldaten graphisch ermittelten überein (65,1 mg/4d).

Durch Division der C-Produktionsrate (9) durch die Tierkonzentration (1) kann die Respirationsrate pro Tier berechnet werden:

$$R(t) = \frac{\text{CO}_2(t)}{X(t)} = \frac{\lim_{t \rightarrow \infty} \text{CO}_2 + \frac{\text{CO}_2(t=1) - \lim_{t \rightarrow \infty} \text{CO}_2}{t}}{X_0 + a_R * t}$$

Nach der Fütterung beträgt die CO_2 -Ausscheidung der Rotatorien knapp 6 ng/Tier * h. Sie sinkt im Verlauf der 24 h hyperbolisch auf knapp 1,5 ng/Tier und Stunde ab.

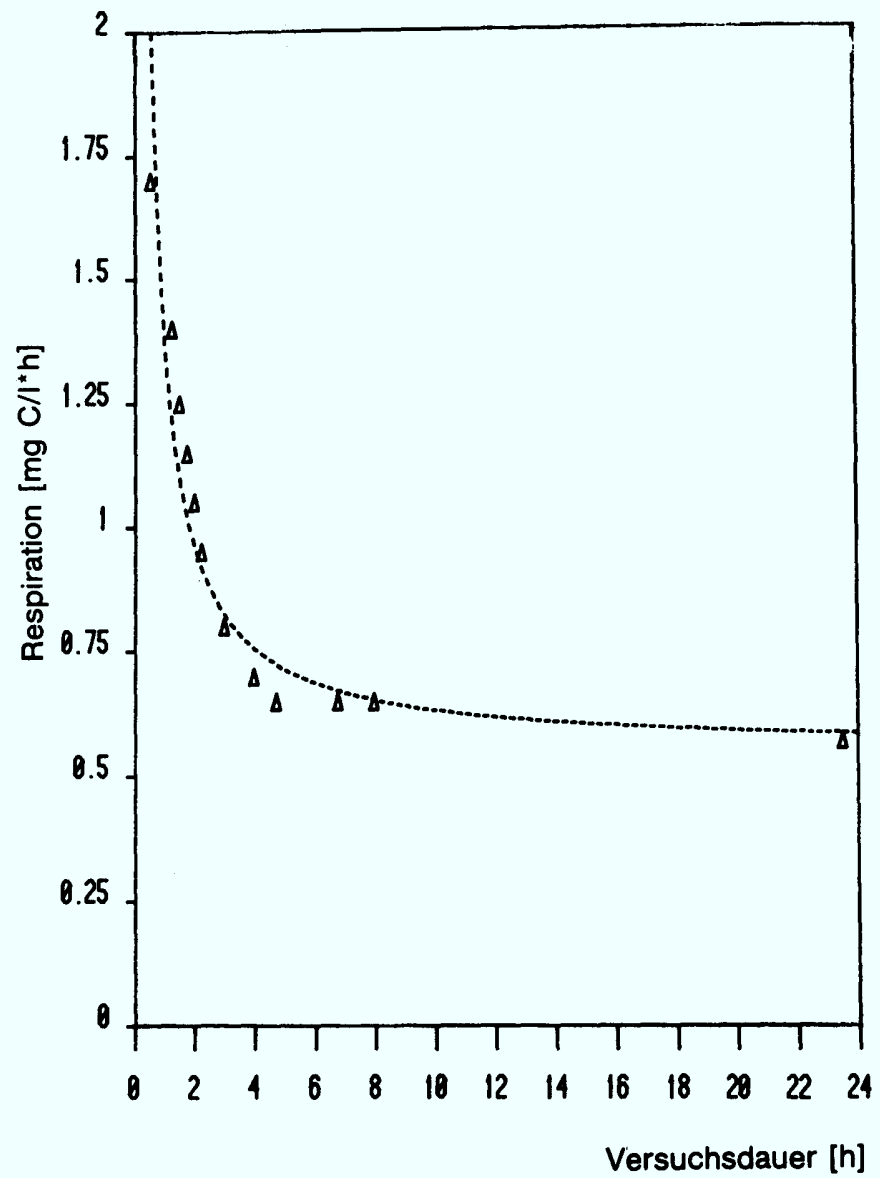


Abb 14: Respiration einer Rotatorienkultur im Tagesgang

4.1.3. Bestimmung von Freß- und Filtrationsraten

4.1.3.1. Filtrationsrate

Die Filtrationsrate, das von einem Tier pro Zeiteinheit leerfiltrierten Wasservolumen, läßt sich nach der Formel der Kinetik der Algenzellzahl (6 + 7) sowie der Rotatorienkonzentration (1) berechnen.

Die dort ermittelte Konstante $a_c = -0,1865$ ist das Produkt aus Rotatorienkonzentration (1) und Filtrationsrate F . Man erhält daraus für F :

$$F(t) = \frac{-a_c}{X(t)} = \frac{-a_c}{X_0 + a_R * t} \quad (12)$$

$$r = 0,7763$$

Die Daten folgen daher theoretisch einer Hyperbel (Abb. 15), im Versuchszeitraum (0 - 24 h) sind die Änderungen daher sehr gering ($0,77 \pm 0,09 \mu\text{l/Tier} * \text{h}$). Auch die Werte während der Zeit der Futterknappheit (nach ca. 8 h) liegen im Vergleich zur Literatur im niedrigen Bereich. Bei extrem geringen Futterkonzentrationen kann F auf über $200 \mu\text{l/Tier} * \text{h}$ ansteigen (Pilarska 1977a).

4.1.3.2. Freßrate

Die Freßrate ($J(t)$), d.h. die Zahl der pro Tier und Zeiteinheit gefressenen Algenzellen läßt sich als Produkt von Filtrationsrate (12) und Algenkonzentration (7) berechnen (Hirayama & Ogawa 1972).

$$J(t) = F(t) * C(t) = \frac{-a_c * (C_0 * e^{a_c * t})}{X_0 + a_R * t} \quad (13)$$

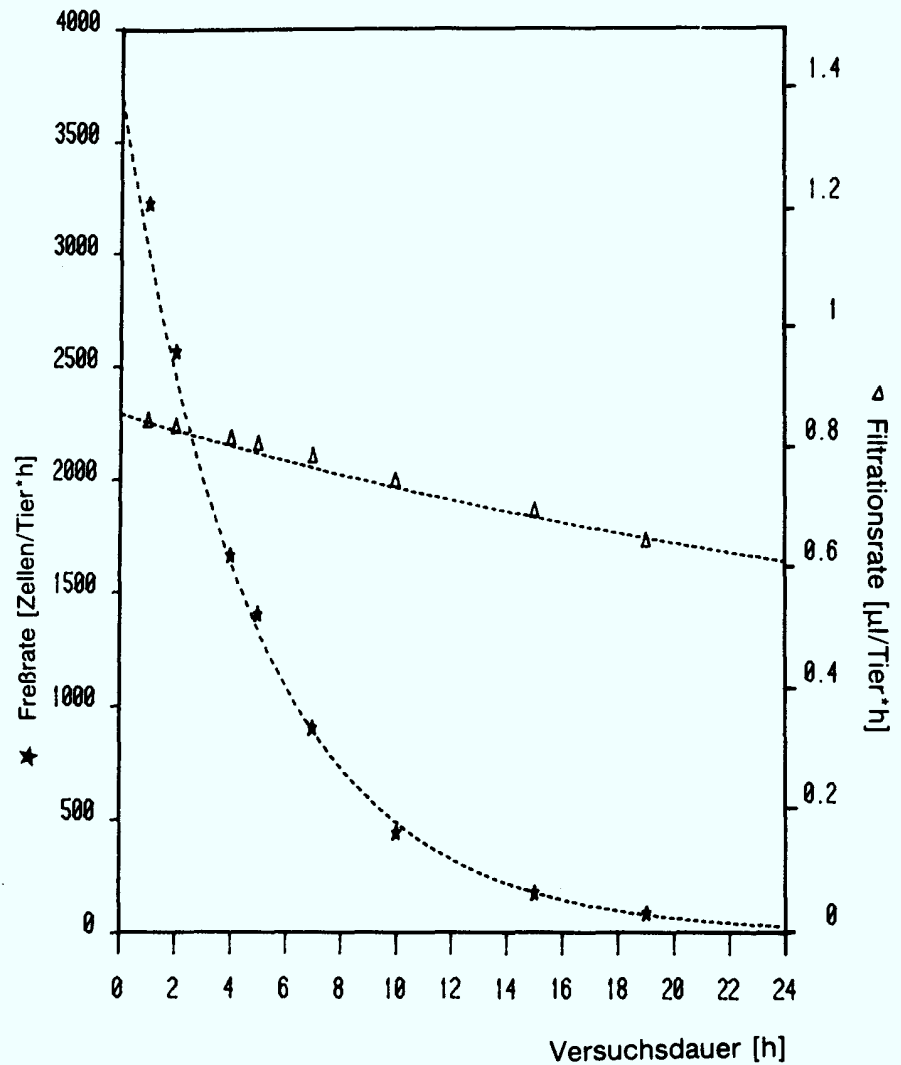


Abb. 15: Freßrate ★ --- und Filtrationsrate Δ --- im Tagesgang.
Mittelwerte aus 3 Kulturen.

Die Korrelation zu den Meßwerten ist sehr gut ($r = 0,9988$). Die Freßrate nimmt während des 24-h-Zyklus stetig ab. Da sich die Filtrationsrate nur geringfügig ändert, kann J auch durch die folgende mit dem Rechner empirisch bestimmte Exponentialfunktion ausgedrückt werden:

$$J_{(t)} > J_0 * e^{-i * t} \quad r = 0,988 \quad (14)$$

$J_0 = 3750$ und $i = 0,2$

4.1.3.3. Abhängigkeit der Freß- und Filtrationsrate von der Algenkonzentration

Filtrations- und Freßrate können auch zeitunabhängig als Variable zur momentanen Algenkonzentration dargestellt werden.

Theoretisch sollte sich die Freßrate hyperbolisch einem Maximalwert annähern (Pilarska 1977a). Im getesteten Konzentrationsbereich (bis $4 * 10^6$ Zellen/ml) steigt J jedoch linear an (Abb. 16).

$$J(C) = J_0 + a_J * C \quad r = 0,9996 \quad (15)$$

mit $J_0 = -46$ und $a_J = 0,86$.

Umgekehrt sollte (nach Pilarska) die Filtrationsrate nach Erreichen eines Maximums auf einen niedrigeren Wert absinken. Tatsächlich reagieren die Rotatorien auf die sinkende Algenkonzentration jedoch nicht mit einer Erhöhung der Filtrationsrate. Vielmehr sinkt sie hyperbolisch mit der Algenkonzentration und strebt für $C = 0$ gegen 0. Sie kann, analog zur Freßrate (13) als Quotient von Freßrate und Algenkonzentration bestimmt werden.

$$F(C) = \frac{J(C)}{C} = a_J + J_0 * \frac{1}{C} \quad r = 0,9620 \quad (16)$$

Diese Ergebnisse zeigen, daß zur Messung von Freß- und Filtrationsraten bei verschiedenen Futterkonzentrationen nur Tiere benutzt werden dürfen, die bei der entsprechenden Futterkonzentration vorkultiviert wurden und daß Futterkonzentration im Versuch aber auch bei der Vorkultur konstant gehalten werden müssen.

Im beschriebenen Fall erhöht sich die Filtrationsrate nach Absinken der Algen nicht, weil eine Phase der Futtersättigung bestand und die Adaptationsphase zu kurz war.

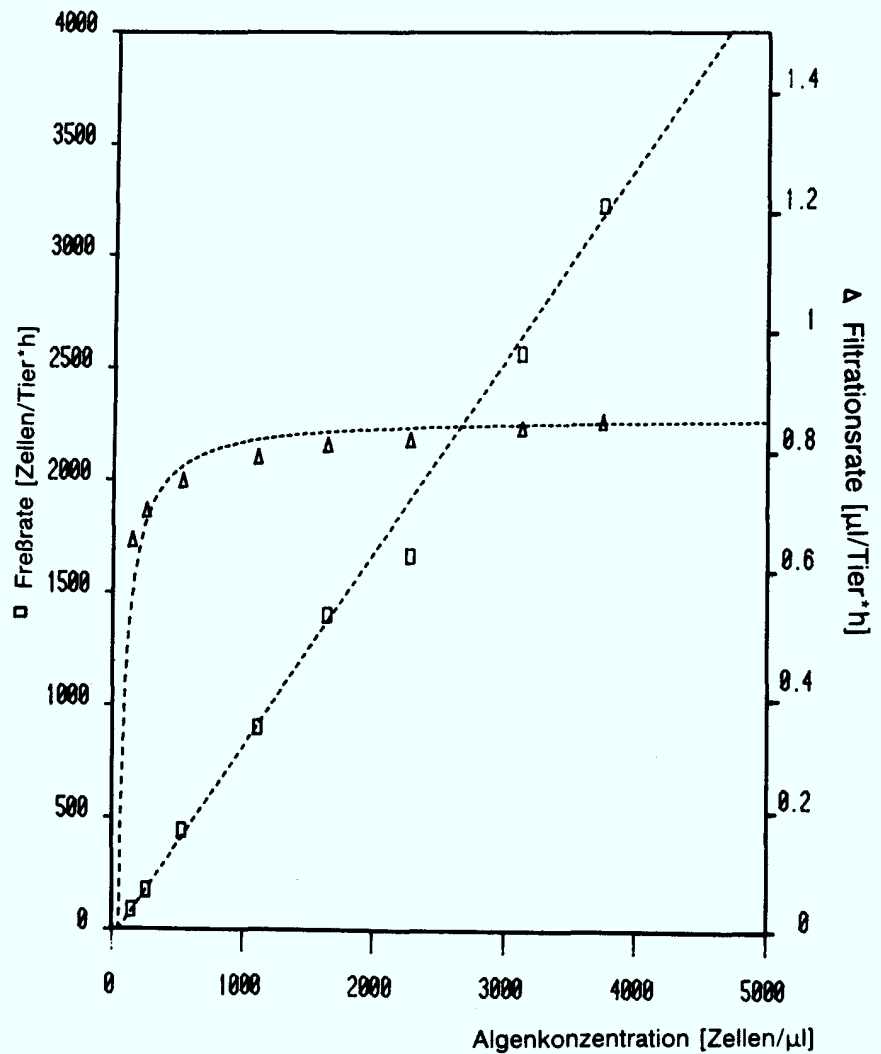


Abb. 16: Freßrate □---□ und Filtrationsrate Δ---Δ als Funktion der Algenkonzentration. Mittelwerte aus 3 Kulturen.

TABELLE 4: Tagesgang/Simulation

Parameter	allgemeine Formel	Konstanten	Korrelation
1. Rotatorienkonzentration	$X(t) = X_0 + a_R \cdot t$	$X(t) = 221 + 3,76 \cdot t$	$r = 0,996$
2. Rotatorieneier	$E(t) = E_0 + a_E \cdot t$	$E(t) = 39 + 0,8 \cdot t$	$r = 0,890$
3. Gesamtpigment	$G(t) = G_0 + a_G \cdot t$	$G(t) = 1758 - 55 \cdot t$	$r = 0,998$
4. Chlorophyll	$Ch(t) = Ch_0 \cdot e^{-a \cdot t}$	$Ch(t) = 1234 \cdot e^{-0,0675 \cdot t}$	$r = 0,998$
5. Phaeophytin	$Ph(t) = G(t) - Ch(t)$	$Ph(t) = 1758 - 55 \cdot t - 1234 \cdot e^{-0,0675 \cdot t}$	$r = 0,883$
6. Zellzahl	$C(t) = C_0 \cdot e^{-a_i \cdot t}$	$C(t) = 4376 \cdot e^{-0,1865 \cdot t}$	$r = 0,9950$
7. Einzelzellen	$E_2(t) = E_{20} + at + bt^2 + ct^3 + dt^4$	$E_2(t) = 30,3 + 19,4t - 4t^2 + 0,24t^3 - 4,6t^4$	$r = 0,9824$
8. CO ₂ -Exkretion	$CO_2(t) = \lim_{t \rightarrow \infty} CO_2 + \frac{\lim_{t \rightarrow \infty} CO_2 - CO_2(t=1)}{t}$	$CO_2(t) = 0,55 + \frac{0,83}{t}$	$r = 0,9176$
9. Filtrationsrate	$F = \frac{-ac}{X(t)} = \frac{-ac}{X_0 + a_{Rot} \cdot t}$	$F = \frac{-0,1865}{221 + 3,76 \cdot t}$	$r = 0,7766$
10. Freßrate	$I(t) = F(t) \cdot C(t) = \frac{ac \cdot C_0 \cdot e^{-ac \cdot t}}{X_0 + a_R \cdot t}$	$I = \frac{-0,1865 \cdot 4376 \cdot e^{-0,1865 \cdot t}}{221 + 3,76 \cdot t}$	$r = 0,988$

4.1.4. Populationsdynamik von Brachionus rubens

4.1.4.1. Wachstumsraten in den Rotatorienkulturen

Im Chemostat werden bei kontinuierlicher Substratzufuhr die Organismen unter der Annahme, daß kein Wachstum erfolgt, exponentiell ausgespült (z.B. Pirt 1975):

$$X = X_0 * e^{-D * t}$$

Im Steady State wird diese Ausspülrate durch die Wachstumsrate der Organismen kompensiert:

$$\mu = - D$$

In der periodisch diskontinuierlich verdünnten Kultur wird die Biomasse, wiederum unter der Annahme, daß kein Wachstum erfolgt, folgendermaßen ausgespült (s. Abb. 17):

$$X_{(t)} = X_0 (1 - d)^n * t$$

mit: d = Verdünnungsfaktor

n = Anzahl der Verdünnungen pro Tag

t = Tage

Da d während aller Versuche konstant auf 0,25/Verdünnung festgesetzt wurde, ist die Wachstumsrate lediglich eine Funktion von n.

$$\mu = \ln (1 - d)^n \quad (/d)$$

In diesem System wird ein "Quasi-Steady State" erreicht; die Ausspülrate wird durch die Wachstumsrate der Organismen kompensiert.

Die Verdopplungszeit der Organismen beträgt dann:

$$TD = \frac{\ln 2}{\ln (1 - d)^n} \quad (d)$$

Für die untersuchten Durchflußraten sind Aufenthaltszeiten, Wachstumsraten und Verdopplungszeiten in der Tabelle gegenübergestellt.

TAB. 5: Wachstumsraten bei diskontinuierlicher Verdünnung

Verdünnungen/Tag	Aufenthaltszeiten (h)	μ (1/h)	TD (h)
1	96	0,012	58
2	48	0,024	29
3	32	0,036	19
4	24	0,048	14
5	19	0,060	12

4.1.4.2. Auswirkungen der Generationsdauer der Rotatorien auf die Vermehrungsraten in kontinuierlicher Kultur

Die Vermehrung der Rotatorien in kontinuierlichen Kulturen sollte, da Streßfaktoren wie Temperaturschwankungen und Medienzusammensetzung ausschneiden - nur von der Futterkonzentration und Temperatur abhängen. Der Einfluß der Temperatur ist bereits von Halbach (1970) quantifiziert worden. Danach dauert bei 20 °C die Phase vom Ablegen des Eies bis zum Schlupf bei B. calyciflorus 12 h, die Juvenilphase, d.h. die Zeit vom Schlüpfen bis zum Anheften des 1. Eies 2 Tage, die fertile Phase 8,5 Tage und eine senile Phase von 2 Tagen, in denen die Tiere kein Ei mehr legen, beendet den Lebenszyklus (Abb. 18).

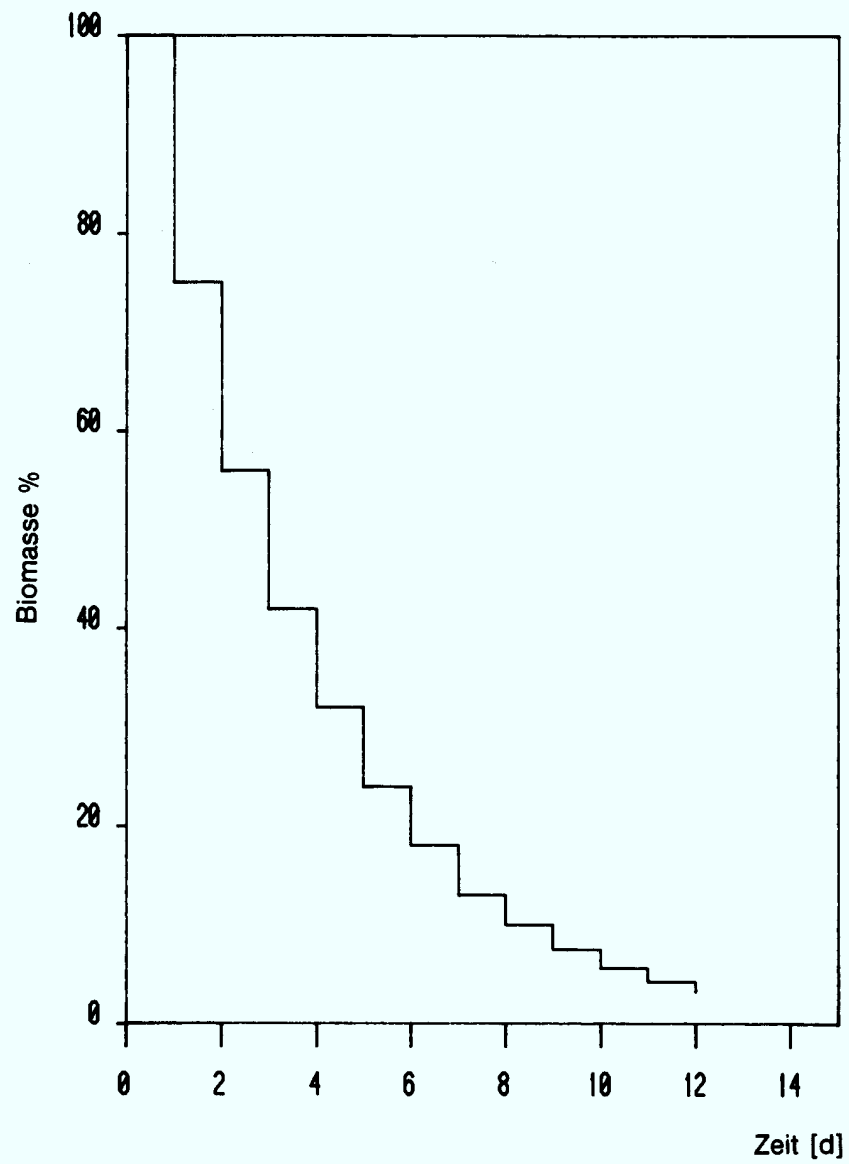


Abb. 17: Theoretische Ausspülrate der Biomasse im diskontinuierlich verdünnten Kultursystem bei 4 Tagen Aufenthaltszeit.

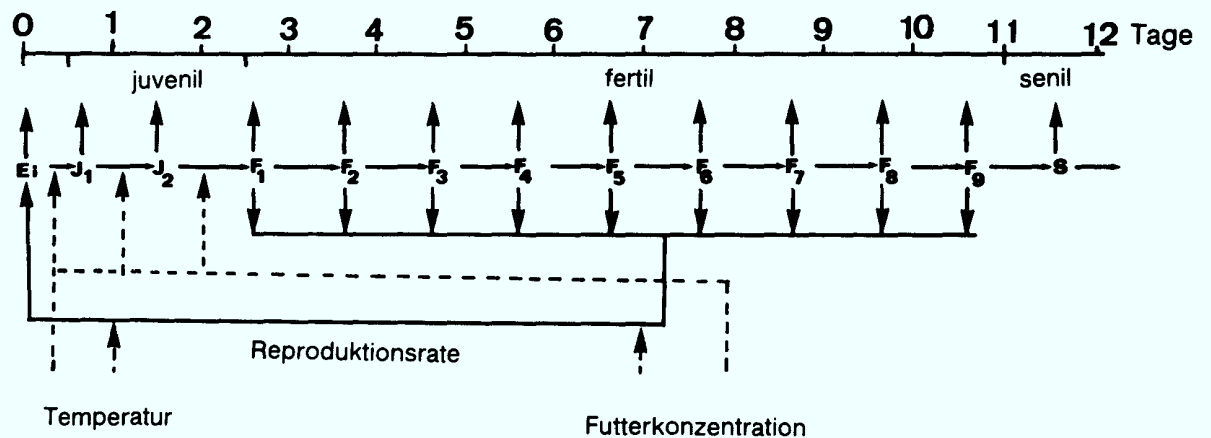


Abb. 18: Altersstruktur einer Rotatorienpopulation im Chemostaten

In der kontinuierlichen Kultur werden Tiere aller Lebensphasen gleichermaßen ausgespült, nur ein Teil der Tiere erreicht daher ein fortpflanzungsfähiges Alter. Für eine Aufenthaltszeit von 4 Tagen im diskontinuierlich verdünnten Kultursystem gibt Abb. 17 die Zahl der Tiere in Abhängigkeit vom Alter an. Daraus läßt sich der Prozentsatz der Gesamtpopulation berechnen, der sich in jeweils einer der oben genannten Lebensphasen befindet. Bei 4 Tagen Aufenthaltszeit sind 45 % der Population noch nicht fortpflanzungsfähig, 54 % der Tiere sind in ihrer fertilen Phase und 1 % hat bereits die senile Phase erreicht. 34 % aller Tiere (63 % der fertilen Tiere) legen pro Tag ein Ei, d.h. bei 12 h Immaturationszeit müssen ständig 17 % der Tiere ein Ei angeheftet tragen (23 % bei 16 h Immaturationszeit).

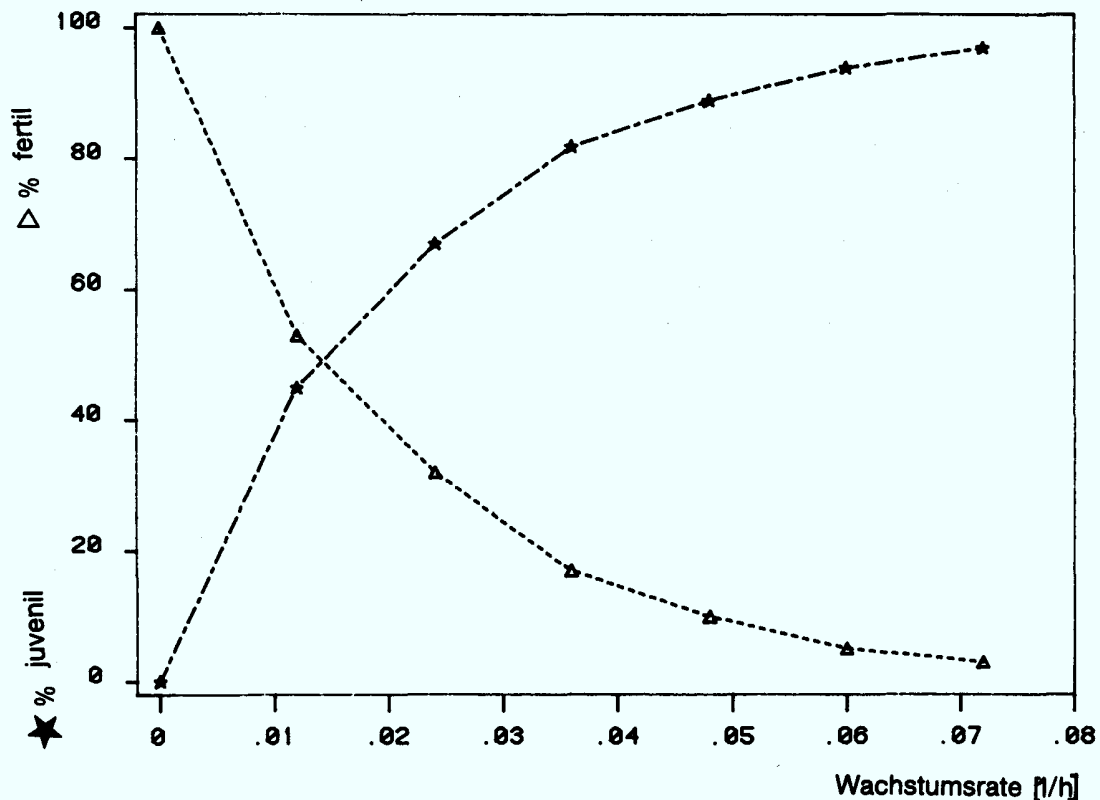


Abb. 19: Altersstruktur einer Rotatorienpopulation als Funktion der Wachstumsrate. Simulation nach den Lebensdaten aus Halbach (1970) für 20 °C.

Die hier nach Halbach (1970) berechneten Faktoren stimmen mit meinen Meßwerten auf $\pm 10\%$ aus den Kulturen mit 4 Tagen Aufenthaltszeit gut überein. Bei kurzer Aufenthaltszeit gelang es jedoch nicht, die theoretische Verteilung zu verifizieren, weil dann nur ein sehr kleiner Teil der Tiere die fertile Phase erreichen würde (Abb. 19) und - um ein Ausspülen der Kulturen zu verhindern - in sehr kurzen Abständen Eier legen müßte. Tatsächlich wurde direkt nach der Erhöhung der Durchflußrate ein erhöhter Anteil von Tieren, die mehrere Eier gleichzeitig angeheftet trugen, gefunden. Bei der Verkürzung der Aufenthaltszeit von 32 auf 24 h trugen einige Tiere bis zu 6 angeheftete Eier unterschiedlichen Alters. Dieser Zustand verschwand jedoch

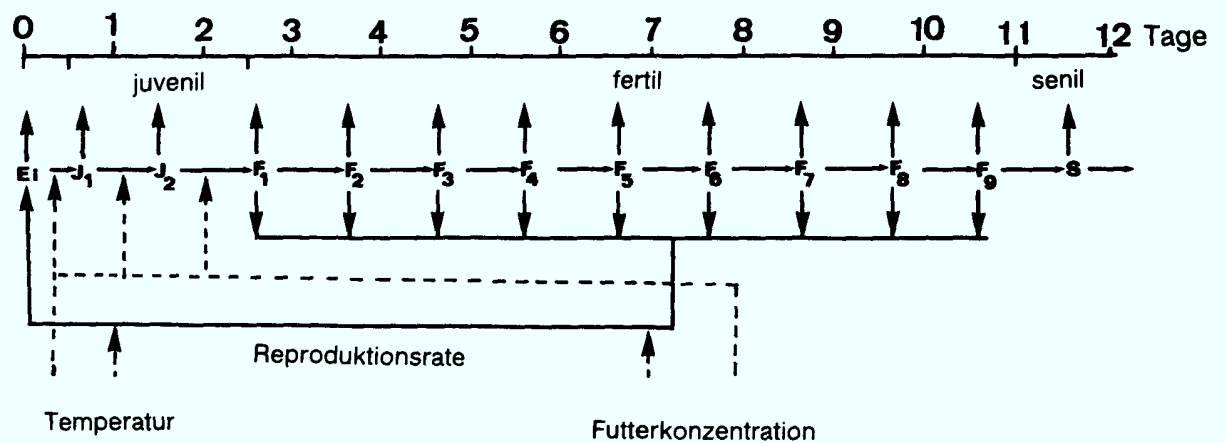


Abb. 18: Altersstruktur einer Rotatorienpopulation im Chemostaten

In der kontinuierlichen Kultur werden Tiere aller Lebensphasen gleichermaßen ausgespült, nur ein Teil der Tiere erreicht daher ein fortpflanzungsfähiges Alter. Für eine Aufenthaltszeit von 4 Tagen im diskontinuierlich verdünnten Kultursystem gibt Abb. 17 die Zahl der Tiere in Abhängigkeit vom Alter an. Daraus läßt sich der Prozentsatz der Gesamtpopulation berechnen, der sich in jeweils einer der oben genannten Lebensphasen befindet. Bei 4 Tagen Aufenthaltszeit sind 45 % der Population noch nicht fortpflanzungsfähig, 54 % der Tiere sind in ihrer fertilen Phase und 1 % hat bereits die senile Phase erreicht. 34 % aller Tiere (63 % der fertilen Tiere) legen pro Tag ein Ei, d.h. bei 12 h Immaturationszeit müssen ständig 17 % der Tiere ein Ei angeheftet tragen (23 % bei 16 h Immaturationszeit).

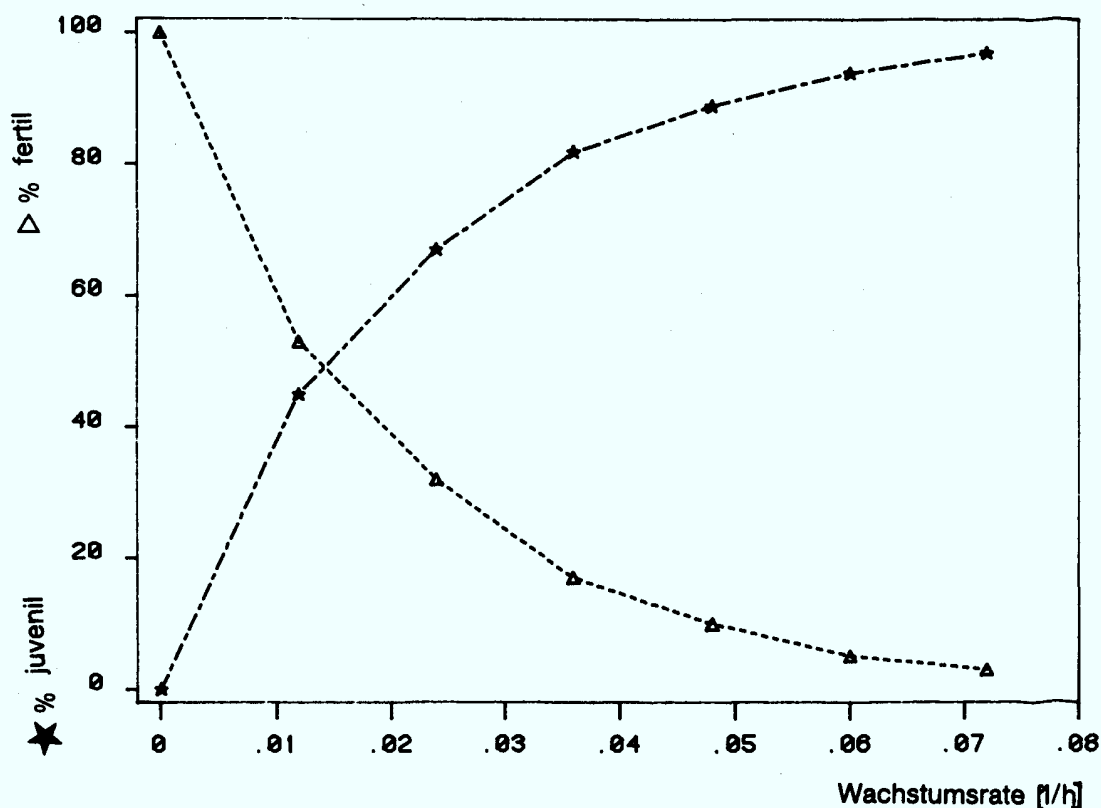


Abb. 19: Altersstruktur einer Rotatorienpopulation als Funktion der Wachstumsrate. Simulation nach den Lebensdaten aus Halbach (1970) für 20 °C.

Die hier nach Halbach (1970) berechneten Faktoren stimmen mit meinen Meßwerten auf $\pm 10\%$ aus den Kulturen mit 4 Tagen Aufenthaltszeit gut überein. Bei kurzer Aufenthaltszeit gelang es jedoch nicht, die theoretische Verteilung zu verifizieren, weil dann nur ein sehr kleiner Teil der Tiere die fertile Phase erreichen würde (Abb. 19) und – um ein Ausspülen der Kulturen zu verhindern – in sehr kurzen Abständen Eier legen müßte. Tatsächlich wurde direkt nach der Erhöhung der Durchflußrate ein erhöhter Anteil von Tieren, die mehrere Eier gleichzeitig angeheftet trugen, gefunden. Bei der Verkürzung der Aufenthaltszeit von 32 auf 24 h trugen einige Tiere bis zu 6 angeheftete Eier unterschiedlichen Alters. Dieser Zustand verschwand jedoch

nach einigen Wochen Wachstums bei gleichbleibender Verdünnungsrate, und es fanden sich nur noch Tiere, die 1 - 3 Eier trugen. Die Tiere hatten demnach ihre Entwicklungsdauer an die verkürzte Aufenthaltszeit angepaßt. Dies ist nur als Reaktion auf ein größeres Futterangebot zu deuten. Alle Lebensstadien der Rotatorien sind von dieser Beschleunigung betroffen. Die Immaturationsdauer der Eier sinkt mit zunehmender Wachstumsrate. Sie kann aus dem Quotient Eier/Tier (s. 4.4.4.1.) als Funktion der Wachstumsraten berechnet werden (Abb. 20). Sie verkürzt sich von 15 Std. bei 4 Tagen Aufenthaltszeit (s. 4.1.4.2.) auf ca. 8 Std. bei einer Aufenthaltszeit von 24 h.

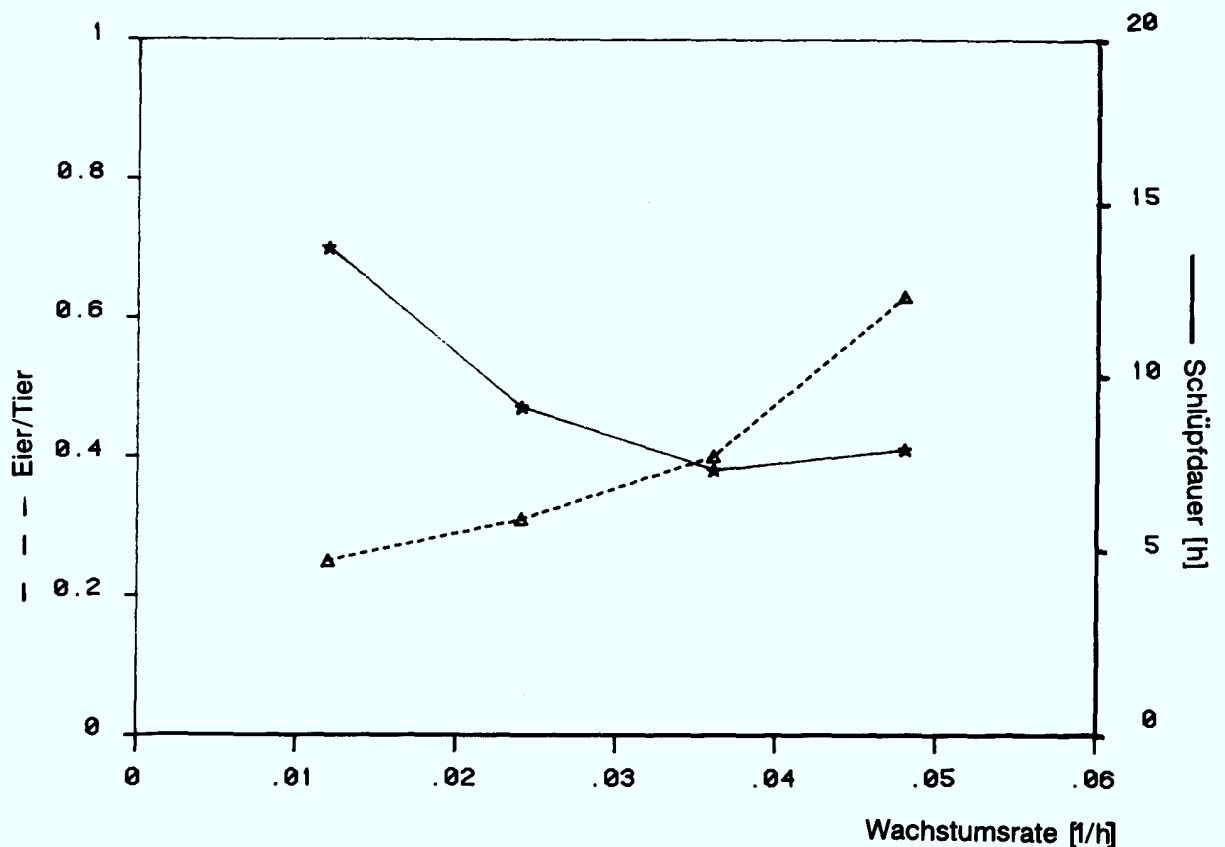


Abb. 20: Schlüpfdauer und Zahl der Eier pro Tier als Funktion der Wachstumsrate.

Auch die juvenile Phase wird - bedingt durch die bessere Futterversorgung - mit zunehmender Wachstumsrate verkürzt. Bei 4 Tagen Aufenthaltszeit beträgt sie rund 48 Stunden, bei 24 Tagen Aufenthaltszeit nur noch 20 Stunden (wenn alle fertilen Tiere im Mittel 2,5 Eier angeheftet tragen). Die Intervalle zwischen den Eiablagen der fertilen Tiere verkürzen sich von 37 Stunden bei 4 Tagen Aufenthaltszeit auf 3,2 h bei 24 h Aufenthaltszeit.

Die Generationszeit der Tiere, d.h. die Zeit von der Eiablage bis zur ersten Eiablage der nächsten Generation beträgt bei 4 Tagen Aufenthaltszeit ca. 63 h, bei 24 h Aufenthaltszeit nur noch 28 Stunden. Diese Verquickung von Wachstumsrate und Entwicklungsdauer der einzelnen Lebensstadien über das Futterangebot ermöglicht den Tieren ihre enorme Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Lebensbedingungen und vermehrt so ihre entwicklungsphysiologischen Freiheitsgrade.

4.1.4.3. Nachweis einer homogenen Altersverteilung der Rotatorien anhand der Schlüpftrate

Synchronität

Da die Rotatorien im 24 h-Rhythmus gefüttert wurden und die Algenkonzentration in der Kultur demzufolge starken periodischen Schwankungen unterworfen war, konnte vermutet werden, daß sich auch die Vermehrung der Rotatorien an diesen Rhythmus anpaßt, also (zumindest teilweise) synchron erfolgte.

Die Altersverteilung der an die Weibchen angehefteten Eier gibt Aufschluß über eine eventuelle Synchronität der Vermehrung. Träten alle "Altersklassen" mit gleicher Häufigkeit auf, so wäre die Kultur asynchron, wiese dagegen ein hoher Prozentsatz der Eier (wenigstens zu bestimmten Tageszeiten) das gleiche Alter auf, so ließe dieser Befund auf eine Synchronität der Vermehrung schließen.

Edmondson (1965, 1975) beschreibt eine einfache Methode zur Bestimmung der Altersverteilung von Rotatorieneiern aus Freiland- oder Laborproben. Dabei geht er davon aus, daß die Zeitspanne vom Legen bis zum Schlüpfen unter konstanten Umweltbedingungen annähernd konstant ist. Eine größere Zahl eiertragender Weibchen wurde isoliert, unter möglichst den gleichen Bedingungen wie in der Kultur inkubiert (Temperatur, Futter) und die Zeitspanne bis zum Schlüpfen des Tieres bestimmt.

Der Prozentsatz geschlüpfter Tiere wird gegen die Zeit aufgetragen. Wenn die Altersverteilung homogen ist (asynchrone Vermehrung), sollte die Schlüpftrate konstant sein, und der Zusammenhang zwischen Schlüpfzeit und geschlüpften Tieren linear. Werden dagegen andere Verteilungen gefunden, zeigt die Schlüpftrate (Ableitung der Kurve) ein Maximum oder Minimum. Die Vermehrung dieser Populationen erfolgt zumindest teilweise synchron. Eine völlige Synchronie liegt vor, wenn die Kurve einen plötzlichen Sprung aufweist und während dieser Zeit nahezu alle Eier schlüpfen.

Versuchsansatz:

192 eiertragende Weibchen von B. rubens aus Kulturen mit 4 Tagen Aufenthaltzeit wurden auf Mikrokulturplatten in jeweils 0,1 ml Algensuspension inkubiert. Die Temperatur betrug 20 °C. Im Abstand von 30 Minuten wurden die geschlüpften Tiere registriert. Dies wurde so lange fortgeführt, bis alle Tiere geschlüpft waren. Da die Schlüpfzeit unter 24 Stunden lag, wurde der Versuch mit zwei verschiedenen Startzeiten durchgeführt (10.00 und 18.00 Uhr). Nur so konnte der Verlauf der Schlüpfkurve über den gesamten 24-Stunden-Zyklus beschrieben werden.

Ergebnis:

Der Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz geschlüpfter Tiere und der Schlüpfdauer erwies sich als annähernd linear, die Vermehrung der Rotatorien erfolgt asynchron. Zwischen beiden Versuchsreihen (10.00 und 18.00 Uhr) kann mit Hilfe des t-Testes kein Unterschied festgestellt werden. Zur weiteren Auswertung wurden sie daher zusammengefaßt (n = 384 Tiere).

Die Regressionsgerade (Abb. 21) schneidet die Zeitachse bei 15,2 h (100 % geschlüpft). Die Steigung der Geraden beträgt 6,5 %/h, die Korrelation zwischen Schlupfrate und Zeit ist sehr gut ($r = 0,9975$).

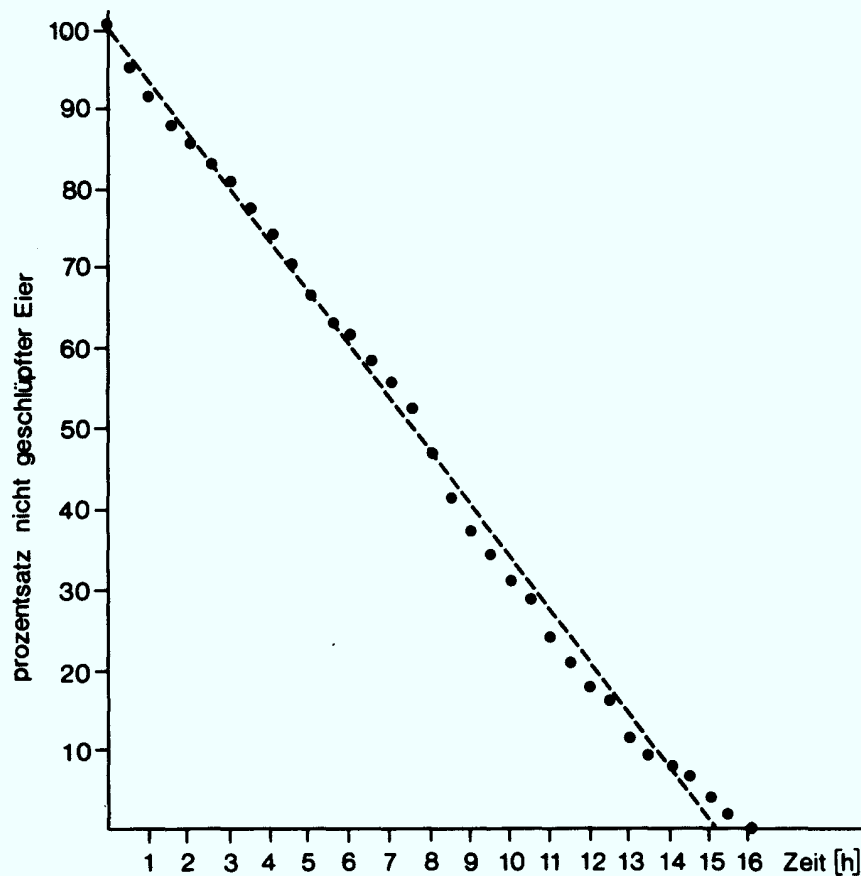


Abb. 21: Schlüpfkurve

$T = 20^{\circ}\text{C}$, $N = 384$ Tiere

$r = 0,9975$, $T = 15,2$ h, $m = 6,5$ %/h

Der Schnittpunkt mit der Zeitachse ist identisch mit der Entwicklungsdauer der Eier, da die Eier, die zuletzt schlüpften, theoretisch kurz vor der Isolation der Mütter gelegt wurden. Die Entwicklungsdauer der Eier dauert daher 15,2 Stunden. Diese Zeit ist allerdings mit einem Unsicherheitsfaktor von 20 Minuten behaftet, weil es so lange dauerte, die jeweils 96 Tiere einer Versuchsreihe auf die Mikrotiterplatten zu überführen.

Die Häufigkeitsverteilung der Schlüpfrate (Tiere/30 min) zeigt das Bild einer Gaußschen Normalverteilung. Bei Auftragung auf Wahrscheinlichkeitspapier entsteht eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9860$.

4.1.5. Nachweis einer Abhängigkeit des Aufschlusses der Algen durch die Rotatorien von der Freßdauer

Die Konzentrationen des Phaeophytins sowie der Einzelzellen zeigen in der Rotatorienkultur im Verlauf des 24 h-Zyklus eine Maximumskurve. In den ersten 6 - 8 Stunden nehmen beide Konzentrationen stark zu, um danach wieder abzusinken. Dies könnte auf eine unvollständige Verdauung der Algen in den ersten Stunden nach der Fütterung zurückzuführen sein.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden hungrige Rotatorien mit Algen gefüttert. Nach einer definierten Freßdauer (30 min - 16 Std) wurden die Rotatorien von den restlichen Futteralgen abgetrennt (50 μ m Sieb), mit Rotatorienmedium gewaschen und 20 Minuten im algenfreien Medium inkubiert. In dieser Zeit wird der Darm völlig entleert (Dauer einer Darmpassage ca. 15 Min, Starkweather 1978). Nach Abtrennung der Rotatorien wurden die Fäzes mittels Zentrifugation konzentriert und mikroskopisch untersucht.

Das Ergebnis ist in der Fotoserie dargestellt. Nach 30 Minuten Freßzeit bestehen die Fäzes aus ungeflochtenen Algenzellen, ein Großteil der Zellen sieht völlig intakt aus, einige Coenobien sind in Einzelzellen zerfallen. Nach einer Freßdauer von einer Stunde bilden die Fäzes nach der Zentrifugation stabile Flocken, ein Teil der Zellen ist bereits desintegriert, der Anteil intakter 2er Coenobien nimmt ab. Dieser Prozeß setzt sich in den folgenden Stunden fort. Die Flocken enthalten mehr und mehr Zellbruchteile, nach 16 h Freßdauer sind nur noch vereinzelte intakte Algenzellen in den Fäzesflocken enthalten.

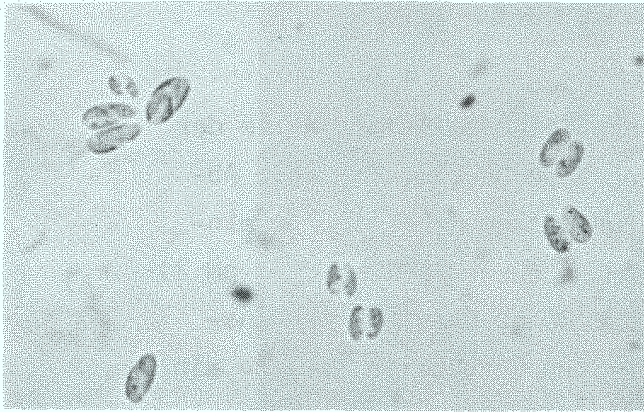


Foto 5: Algenkultur

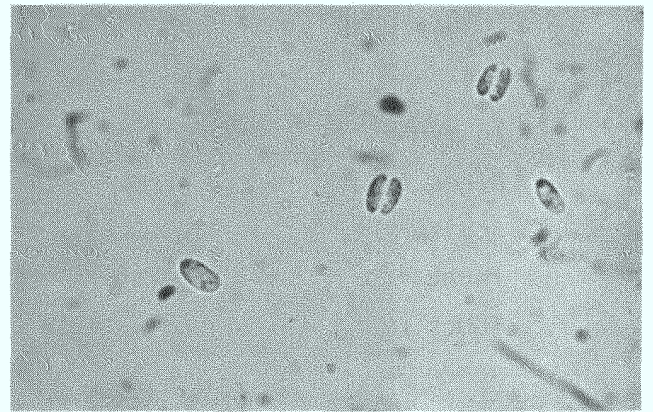


Foto 6: 30 min

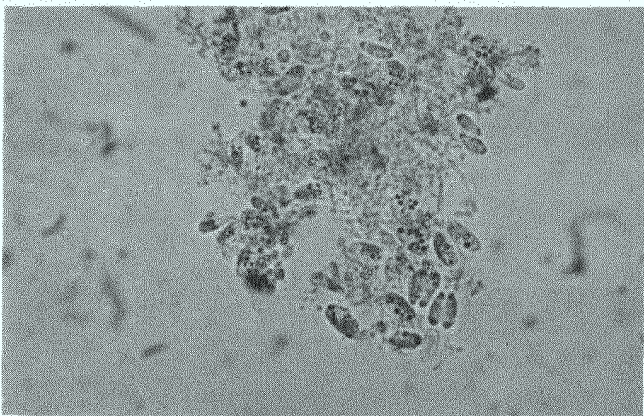


Foto 7: 1 h

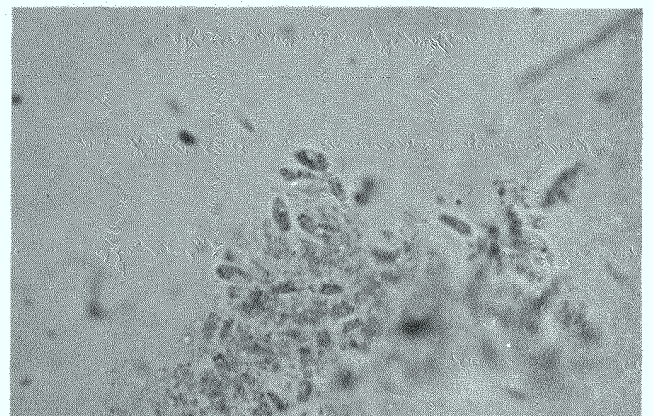


Foto 8: 5 h

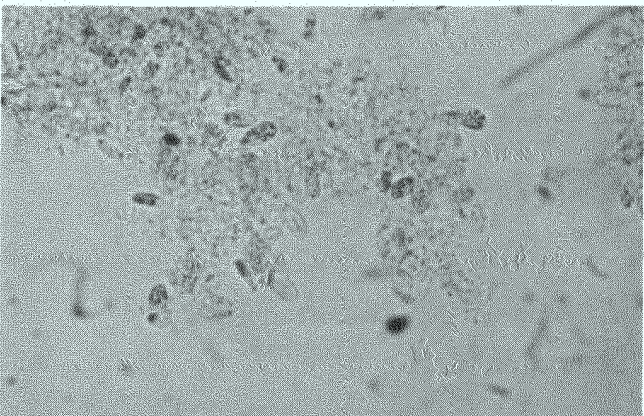


Foto 9: 8 h

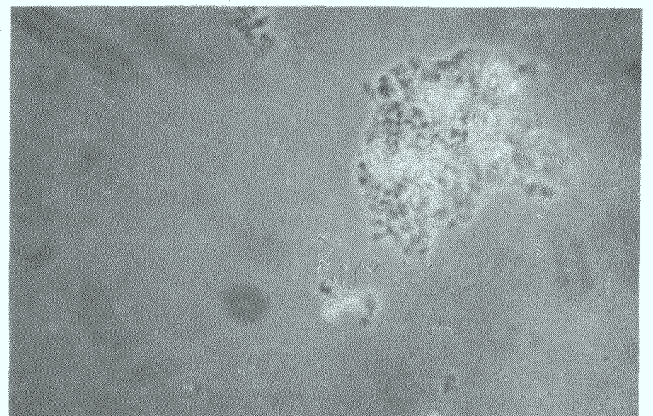


Foto 10: 16 h

Fotos 5 - 10: Fotoserie zur Freßeffektivität. Phasenkontrastaufnahmen
der Fäzes nach verschiedenen Freßzeiten. $\longrightarrow$ 10 μ m

4.1.6. Abschätzung des pH-Wertes im Verdauungstrakt von Brachionus rubens

In den Rotatorienkulturen liegt ständig ein Teil des Chlorophylls der Algen als Phaeophytin vor. Die Bildung von Phaeophytin, d.h. die Abspaltung des Magnesium-Ions, wird im sauren Milieu erheblich vereinfacht. Eine Überführung der intakten Algen in saures Milieu (bis pH 2) führt nicht zu einer meßbaren Phaeophytinbildung. Nach dem mechanischen Aufschluß der Algen durch den Mastax der Rotatorien, sollte ein saurer pH-Wert im Verdauungstrakt die Phaeophytinbildung fördern.

Da keine entsprechenden Mikroelektroden zur Verfügung standen, wurden pH-Indikatoren eingesetzt, um das pH abzuschätzen.

Benutzt wurden:

1. Thymolblau (Umschlag bei 2,0)
2. Kongorot (4,1)
3. Bromthymolblau (6,9)
4. Methylrot (5,3)
5. Neutralrot (7,2)

Die Indikatoren 1, 3 und 4 erwiesen sich als toxisch für die Rotatorien, eine Lebendfärbung war unmöglich. Die abgetöteten Tiere färbten sich mit Thymolblau gelb ($> 4,1$) und mit Bromthymolblau ebenfalls gelb ($< 6,9$). Mit Methylrot wurde keine Färbung erzielt. Hingegen erlaubten Kongorot und Neutralrot eine Vitalfärbung. Beide Farbstoffe färbten den Inhalt des Magen-Darm-Traktes der Tiere intensiv rot. Die rote Färbung wurde auch erzielt, wenn Kongorot blau angesetzt wurde ($> \text{pH } 3,5$) und Neutralrot orange ($\text{pH } 8,0$) (Fotos 11 + 12).

Der pH-Wert im Darm der Tiere liegt daher zwischen den Umschlagpunkten der zwei Indikatoren, d.h. zwischen pH 7,2 und pH 4,1.

Unter diesen Bedingungen wird die Magnesium-Abspaltung aus freigesetztem Chlorophyll gefördert, so daß der leicht saure pH-Wert die Phaeophytinbildung fördern könnte.



Foto 11: Anfärbung des Magen-Darm-Inhaltes von Brachionus rubens.
Kongorot

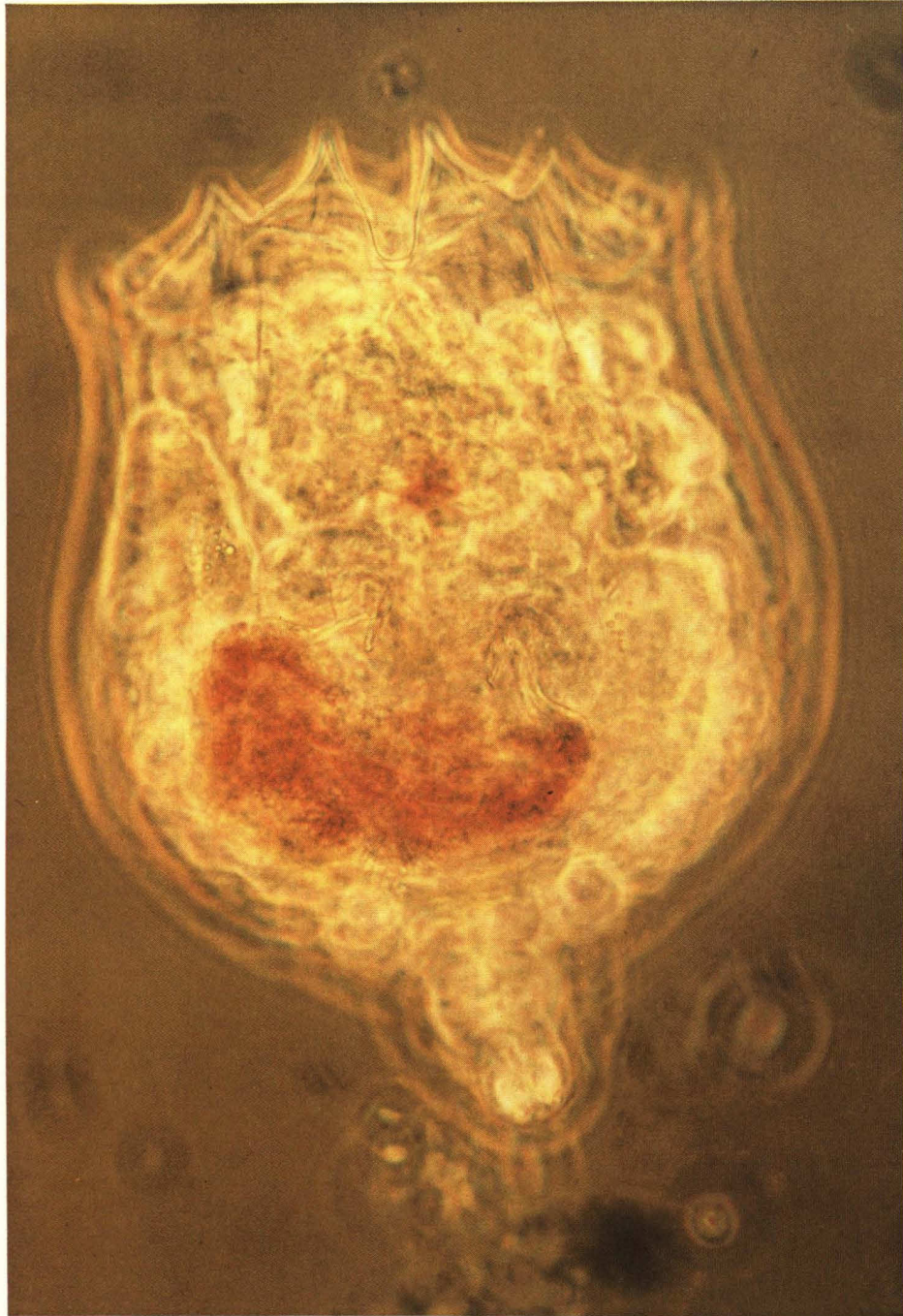


Foto 12: Anfärbung des Magen-Darm-Inhaltes von Brachionus rubens.
Neutralrot

4.2. Fütterung von Brachionus rubens mit Albazod

Mit den folgenden Versuchen soll demonstriert werden, daß sich eine Rotatorienkultur eignet, die Biomasse aus dem Ablauf eines mit Schweinegülle belasteten Algengrabens zu entfernen. Der Einfluß dieser Reinigungsstufe auf die Ablaufqualität sowie die Produktion der Rotatorien wird registriert.

4.2.1. Aufbau des Versuchssystems

Für unsere Fütterungsversuche an Rotatorien benutzten wir den Ablauf eines im Freiland betriebenen Algengrabens (Foto 13), der zur Reinigung von Schweinegülle benutzt wurde (Groeneweg et al. 1980). Dieser besteht aus einem flachem Endlosgerinne vom Rennbahntyp (Stengel 1970) mit einer Oberfläche von ca. 10 m^2 . Die Albazod-Suspension wird kontinuierlich mit einem Schaufelrad bewegt, um ein Absetzen von Partikeln zu vermeiden. Der Algengraben wurde kontinuierlich mit verdünnter Schweinegülle belastet.

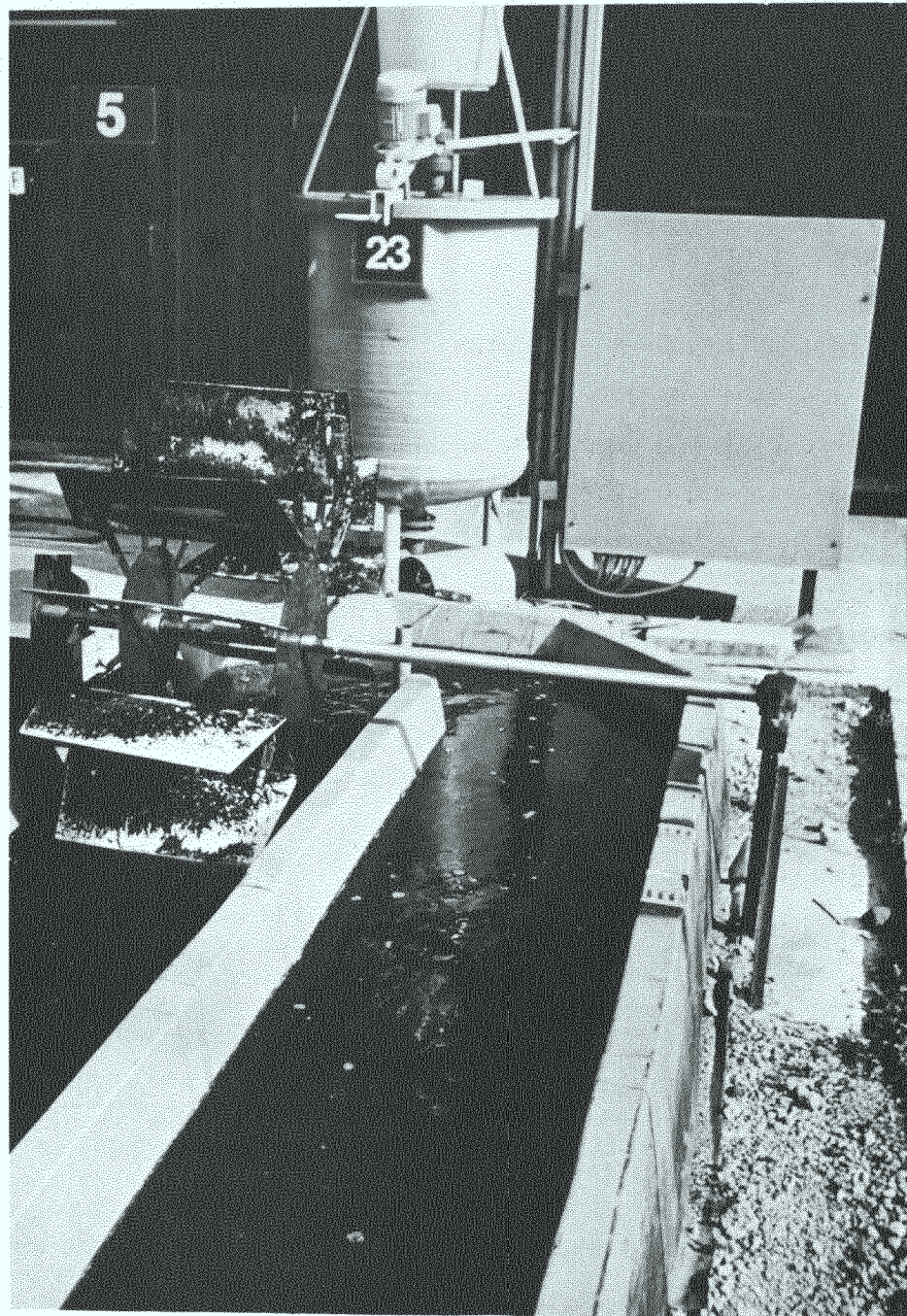


Foto 13: Algengraben, Pilotanlage mit 10 m² Oberfläche

Zunächst wird eine Trennung der Gülle in Feststoffe und Flüssigphase vorgenommen. Die Feststoffe können nach entsprechender Behandlung (z.B. Trocknung, Sterilisierung) wieder verfüttert oder anaerob fermentiert werden.

Täglich wurden Verdünnungen der Gülleflüssigphase mit Wasser hergestellt und dem Algengraben kontinuierlich zugeführt. Der Flüssigkeitspegel im Graben wurde durch einen Überlauf konstant gehalten. Die verdünnte Gülle wurde so dosiert, daß theoretische Aufenthaltszeiten zwischen 4 - 10 Tagen vorgegeben wurden. Unterschiedliche Belastungen ließen sich durch mehr oder weniger starke Verdünnungen der Gülle einstellen.

Ebenso wie das Wachstum der Algen stark von den Licht- und Temperaturverhältnissen abhängig ist, erwies sich auch die Reinigungsleistung als klimaabhängig.

Die Rotatorienkultur bestand aus einem V-förmigen Gefäß (Abb. 22) mit 50 l Inhalt. Durch eine air-lift-Pumpe wurde die Kultursuspension umgewälzt (Sorgeloos & Persoone 1972) und belüftet. Die Rotatorienstufe wurde semikontinuierlich gefüttert - ähnlich den in Abschnitt 3.2.2. beschriebenen Laborkulturen. Die Rotatorien wurden bei Zimmertemperatur (ca. 20 °C) ohne besondere Thermostatisierung kultiviert.

Vor dem Verfüttern an die Rotatorien wurde der Ablauf des Algengrabens durch ein Planktonnetz mit der Maschenweite 120 µm filtriert, um größere Partikel und Organismen (wie z.B. Mückenlarven) zu entfernen. Die so erhaltene Albazodsuspension enthielt außer der Algen-Bakterien-Biomasse auch eine erhebliche Menge nicht abgebauter organischer Partikel, die in der Rotatorienkultur zusammen mit den Fäzes der Tiere absetzbare Flocken bildeten. Um die Differenzen von pH und Temperatur zwischen Algengraben und Rotatorienkultur auszugleichen, wurde die Suspension, wenn nötig, bis ca. 3 h belüftet.

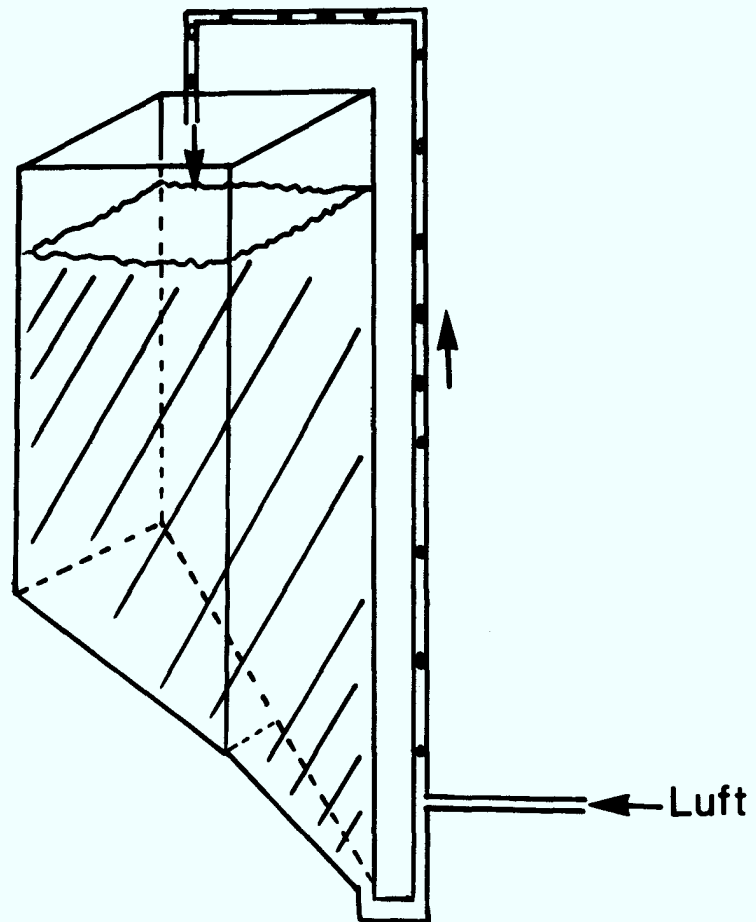


Abb. 22: Kulturgefäß für Brachionus, Inhalt = 50 l.

Täglich wurden morgens um 9.00 Uhr 25 % (= 12,5 l) des Kulturvolumens geerntet und durch die gleiche Menge Ablauf aus dem Algengraben ersetzt. Zum Nachweis der Limitierung des Populationswachstums der Rotatorien durch die Futtermenge wurde über einen Zeitraum von 2 x 7 Tagen 2 x täglich 25 % des Kulturvolumens abgeerntet, die Rotatorien jede 2. Ernte jedoch rückgeführt.

Die Versuche wurden über 40 Tage in den Monaten Juni - August 1979 durchgeführt.

4.2.2. Organismen

Im Algengraben dominierte während der Versuchsphase die einzellige coccale Grünalge Scenedesmus falcatus. Sie machte bis zu 90 % der gesamten Algenzahl aus. Der Rest der Algenbiomasse bestand aus anderen coccalen Grünalgen wie Scenedesmus opoliensis, Sc. armatus, Monoraphidium contortum. Außerdem traten - abhängig von der Belastung - farblose Flagellaten (z.B. Bodo sp.) und kleine Ciliaten auf.

Die Rotatorienkultur wurde mit dem Rädertier Brachionus rubens angeimpft. Dieses Rädertier kann eine breite Palette von coccalen Grünalgen als Nahrung nutzen (Schlüter 1980). Die Rotatorien stammten aus Kulturen auf Mineralmedium (Schlüter und Groeneweg 1981) und wurde in einigen Tagen an die Algen aus dem Algengraben adaptiert.

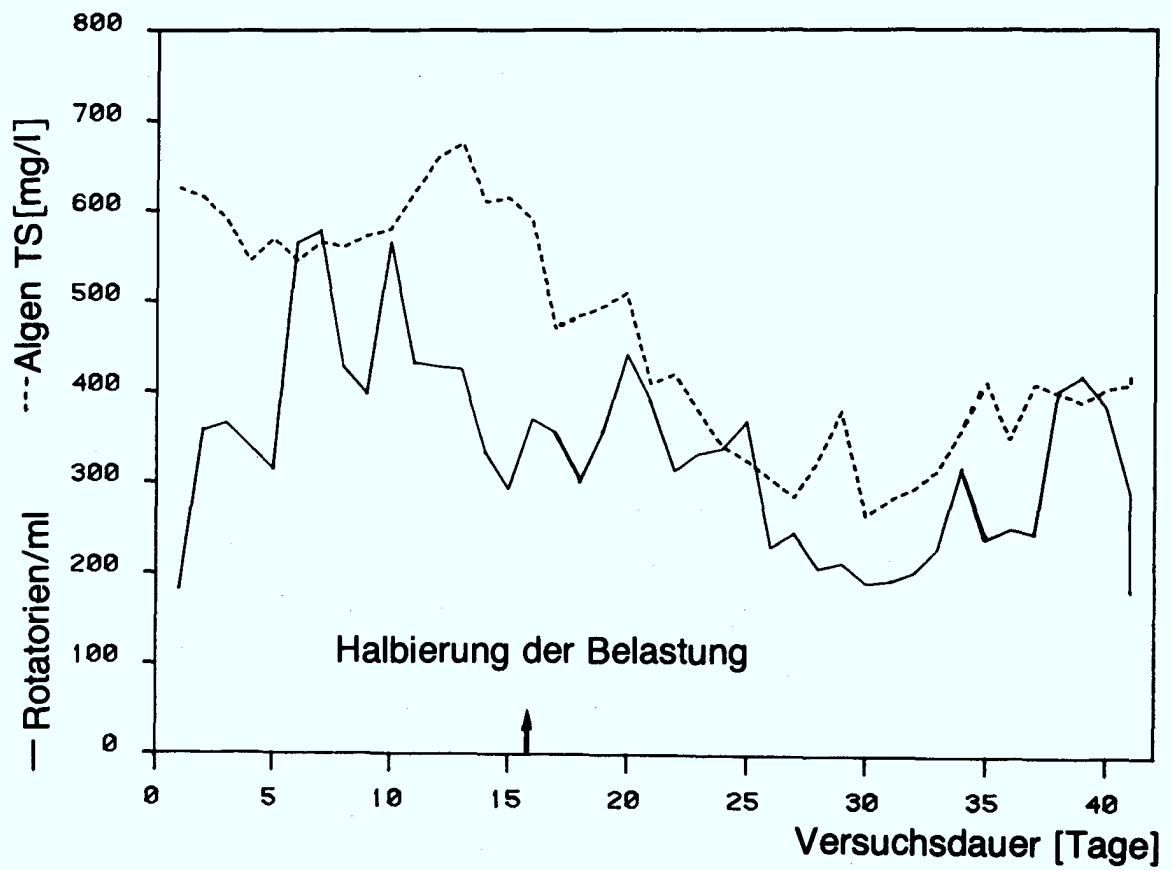


Abb. 23: Biomassekonzentration im Algengraben und Tierkonzentration in der Rotatorienkultur während der 40-tägigen Versuchsperiode.

4.2.3. Populationsdynamik

Während der gesamten Versuchsdauer von 2 Monaten wurde in der Rotatorienkultur eine stabile Population von Rotatorien aufrechterhalten (Abb. 23). Es lagen keine Anzeichen dafür vor, daß die Rotatorienkultur nicht über beliebig lange Zeit hätte fortgeführt werden können. Das Wachstum der Rotatorienpopulation wurde von der Albazodkonzentration im Zulauf bestimmt. Diese wurde von den Witterungsbedingungen beeinflusst, die zu starken Schwankungen der Biomassekonzentration im Algengraben führten. Die Rotatorienkonzentration ließ sich durch 2malige tägliche Fütterung mit Algen nahezu verdoppeln ($275 \rightarrow 506$ Rotatorien/ml). Die Korrelation zwischen Tierkonzentration und Algenkonzentration ist signifikant ($r = 0,755$), gemessen bei einmaliger täglicher Fütterung (Abb. 24).

Zu Beginn der Versuchsperiode enthielt der Ablauf des Algengrabens eine große Anzahl an farblosen Flagellaten. Während dieser Phase (bis 10. Juli) entwickelte sich in der Rotatorienkultur eine Population von Ciliaten (Paramecium spec.) von bis zu 4000 Individuen/ml und bis zu 20 Individuen/ml des Flagellaten- und Ciliaten-fressenden Rotators Epiphanes senta. Nach dem 10. Juli (Pfeil in Abb. 23) wurde die Belastung des Algengrabens vermindert. Als Folge sanken die Konzentrationen an Flagellaten auf wenige Tiere/ml und die flagellatenfressenden Organismen Paramecium und Epiphanes spülten in der Rotatorienstufe nahezu aus. Gegen Ende Juli gelangte ein weiteres Rädertier (Brachionus calyciflorus), das im Algengraben in geringer Konzentration vorhanden war, in die Kultur. Diese Art besitzt ähnliche Nahrungsansprüche wie B. rubens (Halbach 1973). Beide Arten mußten daher um die angebotene Futtermenge konkurrieren. Dabei erwies sich B. calyciflorus als überlegen. Die Population von B. rubens wurde in den folgenden 3 Wochen stark zurückgedrängt und machte gegen Ende des Versuches nur noch 30 % der Gesamtpopulation aus (Abb. 25). Die Gesamtproduktion an Rotatorien wurde durch diesen Vorgang nicht merklich beeinflusst.

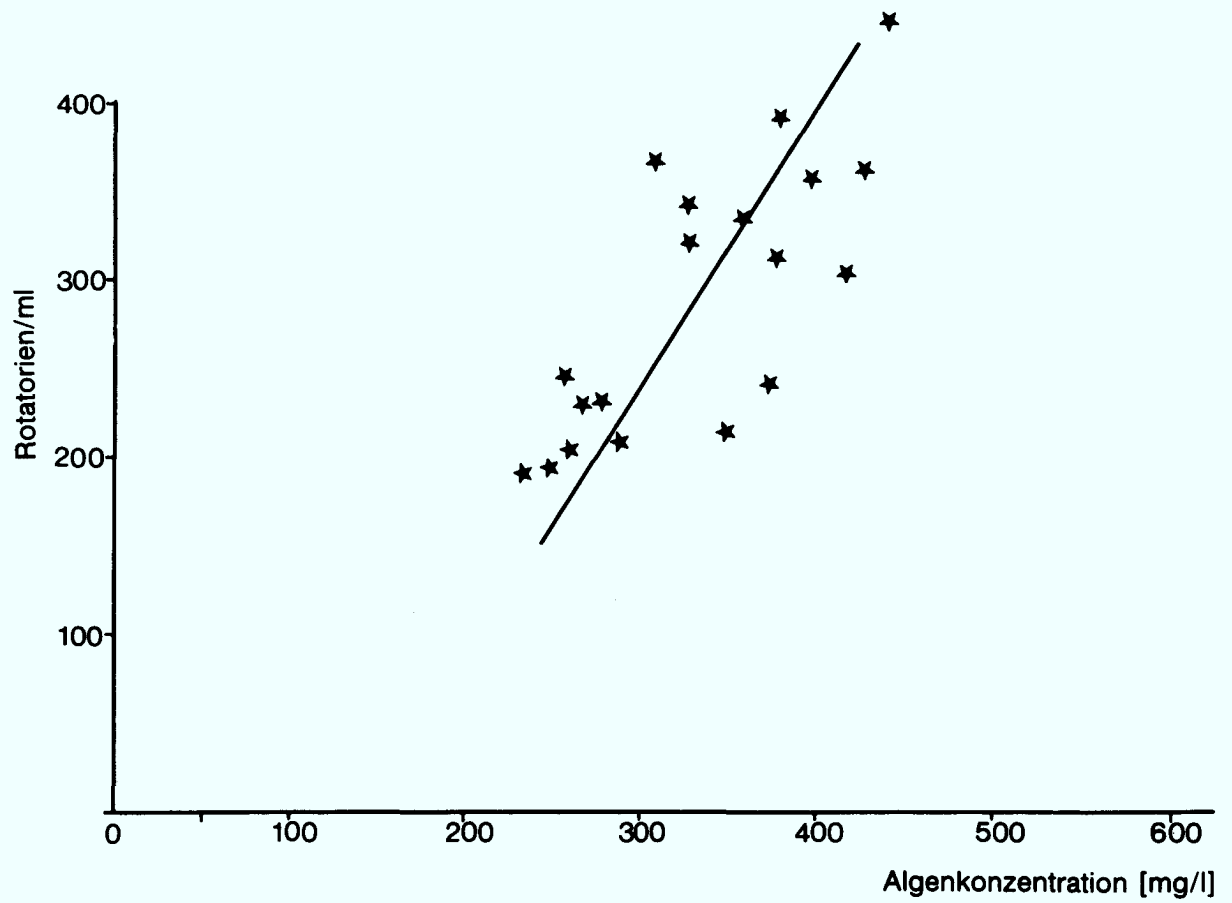


Abb. 24: Korrelation zwischen Rotatorien- und Albazod-Konzentration

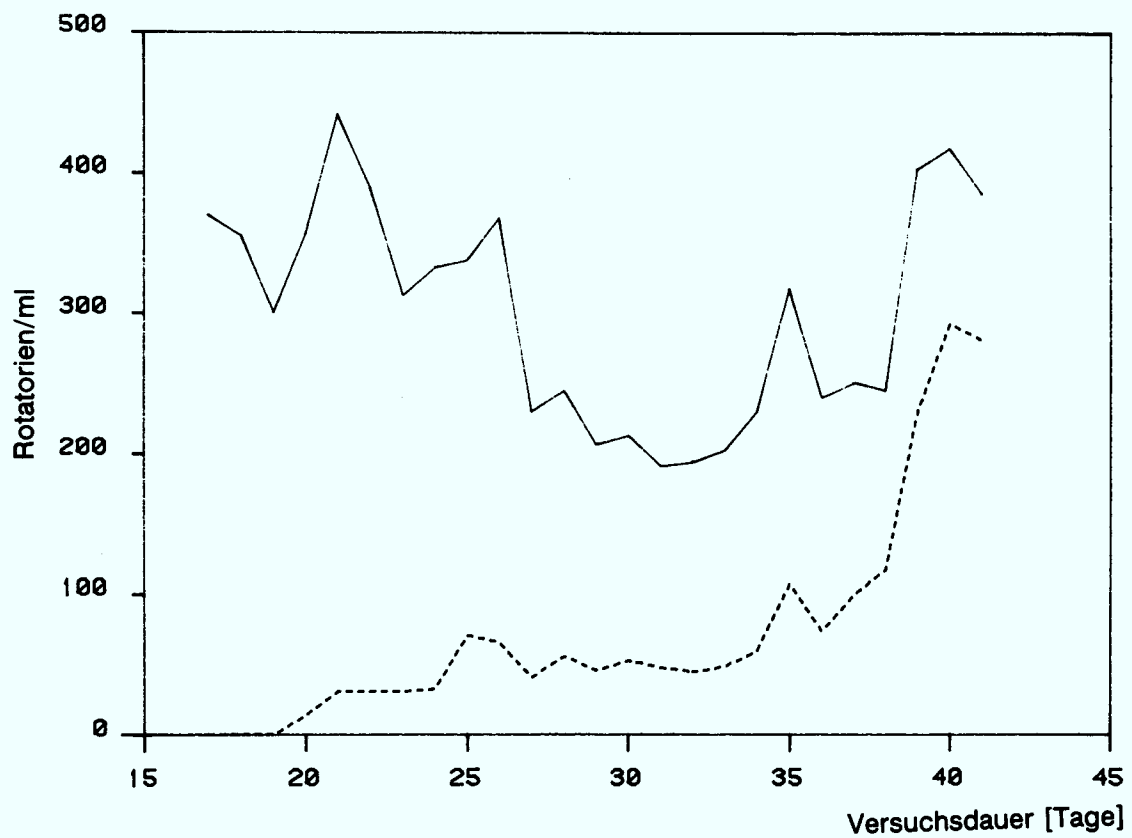


Abb. 25: Verdrängung von B. rubens durch B. calyciflorus
—— Gesamtpopulation - - - - B. calyciflorus

4.2.4. Ablaufqualität

4.2.4.1. CSB/TOC

Der CSB im Ablauf des Algengrabens war noch relativ hoch (150 - 220 mg CSB/l). Es handelt sich dabei zum größten Teil um biologisch schlecht abbaubare Substanzen. Die 4-tägige Belüftung des Ablaufs in der Rotatorienkultur ($6,5 \pm 0,7$ mg O_2/l) trug daher nicht wesentlich zur Verminderung des CSB bei.

Sekundär produzierter CSB - aus der Exkretion der Rotatorien - wurde offensichtlich sofort oxidiert, so daß der CSB in der Rotatorienkultur geringfügig niedriger war als im Ablauf des Algengrabens (Abb. 26). Der TOC zeigt im wesentlichen den gleichen Verlauf wie der CSB.

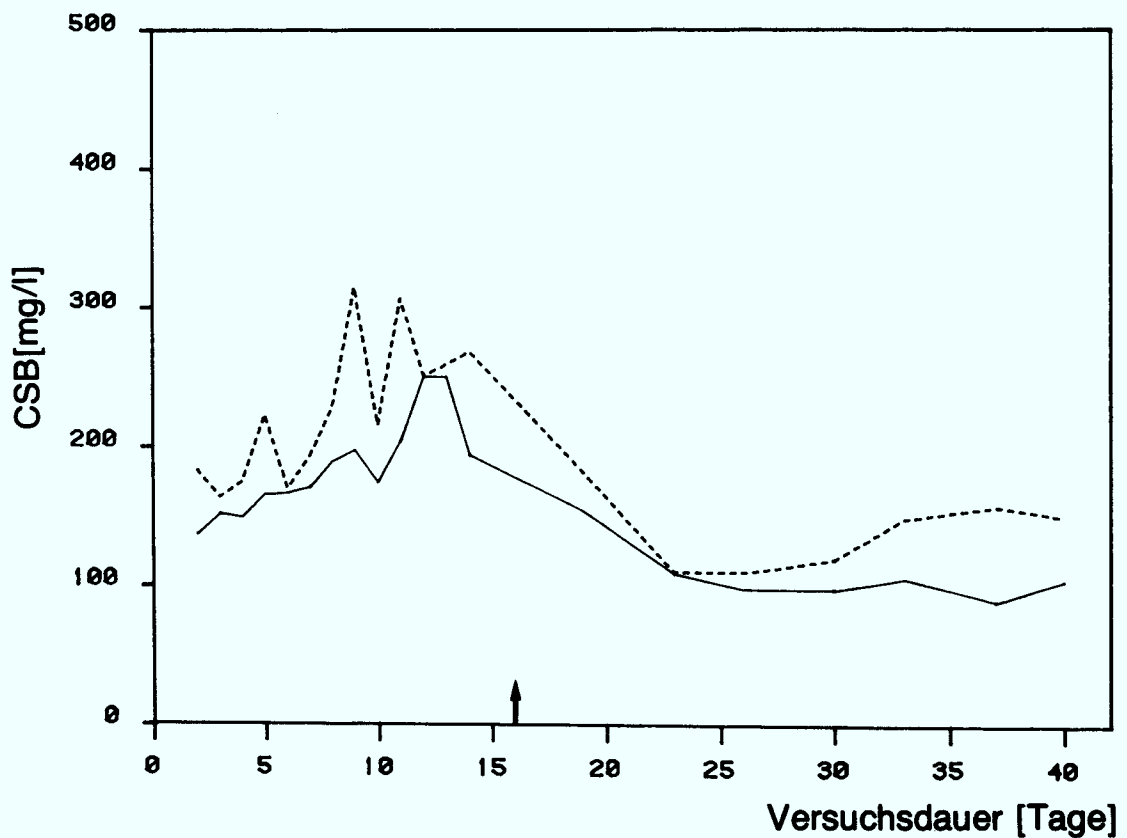


Abb. 26: CSB im Algengraben - - - - und in der Rotatorienkultur ———

4.2.4.2. Stickstoff

Schweinegülle enthält hohe Konzentrationen an anorganischem N. Während der Versuchsdauer wurde der Algengraben mit 2 verschiedenen Güllekonzentrationen belastet. Der Verlauf der Konzentrationen an gelösten anorganischem Stickstoff ist in den Abb. 27 und 28 dargestellt. In der ersten Versuchsphase (hohe N-Belastung) dominiert NH_4^+ -N. Weder in der Algenkultur noch in der Rotatorienkultur kam es zu einer nennenswerten Nitrifikation. Im Ablauf der Rotatorienkultur werden die N-Werte leicht erhöht, bedingt durch die N-Exkretion der Rotatorien.

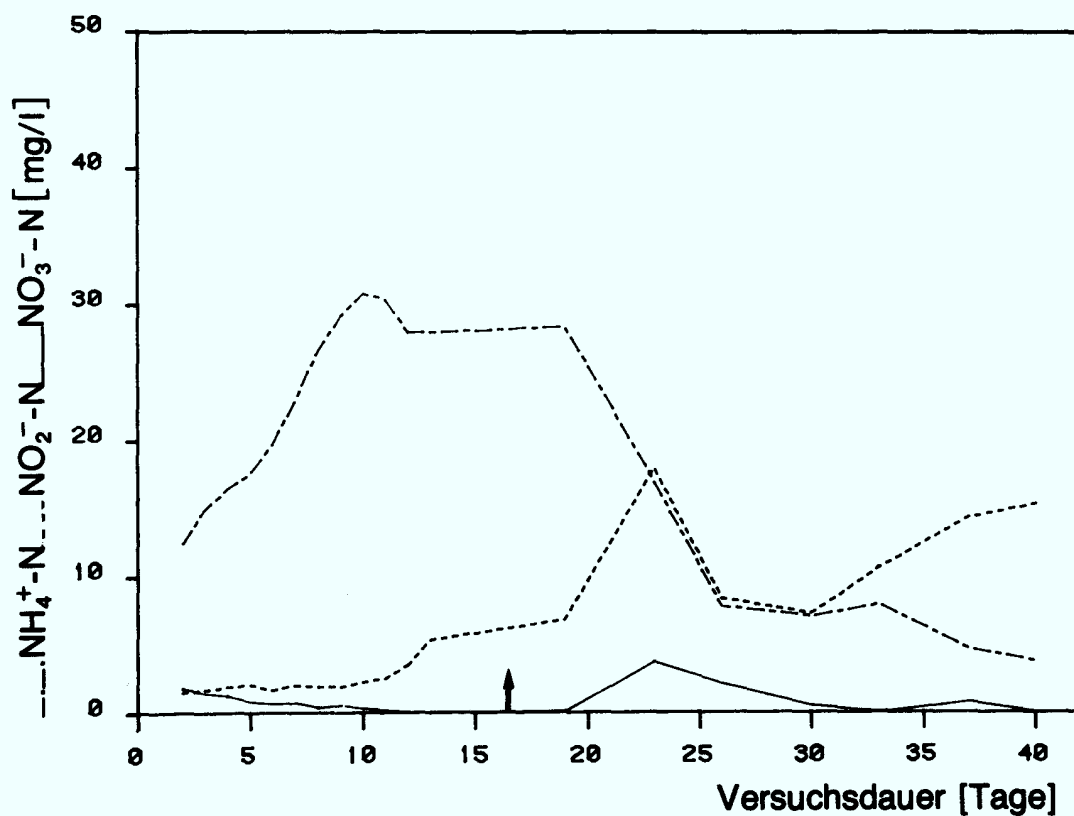


Abb. 27: Stickstoffverteilung im Algengraben
Pfeil = Halbierung der Belastung

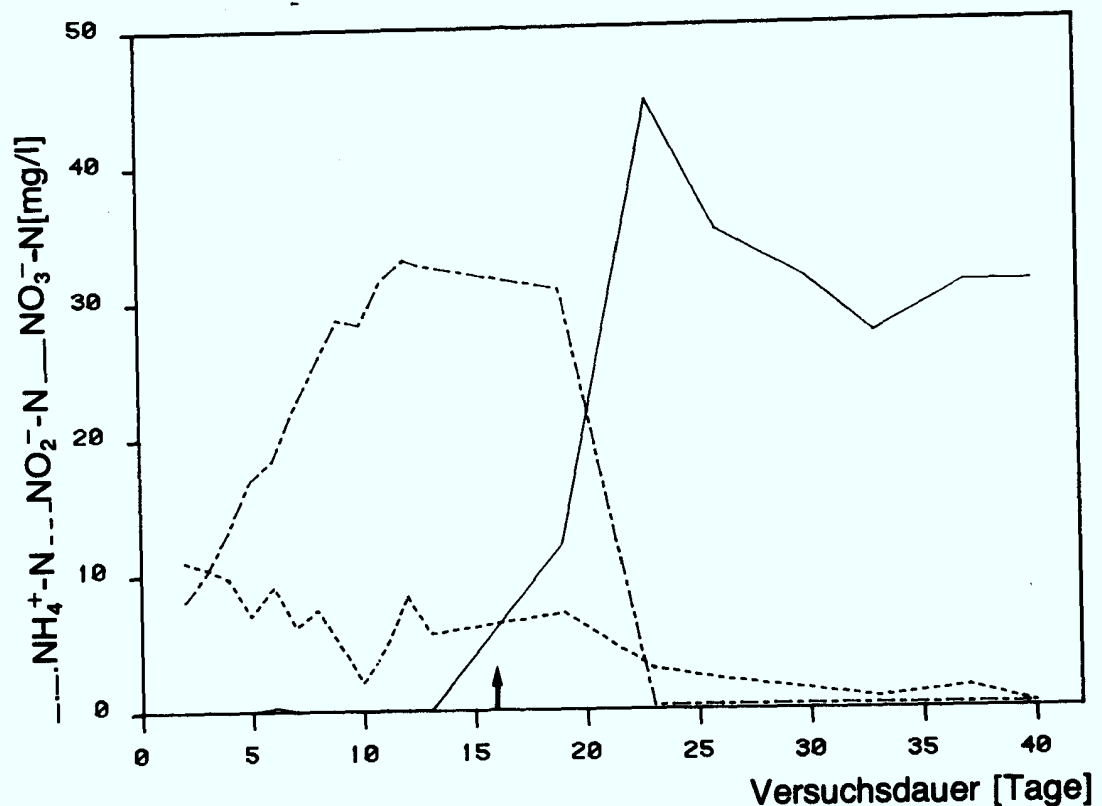


Abb. 28: Stickstoffverteilung in der Rotatorienkultur

In der 2. Versuchsserie (geringere N-Belastung) wurde ein großer Teil des $\text{NH}_4^+\text{-N}$ im Algengraben bereits zu $\text{NO}_2^-\text{-N}$ oxidiert. Es wurden bis zu 20 mg $\text{NO}_2^-\text{-N/l}$ gemessen. Diese Konzentration ist für B. rubens nicht toxisch (Schlüter & Groeneweg 1981). In der Rotatorienstufe wurde die Nitrifikation vervollständigt, im Ablauf wurde nahezu ausschließlich $\text{NO}_3^-\text{-N}$ gemessen (Abb. 28). Der N-Flux durch das System ist in Abb. 29 dargestellt. Das Diagramm zeigt, daß ca. 40 % des in der Algenstufe in der Biomasse festgelegten N die Rotatorienstufe als $\text{NO}_3^-\text{-N}$ verließ. Die N-Eliminationsleistung des Gesamtsystems wurde durch diese Sekundärverschmutzung signifikant vermindert.

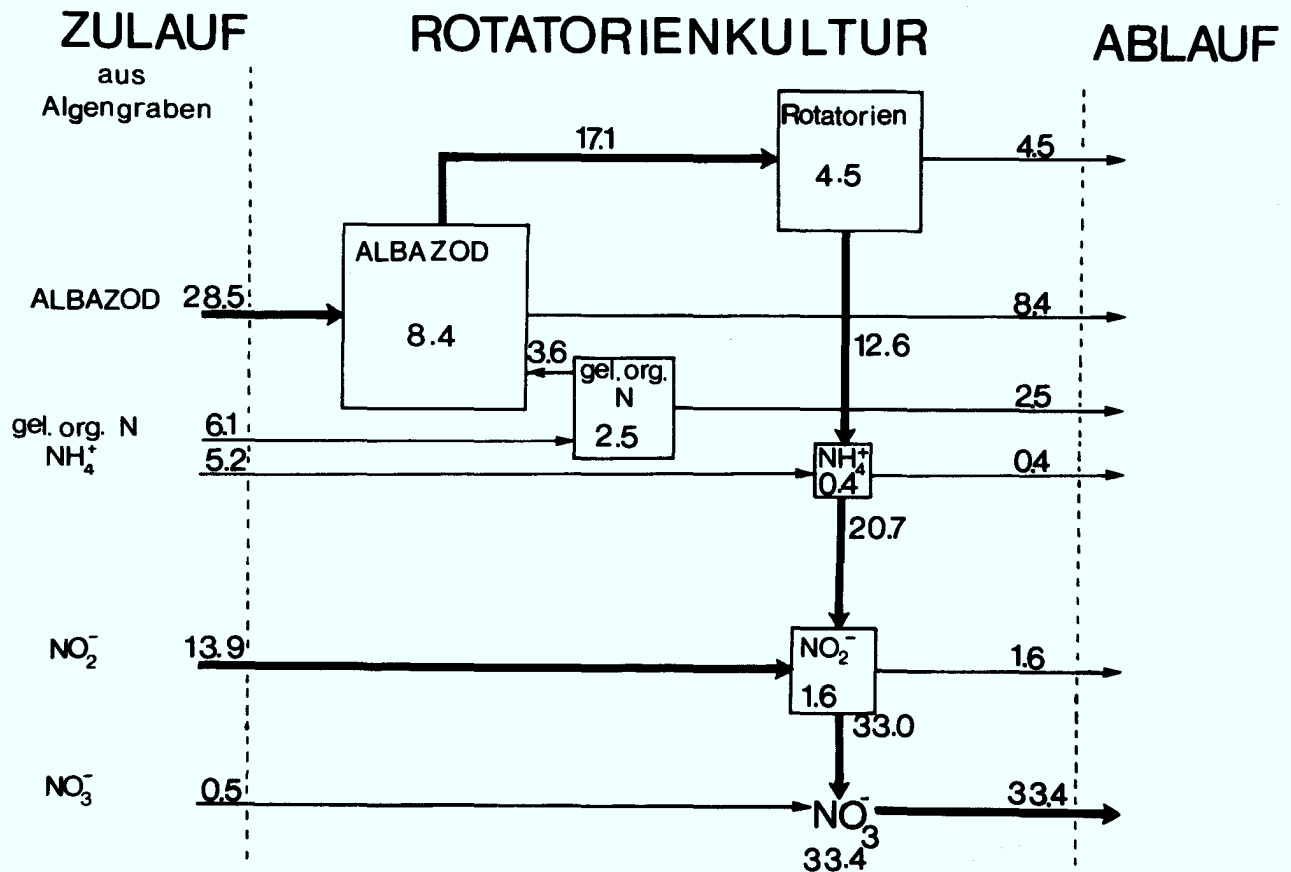


Abb. 29: Stickstofffluß durch die Rotatorienkultur. Angaben in mg N/l in einer Aufenthaltszeit (4d).

4.3. Einfluß von Rotatorien auf die Sukzession von Algenspezies in Algengräben

Rotatorien der Gattung Brachionus stellen für kontinuierlich betriebene Algengräben eine große Gefahr dar, weil sie durch ihr intensives Populationswachstum die Algenkonzentration stark vermindern und den Reinigungseffekt der Anlage so zunichte machen können (Lee 1980, Shelef et al. 1980, Groeneweg et al. 1980). Beim Studium der o.g. Literatur fällt auf, daß Algengräben, in denen Micractinium in der Algenpopulation dominiert, von der Invasion durch Rotatorien verschont bleiben (z.B. Shelef et al. 1980).

Wegen der starken Bestachelung von Micractinium (Foto 14) liegt die Hypothese nahe, daß die Rotatorien diese Algen nicht fressen können. Somit müßte Micractinium einen entscheidenden Selektionsvorteil vor den unbestachelten Arten besitzen und seine dominante Stellung in der Algenpopulation behaupten können. Diese Annahme wurde durch gezielte Experimente mit Micractinium experimentell untersucht.

Es war auch die Frage zu prüfen, ob Micractinium lediglich als Futter ungeeignet ist, oder ob die Rotatorien durch die Stacheln daran gehindert werden, auch andere unbestachelte Algen zu fressen.

4.3.1. Ernährung von Brachionus rubens mit der bestachelten Grünalge Micractinium pusillum

In diesem Versuch wurde das Wachstum einer Batch-Kultur von B. rubens bei Fütterung mit einer Batch-Kultur von Micractinium pusillum gemessen. Als Kontrollkulturen dienten mit Sc. costato-granulatus gefütterte Rotatorienkulturen. Die Algen wurden zu Beginn des Experiments in einer Konzentration von 100 mg TS/l gefüttert.

In der ersten Versuchsserie wurden Micractinium-Zellen verwendet, die nur wenige Stacheln (maximale Länge $11,4 \pm 3,2 \mu\text{m}$). Der Zelldurchmesser dieser Algen betrug $7,4 \mu\text{m}$.

Das Populationswachstum der mit diesen Algen gefütterten Rotatorien war nicht geringer als das der mit Scenedesmus gefütterten Kontrollen. Es wurde sogar ein stimulierender Effekt gefunden, der möglicherweise auf den im Vergleich zu Scenedesmus größeren Zelldurchmesser zurückzuführen ist (Abb. 30a).

In der zweiten Versuchsserie wurden Algen benutzt, deren Zelldurchmesser zwar mit dem der Algen der 1. Testserie identisch war, deren Stachelbildung durch Dunkelhaltung der Zellen über 10 Tage im Dunkeln jedoch stark stimuliert worden war. Die Stacheln waren sehr zahlreich und erreichten eine mittlere maximale Länge von $26,1 \pm 3,6 \mu\text{m}$. Diese Algen waren als Futter für B. rubens völlig ungeeignet (Abb. 30b); die Kulturen starben nach einigen Tagen ab.

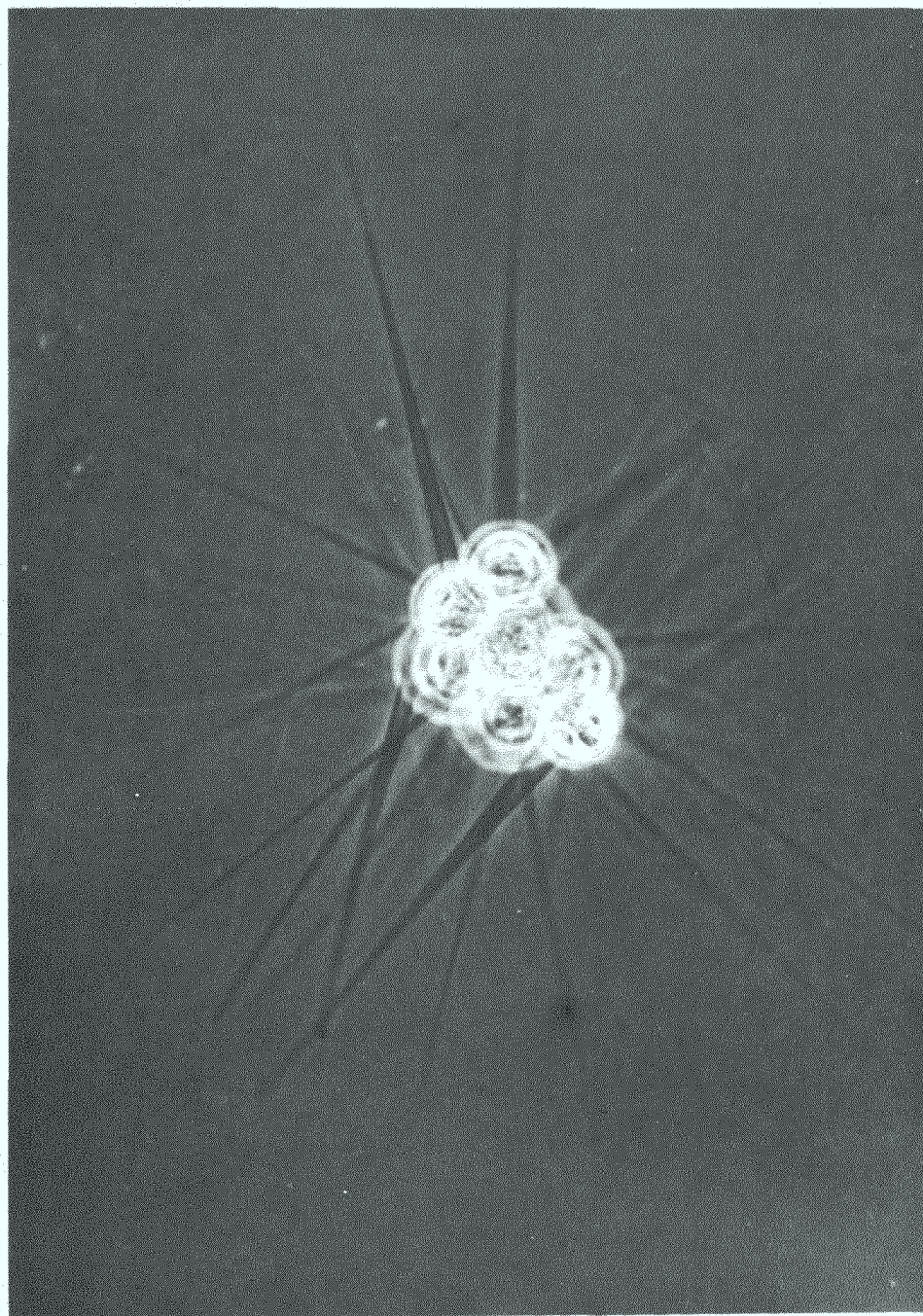


Foto 14: Micractinium pusillum. —————→ 10 μ m

Foto: E.Hegewald

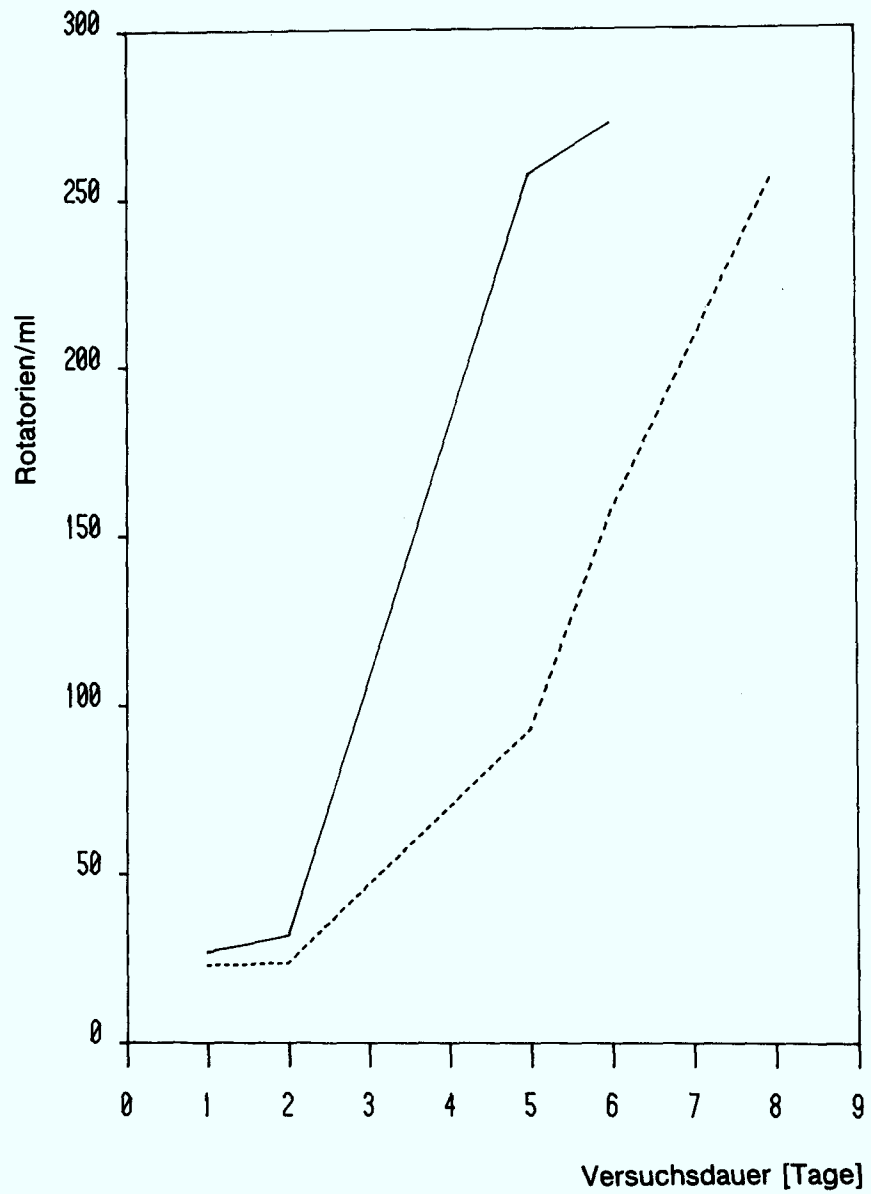


Abb. 30: Fütterung von B. rubens mit Micractinium pusillum

———— Micractinium (100 mg/l)

- - - - - Kontrolle (Scenedesmus) (100 mg/l)

a) Stachellänge 11 μ m

Mittelwerte aus drei Kulturen

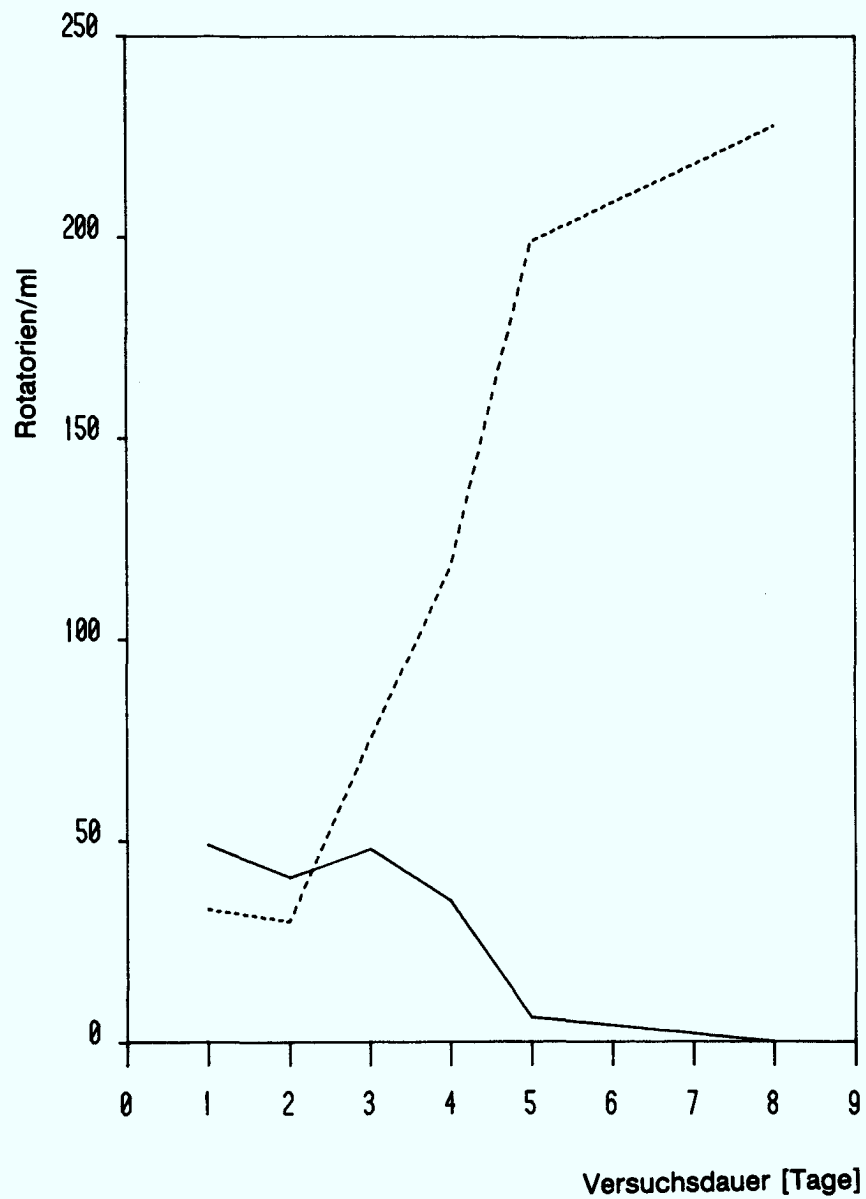


Abb. 30: Fütterung von B. rubens mit Micractinium pusillum

———— Micractinium (100 mg/l)

- - - - - Kontrolle (Scenedesmus) (100 mg/l)

b) Stachelänge 26 μ m

Mittelwerte aus 3 Kulturen

4.3.2. Ernährung von Brachionus rubens mit einer Mischung von Micractinium pusillum und Scenedesmus costato-granulatus

In diesem Versuch sollte die Frage geprüft werden, ob B. rubens in der Lage ist, aus einer Mischung von Micractinium und Scenedesmus die als Futter geeignetste Alge selektiv herauszufiltrieren.

Batch-Kulturen von B. rubens wurden mit einer Mischung aus 50 mg/l Scenedesmus costato-granulatus und 50 mg/l Micractinium pusillum gefüttert. Als Kontrollen dienten mit 50 mg/l Scenedesmus costato-granulatus sowie mit 50 mg/l Micractinium pusillum gefütterte Kulturen.

Nur die Rotatorien, die ausschließlich mit Scenedesmus costato-granulatus gefüttert wurden, zeigten ein signifikantes Wachstum (Abb. 31a).

Sowohl die mit Micractinium pusillum allein, als auch die mit der Algenmischung gefütterten Rotatorien starben ab. Die Auszählung der Algenzellzahlen in den Kulturen ergab nur bei alleiniger Verfütterung von Scenedesmus costato-granulatus eine Abnahme der Algenzellen (Abb. 31b) infolge der Freßtätigkeit der Rotatorien. Diese Aussage kann auch durch die mikroskopische Untersuchung der Tiere bestätigt werden. Foto 15 zeigt ein Tier, daß mit der Algenmischung gefüttert wurde. Sein Verdauungstrakt war bis auf einige Lipidtröpfchen leer, obwohl das Tier mitten in einer Algensuspension schwamm. Diese Versuche belegen, daß die Futterqualität einer Algensuspension für Brachionus durch Zugabe von stark bestachelten Micractinium pusillum dramatisch verschlechtert werden kann.



Foto 15: Brachionus rubens mit leerem Magen bei Fütterung mit Micractinium

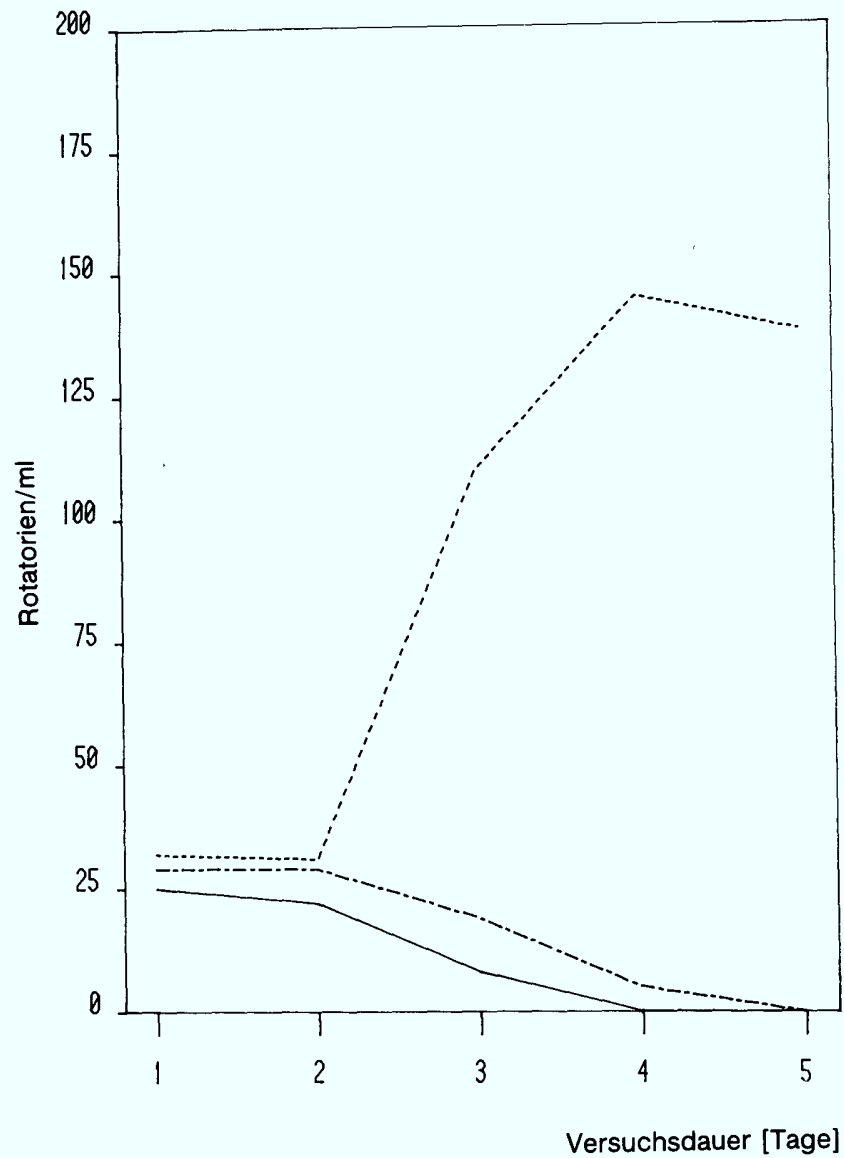


Abb. 31: Fütterung von B. rubens mit einer Mischung aus Scenedesmus costato-granulatus und Micractinium pusillum

a) Rotatorienkonzentration

—— Micractinium (50 mg/l)

--- Scenedesmus (50 mg/l)

-.-.- Micractinium + Scenedesmus (je 50 mg/l)

Mittelwerte aus zwei Kulturen

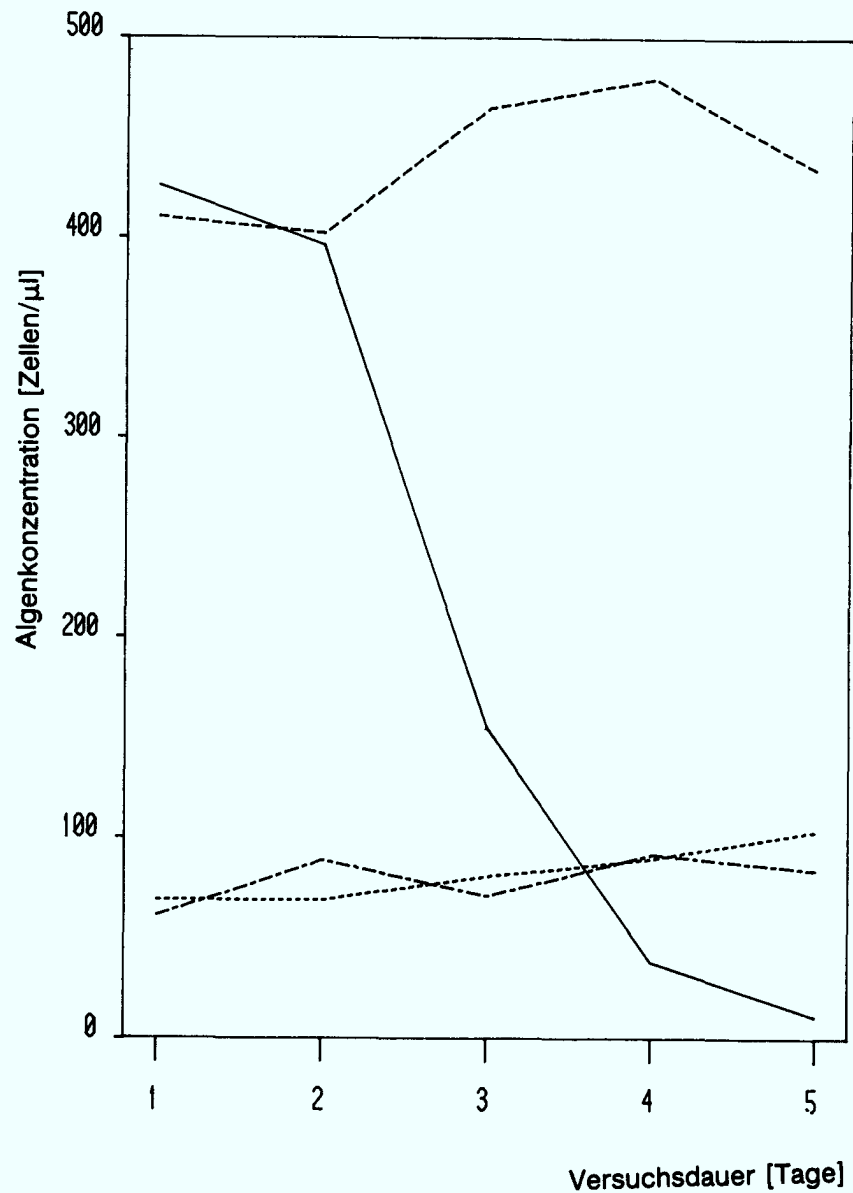


Abb. 31: Fütterung von B. rubens mit einer Mischung aus Scenedesmus costato-granulatus und Micractinium pusillum

b) Algenkonzentration

----- Micractinium

- · - · - · - Micractinium in Mischung

———— Scenedesmus

- - - - - Scenedesmus in Mischung

Mittelwerte aus 2 Kulturen

4.4. Versuche im 2-stufigen Algen-Rotatorien-Kultursystem

4.4.1. Vergleich einer Stickstoff-limitierten mit einer Licht-limitierten 2-stufigen Nahrungskette

Es wurden zwei 2-stufige Kultursysteme parallel betrieben. Beide Systeme unterschieden sich nur in der Betriebsweise des Algenchemostaten, die Rotatorienkulturen waren identisch aufgebaut. Beide Algenchemostaten wurden mit axenisch angezogenen Algen angeimpft, nach einigen Wochen wurden jedoch beide mit Bakterien kontaminiert.

System A erhielt mit der Nährlösung 13,8 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$, System B dagegen 34,6 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$.

In System A wurde das Wachstum der Algen über die N-Konzentration limitiert. Im System B wurde nicht der gesamte Stickstoff aufgenommen, die Kultur war lichtlimitiert. Um eine höhere Biomasse in dieser Kultur zu vermeiden, wurde das Lichtangebot in 4 Schritten durch Abschalten von Leuchtstoffröhren soweit gesenkt, daß die Biomasse, gemessen als Trockensubstanz, in beiden Algenkulturen nahezu identisch war.

4.4.1.1. Auswirkungen des unterschiedlichen N-Angebotes auf das Wachstum der Algenkultur

4.4.1.1.1. Stickstoff-limitiertes System

Dieser Algenchemostat wurde über eine Versuchsperiode von 2 Monaten Stickstoff-limitiert betrieben, bei einer Durchflußrate von $D = 0,8496 \text{ d}^{-1}$, entsprechend einer Aufenthaltszeit von 28 Stunden (s. Abb. 32). Es wurde fast der gesamte gelöste Stickstoff aufgenommen, die Restkonzentration (als Summe von NH_4^+ , NO_2^- und $\text{NO}_3\text{-N}$) lag unter 0,6 mg N/, davon liegen 0,5 mg/l als $\text{NH}_4^+\text{-N}$ vor. Unter diesen Bedingungen wird eine Biomassekonzentration von $X = 229 \text{ mg TS/l}$ erreicht. Das entspricht einer Chlorophyll-Konzentration von im Mittel 2,4 mg/l, d.h. 1 % der TS. Der N-Gehalt der Biomasse betrug im Durchschnitt 5,5 % entsprechend einem Rohproteingehalt von 34 % (berechnet als $\text{N} \times 6,25$).

4.4.1.1.2. Licht-limitiertes System

Diese Algenkultur wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen Licht-limitiert betrieben mit einer Durchflußrate von $D = 0,8889 \text{ d}^{-1}$ entsprechend einer Aufenthaltszeit von 27 Stunden. Die Biomassekonzentration war unter diesen Bedingungen nahezu identisch mit System A (225 mg TS/l), die Chlorophyll-Konzentration lag jedoch erheblich höher (5,7 mg/l, entsprechend 2,5 % der TS). Der Stickstoffgehalt der Biomasse erreicht den doppelten Wert von System A (9,9 % entsprechend 62 % Rohprotein). Die Ammoniumkonzentration liegt dagegen im gleichen Bereich wie in der N-limitierten Kultur ($0,5 \text{ mg NH}_4^+-\text{N/l}$) (s. Abb. 33).

In beiden Algenkulturen waren Trockensubstanz und optische Dichte miteinander korreliert ($r = 0,7917$, $n = 28$). Chlorophyll-Konzentration und Trockensubstanz lieferten dagegen nur in der Licht-limitierten Kultur eine positive Korrelation ($r = 0,7505$, $n = 14$). In der N-limitierten Kultur war keine Korrelation festzustellen ($r = 0,0138$, $n = 14$).

4.4.1.2. Auswirkungen des unterschiedlichen Stickstoffangebots auf das Wachstum der Rotatorienkulturen

4.4.1.2.1. Rotatorienkonzentration

Die Rotatorienpopulation in der N-limitierten Nahrungskette (A) konnte länger als 4 Monate aufrechterhalten werden, im Licht-limitierten System hingegen nur einige Wochen. Da die Bedingungen in den Licht-limitierten Kulturen identisch mit den Vorversuchen waren (3.2.1.), deutet dieser Befund darauf hin, daß auch dort die hohe N-Zufuhr im Zulauf der Algenkultur direkt oder indirekt für das in gewissen Abständen eintretende Absterben der Kulturen verantwortlich war.

Der pH-Wert der Kulturen wurde nur gelegentlich gemessen, er schwankte in allen Rotatorien-Kulturen nur zwischen pH 7,0 und pH 7,2.

Im folgenden werden die Biomasseproduktion und -verwertung sowie die N-Ausscheidung beider Rotatorienkulturen während eines 14-tägigen angenäherten "Steady state" miteinander verglichen.

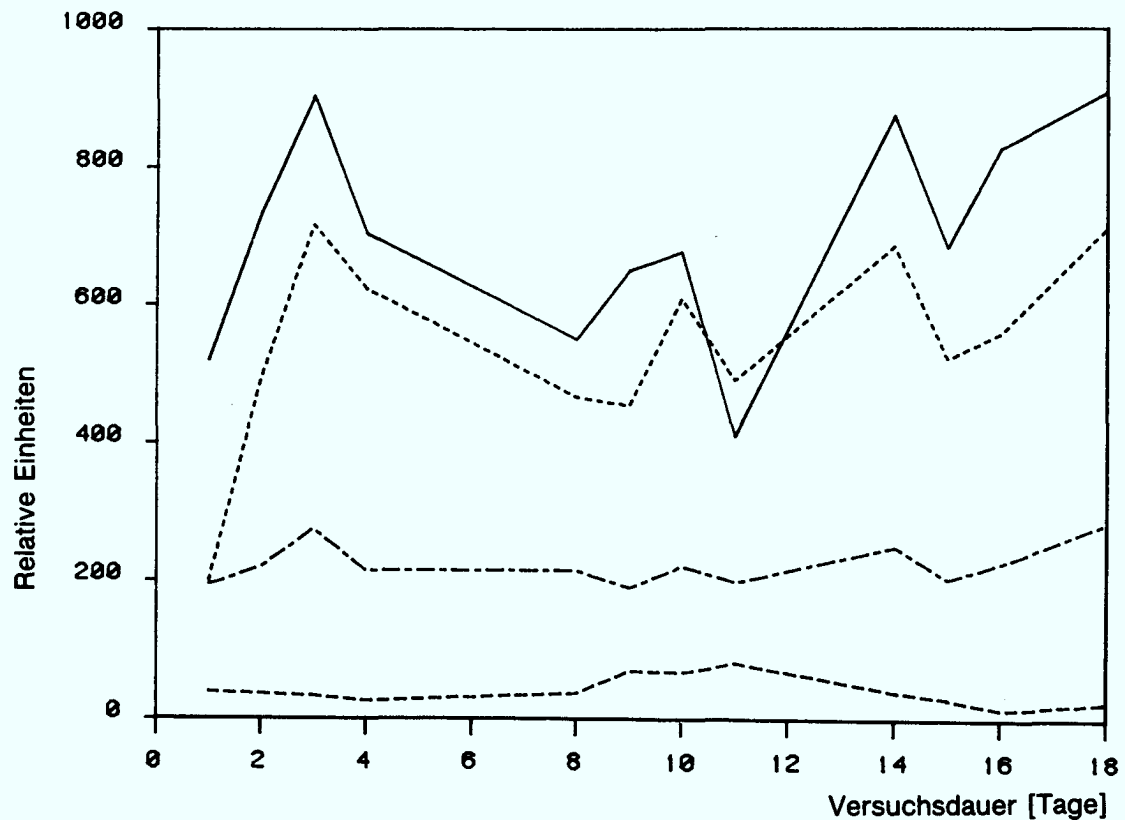


Abb. 32: Licht-limitierte Algenkultur

— Extinktion (570 nm)
----- Chlorophyll (mg/l * 100)
- - - - - TS (mg/l)
— — — — $\text{-NH}_4^+\text{-N}$ (mg/l * 100)

Beide Kultursysteme wurden mit der gleichen Durchflußrate betrieben (75 ml/d entsprechend einer Aufenthaltszeit von 4 Tagen). Da die Futterquantität (s. Algenkulturen, S. 96) für beide Systeme gleich war (229 bzw. 225 mg TS/l) erreichten sie auch die gleiche Rotatorienkonzentration (282 bzw. 295 Tiere/ml. Auch zwischen Trockengewicht und Konzentration an Phaeopigment konnte mit Hilfe des

schied zwischen den Kulturen festgestellt werden. Lediglich die Chlorophyllkonzentration war verschieden ($P > 99,9 \%$), wie es dem Unterschied der Futteralgen entsprach.

In beiden Kultursystemen limitierte die Algenkonzentration im Zulauf die Vermehrung der Rotatorien. Der Vergleich zwischen Produktion an Rotatorien pro ml und Tag mit dem Chlorophyllgehalt der Algenkultur des vorangegangenen Tages liefert eine positive Korrelation (System A: $r = 0,8229$, System B: $r = 0,7546$). Die Korrelations-Koeffizienten sind auf dem 99 %-Niveau signifikant. Werden Tierkonzentration und Chlorophyllkonzentration der Algenkultur als Mittelwerte von je 4 Tagen aufgetragen (eine Aufenthaltszeit), so verbessert sich die Korrelation.

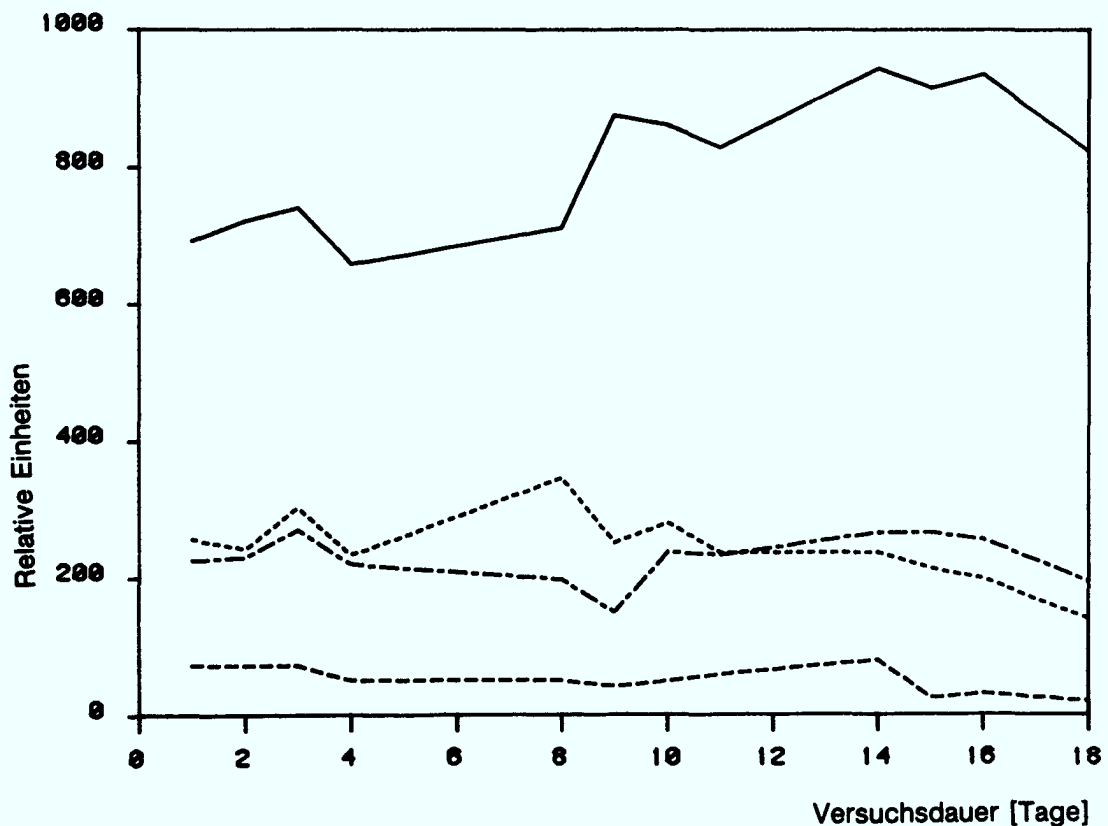


Abb. 33: N-limitierte Algenkultur. Symbole wie in Abb. 32

4.4.1.2.2. Ammoniumexkretion

Die Konzentration an gelöstem NH_4^+ unterscheidet sich in beiden Kulturen stark. Sie beträgt im System A 2,7 mg NH_4^+ -N/l, in System B 7,8 mg NH_4^+ -N/l. Da NH_4^+ für aquatische Organismen sehr toxisch sein kann, wird dieser Befund eine mögliche Ursache der regelmäßigen Zusammenbrüche der Rotatorienpopulationen in den nicht N-limitierten Kulturen diskutiert (siehe S. 97). Die erhöhte NH_4^+ -Konzentration in den Rotatorienkulturen ist eine Folge ihres N-Metabolismus. Über ihre Protonephridien scheiden sie NH_3 als Endprodukt des Metabolismus von Protein aus (Voigt & Koste 1978). Da der Proteingehalt der Licht-limitierten Algen höher ist, als der der N-limitierten, der Kaloriengehalt dagegen ähnlich - wenn nicht sogar geringer - müssen die Rotatorien mehr Protein zur Energiegewinnung veratmen - NH_3 wird ausgeschieden. Bei den N-limitierten Futteralgen ist das Verhältnis von Stickstoff zu Energieinhalt für die Rotatorien günstiger, der Stickstoff des Futters wird bevorzugt in die Biomasse eingebaut, die N-Ausscheidung wird vermindert. In beiden Kultursystemen ist daher die NH_4^+ -N-Konzentration im Medium mit der Rotatorienkonzentration korreliert ($P > 95 \%$). Aus den Daten läßt sich die NH_4^+ -Ausscheidungsrate pro Tier und Tag berechnen. Sie beträgt zwischen 2,4 und 3,0 ng/Tier und Tag für System A und 6,5 bis 8,8 ng/Tier und Tag für System B.

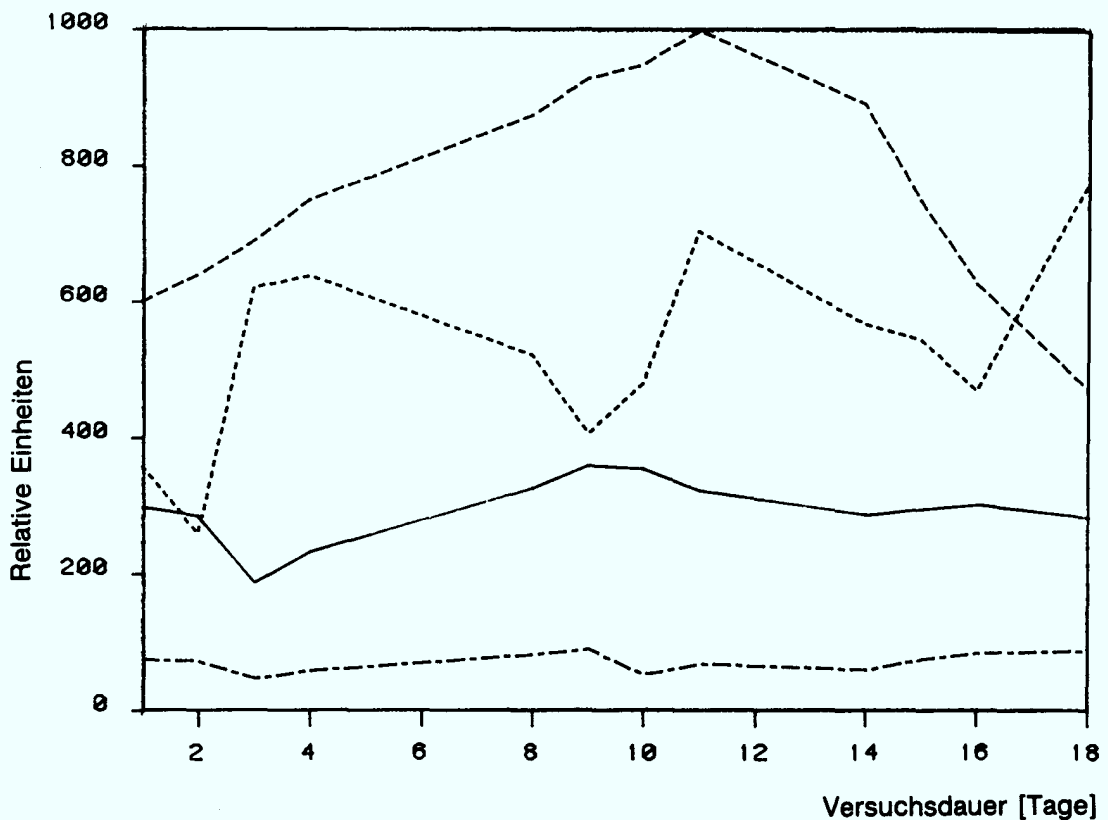


Abb. 34: Rotatorienkultur im Licht-limitierten System, Mittelwerte aus 3 Kulturen

— Rotatorien/ml
- - - - - Gesamtpigment (mg/l * 500)
- · - · - TS (mg/l)
- - - - - $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/l * 100)

Die Mittelwerte der NH_4^+ -Konzentration in allen Rotatorienkulturen beider Systeme verhalten sich etwa wie die Nitrateinwaagen ins Medium (1 : 2,5). In beiden Kulturen werden 20 % des in der Algenstufe reduzierten und in der Biomasse festgelegten Stickstoffs als NH_4^+ wieder ausgeschieden. Die Rotatorienkultur in System A war daher nicht Stickstoff-limitiert wie die Algenkultur, sondern nur durch den partikulären organischen Kohlenstoff der Futteralgen.

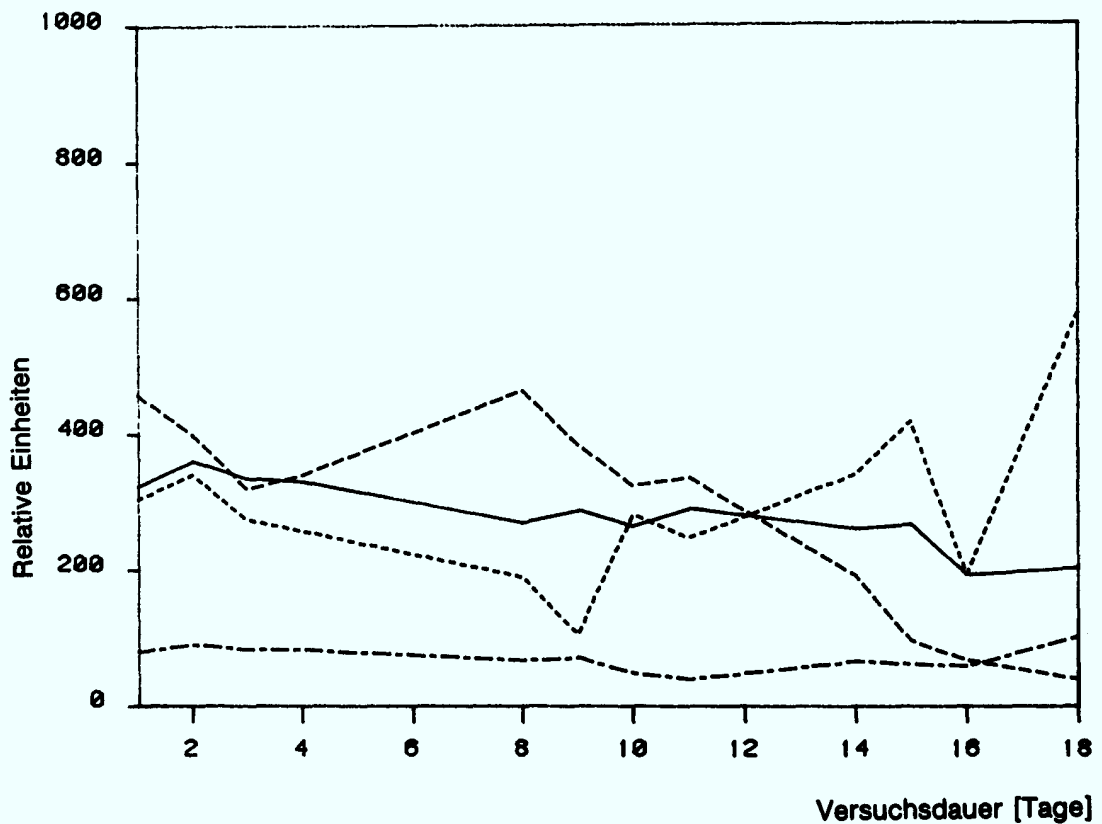


Abb. 35: Rotatorienkultur im N-limitierten System, Mittelwerte aus 3 Kulturen. Symbole wie in Abb. 34

4.4.1.3. Gelöster organischer Kohlenstoff

Algenkulturen

Der gelöste organische Kohlenstoff verhält sich in beiden Algenkulturen unterschiedlich. Während er im N-limitierten System A stark schwankt (zwischen 10 und 40 mg DOC/l bei einem Mittelwert von $20,3 \pm 12,7$ mg/l) produzieren die Algen im System B konstant $8,6 \pm 1,7$ mg DOC/l. Die erhöhte DOC-Produktion der Stickstoff-limitierten Kultur

ist eine Folge der Stickstoffknappheit. Assimiliertes CO_2 wird in organische Verbindungen überführt und z.T. wieder exkretiert, weil die Umwandlung in stickstoffhaltige Substanzen (Protein und Nukleinsäuren) durch den vorhandenen Stickstoff limitiert wird.

Rotatorienkulturen

Im Stickstoff-limitierten System setzen sich zwar die starken Schwankungen des DOC der Algenkultur fort, durch bakterielle Tätigkeit wird er aber um die Hälfte reduziert und beträgt im Mittel $11,1 \pm 9,3$ mg DOC/l. Im Licht-limitierten System liegt der DOC in der Rotatorienkultur dagegen etwas höher als in der Algenkultur ($P > 95 \%$), erreicht aber einen ähnlichen Wert wie in der Rotatorienkultur der Stickstoff-limitierten Nahrungskette ($10,4 \pm 2,7$ mg DOC/l).

4.4.1.4. Berechnung der Futterwertung der Rotatorien in beiden Kultursystemen

Die Berechnungen können mit 2 verschiedenen Meßgrößen als Leitparameter durchgeführt werden:

1. Trockensubstanzkonzentration
2. Chlorophyllgehalt

Bei der Ermittlung der Bilanz über die Trockensubstanz muß zwischen der Trockensubstanz der Rotatorien und der Trockensubstanz der Fäzes und nicht gefressenen Algen differenziert werden. Die Trockensubstanz der Rotatorien kann über die Tierkonzentration und dem Gewicht/Tier unter Berücksichtigung des Prozentsatzes eiertragender Weibchen berechnet werden. Die Differenz zwischen der Trockensubstanz der Gesamtprobe und der Trockensubstanz der Rotatorien gibt das Gewicht der nichtgefressenen bzw. ausgeschiedenen Partikel an.

Bei Benutzung des Chlorophylls als Leitparameter zur Berechnung der Futterverwertung wurde der Chlorophyllgehalt der Rotatorienkulturen zum Chlorophyllgehalt der Algenkulturen in Relation gesetzt und so die Menge an nichtgefressenen und ausgeschiedenen Algen in mg TS/l berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 gegenübergestellt.

Beide Meßmethoden liefern eine gute Übereinstimmung. Der meßtechnisch entscheidende Wert für die Summe nicht gefressener Algen und der Fäzes beträgt im System A 13 % der TS des Zulaufs bei Berechnung auf TS-Basis und 14 % bei Berechnung auf Chlorophyll-Basis. In System B werden bei Berechnung auf TS-Basis noch 11 % und bei Berechnung auf Chlorophyll-Basis noch 13 % der TS des Zulaufs als Algen bzw. Fäzes in der Rotatorienkultur gefunden. In beiden Systemen werden rund 20 % der in den Algen festgelegten Biomasse in Rotatorienbiomasse konvertiert. Knapp 70 % verschwinden, sie werden von den Tieren veratmet.

1. Stickstofflimitiertes System

<u>1.1. Trockensubstanz</u>		<u>1.2. Chlorophyll</u>	
	TS(mg/l)	TS(berechnet)	Chlorophyll($\mu\text{g/l}$)
input Algen	229.....100%	100%	229.....2363
output Rotatorien und Fäces.....	71..... 32%		
Rotatorien pro- duziert.....	43.....19%		
Algen und Fäces....	30.....13%	14%.....	33..... 342
veratmet.....	158.....69%	67%.....	153
Algen gefressen....	199.....87%	85%.....	196.....2021

2. Lichtlimitiertes System

<u>2.1. Trockensubstanz</u>		<u>2.2. Chlorophyll</u>	
	TS(mg/l)	TS(berechnet)	Chlorophyll($\mu\text{g/l}$)
input Algen.....	225.....100%	100%.....	225..... 5657
output Rotatorien und Fäces.....	70.....31%		
Rotatorien pro- duziert.....	45.....20%		
Algen und Fäces..	25.....11%	13%.....	29..... 725
veratmet.....	153.....68%	67%.....	151
Algengefressen...	200.....89%	87%.....	196 4932

Tabelle 5. Berechnung der Futterverwertung in der zweistufigen Nahrungskette

Die Daten sind Mittelwerte aus jeweils 2 Kulturen und einem
18-tägigen Meßzeitraum.

4.4.2. Betrieb der Rotatorienstufe mit 2 und 4 Tagen Aufenthaltszeit

Bei allen folgenden Versuchen wurde die Algenstufe als stickstofflimitierter Chemostat betrieben, die Versuchsbedingungen sind identisch mit den unter 4.4.1. beschriebenen.

4.4.2.1. Tierzahl, TS

Die Rotatorienkonzentration unterscheidet sich bei beiden Aufenthaltszeiten nicht signifikant. Es werden stabile Fließgleichgewichte (Quasi steady States) erreicht mit einer Standardabweichung von ± 15 bis ± 20 %. Der Mittelwert der Tierkonzentrationen beträgt bei 4 Tagen Aufenthaltszeit 321 ± 51 Tiere/ml und bei 2 Tagen 337 ± 63 Tiere/ml ($n = 47$). Der Prozentsatz der eiertragenden Tiere ist bei der kurzen Aufenthaltszeit signifikant höher. Bei einer Aufenthaltszeit von 4 Tagen tragen 25 ± 10 % der Tiere ein Ei angeheftet, bei 2 Tagen dagegen 32 ± 8 %.

Der dTS-Gehalt der Kulturen mit kurzer Aufenthaltszeit ist signifikant größer als bei langer Aufenthaltszeit. Da die Zahl und damit die TS der Rotatorien beider Kulturen identisch ist, ist dieser Unterschied auf den höheren Anteil nicht gefressener Algen und Fäzes zurückzuführen. Bei 4 Tagen Aufenthaltszeit bleiben 30 mg/l als Algen und Fäzes in der Kultur, bei 2 Tagen dagegen 53 mg/l.

4.4.2.2. Pigmentkonzentration

Die Analyse der Pigmentkonzentration bestätigt die bereits bei der Analyse der TS gefundenen unvollständigen Elimination der Algenbiomasse bei der kurzen Aufenthaltszeit. Während der Phaeophytingehalt beider Kulturen sich nicht signifikant unterscheidet, liegt der Chlorophyllgehalt bei kurzen Aufenthaltszeiten deutlich höher. Im Ablauf befinden sich bei 4 Tagen Aufenthaltszeit noch 16 % bzw. bei 2 Tagen Aufenthaltszeit 28 % der Chlorophyllkonzentration in der Algenkultur. Diese Werte stimmen gut mit der Bilanzierung auf TS-Basis überein. Hier beträgt der Anteil der Algen- und Fäzes-Fraktion 13 % bzw. 24 % des TS der Algenkultur.

4.4.2.3. Stickstoffbilanz

Die Konzentration an anorganischen gelösten Stickstoff ist in beiden Kulturen deutlich verschieden. Sie beträgt $4,5 \pm 2,4$ mg N/l bei der langen und $2,3 \pm 0,9$ mg N/l bei der kurzen Aufenthaltszeit. Den Löwenanteil davon macht in beiden Kulturen der von den Tieren exkretierte Ammoniumstickstoff aus. Die Nitrit- und Nitratkonzentrationen liegen ähnlich niedrig wie in der Algenkultur (Abb. 36).

Aus den NH_4^+ -Konzentrationen in den Kulturen läßt sich die NH_4^+ -Exkretionsrate der Rotatorien bestimmen. Sie beträgt in beiden Kulturen $3,3$ ng NH_4^+ -N pro Tier und Tag. Die unterschiedliche NH_4^+ -Konzentration im Ablauf der Kulturen ist daher nur durch die längere Aufenthaltszeit bedingt.

In beiden Kulturen werden ca. 55 % des in der Algenbiomasse festgelegten Stickstoffs in die Rotatorienbiomasse inkorporiert (7,6 bzw. 8,1 mg N/l). In der Fraktion der nicht gefressenen Algen und Fäzes bleiben 1,77 mg N/l bei 4 Tagen und 3,13 mg N/l bei 2 Tagen Aufenthaltszeit. Die Summe an partikulären N beträgt 9,34 bzw. 11,24 mg N/l, das sind 67 % des Gesamt-N bei 4 Tagen und 81 % bei 2 Tagen Aufenthaltszeit (Abb. 36). Der Rest, 33 bzw. 19 %, gelangen als gelöster N in den Ablauf und führen daher zu einer erheblichen Verminderung der N-Eliminationsrate des gesamten 2-stufigen Systems.

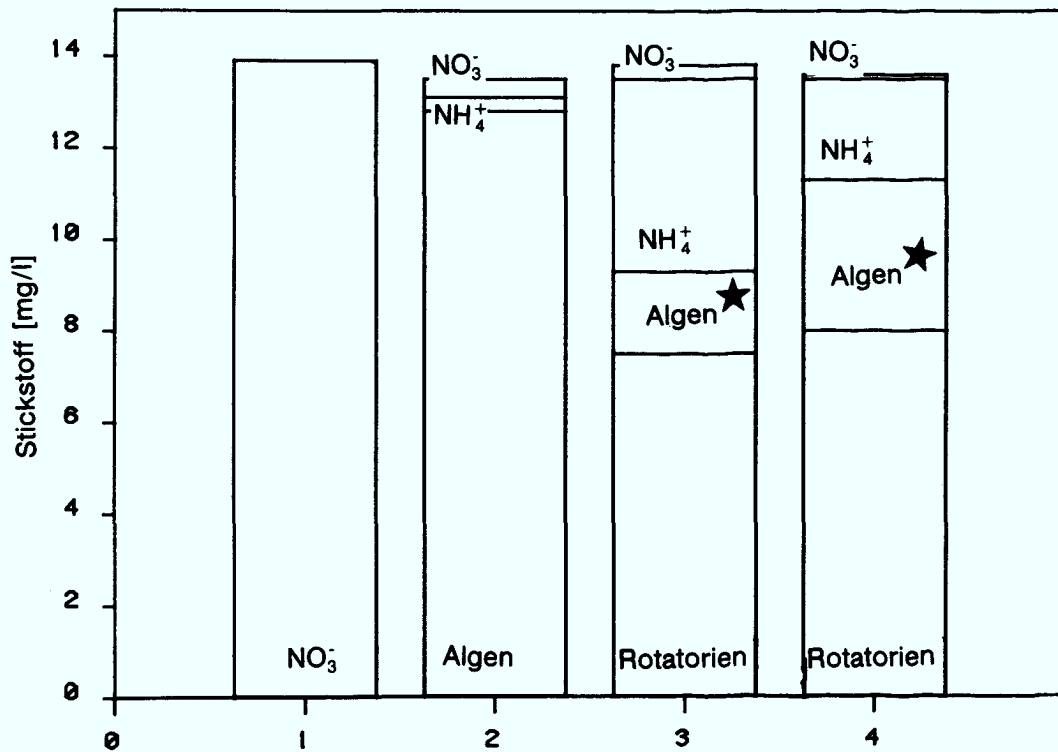


Abb. 36: Stickstoff-Fluß durch die 2-stufige Algen-Rotatorien-Nahrungskette (Angaben in mg N/l * Aufenthaltszeit)

1: Medium
2: Algenkultur
3: Rotatorienkultur (4 Tage Aufenthaltszeit)
4: Rotatorienkultur (2 Tage Aufenthaltszeit)
Algen★ = Fraktion der nicht gefressenen Algen+Fäzes
Mittelwerte aus 2 Kulturen, während eines 14-tägigen Quasi: steady states

(25 %) in der Fraktion der nicht gefressenen Algen zurück. Der gelöste organische Kohlenstoff ist bei der langen Aufenthaltszeit mit 13 ± 5 mg/l (12 %) erheblich höher als bei den kurzen Aufenthaltszeiten (6 ± 2 mg C/l; 6 %). Der fehlende Kohlenstoff findet sich als CO_2 im Abgas der Kulturen wieder. Diese Menge ist in beiden Kulturen identisch. Durch Integration der CO_2 -Konzentrationen im Abgas über eine Aufenthaltszeit (siehe auch Kap. 4.1.2.) kann die Respiration der Rotatorien quantifiziert werden. Dabei werden 65,1 mg C/l (58 %) bzw. 66,8 mg C/l (59 %) als CO_2 frei (Abb. 37).

Für die Abwasserreinigung ist der gelöste organische Kohlenstoff ein wichtiger Parameter. Im Vergleich zur Algenkultur ist seine Konzentration in der Rotatorienkultur bei 4 Tagen Aufenthaltszeit nicht signifikant erhöht (13 ± 5 mg C/l gegen 11 ± 4 mg in der Algenkultur) bei kurzer Aufenthaltszeit mit 7 mg/l dagegen sogar niedriger. Diese Verminderung ist auf bakterielle Tätigkeit in den Rotatorienkulturen zurückzuführen. Eine Sekundärverschmutzung wie beim gelösten Stickstoff liegt bezüglich des Kohlenstoffs nicht vor, von Rotatorien eventuell exkretierter Kohlenstoff wird von vorhandenen Bakterien gleich oxidiert.

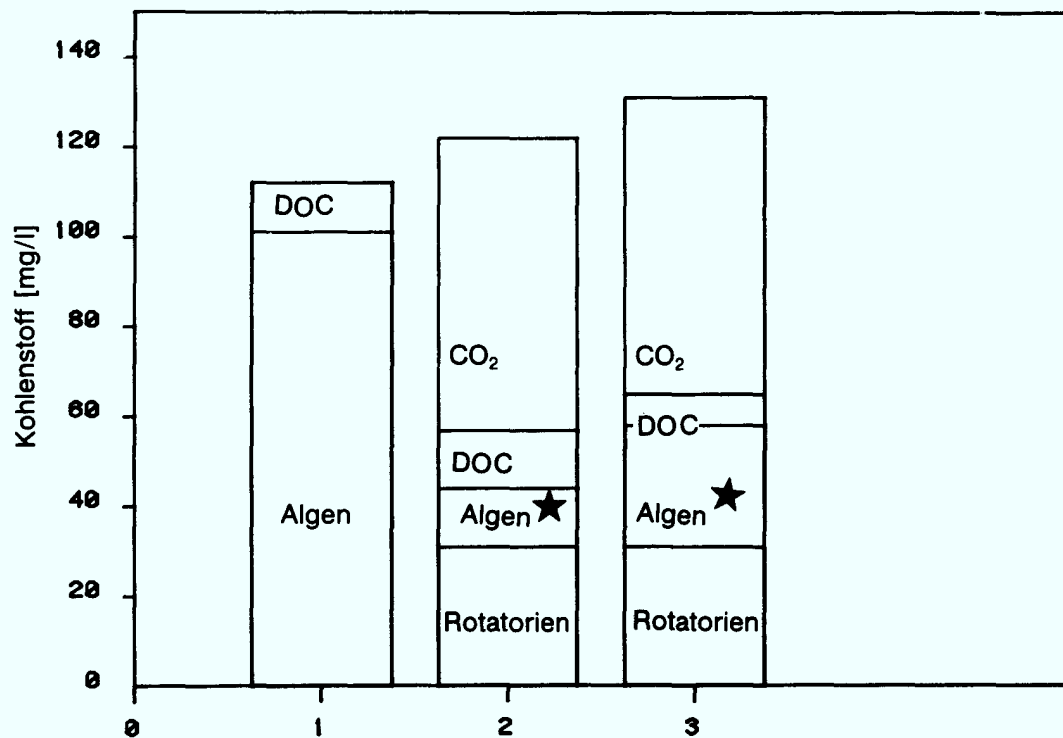


Abb. 37: Kohlenstoff-Fluß durch die 2-stufige Algen-Rotatorien-Nahrungskette (Angaben in mg C/l * Aufenthaltszeit)

1: Algenkultur

2: Rotatorienkultur (4 Tage Aufenthaltszeit)

3: Rotatorienkultur (2 Tage Aufenthaltszeit)

Algen* = Fraktion der nicht gefressenen Algen und Fäzes

Mittelwerte aus 2 Kulturen während eines 14tägigen Quasi steady states.

4.4.3. Betrieb des Kultursystems mit belichteter 2. Stufe

Die Ammoniumexkretion der Rotatorien führt zu einem Anstieg des gelösten N im Ablauf der Rotatorienkultur. Da die Kulturen im Dunkel gehalten wurden, konnte dieser Stickstoff von den noch nicht gefressenen Algen nicht zum Wachstum benutzt werden. Eine Belichtung der Kulturen sollte daher zu einer signifikanten Reduktion des Ammoniums im Ablauf führen. Zur Prüfung dieser Frage wurde die 2. Stufe des Kultursystems belichtet und die Populationsdynamik der Rotatorien, sowie die N-Konzentration im Ablauf registriert.

4.4.3.1. Populationsdynamik und Stickstoffbilanz

Die in der Rotatorienkultur noch vorhandenen Algen sind bei Belichtung in der Lage das von den Rotatorien exkretierte Ammonium quantitativ aufzunehmen, die NH_4^+ -Konzentration sinkt von 4,2 auf 0,3 mg N/l ab (Abb. 38). Die Auswirkungen dieses internen Recyclingprozesses sind in Abb. 39 dargestellt. Die NH_4^+ -Aufnahme der Algen und die damit verbundene Biomasseproduktion bewirkt eine erhöhte Futterbereitstellung für Brachionus. Da das Wachstum der Rotatorien über die Futtermenge limitiert ist, steigt die Tierkonzentration stark an. Das neue Steady-State wird nach ca. 10 Tagen erreicht (Abb. 39). Es liegt mit 643 ± 38 Tieren/ml etwa doppelt so hoch wie in den Kulturen ohne Belichtung.

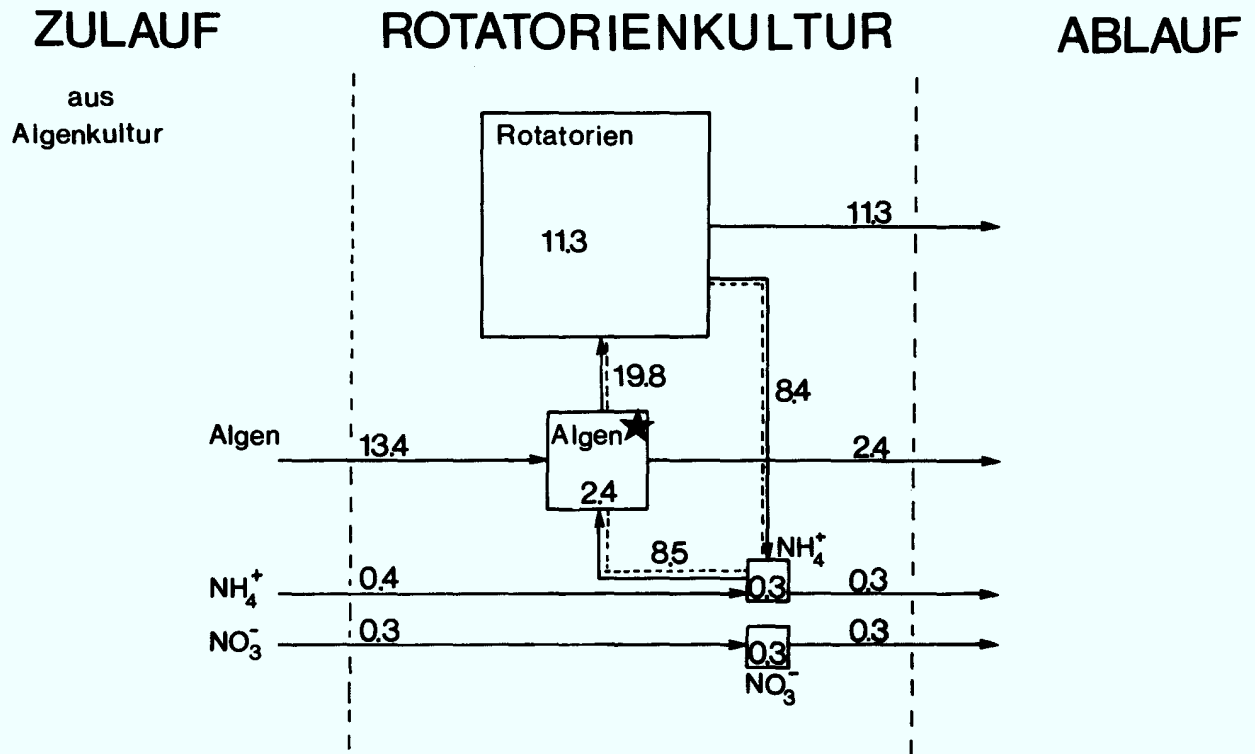


Abb. 38: Stickstoff-Fluß durch eine belichtete Rotatorienkultur.

Angaben in mg N/l in einer Aufenthaltszeit (4d)

----- internes N-Recycling

Mittelwerte während eines 14-tägigen Quasi Steady States

Algen★ = Fraktion der nicht gefressenen Algen und Fäzes

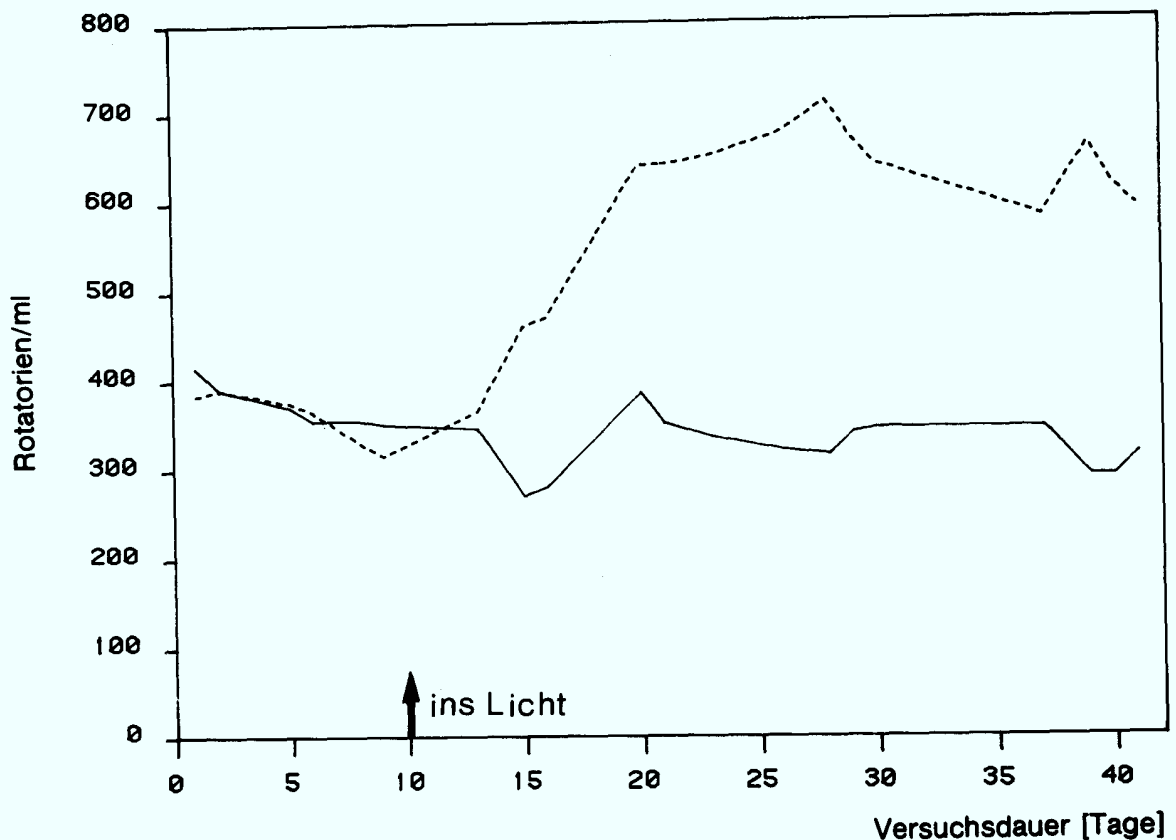


Abb. 39: Einfluß einer Belichtung der 2. Stufe auf die Populationsdynamik von B. rubens im 2-stufigen Chemostatensystem
— im Dunkel; - - - - im Licht

Die Konzentration an N nicht gefressener Algen und Fäzes ist mit 2,4 mg N/l (= 17 %) nicht wesentlich höher als in den abgedunkelten Kulturen (3,13 mg N/l). Der Anstieg der Rotatorienpopulation ist daher nur auf die Aufnahme des N aus der Ammonium-Fraktion zurückzuführen. Der Wirkungsgrad der Konversion von Algen-N in Rotatorien-N beträgt in dieser Kultur 82 %, dies bedeutet eine Steigerung von fast 30 % gegenüber den abgedunkelten Kulturen. Der Gesamtwirkungsgrad der N-Elimination dieses 2-stufigen Systems ist exzellent, 98 % des gelösten anorganischen Stickstoffs im Zulauf werden in die leicht abtrennbare Biomasse inkorporiert.

4.4.3.2. Trockensubstanz und Kohlenstoffbilanz

Die TS-Konzentration in der belichteten Kultur erreicht 141 mg TS/l, das bedeutet eine Steigerung von ca. 45 % gegenüber der verdunkelten Kultur. Von den 112 mg/l partikulären organischen Kohlenstoff in der Algenkultur werden 44 mg/l (39 %) in die Rotatorienbiomasse inkorporiert, weitere 21 mg/l (19 %) bleiben als nicht gefressene Algen und Fäzes zurück. Nur 47 mg/l (42 %) werden von der Kultur als CO_2 abgegeben. Dieser niedrige Wert (verdunkelte Kulturen = 60 %) ist ebenfalls durch den internen Recyclingprozeß bedingt.

4.4.4. Bestimmung des Auswaschpunktes der Rotatorienkultur und Modellierung der Steady State-Parameter als Funktion der Durchflußrate

4.4.4.1. Populationsdynamik der Rotatorien

Zur Bestimmung der maximalen Durchflußrate durch eine Rotatorienkultur wurde die Aufenthaltszeit in der 2. Stufe verkürzt. Bei Aufenthaltszeiten von 32 und 24 h (3 und 4malige Verdünnung und Fütterung pro Tag) wurden Steady States erreicht. Eine weitere Erhöhung der Durchflußrate ($D = 0,059$) führte zum Auswaschen der Kulturen, da die in Batchkulturen bestimmte maximale Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,056$ (Verdopplungszeit = 18 h) überschritten war.

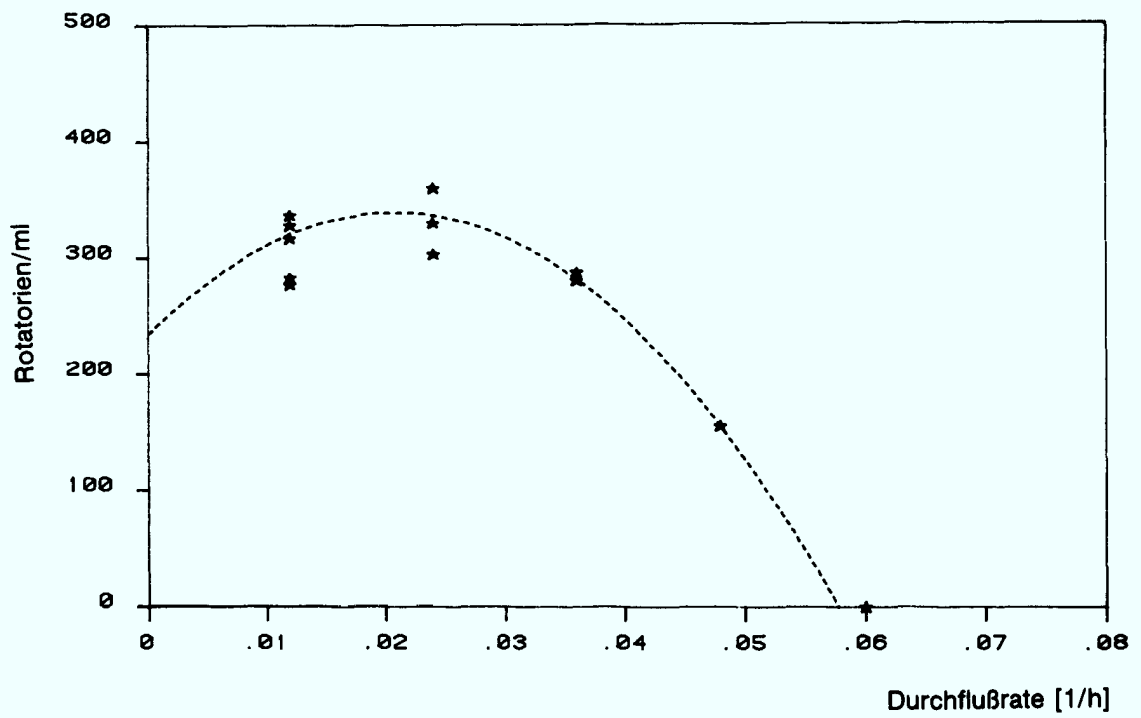


Abb. 40: Rotatorienkonzentration im Fließgleichgewicht als
Funktion der Durchflußrate
Mittelwerte während eines 14-tägigen Quasi Steady States

Diese kurzen Aufenthaltszeiten bewirkten signifikante Änderungen in der Populationsstruktur der Rotatorien (siehe auch 4.1.4.). Ein großer Teil der Tiere wurde bereits vor Erreichen der fertilen Phase ausgespült. Dieser Effekt mußte von den verbleibenden Tieren durch eine erhöhte Eiproduktion kompensiert werden, damit ein Auswaschen der Kulturen verhindert wird. Tatsächlich erhöht sich die durchschnittliche Zahl der angehefteten Eier/Tier mit zunehmender Durchflußrate (Abb. 41). Bei 96 Stunden Aufenthaltszeit beträgt dieser Quotient 0,24, bei 24 Stunden Aufenthaltszeit steigt er auf 0,63 Eier pro Tier an. Gleichzeitig steigt die maximale Anzahl der von einem Tier gleichzeitig angeheftet getragenen Eier von 1 Ei bei 96 Stunden Aufenthaltszeit auf bis zu 6 Eiern bei einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden an. Die mittlere Rotatorienkonzentration im Steady State sinkt erst bei hohen Durchflußraten ab. Selbst bei 32h Aufenthaltszeit sinkt die Populationsdichte (280 Tiere/ml) nur leicht unter den Wert bei längeren Aufenthaltszeiten ab (320 Tiere/ml). Erst eine weitere Erhöhung des Durchflusses führt zu einer signifikant niedrigeren Tierkonzentration. Bei einer Aufenthaltszeit von 24 h beträgt die mittlere Rotatorienkonzentration nur noch 155 Tiere/ml (Abb. 40).

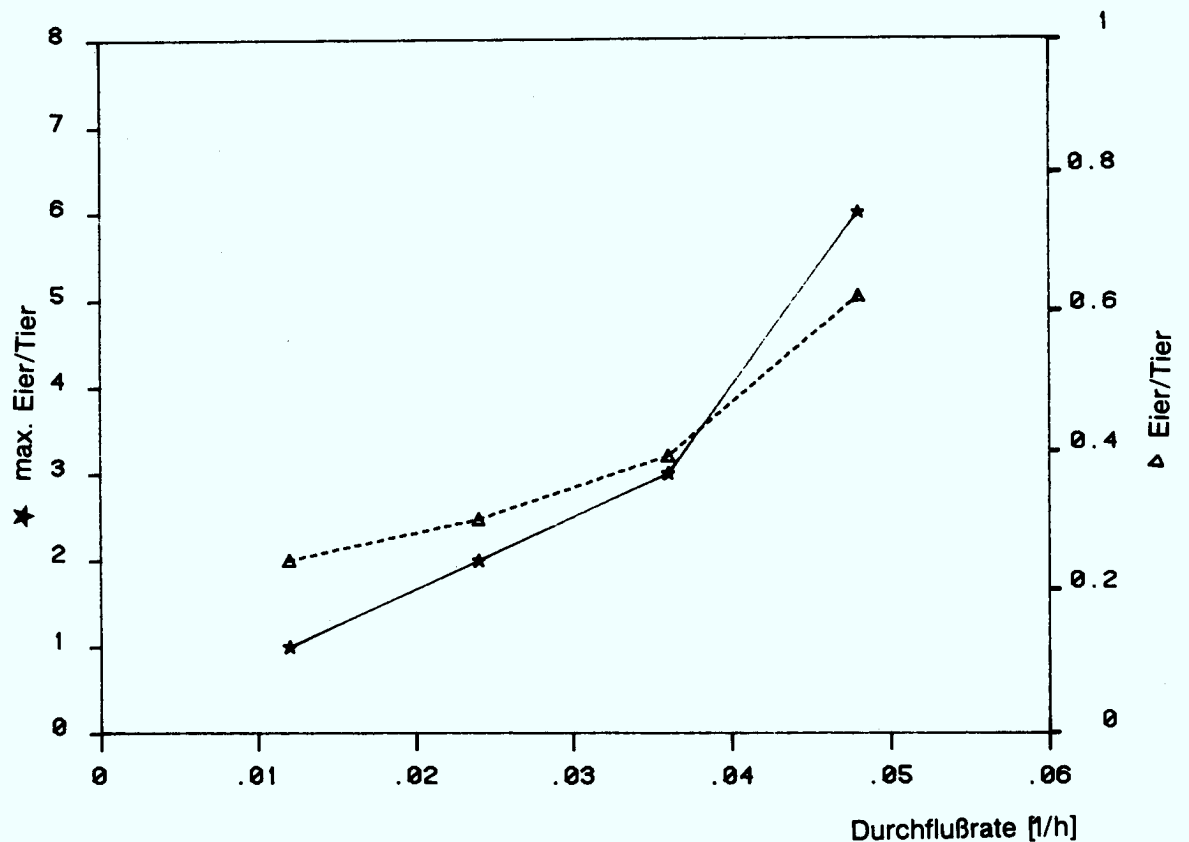


Abb. 41: - - - mittlere Zahl und ——— Maximum der pro Tier angeheftet getragenen Eier als Funktion der Durchflußrate

Die Größenverteilung der Rotatorienpopulation wurde bei 2 Wachstumsraten mit Hilfe des Morphomats gemessen.

Pro Kultur wurden 220 Tiere vermessen (Länge und Breite). Aus diesen Daten läßt sich nach Ruttner-Kolisko (1977) das Volumen von Brachionus berechnen. Die von ihr für die Gattung Brachionus angegebene Formel für einen ellipsoidischen Körper:

$$V = \frac{4\pi}{3} * r_1 * r_2 * r_3$$

mit den Verhältnissen von r_1 (Länge) : r_2 (Breite) : r_3 (Dicke) von 1 : 0,6 : 0,4 gilt offensichtlich nur für B. calyciflorus. B. rubens besitzt eine gedrungene Gestalt mit einem Verhältnis von Länge : Breite : Dicke von 1 : 0,8 : 0,5. Diese in meinen Kulturen gemessenen Relationen stimmen gut mit den Abbildungen von B. rubens in Voigt & Koste (1978) überein. Bei Verwendung dieser Relationen läßt sich das Volumen von B. rubens näherungsweise bestimmen als $0,21 * \text{Länge}^3$.

Tiere unter einer Körperlänge von $130 \mu\text{m}$ wurden nicht berücksichtigt, sie wurden als juvenil betrachtet. Die statistische Auswertung erfolgte volumenbezogen. Bei einer Aufenthaltszeit von 96 Stunden betrug das Volumen der adulten Tiere $6,39 * 10^6 \pm 1,17 * 10^6 \mu\text{m}^3$, bei 32 Stunden Aufenthaltszeit dagegen $7,98 * 10^6 \pm 2,4 * 10^6 \mu\text{m}^3$. Die adulten Tiere der schnellwachsenden Kultur waren daher ca. 20 % größer als die Tiere der langsam wachsenden Kultur. Dieser Unterschied ist hochsignifikant (t-Test, $P > 99,9 \%$).

4.4.4.2. Algenkonzentrationen

Die Konzentration an nicht gefressenen Algen und Fäzes erhöht sich mit zunehmender Durchflußrate, da nur ein geringerer Teil der Algen von den Tieren gefressen wird. Während von den zudosierten 225 mg Algen/l bei 83 Stunden Aufenthaltszeit nur zwischen 15 und 30 mg zurückbleiben, gelangen bei einer Aufenthaltszeit von 24 Std. immerhin 140 mg/l Algenbiomasse in den Ablauf.

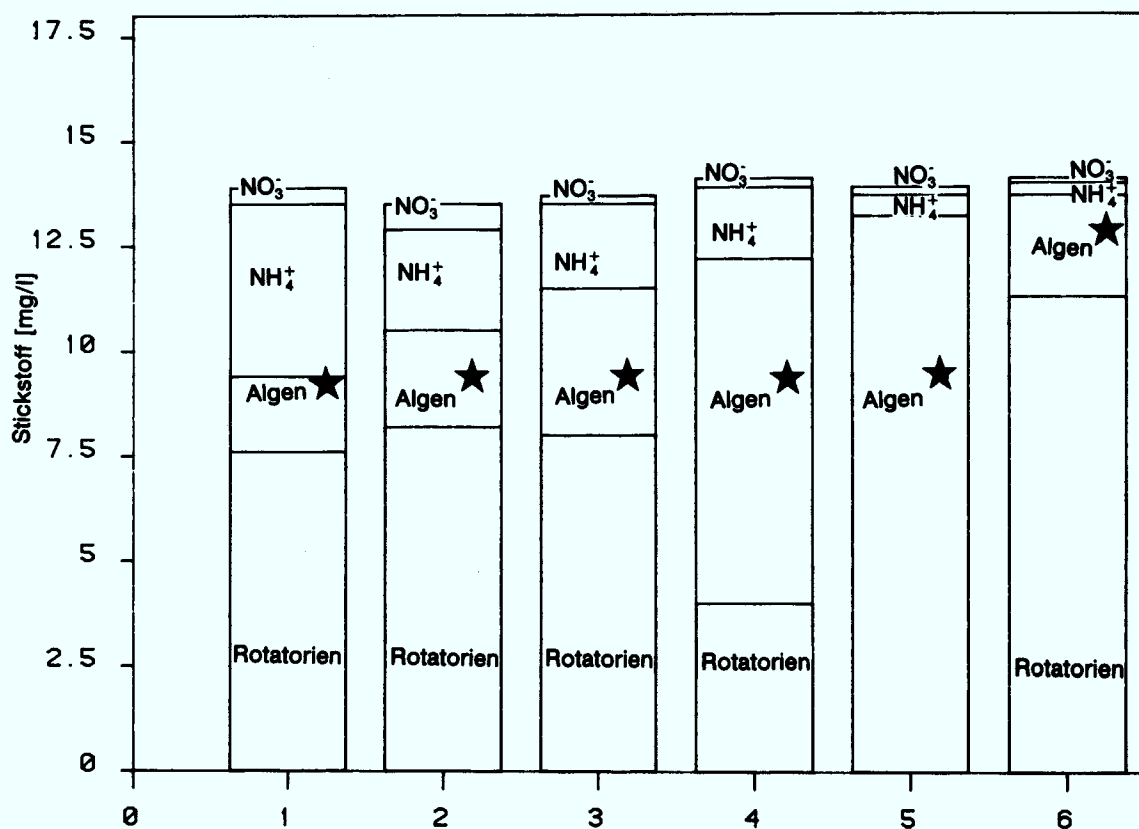


Abb. 42: Stickstoffbilanz in der Rotatorienkultur bei unterschiedlichen Durchflußraten in einer Aufenthaltszeit

1. D = 0,012 /h
2. D = 0,024/h
3. D = 0,036/h
4. D = 0,048/h
5. D = 0,06 /h
6. D = 0,012; Kultur im Licht

Mittelwerte aus 2 Kulturen während eines 14-tägigen Quasi Steady States

4.4.4.3. NH₄⁺-Exkretion

Die Ammoniumkonzentration im Ablauf sinkt mit zunehmender Durchflußrate bzw. abnehmender Rotatorienkonzentration (Abb. 43). Die berechnete NH₄⁺-Exkretionsrate in ng NH₄⁺-N/Tier und Tag steigt aber bei kürzeren Aufenthaltszeiten als 2 Tagen stark an (Abb. 43) und erreicht bei 24 h Aufenthaltszeit mit 11,0 ng mehr als den 3fachen Wert wie bei den langsam wachsenden Tieren (3,3 ng N/Tier und Tag).

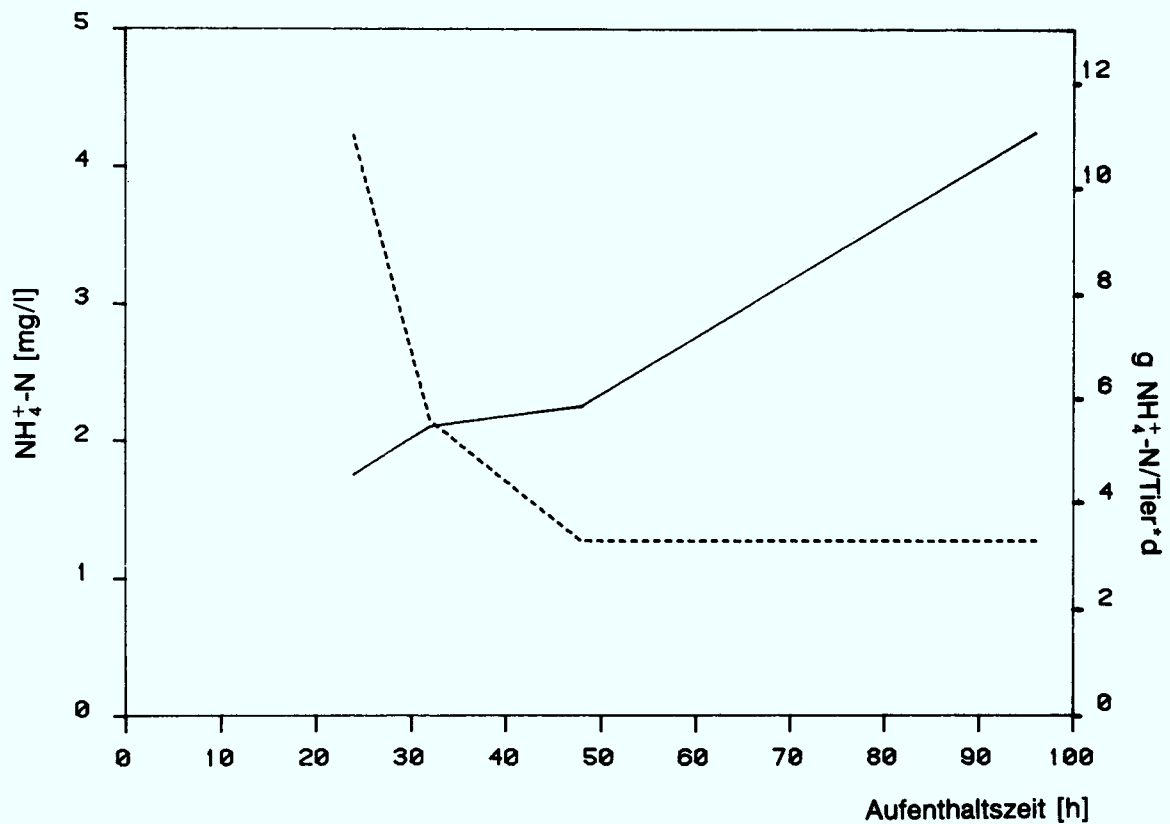


Abb. 43: Ammonium-Konzentration in der Kultur ——— und NH_4^+ -Exkretion von *B. rubens* - - - - als Funktion der Aufenthaltszeit

4.4.4.4. Produktion

Die Produktion an Rotatorien gemessen als Tiere pro ml und Tag zeigt die erwartete Maximumskurve. Bis zu einer Durchflußrate von 0,036/h steigt die Produktion stark an (von 80 auf 210 Tiere/ml $\times$ d) und sinkt anschließend auf 155 Tiere/ml Tag ab (Abb. 44). Dies ist die höchste Produktivität, die bislang an Rotatorienkulturen erzielt wurde.

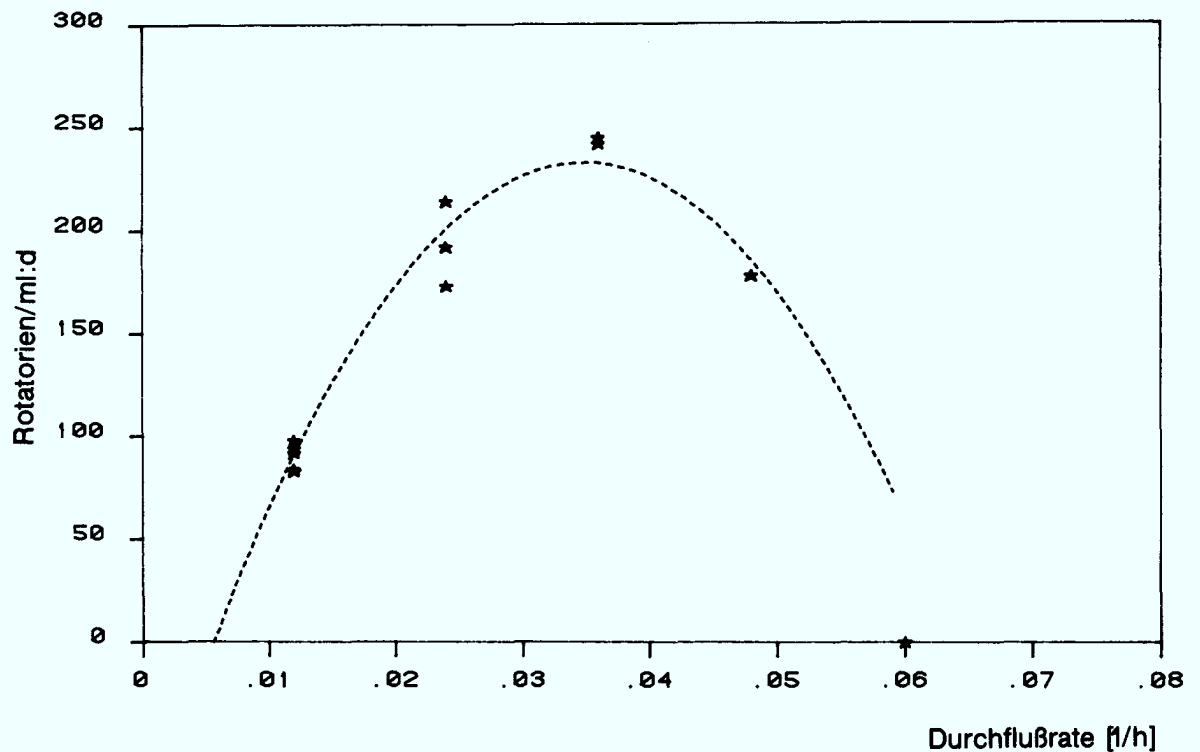


Abb. 44: Produktivität der Rotatorienkulturen in Abhängigkeit von der Durchflußrate
Mittelwerte während eines 14-tägigen Quasi Steady States

4.4.4.5. Futterverwertung/Ertrag

Bei Berechnung der Futterverwertung heterotropher Organismen kann zwischen verschiedenen Effizienzen unterschieden werden (Pilarska 1977c).

1. Die Produktionseffizienz (K_2) ist das Verhältnis von Produktion (P) zu Assimilation (A).

$$K_2 = \frac{P}{A}$$

2. Die Assimilationseffizienz (K_1) gemessen als Verhältnis von Produktion (P) zu Futteraufnahme (Konsumption, C)

$$K_1 = \frac{P}{C}$$

3. Die ökologische Effizienz (o) gemessen als Verhältnis von Produktion (P) zu Futterangebot (Input, I)

$$O = \frac{P}{J}$$

In meinen Experimenten kann ich die beiden Parameter K_1 und K_2 nicht exakt bestimmen, da ich nicht ausschließen kann, daß nicht assimiliertes Futter, das wieder exkretiert wird, nochmals aufgenommen und assimiliert wird. Der von mir gemessene Ertragskoeffizient Y, ebenfalls gemessen als Verhältnis von Produktion zu Assimilation unterscheidet sich von dem von anderen Autoren (s. Diskussion) in Kurzexperimenten bestimmten Wert K_2 durch die Möglichkeit mehrfacher Darmpassagen von nicht gleich assimiliertem Futter. Er sollte daher zwischen K_1 und K_2 liegen.

Die Futterverwertung steigt mit Erhöhung der Durchflußrate leicht an. Bei 96 Stunden Aufenthaltszeit beträgt sie 0,34 mg Rotatorien/mg gefressener Algen, bei 24 h Aufenthaltszeit 0,40 mg Rotatorien/mg gefressener Algen (Abb. 46b). Dieser Unterschied ist auf den erhöhten Anteil des Erhaltungsstoffwechsels (Maintenance) im Vergleich zum Produktionsstoffwechsel bei längeren Aufenthaltszeiten zurückzuführen.

Die ökologische Effizienz O auf TS-Basis der Rotatorien erreicht bei Aufenthaltszeiten zwischen 96 und 32 h Werte zwischen 26 und 30 %. Bei der kurzen Aufenthaltszeit von 24 h beträgt sie nur noch 15 %.

Bedeutung des Ertragskoeffizienten für die Freßraten

Der Ertragskoeffizient wird in Rotatorienbiomasse/gefressene Algen ausgedrückt, er kann durch Einbeziehung der Gewichte einer Alge bzw. eines Rädertiers umgeschrieben werden. Er erhält dann die Dimension "Algenzellen pro Rädertier" (Abb. 45). Daraus läßt sich die mittlere Freßrate in Abhängigkeit von der Durchflußrate bestimmen. Sie beträgt bei 4 Tagen Aufenthaltszeit 590 Zellen/Tier und Stunde und steigt bis auf 1850 Zellen/Tier und Stunde bei 24 h Aufenthaltszeit an. Aus dem Zusammenhang zwischen Freßrate und Algenkonzentration (s. 4.1.3.3.) kann die mittlere Algenkonzentration ermittelt werden, die bei den entsprechenden Aufenthaltszeiten nicht unterschritten werden darf (Abb. 45). Dieser Zusammenhang belegt, daß die hohen Restalgenkonzentrationen, die bei kurzen Aufenthaltszeiten gefunden werden, notwendig sind, um die erforderlichen hohen Freßraten zu garantieren. Bei einem Absinken dieser Konzentration könnten die Rotatorien während einer Aufenthaltszeit nicht genügend Algen aufnehmen, um die erforderliche Wachstumsrate aufrecht zu erhalten.

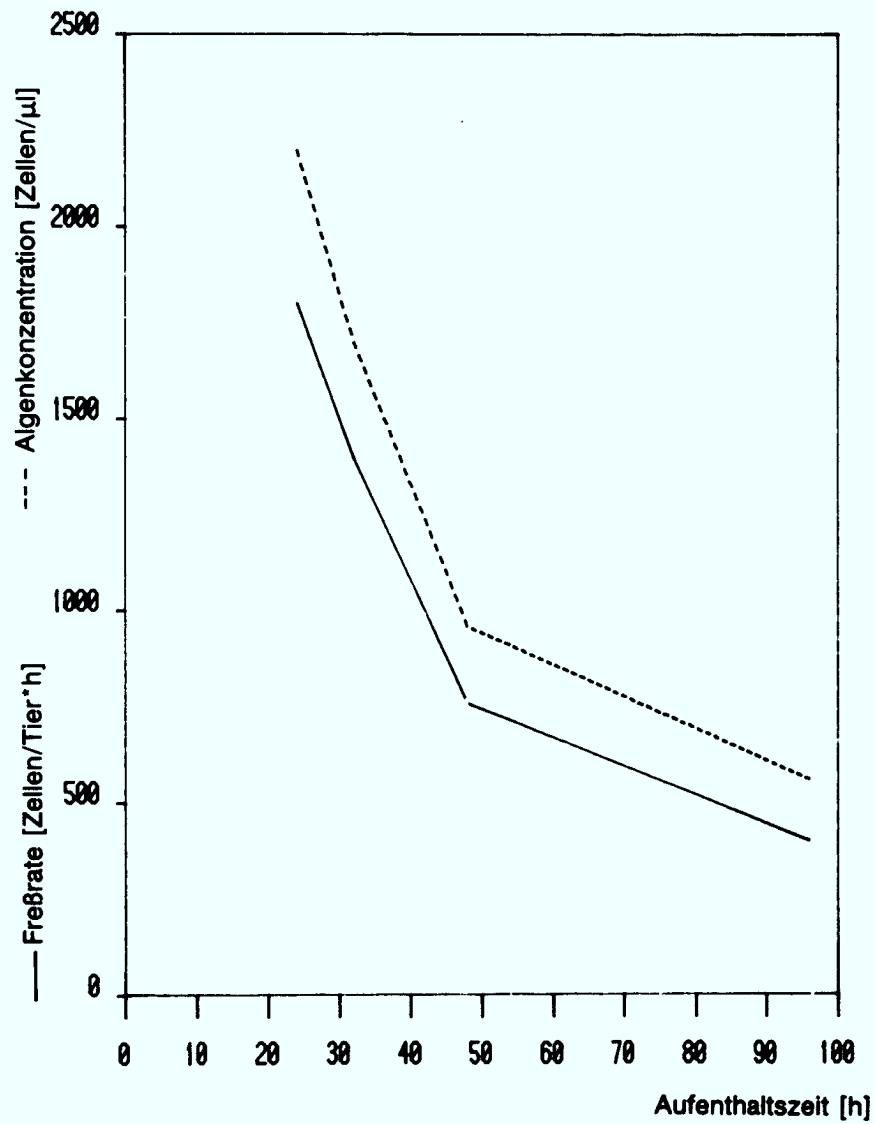


Abb. 45: Minimale Freßrate ——— und dazugehörige Algenkonzentration --- als Funktion der Durchflußrate

4.4.4.6. Berechnung des Futterbedarfs für den Erhaltungs-Stoffwechsel (Maintenance)

Aus der gefundenen Abhängigkeit zwischen der Durchflußrate u und dem Ertragskoeffizienten (Yield) Y läßt sich der Anteil des Futters berechnen, der von den Rotatorien für ihren Erhaltungsstoffwechsel benötigt wird.

Nach Pirt (1975) besteht zwischen maximalem Yield, tatsächlichem Yield und der Wachstumsrate folgender mathematischer Zusammenhang:

$$1) \quad \frac{1}{Y} = \frac{m}{\mu} + \frac{1}{Y_{\max}}$$

$Y_{\max}$ = maximaler Ertrag (Maintenance = 0)

m = Maintenance-Faktor

Aus der Gleichung folgt, daß bei Auftragung von $\frac{1}{Y}$ gegen $\frac{1}{\mu}$, die

Steigung der entstehenden Geraden durch m , der Achsenschnittpunkt dagegen durch $1/Y_{\max}$ ausgedrückt wird. Die Gerade (Abb. 46b; $r = 0,693$) liefert für $m = 8,93 \times 10^{-3}$ und den maximalen Ertragskoeffizienten $Y_{\max} = 0,43$. Der Prozentsatz des gefressenen Futters, der für den Maintenance benötigt wird, läßt sich mit Hilfe von 1) aus der Differenz des gemessenen Yields (Y) und des maximalen Yields ($Y_{\max}$) in Abhängigkeit von der Wachstumsrate berechnen. Abb. 46a gibt diesen Anteil für die bearbeiteten Durchflußraten an. Mit den Daten kann aus den gemessenen Größen der produzierten Rotatorien und der gefressenen Algen die von den Rotatorien pro Tag zur Aufrechterhaltung des Maintenance-Stoffwechsels benötigte Futtermenge berechnet werden. Sie beträgt für alle Aufenthaltszeiten 0,20 mg Algen pro mg Rotatorien und Tag. Aus der Biomasse eines Rotatoriums und einer Algenzelle kann damit die Freßrate in Algenzellen/ml berechnet werden, die für den Maintenance-Stoffwechsel erforderlich ist. Sie beträgt ca. 148 *Scenedesmus costato-granulatus*-Zellen/Tier x Stunde.

Da zwischen der Freßrate und der Algenkonzentration ein direkter Zusammenhang besteht (siehe 4.1.3.3.) kann die Algenkonzentration bestimmt werden mit der B. rubens seinen Maintenance-Stoffwechsel bestreiten kann. Sie beträgt 225 Zellen/ul oder 2,5 mg/l Algentrockensubstanz.

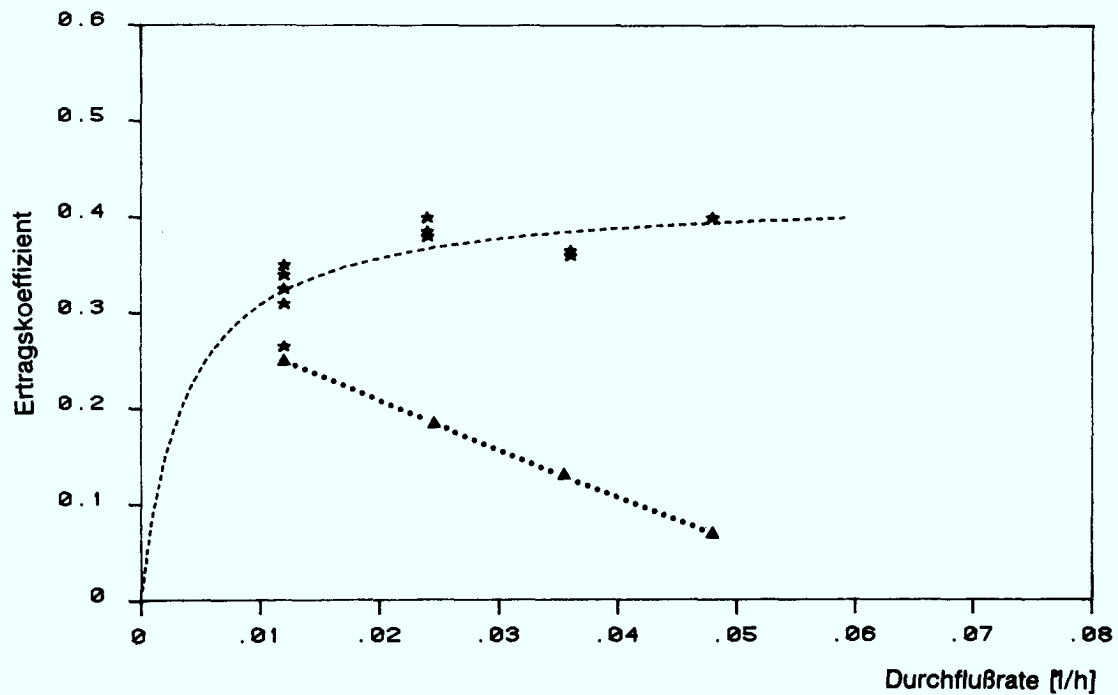


Abb. 46: Berechnung des Ertragsstoffwechsels aus der Abhängigkeit des Ertragskoeffizienten Y von der Durchflußrate

- a) - - - - - Ertragskoeffizient als Funktion von μ
..... Anteil der gefressenen Algen, der für den Erhaltungsstoffwechsel benötigt wird

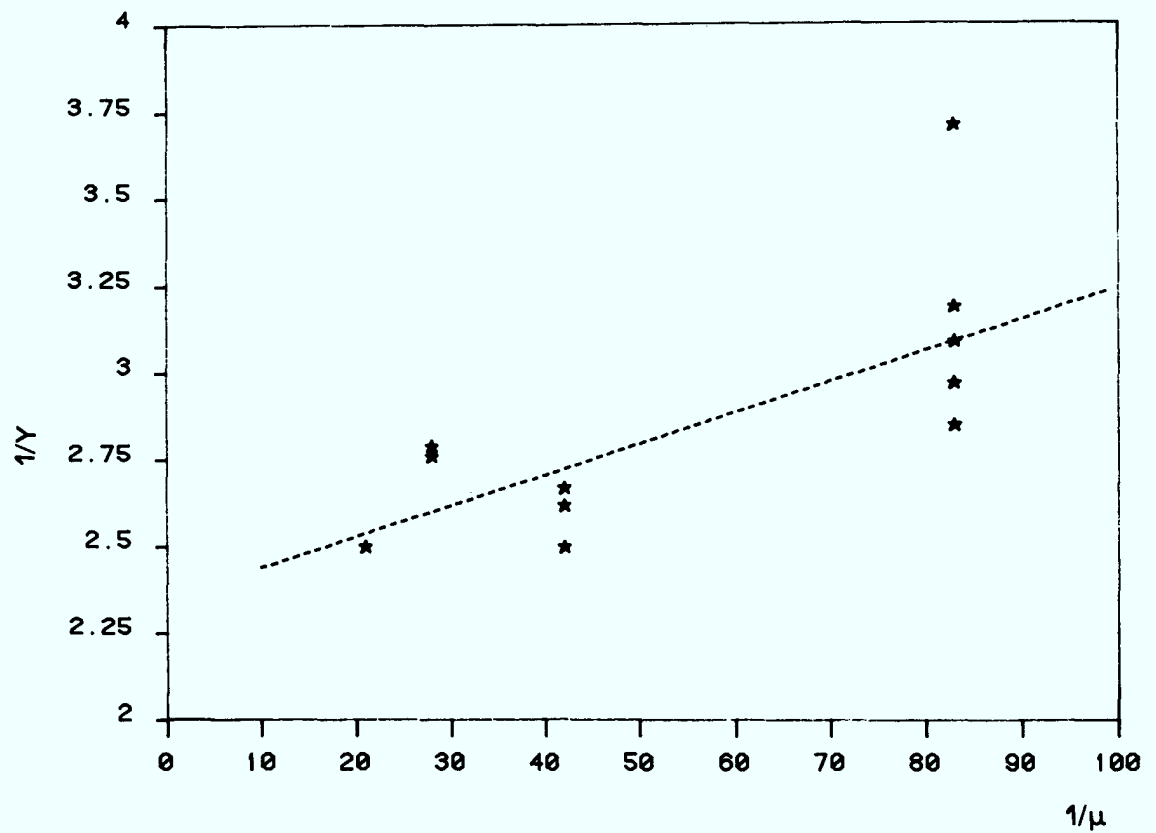


Abb. 46: Berechnung des Ertragsstoffwechsels aus der Abhängigkeit des Ertragskoeffizienten Y von der Durchflußrate
b) Linearisierung von 46a (nach Pirt 1975) $r = 0,8468$

4.4.4.7. Berechnung der Substratsättigungskonstante K_S

Zwischen der in der Kultur noch vorhandenen Algenkonzentration S und der Wachstumsrate besteht unter Einbeziehung des Maintenance-Stoffwechsels folgender Zusammenhang (nach Pirt 1975):

$$S = (D + m \times Y_{\max}) \times K_S / (\mu_{\max} - m \times Y_{\max} - D)$$

Da alle übrigen Parameter dieser Gleichung bestimmt sind, kann sie benutzt werden, um die Substratsättigungskonstante (K_S) zu bestimmen. Sie beträgt für die bearbeiteten 11 Steady-States 45 ± 27 mg Algentrockensubstanz/l. Mit Hilfe von K_S kann jetzt der Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Wachstumsrate nach Michaelis-Menten (Pirt 1975) formuliert werden. Die Gleichung hat folgende Form:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{S + K_S}$$

Daten und Modelle sind in Abb. 47 gegenübergestellt. Trotz der breiten Streuung der Daten ist die Übereinstimmung zufriedenstellend ($r = 0,8409$), es kann gezeigt werden, daß der für Mikroorganismen formulierte mathematische Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Wachstumsrate auch auf Rotatorien übertragen werden kann.

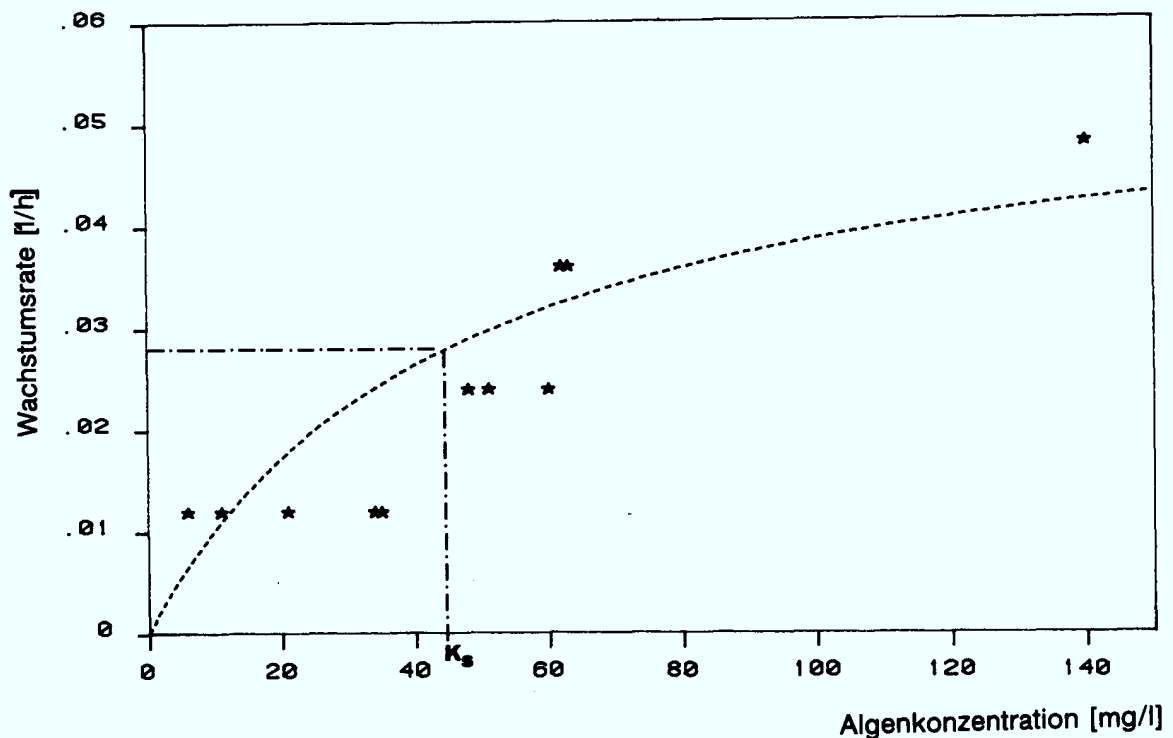


Abb. 47: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Kinetik)

4.4.4.8. Berechnung des Ertragskoeffizienten für Stickstoff

Die in 4.4.4.6. und 4.4.4.7. auf TS-Basis durchgeführten Berechnungen zur Bestimmung des Ertragskoeffizienten, des Erhaltungsstoffwechsels und der Substratsättigungskonstanten, können auch mit Stickstoff als Leitparameter durchgeführt werden. Der Ertragskoeffizient Y für Stickstoff erreicht bei den untersuchten Wachstumsraten Werte zwischen 0,6 und 0,8 (Abb. 48a). Er liegt ca. doppelt so hoch wie der Ertragskoeffizient auf TS-Basis. Diese hohe Effizienz ist auf den im Vergleich zu den Algen erhöhten Proteingehalt der Tiere zurückzuführen. Die Auswertung nach Pirt (1975) führt zu einem maximalen Ertragskoeffizienten von 0,86. Analog zur Berechnung auf TS-Basis wurde auch der K_s -Wert

der N-Aufnahme durch *Brachionus* bestimmt (Abb. 49). Er beträgt $2,8 \pm 1,5$ mg N/l. Dieser Wert ist identisch mit dem K_s -Wert, der auf TS-Basis bestimmt (45 mg/l) wurde, wenn man den N-Gehalt der Algen (5,9 %) mit berücksichtigt. Die ökologische Effizienz σ auf N-Basis liegt bei Wachstumsraten von 0.012/h bis 0.036/h bei Werten zwischen 51 und 59 %, bei $\mu = 0,048$ sinkt sie auf 25 % ab.

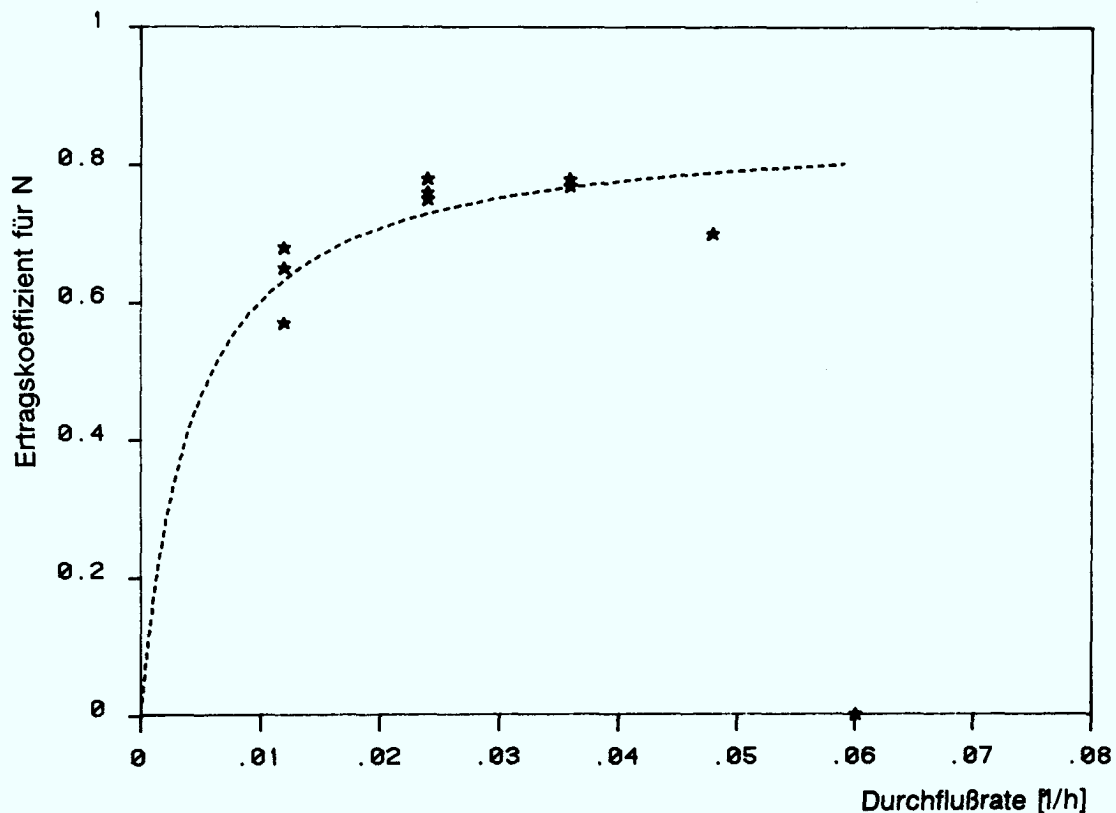


Abb. 48: a) Berechnung des Erhaltungsstoffwechsels (für Stickstoff) aus der Abhängigkeit des Ertragskoeffizienten Y von der Durchflußrate

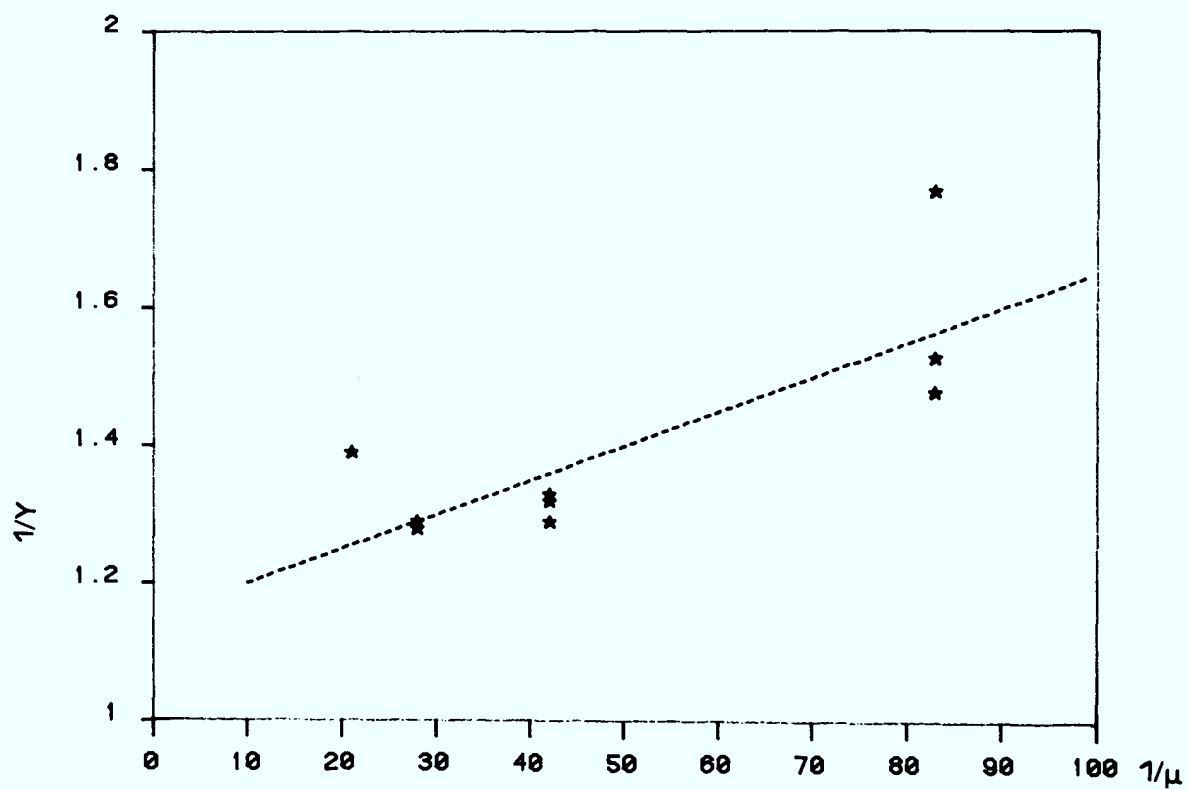


Abb. 48: b) Linearisierung von 48 a (nach Pirt)

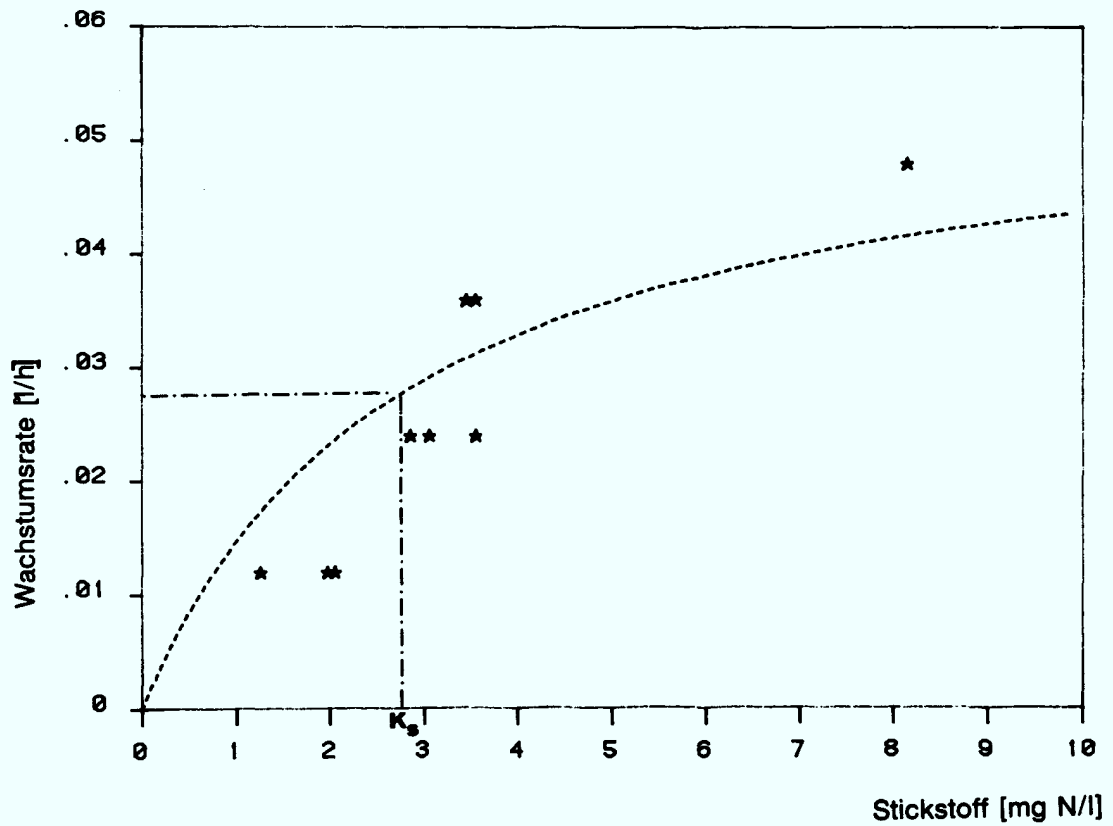


Abb. 49: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der N-Konzentration in den dargebotenen Futteralgen (Michaelis-Menten-Kinetik) (Berechnung wie 4.4.4.7.)

4.4.5. Einsatz des 2-stufigen Chemostatsystems als empfindliches Biotestverfahren. - Ermittlung der NH_4^+ - NH_3 -Toxizität für B. rubens

Da aus der Literatur nur grobe Abschätzungen der NH_4^+ / NH_3 -Toxizität vorliegen (Lincoln 1980, 1983), andererseits aber die möglichst exakte Kenntnis der Toleranzschwelle von autökologischem Interesse ist und für den Betrieb von Massenkulturen von Rotatorien und Algen von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung sein kann, wurde die NH_4^+ / NH_3 -Toxizität für B. rubens bestimmt. Diese Versuche mußten im kontinuierlichen Kultursystem durchgeführt werden, denn nur in einem solchen System kann die Auswirkung eines hemmenden oder fördernden Faktors in sublethaler Konzentration auf die Reproduktionsrate der Rotatorien untersucht und über mehrere Generationen verfolgt werden.

4.4.5.1. Methode

Die NH_4^+ -Toxizität hängt vom NH_3 / NH_4^+ -Gleichgewicht und dieses vom pH-Wert des Mediums ab. Daher war es notwendig, die Rotatorienkulturen zu pH-statisieren. Dies erfolgte bei pH-Werten zwischen 7,0 und 8,0 durch Titration mit einem Phosphat-Puffer, bei höheren pH-Werten durch automatische Zudosierung von 0,01 n NaOH. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte durch kontinuierliche Registration auf einem Schreiber. In diese pH-statischen Kulturen wurde direkt nach der täglichen Fütterung und Verdünnung eine definierte Menge NH_4^+ -N (als NH_4Cl) einpipettiert. Die eingestellte NH_4^+ -Konzentration wurde durch Messung des gelösten NH_4^+ -N mit Hilfe eines Autoanalysers täglich kontrolliert.

Als Kontrolle dienten bei jedem pH-Wert eine NH_4^+ -freie Kultur, außerdem bei NH_4^+ -N-Konzentrationen über 200 mg N/l eine mit der äquimolaren Menge an NaCl belastete Kultur. Getestet wurde der pH-Bereich von 7,0 bis 8,5. In diesem pH-Bereich ist B. rubens nicht durch den pH-Wert selbst inhibiert (Abb. 50).

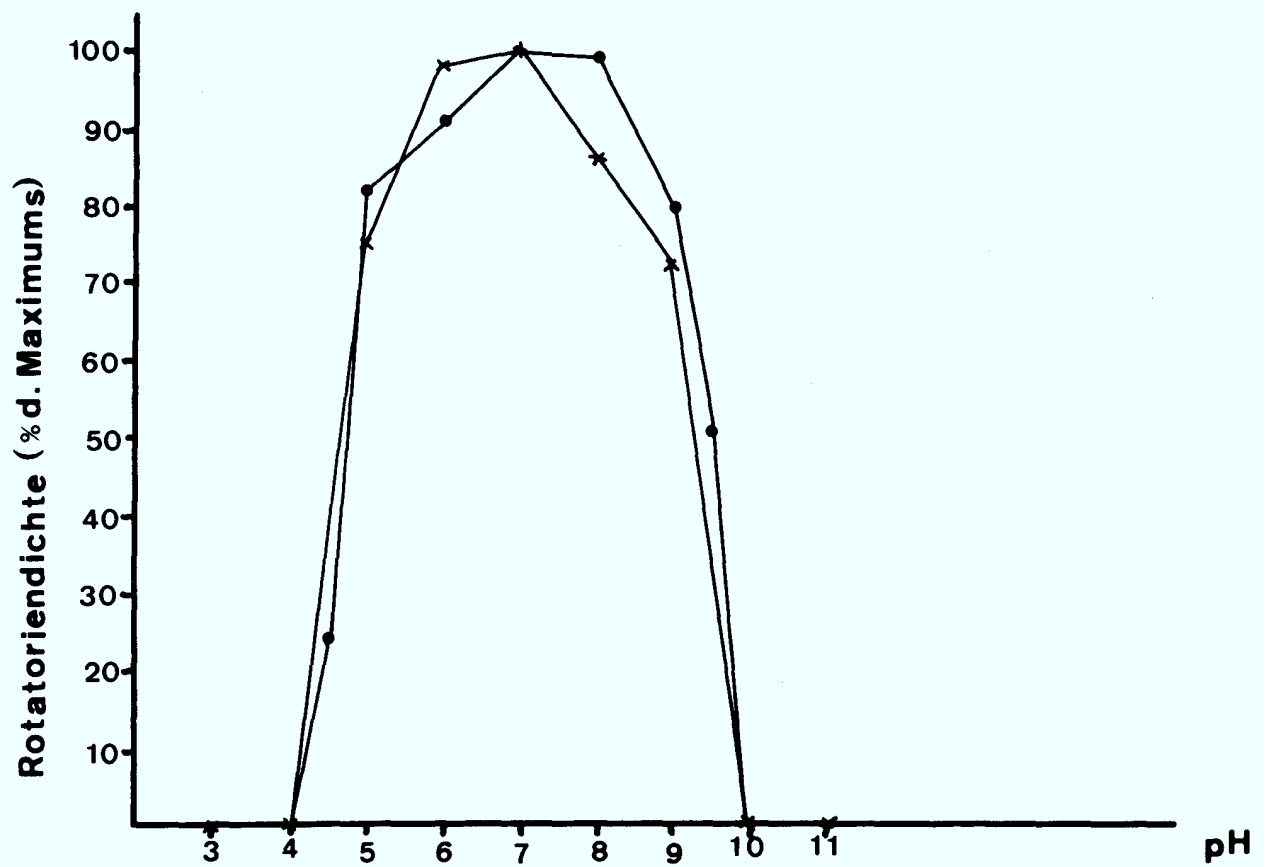


Abb. 50: Abhängigkeit des Populationswachstums von Brachionus rubens vom pH-Wert des Mediums (aus Schlüter 1979). Versuchsbedingungen wie in Abb. 1a

4.4.5.2. Ergebnisse

Die Untersuchungen erwiesen sich als sehr zeitaufwendig, da für jeden Arbeitspunkt (NH_4^+ -Konzentration/pH-Wert) ein Steady-State über 3 Aufenthaltszeiten (≈ 12 Tage) aufgezeichnet werden mußte, um gesicherte Aussagen zuzulassen. Insgesamt wurden 26 Arbeitspunkte untersucht.

4.4.5.2.1. NH_4^+ -Toxizität bei pH 7,0 - 7,5

Dieser pH-Bereich wurde zunächst untersucht, da sich in den Kulturen ohne pH-Regulierung immer ein Wert zwischen pH 7,0 und 7,3 einstellt.

Wegen der bereits bei geringen NH_4^+ -Konzentrationen vermuteten Hemmung wurden zunächst niedrige NH_4^+ -Konzentrationen getestet (11 - 25 mg NH_4^+ -N/l; Abb. 51).

Die Populationsdynamik in allen Kulturen war nicht von der NH_4^+ -freien Kontrolle verschieden. Die Test-Kultur mit 25 mg NH_4 -N/l wurde am Tag 5 durch einen technischen Defekt bis auf 54 Tiere/ml ausgespült, erreichte jedoch - trotz täglicher Verdünnung - nach 4 Tagen bereits wieder ihre "Steady-State"-Konzentration. In einer 2. Versuchsreihe wurden die Kulturen mit NH_4^+ -N-Konzentrationen zwischen 57 und 100 mg NH_4^+ -N belastet (Abb. 52). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollkultur nachgewiesen werden.

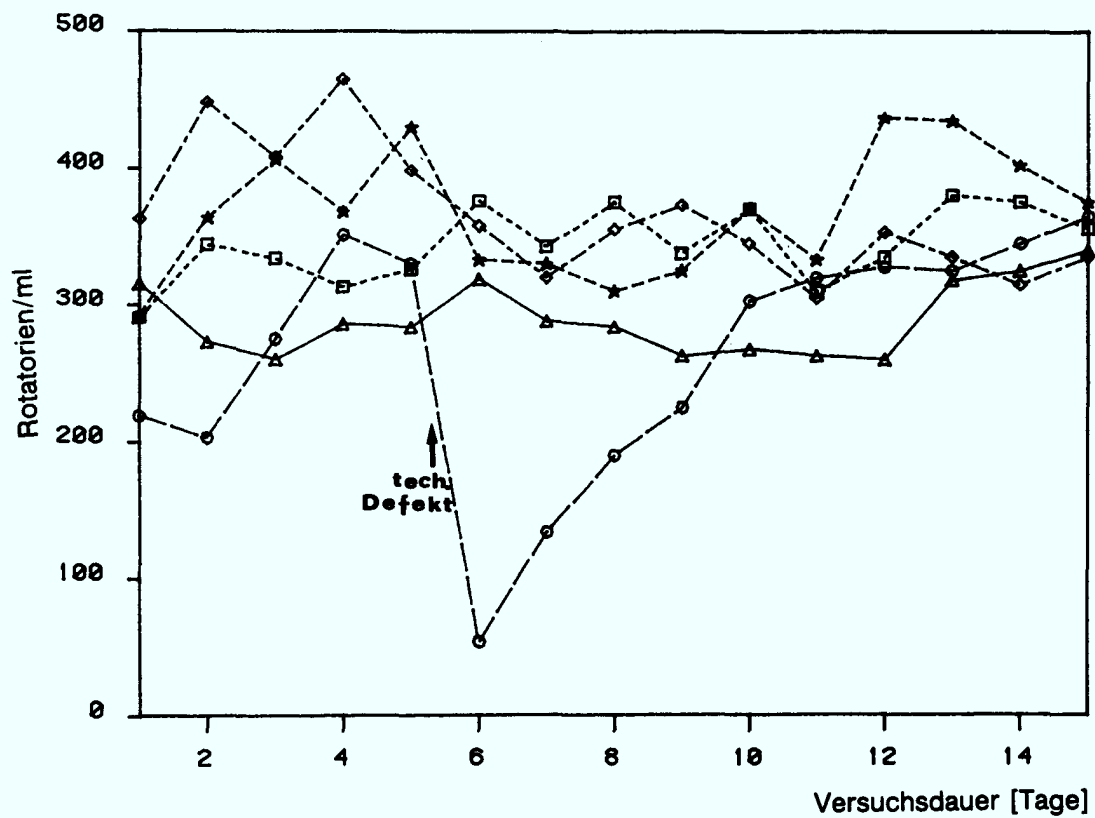


Abb. 51: Ammonium-Toxizität bei pH 7,5 (1)

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| △— Kontrolle, pH 7,50 | □---11 mg/l, pH 7,60 |
| ◇---17 mg/l, pH 7,54 | ★---20 mg/l, pH 7,59 |
| ○---25 mg/l, pH 7,56 | |

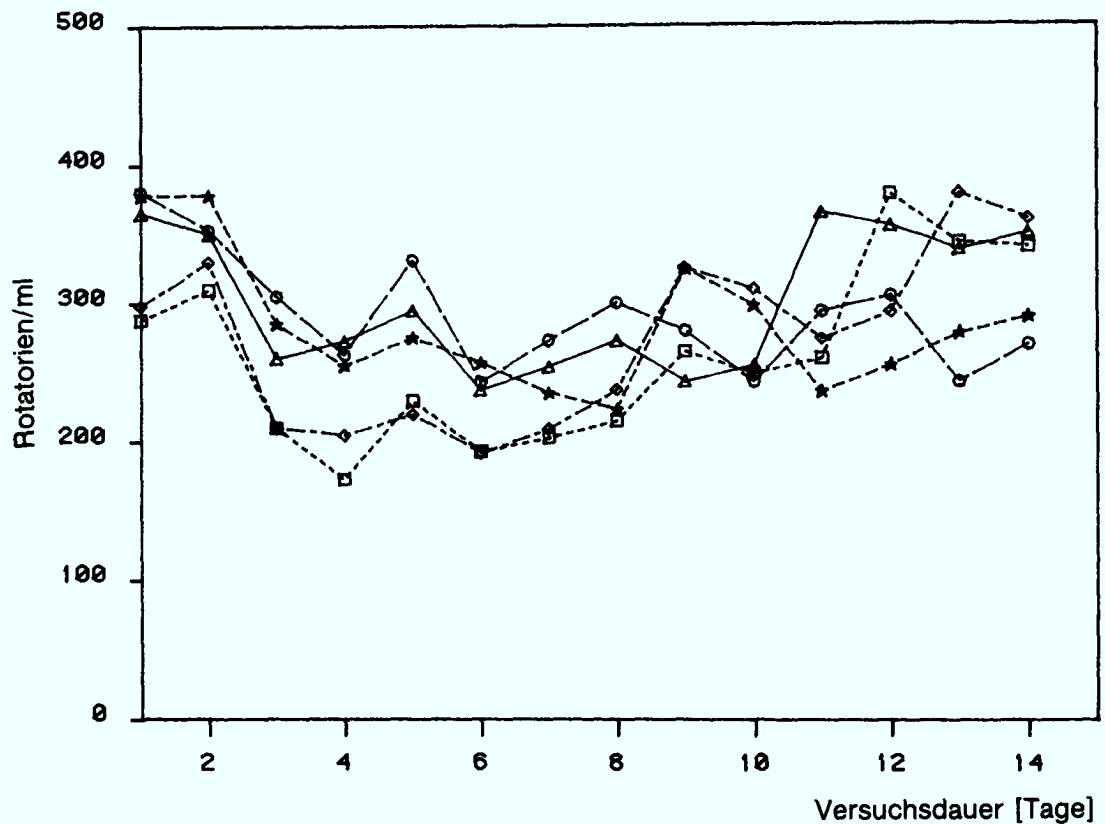


Abb. 52: Ammonium-Toxizität bei pH 7,5 (2)

Δ— Kontrolle, pH 7,55 □---- 57 mg/l, pH 7,55
◇--- 81 mg/l, pH 7,48 ★— 99 mg/l, pH 7,49
○— 103 mg/l, pH 7,55

In der 3. Versuchsreihe wurden die Kulturen mit Konzentrationen bis nahezu 1400 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ belastet (Abb. 53). Jetzt wuchs nur noch eine Kultur (+ 276 mg $\text{NH}_4\text{-N}$) ohne Unterschied zur Kontrolle. Höhere Konzentrationen führten zur Hemmung der Reproduktionsrate. Die Kulturen mit den höchsten Konzentrationen (872 und 1388 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$) starben innerhalb von 2 Tagen ab. Die Kulturen mit 627 bzw. 780 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ spülten aus, die Tierkonzentration sank bis auf ca. 30 Tiere/ml (Tag 7). Nach dem 7. Tag wurde kein NH_4Cl mehr zudosiert, die Kulturen erreichten nach 7 - 8 Tagen wieder ihre Steady-State-Konzentrationen von 300 Tieren/ml. Die Schädigung der Tiere durch das NH_4Cl erwies

sich im sublethalen Konzentrationsbereich als reversibel. Die Hemmung der Reproduktionsrate wird durch eine Schädigung der Eier bzw. Embryonen bewirkt. Bedingt durch das - insbesondere bei verminderter Tierkonzentration - erhöhte Futterangebot, tragen die Tiere eine große Zahl amiktischer Eier angeheftet (3 - 4). Diese entwickeln sich jedoch nicht, es werden nur vereinzelt Jungtiere in der Kultur gefunden.

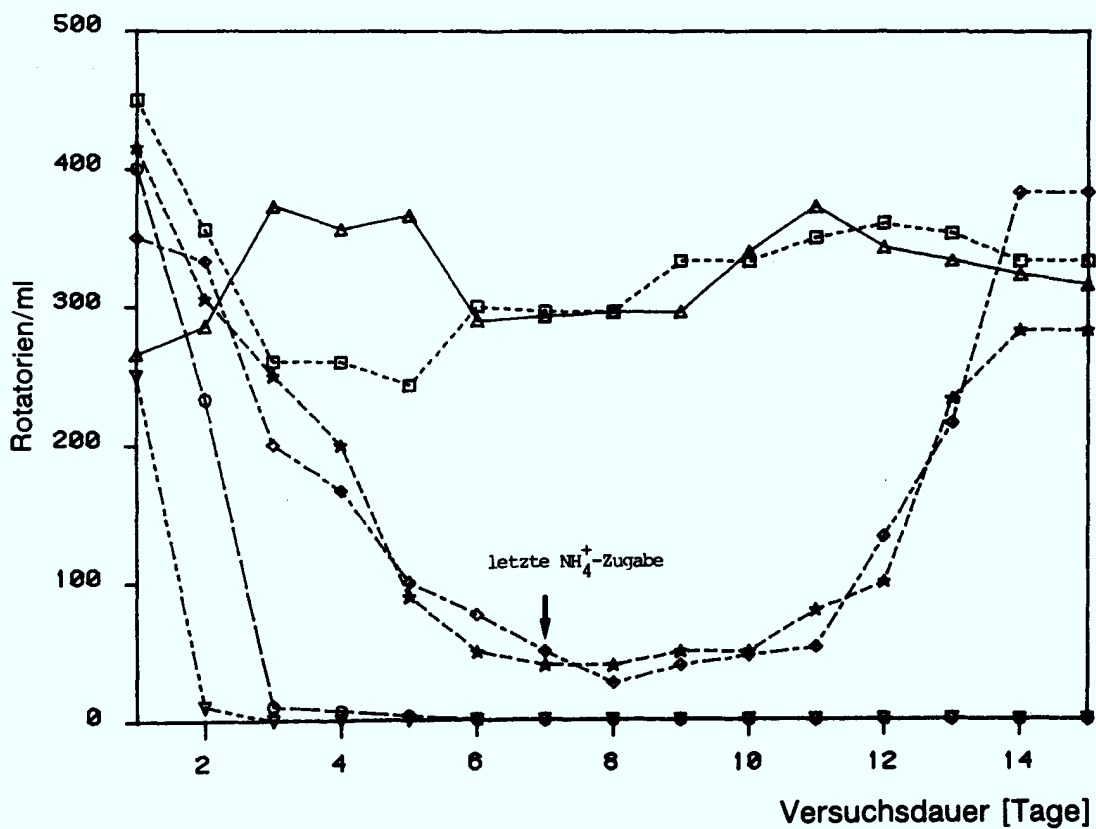


Abb. 53: NH_4^+ -Toxizität bei pH 7 - 7,5 (3)

Δ — Kontrolle, pH 7,40

◇ — 627 mg/l, pH 7,23

○ — 872 mg/l, pH 7,17

□ — 276 mg/l, pH 7,36

★ — 780 mg/l, pH 7,02

▽ — 1388 mg/l, pH 7,00

In der 4. Versuchsreihe wurden noch 3 weitere Kulturen bei pH 7,5 gefahren, um den toxischen Konzentrationsbereich weiter einzugrenzen (Abb. 54). Hier erwies sich eine Konzentration, die bei pH 7,0 nur zu sublethaler Schädigung führte, bei pH 7,5 bereits als lethal (490 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$). Hier deutet sich bereits die postulierte pH-Abhängigkeit der NH_4^+ -Toxizität an.

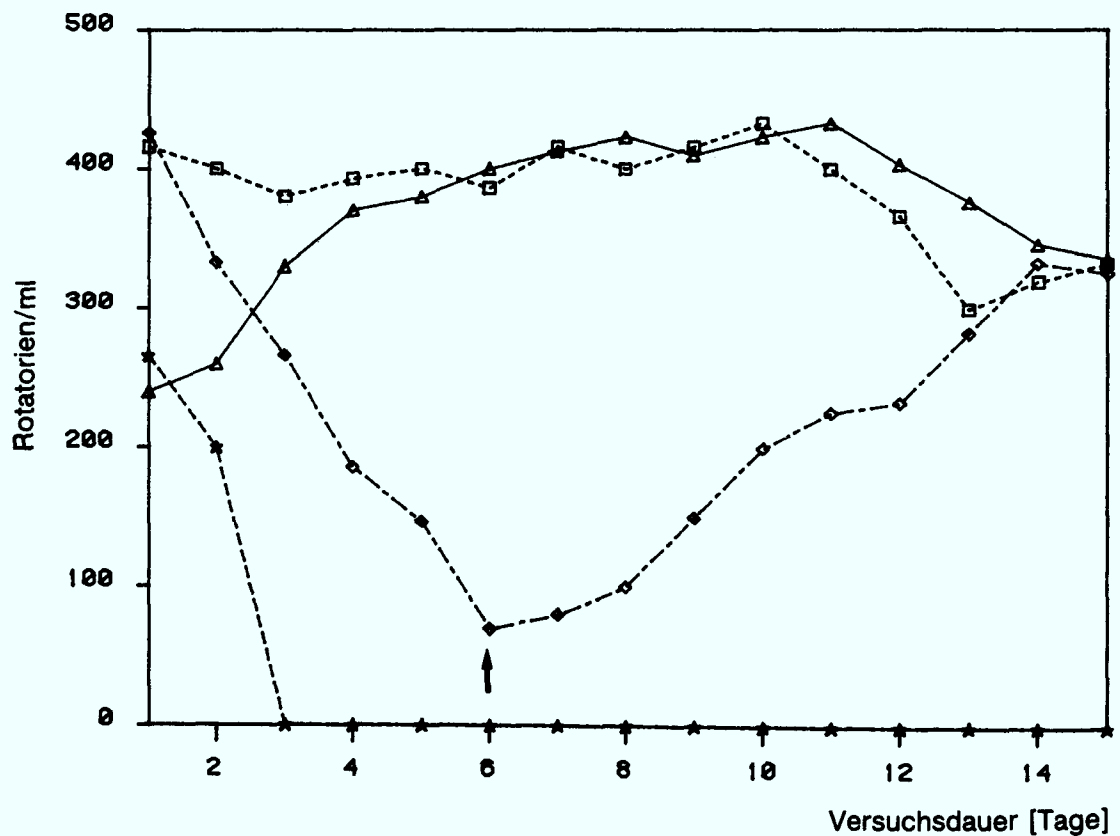


Abb. 54: NH_4^+ -Toxizität bei pH 7,5 (4)

Δ — Kontrolle, pH 7,50
◇ — 452 mg/l, pH 7,42

□ — 316 mg/l, pH 7,08
★ — 490 mg/l, pH 7,51

4.4.5.2.2. Toxizität bei pH 8,0

Die 5. Versuchsserie wurde bei pH 8,0 (7,95 - 8,00) gefahren. Hier wurden Konzentrationen zwischen 60 und 250 mg $\text{NH}_4\text{-N/l}$ getestet. Bis 74 mg/l konnte keine Schädigung nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von 86 und 105 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ führten reversibel zur Hemmung der Reproduktionsrate, bei Belastung mit 247 mg $\text{NH}_4\text{-N/l}$ starb die Kultur innerhalb von 2 Tagen ab (Abb. 55).

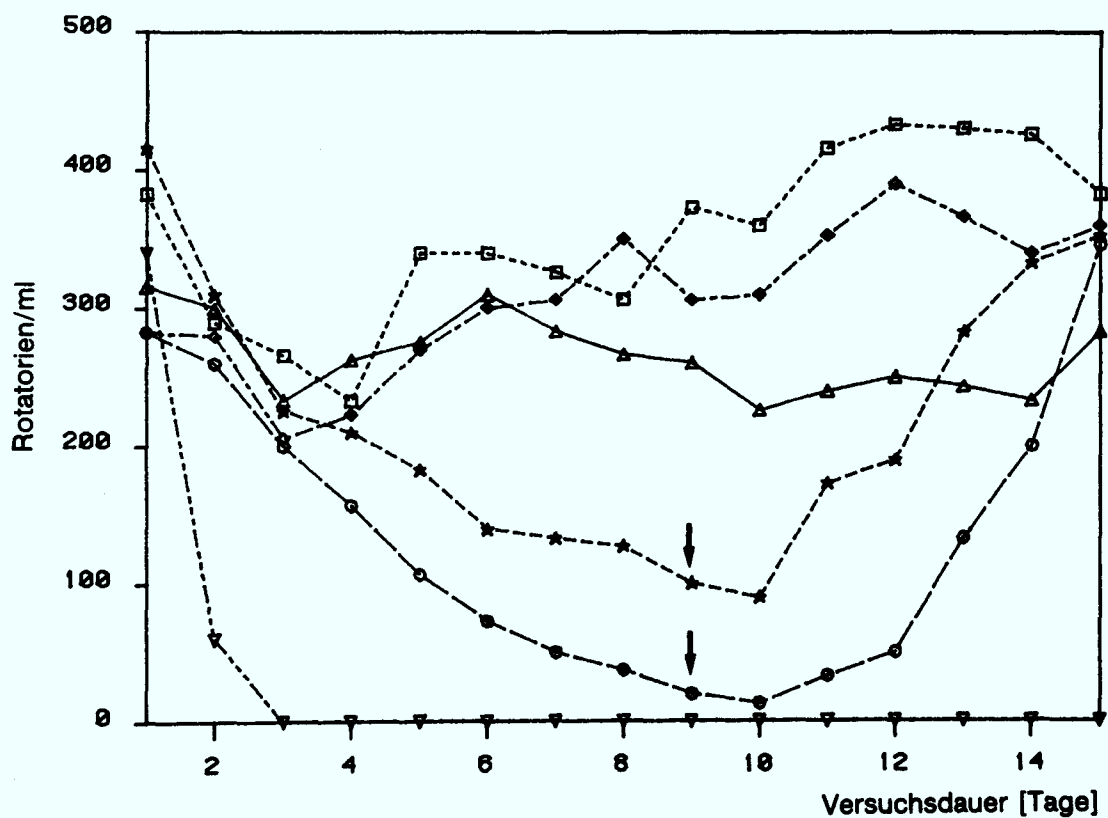


Abb. 55: NH_4^+ -Toxizität bei pH 8,0

△ — Kontrolle, pH 8,0
◇ — 74 mg/l, pH 8,0
○ — 105 mg/l, pH 8,0

□ — 60 mg/l, pH 8,0
★ — 86 mg/l, pH 8,0
▽ — 247 mg/l, pH 8,0

4.4.5.2.3. Toxizität bei pH 8,5

Zur Bestätigung der pH-Abhängigkeit der NH_4^+ -Toxizität wurde die 6. Versuchsreihe bei pH 8,3 und 8,5 gefahren, die Kulturen wurden mit NH_4 -N-Konzentrationen von 14 - 75 mg/l belastet (Abb. 56). Bis 30 mg/l traten keine Schäden auf, zwischen 37 und 45 mg/l wurden die Tiere sublethal geschädigt, 75 mg NH_4^+ -N/l hatten ein Absterben der Rotatorien zur Folge.

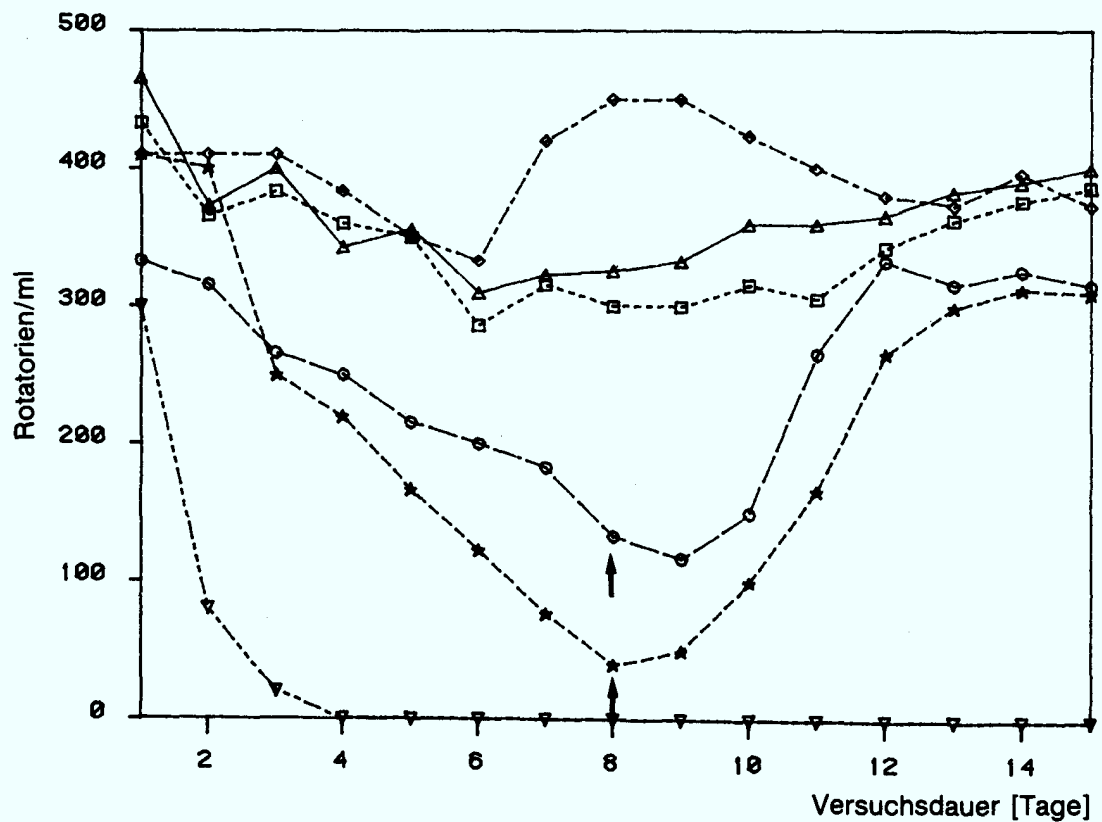


Abb. 56: NH_4^+ -Toxizität bei pH 8,5

Δ — Kontrolle, pH 8,5

◇ — 29 mg/l, pH 8,3

○ — 45 mg/l, pH 8,3

□ — 14 mg/l, pH 8,5

★ — 37 mg/l, pH 8,5

▽ — 75 mg/l, pH 8,5

4.4.5.3. Quantifizierung der pH-Abhängigkeit der NH_4^+ -Toxizität

Da die Toxizität des NH_4^+ -N in den oben genannten Versuchen eine klare pH-Abhängigkeit zeigt, liegt die Hypothese nahe, daß der NH_3 die eigentliche toxische Substanz ist. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden die im Versuch eingestellten Arbeitspunkte (NH_4^+ -Konzentration/pH-Wert) in ein Diagramm eingetragen (Abb. 57). Zusätzlich wurden aus den von Trussel (1972) beschriebenen Gleichgewichtskonstanten für das Gleichgewicht der Dissoziation des NH_4^+ zu $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ die Geraden für 3 und 5 mg freies NH_3 berechnet. Die Reaktion der Rotatorien wurde in die 3 Kategorien eingeteilt: 1. keine Schädigung, 2. sublethale, reversible Schädigung, 3. lethale Schädigung.

Die gefundenen Effekte lassen sich nach Abb. 57 eindeutig auf die Konzentration undissoziierten Ammoniaks zurückführen. Unter einer Konzentration von 3 mg NH_3 -N/l treten keine Schäden an den Rotatorien auf. Zwischen 3 und 5 mg wird die Reproduktionsrate reversibel gehemmt. Konzentrationen über 5 mg NH_3 -N/l schädigen die Tiere lethal.

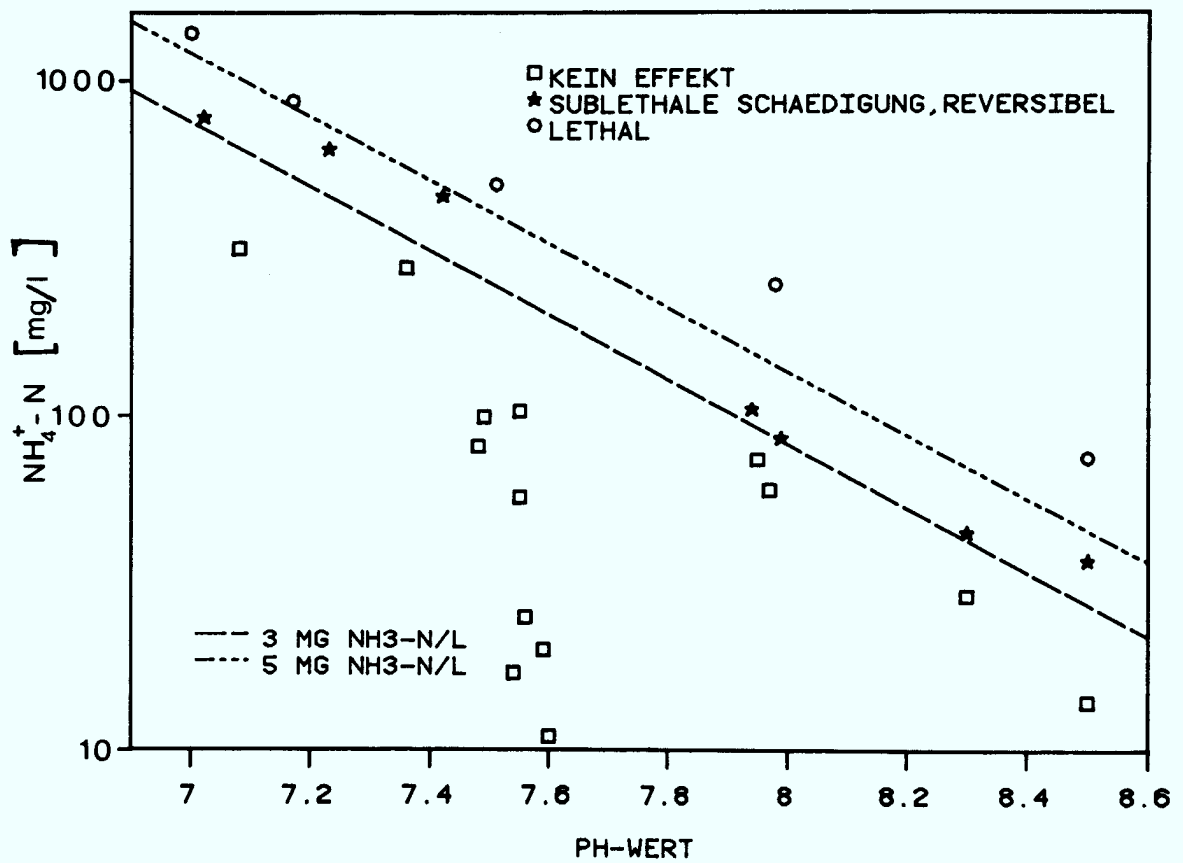


Abb. 57: Toxizität von NH_4^+ -N für Brachionus rubens in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums

- kein Effekt
- ★ sublethale, reversible Schädigung
- lethal
- 3 mg NH_3 -N/l
- - - 5 mg NH_3 -N/l

4.5. Versuche im einstufigen Chemostatensystem

In diesem Versuch wurde geprüft, ob sich die Freßkette Algen-Rotatorien auch in einem einstufigen Fermenter aufrechterhalten läßt. Die N-Eliminationsleistung einer solchen Kultur, sowie Umsetzungen des organischen und anorganischen Kohlenstoffs wurden bestimmt.

4.5.1. Beschreibung des Kultursystems

Als Reaktionsgefäß diente eine 2 l fassende Glasröhre mit konisch zulaufendem Boden. Die benutzte Nährlösung war identisch mit dem Medium, das im 2-stufigen System verwendet wurde. Auch die Aufenthaltszeit wurde dem 2-stufigen System angeglichen und mit einer Hubpumpe auf 4 Tage eingestellt. Begast wurde mit Luft (20 l/h) ohne zusätzliche Dosierung von CO₂.

4.5.2. Populationsdynamik

Das System erreichte kein stabiles Steady State wie das 2-stufige System. Die Bilanzierung des Stickstoffs und Kohlenstoffs erfolgte in einer annähernd stabilen 14tägigen Phase zu Beginn des Experimentes (Tag 1-14). Danach gerieten die Konzentrationen von Rotatorien und Algen in Schwingungen, die jedoch nicht zum Ausspülen der Organismen führten (s. Abb. 58).

Während dieser Oszillationen sind der Verlauf der Rotatorienkonzentrationen und der Chlorophyllkonzentration gut miteinander korreliert ($r = -0,762$, $P > 99.9\%$). Der Korrelationskoeffizient ist erwartungsgemäß negativ, d.h. Phasen hoher Algenpopulation und Phasen hoher Rotatorienpopulation wechseln miteinander ab. Solche Oszillationen sind für ein Algen-Rotatorien-Chemostatsystem bereits beschrieben (Booras 1980, 1983).

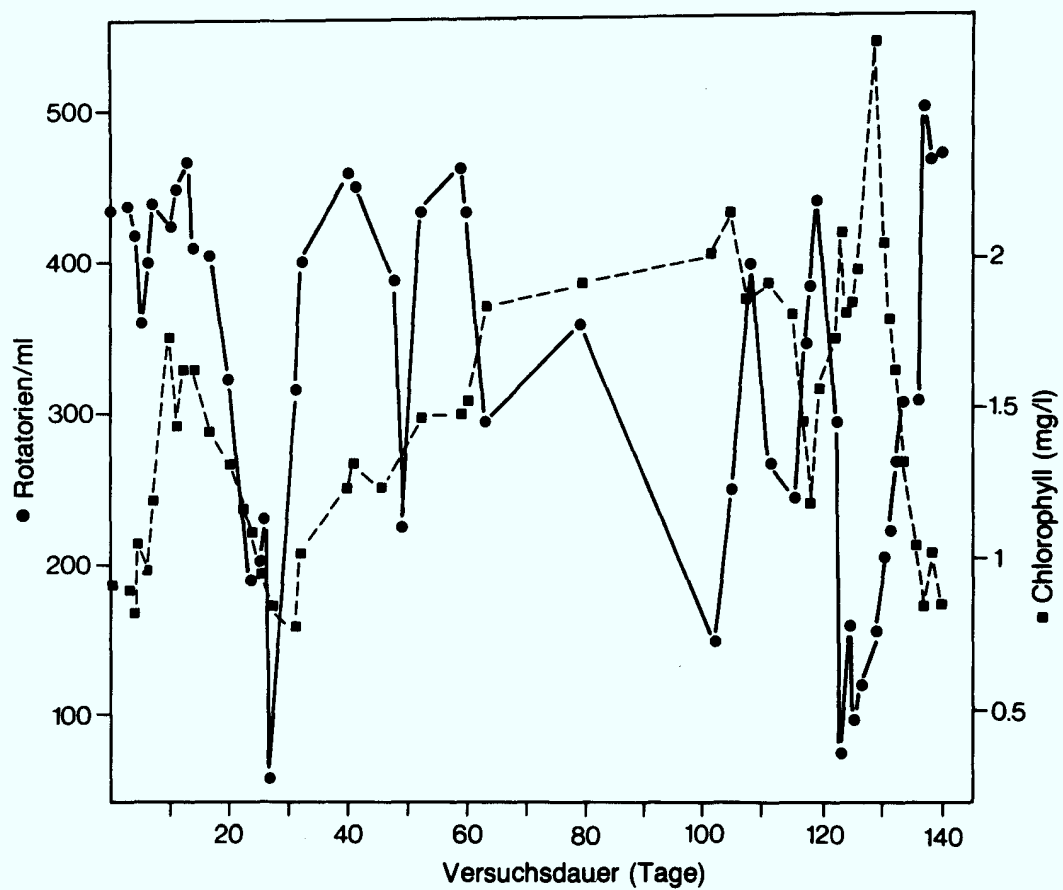


Abb. 58: Rotatorien- und Chlorophyllkonzentration im 1-stufigen Chemostaten

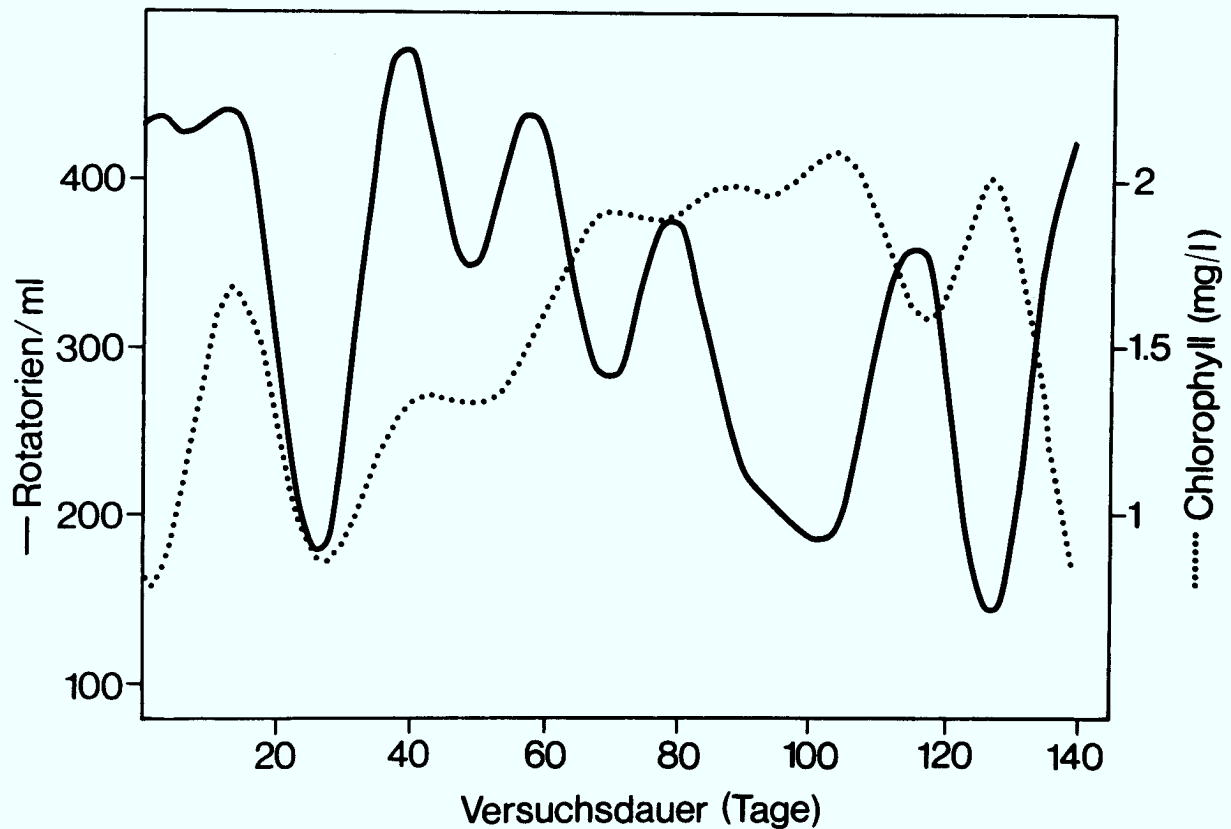


Abb. 59: Fourier-Transformation: Rotatorien- und Chlorophyll-Konzentration im einstufigen Chemostaten

4.5.2.1. Rotatorien

Der Verlauf von Algen- und Rotatorienkonzentration (Abb. 58) ist nur schwer interpretierbar. Zur Verdeutlichung eventueller Regelmäßigkeiten wurden die Daten mit Hilfe einer Reihenanalyse nach Fourier geglättet. Das Ergebnis zeigt Abb. 59. Die Korrelation zwischen Originaldaten und geglätteten Daten ist gut ($r = 0,893$ für die Rotatorienkonzentration, $r = 0,947$ für Chlorophyll, $n = 140$).

Die Rotatorienkonzentration zeigt jetzt sinusförmige Schwingungen von regelmäßiger Frequenz ($22 \pm 2,4$ d). Die Amplitude dieser Schwingungen bewegt sich zwischen 50 und 150 Tieren/ml (Mittel 100 ± 38 Tiere/ml). Die Schwingungsknoten dieser Oszillation liegen jedoch nicht auf einer Geraden, sondern schwingen ihrerseits mit einer Frequenz von 65 d und einer Amplitude von 56 Tieren/ml. Die Schwingungsknoten dieser Schwingung 2. Grades liegen bei 340 Rotatorien/ml. Die Überlagerung beider Schwingungen läßt sich mathematisch beschreiben:

$$X(t) = 100 * \text{--cos}(2\pi/22 + X) + 56 * \text{--sin}(2\pi/65 + X) + 340$$

(Schwingung 1. Grades) (Schwingung 2. Grades)

Abb. 60 zeigt den Verlauf der so berechneten Kurve. In den ersten 3 Monaten (bis Tag 93) stimmt sie gut mit den Originaldaten und der Fourieranalyse überein ($r = 0,431$, $n = 95$, $P > 99,9$). Die Schwingung zwischen Tag 90 und 110 in den Originaldaten führt wegen ihrer langen Schwingungsdauer zu einer Phasenverschiebung mit der Simulation, so daß die Korrelation über den Gesamtzeitraum schlecht ist. Die hier gemessene lange Schwingungsdauer ist wahrscheinlich auf die zu seltene Probennahme zwischen Tag 65 und 100 zurückzuführen.

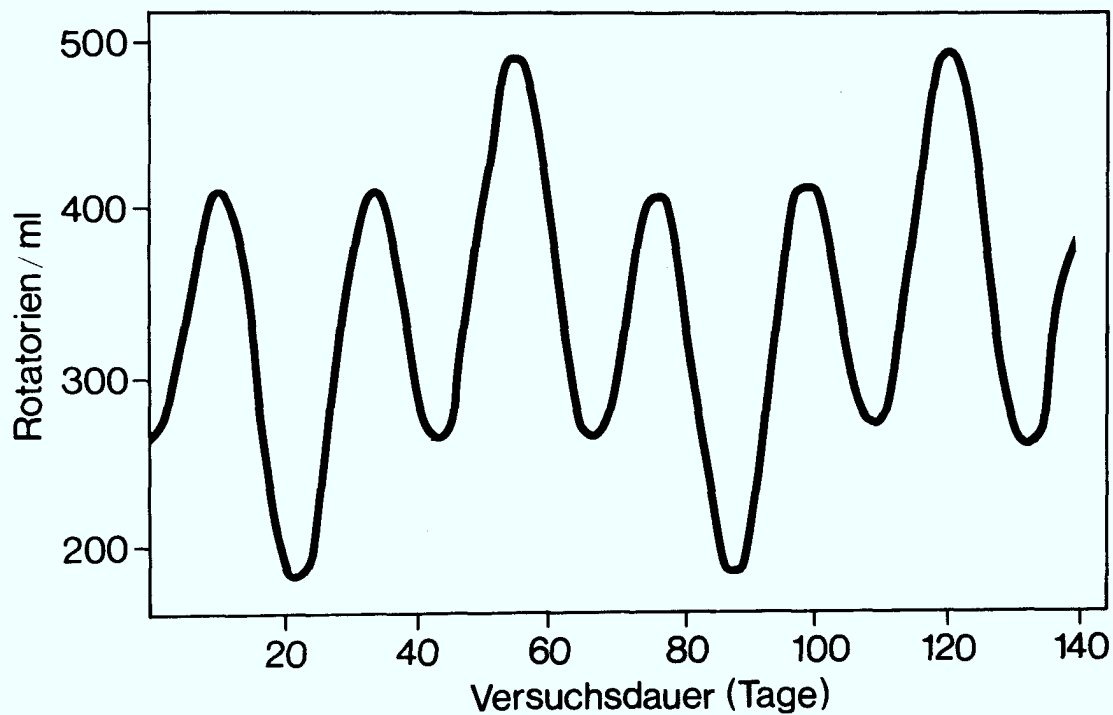


Abb. 60: Simulation: Rotatorienkonzentration im 1-stufigen Chemostaten

4.5.2.2. Chlorophyll

Die Oszillationen der Chlorophyllkonzentrationen verlaufen nicht so gleichmäßig wie die der Rotatorienkonzentration. Ihre Frequenz beträgt 23 ± 9 d, die Amplitude 360 ± 310 $\mu\text{g/l}$, mit breiter Streuung zwischen 40 und 870 $\mu\text{g/l}$. Die Schwingungsknoten liegen auch hier nicht in einer Ebene. Sie führen ebenfalls eine Oszillation durch, aber die Frequenz läßt sich nicht genau bestimmen (~ 130 d). Auffallend ist die negative Korrelation dieser Schwingung 2. Grades zu der entsprechenden Schwingung der Rotatorien ($r = -0,534$, $n = 140$).

4.5.3. Bilanzierung von N und C während des 14-tägigen Steady States

4.5.3.1. Stickstoffbilanz

Von den ins Medium gegebenen 14 mg NO_3^- -N, finden sich 95 % (13,1 mg) in der Biomasse wieder (berechnet aus TS und CHN-Analyse). Auch dieses System läuft daher N-limitiert. Der gelöste anorganische Stickstoff verteilt sich auf NH_4^+ -N (34 mg) (NO_3^- -N) (0,34 mg) und NO_2^- -N (0,01 mg = Nachweisgrenze). Diese Verteilung ist nahezu identisch mit der N-Verteilung in der Algenkultur des 2-stufigen Systems. Die dort in den Rotatorienstufen beobachtete NH_4^+ -N-Ausscheidung ist hier nicht offensichtlich - bedingt durch ein internes Recycling. Da das N-Angebot das Wachstum der Algen limitiert, nehmen sie von den Rotatorien ausgeschiedenes NH_4^+ -N bevorzugt auf.

Der in die Biomasse eingebaute Stickstoff läßt sich über die Bestimmung der TS und des CHN-Verhältnisses auf Algen und Rotatorien aufteilen. Der Anteil der Algen an der Trockensubstanz wird aus der Differenz von TS-Gesamtprobe und TS-Rotatorien bestimmt. Die TS der Rotatorien wird aus der Tierzahl berechnet. Unter der Annahme eines konstanten N-Gehaltes im Algenchemostaten und im Algen-Rotatorien-Chemostaten von 5,9 % beträgt die Menge des in der Algenbiomasse festgelegten N 4,6 mg; in der Rotatorienbiomasse sind dagegen 8,5 mg N festgelegt. Aus diesen Daten kann eine Gesamtbilanz für das System aufgestellt werden.

Da die NH_4^+ -Ausscheidungsrate der Rotatorien aus den verdunkelten Kulturen im 2-stufigen System bekannt sind, kann auch das NH_4^+ -Recycling von Rotatorien in die Algen quantifiziert werden. Die Steady State-Konzentrationen und die dazugehörenden Austauschraten sind im Fließdiagramm (Abb. 61) dargestellt. Die Algen nehmen außer den 13,7 mg NO_3^- -N auch noch 3,8 mg NH_4^+ -N aus Rotatorienexkreten auf. Von diesen 18,5 mg N nehmen die Rotatorien 12,9 mg auf, können jedoch nur 8,5 mg (65 %) in ihrer Biomasse festlegen. 4,1 mg werden als NH_4^+ -N ausgeschieden und 0,3 mg N/l verlassen das System mit dem kontinuierlichen Ablauf.

System gewonnenen Wert für die Respiration der Rotatorien auf dieses System übertragen. Die so ermittelten 66 mg C müssen zu der 75 mg Brutto-C-Aufnahme geschlagen werden, wenn die tatsächliche C-Fixierung der Algen bestimmt werden soll. Sie beträgt daher $141 \text{ mg/l} \cdot 4\text{d}$. Die Effizienz der Umwandlung von Algen in Rotatorienbiomasse kann aus diesen Daten berechnet werden und beträgt 21 % (auf C-Basis).

Das Fließdiagramm (Abb. 62) zeigt Steady-State-Konzentrationen und die dazugehörigen Reaktionsraten. Es können aber nicht zu allen Reaktionen die entsprechenden Raten zugeordnet werden, da bei der Entstehung und Umsetzung des DOC nicht zwischen Algen und Rotatorien differenziert werden kann und außerdem Umsetzungen des C durch Bakterien, deren Biomasse im Steady State vernachlässigbar klein ist, nicht quantifiziert werden können. Dennoch wird deutlich, welche enorme Rolle das interne Recycling des CO_2 aus der Rotatorienrespiration für das Gesamtsystem spielt.

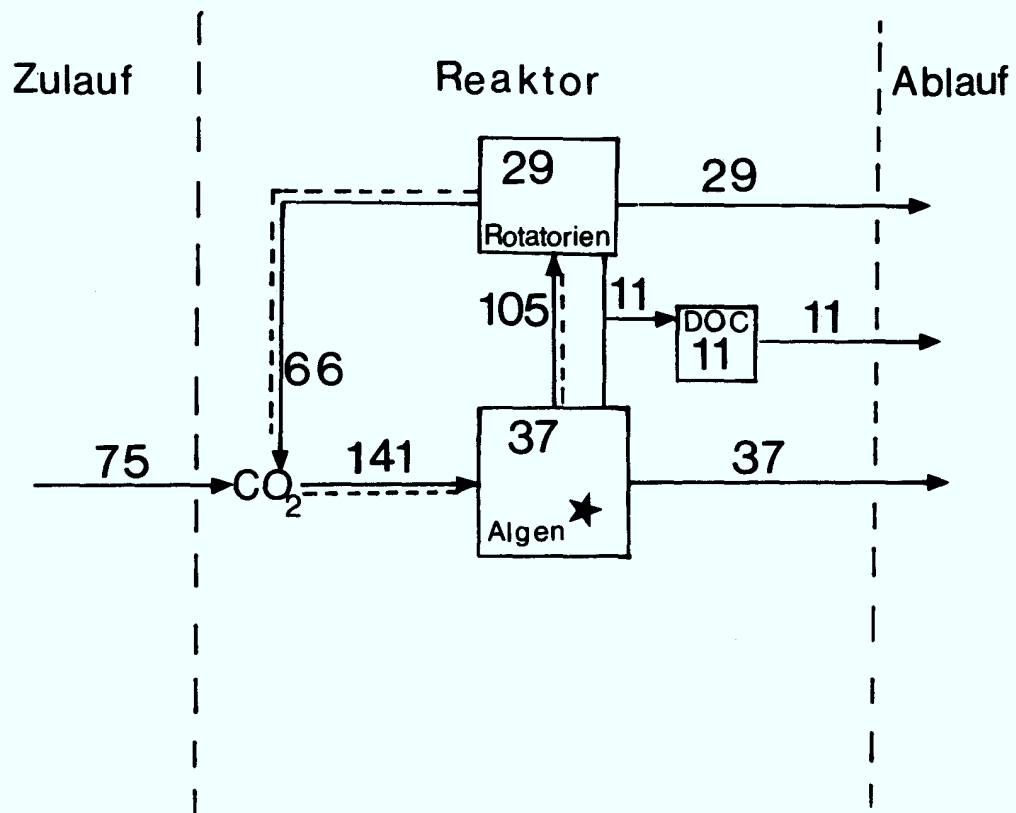


Abb. 62: Kohlenstoff-Fluß durch den 1-stufigen Chemostaten. Angaben in mg C/l in einer Aufenthaltszeit (4d)

Algen★ = Fraktion der nicht gefressenen Algen und Fäzes

4.5.3.2.2. Simulation

Der Einfluß den der mögliche Weg des Kohlenstoffs über Rotatorien-DOC und Bakterien zum CO_2 auf das Gesamtsystem hat, kann mit Hilfe einer Produktionsmatrix (Richey et al. 1978) simuliert werden. Abb. 63 zeigt die Abhängigkeit des Cycling-Index sowie der Bedeutung der einzelnen Komponenten (CO_2 , Algen, Rotatorien, DOC und Bakterien) in Abhängigkeit von der Größe dieser Rate.

Angenommen wurde eine DOC-Ausscheidung der Rotatorien von 0 - 20 % des von ihnen assimilierten Kohlenstoffs. Der Cycling-Index wird von der Verlagerung dieses Kohlenstoffs nicht beeinflusst, er beträgt konstant 0,44. Die Anteile der 3 wichtigsten Kompartimente am Gesamtumsatz (CO_2 , Algen und Rotatorien) sinken nur leicht, während Bakterien und DOC ihren Anteil erwartungsgemäß steigern, die Bakterien erreichen bis 6 % des Gesamtumsatzes (s. Abb. 63).

Insgesamt ist es für das System nur von untergeordneter Bedeutung, über welchen Abbauweg der organische Kohlenstoff zum CO_2 gelangt. Eine Einbeziehung der Bakterien kann weder die input-output-Charakteristik noch die Bedeutung von Algen und Rotatorien am Gesamtumsatz entscheidend verändern.

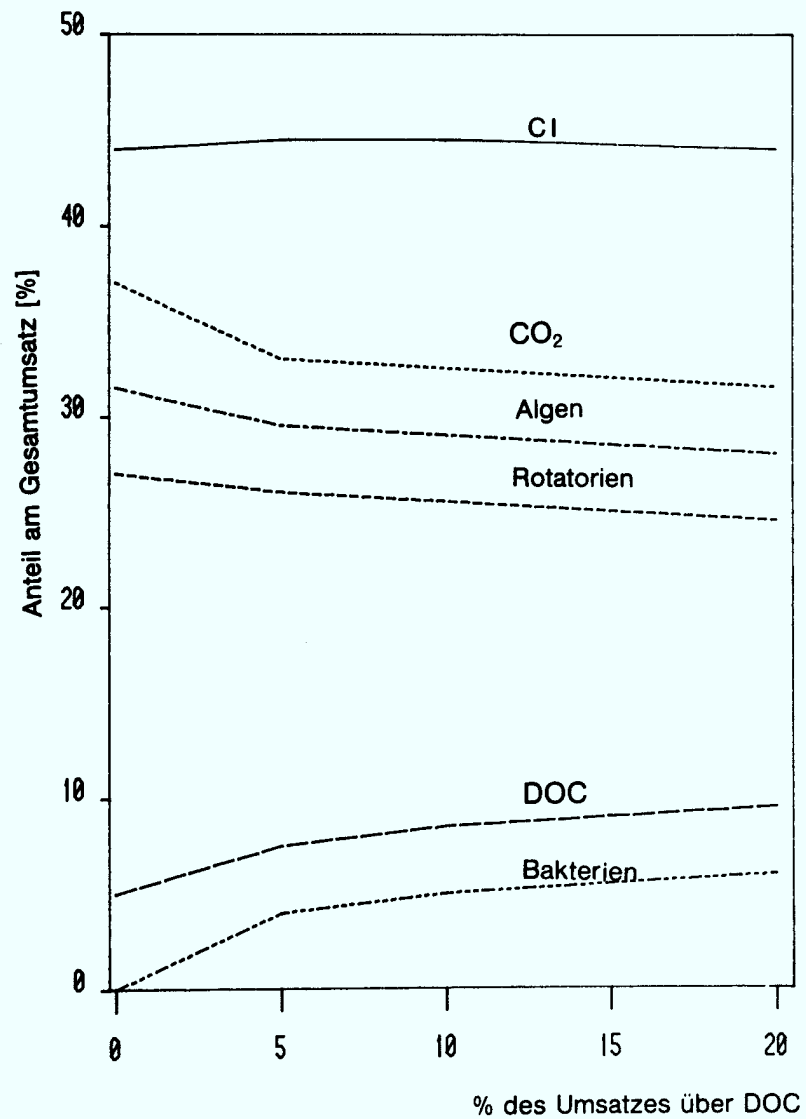


Abb. 63: Simulation: Respiration der Rotatorien; Annahme verschiedener Flußraten des Kohlenstoff via DOC und Bakterien zum CO₂, Einfluß dieses Stoffwechselweges auf den Cycling Index

5. Diskussion

5.1. Wachstumslimitierung durch Lichtmenge und Stickstoffangebot

5.1.1. Algen

In der Natur finden die meisten Organismen nicht so viel Nahrung (Substrat), wie sie verarbeiten könnten; ihr Wachstum wird durch einen Faktor limitiert. Batchkulturen von Organismen im Labor wachsen in der ersten Phase ohne Limitation - ein Vergleich mit natürlichen Populationen ist daher schwierig. In Chemostatkulturen muß dagegen wie in der Natur das Wachstum der Organismen durch einen Faktor limitiert werden. Dies ist die Bedingung für das Erreichen eines stabilen Fließgleichgewichts.

Das Wachstum im Chemostaten kann bei konstanter Temperatur bei Mikroalgen auf zweierlei Weise limitiert werden. Entweder wird ein essentielles Element der Nährlösung ins Minimum gebracht oder das Lichtangebot wird zur Kontrolle des Wachstums benutzt (Rhee 1978, Droop 1974). Wird das Algenwachstum durch N limitiert, sinkt der Stickstoff-Gehalt der Algen auf niedrige Werte ab. Während die Algen im stickstoffreichen Medium ca. 10 % N in ihrer Biomasse enthalten, kann dieser Wert bei extremem Stickstoffmangel auf bis zu 2,3 % absinken (Bongers 1956). In der stationären Phase von Batchkulturen (Spoehr & Milner 1949) und wohl auch unter natürlichen Bedingungen werden noch niedrigere N-Gehalte (< 1,5 % der TS) erreicht.

5.1.2. Rotatorien

Rotatorien enthalten nach eigenen Messungen zwischen 12 und 14 % N in ihrer Biomasse, was gut mit den Daten von Scott (1980) übereinstimmt (12,4 % N). Kokova et al. (1982) und Scott und Baynes (1978) kommen dagegen zu niedrigeren Werten (10 % N).

Der N-Metabolismus der Rotatorien bzw. ihre NH_4^+ -Exkretionsrate sollte daher vom Proteingehalt der Algen beeinflusst werden. Nach Scott (1980) beeinflusst der Proteingehalt der Futteralgen auch ihre Verwertung durch Brachionus plicatilis. Der Autor variierte den Proteingehalt der Futteralgen durch Variation der Durchflußraten im Vitamin B_{12} -limitierten Chemostatkulturen zwischen 24 und 38 %. Die Futterverwertung (Ertragskoeffizient) durch die Rotatorien erreichte bei einem Proteingehalt der Algen von 35 % mit einer Effizienz von 35,5 % ein Maximum. Die von ihm benutzten Algen wuchsen allerdings mit verschiedenen Wachstumsraten und Biomassekonzentrationen. Außerdem arbeitete Scott mit einem marinen System, das insbesondere bezüglich der Rolle des Stickstoffs von limnischen Systemen stark abweichen kann. Auch Gallager und Mann (1981/1982) fanden unterschiedliche Effizienzen bei der Verwertung der Diatomee Thalassiosira durch die Muschel Tapes japonica, wenn die Proteinkonzentration der Algen durch die Anzuchtbedingungen variiert wurden. Taub (1981) verfütterte in kontinuierlichen Kulturen produzierte Algen, deren Proteingehalt mittels Lichtangebot und Durchflußrate zwischen 20 und 50 % der TS variiert wurde an Ciliaten (Tetrahymena) und Crustaceen (Daphnia). Die Ciliaten reagierten auf die Erhöhung des Proteingehaltes mit einer Erhöhung des Ertragskoeffizienten, Daphnia verwertete dagegen die Algen mit niedrigem Proteingehalt besser.

In der vorliegenden Arbeit wurden Futteralgen benutzt, die sich in ihren Proteinkonzentrationen erheblich unterschieden (34 bzw. 62 %). Sie wurden im Chemostaten bei gleicher Wachstumsrate und Biomassekonzentration angezogen. Unter diesen Bedingungen konnte zwischen den Ertragskoeffizienten beider Rotatorienkulturen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, der Proteingehalt der N-limitierten Algen reichte offensichtlich völlig aus, um den Proteinbedarf der Rotatorien zu decken. Bei zu hohem Proteinangebot wurde ein Teil des Proteins veratmet. Daraus resultierte eine erhöhte NH_4^+ -Exkretion, sie stieg von 3 ng N/Tier und Tag auf fast 9 ng/Tier und Tag an.

Die einzigen bislang verfügbaren Daten zur NH_4^+ -Exkretion von Rotatorien stammen von Eijsmont-Karabin (1983). Die Autorin modellierte die NH_4^+ -Exkretion von Brachionus calyciflorus als Funktion der Temperatur, sowie die NH_4^+ -Exkretion einer Reihe anderer Rotatorienspezies aus Teichplankton als Funktion des Körpergewichts der Tiere.

Die Algen für ihre Laborkulturen von B. calyciflorus stammten wahrscheinlich aus Batchkulturen und waren daher möglicherweise N-limitiert, die Algen des Teichplanktons (P-limitiert) sollten dagegen eine hohe Proteinkonzentration aufweisen. Tatsächlich stimmen die von mir im stickstofflimitierten System gemessenen Daten gut mit den Labordaten von Eijsmont-Karabin überein, die Werte aus meinen lichtlimitierten Kulturen passen dagegen in ihr Modell aus Freilanddaten (Abb. 64a, b).

Die von mir gefundene Abhängigkeit der NH_4^+ -Ausscheidungsrate vom Proteingehalt der Algen kann modelliert und zur Korrektur der Daten benutzt werden (Abb. 65). Da nur 2 Proteinkonzentrationen getestet wurden, wurden hierzu auch die Exkretionsraten aus Versuch 4.4.2. herangezogen.

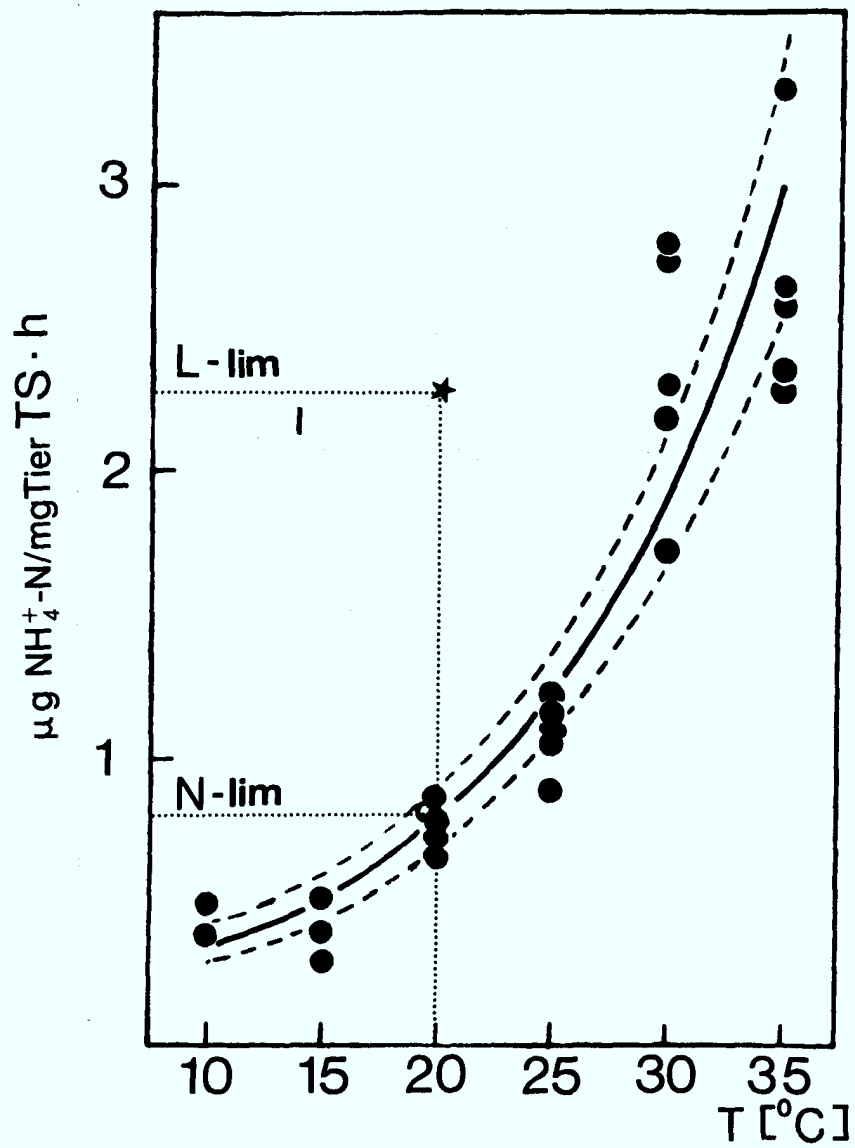


Abb. 64: NH_4^+ -Exkretion von Rotatorien (aus Eijsmont-Karabin 1983)

a) NH_4^+ -Exkretion als Funktion der Temperatur

Eigene Messungen

○ N-limitierte Kultur

★ Licht-limitierte Kultur

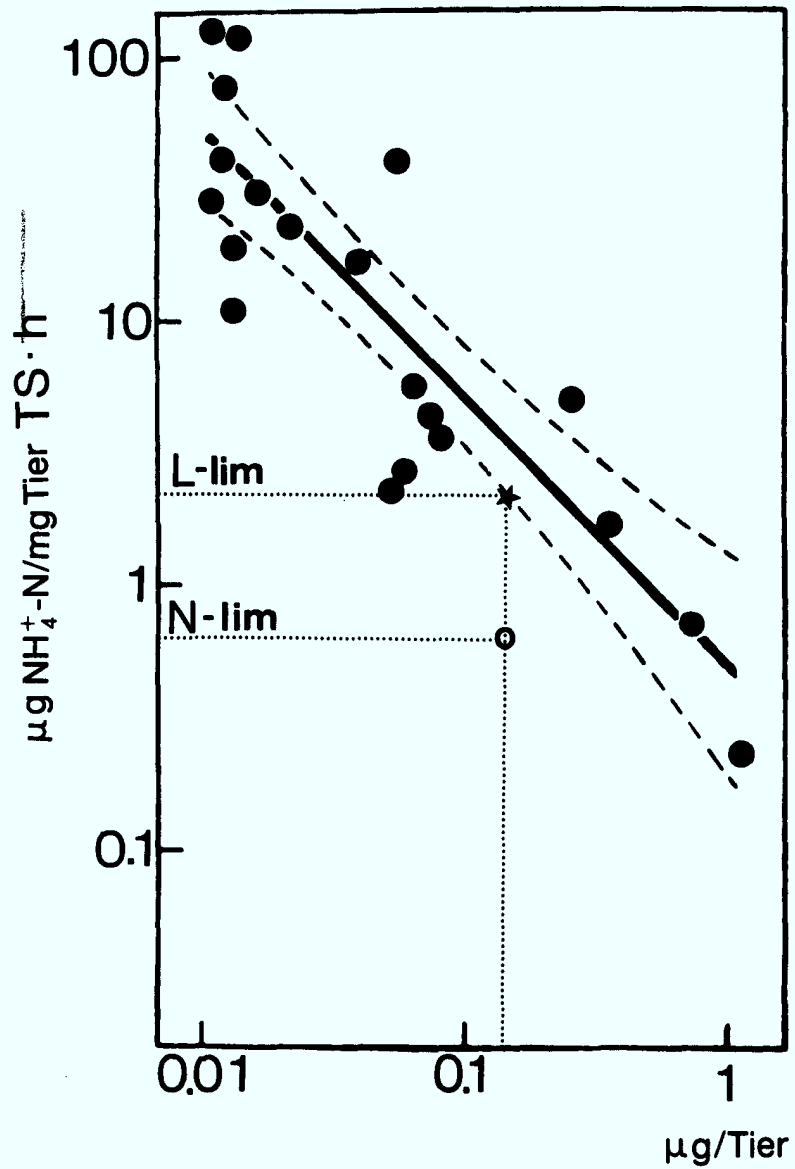


Abb. 64: NH_4^+ -Exkretion von Rotatorien (aus Eijsmont-Karabin 1983)

b) NH_4^+ -Exkretion als Funktion der Körpergröße

Eigene Messungen

○ N-limitierte Kultur

★ Licht-limitierte Kultur

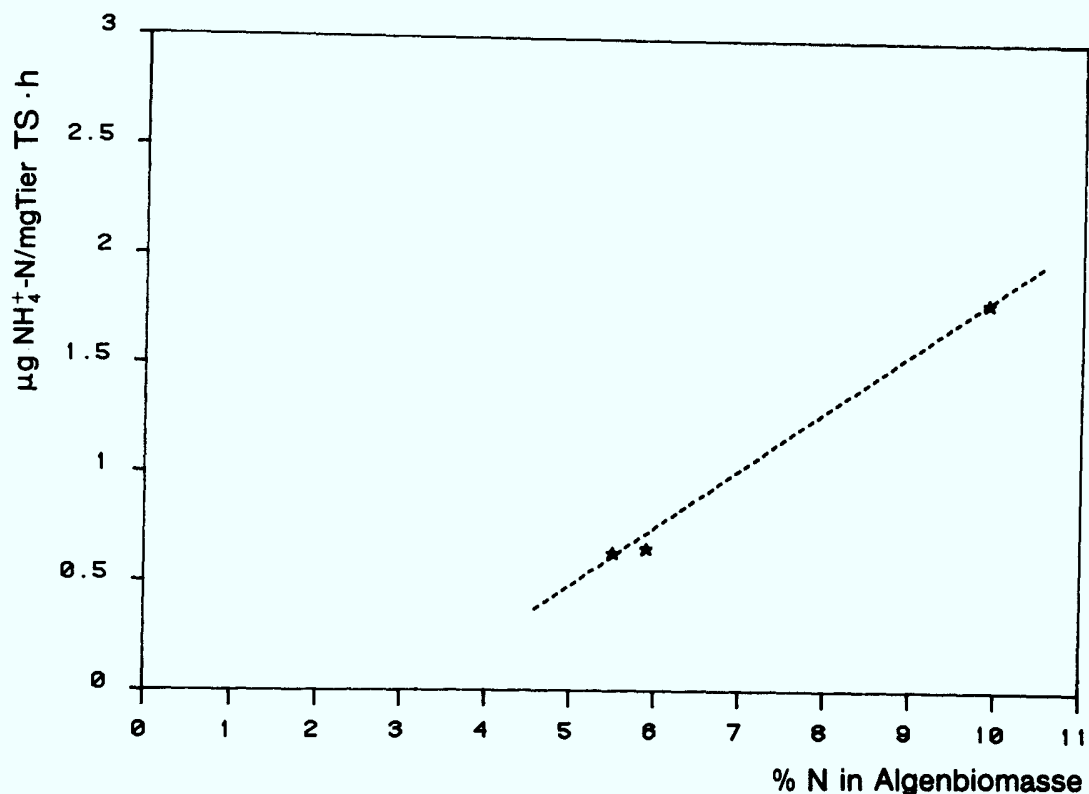


Abb. 65: NH_4^+ -Exkretion von Rotatorien als Funktion des Stickstoffgehaltes der Futteralgen

$$\text{EX}_{(\text{NH}_4\text{-N})} = -0,808 + 0,2632 \cdot \text{N}$$

N = Stickstoffgehalt der Algen in % des Trockengewichts

Die Gleichung basiert nur auf drei Wertepaaren (Futter N/Exkret N), ermöglicht aber die Umrechnung der gefundenen Exkretionsraten in das von Eijsmont-Karabin aufgestellte Modell. Die von ihr postulierte Abhängigkeit der NH_4^+ -Exkretion von den 2 Faktoren Temperatur und Körpergewicht sollte daher um einen dritten Parameter, den N-Gehalt der Futteralgen, erweitert werden. Dieses Modell gilt dennoch nur für relativ niedrige Wachstumsraten der Rotatorien. Die NH_4^+ -Exkretion schnell wachsender Tiere ($\mu \rightarrow \mu_{\text{max}}$) ist gegenüber den langsam wachsenden stark erhöht (s. 4.4.4.). Sie übertrifft mit 11 ng/Tier * Tag sogar

den Wert bei Fütterung mit proteinreichen Algen.

Gleich den Rotatorien sind auch die planktischen Crustaceen ammonotelisch. Ihre Exkretionsraten (gemessen als $\mu\text{g NH}_3\text{-N/mg Tier und Stunde}$) liegen wegen der höheren Körpergröße der Tiere jedoch niedriger als bei Rotatorien. Calanus exkretiert unabhängig von der Futterzufuhr bei 10 °C ca. 0,14 $\mu\text{g N/mg} \cdot \text{h}$ (Corner & Newell 1977); Eucalanus dagegen scheidet im Hunger 0,4 $\mu\text{g/mg} \cdot \text{h}$, gefüttert 0,7 $\mu\text{g/mg} \cdot \text{h}$ aus (Gardner & Paffenhöfer 1982). Messungen im Freiland liegen noch unter diesen Werten. Ikeda et al. (1982) bestimmten für Zooplankton im Gebiet des Great Barrier Reef Werte von 0,07 - 0,08 $\mu\text{g/mg} \cdot \text{h}$, Conover und Corner (1968) in England je nach Jahreszeit zwischen 0,04 und 0,17 $\mu\text{g/mg} \cdot \text{h}$. Ähnliche Werte erzielten Benson und Aldrich (1981) für Temora longicornis (0,04 - 0,17 $\mu\text{g/mg} \cdot \text{h}$).

Die NH_4^+ -N-Exkretion bei Mollusken liegt in der gleichen Größenordnung wie bei Crustaceen. Nach Langton et al. (1977) exkretieren ausgewachsene Iapes japonica ca. 0,4 $\mu\text{g/mg} \cdot \text{h}$, junge Muscheln dagegen 4,1 $\mu\text{g/mg} \cdot \text{h}$. Diese Werte sind außerdem abhängig von der Futterration.

Diese Daten passen tendenzmäßig in das Modell von Eijssmond-Karabin. Die NH_4^+ -Konzentration steigt mit der Temperatur und sinkt mit zunehmender Körpergröße der Tiere.

5.2. Wachstumsraten von Rotatorien

Autoren, die die Vermehrung von Rotatorien in Batchkulturen untersuchten, fanden meist recht niedrige Wachstumsraten. Halbach und Halbach-Keup (1974) bestimmten für Brachionus calyciflorus bei der von ihnen bestimmten optimalen Futterkonzentration eine Wachstumsrate von 0,51/d (0,021/h). Auch Rothaupt (1982) kultivierte B. rubens in seinem Chemo-statsystem mit ähnlich geringen Wachstumsraten ($\mu_{\text{max}} = 0,5/\text{d}$ (0,021/h). Droop und Scott (1978) erhielten mit B. plicatilis im Chemo-staten noch bei Wachstumsraten von 0,8/d (0,033/h) stabile Populationen. Boraas (1980, 1983) konnte zeigen, daß Rotatorien zu wesentlich höheren Wachstumsleistungen imstande sind. Die maximale Wachstumsrate seiner Brachionus calyciflorus-Population lag bei 0,054/h (25 °C).

Dies ist die höchste bislang für limnische Rotatorien in der Literatur beschriebene Vermehrungsrate. Diese Rate wurde nur noch von Brachionus plicatilis in den Chemostatkulturen von Endo (1979) übertroffen. Er schätzte die maximale Wachstumsrate seiner Rotatorien auf 1,67/d (0,0069/h; höchster gemessener Wert: 0,053). Die maximale Wachstumsrate meines Stamms von B. rubens beträgt bei 20 °C 0,056/h. Sie liegt damit in der gleichen Größenordnung wie in den Kulturen von Boraas. Bei 25 °C übertrifft sie mit $\mu_{\max} = 0,072/h$ sogar deutlich die von Boraas und Endo (bei dieser Temperatur) gemessenen Raten. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von 10 h und ist die höchste bislang bekanntgewordene Wachstumsleistung eines metazoischen Lebewesens.

5.3. Futterverwertung

Die Futterverwertung von Rotatorien ist von einigen Autoren bereits intensiv untersucht worden.

Boraas (1983) erreichte im Chemostaten in Abhängigkeit von der Wachstumsrate mit B. calyciflorus bei 25 °C einen Ertragskoeffizienten $Y_{\max}$ von 0,34 (TS-Basis).

Droop und Scott (1978) berechneten für B. plicatilis eine Reihe verschiedener Effizienzen. Der Ertragskoeffizient Y lag auf Kohlenstoffbasis zwischen 0,3 und 0,6, auf Stickstoffbasis zwischen 0,22 und 0,45 und auf Vitamin B₁₂-Basis (limitierendes Substrat) bei 1,0. Die ökologische Effizienz (ϕ) ihrer Tiere erreichte für Kohlenstoff den Wert 0,29, für Stickstoff 0,19 und für Vitamin B₁₂ 0,61. Die gefundenen Werte waren unabhängig von der Wachstumsrate.

Für den gleichen Organismus fand Doohan (1973) in Kurzzeitmessungen (24 h) für K_1 0,11 und für K_2 0,57 (s. 4.4.4.5.). Pilarska (1977c) bestimmte an Einzeltieren von B. rubens in Kurzzeitmessungen (2 h Fütterung mit ¹⁴C-markierten Algen) in Abhängigkeit vom Alter der Tiere sowie der Futterkonzentration für K_1 Werte zwischen 0,05 und 0,2 und für K_2 Werte zwischen 0,2 und 0,6.

Ebenfalls in Abhängigkeit von der Futterkonzentration erreichte Leimeroth (1980) für juvenile B. calyciflorus für K_1 Werte zwischen 0,16 und 0,29, für K_2 Werte zwischen 0,58 und 0,78. Dabei ist K_1 negativ, K_2 dagegen positiv mit der Algenkonzentration korreliert.

Galkovskaya (1963) bestimmte für Brachionus calyciflorus K_1 mit 0,19 - 0,36, K_2 mit 0,47 - 0,69.

Rothaupt (1982) ermittelte in seinen Chemostatkulturen für B. rubens den sehr niedrigen Ertragskoeffizienten von $Y = 0,083$. Die Aufenthaltszeit in seinen Kulturen war allerdings sehr lang (6 Tage), ein großer Teil der assimilierten Energie wurde daher veratmet. Eine Übertragung dieses Werts in die von mir ermittelte Abhängigkeit zwischen Ertragskoeffizient und Wachstumsrate (Abb. 46 b) liefert für 6 Tage Aufenthaltszeit einen Ertragskoeffizienten von ca. 0,23. Die Sättigungskurve knickt in diesem Bereich allerdings schon stark ab, so daß eine geringfügige Verminderung der Wachstumsrate bereits eine starke Abnahme des Ertrags bewirkt.

Die Ertragskoeffizienten anderer Filtrierer liegen im gleichen Bereich wie die an Rotatorien gemessenen. Rijsgard und Randlov (1981) bestimmten für Mytilus edulis K_1 zwischen 0,19 und 0,36, K_2 dagegen zwischen 0,19 und 0,61. Nach Lampert (1977a - c) erreichte Daphnia pulex K_2 bei einer Futterkonzentration von 2 mg Algen-C/l (Scenedesmus) bei 15 - 20 °C ein Maximum von ca. 0,85.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ertragskoeffizient Y auf Trockensubstanz und auf Stickstoffbasis bestimmt. Nach der Auswertung von Pirt (1975) betrug der maximale Ertragskoeffizient auf TS-Basis 0,43 und auf N-Basis 0,86. Die ökologische Effizienz O betrug auf TS-Basis 0,26 - 0,29, auf Stickstoff-Basis 0,55 - 0,59.

In Tab. 6 sind die gemessenen Ertragskoeffizienten den Literaturdaten gegenübergestellt. Meine auf TS-Basis bestimmten Werte liegen im Bereich der Daten von Droop und Scott, die Ertragskoeffizienten von Boraas sind dagegen kleiner. Im Vergleich zu den in Batchkulturen bestimmten Parametern K_1 und K_2 von Doohan, Pilarska, Leimeroth und Galkovskaya liegen die von mir für Y gemessenen Werte erwartungsgemäß

zwischen beiden Parametern. Der von mir auf N-Basis ermittelte Ertragskoeffizient von 0,86 liegt wesentlich über den von Droop und Scott bestimmten Werten (0,22 - 0,45). Dieser Befund ist verständlich, da in meinem System Stickstoff das Wachstum der Algenkultur limitierte, bei Droop und Scott dagegen Vitamin B₁₂. Für diese Substanz fanden sie den sehr hohen Ertragskoeffizienten von 1,0, d.h. die Tiere schieden einmal assimiliertes Vitamin B₁₂ nicht wieder aus.

Trotz der periodischen Fütterung stimmte die beobachtete Abhängigkeit des Ertragskoeffizienten von der Wachstumsrate mit der für Mikroorganismen entwickelten Theorie nach Pirt (1975) überein. Bei geringen Wachstumsraten wird ein größerer Teil des Substrates für den Erhaltungsstoffwechsel benötigt. Während Droop und Scott (1978) bei B. plicatilis keine signifikante Änderung des Ertragskoeffizienten von der Wachstumsrate finden, ermittelte Boraas (1983) für B. calyciflorus eine Steigerung des Ertrages mit der Wachstumsrate, die wie in der vorliegenden Arbeit durch die Sättigungskurve nach Pirt (1975) beschrieben werden kann.

Boraas (1983) versuchte auch die Halbsättigungskonstante K_s in seinem System zu bestimmen. Seine berechneten Werte zeigen eine starke nicht lineare Abhängigkeit zur Wachstumsrate. Sie stehen damit im Gegensatz zu den von mir bestimmten Daten, die zwar eine breite Streuung aufweisen, jedoch nicht mit der Durchflußrate korreliert sind. Größenordnungsmäßig liegen die von Boraas bestimmten K -Werte niedriger als meine, der von mir ermittelte Mittelwert von 45 mg Algen/l wurde von Boraas (1983) nur bei niedrigen Wachstumsraten erreicht.

Taub und McKenzie (1973) bestimmten in einem 2-stufigen Chemo-statsystem die Halbsättigungskonstante K_s für die Verwertung von Chlamydomonas durch den Ciliaten Tetrahymena. Für diesen Organismus liegt $\mu_{\max}$ mit 0,07/h in der gleichen Größenordnung wie bei Brachionus. K_s beträgt $3 \cdot 10^5$ Algenzellen/ml und liegt somit niedriger als bei Rotatorien. Beide Größen werden jedoch vom Proteingehalt der Algen beeinflusst, die größte Wachstumsrate wurde bei einem Proteingehalt der Algen von 50 % erreicht.

Tabelle 6. Futterverwertung von Brachionus

Autor	Spezies	Y P A	0 <u>Input</u> P	K ₁ P C	K ₂ P A
Droop & Scott 1978*	<u>B. plicatilis</u>	0,3 - 0,6	0,29		
Dochan 1973	<u>B. plicatilis</u>			0,11	0,57
Booras 1983*	<u>B. calyciflorus</u>	0,34	0,23		
Galkovskaya 1963	<u>B. calyciflorus</u>			0,19 - 0,36	0,47 - 0,69
Leimeroth 1980	<u>B. calyciflorus</u>			0,16 - 0,29	0,58 - 0,78
Pilarska 1977c	<u>B. rubens</u>			0,05 - 0,2	0,2 - 0,6
Rothaupt 1982*	<u>B. rubens</u>	0,083			
eigene Daten*	<u>B. rubens</u>	0,43	0,29		

* in kontinuierlichen Kulturen gemessen

5.4. Nährstoff-Recycling

Wie bereits dargestellt, nimmt die NH_4^+ -Exkretion von Brachionus mit der Wachstumsrate zu. Dennoch wurden bei hohen Wachstumsraten niedrigere NH_4^+ -Werte im Ablauf des Kultursystems erreicht. Der Anteil der nicht gefressenen Algen und Fäzes stieg dagegen mit der Durchflußrate kontinuierlich an.

Ziel des zweistufigen Chemostatensystems war es aber, sowohl die NH_4^+ -Konzentration als auch die Algenkonzentration im Ablauf zu minimieren. Dies konnte durch ein Recycling des exkretierten NH_4^+ -N in der Rotatorienstufe erreicht werden. Bei Belichtung dieser Kultur nahmen die nicht gefressenen Algen das Ammonium nahezu quantitativ auf. Da sie gleichzeitig Biomasse bildeten, stand den Rotatorien eine höhere Futtermenge zur Verfügung. Ihre Konzentration im Fließgewicht nahm zu. Die ökologische Effizienz für Stickstoff stieg von 0,51 in den verdunkelten Kulturen auf 0,81 in der belichteten Kultur an, bezüglich des Kohlenstoffs wurde eine Verbesserung der ökologischen Effizienz von 0,29 auf 0,39 erreicht. Eine Erhöhung der Futterkonversionsraten durch Recycling in Rotatorienkulturen ist von Hirata (1974, 1976) und Hirata et al. (1979, 1983) bereits beschrieben worden. Die Autoren fermentierten die diskontinuierlich gesammelten Fäzes der Rotatorien in einem anaeroben Reaktor und benutzten die Fermentationsrückstände zusammen mit dem verbrauchten Medium nach Abtrennung der Rotatorien zur Kultur von *Chlorella*, die wiederum an die Rotatorien verfüttert wurde. Die Futterkonversionsraten stiegen von 10 % auf 24 % in der Kultur mit Recycling an.

5.5. Einstufiger Chemostat, Mischkultur

In Batchkulturen führen Mischkulturen von Primärproduzenten und Konsumenten bzw. von Räuber und Beute meist zunächst zur Ausrottung des Futterorganismus, die Konsumenten- bzw. die Räuberpopulation verhungert daraufhin (Halbach 1969). Im Chemostaten können Mischkulturen dieser Art jedoch unter bestimmten Bedingungen bestehen. Bazin et al. (1978) beschreiben das Wachstum eines zellulären Schleimpilzes (Dictostelium) zusammen mit seiner Beute (Escherichia coli) im glucoselimitierten Chemostaten.

Die Biomassekonzentrationen beider Organismen oszillieren in ungedämpften, phasenverschobenen Schwingungen, ohne daß ein Organismus ausgespült wurde. Boraas (1980) erzielte analoge Ergebnisse bei der Kultivierung von Brachionus calyciflorus und Chlorella im nitratlimitierten Chemostaten. Die Oszillationen verliefen in seinen Kulturen als gedämpfte Schwingungen, nach ca. 45 Tagen wurde ein stabiles Plateau erreicht, daß aber durch eine Temperaturabsenkung von 5 °C für 5 - 10 h so gestört wurde, daß es erneut zu Oszillationen kam.

Gedämpfte Oszillationen, die nach ca. 14 Tagen in ein Fließgleichgewicht übergehen, fanden Bader et al. (1976) bei einer Chemostatkultur des Ciliaten Colpoda steinii und dem Cyanobacterium Anacystis nidulans. Das Fließgleichgewicht wurde jedoch eher erreicht als die Autoren nach ihrem Modell berechneten.

In der in dieser Arbeit beschriebenen Mischkultur von B. rubens und Sc. costato-granulatus treten ebenfalls Oszillationen der Biomassekonzentration auf, sie waren jedoch nicht gedämpft. Die Rotatorienkonzentration konnte aus 2 übereinandergelagerten Sinusschwingungen modelliert werden. Eine dieser Schwingungen war mit der Chlorophyllkonzentration, d.h. wohl mit der Algenbiomassekonzentration, korreliert. Das Auftreten überlagerter Schwingungen in den Algen- und Rotatorienkonzentrationen deutet an, daß noch andere Faktoren außer den Vermehrungsraten von Algen und Rotatorien dieses System steuern. Einer dieser Faktoren kann die Verfügbarkeit der Algen für die Rotatorien sein. Hierzu liegen keine Messungen vor. Es wurde jedoch beobachtet, daß in Phasen hoher Rotatorienpopulationen die Algen mit den Faeces stabile Flocken bildeten und sich damit dem Freßdruck der Rotatorien entzogen. Diese Flocken blieben z.T. auch bei absinkender Tierkonzentration stabil bestehen und führten zwischen Tag 40 und 100 zu einem steten Chlorophyllanstieg, bei stetem Abfall der Rotatorienkonzentration (Schwingung 2. Grades!).

Zu Beginn des Meßzeitraums erreichten die Rotatorien für ca. 14 Tage ein Plateau (Abb. 58/59). Während dieser Phase wurden der Stickstoff- und Kohlenstofffluß bilanziert. Da in dieser Kultur, wie in der belichteten Rotatorienkultur, ein NH_4^+ -Recycling möglich war, wurde der von den Rotatorien exkretierte NH_4^+ -N von den Algen aufgenommen, die Bilanzen des gelösten N beider Kulturen gleichen sich daher. Die Konzentration an nicht gefressenen Algen erreichte annähernd das Doppelte des Vergleichswerts für das 2-stufige System, die Rotatorienkonzentration lag ca. 30 % niedriger. Diese Effekte wurden durch die ständige Zudosierung von Algen im 2-stufigen System bewirkt; eine weitere Verminderung der Algenkonzentration im einstufigen System hätte zu einer Verminderung der Primärproduktion und somit zu einer ebenso verminderten Rotatorienkonzentration geführt.

5.6. Respiration

Respirationsmessungen an Rotatorien sind bereits von einigen Autoren durchgeführt worden. Leimeroth (1980), Doohan (1973) und Pilarska (1977b) bestimmten die Respiration einzelner Rotatorien über die Sauerstoffaufnahme mit Hilfe kartesischer Taucher. Droop und Scott (1978) berechnen die Respiration von B. plicatilis aus der Differenz zwischen gefressener Algenbiomasse und produzierten Rotatorien im Chemostaten. Direkte Messungen der CO_2 -Exkretion sind noch nicht durchgeführt worden. Die Respiration beträgt nach der Messung der O_2 -Zehrung für B. rubens ca. 10×10^{-6} cal/Tier x h (Pilarska 1977c), für B. calyciflorus ca. 23×10^{-6} cal/Tier x h (Leimeroth 1980) und für B. plicatilis ca. 26×10^{-6} cal/Tier x h (Doohan 1973). Die für B. rubens mit Hilfe der CO_2 -Messung ermittelten Werte lagen bei 96 h Aufenthaltszeit in der gleichen Größenordnung ($2 \text{ ng C} = \text{ca. } 22 \times 10^{-6}$ cal/Tier x h). Die Respiration war jedoch von der Wachstumsrate abhängig und betrug bei 24 h Aufenthaltszeit bereits 74×10^{-6} cal/Tier x h. Droop und Scott (1978) bestimmten für B. plicatilis Werte zwischen 15×10^{-6} cal/Tier x h bei $\mu = 0$ und 116×10^{-6} cal/Tier x h bei μ_{max} . Ihre Daten aus den indirekten Messungen stimmen mit den von mir direkt gemessenen CO_2 -Produktionsraten gut überein.

5.7. Filtrations- und Freßraten

Die Bestimmung der Filtrations- und Freßraten von Rotatorien ist von einer ganzen Reihe Autoren intensiv bearbeitet worden.

Hirayama und Ogawa (1972), Doohan (1973), Chotiyaputta und Hirayama et al. (1972) und Capuzzo (1979) bestimmten die Filtrationsraten von B. plicatilis. Im limnischen Bereich sind von Erman (1962), Galkovskaya (1963), Halbach und Halbach-Keup (1974), Gilbert und Starkweather (1977), Starkweather und Gilbert (1977), Starkweather und Frost (1979) sowie Pilarska (1977a) Filtrationsraten von Brachionus bestimmt worden. Schlosser und Anger (1982) verglichen die Ergebnisse der genannten Autoren und führten einige offenkundige Differenzen auf methodische Unterschiede zurück.

Die Freßrate der Rotatorien stieg nach allen genannten Autoren mit der Futterkonzentration zunächst linear an und erreicht bei hohen Futterkonzentrationen ein Plateau. Die Filtrationsrate sinkt dagegen mit zunehmender Futterkonzentration. Die Lage des Plateaus ist von den Versuchsbedingungen abhängig. So flacht die Freßrate von B. rubens nach Pilarska (1977a) bereits bei Konzentrationen über 10^6 Chlorella/ml ab, während sowohl bei B. plicatilis nach Schlosser und Anger als auch bei B. rubens (vorliegende Arbeit) die Freßrate bis über 2×10^6 Algenzellen/ml linear ansteigt. Die Filtrationsrate fällt in diesem Bereich nach Pilarska noch stark ab, nach Schlosser und Anger, sowie nach den in dieser Arbeit gemessenen Daten bleibt sie zwischen $0,5$ und 2×10^6 Algenzellen/ml annähernd konstant, die Sättigungskonzentration wurde in diesen Fällen noch nicht erreicht.

5.8. NH_4^+ -Toxizität

Ammonium-Stickstoff, insbesondere der freie Ammoniak ist ein starkes Gift für aquatische Organismen. In der neuen Literatur werden die zulässigen Höchstkonzentrationen für Gewässer kontrovers diskutiert (Szumski et al. 1982, Maschewitz 1982, Roseboom 1983). Die Toxizität des Ammoniumstickstoffs für Fische kann in einem Wasser mit niedriger Alkalinität beträchtlich vermindert werden, da das in den Kiemen exkretierte CO_2 zu einer pH-Absenkung im Kiemenbereich führen kann; die Kon-

zentration an freiem NH_3 wird so vermindert. Als Konzentration, die auch für empfindliche Fischarten unbedenklich ist, wird von Maschewitz (1982) 0,016 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ angesehen. Für marine Fischbrut bedeuten nach Brownell (1980) 0,02 - 0,05 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ keine Gefährdung. Colt und Armstrong (1979) geben eine Übersicht über die Ammoniumtoxizität für in der Aquakultur verbreitete Nutztiere (Fische, Crustaceen, Molusken). Der Süßwasserkrebs Macrobrachium reagierte auf 0,09 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ mit einer signifikanten Verminderung der Wachstumsrate. Muscheln (Crassostrea) verminderten bei einer Konzentration von 0,15 - 0,28 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ ihre Filtrationsrate um ca. 50 %. Diese Konzentrationen können in Algengräben in Phasen maximaler Photosyntheseaktivität durch die damit verbundene Erhöhung des pH-Wertes um Größenordnungen überschritten werden.

Mikroalgen reagieren erst bei 17 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ mit einer 50 % Reduktion ihrer C-Assimilation (Azov und Goldman 1982), ihre Wachstumsrate vermindert sich bei NH_3 -Konzentrationen zwischen 28 und 35 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ (Abeliovich und Azov 1976). Sie sind daher wesentlich resistenter gegen $\text{NH}_3\text{-N}$ als tierische Organismen.

Die Empfindlichkeit von Zooplankton gegenüber Ammoniak ist bereits zur Kontrolle von Zooplankton in Algengräben eingesetzt worden (Lincoln und Hill 1980, Lincoln et al. 1983). Die Autoren erhöhen durch Zugabe von NH_4OH den NH_3 -Gehalt des Algengrabens auf ca. 20 mg/l. Unter diesen Umständen sterben sowohl Diaphanosoma brachyurum als auch Brachionus rubens in 24 Stunden ab. Die 24 h LC_{100} für Brachionus rubens ist mit Tieren aus dem Algengraben bestimmt worden. Sie betrug ca. 16 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$. Daten über die Hemmung der Reproduktion von Rotatorien durch Ammoniak werden nicht angegeben.

Die in eigenen Versuchen gefundene Instabilität der Rotatorienpopulation bei erhöhten NH_4^+ -Konzentrationen ($> 10 \text{ mg } \text{NH}_4^+\text{-N/l}$) deutete jedoch eine höhere Empfindlichkeit gegen Ammoniak an. Dabei führte ich die Experimente zur Bestimmung der NH_3 -Toxizität für Brachionus im 2-stufigen Kultursystem durch, denn auf diese Weise können auch chronische sublethale Schäden festgestellt werden. Rotatorien sind bereits als Indikatoren zur Bestimmung des Trockengrades von Gewässern (Radwan 1976) sowie als Testorganismen in Biotests zur Bestimmung von

akuten (Arora 1965, Capuzzo 1976) und sublethalen Schädigungen (Halbach et al. 1981, 1983) herangezogen worden. Die Testverfahren von Halbach et al. lassen zwar die exakte Bestimmung sublethaler Effekte zu, da jedoch Batchkulturen verwendet werden, und die Tiere zudem täglich in frische, toxinbelastete Algensuspension umgesetzt werden müssen, ist der Aufwand erheblich. Die mathematische Auswertung der Effekte ist ebenfalls aufwendig und wegen des kritischen Gleichgewichts von Absterberate und Vermehrungsrate nur schwer interpretierbar. Im Chemostaten kann dagegen eine Population erzeugt werden, die kontinuierlich mit hoher Wachstumsrate wächst; eine geringfügige Verminderung dieser Rate ist direkt als Verminderung der Tierkonzentration im Fließgleichgewicht oder als Ausspülrate meßbar. Dieses Verfahren bietet - ohne Informationsverluste in Kauf nehmen zu müssen - eine erhebliche Verminderung technischen Aufwandes gegenüber der von Halbach et al. vorgeschlagenen Methodik.

Cladoceren sind für die Bestimmung akuter und sublethaler Schäden in der Regel geeigneter als Rotatorien, da sie auf die meisten Schadstoffe erheblich empfindlicher reagieren (Pott 1980, Schaler und Lampert 1977), ihre Generationszeit ist jedoch bedeutend länger und die Untersuchung chronischer Schädigungen über mehrere Generationen daher sehr aufwendig.

Der im Versuch gefundene Grenzwert für sublethale Schädigung von B. rubens durch Ammoniak liegt mit 3 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ deutlich unter der von Lincoln et al. bestimmten LC_{100} von 16 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$.

Bei pH 9 im Algengraben wird der von mir ermittelte Grenzwert von 3 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$ schon bei 10 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ erreicht, daher ist vor Verfütterung der Algen-Bakterien-Suspensionen an die Rotatorienkultur für ein Absenken des pH-Wertes zu sorgen.

5.9. Versuche mit Schweinegülle

In einer ausgedehnten Versuchsserie fütterten wir eine 50 l-Brachionus-Kultur mit Albazod aus einem im Freiland chemostatisch betriebenen Abwasserreinigungsbecken (Substrat: Schweinegülle) (Groeneweg und Schlüter 1981, Schlüter et al. 1984)). Die Algenkonzentration im Algengraben war mit der Rotatorienkonzentration korreliert, die Kulturen waren futterlimitiert. Die für die Abhängigkeit der Tierkonzentration von der Futterdosis erhaltene Regressionsgerade schneidet die x-Achse jedoch nicht im Nullpunkt (s. Abb. 24), sondern bei 148 mg Algen-Bakterien TS/l. Bei dieser Konzentration wird kein Wachstum der Rotatorien mehr erzielt. Die Ausnutzung der Biomasse aus der Abwasserkultur ist offensichtlich schlechter als in den Laborversuchen (vgl. Abb. 47), im Mittel beträgt sie nur ca. 13 %. Da die Regressionsgerade aber wie in den Laborkulturen den Nullpunkt annähernd schneiden sollte, müssen die 148 mg TS/l nicht verwertbare Substanzen sein, inerte Partikel, wie z.B. Feststoffe aus Futter und Streu der Schweine. Wenn die Trockensubstanz in der Algenkultur um diesen Faktor korrigiert wird, kann die tatsächlich von den Rotatorien verwertbare Biomasse bestimmt werden. Daraus berechnet sich ein Futterausnutzungskoeffizient von 22 %, der mit dem aus den Laborversuchen in 3.1.1. (20 %) gut übereinstimmt. Er liegt aber noch erheblich unter dem in 3.1.4. berechnetem maximalen Ertrag von 43 %. Unsere so interpretierten Versuchsergebnisse zeigen, daß sich die im Labor an definierten Kulturen ermittelten Abbau- und Wachstumsraten auf Rotatorienpopulationen in Abwasserkulturen übertragen lassen.

5.10. Micractinium

In der Literatur über den Betrieb von Algengräben zur Abwasserreinigung wird regelmäßig über Befall der Kulturen mit Rotatorien der Gattung Brachionus berichtet. Die Rotatorien vermehren sich in den Algenkulturen sehr schnell und können die gesamte Algenpopulation in kurzer Zeit vernichten. Groeneweg et al. (1980) berichteten von einem Brachionus-Befall ihres Algengrabens; dessen Populationen wurde von Scenedesmus sp. dominiert. Shelef et al. (1976) ermittelten in ihren Algengräben in der kalten Jahreszeit eine Dominanz von Scenedesmus sp. in der Algenpopulation. Im Juli wurde Scenedesmus von Micractinium

abgelöst. Dem Zusammenbruch der Scenedesmus-Kulturen ging ein Befall mit Rotatorien voraus, danach etablierte sich Micractinium. Da dieser Vorgang in zwei Jahren (1975 und 1976) nahezu gleich ablief, schlossen die Autoren auf eine Widerstandsfähigkeit von Rotatorien gegenüber Fraß durch Rotatorien. Diese Hypothese stellte auch Beneman (1977) auf. Lincoln und Hall (1983) möchten Brachionus als ein Instrument zur biologischen Kontrolle der Algenspezies in Algengräben einsetzen. Bedingung wäre, daß die unerwünschten Algenspezies (in ihrem Fall Synechocystis) von den Rotatorien gefressen werden, die erwünschte Alge dagegen nicht.

Auch Lee (1980) brachte das Vorkommen von Micractinium in Algengräben mit deren Resistenz gegen Rotatorien in Zusammenhang. Seine Micractinium-Kulturen wurden jedoch von Moina, einer Cladocere, dezimiert. Diese Filtrierer sind offensichtlich in der Lage, auch die stark bestachelten Micractinium-Zellen zu fressen. Nach Oswald (1980) können Cladoceren jedoch mit Netzen aus dem Algengraben entfernt werden, Rotatorien wegen ihrer geringeren Größe dagegen nicht. Sie stellten daher eine erheblich größere Gefahr für das System dar als die Cladoceren.

Dicht gewachsene Micractinium-Kulturen blieben bei Lee und Dodd (1980) weitgehend frei von Herbivoren. Scott und Chutter (1980) fordern in ihrem Artikel über Predation in Algengräben die Selektion resistenter Algenspezies wie Micractinium, die gegen Zooplanktonfraß weitgehend geschützt seien. Auch die Ergebnisse von Viviers et al. (1980) und Pieterse und Le Roux (1980) in Süd-Afrika passen in dieses Konzept. In ihren Algengräben war stets ein hoher Prozentsatz von Micractinium pusillum vorhanden, über Monate war diese Alge gar dominant. Hinweise auf Predation durch Rotatorien geben diese Autoren nicht.

All diese an Algengräben gemachten Beobachtungen über Befall mit Herbivoren deuten an, daß Rotatorien einen bedeutenden Einfluß auf die Spezieskomposition der Mikroalgenflora haben können, was anfänglich nicht beachtet wurde. Die in dieser Arbeit durchgeführten Fütterungsversuche von Micractinium an Brachionus rubens bestätigen diese Vorstellung, ja es reicht eine bestimmte niedrige Konzentration an Micractinium aus, um den Rotatorien das Fressen der übrigen gut filtrierbaren Algen

unmöglich zu machen.

Diese Erkenntnisse lassen die Arbeit von Azov et al. (1980) über die Kontrolle der Algenspezies in Algengräben in einem anderen Licht erscheinen. Die Autoren versuchen das Vorkommen verschiedener Algentaxa mit den physikalisch-chemischen Betriebsparametern des Algengrabens zu korrelieren. Die Reaktion auf Zooplanktonfraß wird jedoch nicht berücksichtigt. So leuchtet es nicht ein, daß Scenedesmus, der ja in Laborkulturen sein Temperaturoptimum bei ca. 30 °C hat, nur im Winter vorkommt, im Sommer dagegen von Micractinium verdrängt wird. Bei hoher Belastung mit organischen Substanzen dominiert Scenedesmus, bei geringer Belastung Micractinium. Im beschriebenen Algengraben bedeutet aber eine hohe Belastung immer auch eine kurze Aufenthaltszeit (Shelef et al. 1976).

Die Micractinium-Dominanz in den Algengräben fällt in eine Zeit hoher Temperatur (20 - 25 °C) und hoher Aufenthaltszeit bzw. geringer Belastung. Unter diesen Bedingungen können sich Rotatorien rasch vermehren, daher besitzt Micractinium dann einen entscheidenden Selektionsvorteil gegenüber Scenedesmus. In der kühlen Jahreszeit und bei extrem kurzer Aufenthaltszeit bzw. hoher Belastung wird Scenedesmus dagegen nicht durch Zooplanktonfraß bedroht und ist Micractinium überlegen.

Da Micractinium pusillum durch Filtration besser aus dem Ablauf des Algengrabens entfernt werden kann als kleinere, unbestachelte Formen (Lee 1980), sein Beitrag zur Abwasserreinigung aber etwa genauso groß ist, bietet diese Alge wesentliche (verfahrenstechnische) Vorteile gegenüber Scenedesmus, Chlorella oder Euglena-Arten.

Soll der Ablauf des Algengrabens dagegen, wie in dieser Arbeit vorgeschlagen, von einer Rotatorienkultur geerntet werden, muß das Aufkommen von Micractinium im Algengraben verhindert werden. Dies ist durch eine Kontrolle der Rotatorien im Algengraben möglich, denn ohne den Freßdruck durch die Filtrierer wird sich der schneller wachsende Scenedesmus im Algengraben durchsetzen. Eine Kontrolle der Rotatorien kann durch eine Erhöhung des pH-Wertes bei gleichzeitig hohem Ammonium-Gehalt erreicht werden (Lincoln und Hall 1983). Eine besser geeignete Methode ist jedoch eine oxigenostatische Betriebsweise des Algen-

grabens. Hier wird die organische Belastung so zudosiert, daß Sauerstoff im Algengraben nicht meßbar ist. Unter diesen Bedingungen wird ein Befall mit Brachionus zuverlässig vermieden (Groeneweg, pers. Mitteilung 1984).

6. Schlußbemerkung

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich bemüht, die Biologie von B. rubens, seine Eignung für die Massenkultur sowie deren technische Durchführung zu untersuchen. Die Ergebnisse lassen hoffen, daß die Realisierung einer Massenproduktion von Süßwasserrotatorien für die verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten in der Aquakultur ökonomisch durchführbar ist. Ziel weiterer Forschungsbemühungen sollte es jetzt sein, die nächstfolgende Stufe der Nahrungskette mit in die Untersuchungen einzubeziehen und Wachstum und Überlebensraten verschiedener Fisch- und Krebsbrut bei Fütterung mit Rotatorien zu testen und mit den bislang üblichen Methoden zu vergleichen. Auch die Erschließung weiterer Nahrungsquellen für Zooplankter (z.B. Biomasse aus Belebungsanlagen) erscheint lohnenswert, da sich die Produktionsverfahren für Algen, und zwar sowohl auf Mineraldünger angezogene Reinkulturen als auch auf Abwasser produzierte Algen bislang noch nicht durchgesetzt haben und unter unseren Klimabedingungen wohl kaum ganzjährig in größeren Mengen verfügbar sein dürften.

7. Zusammenfassung

Das Wachstum von Brachionus rubens wurde in kontinuierlicher Kultur untersucht. Als Futter wurde die Grünalge Scenedesmus costato-granulatus benutzt.

Dazu wurde eine zweistufige Algen-Rotatorien-Freßkette im Labormaßstab konstruiert, mit kontinuierlicher Verdünnung der Algenstufe und diskontinuierlicher automatischer Fütterung und Verdünnung der Rotatorienkultur.

- In diesem System wurden Filtrations- und Freßraten, sowie die Respiration und die Populationsstruktur von Brachionus rubens untersucht.
- Der Futterwert von Algen mit unterschiedlichen Proteingehalten für B. rubens wurde verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Ertragskoeffizienten bei Fütterung von Algen mit 34 % oder 62 % Rohprotein festgestellt werden, bei Fütterung mit Algen mit niedrigem Proteingehalt erwiesen sich die Rotatorienkulturen jedoch als stabiler.
- Bei unterschiedlichen Aufenthaltszeiten in der Rotatorienstufe wurden Massebilanzen für Stickstoff und Kohlenstoff aufgestellt und die Ammoniumexkretion der Tiere bestimmt. Diese betrug je nach Aufenthaltszeit zwischen 15 und 33 % des assimilierten N. Die Ertragskoeffizienten erwiesen sich - analog zu den Untersuchungen an Mikroorganismen - als abhängig von der Wachstumsrate. Für Stickstoff wurde ein maximaler Ertragskoeffizient von 0,86 bestimmt, für Kohlenstoff (bzw. TS) wurden 0,43 erreicht.
- Für algengebundenen Stickstoff und Algentrockensubstanz wurde die Substratsättigungskonstanten K_s bestimmt. Sie betrugen für Stickstoff 2,8 mg N/l und für Algentrockensubstanz 45 mg/l.

- Die maximale Wachstumsrate von B. rubens wurde bestimmt. Sie betrug bei 20 °C 0,056/h.
- Für eine belichtete Rotatorienkultur wurde eine Stickstoffbilanz erstellt. Im Vergleich zu den verdunkelten Kulturen verminderte sich die NH_4^+ -Konzentration im Ablauf durch "internes" NH_4^+ -Recycling um den Faktor 10. Der Ertrag an Rotatorienbiomasse verdoppelte sich.
- Die Toxizität von NH_4^+ -N für B. rubens wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Konzentrationen über 3 mg NH_3 -N/l führten zu sublethalen reversiblen Schädigungen der Tiere, über 5 mg/l wirkten lethal.
- Die Populationsdynamik der Algen und Rotatorien wurde im einstufigen Chemostaten untersucht und modelliert.
- Die Eignung der bestachelten Grünalge Micractinium pusillum als Futter für B. rubens wurde getestet. Sie erwies sich, zumindest in ihrer langstacheligen Form, als ungeeignet und verhinderte sogar die Aufnahme anderer Futteralgen.
- Das Wachstum von B. rubens mit Albazod aus einem abwasserbelasteten Algengraben wurde untersucht. Mit diesem Futter wurden bei den Algenreinkulturen durchaus vergleichbare Ertragskoeffizienten erzielt.

8. Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A. & Azov, Y.: Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. Appl. Environm. Microbiol. 31, 801 - 806 (1976)
- American Public Health Association: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14. Aufl. (1975)
- Arora, H.C.: Responses of rotifera to variations in some ecological factors. Proc. Indian Acad. Sci. B63, 57 - 66 (1966)
- Azov, Y., Shelef, G., Moraine, R. & Levi, A.: Controlling algal genera in high rate wastewater oxidation ponds. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 245 - 253 (1980)
- Azov, Y. & Goldman, J.C.: Free ammonia inhibition of algae photosynthesis in intensive cultures. Applied and Environmental Microbiology, S. 735 - 739 (1982)
- Bader, F.G., Fredrickson, A.G. & Tsuchiya, H.M.: Dynamics of an algal-protozoan grazing interaction. In: R.P. Canale (Herausg.), Modelling Biochemical Processes in Aquatic Ecosystems. Ann. Arbour Sciences Publ., Michigan, S. 257 - 279 (1976)
- Bazin, M.S., Saunders, P.T., Owen, B.H. & Kilpatrick, D.: Predation by slime amoeba. In: M.W. Lontit & J.A.R. Miles (Herausg.), Microbial Ecology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 21 - 24 (1978)
- Ben-Amotz, A. & Fishler, R.: Induction of sexual reproduction and resting egg production in Brachionus plicatilis by a diet of salt-grown Nannochloris oculata. Marine Biol. 67, 289 - 294 (1982)

- Benson, F.W. & Aldrich, J.C.: A study of nitrogen excretion in the marine copepod Temora longicornis. Kieler Meeresforsch. Sonderh. 5, 186 - 190 (1981)
- Bohl, M. & Schlüter, M.: Forschungsbericht über Aufbau von Algenkulturen zur Brachionus-Züchtung mit dem Ziel der Errichtung eines Recycling-Verfahrens in der Fischkreislaufhaltung. Projektbericht, Bayerische Landesanstalt für Wasserforschung Wielenbach (1978)
- Bongers, L.H.J.: Aspects of nitrogen assimilation by cultures of green algae. Medelingen van de Landbouwhogeschool Wageningen, NL 56 (15), 1 - 52 (1956)
- Boraas, M.E.: A chemostat system for the study of rotifer-algae-nitrate interactions. Am. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp. 3, 173 - 182 (1980)
- Boraas, M.E.: Population dynamics of food-limited rotifers in two-stage chemostat culture. Limnol. Oceanogr. 28 (3), 546 - 563 (1983)
- Brownell, C.L.: Water quality requirements for first feeding in marine fish larvae. I. Ammonia, nitrite and nitrate. J. exp. mar. Biol. Ecol. 44, 269 - 283 (1980)
- Buchner, H., Kiechle, H. & Tiefenbacher, L.: Untersuchungen über die Bedingungen der heterogenen Fortpflanzungsarten bei den Rädertieren. I. Die miktische Reaktion, ihre Beziehungen zur Populationsdynamik und ihre Abhängigkeit vom Milieu. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol. 74, 329 - 426 (1969)
- Capuzzo, J.M.: The effects of halogen toxicants on survival, feeding and egg production of the rotifer Brachionus plicatilis. Estuarine and Coastal Marine Science 8, 307 - 316 (1979)

- Chotiyaputta, C. & Hirayama, K.: Food selectivity of the rotifer Brachionus plicatilis feeding on phytoplankton. Marine Biol. 45, 105 - 111 (1978)
- Colt, J. & Armstrong, D.: Nitrogen toxicity to fish, crustaceans and mollusks. Proc. Bio-Engineering Symp., Fish Culture Section of the American Fisheries Society, 1979, Traverse City, Michigan, USA (1979)
- Conover, R.J.: Cultivation of plankton populations. Helgoländer wiss. Meeresuntersuchungen 21, 401 - 444 (1970)
- Conover, R.J. & Corner, E.D.S.: Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. J. mar. Biol. Ass. UK 48, 45 - 75 (1968)
- Corner, E.D.S. & Newell, B.S.: On the nutrition and metabolism of zooplankton. IV. The forms of nitrogen excreted by Calanus. J. mar. Biol. Ass. UK 47, 113 - 120 (1967)
- Doohan, M.: An energy budget for adult Brachionus plicatilis (Müller) rotatoria. Oecologia 13, 351 - 362 (1973)
- Droop, M.R.: The nutrient status of algal cells in continuous culture. J. mar. Biol. Ass. UK 54, 825 - 855 (1974)
- Droop, M.R.: The chemostat in mariculture. Proc. 10th Europ. Marine Biological Symp. Ostende 1975, Vol. 1, S. 71 - 93 (1976)
- Droop, M.R. & Scott, J.M.: Steady-state energetics of a planktonic herbivore (Brachionus). J. mar. Biol. Ass. UK 58, 749 - 772 (1978)
- Droop, M.R. & Scott, J.M.: A steady-state approach to some micro-plankton problems. Ann. Inst. Oceanogr. Paris 58, 47 - 54 (1982)

- Edmondson, W.T.: Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. *Ecological Monographs* 35, 61 - 111 (1965)
- Edmondson, W.T.: Population dynamics and secondary production. *Arch. Hydrobiol., Ergebn. Limnol.* 8, 56 - 4 (1977)
- Eijsmont-Karabin, J.: Ammonia, nitrogen and inorganic phosphorus excretion by planktonic rotifers. *Hydrobiologia* 104, 231 - 236 (1983)
- Endo, K. & Mochizuki, T.: Relation between specific growth rate of rotifer Brachionus plicatilis and concentration of food, marine species of Chlorella. *J. Ferment. Technol.* 57, 372 - 774 (1979)
- Erman, L.A.: Nutrition and multiplication of planctonic rotifer Brachionus calyciflorus Pall. in mass culture. Übersetzt aus: *Doklady Biological Sciences Sections (Dokl. Acad. Nauk. SSR)* 144, 642 - 644 (1962)
- Galkovskaya, F.A.: On the utilization of food for growth and conditions of highest yield in rotatoria, Brachionus calyciflorus Pallas. *Zool. Zh.* 42, 506 - 512 (Übersetzt in: *Fisheries Research Board of Canada* 997, 1969 (1963)
- Gallager, S.M. & Mann, R: The effect of varying carbon/nitrogen ratio in the phytoplankter Thalassiosira pseudorana (3H) on its food value to the bivalve Tapes japonica. *Aquaculture* 26, 95 - 105 (1981/82)
- Gatesoupe, F.J. & Luquet, P.: Practical diet for mass culture of the rotifer Brachionus plicatilis: Application to larval rearing of sea bass, Dicentrarchus labrax. *Aquaculture* 22, 149 - 163 (1981)

- Gardner, W.S. & Paffenhöfer, G.A.: Nitrogen regeneration by the subtropical marine copepod Eucelanus pileatus. J. plankton. Res. 4, 725 - 733 (1982)
- Gilbert, J.J.: Contact chemoreception, mating behaviour, and sexual isolation in the rotifer genus Brachionus. J. exp. Biol. 40, 625 - 641 (1963)
- Gilbert, J.J.: Dietary control of sexuality in the rotifer Asplanchna brightwelli. Phys. Zool. 41, 14 - 43 (1968)
- Gilbert, J.J.: A note on mictic-female production in monoxenic cultures of Brachionus calyciflorus. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 8, 156 - 157 (1977)
- Gilbert, J.J. & Starkweather, P.L.: Feeding in the rotifer Brachionus calyciflorus. I. Regulator mechanisms. Oecologia 28, 125 - 131 (1977)
- Grabner, M., Wieser, W. & Luckner, R.: The suitability of frozen and freeze-dried zooplankton as food for fish larvae: A biochemical test program. Aquaculture 26, 85 - 94 (1981)
- Groeneweg, J.: Behandlung von Abwasser aus Massentierhaltungen in Algengräben. Wiss. Umwelt 4, 165 - 170 (1980)
- Groeneweg, J., Klein, B., Mohn, F.H., Runkel, K.H. & Stengel, E.: First results of outdoor-treatment of pig manure with algal-bacterial systems. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 255 - 264 (1980)
- Groeneweg, J. & Schlüter, M.: Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes. II. Mass production of Brachionus rubens Ehrenberg 1838 in the effluent of high-rate algal ponds used for the treatment of piggery waste. Aquaculture 25, 25 - 34 (1981)

- Groeneweg, J. & Schlüter, M.: Verfahren zur Behandlung flüssiger landwirtschaftlicher Abfälle. Europäische Patentschrift No. 0035264 B1 (1981)
- Groeneweg, J. & Soeder, C.J.: An improved culture tube for axenic cultures of microalgae. Br. phycol. J. 13, 337 - 340 (1978)
- Halbach, U.: Das Zusammenwirken von Konkurrenz und Räuber-Beute-Beziehungen bei Rädertieren. Zool. Anz. Suppl. 33: 72 - 79 (1969)
- Halbach, U.: Einfluß der Temperatur auf die Populationsdynamik des planktischen Rädertieres Brachionus calyciflorus Pallas. Oecologia 4, 176 - 207 (1970)
- Halbach, U.: Quantitative Untersuchungen zur Assoziation von planktischen Rotatorien in Teichen. Arch. Hydrobiol. 71, 233 - 254 (1973)
- Halbach, U. & Halbach-Keup, G.: Quantitative Beziehungen zwischen Phytoplankton und der Populationsdynamik des Rotators Brachionus calyciflorus Pallas. Befunde aus Laboratoriumsexperimenten und Freilanduntersuchungen. Arch. Hydrobiol. 73, 273 - 309 (1974)
- Halbach, U., Siebert, M., Wissel, C., Klaus, J., Benter, U. & Delion, M.: Population dynamics of rotifers as bioassay tool for toxic effects of organic pollutants. Verh. Internat. Verein. Limnol. 21, 1141 - 1146 (1981)
- Halbach, U., Siebert, M., Westermayer, M. & Wissel, C.: Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. Ecotoxicology and Environmental Safety 7, 484 - 513 (1983)
- Hettler, W.F.: Spawning and rearing atlantic menhaden. Progr. Fish-Cult. 43, 80 - 84 (1981)

- Hino, A. & Hirano, R.: Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer Brachionus plicatilis. II. Effects of cumulative parthenogenetic generation on the frequency of bisexual reproduction. Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries 43, 1147 - 1155 (1977)
- Hirata, H.: An attempt to apply an experimental microsom for the mass culture of marine rotifer, Brachionus plicatilis Müller. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 23, 163 - 172 (1974)
- Hirata, H.: Homeostatic problems of artificial ecosystem in aquaculture. Proc. 5th Japan-Soviet Joint Symp. Aquaculture, Sept. 1976, Tokyo & Sapporo. S. 49 - 64 (1977)
- Hirata, H., Yamasaki, S., Kawaguchi, T. & Ogawa, M.: Continuous culture of the rotifer Brachionus plicatilis fed recycled algal diets. Hydrobiologia 104, 71 - 75 (1983)
- Hirayama, K. & Ogawa, M.: Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. I. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38, 1207 - 1214 (1972)
- Hoyer, O. & Clasen, J.: Ein Verfahren zur schnellen Routinebestimmung von Chlorophyll a in Gewässerproben mittels HPLC. Gewässer, Wasser, Abwasser (1983; im Druck)
- Ikeda, T. & Mitchell, A.W.: Oxygen uptake, ammonia excretion and phosphate excretion by krill and other antarctic zooplankton in relation to body size and chemical composition. Marine Biol. 71, 283 - 298 (1982)
- Imada, O., Kageyama, Y., Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S. & Yone, Y.: Development of a new yeast as a culture medium for living feeds used in the production of fish seed. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45, 955 - 959 (1979)

- Ito, T.: On the culture of the mixohaline rotifer Brachionus plicatilis O.F. Müller in sea water. Rep. of Fac. Fish. Prefect Univ. Mie 3, 708 - 740 (1960)
- James, C.M., Al-Hinty, S. & Al-Khars, A.M.: Mass culture and reproduction of single-cell organisms for aquaculture. Ann. Res. Rep. Kuwait Institute for Scientific Research, 101 - 103 (1981)
- James, C.M. & Makkeya, B.A.: Production of rotifers, Brachionus plicatilis, brine shrimp, Artemia salina and copepods for aquaculture. Ann. Res. Rep. Kuwait Institute for Scientific Research, 103 - 107 (1981)
- James, C.M., Bon-Abbas, M., Al-Khars, A.M., Al-Hinty, S. & Salman, A.E.: Production of the rotifer Brachionus plicatilis for aquaculture in Kuwait. Hydrobiologia 104, 77 - 84 (1983)
- Kinne, O.: Marine Ecology. Vol. III, Cultivation, Part 2. John Wiley et Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto (1977)
- Kitajima, C., Fujita, S., Ohwa, F., Yone, Y. & Watanabe, T.: Improvement of dietary value for Red Sea bream larvae of rotifers Brachionus plicatilis cultured with the baker's yeast Saccharomyces cerevisiae. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45, 469 - 471 (1979)
- Kitajima, C., Arakawa, T., Oowa, F., Fujita, S., Imada, O., Watanabe, T. & Yone, Y.: Dietary value for Red Sea bream larvae of rotifer Brachionus plicatilis cultured with a new type of yeast. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46, 43 - 46 (1980)
- Klekat, L. & Klimowicz, H.: Rotifer communities of ponds supplied with post-wastewater. Holarctic Ecol. 4, 208 - 214 (1981)
- Kokova, V.A., Trubachev, N. & Barashov, V.A.: Biochemical composition of some water invertebrates. Hidrobiologiceskij Zurnal 18, 58 - 62 (1982)

- Lampert, W.: Studies on the carbon balance of Daphnia pulex as related to environmental conditions. I. Methodical problems of the use of ^{14}C for the measurement of carbon assimilation. Arch. Hydrobiol./Suppl. 48, 287 - 309 (1977a)
- Lampert, W.: Studies on the carbon balance of Daphnia pulex as related to environmental conditions. II. The dependance of carbon assimilation on animal size, temperature, food concentration and diet species. Arch. Hydrobiol./Suppl. 48, 310 - 335 (1977b)
- Lampert, W.: Studies on the carbon balance of Daphnia pulex as related environmental conditions. III. Production and production efficiency. Arch. Hydrobiol./Suppl. 48, 336 - 360 (1977c)
- Langton, R.W., Haines, K.C. & Lyon, R.E.: Ammonia-nitrogen production by the bivalve mollusc Tapes japonica and its recovery by the red seaweed Hypnea musciformis in a tropical mariculture system. Helgoländer wiss. Meeresunters. 30, 217 - 229 (1977)
- Lee, B.Y. & Dodd, J.C.: Production of algae from pig wastewater in high-rate ponds. Rep. Workshop on High-Rate Algal Ponds Singapur (1980)
- Lee, B.Y., Wing, L.K., McGarry, M.G. & Graham, M.: Overview of waste water treatment and resource recovery. Rep. Workshop on High-Rate Algal Ponds Singapur (1980)
- Leimeroth, N.: Respiration of different stages and energy budgets of juvenile Brachionus calyciflorus. Hydrobiologia 73, 195 - 197 1980)
- Lincoln, E.P. & Hall, T.W.: Critical factors in the large scale production of microalgae. Rep. Workshop on Waste Treatment and Nutrient Recovery from High-Rate Algal Ponds Singapur (1980)

- Lincoln, E.P., Hall, T.W. & Koopman, B.: Zooplankton control in mass algal cultures. *Aquaculture* 32, 331 - 337 (1983)
- Lorenzen, C.J.: Vertical distribution of chlorophyll and phaeo-pigments: Baja California. *Deep Sea Res.* 14, 735 - 745 (1967)
- Lubzens, E.: Rotifer resting eggs and their application to marine aquaculture. *Europ. Maricult. Soc. Spec. Publ.* 6, 136 - 179 (1983)
- Lubzens, E., Fishler, R. & Berdugo-White, V.: Induction of sexual reproduction in Brachionus plicatilis. *Hydrobiologia* 73, 55 - 58 (1980)
- Maschewitz, D.E.: Un-ionized ammonia toxicity. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 54, 1048 (1982)
- Middlebrooks, E.J., Porcella, D.B., Gearheart, R.A., Marshall, G.R., Reynolds, J.H. & Grenney, W.J.: Techniques for algae removal from wastewater stabilization ponds. *J.W.P.C.F.* 46, 2675 - 2695 (1974)
- Mohn, F.H.: Improved technologies for harvesting and processing of microalgae and their impact on production costs. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 11, 228 - 253 (1978)
- Mohn, F.H.: Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), *Algae Biomass: Production and Use*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 547 - 572 (1980)
- Nusch, E.: Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14, 14 - 36 (1980)
- Oswald, W.J.: Algal production - Problems, achievements and potential. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), *Algae Biomass: Production and Use*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 1 - 8 (1980)

- Parsen, T.R. & Strickland, S.O.H.: Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J. mar. Res. 21, 155 - 163 (1963)
- Payer, H.-D. & Trültzsch, U.: Ein Beitrag zur Versorgung dichter Kulturen von Grünalgen mit Mangan, Vanadium und anderen Spurenelementen. Arch. Mikrobiol. 84, 43 - 53 (1972)
- Pieterse, A.J.H. & Le Roux, J.D.: Algal culture using waste water. Proc. Symp. on Aquaculture in Wastewater, Pretoria, SA (1980)
- Pilarska, J.: Eco-physiological studies on Brachionus rubens. I. Food selectivity and feeding rate. Polski Archiwum Hydrobiologii 24, 319 - 329 (1977a)
- Pilarska, J.: Eco-physiological studies on Brachionus rubens. II. Production and respiration. Polski Archiwum Hydrobiologii 24, 329 - 343 (1977b)
- Pilarska, J.: Eco-physiological studies on Brachionus rubens. III. Energy balances. Polski Archiwum Hydrobiologii 24, 343 - 355 (1977c)
- Pirt, S.J.: Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Sci. Publ., Oxford, London, Edinburgh, Melbourne (1975)
- Pott, E.: Die Hemmung der Futteraufnahme von Daphnia pulex - eine neue limnotoxikologische Meßgröße. 2. Wasser-Abwasser-Forsch. 13, 52 - 54 (1980)
- Pourriot, R.: Influence de la nourriture sur l'apparition des females mictiques, chez deux espèces et une variété de Brachionus (rotifères). Hydrobiologia 9, 60 - 65 (1957)

- Pourriot, R.: Males et oeufs durables de quelques rotifères. Bull. Soc. Zool. France 92, 185 - 192 (1967)
- Pourriot, R. & Rougier, C.: Effets de la densité de population et du groupement sur la reproduction de Brachionus calyciflorus (Pallas). Ann. Limnol 13, 101 - 113 (1977)
- Pourriot, R.: Observations about the hatching of resting eggs. Hydrobiologia 73, 51 - 54 (1980)
- Radwan, S.: Planktonic rotifers as indicators of lake trophy. Ann. Universitatis Mariae Curie-Skodowska, Lublin (Polen) Vol. 41, 21, Sectio C (1976)
- Rao, R.K. & Mohan, P.C.: Rotifers as indicators of pollution. Current Sci. 46, 190 (1977)
- Rhee, G.-Y.: Effects of N : P atomic ratios and nitrate limitations on algal growth, cell composition and nitrate uptake. Limnol. Oceanogr. 23, 10 - 25 (1978)
- Richey, J.E., Wissmar, R.C., Devol, A.H., Likens, G.E., Eaton, J.S., Wetzel, R.G., Odum, W.E., Johnson, N.M., Loucks, O.L., Prentki, R.T. & Rich, P.H.: Carbon flow in four lake ecosystems. A structural approach. Science 202, 1183 - 1186 (1978)
- Rijsgard, H.U. & Randløv, A.: Energy budgets, growth and filtration rates in Mytilus edulis at different algae concentrations. Marine Biol. 61, 227 - 234 (1981)
- Roseboom, D.P.: Discussion of evaluation of EPA - un-ionized ammonia toxicity criteria. J. WPCF 55, 420 - 423 (1983)
- Rothbard, S.: Practical mass-culture of the rotifer Brachionus plicatilis (Müller). Eifac Technical Paper 35, Suppl. 1, 194 - 202 (1979)

- Rothhaupt, K.O.: Die Kultur des planktischen Rädertiers Brachionus rubens Ehrenberg im Chemostaten. Ein Modell und Experimente. Diplomarbeit Universität Frankfurt (1982)
- Ruttner-Kolisko, A.: Rotatoria. In: A. Thienemann (Herausg.), Die Binnengewässer, Bd. 26 "Das Zooplankton der Binnengewässer", E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. 1. Teil. S. 99 - 234 (1972)
- Sartory, D.P.: Spectrophotometric analysis of chlorophyll a in fresh-water phytoplankton. Technical Report TR 115, Pretoria (1982)
- Scott, A.P. & Baynes, S.M.: Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer Brachionus plicatilis. Aquaculture 14, 247 - 260 (1978)
- Scott, J.M.: Effect of growth rate of the food alga on the growth/ingestion efficiency of a marine herbivore. J. mar. biol. Ass. UK 60, 681 - 702 (1980)
- Scott, J.M.: Rotifer production under controlled experimental conditions. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 8, 169 - 171 (1977)
- Scott, W.E. & Chutter, F.M.: Introduction: Infections and predators. In: J.U. Grobbelaar, C.J. Soeder & D. Toerien (Herausg.), Waste-water in Aquaculture, Pretoria, S.A. (1981)
- Schlosser, H.J. & Anger, K.: The significance of some methodological effects on filtration and ingestion rates of the rotifer Brachionus plicatilis. Helgoländer Meeresunters. 35, 215 - 223 (1982)
- Schlüter, M.: Das Wachstum planktischer Rotatorien (Brachionus usw.) in Abhängigkeit von Kulturbedingungen und Futterqualität. Diplomarbeit Bochum (1979)

- Schlüter, M.: Mass culture experiments with Brachionus rubens.
Hydrobiologia 73, 45 - 50 (1980)
- Schlüter, M. & Groeneweg, J.: Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes. I. The influence of some environmental factors on population growth of Brachionus rubens Ehrenberg 1838. Aquaculture 25, 17 - 24 (1981)
- Schlüter, M., Groeneweg, J. & Soeder, C.J.: Rädertiere in der Algenkultur. Fischer & Teichwirt 35, 105-108 (1984)
- Schober, U. & Lampert, W.: Effects of sublethal concentrations of the herbicide Atrazin on growth and reproduction of D. pulex. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 17, 269 - 277 (1977)
- Semenyuk, G.A.: Versuch der Ausnutzung von Abwärme für die Massenkultur von Planktonorganismen als Futter für Fischbrut (in russisch). Vesci Akademii Navuk BSSR Minsk, 130 - 132 (1980)
- Sharp, J.H., Frake, A.C., Hillier, G.B. & Underhill, P.A.: Modelling nutrient regeneration in the ocean with an aquarium system. Marine Ecology-Progress Series 8, 15 - 32 (1982)
- Shelef, G.: Combined systems for algal wastewater treatment and reclamation and protein production. 3rd Progress Report Technion, Haifa (Israel), S. 13 - 565 (1976)
- Shelef, G.: Combined systems for algae wastewater treatment and reclamation and protein production. Final Report Technion, Haifa (Israel), 135 S. (1981)
- Shelef, G., Azov, Y., Moraine, R., Sandbank, E. & Oron, G.: Waste treatment and nutrient removal by high-rate algal ponds. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 163 - 190 (1980)

- Soeder, C.J.: Algal cultures. Manuskript für: R.A. Vollenweider (Herausg.), IBP Handbook No. 12, 3. Ed. (unveröffentlicht)
- Soeder, C.J.: Aquatic bioconversion of excrements in ponds. Proc. Wageningen Symp., Wageningen (NL) (1984, im Druck)
- Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Cooreman, A., Dobbeleir, J. Vanhaecke, P. & Versichele, D.: Research at the Artemia reference centre. Progress Report on the Research Activities of the Laboratory for Mariculture, ICES 54, 204 - 214 (1979)
- Sorgeloos, P. & Persoone, G.: Three simple culture devices for aquatic invertebrates and fish larvae with continuous recirculation of the medium. Marine Biol. 15, 251 - 254 (1972)
- Spoehr, H.A. & Milner, H.W.: The chemical composition of Chlorella; effects of environmental conditions. Plant Physiol. 24, 120 - 149 (1949)
- Starkweather, P.L. & Gilbert, J.J.: Radiotracer determination of feeding in Brachionus calyciflorus: the importance of gut passage times. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 8, 261 - 263 (1977a)
- Starkweather, P.L. & Gilbert, J.J.: Feeding in the rotifer Brachionus calyciflorus. II. Effects of food density on feeding rates using Euglena gracilis and Rhodotorula glutinis. Oecologia 28, 133 - 139 (1977b)
- Starkweather, P.L., Gilbert, J.J. & Frost, T.M.: Bacterial feeding by the rotifer Brachionus calyciflorus: Clearance and ingestion rates, behaviour and population dynamics. Oecologia 44, 26 - 31 (1979)
- Stengel, E.: Zustandsänderungen verschiedener Eisenverbindungen in Nährlösungen für Algen. Arch. Hydrobiol./Suppl. 38 (Falkau-Arbeiten 7), 151 - 169 (1970)

- Szumski, D.S., Barton, D.A., Putnam, H.D. & Polter, R.C.: Evaluation of EPA un-ionized ammonia toxicity criteria. J.W.P.C.F. 54, 281 - 291 (1982)
- Taub, F.B.: Use of continuous culture techniques to control nutritional quality. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 707 - 722 (1980)
- Taub, F.B. & McKenzie, D.H.: Continuous culture of an alga and its grazer. Bull. Ecol. Res. Comm. 17, 371 - 377 (1973)
- Theilacker, G.H. & Mac Master, M.F.: Mass culture of the rotifer Brachionus plicatilis and its evaluation as a food for larval anchovies. Marine Biol. 10, 183 - 188 (1971)
- Trotta, P.: A simple and inexpensive system for continuous monoxenic culture of Brachionus plicatilis Müller as a basis for a mass production. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 307 - 313 (1980)
- Trussel, R.P.: The percent un-ionized Ammonia in aqueous ammonia solutions at different pH-levels and temperatures. In: J. Fish. Res. Board Canada 29, 1505 - 1507 (1972)
- Vasileva, G.L. & Blochina, N.P.: Berechnung der Produktion von Brachionus rubens mittels der Methode der direkten Statistik und der Methode von Edmondson (in russisch). Hidrobiologiceskij Zurnal Kiev 16, 35 - 40 (1980)
- Voigt, M. & Koste, W.: Rotatorien. Die Rädertiere Mitteleuropas, ein Bestimmungswerk begründet von Max Voigt. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart (1978)

Viviers, J.M.P., Briers, J.H. & van Vuuren, L.R.J.: Harvesting of algae grown on raw sewage. Proc. Symp. Aquaculture in Wastewater, Pretoria, SA (1980)

Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C., Fujita, S. & Yone, Y.: Relationship between the dietary value of rotifers Brachionus plicatilis and their content of 3 highly unsaturated fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45, 883 - 889 (1979)

Yufera, M. & Pascual, E.: Estudio del rendimiento de cultivos des rotifero Brachionus plicatilis Müller alimentados con levadura depaification. Inv. Pesq. 44, 361 - 368 (1980)

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. C.J. Soeder, der mir die Durchführung meiner Arbeit an seinem Institut ermöglichte, die notwendigen Apparaturen und Sachmittel zur Verfügung stellte, stets ein engagiertes Interesse am Fortgang der Arbeit zeigte und mir viele richtungsweisende Rat-schläge erteilte.

Herrn J. Groeneweg für die Beratung bei der Erarbeitung des Themas und beim Aufbau der Apparaturen, sowie die intensiven Diskussionen, die zur Lösung vieler unvorhergesehener Probleme führten,

Herrn Prof. Dr. H. Schuhmacher für die bereitwillige Übernahme der Vertretung der Arbeit an der Universität Essen,

Herrn U. Fingerhut für die gute Zusammenarbeit, insbesondere bei der Konstruktion der Versuchsanlagen,

Frau D. Leißner für die Durchführung der vielen chemischen Analysen,

der Infrastruktur des IBT, besonders der Werkstatt und dem stets ein-satzbereiten Fotolabor,

allen übrigen Mitarbeitern des IBT-3 für viele anregende Diskussionen und die freundliche Aufnahme im Institut,

Herrn Prof. Dr. U. Halbach (posthum) für die Begutachtung des Arbeits-planes für das Evangelische Studienwerk,

dem Evangelischen Studienwerk e.V. in Villigst für das mir gewährte Stipendium,

zuletzt, aber besonders herzlich Frau D. Schröder für die nervenauf-reibende Schreibarbeit am Alphi.

