



UFZ-Bericht

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 33/1999

Dissertation

**Einsatz der Respirometrie zur Erfassung
subletaler Chemikalieneffekte auf den
Energiehaushalt von *Daphnia magna***

Monika Knops

ISSN 0948-9452

**Einsatz der Respirometrie zur Erfassung subletaler
Chemikalieneffekte auf den Energiehaushalt von *Daphnia magna***

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin Monika Knops

aus Aachen

Berichter: Prof. Dr. I. Schuphan

Priv.-Doz. Dr. H. Segner

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 1999

“D 82 (Diss. RWTH Aachen)“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Respirometrie in der Ökotoxikologie.....	1
1.2 Energiebudget und Scope for Growth	2
1.3 Entwicklung der Fragestellungen	4
1.4 Auswahl der Methodik	6
1.5 Chemikalienauswahl.....	9
1.6 Zusammenfassung der Themen und Fragestellungen	10
2. Material & Methoden.....	11
2.1 Daphnienzucht.....	11
2.2 Toxizitätstestung.....	13
2.2.1 Standard-Testbedingungen	13
2.2.2 Akuter Toxizitätstest	14
2.2.3 Chronischer Reproduktionstest	15
2.3 Trockengewichtsbestimmung	15
2.4 Physiologische Messungen	16
2.4.1 Methoden zur Bestimmung von Sauerstoffverbrauch und Ingestion	16
2.4.1.1 Respirometrie	16
2.4.1.2 Bestimmung der Ingestion	17
2.4.2 Experimentelle Konzepte zur Bearbeitung der Fragestellungen	18
2.4.2.1 Respirometrie mit adulten Daphnien: Chemikalieneffekte in Abhängigkeit von der Expositionszeit.....	18
2.4.2.2 Respirometrie mit adoleszenten Daphnien/Primiparae: Veränderungen im SFG unter chronischer Chemikalienexposition	20
2.5 Experimente zur Etablierung einer Datenkorrektur für Photosyntheseeffekte	22
2.5.1 Algenphotosynthese in Abhängigkeit von der Zelldichte und der Chemikalienkonzentration	22
2.5.2 Respirometerexperimente mit Daphnienkohorten in Gegenwart des Photosyntheseinhibitors Atrazin.....	22

3. Respirometrie bei <i>Daphnia magna</i>: Methodik, biologische Variabilität und Reaktionen auf veränderte Umweltbedingungen	23
3.1 Einführung	23
3.2 Ergebnisse.....	25
3.2.1 Varianz und Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse für Sauerstoffverbrauch und Ingestion.....	25
3.2.2 Sauerstoffverbrauch von Daphnienkohorten in Abhängigkeit von der Futteralgedichte.....	28
3.2.3 Einfluß der Belichtung auf den Sauerstoffverbrauch von Daphnienkohorten	31
3.2.4 Experimente zur Etablierung einer Datenkorrektur für Photosyntheseeffekte	32
3.2.4.1 Photosyntheserate in Abhängigkeit von der Algedichte	32
3.2.4.2 Respirometrische Messungen in Anwesenheit eines Photosyntheseinhibitors.....	34
3.2.4.3 Einfluß der Chemikalien auf die Algenphotosynthese.....	40
3.3 Diskussion	40
4. Sauerstoffverbrauch und Ingestion bei <i>Daphnia magna</i> unter Chemikalienexposition: Subletale Effekte in Abhängigkeit von der Expositionsdauer	45
4.1 Einführung	45
4.2 Ergebnisse.....	46
4.2.1 Akute Daphnientoxizität der untersuchten Chemikalien	46
4.2.2 Chemikalieninduzierte Veränderungen im Sauerstoffverbrauch und in der Ingestion in Abhängigkeit von der Expositionszeit	50
4.2.2.1 CTAB	50
4.2.2.2 Kupfer	57
4.2.2.3 Cadmium	61
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	67
4.3 Diskussion	69

5. Veränderungen im Scope for Growth unter chronischer Chemikalienex- position: Ökotoxikologische Relevanz physiologischer Streßreaktionen	80
5.1 Einführung	80
5.2 Ergebnisse.....	81
5.2.1 Chemikalieneffekte auf das SFG.....	81
5.2.2 Wachstum und Reproduktion unter chronischer Chemikalienexposition	86
5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	90
5.3 Diskussion	91
6. Zusammenfassung	100
7. Ausblick.....	102
8. Literatur	103
9. Anhang	116

Abkürzungsverzeichnis

ADaM	Aachener Daphnienmedium
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTAC	Cetyltrimethylammoniumchlorid
DTDMAC	Ditallowdimethylammoniumchlorid
EC ₅₀	Effektkonzentration 50%
GSH	Glutathion
LAS	Lineares Alkylbenzolsulfonat
l_x	altersspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit
MG	Molekulargewicht
m_x	altersspezifische Anzahl an Neonaten pro überlebender Daphnie
$\sum m_x$	Summe der altersspezifischen Neonatenzahl pro überlebender Daphnie (ermittelt über 17 Tage)
QAC	Quaternäre Ammoniumverbindung
r	spezifische Zuwachsrage
RQ	Respiratorischer Quotient
SDA	'Specific Dynamic Action', die mit Nahrungsaufnahme assoziierte Zunahme der metabolischen Rate
SFG	'Scope for Growth', Differenz zwischen Energieaufnahme und -verlusten
TG	Trockengewicht

1. Einleitung

Für die Bewertung der Schädigungspotentiale von Chemikalien sowie zur Risikoabschätzung sind Kenntnisse bezüglich subletaler Effekte und chronischer Wirkungen, die sich nach längerer Exposition an subletale Konzentrationen manifestieren, von zentraler Bedeutung. Dies gilt insbesondere, da in natürlichen Systemen gegenwärtig in der Regel nur wenige Organismen akut letalen Konzentrationen von Umweltchemikalien ausgesetzt sind (Rand et al. 1995). Subletale Effekte äußern sich in einer Beeinträchtigung biochemischer und physiologischer Funktionen, in morphologischen Veränderungen und in Verhaltensänderungen (Sheehan et al. 1984). Diese Streßreaktionen spiegeln dabei nicht nur direkte pharmakologische Wirkungen von Stoffen (z.B. Entkopplung von Sauerstoffverbrauch und oxidativer Phosphorylierung, Atmungskettenhemmung, neurotoxische Wirkung) wider, sondern auch Prozesse, die auf eine Aufrechterhaltung der inneren Homöostase abzielen. Physiologisch-phänotypische Anpassungsprozesse führen beispielsweise durch eine Verminderung des bioverfügbaren Anteils der Chemikalie oder durch Kompensation von Zellschädigungen durch Reparaturmechanismen zu einer Erhöhung der Toleranz des Individuums (Segner und Braunbeck 1998). Da diese Mechanismen jedoch Energieressourcen erfordern, wird vermutet, daß Anpassungsreaktionen zur Verbesserung der Überlebensfähigkeit des Individuums möglicherweise auf Kosten anderer biologisch-physiologischer Prozesse erfolgen (Calow 1991). Aus ökotoxikologischer Sicht hängt die Relevanz einer Chemikalienwirkungen davon ab, ob direkt oder indirekt Schäden für die Natur entstehen (Streit 1991). Für eine Bewertung sind daher Kenntnisse über die Folgen subletaler Effekte auf (sub-)organismer Ebene für höhere organisatorische Ebenen (Organismus, Populationen) erforderlich. Es ist zu untersuchen, ob aus den zusätzlichen metabolischen Kosten negative Auswirkungen für das Individuum und den Bestand der Art resultieren.

1.1 Respirometrie in der Ökotoxikologie

Die Respirometrie liefert ein Verfahren, mit dem summarisch die metabolischen Kosten, die chemikalieninduzierte Veränderungen auf (sub-)organismer Ebene hervorrufen, und deren Folgen für den Energiehaushalt erfaßt werden können. Anhand der Bilanzierung von Energieaufnahme und -verbrauch des Organismus läßt sich der Netto-Energiegewinn quantifizieren und damit die Biomasseproduktion abschätzen. Der Netto-Energiegewinn (Produktion) stellt einen zentralen Parameter in Bezug auf die Hierarchie verschiedener biologisch-ökologischer Ebenen dar, der einerseits Veränderungen im Verhalten und im Bereich molekularer, biochemischer

und physiologischer Prozesse integriert, andererseits bestimmend ist für Wachstum, Entwicklung und Reproduktion von Organismen und damit zu Veränderungen auf Populationsebene überleitet (Sheehan et al. 1984, Forbes und Forbes 1994). Die Kalkulation der Produktionsrate in Form des energetischen Meßparameters liefert außerdem eine alternative Methode zur experimentellen Bestimmung von Längen- oder Gewichtszuwachs. Bei Muscheln wird die energetische Meßgröße bevorzugt, da eine direkte Bestimmung der Produktionsrate über die Messung von Gewichtsveränderungen bei Organismen mit Schalen und variablem Anteil an Seewasser nicht möglich ist. Eine Ermittlung der Schalenlänge reicht dagegen nicht aus, da Schalenwachstum und Gewebewachstum unabhängig erfolgen (Hilbish 1986).

1.2 Energiebudget und Scope for Growth

Heterotrophe Organismen nehmen Energie in Form von organischer Substanz auf (Assimilation). Die energiereichen Verbindungen werden teilweise in Körpersubstanz eingebaut, teilweise im Stoffwechsel verbrannt. Abb. 1 gibt schematisch den Energiefluß im Organismus wieder.

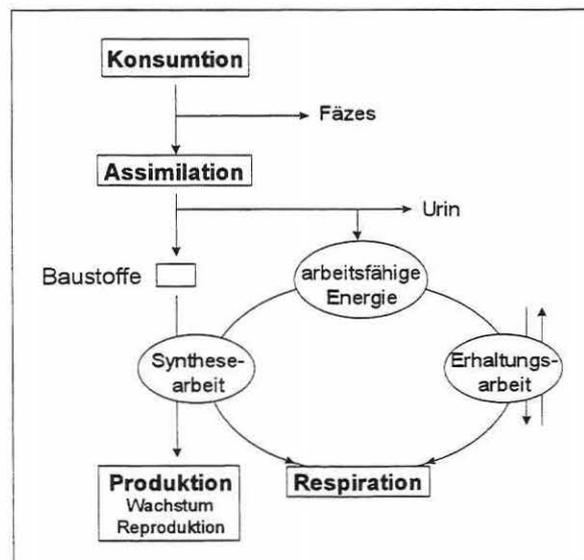


Abb. 1: Energiefluß im Organismus (in Anlehnung an Wieser 1986). Erläuterungen siehe Text.

Die über die Nahrung aufgenommene Energiemenge (Konsumtion) abzüglich des Energiegehalts der nicht verwertbaren Bestandteile (Fäzes) entspricht der über die Darmwand resorbierten Energie (Assimilation). Die über den Urin abgegebene Exkretionsenergie wird bei ökologischen Betrachtungen in der Regel vernachlässigt und ist bei ammoniotelen Organismen auch vergleichsweise gering. Der assimilierte Anteil wird zur Deckung des für die Erhaltung des Organismus benötigten Energiebedarfs (Erhaltungsarbeit) verwendet und liefert Bausteine und Energie (Synthesearbeit) für den Aufbau organischer Substanz (Produktion). Als Erhaltungsarbeit definiert Wieser (1986) die gesamte 'normale' Alltagsaktivität mit Ausnahme des Energieaufwands für Produktionsprozesse. Die Produktion entspricht dem Netozuwachs an Biomasse. Auch in nicht wachsenden Organismen wird ständig Biomasse auf- und abgebaut.

Die Beziehung zwischen Energieaufnahme und Energieverlusten kann nach Umrechnung der einzelnen Posten auf eine gemeinsame Einheit (Joule, Kohlenstoff, Stickstoff) quantitativ dargestellt werden. In der Regel handelt es sich dabei um zeitbezogene Energieumsätze. Der in Abb. 1 schematisch dargestellte Energiefluß läßt sich vereinfacht durch folgende Bilanzgleichung beschreiben:

$$C = P + R + U + F \quad (1)$$

C: Konsumtion, P: Produktion, R: Respiration, U: Exkretion (Urin), F: Fäzes

Die Bestimmung der Energieverluste erfolgt bei aktiven Tieren in der Regel indirekt über Sauerstoffverbrauchsmessungen; direktkalorimetrische Methoden kommen weniger zum Einsatz. Voraussetzung für die Anwendbarkeit der indirekten Kalorimetrie ist ein rein aerober Stoffwechsel. Die Gesamtstoffwechselverluste repräsentieren eine summarische Größe verschiedener individueller Komponenten: Grundumsatz, Temperaturregulation, Lokomotion und mechanische Arbeit sowie kalorogene Wirkung der Nahrung. Die stoffwechselsteigernde Wirkung von Nahrung wurde bereits vor mehr als 200 Jahren von Lavoisier beobachtet. Rubner (1902) führte hierfür den Begriff der 'spezifisch-dynamischen Wirkung' ein. Das Attribut 'spezifisch' zielt auf die Abhängigkeit der Höhe der Wärmeverluste von der Zusammensetzung der Nahrung (Wieser 1986).

Wie aus dem Schema (Abb. 1) ersichtlich wird, sind Respiration und Produktion über den Term Synthesearbeit vernetzt. So benötigt beispielsweise die Synthese von Gewebe mit einem Energiegehalt von 100 kJ ca. 120-130 kJ, wovon 20-30 kJ als Wärme verloren gehen (Parry 1983). In vielen bioenergetischen Untersuchungen wird die Synthesearbeit in die 'Specific Dynamic Action' (SDA), die mit Nahrungsaufnahme assoziierte Zunahme der metabolischen Rate, mit einbezogen (Widdows und Hawkins 1989). Nach Kalkulationen von Kiørboe et al. (1985) repräsentiert die

SDA bei Copepoden in erster Linie die Kosten für Wachstum (Biosynthese und Transport). Nach Definition von Widdows und Hawkins (1989), auf die in dieser Arbeit Bezug genommen wird, umfaßt die SDA:

- (1) energetische Kosten für Nahrungserwerb und Darmpassage
- (2) energetische Kosten für Verdauung und Assimilation
- (3) energetische Kosten für Biosynthese

Auch bei Daphnien wird eine Steigerung der Respirationsrate bei zunehmender Nahrungskonzentration durch viele Untersuchungen belegt (Lampert und Bohrer 1984, Philippova und Postnov 1988, Lampert 1986, Bohrer und Lampert 1988, Barber et al. 1994). Nach Lampert (1986) und Bohrer und Lampert (1988) steht die Respiration in funktionalem Zusammenhang zur Assimilation; ab einem Schwellenwert im Hinblick auf die verfügbare Nahrungskonzentration (incipient limiting level 'ILL') wird ein Plateau der metabolischen Rate erreicht. Kersting und van der Leeuw-Leegwater (1976) beobachteten dagegen eine Abnahme der Respirationsrate bei hohen Algenkonzentrationen.

Die für Wachstum und Reproduktion verfügbare Energie, von Warren und Davis (1967) als Scope for Growth (SFG) definiert, ergibt sich aus der Differenz zwischen Energieaufnahme und Gesamt-Energieverlusten. Unter Vernachlässigung der Exkretion (U) läßt sich Gl. 1 wie folgt umformen:

$$\text{SFG} = (C - F) - R = A - R \quad (2)$$

SFG : Scope for Growth (entspricht der Produktion 'P' in Gl. 1)

C: Konsumtion, R: Respiration, F: Fäzes, A: Assimilation

Chemikalieneffekte auf (sub-)organismischer Ebene, die sich in einer Beeinträchtigung der Größen 'A' (Assimilation) beziehungsweise 'R' (Respiration) auf organischer Ebene manifestieren, wirken sich, sofern die Veränderungen sich nicht quantitativ kompensieren, auf die energetische Meßgröße SFG aus.

1.3 Entwicklung der Fragestellungen

Die Bedeutung des SFG als Indikator für Streß wird durch Untersuchungen wie etwa von Gilfillan und Vandermeulen (1978) und Widdows und Johnson (1988) hervorgehoben. Die physiologische Energetik erwies sich in Experimenten mit *Mytilus* als sensitiver Effektparameter für verschiedene Umweltchemikalien (Widdows und Donkin 1991). Streßantworten von Organismen sind komplexe und dynamische Re-

aktionen (Koehn und Bayne 1989). Die ökologische Relevanz physiologischer Effekte hängt letztlich davon ab, ob Schäden für Individuen oder Populationen mit diesen Streßantworten assoziiert sind (Bayne 1980). Wie Bayne et al. (1987) zeigten, tritt eine Reduktion des SFG bei *Mytilus* als Reaktion auf eine Veränderung der Nahrungsqualität nur in einer frühen Phase nach Nahrungsumstellung deutlich in Erscheinung. Die Dynamik in Bezug auf die Ausprägung physiologischer Effekte und der Einfluß der Expositionsdauer stellen bei der Beurteilung einen wichtigen Aspekt dar, da akute Veränderungen und chronische Effekte sich möglicherweise deutlich unterscheiden.

In der Ökotoxikologie wird die chronische Toxizität von Chemikalien auf Daphnien in der Regel anhand der Effekte auf die Reproduktionsrate im Rahmen eines standardisierten 21 d-Test ermittelt. McCauley et al. (1990b) und Ebert (1992) postulieren eine von Umwelteinflüssen unabhängige Mindestkörperlänge, ab der erstmals die Oogenese initiiert wird. Die Produktion von Brut, von der Oogenese bis zur Neontenfreisetzung, umfaßt bei Daphnien drei Häutungszyklen (Zaffagnini 1987), von Bradley et al. (1990) als IM1 - IM3 bezeichnet. Die Zeitspanne, die zum Erreichen der für das Stadium IM1 erforderlichen Mindestlänge benötigt wird, hängt von der Wachstumsrate und der Länge der Neonaten ab (Ebert 1994). Lampert und Trubetskova (1996) und Hanazato (1998) propagieren daher zur Abschätzung chronischer Effekte die Bestimmung der Wachstumsrate von Juvenilen als Alternative zu Reproduktionstests. Zahlreiche Untersuchungen an Daphnien belegen, daß die Dauer der Juvenilentwicklung und die Größe bei Erreichen der Reife durch die Umweltbedingungen beeinflusst werden (McCauley et al. 1990a, Vigano 1993, Porter et al. 1983, Taylor und Gabriel 1985, Hanazato und Dodson 1995, Hanazato 1996). In der Regel existiert, zumindest bis zum Erreichen eines gewissen Alters, eine positive Korrelation zwischen Brutgröße und Körpergröße der Adulten (Green 1954, Green 1956, Lynch et al. 1986, Lampert 1993). Die Bestimmung des SFG von Daphnien alternativ zur Messung von Längen- oder Gewichtszuwachs stellt einen methodischen Ansatz dar, eine direkte Verbindung zwischen Chemikalieneffekten auf physiologischer Ebene einerseits und Wachstum und Reproduktion andererseits herzustellen. Weiterhin lassen sich so möglicherweise Aussagen treffen, ob die Reduktion in der Nettoproduktion primär auf eine verminderte Energieaufnahme ('supply side' effects; Baird et al. 1990) oder auf einen erhöhten Energieverbrauch ('demand side' effects, Baird et al. 1990) zurückzuführen ist.

Unter der Voraussetzung, daß Korrelationen zwischen der energetischen Meßgröße und populationsdynamisch relevanten Parametern ableitbar sind, liefert das SFG-Modell einen experimentellen Ansatz, der die Vorteile von Kurzzeitmessungen auf niedrigerer biologischer Ebene, wie beispielsweise höhere Sensitivität und bessere

Reproduzierbarkeit, mit den Vorteilen einer Testung auf höherer organisatorischer Ebene, insbesondere eine höhere ökologische Relevanz, verbindet. Wie Calow und Sibly (1990) anhand eines theoretischen Modells demonstrieren, sind jedoch Kenntnisse über die funktionalen Zusammenhänge zwischen physiologischen Parametern und Lebensdaten, beispielsweise die Bedeutung von Stoffwechseleränderungen für die Überlebensfähigkeit des Individuums, eine wesentliche Voraussetzung für die Prognostizierbarkeit von Stressauswirkungen auf Populationsebene. In der Praxis sind solche 'trade-offs' jedoch schwer meßbar, was die Überprüfbarkeit des Modells erschwert (van Straalen und Kammenga 1998). DeCoen (1998) beobachtete chemikalienspezifische Beeinflussungen der Ressourcenaufteilung zwischen Wachstum und Reproduktion und betont, daß pharmakologische Aspekte in physiologisch-energetischen Modellen zu berücksichtigen sind. Zudem wird auch von individueller Variabilität bezüglich der altersspezifischen Energieverteilung zwischen Wachstum und Reproduktion unter gleichen Umweltbedingungen berichtet (Enserink et al. 1995).

Für die Diskussion chemikalieninduzierter Veränderungen der energetischen Meßgröße SFG sind daher parallel Auswirkungen der Exposition auf die Lebensdaten der Organismen zu untersuchen. Die spezifische Zuwachsrate r ist nach Simulationsstudien von Ratte (1996) vermutlich der sensitivste Endpunkt für toxische Effekte im Reproduktionstest unter der Voraussetzung einer täglichen Datenerhebung. Nach Untersuchungen von van Leeuwen et al. (1985) liefern dabei auch verkürzte Versuchszeiträume relativ zum 21 d-Intervall des standardisierten chronischen Tests akzeptable Kalkulationen für r , da die Dauer der Juvenilperiode sowie die Größe der ersten Bruten von entscheidender Bedeutung sind. Die vergleichende Kalkulation der demographischen Größe r als Index für Populationswachstum unter unlimitierten Umweltbedingungen (Odum 1983) liefert weiterhin auch eine Basis für eine Diskussion der ökologischen Relevanz physiologischer Effekte im Hinblick auf mögliche Konsequenzen für die supraorganismische Ebene.

1.4 Auswahl der Methodik

Als Testorganismus wurde die Cladocere *Daphnia magna* (Crustacea) eingesetzt, ein wichtiger Stellvertreter im Bereich der ökotoxikologischen Testung. Standardisierte akute und chronische Daphnientests (OECD Guideline 202, Deutsche Norm DIN 38 412) werden nach dem Deutschen Chemikaliengesetz zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Chemikalien durchgeführt (Rudolph und Boje 1986). Neben der Bedeutung für die Ökotoxikologie war ein weiteres Kriterium für die Wahl des Testorganismus die relativ kurze Generationszeit, die die Abschätzung demographischer Größen vereinfacht. Zudem nehmen Cladoceren eine wichtige Position

innerhalb der Primärkonsumenten vieler aquatischer Ökosysteme ein und tragen zum biogenen Stoffumsatz in Gewässern bei.

Energiebilanzierungen werden seit vielen Jahren im Rahmen ökologischer Untersuchungen an Daphnien vorgenommen, um den Einfluß verschiedener Umweltfaktoren (Nahrungsqualität und -quantität, Temperatur, Tierdichte) auf Wachstumseffizienz und Produktionsraten zu erfassen (Richman 1958, Schindler 1968, Threlkeld 1976, Lampert 1977c). Der energetische Ansatz ermöglicht es, experimentelle Zeiträume zu verkürzen, indem Produktionsraten auf der Basis gewichtsspezifischer Assimilations- und Respirationsraten in Modellen kalkuliert werden anstelle einer empirischen Bestimmung in Langzeitversuchen. Kürzere Versuchszeiträume erleichtern die Konstanthaltung von Umweltfaktoren, wie beispielsweise der Nahrungskonzentration (Lampert 1977c).

Einen Überblick über Methoden, die bei der Bestimmung physiologisch-energetischer Parameter bei Zooplankton zur Anwendung kommen, liefern Peters (1984) für die Bestimmung von Ingestion-, Filtrations- und Assimilationsraten und Lampert (1984) für die Ermittlung von Respirationsraten. Die Abschätzung der Assimilation kann generell indirekt auf Basis der Messung von Ingestions- und Defäkationsraten oder direkt durch Verwendung von Tracern erfolgen. Da bei Cladoceren eine quantitative Erfassung der Fäzes nicht möglich ist, wird hier meist die Absorption von Isotopen durch Organismen unter Verwendung ^{14}C -markierter Algen (Lampert 1977a, 1977b) gemessen. Bei Daphnien werden zur Bestimmung der Atmungsrate meist geschlossene Systeme verwendet (z.B. Glazier 1991, Schindler 1968, Richman 1958, Lampert und Bohrer 1984, Barber et al. 1990, Evers und Kooijman 1989, Stibor und Macháček 1998). Nachteile dieser Systeme sind unter anderem, daß die Nahrungskonzentration nicht konstant gehalten werden kann, eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten stattfindet und die Organismen zu Beginn der Messung oft erhöhte Respirationsraten als Folge der Manipulation aufweisen (Lampert 1984). Bei Systemen mit der Möglichkeit einer kontinuierlichen Datenaufzeichnung kann eine Überschätzung der Atmungsraten durch die Berücksichtigung einer entsprechenden Akklimatisierungsperiode vermieden werden (Porter 1982). Ein offenes Durchflusssystem für die Bestimmung der Respiration wurde beispielsweise von Lampert (1986) eingesetzt.

Lampert (1977c) ermittelte nach dem Anabolismus-Katabolismus-Konzept von van Bertalanffy (1964) Produktionsraten für *Daphnia pulex* auf der Basis längenspezifischer Funktionen für Assimilation und Respiration. Die anhand eines mathematischen Modells konstruierten kumulativen Produktionskurven standen in guter Übereinstimmung zu empirisch bestimmten Kurven, obwohl kalkulierte und empirisch erhobene Produktionsraten über weite Größenbereiche voneinander abwichen. Pro-

bleme ergeben sich, wenn zur Aufstellung der Funktionen Daten unterschiedlicher Quellen gepoolt werden, die bezüglich der verwendeten Spezies und der experimentellen Methoden variieren (Lynch et al. 1986). Lynch et al. (1986) verglichen empirisch ermittelte und anhand physiologischer Parameter kalkulierte Produktionsraten für vier Daphnienarten und beobachteten eine deutliche Überschätzung der realen Netto-Kohlenstoffaufnahme bei adulten Tieren, da die bilanzierte Größe im Gegensatz zur gewichtsspezifischen Produktionsrate nach Erreichen der Reife kein Plateau erreichte. Einige experimentelle Artefakte, die zu Fehlern bei der Extrapolation führen können, werden von den Autoren diskutiert. Hierzu gehören methodische Aspekte in Zusammenhang mit der Tracer-Technik, speziell Inhomogenitäten bei der Markierung der Futteralgen, Einflüsse der Geometrie der Meßkammern und Probleme, die aus der Dauer der Meßintervalle resultieren, welche in der Regel nur wenige Stunden umfassen. Die in statischen Systemen übliche Dezimierung der Algendichte als Folge der Freßaktivität der Tiere ist in diesen Zeiträumen oft nicht relevant und tageszeitliche Aktivitätsunterschiede der Organismen bleiben unberücksichtigt. Nach Untersuchungen von Haney und Hall (1975) ist unter Freilandbedingungen die von der Tagesfiltrierkurve errechnete Freßrate von Daphnien viermal höher als der von der Tagesrate abgeleitete Wert. Auch Starkweather (1983) demonstriert tageszeitabhängige Variationen bezüglich der Steigungen der Regressionsgeraden zur Beschreibung der längenspezifischen Ingestion.

Auf der Basis der oben dargestellten Diskussion wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein methodischer Ansatz gewählt, der tageszeitabhängige Aktivitätsunterschiede der Organismen integrierte und eine gleichzeitige Erfassung der Parameter Energieaufnahme und Energieverbrauch ermöglichte. Für die Experimente wurde ein geschlossenes Respirometer verwendet, bei dem die Organismen in Kontakt zu einem definierten Gasvolumen stehen, dessen Sauerstoffanteil kontinuierlich mit Hilfe einer Bleioxidationsmeßzelle direkt gemessen werden kann. Die Energieaufnahme wurde anhand der Algenbiovolumenverluste abgeschätzt, da die Anwendung der Tracer-Technik bei längeren Meßzeiträumen problematisch ist (Peters 1984) und auch mit der Respirometrie nicht zu kombinieren ist.

Ein wesentlicher Vorteil dieses experimentellen Ansatzes besteht darin, daß auch chemikalieninduzierte Veränderungen im Verhalten bis zu einem gewissen Grad berücksichtigt werden. Wenn tageszeitabhängige Aktivitätsunterschiede auftreten, ist der Gesamtenergieverbrauch nicht nur von der Intensität der Aktivität, sondern auch von der Länge der aktiven Phasen abhängig. So belegen beispielsweise Untersuchungen an verschiedenen Organismen, daß unter Chemikalienexposition die Zeit, in der die Tiere aktiv sind, abnimmt (Wicklum und Davies 1996, Gerhardt 1996). Da dieser Respirometertyp bei Daphnien beziehungsweise für ökotoxikologische Fragestellungen bisher, soweit bekannt, nicht eingesetzt wurde, bestand ein erster Ar-

beitsschritt in der Methodenentwicklung und der Untersuchung der Leistungsfähigkeit des Systems.

1.5 Chemikalienauswahl

Als Modellsubstanzen wurden die beiden Schwermetalle Cadmium und Kupfer in Form ihrer Salze Cadmiumchlorid Monohydrat und Kupfersulfat Pentahydrat sowie das kationische Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) verwendet. Aufgrund ihres verbreiteten Einsatzes und des diffusen oder gezielten Eintrages in die Umwelt bergen die ausgewählten Umweltchemikalien Gefährdungspotentiale für aquatische Systeme.

Für die Chemikaliestestungen wurden drei elektropositive Stoffe ausgewählt, da nach Untersuchungen von Allen et al. (1995) die Ingestion als ein zentrales Element des Energiebudgets einen sensitiven Endpunkt für kationische Umweltchemikalien darstellt. Den Chemikalien werden ferner, wie in den folgenden Abschnitten dargelegt, membranschädigende beziehungsweise zytotoxische Wirkungen zugeschrieben, so daß Störungen im Gastransfer aufgrund von Beeinträchtigungen der Kiemenfunktion nicht auszuschließen sind. Aufgrund dieser Wirkungen sind Einflüsse auf den Energiehaushalt unter subletaler Chemikalienexposition zu erwarten. Andererseits ist zu vermuten, daß die Relevanz akut-subletaler Veränderungen für die chronischen Endpunkte Wachstum und Reproduktion in Anbetracht der substanzspezifischen Unterschiede im chronischen Schädigungspotential variiert.

Cadmium ist ein biologisch nicht-essentielles Metall, das aufgrund der toxikokinetischen Eigenschaften zu den Kumulationsgiften zählt (biologische Halbwertszeit 10-30 Jahre) (Schäfer et al. 1994, Friberg et al. 1986). Nach pharmakologischen Untersuchungen erfolgt die Aufnahme in den Organismus möglicherweise über Transportwege von Calcium und Eisen. Im Körper bindet Cd^{2+} insbesondere an Sulfhydryl-Gruppen des Metallothioneins oder Albumins und kann in höheren Dosen durch Denaturierung von Proteinen zur Schädigung von Grenzflächenfunktionen z. B. im Bereich der Lungen führen (Schäfer et al. 1994). Einige Wirkungen des Schwermetalls sind auf Interaktionen mit dem Calcium-Metabolismus zurückzuführen (Friberg et al. 1986, EHC 1992).

Kupfer gehört als Bestandteil vieler Metallo-Enzyme (Cytochrom-Oxidase, Superoxid-Dismutase, Hämocyanine, Plastocyanine) zu den biologisch-essentiellen Metallen. Pharmakologisch unterscheidet es sich von Cadmium weiterhin durch die wesentlich geringere biologische Halbwertszeit (ca. 4 Wochen) (Schäfer et al. 1994, Aaseth und Norseth 1986). Kupfersulfat wird als Fungizid, Herbizid, Algizid, Molluskizid und Bakterizid verwendet. Kupferionen sind zytotoxisch (Schäfer et al. 1994).

Cu^{2+} katalysiert die Oxidation von Glutathion und hat inhibierende Wirkung auf die GSH-Reduktase und unterbindet damit den zellulären Schutz gegenüber freien Sauerstoffradikalen (Christie und Costa 1984). Wie für Cadmium werden auch hier Schädigungen der Zellmembran beschrieben (Fingerman et al. 1996).

CTAB ist als eine quaternäre Ammoniumverbindung der Gruppe der kationischen Tenside zuzuordnen. Tenside sind amphiphile Substanzen, die sich aufgrund ihrer asymmetrischen Molekülstruktur, bestehend aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Element, bevorzugt in Grenzflächen anreichern und dabei die Oberflächenspannung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen herabsetzen. Sie werden beispielsweise in Weichspülern, Bioziden, Desinfektionsmitteln und Haarpflegeprodukten verwendet (Cooper 1988). Die bakterizide Wirkung von Detergenzien beruht auf der Zerstörung der Semipermeabilität der Cytoplasmamembran. Die amphiphilen Substanzen reichern sich in der ebenfalls polar strukturierten Lipoprotein-Membran an und machen sie funktionsuntüchtig (Schlegel 1992). Physikalisch-chemisch zeichnen sich kationische Tenside durch ihre starke Adsorption an Sedimente und andere Materialien sowie durch ihre Komplexbildung mit anionischen Substanzen aus (Boethling und Lynch 1992), was vermutlich die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen in natürlichen Systemen vermindert (Lewis und Wee 1983, Pittinger et al. 1989).

1.6 Zusammenfassung der Themen und Fragestellungen

Entwicklung einer Methodik zur Bestimmung von Veränderungen im Energiehaushalt von Daphnien; mit diesem Verfahren wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- (1) Welche Auswirkung hat die Exposition an subletale Chemikalienkonzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch und die Ingestion bei Daphnien?
- (2) Welche Veränderungen sind bezüglich der Effektausprägung mit fortschreitender Expositionszeit zu beobachten?
- (3) Sind spezifische Reaktionsmuster in Abhängigkeit von der Wirkung der untersuchten Substanzen festzustellen?
- (4) Mit welcher Sensitivität zeigt das SFG chronischen Chemikalienstreß an?
- (5) Korrelieren Effekte auf das SFG mit chemikalieninduzierten Veränderungen im Wachstum der Organismen und lassen sich Veränderungen im Wachstum auf einen erhöhten Energieverbrauch und / oder auf eine Reduktion der Energieaufnahme zurückführen?
- (6) Welcher Zusammenhang besteht zwischen energetischen Veränderungen und chronischen Chemikalieneffekten auf die Reproduktion und die spezifische Zuwachsrate r ?

2. Material & Methoden

2.1 Daphnienzucht

Als Testorganismus wurde die Cladocere *Daphnia magna* verwendet. Zum Aufbau der Kultur wurden Tiere aus der Daphnienzucht der Technischen Hochschule Aachen bezogen. Die Kultivierung wie auch die Testdurchführung erfolgte in einer Klimakammer (Bio-Line Pflanzenwuchsschrank HB0714 mit Bestrahlungsmodul 1; Heraeus - Vötsch, Balingen, D.) bei 20 °C und einem Licht : Dunkelwechsel von 16 h : 8 h. Für die Photoperiode wurde eine Beleuchtungsstärke von 15% vorprogrammiert (Leuchtstoffröhren Osram L30W/77 Fluora; Osram, Berlin, D.), was einer Lichtintensität von etwa 3 Wm^{-2} ($2,6\text{-}4 \text{ Wm}^{-2}$) an der Oberfläche der Kulturgefäße entsprach. Die Organismen wurden einzeln in Weithalsflaschen (80 ml Wasservolumen) gehältert. Das Kulturmedium wurde einmal wöchentlich erneuert, dabei wurden die Jungtiere entfernt. Daphnien, die älter als 5 Wochen waren, wurden durch Jungtiere ersetzt.

Die Hälterung und Testdurchführung erfolgte in 'Aachener Daphnienmedium' (ADaM) nach Klüttgen et al. (1994), welches in der Gesamthärte (2,5 mmol/L; Ca:Mg-Verhältnis 4:1) dem DIN-Medium (1982) angeglichen ist.

Tab. 1: Aachener Daphnienmedium (ADaM)

Stammlösung	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Medium
synthetisches Meersalz*		0,333 g/L
CaCl ₂ - Lösung	0,4 mol/L (58,8 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O / L)	1,84 mmol/L** (4,6 mL Stammlsg./L)
NaHCO ₃ - Lösung	0,3 mol/L (25,2 g NaHCO ₃ / L)	0,66 mmol/L** (2,2 mL Stammlsg./L)
SeO ₂ - Lösung	0,13 mmol/L (14,4 mg SeO ₂ / L)	0,013 µmol/L** (0,1 mL Stammlsg./L)

* Wimex hw Meersalz + Bioelemente; Wiegandt, GmbH & Co KG, Krefeld

** ohne Berücksichtigung der im Meersalz enthaltenen Mengen

Das Zuchtwasser wurde, wie in Tab. 1 angegeben, unter Verwendung von bi-destilliertem Wasser (Destamat Bi18E, Heraeus, Kleinostheim, D.) hergestellt und bis zur Sauerstoffsättigung mit sterilfiltrierter, wasserdampfgesättigter Preßluft belüftet. Der pH-Wert des belüfteten Mediums lag bei $7,8 \pm 0,2$ und wurde nicht nachreguliert.

Als Futteralge wurde die einzellige Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* Shih. et Krauss (früher *Chlorella fusca* var. *vacuolata*), Stamm 211/15 der Algensammlung Pringsheim (Göttingen, D), verwendet.

Die Anzucht der Algen erfolgte photoautotroph bei $28 \pm 0,5$ °C in sterilfiltriertem Nährmedium nach Grimme und Boardman (1972), modifiziert nach Faust et al. (1992), in zylindrischen Kulturgefäßen mit konischen Böden (Fassungsvermögen 550 mL). Die Kulturen wurden mit sterilfiltrierter, wasserdampfgesättigter Luft, angereichert mit 1,5-2 Vol.% Kohlendioxid, über Glaskapillaren begast. Auf diese Weise wurde die CO₂-Versorgung gewährleistet und eine Sedimentation der Algen verhindert. Durch eine Kombination von Leuchtstoffröhren der Typen Osram L36W/41 Interna und Osram L36W/11 Daylight (Osram, Berlin, D.) wurde eine Lichtintensität von 13-18 Wm⁻² (22-33 klux) und eine Photonenflußdichte von 370 µEm⁻²s⁻¹ an der Oberfläche der Kulturgefäße erzielt.

Die Algenkulturen wurden durch einen Licht : Dunkelwechsel von 14 h : 10 h und durch Verdünnung auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen zu Beginn der Lichtperiode synchronisiert. Als Daphnienfutter wurden die nach einem Generationszyklus von 24 h freigesetzten Autosporen verwendet. Zur Überprüfung der Synchronität wurde die Kultur regelmäßig mit Hilfe eines CASY 1-Cell Counter and Analyser System Model TTC (Schärfe System, Reutlingen, D.) hinsichtlich der Homogenität der Zellvolumenverteilung analysiert. Durch Widerstandsmessung kombiniert mit Pulsflächenanalyse wurde eine durchmesserlineare Größenverteilung mit einer Auflösung von 1024 Kanälen berechnet, auf deren Basis alle weiteren Meßparameter ermittelt wurden. Der Durchmesser der verwendeten Kapillare betrug 60 µm. Die Algensuspension wurde bis zur Verfütterung maximal 1 Woche bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung des Futteralgenkonzentrats wurden die Algen abzentrifugiert (5 min bei 2500 g) und in ADaM resuspendiert. Die Quantifizierung der Futtermenge erfolgte anhand des Gesamt-Algenbiovolumens im Konzentrat. Dieses Verfahren ermöglichte auch bei vorübergehenden Störungen der Synchronität der Algenkultur die Einhaltung konstanterer Nahrungsbedingungen als es auf Basis der Zellzahl möglich gewesen wäre. Zellzahl, Zellvolumenverteilung und Gesamtbiovolume wurden mit Hilfe des CASY 1-Cell Counter and Analyser Systems ermittelt. Für die Messung wurde ein Aliquot des Futteralgenkonzentrats mit CASYTON-Elektrolytlösung

sung (Schärfe, Reutlingen, D.) verdünnt, so daß die Zellzahl in 200 µL unter 20 000 lag.

Die Tiere wurden nach dem in Tab. 2 angegebenen Schema mit einer Kombination von Algen und Bierhefe (Sigma) gefüttert. Zur Herstellung der Hefesuspension wurden 100 mg der lyophilisierten Hefe in 100 mL bi-destilliertem Wasser 15 min mit Ultraschall behandelt.

Tab.2: Fütterungsschema für die Daphnienkultur

Altersstufe	Montag [fL]	Mittwoch [fL]	Freitag [fL]
1. Woche	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$ + 250 µL Hefe
2. Woche	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$ + 250 µL Hefe
3. - 5. Woche	$2,7 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$4,1 \times 10^9$ + 250 µL Hefe

2.2 Toxizitätstestung

2.2.1 Standard-Testbedingungen

Akute Toxizitätstests und chronische Reproduktionstests wurden, wie auch die Experimente zur Bestimmung der physiologischen Parameter Sauerstoffverbrauch und Ingestion, unter weitestgehend identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, galten die nachfolgend dargestellten Testkonditionen:

Als Testgefäße dienten Laborflaschen (Duran®) mit 500 mL Nennvolumen, die in leicht modifizierter Form auch als Respirometerkammern verwendbar waren. Das Flüssigkeitsvolumen wurde auf 540 mL erhöht, um den Gasraum im Gefäß für die Sauerstoffmessungen möglichst gering zu halten. Pro Gefäß wurden jeweils 10 Daphnien eingesetzt, die täglich mit 9×10^9 fL Algen gefüttert wurden. Die Tiere wurden bei 20 °C im Licht : Dunkelwechsel 16 h : 8 h gehalten. Während der Pho-

toperioden herrschte diffuses Licht von ca. $0,7 \text{ Wm}^{-2}$ ($0,64\text{-}0,74 \text{ Wm}^{-2}$) vor, um die Photosynthese der Algen zu limitieren.

Für die Testungen wurden von den Chemikalien konzentrierte geometrische Verdünnungsreihen in bi-destilliertem Wasser erstellt, von denen zur Herstellung der Testmedien jeweils ein Aliquot mit belüftetem ADaM auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt wurde. Diese Stammlösungen wurden bei Experimenten mit chronischer Exposition bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und dienten während der gesamten Testdauer bei jedem Wasserwechsel als Basis für die Bereitung der Testlösungen. Bei den angegebenen Konzentrationen handelte es sich immer um Nominalkonzentrationen, die nach dem Einwaageprotokoll zu erwarten waren.

Testsubstanzen:

a) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB); $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$, MG 364,46 g/mol

Reinheit > 99%; Merck, Darmstadt, D.

b) Kupfersulfat Pentahydrat; $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$; MG 249,68 g/mol

Reinheit > 99%; Merck, Darmstadt, D.

c) Cadmiumchlorid Monohydrat; $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$; MG 201,33 g/mol

Reinheit > 98%; Riedel-de-Haen, Seelze, D.

2.2.2 Akuter Toxizitätstest

Der subletale Konzentrationsbereich wurde über die Toxizität der drei Testchemikalien in akuten Tests festgelegt.

Versuchsorganismen waren Neonaten (< 48 h alt) und adulte Daphnien (12-14 d alt). Als Letalitätskriterium galt ein Zustand, bei dem die Daphnien auch nach leichtem Schwenken der Gefäße keine Bewegungen der Antennen bzw. Thorakopoden mehr zeigten. Die Versuche liefen nach den oben beschriebenen Standard-Testbedingungen (2.2.1); bei den Neonatentests wurde die Algenapplikation jedoch nur einmalig bei Versuchsbeginn vorgenommen. Die Testdauer betrug 72 h. Die Letalität wurde an fünf Zeitpunkten protokolliert; tote Tiere wurden täglich entfernt. Während des Versuches fand keine Erneuerung der Testlösungen statt.

Anhand der zeitabhängigen Effekte wurden EC_{50} für den Parameter Letalität über das DEBtox 'Survival Hazard'-Modell (Kooijman und Bedaux 1996) als Funktionen der Expositionszeit geschätzt. Außerdem wurden konzentrationsabhängige Kalkulationen der EC_{50} -Werte auf der Basis von Regressionsmodellfunktionen (Fig. P[®] for Windows[™], Biosoft, Cambridge) durchgeführt.

2.2.3 Chronischer Reproduktionstest

Die Exposition der Daphnien erfolgte gemäß den Standard-Testbedingungen (vgl. 2.2.1) über einen Zeitraum von 17 d. Jede Substanz wurde mit 7 Verdünnungsstufen ohne Replikate getestet. Eine Erneuerung der Testlösung fand dreimal wöchentlich statt. Tote Daphnien sowie freigesetzte Neonaten wurden täglich gezählt und aus den Testansätzen entfernt (mit Ausnahme des 16. Versuchstages). Am 8., 12., 14./15. sowie 17. Tag wurde die Carapaxlänge (Augenhügel bis Spinaansatz) der adulten Daphnien unter einem Stereomikroskop (Leica WILD MZ 8, Heerbrugg, Ch.) mit Hilfe eines Strichokulars und Objektmikrometers bestimmt.

Anhand der Daten zur Mortalität und Reproduktion wurde die Reproduktionsrate als kumulative Anzahl an Nachkommen pro überlebender Daphnie (Summe der altersspezifischen Neonatenzahl pro Daphnie ($\sum m_x$)) kalkuliert. Unter Berücksichtigung der altersspezifischen Überlebensrate wurde in Anlehnung an Carey (1993) die spezifische Zuwachsrate r geschätzt:

$$\sum l_x m_x e^{-r_m x} = 1$$

Alter der Tiere (x) und Überlebensrate (l_x) beziehen sich dabei immer auf die Mitte des Beobachtungsintervalls (Ratte 1996). Am Tag 1 (24 h nach Versuchsansatz) beträgt das Alter der Daphnien (0-24 h alt bei Versuchsbeginn), bezogen auf die Mitte des Beobachtungszeitraums, 1 Tag und die Überlebensrate entspricht dem Mittelwert aus der Anzahl der eingesetzten Organismen und der überlebenden Tiere am Tag 1.

2.3 Trockengewichtsbestimmung

Für die Trockengewichtsbestimmung wurden die Daphnien abgeseibt, vorsichtig mit bi-distilliertem Wasser gespült und mittels Pipette und etwas Flüssigkeit auf vorgewogene Aluschälchen überführt. Der Boden der Wägeschälchen war zuvor mit einer feinen Nadel durchstoßen worden, so daß das überschüssige Wasser mit Zellstoff abgesaugt werden konnte. Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte summarisch für die zehn Testorganismen eines Ansatzes. Die Proben wurden 6 h bei 60 °C getrocknet, anschließend 1 min im Exsikkator abgekühlt und auf einer Analysenwaage (Sartorius RC 210 P, Göttingen, D.) gewogen.

2.4 Physiologische Messungen

2.4.1 Methoden zur Bestimmung von Sauerstoffverbrauch und Ingestion

Die physiologischen Messungen erfolgten ebenfalls unter den in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Bedingungen. Die Daten wurden parallel an denselben Testorganismen erhoben. So waren für die integrative Betrachtung im Rahmen der Bilanzierungen identische Randbedingungen gewährleistet.

2.4.1.1 Respirometrie

Die Sauerstoffmessungen wurden mit einem automatisierten, geschlossenen O₂/CO₂ Respirometer (Micro-Oxymax, Columbus, Ohio), ausgestattet mit einer Bleioxidationsmeßzelle und einem Infrarotdetektor, durchgeführt. Das computergesteuerte Meßsystem erfaßte in regelmäßigen Abständen den Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt im Gasraum von maximal 10 Testkammern und errechnete daraus die Gasverbrauchs- beziehungsweise Produktionsraten. Die Werte wurden durch parallele Beprobung einer internen Referenzkammer automatisch hinsichtlich der Sensordrift korrigiert. Der Versuchszeitraum wurde auf maximal 4 d begrenzt, so daß nach den Ergebnissen von Vorversuchen in den Testlösungen eine Sauerstoffsättigung von mindestens 60% gewährleistet war, was einem Sauerstoffgehalt von etwa 5,3 mg/L bei 20 °C unter Normaldruck entsprach. Nach den Untersuchungen von Heisey und Porter (1977) bleibt die Sauerstoffverbrauchsrate von *Daphnia magna* bis zu einem Sauerstoffgehalt von etwa 3 mg/L weitestgehend konstant.

Bei den Testkammern handelte es sich um handelsübliche Laborflaschen, ausgestattet mit einem zusätzlichen Glasgewinde für Schraubverschlüsse mit Silikondichtung im Bereich des Flaschenhalses. Die Gefäße wurden mit langen Kanülen und Kunststoffdreiweghähnen versehen. So konnten während der Messungen Futteralgen appliziert werden, ohne die Dichtigkeit des Systems zu beeinträchtigen. Zur Verabreichung der täglichen Algenration wurde maximal 1% der Testlösung durch konzentrierte Algensuspension ersetzt, um die für die Messung notwendige Konstanthaltung der Volumina zu gewährleisten und die Verdünnung der Testlösung und damit die Veränderung der Chemikalienkonzentration zu minimieren.

2.4.1.2 Bestimmung der Ingestion

Die Algenaufnahme wurde aus der Differenz des während des Versuchszeitraums insgesamt applizierten Algenbiovolumens und des bei Versuchsende in den Gefäßen verbliebenen Biovolumens errechnet. Kinetiken bezüglich der Nahrungsaufnahme konnten nicht erfaßt werden, da sedimentierte Algen während der Respirometermessungen nicht resuspendiert werden konnten. Die Bestimmung der Biovolumina erfolgte mit dem oben beschriebenen Partikelzählgerät CASY 1. Da Daphnien nicht nur intakte Algen, sondern auch Algenfragmente und andere organische Partikel als Energiequelle nutzen, wurden der Berechnung alle vom Meßgerät auflösbaren Partikelgrößen (1,5-15 µm Durchmesser) zugrunde gelegt.

Da die Algenzellen den Darm unter Umständen mehrmals passieren bevor sie vollständig verdaut sind (Kersting und Holterman 1973, Kersting 1978) beziehungsweise der Durchmesser der Fragmente unterhalb der Auflösungsgrenze des Gerätes liegt, ist die errechnete Differenz, im Rahmen dieser Arbeit als Ingestion im Sinne von Freßaktivität bezeichnet, nicht mit der Konsumtion (vgl. Abb. 1) gleichzusetzen. Sie ist wie folgt zu definieren:

$$\text{Ingestion [fL]} = \text{Biovolumen}_{\text{appliziert}} - (\text{Biovolumen}_{\text{intakte Zellen}} + \text{Fäzes}_{\text{Durchmesser 1,5 - 2,5 µm}})$$

Die mit dieser Methode bestimmte Freßrate stellte eine Näherung an die Assimilationsrate dar, indirekt bestimmt als Differenz zwischen Konsumtion und Defäkation (vgl. Gl. 2), wobei jedoch Energieverluste in Form von gelöstem organischen Material und von partikulärer Substanz mit weniger als 1,5 µm Durchmesser unberücksichtigt blieben.

Zur Bestimmung der Partikelrückstände wurde bei Versuchsende nach Entfernen der Daphnien eine homogene Suspension der verbliebenen Algen und Fragmente hergestellt. Dazu wurden die sedimentierten Algen mit Hilfe eines Zellschabers von den Glaswänden gelöst und durch Rühren in der Testlösung verteilt. Da eine Bestimmung der Algendichte in den Testgefäßen während der laufenden Messung nicht möglich war, wurden zur Verifizierung des applizierten Algenvolumens entsprechende Aliquots der Futteralgensuspension mit Leitungswasser gemäß den Testkonditionen verdünnt und analysiert.

2.4.2 Experimentelle Konzepte zur Bearbeitung der Fragestellungen

Im Rahmen der Arbeit wurden, abhängig von der Fragestellung, zwei experimentelle Designs verwendet:

- (1) Respirometrie mit adulten Daphnien
- (2) Respirometrie mit adoleszenten Daphnien

Die Versuchsserien unterschieden sich jedoch nicht nur hinsichtlich des Entwicklungsstandes der Daphnien zum Zeitpunkt der Messung, sondern auch hinsichtlich Vorexpositionsbedingungen, Futterregime und Respirometereinstellungen.

2.4.2.1 Respirometrie mit adulten Daphnien: Chemikalieneffekte in Abhängigkeit von der Expositionszeit

Mit diesem Konzept wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- (1) Welche Auswirkung hat die Exposition an subletale Chemikalienkonzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch und die Ingestion?
- (2) Welche Veränderungen sind bezüglich der Effektausprägung mit fortschreitender Expositionszeit zu beobachten?
- (3) Sind spezifische Reaktionsmuster in Abhängigkeit von der Wirkung der untersuchten Substanzen nachzuweisen?

Die Experimente umfaßten einen Zeitraum von jeweils 16 d und wurden mit 225 Neonaten (< 48 h alt) gestartet. Die Bestimmung von Sauerstoffverbrauch und Algeningestion der Daphnien erfolgte während der letzten 72 h eines Versuches. Vor Meßbeginn wurden die Daphnien einen Tag an die Testbedingungen adaptiert. Der experimentelle Ablauf war durch die in Tab. 3 angegebenen Phasen charakterisiert.

Jede Chemikalie wurde in drei Verdünnungsstufen bei drei Expositionszeiten untersucht. Die Exposition von jeweils 25 Daphnien erfolgte ab Tag 0, ab Tag 9 und ab Tag 12. Bezugnehmend auf den Beginn des Meßzeitraums waren die Organismen demnach 1, 4 und 13 d vorexponiert. Während der Eingewöhnungsphase wurde zu jedem Ansatz für die Respirometrie ein Replikat mitgeführt. Am Anfang der Meßperiode wurde die Daphnienbiomasse dieser Replikate ermittelt. Die Daten für den Sauerstoffverbrauch und die Ingestion wurden jeweils summarisch für 10 adulte Daphnien einschließlich der während des Meßzeitraums freigesetzten Neonaten erhoben. Für die Respirometrie wurde ein Intervall von 2 h vorgegeben; die Auswertung erfolgte anhand des kumulativen Sauerstoffverbrauches innerhalb von 72 h. Als

Bezugsgrößen dienten das Trockengewicht der Testorganismen zu Beginn des Meßintervalls und der für den Meßzeitraum kalkulierte Biomassezuwachs.

Tab. 3: Experimenteller Ablauf bei Respirometerversuchen mit adulten Daphnien

Phase	Dauer [d]	Tierbesatz [Daphnien/Volumen/Gefäß]	Futterregime [fL x 10 ⁹ / Gefäß]
Anzucht	12	5 Daphnien / 80 mL	18 x 10 ⁹ fL insgesamt*
Eingewöhnungs- phase	1	10 Daphnien + freigesetzte Brut / 540 mL	9 x 10 ⁹ fL / d
Meßzeitraum	3	10 Daphnien + freigesetzte Brut / 540 mL	9 x 10 ⁹ fL / d

* Futterregime während der Anzucht (Algenbiovolumen / Gefäß):

Tag 0: 2,0 x 10⁹ fL

Tag 2: 3,0 x 10⁹ fL

Tag 5: 3,5 x 10⁹ fL (Wechsel der Testlösung)

Tag 7: 3,5 x 10⁹ fL

Tag 9: 6,0 x 10⁹ fL (Wechsel der Testlösung)

Die Bestimmung der Ingestion basierte auf den Algenbiovolumenverlusten während des Meßintervalls unter Vernachlässigung von Algenresten aus der Eingewöhnungsphase, da diese methodisch bedingt nicht erfaßt werden konnten. Bei Versuchsende wurde das Trockengewicht der adulten Tiere sowie die Anzahl der Neonaten und das Trockengewicht der Brut einschließlich der abgestoßenen Exuvien ermittelt. Da die Anzahl der Meßkanäle am Respirometer begrenzt war, mußten die Daten für jede Chemikalie in zwei hintereinandergeschalteten Versuchen erhoben werden. Um die Vergleichbarkeit zu überprüfen, wurden die Messungen an 1 d vorexponierten Daphnien in beiden Versuchsserien vorgenommen. Testansätze, in denen adulte Daphnien während des Meßzeitraums starben oder in größerem Maße letale Effekte bei der freigesetzten Brut zu beobachten waren, wurden nicht ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen.

2.4.2.2. Respirometrie mit adoleszenten Daphnien/Primiparae: Veränderungen im SFG unter chronischer Chemikalienexposition

Mit diesem Konzept wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- (1) Mit welcher Sensitivität zeigt das SFG chronischen Chemikalienstreß an?
- (2) Korrelieren Effekte auf das SFG mit chemikalieninduzierten Veränderungen im Wachstum der Organismen und lassen sich Veränderungen im Wachstum auf einen erhöhten Energieverbrauch und / oder auf eine Reduktion der Energieaufnahme zurückführen?
- (3) Welcher Zusammenhang besteht zwischen energetischen Veränderungen und chronischen Chemikalieneffekten auf die Reproduktion und die spezifische Zuwachsrate r ?

In Anlehnung an die Ergebnisse der chronischen Reproduktionstests wurden jeweils drei Konzentrationen im zu erwartenden Effektbereich ausgewählt. Die Dauer der Experimente betrug 8 d; die Versuche endeten kurz vor der Freisetzung der ersten Brut. 150 Neonaten (< 24 h) wurden auf sechs Kontrollansätze und Triplikate der drei Verdünnungsstufen verteilt, 5 d gemäß den Bedingungen im chronischen Test exponiert und anschließend in die Testkammern des Respirometers überführt. Die Daphnien wiesen zu diesem Zeitpunkt in der Regel ein verdunkeltes Ovar auf (adoleszente Daphnien, nach Ebert 1994); in wenigen Fällen war bereits die erste Brutdeposition erfolgt (Primiparae, nach Ebert 1994). Die Respirometrie wurde mit drei Kontrollansätzen und Duplikaten der drei Verdünnungsstufen durchgeführt. Die übrigen Daphnien wurden, soweit sie nicht als Ersatz für tote Organismen (letale Effekte während der ersten 5 Expositionstage) dienten, zunächst als Replikate weitergeführt. Am folgenden Versuchstag erfolgte eine Bestimmung der Daphnienbiomasse dieser Ansätze sowie eine Partikelanalyse der Testlösungen. Für die Sauerstoffmessungen wurde ein Intervall von 8 h vorgegeben; Sauerstoffverbrauch und Algeningestion der Daphnienkohorten wurden kumulativ über 65 h ermittelt. Die Eingewöhnungsphase entfiel bei diesen Experimenten. Für den Meßzeitraum wurde die tägliche Futterration auf $3,5 \times 10^9$ fL pro Testansatz gesenkt, um die Algenakkumulation in den Versuchsgefäßen herabzusetzen. Diese Futtermenge wurde für Daphnien dieser Altersklasse als ausreichend angesehen, da in Vortests bei einer Analyse der Testlösungen am Versuchsende noch Partikel mit dem Durchmesser intakter Algenzellen nachweisbar waren. Nach Beendigung des Meßzeitraums wurde summarisch das Trockengewicht der 10 Daphnien eines Testansatzes einschließlich der abgestoßenen Exuvien bestimmt.

Auf der Datenbasis dieser Experimente erfolgte die Kalkulation der Energiebilanzen zur Bestimmung des SFG (vgl. Gl. 2). Für die Berechnungen wurden die in den Einheiten 'µL' beziehungsweise 'fL' ermittelten Werte auf Kohlenstoff-Einheiten umgerechnet.

Für den Parameter 'Energieaufnahme' wurde zu diesem Zweck die Korrelation zwischen Gesamtalgenbiovolumen und TOC-Gehalt (Total Organic Carbon) für Autosporensuspension der verwendeten Algenspezies ermittelt. Die TOC -Bestimmung erfolgte als Direktbestimmung nach der Verbrennungsmethode mit einem Hochtemperatur-Analysator (Elementar High TOC). Anhand der Daten einer geometrischen Verdünnungsreihe wurde ein Umrechnungsfaktor geschätzt (vgl. Gl. 3), der die Grundlage für die Berechnungen der Kohlenstoffaufnahme in den Energiebilanzen auf Kohlenstoffbasis bildete (vgl. Gl. 2).

$$\text{TOC (Scenedesmus vacuolatus) } [\mu\text{g}] = 0,776 \times \text{Algenvolumen [fL} \times 10^7] \quad (3)$$

Die Kohlenstoffverluste wurden nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$C \text{ [mg]} = V_{\text{O}_2} \text{ [mL]} \times (V_m \text{ [mL/mmol]})^{-1} \times \text{MG}_C \text{ [mg/mmol]} \times \text{RQ} \quad (4)$$

V_{O_2} (Meßwert [µL]/1000)

V_m (molares Volumen): 22,4 L/mol

MG_C (Molekulargewicht Kohlenstoff): 12 g/mol

Unter der Annahme eines RQ von 1 ergibt sich die Gleichung:

$$C_{\text{veratmet}} \text{ [mg]} = O_{2 \text{ veratmet}} \text{ [mL]} \times 0,0446 \text{ [mmol/mL]} \times 12 \text{ [mg/mmol]} \quad (5)$$

Da Ingestion und Sauerstoffverbrauch für identische Proben ermittelt wurden, erfolgte für die SFG-Kalkulation keine Vereinheitlichung der Ergebnisse hinsichtlich des Trockengewichtes.

2.5 Experimente zur Etablierung einer Datenkorrektur für Photosyntheseeffekte

2.5.1 Algenphotosynthese in Abhängigkeit von der Zelldichte und der Chemikalienkonzentration

Um die Auswirkungen der Algenphotosynthese auf die Gasmessungen zu untersuchen, wurde ein Respirometerversuch mit Algensuspensionen über einen Meßzeitraum von 72 h (nach einer Akklimatisierungsphase von einem Tag) durchgeführt. Drei Zelldichten wurden mit je zwei Replikaten getestet, von denen jeweils eine Testkammer unter Lichtausschluß inkubiert wurde. Durch Partikelanalyse der Suspensionen wurde parallel der Biovolumenzuwachs bezogen auf den Versuchszeitraum von 4 d bestimmt.

Auf der Basis der Respirometerdaten von neun Autosporensuspensionen einer geometrischen Verdünnungsreihe in ADaM wurde ein funktionaler Zusammenhang zwischen zu Versuchsbeginn eingesetztem Algenbiovolumen und Sauerstoffproduktion während des Meßintervalls abgeleitet (vgl. Gl. 6, 3.2.3.1).

Weiterhin wurden Sauerstoffproduktion und Biovolumenzuwachs von Algensuspensionen mit einer Dichte von 9×10^9 fL/540 mL Testvolumen bei Exposition an die in den Daphnienexperimenten eingesetzten Chemikalienkonzentrationen bestimmt.

2.5.2 Respirometerexperimente mit Daphnienkohorten in Gegenwart des Photosyntheseinhibitors Atrazin

Die Versuche wurden mit Kohorten adulter und adoleszenter Daphnien gemäß den oben angeführten Versuchsbedingungen (2.4.2.1 bzw. 2.4.2.2) durchgeführt. Für das Experiment mit Adultkohorten wurde 2 µM Atrazin in ADaM vorgelegt, eine Konzentration, bei der nicht vorbehandelte Algen im Vorversuch keine meßbare photosynthetische Aktivität mehr zeigten. Die an Atrazin exponierte Daphnienkohorte wurde wie die Kontrollen während der Respirometermessung täglich mit frisch abzentrifugierten Algen gefüttert. Die Experimente sollten zeigen, in welcher Weise die Anwesenheit von Atrazin die Sauerstoffverbrauchsrate im Tagesverlauf sowie den kumulativen Sauerstoffverbrauch bezogen auf das Meßintervall von 72 h beeinflusst.

Die adoleszenten Daphnien wurden an 0,3 und 0,5 µM Atrazinlösung in jeweils zwei Replikaten exponiert. Die Futteralgen wurden vor Applikation einen Tag in ADaM mit dem jeweiligen Atrazingehalt vorinkubiert.

3. Respirometrie bei *Daphnia magna*: Methodik, biologische Variabilität und Reaktionen auf veränderte Umweltbedingungen

3.1 Einführung

Im Rahmen dieses Kapitels werden die methodischen Ansätze zur Bearbeitung der stoffspezifischen Fragestellungen etabliert und diskutiert.

Bei der Respirometrie werden die energetischen Kosten aller Stoffwechselprozesse, soweit diese aerob ablaufen, summarisch als Sauerstoffverbrauch von Organismen gemessen (vgl. Abb. 1). Die Gesamtstoffwechselverluste hängen unter anderem von der Bewegungs- und Freßaktivität der Organismen ab. Der Sauerstoffverbrauch von Organismen sollte üblicherweise unter einer 'normalen' Aktivitätsrate erfaßt werden (Lampert 1984). Da viele der involvierten Prozesse jedoch tages- bzw. jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen, ist auch in Systemen, die keinen erkennbaren Streßfaktoren ausgesetzt sind, mit einer 'natürlichen' Variabilität der Werte zu rechnen. Tageszeitliche Rhythmen in der Freßaktivität von Zooplanktonarten wurden im Freiland und unter Laborbedingungen beobachtet (Literaturverweise in Starkweather 1983). Die Extrapolation von Respirations- und Assimilationsraten, die auf der Basis von Kurzzeitmessungen in Intervallen von üblicherweise wenigen Stunden kalkuliert werden, kann daher mit Fehlern behaftet sein (Lynch et al. 1986).

Der für diese Arbeit eingesetzte Respirometertyp ermöglichte es, in kontinuierlichen Messungen an unmanipulierten Systemen den Sauerstoffverbrauch über längere Zeiteinheiten zu messen und zu integrieren. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß zeitabhängige Veränderungen der Sauerstoffverbrauchsrate auftreten. Hierzu wurde der Verlauf der auf der Basis von 2 h-Intervallen kalkulierten Sauerstoffverbrauchsrate (Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{L}/\text{min}$) unter verschiedenen Versuchsbedingungen beobachtet. Zur Beschreibung metabolischer Effekte sowie zur Kalkulation der Energiebilanzen wurde der Sauerstoffverbrauch über mindestens ein 24 h-Intervall, in der Regel aber über 72 h aufsummiert (kumulative Auswertung), um 'natürliche' sowie streßinduzierte Aktivitätsunterschiede in die Ergebnisse zu integrieren.

Da das Meßsystem bei Daphnien bisher nicht verwendet wurde, bestand ein wesentliches Ziel der Experimente darin, die Reproduzierbarkeit der Messungen zu erproben, wobei letztere nicht allein durch die Meßtechnik, sondern auch durch die biologische Variabilität beeinflusst wird. Die Ergebnisse dienen dazu, den Bereich der methodisch-biologisch bedingten Variabilität abzugrenzen, um chemikalieninduzierte Veränderungen erkennen zu können. Durch gezielte Änderungen der Ver-

suchsbedingungen (Nahrungsmenge, Belichtungsintervall) wurde überprüft, mit welcher Sensitivität das System auf Umweltveränderungen reagiert.

Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, um den Einfluß der Photosynthese der Futteralgen auf die Sauerstoffverbrauchsraten der Daphnienkohorten zu quantifizieren.

Die Experimente zur Etablierung einer Datenkorrektur hinsichtlich der Algenphotosynthese wurden mit adulten und adoleszenten Daphnien unter den in Abschnitt 2.4.2.1 und 2.4.2.2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Untersuchungen zur Varianz der Meßergebnisse innerhalb einer Meßserie, zur Abhängigkeit der Sauerstoffverbrauchsraten von der Tageszeit sowie zu Effekten, die durch Veränderungen der Versuchsbedingungen erzielbar sind, erfolgten exemplarisch nur mit adulten Daphnien.

Die Ingestion wurde auf Basis der elektronischen Partikelanalyse als Algenbiovolumenverlust während des Versuchszeitraums parallel zum Sauerstoffverbrauch erfaßt (vgl. 2.4.1.2). Wie bereits eingangs erwähnt, wird der Begriff Ingestion in dieser Arbeit im Sinne von Freßaktivität verwendet und ist nicht mit der Konsumtion (vgl. Gl. 1) gleichzusetzen.

Zusammenfassung der Untersuchungsziele dieser Experimente:

- (1) Reproduzierbarkeit des respirometrischen Verfahrens und Abgrenzung eines biologisch-methodisch bedingten Variabilitätsbereiches
- (2) Reaktionen auf Veränderungen der Versuchsbedingungen
- (3) Einfluß der Futteralgen auf die Meßergebnisse

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Varianz und Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse für Sauerstoffverbrauch und Ingestion

Zur Bestimmung der Variabilität der Versuchsparameter innerhalb einer Meßserie wurden Kohorten adulter Daphnien in 9 Parallelen in einem Respirometerversuch getestet. In Tab. 4 sind die Ergebnisse für Sauerstoffverbrauch, Ingestion und Biomasse bei Versuchsende als Mittelwerte und Standardabweichungen (absolut und prozentual zum Mittelwert) angegeben.

Tab. 4: Respirometerversuch mit adulten Daphnien: Varianz der innerhalb eines Experiments erzielten Meßwerte für Sauerstoffverbrauch und Ingestion sowie für die Biomassen der Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien + freigesetzte Brut) zu Beginn und nach Beendigung des 72 h-Meßintervalls;
Versuchsdauer: 4 d (1 d Eingewöhnungsphase + 3 d Meßintervall)

	Mittelwert n = 9	Standardabweichung	
		absolut	%
Sauerstoffverbrauch/72 h	2107,3 µL	220,8 µl	10,5
Ingestion/72 h	24,10 x 10 ⁹ fL	0,72 fL	3,0
Trockengewicht zu Beginn des Meßzeitraums	3,86 mg	0,13 mg	3,4
Endtrockengewicht:			
Gesamtbiomasse	7,34 mg	0,25 mg	3,4
adulte Daphnien	4,43 mg	0,35 mg	7,9
Neonaten + Exuvien	2,92 mg	0,38 mg	13

Der Variationskoeffizient für die Respirometerdaten der 9 Kontrollen betrug 10,5% relativ zum mittleren Sauerstoffverbrauch. Für die Ingestion wurde ein Wert von 3% ermittelt.

Die Varianz der Sauerstoffmessungen kann technisch bedingt sein (Meßgenauigkeit des Sauerstoffsensors, Meßgenauigkeit bei der Bestimmung der Gasvolumina,

Temperaturgradient etc.) oder aber biologisch vor allem durch die Variabilität bezüglich der Brutfreisetzung verursacht werden. In Abb. 2 ist der kumulative Sauerstoffverbrauch der gesamten Kohorten (Adulte und entlassene Neonaten), bezogen auf das Meßintervall von 72 h, in Abhängigkeit von der Anzahl der während des Versuchszeitraums freigesetzten Neonaten dargestellt.

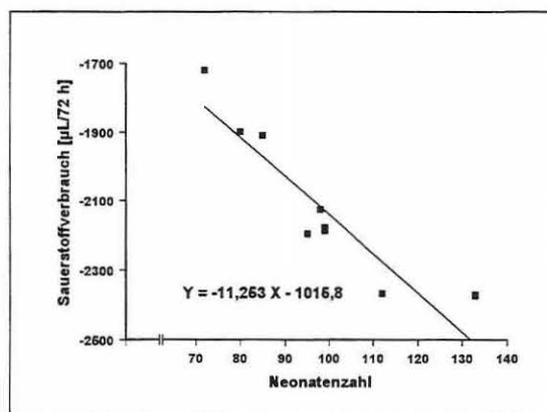


Abb. 2: Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$] von Daphnienkohorten (Kohorten aus 10 adulten Daphnien und die innerhalb von 4 d entlassenen Neonaten) in Abhängigkeit von der Anzahl entlassener Neonaten; das negative Vorzeichen ist auf den Umstand zurückzuführen, daß die Respiration als Abnahme des Sauerstoffgehalts im Gasraum gemessen wird.

Der Sauerstoffverbrauch nahm erwartungsgemäß mit der Neonatenzahl zu. Die gute Korrelation ($n = 9$; $r = 0,917$; $r^2 = 0,842$) ließ vermuten, daß die biologische Variabilität in der Brutgröße der Daphnien ausschlaggebend war für die beobachtete Varianz der Meßergebnisse. Nach der Regressionsgeradengleichung würden 10 adulte Daphnien $1016 \mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$ verbrauchen, das entspricht, bezogen auf ein mittleres Trockengewicht von $4,15 \text{ mg}$, einer Sauerstoffverbrauchsrate von $3,40 \mu\text{L O}_2/\text{mg}/\text{h}$.

Nach den Ergebnissen der Partikelanalyse enthielten die Testlösungen bei Versuchsende kaum noch intakte Algenzellen. Limitationen im Nahrungsangebot verhinderten möglicherweise, daß sich die biologische Variabilität im gleichen Maße bei der Ingestion manifestierte.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in zeitlich unabhängigen Messungen wurden die Daten aller Kontrollen, die bei der Chemikaliertestung mit beiden experimentellen Ansätzen mitgeführt wurden, ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 für die Versuche mit adulten Daphnien ($n = 9$) und in Tab. 6 für die Experimente mit adoleszenten Daphnien ($n = 4$) zusammengefaßt.

Tab. 5: Respirometerversuch mit adulten Daphnien: Varianz der in unabhängigen Versuchen erzielten Meßwerte für Sauerstoffverbrauch und Ingestion sowie für die Biomassen der Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien + freigesetzte Brut) zu Beginn und nach Beendigung des 72 h-Meßintervalls;
Versuchsdauer: 4 d (1 d Eingewöhnungsphase + 3 d Meßintervall)

Parameter	Mittelwert $n = 9$	Standardabweichung	
		absolut	%
Sauerstoffverbrauch/72 h	2262,9 μL	286,2 μL	10,5
Ingestion/72 h	22,05 $\times 10^9$ fL	2,67 fL	3,0
Endrockengewicht:			
adulte Daphnien	4,88 mg	0,49 mg	7,9
Neonaten + Exuvien	2,86 mg	0,52 mg	13

Tab. 6: Respirometerversuch mit adoleszenten Daphnien: Varianz der in unabhängigen Versuchen erzielten Meßwerte für Sauerstoffverbrauch und Ingestion sowie für die Biomassen der Daphnienkohorten (10 Daphnien) bei Versuchsende;
Versuchsdauer = Meßintervall: 65 h

Parameter	Mittelwert $n = 4$	Standardabweichung	
		absolut	%
Sauerstoffverbrauch/65 h	540,2 μL	74,9 μL	13,9
Ingestion/65 h	8,23 $\times 10^9$ fL	0,24 fL	2,9
Endrockengewicht:			
Daphnien (Primiparae)	2,47 mg	0,12 mg	5,0

Für Kohorten adulter Daphnien wurde anhand der in 9 unabhängigen Experimenten erzielten Messwerte ein mittlerer Sauerstoffverbrauch von $2263 \pm 286 \mu\text{L}/72 \text{ h}$ ermittelt, ein Wert, der innerhalb des im Rahmen einer Meßserie ermittelten Varianzbereiches (Tab. 3) lag.

Auch für die mit jüngeren Daphnien durchgeführten Respirometerexperimente konnte die Reproduzierbarkeit der Meßmethode bestätigt werden, obwohl hier wahrscheinlich aufgrund des geringeren 'Signal zu Rausch' - Verhältnisses die Varianz der Messungen mit 14% des Absolutwertes etwas höher lag.

Die Versuche zeigten, daß das Respirometer unter den gewählten Bedingungen gut reproduzierbare Daten liefert. Auch für die Ingestion werden mit der verwendeten Methode in unabhängigen Versuchen vergleichbare Werte erzielt.

3.2.2 Sauerstoffverbrauch von Daphnienkohorten in Abhängigkeit von der Futteralgedichte

In den nachfolgend dargestellten Experimenten wurde die Auswirkung von Nahrungsreduktion und -entzug auf die Meßergebnisse bei der Respirometrie untersucht. In Abb. 3 sind Meßdaten dargestellt, die während der ersten 24 h des Meßintervalls bei gefütterten und ungefütterten Daphnien aufgezeichnet wurden.

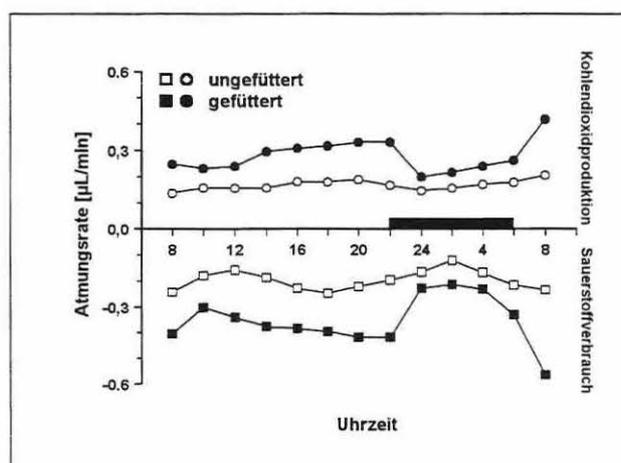


Abb. 3: Atmungsraten (Sauerstoffverbrauch als negativer Wert [$\mu\text{L O}_2/\text{min}$] und Kohlendioxidproduktion als positiver Wert [$\mu\text{L CO}_2/\text{min}$], ermittelt für Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien und die innerhalb des Meßzeitraums entlassenen Neonaten)) während der ersten 24 h des Meßintervalls. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Ansätzen mit gefütterten Daphnien und die Daten unter Nahrungsentzug als Einzelwerte.

Für Testansätze, die Daphnien und Algen enthielten, wies die in 2 h-Intervallen ermittelte Atmungsrate tageszeitabhängige Schwankungen auf, gekennzeichnet durch einen deutlichen Rückgang der Werte während des Dunkelintervalls. Bei hungernden Daphnien zeigten die innerhalb von 24 h aufgezeichneten Daten kaum Schwankungen, die Sauerstoffverbrauchsrate war insgesamt deutlich niedriger als bei den gefütterten Organismen. Kumulativ über 24 h berechnet, lag der Sauerstoffverbrauch in Abwesenheit von Futteralgen bei 55% der Futterkontrollen. Die Quantifizierung von Streßeffecten, in diesem Fall von Nahrungsentzug, auf metabolische Prozesse setzt eine Normierung der Meßwerte auf eine gemeinsame Bezugsgröße voraus. Da für das angesprochene Intervall entsprechende Daten nicht zur Verfügung standen (die Trockengewichtsbestimmung erfolgte erst nach 72 h), wurden die Berechnungen entsprechend für die letzten 24 h des gesamten Meßintervalls vorgenommen. Für die hungernden Tiere wurde eine mittlere Sauerstoffverbrauchsrate von 4,3 $\mu\text{L}/\text{mg}/\text{h}$ ermittelt; die Kontrollen lagen im Mittel bei 5,5 $\mu\text{L}/\text{mg}/\text{h}$. Die Anwesenheit von Algen führte demnach zu einer Steigerung der gewichtsspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate um 28%.

Die Kohlendioxidfreisetzung unterlag einer vergleichbaren Tagesrhythmik wie der Sauerstoffverbrauch, die Absolutwerte waren jedoch ohne Berücksichtigung des in der Wasserphase chemisch gelösten Anteils für die Berechnung von respiratorischen Quotienten nicht exakt genug. Da die Betrachtung der Kohlendioxidproduktion keine zusätzlichen Informationen lieferte, wie aus Abb. 3 ersichtlich wird, wurde auf eine weitere Auswertung der Daten verzichtet.

In einem weiteren Experiment wurde die tägliche Futtermenge reduziert oder auf fünf Portionen verteilt appliziert. Der Versuch wurde mit höherer Besatzdichte durchgeführt als die nach den Standard-Testbedingungen konzipierten Tests; die Absolutwerte sind daher nicht vergleichbar. In Tab. 7 ist der Sauerstoffverbrauch/24 h in Abhängigkeit von der applizierten Algenmenge dargestellt. Abb. 4 zeigt die Meßdaten im Tagesverlauf für die niedrigste und die höchste getestete Algenzelldichte. Bei letzterer wurde die Ration in einem Fall einmalig verabreicht, im anderen Fall aufgeteilt auf 5 Portionen im Tagesverlauf.

Eine deutliche Abnahme des Sauerstoffverbrauches und ein Abflachen der Tagesverlaufskurve wurde bei der niedrigsten getesteten Algendichte (25% der Tagesration) festgestellt. Eine Reduktion der Futtermenge um bis zu 50% führte zu keiner nennenswerten Veränderung im Sauerstoffverbrauch.

Algenmenge [Zellen/24 h]	Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L}/24\text{h}$]
2×10^8	716
$1,5 \times 10^8$	717
$1,0 \times 10^8$	653
$0,5 \times 10^8$	486

Tab. 7: Einfluß der Futtermenge auf den Sauerstoffverbrauch von Daphnienkohorten kumulativ über 24 h (20 adulte Daphnien und entlassene Neonaten).

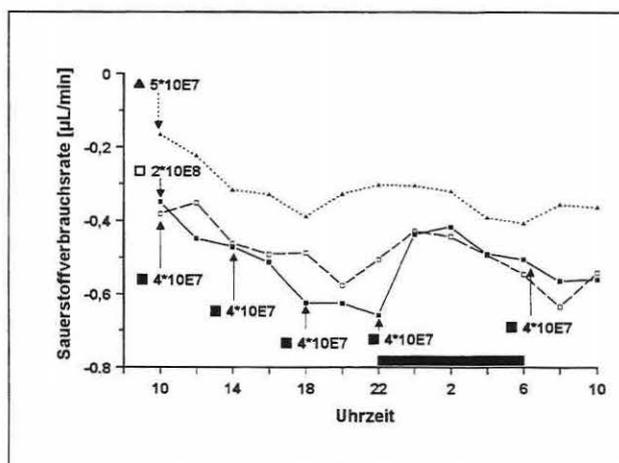


Abb. 4: Einfluß des Fütterungsregimes auf die Sauerstoffverbrauchsrate [$\mu\text{L O}_2/\text{min}$] von Daphnienkohorten (20 adulte Daphnien und entlassene Neonaten) während der ersten 24 h des Meßintervalls.

Fütterungsregime: 2×10^8 Zellen/d, appliziert in einer Portion um 10 Uhr (Einzelwerte) oder aufgeteilt auf 5 Portionen um 10-14-18-22-7 Uhr (Mittelwerte von 3 Parallelen) und 5×10^7 Zellen/d, appliziert um 10 Uhr (Einzelwerte).

Nach den Ergebnissen dieser Versuche war die Ausprägung einer Tagesrhythmik zwar an die Anwesenheit einer ausreichenden Algenmenge, jedoch nicht an den Vorgang bzw. Zeitpunkt der Applikation gekoppelt. Für die mit mehreren Rationen gefütterten Daphnien wurden zwischen 18 und 22 Uhr höhere Sauerstoffverbrauchsrate aufgezeichnet, jedoch war der Quotient zwischen Tagesmaximum und Tagesminimum bei einmaliger Futterapplikation in diesem Experiment kleiner als in anderen Versuchen.

3.2.3 Einfluß der Belichtung auf den Sauerstoffverbrauch von Daphnienkohorten

Als weiterer Faktor wurde der Einfluß von Licht untersucht. Für die Testung wurden adulte Tiere eingesetzt. Zwei Replikate wurden als Kontrollen im Wechsel von 16 h Licht : 8 h Dunkelheit kultiviert, zwei Testansätze wurden unter Lichtausschluß geführt.

In Abb. 5 sind die Meßdaten (Sauerstoffverbrauchsraten in $\mu\text{L}/\text{min}$) für einen Zeitraum von 24 h zusammenfassend dargestellt.

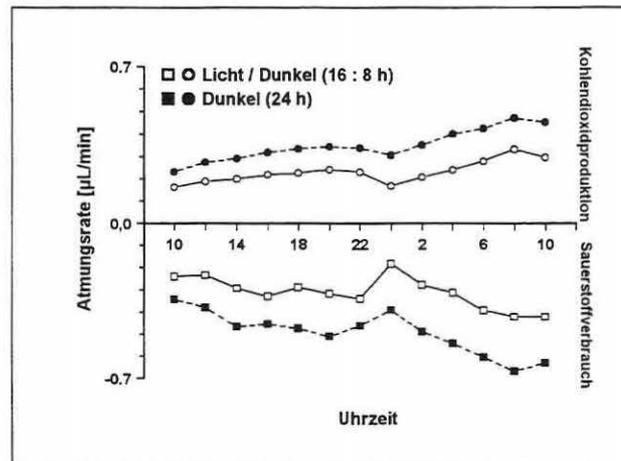


Abb. 5: Einfluß der Belichtung auf die Atmungsraten von Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien und entlassene Neonaten; 9×10^9 fL Algen/d) während der ersten 24 h des Meßintervalls; Sauerstoffverbrauchsrate [$\mu\text{L O}_2/\text{min}$] als negativer Wert, Kohlendioxidproduktionsrate [$\mu\text{L CO}_2/\text{min}$] als positiver Wert; dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 2 Parallelen.

Auch für Daphnien, die während der Messung unter Lichtausschluß gehalten wurden, zeichnete das Respirometer tageszeitabhängige Änderungen der Sauerstoffverbrauchsrate auf. Die Kurve ähnelte dem Verlauf, der auch unter Beibehaltung der Licht-Dunkelperioden zu beobachten war, jedoch lagen die Werte insgesamt deutlich höher. Bezogen auf das 72 h-Meßintervall wurde eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches um 47%, das entsprach einem Absolutwert von $1038 \mu\text{L O}_2$, als Reaktion auf die veränderten Lichtbedingungen ermittelt. Für eine weitere Interpretation der Ergebnisse sind Kenntnisse über die Größenordnung der Algenphotosyntheserate notwendig.

3.2.4 Experimente zur Etablierung einer Datenkorrektur für Photosyntheseeffekte

Die Quantifizierung von Chemikalieneffekten auf den Daphnienmetabolismus setzt voraus, daß der Einfluß der Futteralgen auf die Veränderung der Gaszusammensetzung in den Testgefäßen unter den gewählten Bedingungen vernachlässigbar ist oder daß die Meßdaten einer entsprechenden Korrektur unterzogen werden. Zur Klärung dieser Aspekte wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt:

- (1) Respirometerversuche mit Algensuspensionen in Abwesenheit von Daphnien;
- (2) Experimente mit Daphnien und Algen in Gegenwart eines Photosyntheseinhibitors.

3.2.4.1 Photosyntheserate in Abhängigkeit von der Algendichte

Wie aus Tab. 8 ersichtlich wird, war die photosynthetische Aktivität der Algen in den für die Daphnientestung relevanten Dichten auch unter den gewählten Schwachlichtbedingungen ausreichend, um eine meßbare Sauerstoffproduktion zu erzeugen.

Tab. 8: Sauerstoffproduktion [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$] und Biovolumenzuwachs [$\text{fL}/96 \text{ h}$] von Futteralgensuspensionen unter den für die Daphnientestung etablierten Versuchsbedingungen.

Animpfmenge [$\text{fL} \times 10^9$]	Licht : Dunkel 16 : 8 h		24 h Dunkel	
	Sauerstoff- produktion [$\mu\text{L}/72 \text{ h}$]	Volumen- zuwachs [$\text{fL} \times 10^7/96 \text{ h}$]	Sauerstoff- produktion [$\mu\text{L}/72 \text{ h}$]	Volumen- zuwachs [$\text{fL} \times 10^7/96 \text{ h}$]
1,8	154	92	-34	22
3,7	344	147	-93	29
7,2	542	244	-90	61

Sauerstoffproduktion und Biovolumenzuwachs in den belichteten Ansätzen nahmen abhängig von der eingesetzten Algendichte zu. Unter Lichtausschluß wurde eine schwache respiratorische Aktivität registriert, kombiniert mit einem geringen Biovolumenzuwachs. Möglicherweise fungierten die in den Autosporien enthaltenen Spei-

cherstoffe in beschränktem Maße als Energiereserven für einen lichtunabhängigen Volumenzuwachs.

In Abb. 6 ist die Sauerstoffproduktion für Algensuspensionen verschiedener Zelldichten bezogen auf die aufeinanderfolgenden Versuchstage ($\mu\text{L O}_2/24 \text{ h}$) und summarisch für das gesamte Meßintervall ($\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$) dargestellt.

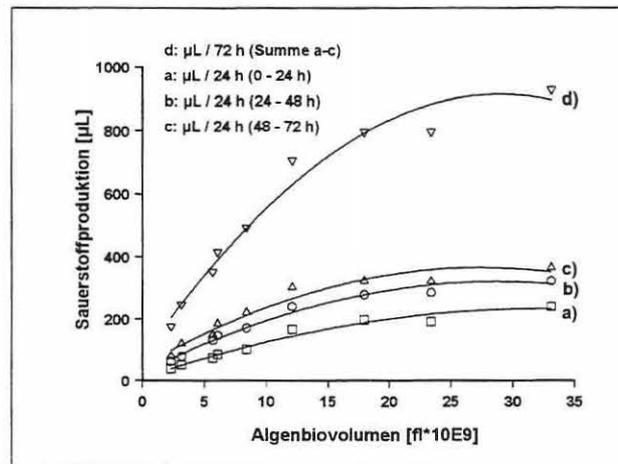


Abb. 6: Nettophotosyntheserate von Algensuspensionen: Die Kurven a-c geben jeweils die Sauerstoffproduktion [$\mu\text{L O}_2/24 \text{ h}$] während der aufeinanderfolgenden Meßtage an; Kurve d beschreibt die Sauerstoffproduktion kumulativ für das gesamte Meßintervall von 72 h.

Bis zu einer Algendichte von etwa $12 \times 10^9 \text{ fL}/540 \text{ mL}$ nahm die Sauerstoffproduktion linear zu. Eine weitere Erhöhung der Algendichte führte zu keiner nennenswerten Steigerung der Sauerstoffproduktion. Möglicherweise wirkte die gegenseitige Beschattung der Zellen zusätzlich limitierend. Die Netto-Photosyntheserate [O_2 -Produktion/24 h] nahm im Versuchsverlauf zu, vermutlich aufgrund der Erhöhung der photosynthetisch aktiven Biomasse. Die Abhängigkeit zwischen eingesetztem Algenbiovolumen und Sauerstoffproduktion innerhalb von 72 h wurde durch eine Regression zweiten Grades nach der folgenden Gleichung beschrieben:

$$Y = A X^2 + B X + C \quad (6)$$

Y: Sauerstoffproduktion [$\mu\text{L}/72 \text{ h}$]

X: Algenbiovolumen [$\text{fL} \times 10^9$]

A: -0,91; B: 54,2; C: 100,7

Die in den Versuchen mit adulten Daphnien täglich applizierte Algenmenge würde nach dieser Gleichung 515 $\mu\text{L O}_2$ in 72 h produzieren, das entspricht absolut ca. 24% des gemessenen Sauerstoffverbrauches in Experimenten mit adulten Daphnien, vorausgesetzt die Zellen blieben über den gesamten Zeitraum physiologisch aktiv. Für die Daphnienexperimente würde dies bedeuten, daß die Sauerstoffverbrauchsrate aufgrund der Sauerstofffreisetzung durch die Algen erheblich unterschätzt wird. Da die photosynthetisch aktive Biomasse während der Messungen jedoch nicht exakt bestimmt werden konnte, wurden die mit diesem Verfahren abgeschätzten Werte durch den Einsatz eines Photosyntheseinhibitors überprüft.

3.2.4.2 Respirometrische Messungen in Anwesenheit eines Photosyntheseinhibitors

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Daphnienexperimente durchgeführt, in denen die Algenphotosynthese durch Atrazinzusatz inhibiert wurde. Im ersten Versuch wurden adulte Daphnien unter den üblichen Fütterungsbedingungen an 2 μM Atrazinslösung exponiert. Nach Literaturdaten war bei dieser Konzentration eine fast vollständige Inhibierung der Algenphotosynthese zu erwarten (EC_{75} im Algen-Photosynthesehemmtest (15 min) mit *Chlorella fusca* 1,57 μM , Altenburger et al. 1990).

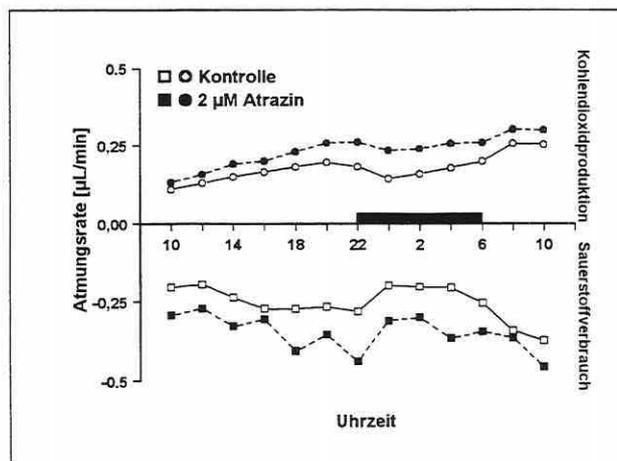


Abb. 7: Einfluß von Atrazin auf die Atmungsraten von Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien und entlassene Neonaten; 9×10^9 fL Algen/d) während der ersten 24 h des Meßintervalls; Sauerstoffverbrauchsrate [$\mu\text{L O}_2/\text{min}$] als negativer Wert, Kohlendioxidproduktionsrate [$\mu\text{L CO}_2/\text{min}$] als positiver Wert; (Kontrollen als Mittelwert von 3 Parallelen, Atrazin-Ansatz als Einzelmessung).

Unter Atrazinexposition wurden insgesamt deutlich höhere Sauerstoffverbrauchsra-ten aufgezeichnet, wobei tageszeitabhängige Aktivitätsunterschiede erhalten blieben (vgl. Abb. 7). Bezogen auf den gesamten Meßzeitraum betrug der mittlere Sauerstoffverbrauch der Kontrollen 1710 μL , für den belasteten Testansatz wurde ein Wert von 2230 μL ermittelt.

Unter der Annahme einer vollständigen Konsumtion der täglichen Algenration bei linearer Abnahme der Algendichte (Reduktion des Algenbiovolumens um $\frac{2}{3}$ innerhalb des 16-stündigen Lichtintervalls) wurde die mittlere photosynthetisch aktive Biomasse mit 6×10^9 fL veranschlagt. Diese Algenmenge würde nach der Regressionsgleichung 390 μL Sauerstoff in 72 h produzieren. Die im Atrazinversuch ermittelte Differenz lag mit 520 μL etwas höher als die kalkulierten Werte, letztere waren jedoch aufgrund der nicht experimentell abgesicherten Schätzung der Algendichte nur als Näherungswerte anzusehen.

Auffällig war die Diskrepanz zwischen den Effekten, die durch Lichtausschluß und denen, die durch Anwesenheit eines Photosyntheseinhibitors erzielt wurden. Das Verdunkeln der Testkammern erhöhte im Daphnienexperiment die Sauerstoffzehrung um 1038 μL relativ zu den mitgeführten Kontrollen. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden anhand der Meßdaten beider Respirometerexperimente die mittleren Sauerstoffverbrauchsraten während der Licht- und Dunkelphasen des Meßzeitraumes errechnet. Hierzu wurde der kumulative Sauerstoffverbrauch während der einzelnen Licht- und Dunkelintervalle durch die Intervalldauer dividiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tab. 9: Mittlerer stündlicher Sauerstoffverbrauch von Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien und die innerhalb von 4 d entlassenen Neonaten, 9×10^9 fL Algen/d) während der Lichtphasen (L) und Dunkelphasen (D) bei Exposition an Atrazin und bei Abdunkeln der Testkammern im Vergleich zu den parallel untersuchten Kontrollen.

Meßtag	L: 6-22 Uhr D: 22-6 Uhr	Atrazinversuch		Einfluß von Licht	
		Kontrolle [$\mu\text{L O}_2/\text{h}$]	+ Atrazin [2 μM] [$\mu\text{L O}_2/\text{h}$]	Kontrolle [$\mu\text{L O}_2/\text{h}$]	Lichtausschluß [$\mu\text{L O}_2/\text{h}$]
1. Tag	L	-14	-20	-17	-26
	D	-13	-20	-17	-30
2. Tag	L	-24	-30	-32	-44
	D	-19	-30	-24	-45
3. Tag	L	-34	-43	-45	-57
	D	-28	-38	-37	-64

Bei einem Vergleich identischer Phasen (Licht bzw. Dunkel) war jeweils eine Zunahme der mittleren Sauerstoffverbrauchsrate zu verzeichnen, vermutlich aufgrund der Steigerung der Daphnienbiomasse im Versuchsverlauf.

Bei den Kontrollen beider Meßserien war, den Tendenzen der eingangs dargestellten Tagesverlaufslinien entsprechend, während der letzten beiden Dunkelintervalle ein deutlicher Rückgang der Sauerstoffverbrauchsrate festzustellen. An Meßkanälen, die mit abgedunkelten Meßkammern bestückt waren, wurde im Mittel eine mehr oder weniger konstante Zunahme des Sauerstoffverbrauches aufgezeichnet. In Anwesenheit des Photosyntheseinhibitors war keine einheitliche Tendenz erkennbar. Diese Dateninterpretation lieferte einerseits keinen eindeutigen Hinweis, daß die periodischen Schwankungen in den Kontrollen an die Anwesenheit photosynthetisch aktiver Algen gekoppelt waren (Atrazin führte nicht zu einer vollständigen Eliminierung der Effekte). Andererseits war zu vermuten, daß Lichtentzug neben einer Ausschaltung der Photosynthese zusätzliche Effekte auf das Daphnien-Algensystem hatte, da keine Übereinstimmung der durch Lichtentzug und der durch chemische Inhibierung der Photosynthese erzielten Tendenzen vorlag.

Eine Interpretation der absoluten Sauerstoffverbrauchswerte bei Ausschaltung der überlagerten Photosynthese durch Atrazin führte zu dem Schluß, daß der Sauerstoffverbrauch der Daphnien um 23% unterschätzt wurde. Das jedoch setzte voraus, daß das Verhalten und die metabolische Aktivität der Daphnien in keiner Weise durch die Anwesenheit des Pestizides beeinflusst wurden.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde die zur Photosyntheseinhibierung erforderliche Atrazinkonzentration optimiert. In Respirometerexperimenten mit Algensuspensionen wurde untersucht, ob die Photosynthese, gemessen an der Netto-Sauerstoffproduktion, bei Verlängerung der Vorexposition der Futteralgen nicht auch bei niedrigeren Atrazinkonzentrationen inhibiert werden konnte. Die Ergebnisse der mit Algensuspensionen durchgeführten Vorversuche sind in Tab. 10 dargestellt.

Unter Einhaltung einer 21-stündigen Vorexposition der Futteralgensuspension konnte die Effektkonzentration um 75% reduziert werden. Wurden Autosporensuspensionen von *Chlorella fusca* an 0,5 µM Atrazin exponiert, war im Respirometerexperiment keine Sauerstoffproduktion mehr meßbar. Die Photosyntheseinhibierung erwies sich als reversibel. Eine Vorexposition der Algen alleine war demnach nicht ausreichend, andererseits war keine Beeinträchtigung der Futterqualität durch Verletzung der Zellintegrität zu befürchten.

Tab. 10: Sauerstoffproduktion von Algensuspensionen (9×10^9 fL/540 mL) nach Vorinkubation der Algen (1 d) in aufkonzentrierter Form (3×10^9 fL/ mL) in Daphnienmedium (ADaM) oder ADaM mit 0,3-0,5 μM Atrazin. Die Inkubationskonzentrationen wurden während der Messung beibehalten; nur in einem Fall wurden die an 0,5 μM Atrazinlösung exponierten Algen für die Messung in Kontrollmedium (ADaM) überführt.

Algenvorexposition	Testmedium	Sauerstoffproduktion [$\mu\text{L}/24 \text{ h}$]
ADaM	ADaM	142
ADaM	ADaM	164
0,3 μM Atrazin	0,3 μM Atrazin	35
0,4 μM Atrazin	0,4 μM Atrazin	31
0,5 μM Atrazin	0,5 μM Atrazin	-7
0,5 μM Atrazin	ADaM	142

Im Anschluß wurde untersucht, in welcher Weise sich diese Expositionsbedingungen auf die Meßergebnisse bei der Respirometrie mit adulten Daphnien auswirken. Die Daten von jeweils zwei Replikaten unter Atrazinexposition und drei Kontrollen sind als absoluter Sauerstoffverbrauch im 24 h-Intervall (mittleres Intervall des Meßzeitraums) und als absoluter Sauerstoffverbrauch während der 16-stündigen Licht- bzw. 8-stündigen Dunkelphase dargestellt (Tab. 11). Zum Vergleich sind nochmals die Meßwerte des vorangegangenen Experiments mit 2 μM Atrazin-Testlösung für das entsprechende Intervall aufgeführt.

Die Anwesenheit des Photosyntheseinhibitors hatte eine deutlich erhöhte Sauerstoffzehrung in den Testkammern zur Folge. Nach den Daten des zuletzt durchgeführten Experiments würde der Sauerstoffverbrauch der Daphnien methodisch bedingt um 30% unterschätzt.

Tab. 11: Einfluß von Atrazin auf den Sauerstoffverbrauch adulter Daphnien (10 adulte Daphnien einschließlich entlassener Neonaten, 9×10^9 fL Algen pro Tag).

Exposition 1: Sauerstoffverbrauch von Daphnien in 2 μM Atrazinlösung ohne Vorinkubation der Futteralgen und von den entsprechenden Kontrollen kumulativ für 24 h.

Exposition 2: Sauerstoffverbrauch von Daphnien in 0,5 μM Atrazinlösung bei 1 d Vorinkubation der Futteralgen und von den entsprechenden Kontrollen kumulativ für 24 h sowie für die Licht- und Dunkelphase (16 bzw. 8 h). Dargestellt ist weiterhin die Gesamt-Daphnienbiomasse bei Versuchsende.

	Exposition 1	Exposition 2		
	[2 μM]	[0,5 μM]		
	[$\mu\text{L O}_2/24 \text{ h}$]	[$\mu\text{L O}_2/24 \text{ h}$]	[$\mu\text{L O}_2/16 \text{ h}$] - [$\mu\text{L O}_2/8 \text{ h}$] Licht - Dunkel	TG [mg]
Kontrolle	444	479	369 - 110	6,18
Kontrolle	540	474	323 - 151	6,28
Kontrolle	664	566	425 - 140	6,55
Atrazin	734	714	514 - 200	5,65
Atrazin		737	555 - 183	5,84

Die Reproduzierbarkeit der Meßwerte unter den beiden Expositionsbedingungen deutete nicht auf konzentrationsabhängige Chemikalieneffekte auf den Daphnienmetabolismus, die Trockengewichtsdaten schlossen jedoch eine streßbedingte Wachstumsreduktion nicht aus. Auch hatte eine Inhibierung des autotrophen Algenwachstums eine Verminderung der verfügbaren Futtermenge und damit eine Verschlechterung der Wachstumsbedingungen zur Folge. Auffallend war weiterhin, daß die Sauerstoffzehrung in den als Kontrollen fungierenden Testkammern nicht nur während der Lichtphase, sondern auch bei Dunkelheit geringer war. Für beide Intervalle betrug das Verhältnis von Kontrollen zu Atrazin-exponierten Testansätzen im Mittel 70%.

Die Versuche hatten gezeigt, daß die Sauerstoffverbrauchsraten der Daphnien aufgrund der überlagerten photosynthetischen Sauerstoffproduktion der Algen unterschätzt wurden. Für den experimentellen Ansatz mit adulten Daphnien wurde nachgewiesen, daß etwa 25-30% der durch die Daphnien verursachten Sauerstoffzehrung durch die parallel erfolgende Sauerstoffproduktion der Algen ausgeglichen wurden. Anhand des nachfolgend dargestellten Experiments wurde überprüft, in wel-

cher Größenordnung dies für die Respirometrie mit adoleszenten Daphnien der Fall war, bei der mit geringerer Daphnienbiomasse und abgewandeltem Futterregime gearbeitet wurde (vgl. 2.4.2.2). Untersucht wurden Sauerstoffverbrauch und Ingestion von adoleszenten Daphnien bei Exposition an 0,3 und 0,5 μM Atrazin in ADaM. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 zusammengefaßt.

Tab. 12: Einfluß von Atrazin auf den Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/65 \text{ h}$] und die Ingestion [$\text{fL} \times 10^9/65 \text{ h}$] adoleszenter Daphnien (10 Daphnien; $3,5 \times 10^9 \text{ fL}$ Algen pro Tag) sowie auf die Daphnienbiomasse bei Versuchsende; die aufkonzentrierten Futteralgensuspensionen wurden 1 d vor Verwendung an die entsprechende Atrazinkonzentration vorexponiert.

	Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/65 \text{ h}$]	Ingestion [$\text{fL} \times 10^9/65 \text{ h}$]	Trockengewicht [mg]
Kontrolle (3 Parallelen)	-406,8	5,98	2,57
0,5 μM Atrazin (2 Parallelen)	-587,6	7,45	2,51
Verhältnis Kontrolle/Atrazin	69%	80%	102%
0,3 μM Atrazin (2 Parallelen)	-600,8	7,46	2,66
Verhältnis Kontrolle/Atrazin	68%	80%	97%

Der Einsatz eines Photosyntheseinhibitors beweist, daß auch unter diesen experimentellen Bedingungen der Sauerstoffverbrauch der Daphnien um 31-32% unterschätzt wurde. Chemikalieneffekte auf das Trockengewicht der Daphnien waren nicht feststellbar. Die meßbare Abnahme des Algenbiovolumens in den Testkammern stieg unter Atrazinexposition; das Verhältnis Kontrollen zu exponierten Ansätzen betrug für diesen Parameter 0,8. Die Ergebnisse zeigten, daß nicht nur Energieverbrauch, sondern auch Energieaufnahme der Daphnien unterschätzt wurden.

3.2.4.3 Einfluß der Chemikalien auf die Algenphotosynthese

Die Resultate der Vorversuche, die zur Bestimmung der Chemikalieneffekte auf die Photosynthese durchgeführt wurden, sind im Anhang (A2) aufgeführt.

Unter Cadmiumexposition waren im für die Daphnienexperimente relevanten Konzentrationsbereich keine Effekte auf die Algenphysiologie festzustellen; CTAB führte dagegen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Sauerstoffproduktion und des Biovolumenzuwachses der Algen. Die in den Daphnienversuchen eingesetzten Kupferkonzentrationen bewirkten eine deutliche Steigerung des Biovolumenzuwachses im Vergleich zu den Kontrollen; bei den Sauerstoffmessungen wurde eine entsprechende Steigerung der Photosyntheseleistung nicht aufgezeigt.

3.3 Diskussion

Ziel der zuvor dargestellten Versuche war die Entwicklung von Methoden, mit denen Energieaufnahme und Energieverluste von Daphnien unter Einbeziehung tageszeitabhängiger Aktivitätsunterschiede bestimmt werden können.

Die Methoden zur Bestimmung von Sauerstoffverbrauch und Ingestion lieferten innerhalb einer Meßserie mit adulten Daphnien gut reproduzierbare Ergebnisse. Für die Respirometerdaten ergab sich ein Variationskoeffizient von 10,5%, der aufgrund der hohen Korrelation zwischen Gesamtsauerstoffverbrauch und Anzahl der während des Meßzeitraumes freigesetzten Neonaten vermutlich teilweise auf biologische Variabilität zurückzuführen war. Die für die Ingestion innerhalb eines Experiments bestimmten Meßwerte wiesen eine geringere Streuung auf als die Sauerstoffverbrauchsdaten. Auch in aufeinanderfolgenden Messungen wurden für beide Parameter vergleichbare Absolutwerte erzielt.

Für die Chemikaliientestung bedeuten diese Ergebnisse, daß nur physiologische Streßantworten nachweisbar sind, welche Abweichungen von mehr als 10% relativ zu den Kontrollen hervorrufen.

Bezüglich der Energieaufnahme ist die maximal zu erwartende (negative) Streßantwort eine vollständige Inhibierung der Ingestion. In Experimenten mit adulten Daphnien führte Nahrungsentzug (zweiter Hungertag) zu einer Reduktion im Sauerstoffverbrauch/24 h um 45% relativ zu den gefütterten Kontrollen. Bei Zooplankton nimmt in der Regel die Sauerstoffverbrauchsrate um etwa 50% unter Hunger ab, was auf eine Abnahme der metabolischen Kosten für SDA und die Reduktion an metabolisch aktiver Biomasse zurückzuführen ist (Threlkeld 1976).

Bezogen auf die letzten 24 h des Versuches (4. Hungertag) wurden mittlere gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von $4,3 \mu\text{L O}_2/\text{mg/h}$ für hungernde Daphnien und $5,5 \mu\text{L O}_2/\text{mg/h}$ für gefütterte Daphnien kalkuliert. Bohrer und Lampert (1988) ermittelten für adulte Daphnien ähnliche Werte von $0,19$ bzw. $0,25 \mu\text{mol O}_2/\text{mg/h}$ für hungernde bzw. gefütterte Daphnien, das entspricht ca. $4,3$ bzw. $5,6 \mu\text{L}/\text{mg/h}$, wobei der Zeitraum des Nahrungsentzugs jedoch wesentlich kürzer war. Die Anwesenheit von Nahrung führte nach den vorliegenden Meßdaten zu einer Steigerung im Sauerstoffverbrauch um 28%. Dieser Anteil entspricht demnach den metabolischen Kosten für Nahrungsaufnahme, -verarbeitung und Biosynthese (SDA). Berücksichtigt man die nach dem Atrazinversuch zu erwartenden Algeneffekte (Unterschätzung des Sauerstoffverbrauches der Daphnien durch die Netto-photosynthese), so erhöhen sich die metabolischen Kosten für SDA auf 37%. Der hier ermittelte Wert liegt etwas höher als die Befunde von Bohrer und Lampert (1988) (32%), Porter et al. (1982) (29%) und Glazier und Calow (1992) (27 und 16% je nach Klon), ihm lag jedoch auch eine längere Hungerperiode zugrunde. In der Tat beobachteten Glazier und Calow (1992) bei einem Klon eine weitere Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate bei Verlängerung der Hungerperiode von 24 auf 48 h.

Die Respirometrie lieferte Sauerstoffverbrauchsrate, die relativ gut reproduzierbare tageszeitabhängige Schwankungen aufwies, mit Maximalwerten in den Abendstunden (20-22 Uhr) und einem deutlichen Rückgang der Sauerstoffverbrauchsrate nach Beginn der Dunkelphase. Die Amplitude war, wie auch der Gesamtsauerstoffverbrauch im Meßintervall, von der Algendichte abhängig. Wurde eine gewisse Futtermenge unterschritten, war der Sauerstoffverbrauch insgesamt niedriger und die Amplituden nahmen ab. Bei hungernden Daphnien wurden über 24 h fast konstante Sauerstoffverbrauchsrate ermittelt. Ein direkter Einfluß der Algen auf die Veränderungen im Sauerstoffgehalt schied als Ursache für diese Effekte aus, denn in diesem Fall wäre ein entgegengesetzter Verlauf der Tagesrhythmik zu erwarten: Die Sauerstoffzehrung durch die Daphnien sollte während der Lichtphase durch die überlagerte photosynthetische Sauerstoffproduktion partiell ausgeglichen werden; mit Eintritt der Dunkelphase hätte eine Zunahme der Sauerstoffverbrauchsrate auftreten müssen. Auch in Abwesenheit von Algen (Hungerexperimente) war der Sauerstoffverbrauch vor allem während der Lichtphase geringer als in Daphnien-Algensystemen. Eine Aufteilung der Futtermenge auf 5 Rationen, die über den Tag verteilt appliziert wurden, hatte ebenfalls keine grundlegenden Verschiebungen der Kurve zur Folge. Tendenziell führte die Modifikation eher zu einer Erhöhung der Sauerstoffverbrauchsrate in den Abendstunden. Selbst durch Abdunkeln der Testkammern sowie durch Einsatz eines Photosyntheseinhibitors konnten die zeitabhängigen Unterschiede in der Sauerstoffverbrauchsrate nicht eliminiert werden. In abgedunkelten Testkammern wiesen die für die üblichen Licht- und Dunkelphasen er-

rechneten mittleren Sauerstoffverbrauchsrate jedoch, im Gegensatz zu den Kontrollen, keine eindeutigen intervallbezogenen Tendenzen mehr auf; hier wirkte die Abwesenheit von Licht nivellierend.

Die bisher geschilderten Beobachtungen ließen den Schluß zu, daß die zeitabhängigen Unterschiede in der Sauerstoffverbrauchsrate auf Aktivitätsunterschiede der Daphnien zurückzuführen waren. Verschiedene Studien belegen, daß sich das Verhalten und die Aktivität von Daphnien im Tagesverlauf verändern. Harris (1963) beschrieb eine vergleichbare Tageszeitabhängigkeit für die vertikale Verteilung von Daphnienpopulationen unter Laborbedingungen. Der Autor interpretierte die Aufwärtsbewegung als Resultat einer erhöhten Schwimmaktivität - eine maximale mittlere Höhe wurde etwa vier Stunden vor Sonnenuntergang erreicht - das nachfolgende Absinken der Organismen als Ausdruck größerer Passivität, wobei ein Minimum etwa zwei bis drei Stunden nach Sonnenuntergang erzielt wurde. Diese Rhythmik war auch bei in Dunkelheit gehälteren Daphnien nachweisbar und demnach endogen gesteuert. Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen bei der Respirometrie überein. Stearns (1975) beobachtete, daß *Daphnia pulex* als Reaktion auf einen in der Nacht gegebenen Lichtimpuls nur geringe Schwimmaktivität zeigt, die mit Einsetzen der Lichtphase zunimmt. Im Gegensatz zum Verlauf der Sauerstoffverbrauchskurve wurde ein Maximum bereits mittags erreicht. Ringelberg und Servaas (1971) fanden eine deutliche Abnahme der phototaktischen Reaktion von Daphnien nach Eintritt der eigentlichen Dunkelperiode. Starkweather (1983) ermittelte bezüglich der Freßaktivität einen Maximalwert während der Dunkelphase; demnach wäre eine Erhöhung der Sauerstoffverbrauchsrate zu diesem Zeitpunkt zu erwarten.

Nach den Ergebnissen der Respirometrie war das Auftreten von Phasen gesteigerter Aktivität und das Ausmaß der Steigerung von der verfügbaren Nahrungsmenge abhängig. Möglicherweise werden in diesem Bereich unter futterlimitierten Bedingungen Energieressourcen eingespart.

Lichtausschluß führte insgesamt zu einer deutlichen Steigerung des kumulativen Sauerstoffverbrauchs (47%), eine Tendenz, die auch aus dem Tagesgang der Sauerstoffverbrauchsrate ersichtlich wurde. Dieser Effekt war teilweise auf die Ausschaltung der Algenphotosynthese zurückzuführen, wie durch Einsatz eines Photosyntheseinhibitors gezeigt werden konnte. Die in Algen-Daphniensystemen durch Atrazinapplikation erzielte Steigerung im Sauerstoffverbrauch war in etwa mit Photosyntheseraten von Algensuspensionen entsprechender Zelldichten vergleichbar. Unter Lichtausschluß wurde für Daphnien-Algensysteme dagegen ein deutlich höherer Sauerstoffverbrauch ermittelt als aufgrund der Photosyntheseinhibierung zu kalkulieren war. In der Tat war nicht auszuschließen, daß kontinuierliche Dunkelheit Verhal-

ten und metabolische Aktivität der Daphnien beeinflusste. Zusätzliche Energieverluste in dieser Größenordnung hätten jedoch eine deutlichere Reduktion des Biomassezuwachses erwarten lassen. Widersprüchlich war weiterhin, daß die Sauerstoffsättigung in der Wasserphase am Ende des Dunkelversuches tendenziell eher höher lag als bei den im Licht - Dunkelwechsel geführten Kontrollen. Eine mögliche Erklärung für die beschriebenen Phänomene und Diskrepanzen auf biologischer Ebene liefert die Betrachtung der physikalischen Prozesse:

Der Massentransfer zwischen Gasphase und flüssiger Phase ist ein in vier Stufen ablaufender Prozeß und umfaßt den Transfer (1) durch die Gasphase zur Grenzschicht, (2) durch den Gasfilm der zur Gasphase orientierten Seite der Grenzschicht, (3) durch den Flüssigkeitsfilm der zur flüssigen Phase orientierten Seite der Grenzschicht und (4) durch den Flüssigkeitskörper.

Treibende Kräfte für den Transfer sind der Partialdruckgradient in der Gasphase und der Konzentrationsgradient in der flüssigen Phase. In der Regel ist ein Schritt geschwindigkeitsbestimmend. In bewegten Flüssigkeiten ist für vergleichsweise schlecht lösliche Gase wie Sauerstoff der Durchtritt durch den Flüssigkeitsfilm limitierend, in stagnierenden Systemen dagegen die Diffusion durch den Flüssigkeitskörper (Jørgensen 1991).

Da extern nur durch das tägliche Einspritzen der Futteralgensuspension Turbulenzen erzeugt wurden, war die Verteilung des Sauerstoffes letztlich zum großen Teil von der lokomotorischen Aktivität der Daphnien abhängig. Zum einen wirken die durch die Schwimmbewegung verursachten Turbulenzen diffusionsbeschleunigend, zum anderen beeinflusst der Aufenthaltsort der sauerstoffverbrauchenden Daphnien die Verteilung des gelösten Gases in der Wasserphase. Ist der Aufenthalt der Daphnien nicht zufällig sondern beispielsweise durch Beeinträchtigungen der Aktivität auf bestimmte Bereiche innerhalb der Testkammer beschränkt, wird vermutlich aufgrund der vergleichsweise langsam ablaufenden Diffusionsprozesse ein Konzentrationsgradient innerhalb des Flüssigkeitskörpers entstehen. Befinden sich also die Daphnien überwiegend am Gefäßboden, ist anzunehmen, daß der Konzentrationsgradient an der Grenzschicht zur Gasphase geringer ist als es bei einer homogenen Verteilung des gelösten Sauerstoffes der Fall wäre. Demzufolge verringert sich der Massentransfer aus der Gasphase. Findet die Sauerstoffzehrung dagegen hauptsächlich in der Nähe der Wasseroberfläche statt, wird der Massentransfer durch den Flüssigkeitsfilm durch den höheren Konzentrationsgradient gesteigert. Eine Diskrepanz zwischen Veränderungen im Sauerstoffpartialdruck in der wässrigen Phase und Sauerstoffgehalt im Gasraum, wie sie bei den Dunkelversuchen zu beobachten war, ließe sich dadurch erklären, daß die Daphnien sich eher im oberen Bereich der Gefäße aufhielten. Zur Bestätigung dieser Hypothese wäre eine parallele Erfassung von Sauerstoffverbrauch, lokomotorischer Aktivität und räumlicher Verteilung der Daphnien notwendig.

Eine Testung in gerührten Systemen, die die Diffusionsproblematik vermindert und zudem eine Erfassung der Freßaktivität in ihrer Zeitabhängigkeit ermöglicht hätte, konnte nicht etabliert werden. Vorversuche zeigten, daß eine direkte Beschädigung der Daphnien durch den Magnetrührkern durch einen zusätzlichen Siebboden in den Kammern vermieden werden konnte. Die Organismen dieser Systeme wiesen jedoch Veränderungen im Verhalten auf und es war eine Adhäsion kleinerer Daphnien an die Oberflächengrenzschicht zu beobachten. Nach Untersuchungen von Wightman (1977) beeinflußt Schütteln der Testsysteme die metabolische Rate von Insektenlarven.

Fazit dieser Diskussion ist, daß sich physiologische Prozesse in der Wasserphase aufgrund der Diffusionsbeeinträchtigung vermutlich nicht zeitnah mit dem System erfassen lassen. Dies zeigte auch die Exposition des Daphnien-Algensystems an Atrazin, bei der sich die Auswirkung der Photosyntheseinhibierung nicht auf die Lichtphasen beschränkten. Auch wenn eine Interaktion zwischen Chemikalie und Daphnienmetabolismus trotz der niedrigen Konzentration (etwa um den Faktor 7 unterhalb des chronischen NOEC von 3 mg/L, Rudolph und Boje 1986) nicht auszuschließen war, waren Ursachen für dieses Phänomen eher im Bereich physikalischer Prozesse zu vermuten. Wie bereits in der Einleitung erörtert, war eine Erweiterung des Meßzeitraums gegenüber den in der Regel durchgeführten Kurzzeitmessungen ein erklärtes Ziel; andererseits waren längere Meßintervalle unter diesen Randbedingungen (geringe metabolisch aktive Biomasse, Verzicht auf diffusionsbeschleunigende Maßnahmen) auch für eine ausreichende Sensitivität erforderlich.

Die Atrazinversuche hatten gezeigt, daß sich die Photosynthese der Futteralgen in signifikanter Weise auf die Meßergebnisse auswirkte.

Aus diesen Ergebnissen wurden folgende Konsequenzen gezogen:

1. Zur Bestimmung von Chemikalieneffekten auf die gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von Daphnien wurde eine Korrektur der Meßwerte hinsichtlich der Algenphotosynthese vorgenommen (Berechnung siehe Anhang A1).
2. Den SFG-Kalkulationen wurden unkorrigierte Meßdaten zugrunde gelegt, da Energieaufnahme und -verbrauch durch Biovolumenzuwachs und Sauerstoffproduktion der Algen unterschätzt wurden.
3. Bei Experimenten, in denen die Zeitabhängigkeit von Effektausprägungen untersucht wurde, wurde auf eine Datenkorrektur verzichtet. Expositionszeitabhängige Effekte waren eindeutig den Daphnien zuzuordnen, da sich nur für diese die Testbedingungen änderten. Unterschiede in der Algendichte und die damit verbundenen Abweichungen in der Photosynthese waren letztlich auch ein Indiz für eine Beeinträchtigung der Daphnien.

4. Sauerstoffverbrauch und Ingestion bei *Daphnia magna* unter Chemikalienexposition: Subletale Effekte in Abhängigkeit von der Expositionsdauer

4.1 Einführung

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente wurden mit dem Ziel durchgeführt, Veränderungen im Sauerstoffverbrauch und in der Freßaktivität bei Daphnien unter Chemikalienexposition sowie die Abhängigkeit der Effektausprägungen von der Expositionsdauer zu untersuchen.

Veränderungen physiologisch-energetischer Parameter reflektieren einerseits mögliche stoffspezifische toxikologische Wirkweisen, andererseits generelle (sub-)organismische Streßreaktionen. Bei der Respirometrie werden die energetischen Konsequenzen der Gesamtheit dieser Prozesse auf den Stoffwechsel erfaßt. Wenn keine Veränderungen meßbar sind, ist daraus nicht zu schließen, daß keine subletalen Chemikalieneffekte auf suborganismischer Ebene ausgelöst werden, sondern daß die suborganismischen Effekte ohne Auswirkung auf den organismischen Sauerstoffverbrauch bleiben.

Über die Messung der Ingestion parallel zum Sauerstoffverbrauch wurde eine weitere wesentliche Komponente des Energiehaushaltes erfaßt. Außerdem beeinflußt die Ingestionsrate über die SDA die Höhe der metabolischen Verluste und ist daher auch bei der Interpretation von Chemikalieneffekten auf den Gesamtstoffwechsel zu berücksichtigen.

Zusammenfassung der Fragestellungen, die in diesem Kapitel erörtert werden:

- (1) Welche Auswirkung hat die Exposition an subletale Chemikalienkonzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch und die Ingestion bei Daphnien?
- (2) Welche Veränderungen sind bezüglich der Effektausprägung mit fortschreitender Expositionszeit zu beobachten?
- (3) Sind spezifische Reaktionsmuster in Abhängigkeit von der Wirkung der untersuchten Substanzen nachzuweisen?

Für die Versuche wurden adulte Daphnien eingesetzt (vgl. 2.4.2.1), um so auch die Auswirkungen längerer Vorexposition untersuchen zu können. Die Meßdaten wurden jeweils summarisch für 10 adulte Daphnien einschließlich der während des Ver-

suchszeitraumes freigesetzten Neonaten erhoben. Zur Festlegung des akut-subletalen Konzentrationsbereiches wurde zunächst die akute Toxizität (Letalität) der einzelnen Substanzen ermittelt (vgl. 4.2.1).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Akute Daphnientoxizität der untersuchten Chemikalien

In Tab. 13-15 sind die Daphnientoxizitäten der drei Testsubstanzen dargestellt, die für jeweils zwei Altersklassen von Daphnien, 0-48 h alte Neonaten und 12-14 d alte Daphnien, in Anwesenheit von Futteralgen und bei einer Expositionsdauer von 72 h ermittelt wurden. Zur Kalkulation der EC₅₀-Werte (Letalität) wurden zwei Verfahren verwendet und hinsichtlich der Ergebnisse verglichen.

Tab. 13-15: Akute Toxizität von CTAB, Kupfer und Cadmium gegenüber gefütterten Daphnien zweier Entwicklungsstadien; die an erster Stelle angegebenen EC₅₀-Werte (Letalität) wurden mit Hilfe des DEBtox-Programmes (Kooijman und Bedaux 1996, vgl. 2.2.2) geschätzt; die in Klammern angegebenen Daten wurden über Hill-Kinetik (asymmetrisch sigmoid) bzw. die mit * markierten Werte mit Hilfe der logistisch-sigmoidalen Funktion kalkuliert.

Tab. 13: Toxizität von CTAB.

	Neonaten	Adulte
Alter bei Testbeginn	< 48 h	12 - 14 d
Testbereich [$\mu\text{g/L}$]	19 - 200	19 - 200
Ergebnisse:	[$\mu\text{g/L}$]	[$\mu\text{g/L}$]
EC 50 (24 h)	71 (65)	67 (62)
EC 50 (48 h)	51 (50)	47 (52)
EC 50 (72 h)	45 (45)	42 (46*)

Tab.14: Toxizität von Kupfer. Die Effektkonzentrationen sind jeweils bezogen auf Kupfersulfat Pentahydrat sowie den errechneten Kupferanteil aufgeführt.

	Neonaten		Adulte	
Alter bei Testbeginn Testbereich [$\mu\text{g/L}$]	< 48 h 19 - 200		12 - 14 d 19 - 200	
Ergebnisse:	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]	Cu^{++} [$\mu\text{g/L}$]	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]	Cu^{++} [$\mu\text{g/L}$]
EC 50 (24 h)	133 (108)	33,9 (27,5)	101 (101)	25,7 (25,7)
EC 50 (48 h)	66 (44)	16,8 (11,2)	79 (86)	20,1 (21,9)
EC 50 (72 h)	48 (39)	12,2 (9,9)	74 (73)	18,8 (18,6)

Tab. 15: Toxizität von Cadmium. Die Effektkonzentrationen sind jeweils bezogen auf Cadmiumchlorid Monohydrat sowie den errechneten Cadmiumanteil aufgeführt.

	Neonaten		Adulte	
Alter bei Testbeginn Testbereich [$\mu\text{g/L}$]	< 24 h 23 - 3000		12 - 14 d 23 - 3000	
Ergebnisse:	$\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]	Cd^{++} [$\mu\text{g/L}$]	$\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]	Cd^{++} [$\mu\text{g/L}$]
EC 50 (24 h)	2300 (-)	1300 (-)	1310 (1061)	730 (592)
EC 50 (48 h)	640 (850)	360 (470)	630 (619)	350 (346)
EC 50 (72 h)	310 (140*)	170 (80*)	430 (407)	240 (227)

Tab. 16: Literaturdaten zur akuten Toxizität der Substanzen gegenüber *Daphnia magna*.

Substanz	Test	Ergebnis
CTAB	Franz. Norm Test NF-T90-301	LC ₅₀ (24 h) 220 µg/L (1)
CTAB		EC ₅₀ 65 µg/L (2)
CTAB		EC ₅₀ 87 µg/L (2)
Cadmium	OECD 1981, ungefüttert	EC ₅₀ (48 h) für Klon A, A-1, A-2, B, E, S-1: 3,6 - 9,0 - 9,0 - 4,5 - 27,1 - 115,9 µg/L (3)
Cadmium	NEN 6501 1980	EC ₅₀ (48 h) 320 µg/L (4)
Cadmium	ungefüttert	LC ₅₀ (48 h) 360 µg/L (5)
Cadmium	ASTM 1980 Bedingungen variiert?	mittlerer EC ₅₀ (48 h) und EC ₅₀ -Bereich 46 µg/L (20-104) (6)
Cadmium	NEN 6501 1980, gefüttert	LC ₅₀ (48 h) kleine Neonaten (hoher Nahrungslevel der Muttertiere): 98 µg/L große Neonaten (geringer Nahrungslevel der Muttertiere): 294 µg/L (7)
Kupfer		LC ₅₀ (48 h) ungefüttert: 6,5 µg/L gefüttert: 18,5 µg/L (8)
Kupfer	SFS 5062 1984 (mit Quellwasser)	EC ₅₀ (48 h) ungefüttert: 11,3 µg/L gefüttert: 49,5 µg/L (9)
Kupfer	OECD 1981, ungefüttert	EC ₅₀ (48 h) für Klon A, A-1, A-2, B, E, S-1: 41,2 - 10,5 - 20,6 - 17,3 - 70,7 - 31,3 µg/L (3)

(1) Sánchez Leal et al. (1994), (2) Umweltbundesamt (1997), (3) Baird et al. (1991), (4) Bodar et al. (1990), (5) Fargašová (1994), (6) Nebeker et al. (1986), (7) Enserink et al. (1990), (8) Dave (1984), (9) Koivisto et al. (1992)

Neonaten und adulte Daphnien wiesen eine übereinstimmende Sensitivität gegenüber CTAB auf.

Für Kupfer und Cadmium wurden nach 48 h jeweils vergleichbare EC₅₀-Werte (Letalität) für die beiden Entwicklungsstufen kalkuliert. Nach 24 h lagen dagegen die für adulte Daphnien kalkulierten EC₅₀-Werte unterhalb der für Neonaten ermittelten Effektkonzentrationen; nach 72 h wurden höhere EC₅₀-Werte geschätzt.

Die mit Hilfe des DEBtox-Programmes kalkulierten Effektkonzentrationen (vgl. 2.2.2) stimmten relativ gut mit den anhand von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ermittelten EC-Werten überein. Ausnahmen bildeten die Ergebnisse der Neonatenversuche mit Kupfer und Cadmium.

In der Literatur liegen nur wenige Toxizitätsdaten für CTAB vor. Diese bestätigen die in dieser Arbeit bestimmten EC_{50} -Werte (Letalität) beziehungsweise liegen in einem Fall deutlich höher. Die Datenbasis zur akuten Daphnientoxizität von Schwermetallen ist vor allem für Cadmium sehr umfangreich, wobei die EC_{50} -Werte relativ stark variieren. Die anhand des DEBtox-Modells kalkulierten EC_{50} -Werte (48 h) betragen $360 \mu\text{g Cd/L}$ für Neonate und $350 \mu\text{g Cd/L}$ für Adulte und liegen im oberen Konzentrationsbereich bezogen auf die Literaturdaten, die Werte für Kupfer dagegen eher im unteren Bereich der aufgezeigten EC_{50} -Konzentrationen. Die Toxizitätstestung wurde in der vorliegenden Arbeit unter Algenfütterung durchgeführt. Chandini (1988) berichtet von einer Zunahme des LC_{50} für Cadmium mit steigender Nahrungskonzentration bei *Daphnia carinata*. Auch Taylor et al. (1998) beobachteten bei *Daphnia magna* eine Erhöhung des LC_{50} für das Schwermetall in Anwesenheit von Algen. Kungolos und Aoyama (1993) kamen hingegen zu dem Schluß, daß der Einfluß von Algen auf die Daphnientoxizität von Cadmium von der Cadmiumkonzentration und der Expositionsdauer abhängig ist: bei höheren Konzentrationen ($\geq 8 \mu\text{g Cd/L}$) erhöht sich die Mortalitätsrate in Anwesenheit von Algen vom zweiten Expositionstag an.

Die hohe Streuung der Literaturdaten und die widersprüchlichen Aussagen bezüglich des Futteralgeneffekts auf die Daphnientoxizität von Chemikalien erschweren die Beurteilung der ermittelten Toxizitätsdaten; insgesamt zeigte der verwendete Daphnienstamm eine nach Literaturwerten zu erwartende Sensitivität gegenüber den Testsubstanzen. Eindeutige Sensitivitätsunterschiede bezüglich der Entwicklungsstadien waren nicht festzustellen.

4.2.2 Chemikalieninduzierte Veränderungen im Sauerstoffverbrauch und in der Ingestion in Abhängigkeit von der Expositionszeit

4.2.2.1 CTAB

In Abb. 8 sind die Effekte von CTAB auf Sauerstoffverbrauch und Ingestion adulter Daphnienkohorten in Abhängigkeit von Konzentration (x-Achse) und Expositionsdauer (z-Achse) als prozentuale Abweichung zum mittleren Absolutwert von drei Kontrollen dargestellt. Wie auch bei den nachfolgenden Graphiken stellen die unter der Vorexpositionszeit von 4 und 13 d angegebenen Effekte jeweils Einzelwerte aus unabhängigen Meßserien dar. Die Testung mit 1 d vorexponierten Daphnien erfolgte in beiden Meßserien; dargestellt ist der mittlere Effekt.

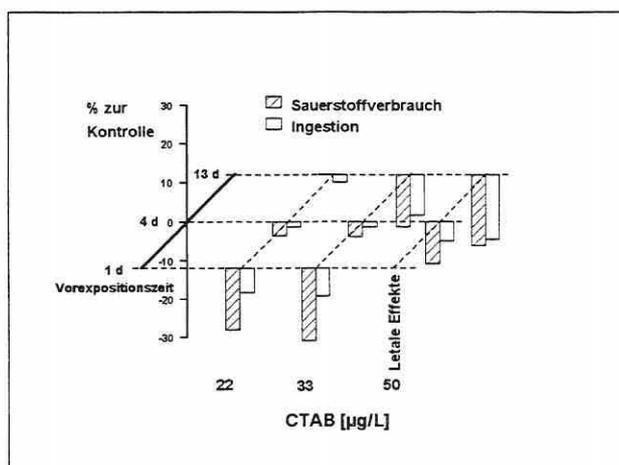


Abb. 8: Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$] und Ingestion [$\text{fL Algenbiovolumen}/72 \text{ h}$] bei Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien und die während 4 d entlassenen Jungtiere) in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration (x-Achse) und Expositionszeit (z-Achse), dargestellt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen.

Wie nach den Voruntersuchungen zu erwarten war, führte die Exposition an 50 $\mu\text{g/L}$ CTAB ohne vorherige Akklimatisierungsphase bei einem Teil der Daphnien zu letalen Effekten. Die Letalität lag in den beiden Meßserien bei 30 bzw. 80%. Im subletalen Konzentrationsbereich war im Mittel eine Verminderung im Sauerstoffverbrauch und eine geringfügige Abnahme der Ingestion feststellbar. In der ersten Meßserie wurden subletale Effekte konzentrationsunabhängig bei beiden Parametern erzielt; in der zweiten Meßserie war nur der Sauerstoffverbrauch bei 33 $\mu\text{g/L}$ deutlich vermindert. Wurden die Daphnien vor Beginn der Messungen 4 d an das

Tensid adaptiert, waren die subletalen Effekte nicht mehr meßbar. Bei der höchsten Testkonzentration lag die Letalität während des Meßzeitraums, bezogen auf die adulten Daphnien, bei 10%. Der Sauerstoffverbrauch der Kohorte war gegenüber den Kontrollen leicht reduziert. Da eine Abnahme im Sauerstoffverbrauch auch bei der Versuchswiederholung zu beobachten war (vgl. Anhang A3) und die mikroskopische Kontrolle der Testlösung nach Anfärbung mit Methylenblau keinen Hinweis auf erhöhte mikrobielle Aktivität lieferte, wurden die Daten in die Auswertung mit einbezogen. Während der Vorexposition wurde keine Mortalität beobachtet. Bei chronisch vorexponierten Tieren konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme des Sauerstoffverbrauches und der Ingestion nachgewiesen werden.

Wie bereits im vorangehenden Kapitel angesprochen, ist die Vergleichbarkeit der physiologischen Daten letztlich nur unter Berücksichtigung einer geeigneten Bezugsgröße gewährleistet. Abb. 9 zeigt, wie sich das konzentrations- und zeitabhängige Reaktionsmuster unter CTAB-Exposition ändert, wenn der Sauerstoffverbrauch auf das zu Beginn des Meßintervalls vorliegende Gesamttrockengewicht der Daphnien eines Meßansatzes und auf den Biomassezuwachs während des Meßintervalls (adulte Daphnien + Jungtiere) bezogen wird.

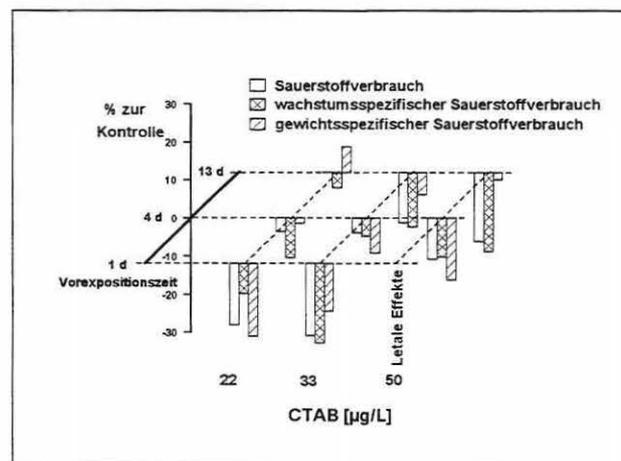


Abb. 9: Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$], wachstumsspezifischer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/mg}$ Biomasseproduktion] und gewichtsspezifischer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/mg}$ Trockengewicht bei Meßbeginn] in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration und Expositionszeit, dargestellt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen.

Der biomassezuwachsbezogene Sauerstoffverbrauch nahm bei nicht vorbelasteten und bei chronisch vorexponierten Tieren mit steigender CTAB-Konzentration ab. Nach viertägiger Vorexposition waren die Werte dagegen nur leicht erniedrigt. Ein Bezug der Respirometerdaten auf die zu Meßbeginn eingesetzte Biomasse eliminierte die physiologischen Effekte nach 13-tägiger Vorexposition. Nach 4-tägiger Schadstoffexposition war der Sauerstoffverbrauch bei der höchsten Testkonzentration deutlich vermindert. CTAB-Effekte auf Biomasse und Biomasseproduktion sind in Tab. 17 als prozentuale Abweichung zum Mittelwert der Kontrollen zusammengefaßt.

Tab. 17: Konzentrations- und expositionszeitabhängige CTAB-Effekte auf die Daphnienbiomasse/Kohorte zu Beginn des Meßintervalls (13. Tag), die Biomasseproduktion/72 h sowie die Daphnienbiomasse/Kohorte bei Abschluß der Messung (16. Tag). Letztere ist aufgeteilt in Gesamtbiomasse der 10 adulten Tiere und Trockengewicht der Brut. Die Ergebnisse sind jeweils als % Abweichung zum Mittelwert der Kontrollen dargestellt. Weiterhin ist die Anzahl an Jungtieren relativ zu den Kontrollen aufgeführt.

Test- ansatz [d] [µg/L]	Biomasse (13. Tag) [%]	Produktion (13.-16.Tag) [%]	Biomasse Adulte (16. Tag) [%]	Biomasse Brut (16. Tag) [%]	Neonaten- zahl [%]
1 22	3,3 %	-7,8 %	-4,0 %	-0,6 %	-7,6 %
1 33	-7,5 %	2,4 %	-2,5 %	-2,5 %	-13,9 %
4 22	-2,3 %	7,5 %	-0,9 %	7,0 %	-4,8 %
4 33	5,8 %	0,7 %	-1,6 %	9,4 %	-2,2 %
4 50	-4,2 %	-10,8 %	-8,8 %	4,7 %	-18,5 %
13 22	-6,4 %	4,5 %	-5,6 %	7,0 %	5,2 %
13 33	-8,0 %	1,4 %	-5,2 %	0,2 %	-19,1 %
13 50	-16,7 %	3,5 %	-10,8 %	1,2 %	16,5 %

Effekte auf die Biomasseproduktion (13.-16. Tag) während des 72-stündigen Meßintervalls waren für die untersuchten Expositionsbedingungen mit Ausnahme einer leichten Verminderung der Produktion bei den 4 d an 50 µg/L CTAB vorexponierten Daphnien nicht feststellbar. Eine deutliche Gewichtsreduktion wiesen die an 50 µg/L 13 d-vorexponierten Daphnien zu Meßbeginn (13. Tag) auf (-16,7%). Auch nach 7-

tägiger Exposition an 50 µg/L CTAB (4 d-vorexponierte Daphnien, 16. Tag) war bereits eine relative Abnahme im Trockengewicht der adulten Daphnien festzustellen (-8,8%). Demnach reduzierte CTAB bei längerer Expositionsdauer das Wachstum der Daphnien. Nach den vorliegenden Ergebnissen verminderten sich die Gewichtsunterschiede zu den Kontrollen bei chronischer Belastung mit fortschreitender Expositionsdauer wieder (von -16,7% 13. Tag auf -10,8% 16. Tag). Ob dieser Trend Ausdruck einer zunehmenden Akklimatisierung war oder durch biologische Variabilität verursacht wurde (zwei unabhängige Proben), war jedoch auf dieser Datenbasis nicht zu entscheiden. Die Biomasse der im Verlauf des Meßintervalls freigesetzten Neonaten (Brut 16. Tag) wurde durch die Anwesenheit der Chemikalie nicht beeinträchtigt, obwohl die Anzahl an Jungtieren variierte.

Exposition an 50 µg/L CTAB hatte bei den Respirometermessungen eine höhere Letalitätsquote zur Folge als während der Vorexposition, obwohl adulte und juvenile Daphnien sich hinsichtlich ihrer Sensitivität nicht unterschieden, wie zu Beginn des Kapitels dargestellt wurde. Zur Verifizierung dieser Beobachtung wurde, anders als in den geschilderten Versuchen, die akute Toxizität von CTAB unter den Bedingungen geprüft, die der Hälterung bei der Anzucht (vgl. Tab. 3) entsprachen. Es wurde bei höherer Daphnien- und Algendichte bis zu einer Konzentration von 90 µg/L CTAB über einen Zeitraum von 72 h getestet.

Bis zu einer CTAB-Konzentration von 63 µg/L waren dabei keine konzentrationsabhängigen letalen Effekte zu beobachten. Ein Grund für die Abnahme der „Sensitivität“ der Daphnien könnte in einer Verminderung der Bioverfügbarkeit der Substanz liegen, verursacht durch die hohe Algen- und Daphniendichte.

Eine weitere Meßserie sollte zeigen, welche Auswirkungen die Anzuchtbedingungen auf die nach 1- und 13-tägiger Vorexposition aufgezeigten CTAB-Effekte auf den Sauerstoffverbrauch der Daphnienkohorten hatten. Hierzu wurden für die Anzucht Gefäßgeometrie und Daphnienbesatzdichte den späteren Meßbedingungen angeglichen (10 Daphnien/540 mL); die üblicherweise in der Anzucht verwendete Gesamtfuttermenge ($3,6 \times 10^{10}$ fL/10 Tiere/12 d) wurde hingegen beibehalten. Das Futterregime war dahingehend modifiziert worden, daß bei Expositionsbeginn und Mediumwechsel (0., 5., 9. Tag) Testlösungen mit der bei den Messungen verwendeten Algendichte (9×10^9 fL/540 mL) hergestellt wurden und zu den übrigen Fütterungszeitpunkten (2., 7. Tag) die Futtermenge entsprechend angeglichen wurde. In Tab. 18 sind die relativen CTAB-Effekte auf den Sauerstoffverbrauch und die Biomasse (mittleres Trockengewicht von 10 adulten Daphnien nach 16 d) in Abhängigkeit von der Besatzdichte während der Anzucht dargestellt.

Tab. 18: CTAB-Effekte auf die Daphnienbiomasse (Gesamtrockengewicht von 10 Daphnien am 16. Tag) und den Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$] in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen (5 Daphnien/80 mL bzw. 10 Daphnien/540 mL).

Vor- exposition [d]	Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Anzuchtbedingungen 5 Tiere/80 mL		Anzuchtbedingungen 10 Tiere/540 mL	
		Biomasse	O ₂ -Verbrauch	Biomasse	O ₂ -Verbrauch
1	22	-4,0 %	-16,1 %	+6,0 %	-8,4 %
1	33	-2,5 %	-19,0 %	+0,9 %	-35,7 %
13	22	-5,6 %	0,1 %	-4,1 %	-14,8 %
13	33	-5,2 %	-13,4 %	-16,8 %	-20,0 %
13	50	-10,8 %	-18,2 %	-24,8 %	-42,3 %

Unabhängig von den Anzuchtbedingungen war eine konzentrationsabhängige Abnahme im Sauerstoffverbrauch zu beobachten. Daphnien, die bereits vor der Messung an die entsprechenden CTAB-Konzentrationen exponiert worden waren, wiesen eine konzentrationsabhängige Reduktion im Trockengewicht auf. Die dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß sich chronische CTAB-Effekte stärker ausprägen, wenn die Tierdichte/Algendichte während der Anzucht reduziert wird, jedoch war die Varianz in den Kontrollen in diesem Experiment höher (Daten nicht dargestellt). Insgesamt wurden die aufgezeigten Trends bestätigt. Die höchste CTAB-Konzentration erzeugte bei nicht vorexponierten Daphnien unter den modifizierten Anzuchtbedingungen (10 Daphnien/540 mL) 60% Mortalität. Der letale Schwellenwert adulter Daphnien blieb demnach unbeeinflusst.

Um die Reproduzierbarkeit der Methodik und der Chemikalieneffekte zu bestätigen, wurden die nach standardmäßigen Anzuchtbedingungen durchgeführten Messungen für jedes Vorexpositionsregime wiederholt. Die Ergebnisse der Versuchswiederholungen sind für die verschiedenen Parameter im Anhang (A3) dargestellt. Insgesamt waren die oben dargestellten Trends reproduzierbar. Größere Unterschiede traten beim wachstumsspezifischen Sauerstoffverbrauch auf. Im Hinblick auf akut-subletale Effekte bestätigte sich die Verminderung des Sauerstoffverbrauches bei der mittleren Konzentrationsstufe (33 $\mu\text{g/L}$); die niedrigste Testkonzentration führte nicht immer zu Effekten.

Auswirkung von CTAB auf die Tag-Nachtunterschiede im Sauerstoffverbrauch

Im dritten Kapitel wurde diskutiert, daß die Sauerstoffverbrauchsrate der Daphnienkohorten tageszeitabhängigen Schwankungen unterlag. In der Dunkelphase war eine Abnahme des mittleren stündlichen Sauerstoffverbrauches der Daphnienkohorten zu beobachten. Die über 72 h aufgezeichneten Sauerstoffverbrauchsdaten wurden nun daraufhin untersucht, ob endogene Rhythmen der Daphnien durch Chemikalienstreß beeinflusst wurden. Wie bereits im dritten Kapitel beschrieben, wurde hierzu der kumulative Sauerstoffverbrauch während der aufeinanderfolgenden Licht- und Dunkelintervalle jeweils durch die Intervalldauer dividiert; die Einzeldaten sind im Anhang (A4) aufgeführt. In Abb. 10.1 ist der mittlere stündliche Sauerstoffverbrauch während der drei Lichtintervalle prozentual zum mittleren stündlichen Sauerstoffverbrauch während der Dunkelintervalle präsentiert. Ein positiver Wert bedeutet demnach, daß der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch während der Lichtstunden höher war als in der Dunkelphase; eine gesteigerte Aktivität während der Dunkelphase führte zu einem negativen Effekt. Wie bereits in den vorangehenden Graphiken wurden zur Verbesserung der Übersichtlichkeit die bei wiederholter Testung aufgezeigten Ergebnisse (1 d vorexponiert) als mittlerer Effekt dargestellt.

Bei Kontrollen und bei Daphnienkohorten, welche erst seit Versuchsbeginn mit dem Schadstoff konfrontiert worden waren, war der Sauerstoffverbrauch während der Lichtphasen höher als während der Dunkelphase. Zur Bestätigung der Ergebnisse und der daraus abzuleitenden Chemikalieneffekte sind die Daten des zweiten Versuches, der zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der physiologischen Messungen durchgeführt wurde, ebenfalls graphisch dargestellt (Abb. 10.2.). In beiden Experimenten war nach längerer Vorexposition eine Abnahme des Quotienten zu beobachten; der Sauerstoffverbrauch war unter diesen Bedingungen nachts höher als bei Tage. Der für die Kontrollen errechnete Effekt war im ersten Experiment niedriger als im zweiten Versuch. Die Betrachtung der Einzeldaten (vgl. Anhang A4) läßt vermuten, daß im ersten Versuch während der letzten Dunkelphase Ungenauigkeiten bei der Sauerstoffmessung aufgetreten waren.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die Tageszeitabhängigkeit der respiratorischen Aktivität mit zunehmender Expositionsdauer von der unbelasteter Daphnien unterschied. Auffallend ist, daß das Reaktionsmuster nicht mit der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Effekte auf den Gesamtsauerstoffverbrauch übereinstimmt. Die Ergebnisse stützen die Vermutung, daß die nach akuter und chronischer Exposition beobachtete Verminderung im Sauerstoffverbrauch durch unterschiedliche Mechanismen verursacht wurde, wie bereits die Daten für den gewichtsspezifischen Sauerstoffverbrauch erkennen ließen.

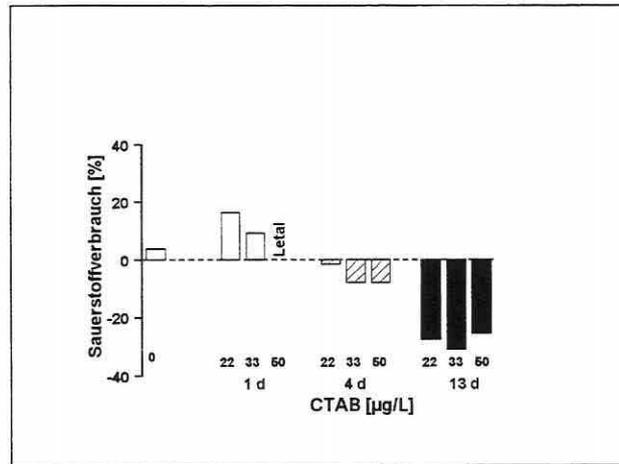


Abb. 10.1: Experiment 1

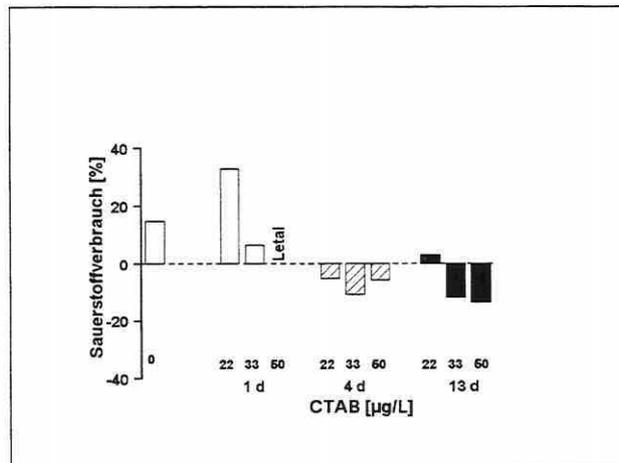


Abb. 10.2: Experiment 2

Abb. 10: Mittlerer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/\text{h}$] von Daphnien (10 Adulte und die während des Versuches entlassenen Jungtiere) während der Lichtintervalle prozentual zum mittleren Sauerstoffverbrauch während der Dunkelphasen unter CTAB-Exposition.

4.2.2.2 Kupfer

Auf Basis der akuten Toxizitätstests wurde ein Konzentrationsbereich von 15,6 bis 40 $\mu\text{g/L}$ Kupfersulfat Pentahydrat für die Respirometrie gewählt. Abb. 11 zeigt die Chemikalieneffekte auf den Sauerstoffverbrauch und die Ingestion adulter Daphnienkohorten in Abhängigkeit von der Konzentration an Kupfersulfat Pentahydrat und der Expositionsdauer jeweils als prozentuale Abweichung zum mittleren Absolutwert von drei Kontrollen.

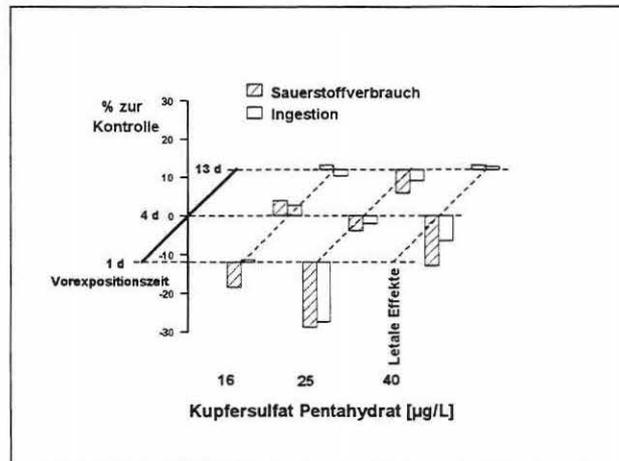


Abb. 11: Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$] und Ingestion [$\text{fL Algenbiovolumen}/72 \text{ h}$] von Daphnien (10 adulte Daphnien und die während 4 d entlassenen Jungtiere) in Abhängigkeit von der Konzentration an Kupfersulfat Pentahydrat (x-Achse) und der Expositionsdauer (z-Achse), dargestellt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen.

Bei Daphnien, die vor Versuchsbeginn nicht an das Schwermetall vorexponiert waren, betrug die Letalität bezogen auf die Anzahl adulter Daphnien bei der höchsten Konzentration (40 $\mu\text{g/L}$) 10% und 70% in den beiden Meßserien.

Sauerstoffverbrauch und Ingestion der Daphnienkohorten waren im subletalen Konzentrationsbereich deutlich vermindert; für die niedrigste getestete Konzentration waren jedoch keine Unterschiede zu unbehandelten Daphnien mehr feststellbar. Der graphischen Darstellung (Abb. 11) liegen im Falle der akuten Exposition (1 d Vorexposition) die Mittelwerte der Ergebnisse zweier Meßserien zugrunde. Anzumerken ist, daß nur bei einer Messung deutliche Effekte für Sauerstoffverbrauch und Ingestion ermittelt wurden (mehr als 30% Abweichung zu den Kontrollen), die bei der zweiten Messung nicht reproduziert wurden. Effekte im subletalen Bereich waren

bereits nach 4-tägiger Schadstoffexposition nicht mehr zu beobachten. Lediglich bei Exposition an die höchste Testkonzentration konnte in diesem Fall noch eine Abnahme im Sauerstoffverbrauch und der Ingestion nachgewiesen werden; letale Effekte traten nicht mehr auf. 13 d-vorexponierte Daphnien unterschieden sich hinsichtlich der beiden Endpunkte nicht von unbelasteten Organismen. Deutlicher wurden die Effekte bei Bezug des Sauerstoffverbrauches auf den Trockengewichtszuwachs, wie Abb. 12 zeigt.

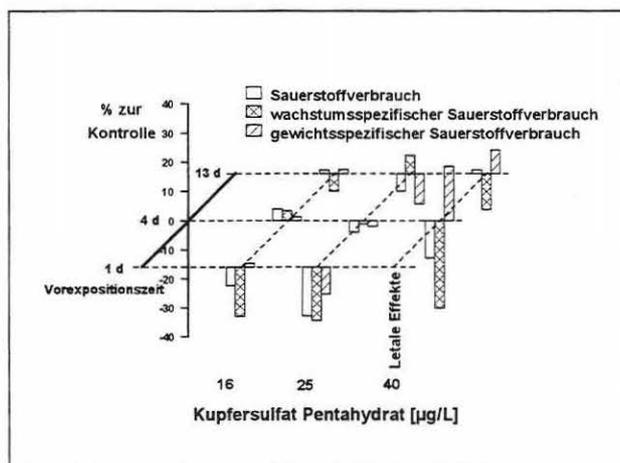


Abb. 12: Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$], wachstumsspezifischer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/mg}$ Biomasseproduktion] und gewichtsspezifischer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/mg}$ Trockengewicht bei Meßbeginn] in Abhängigkeit von der Konzentration an Kupfersulfat Pentahydrat und der Expositionszeit, dargestellt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen.

Der biomassenzuwachsbezogene Sauerstoffverbrauch war bei 1 d-vorexponierten Tieren und vor allem bei Daphnien, die 4 d vor Meßbeginn an 40 $\mu\text{g/L}$ Kupfersulfat akklimatisiert worden waren, deutlich erniedrigt. Der Sauerstoffverbrauch, bezogen auf das Trockengewicht zu Beginn des Meßintervalls, war unter den zuletzt genannten Expositionsbedingungen relativ zu den Kontrollen erhöht. Gleiche Tendenzen in abgeschwächter Form zeichneten sich auch noch bei 13 d-vorexponierten Daphnien ab.

Die Auswirkungen der Kupferexposition auf Biomasse und Biomasseproduktion der Daphnien sind in Tab. 19 als prozentuale Abweichung zum Mittelwert der Kontrollen zusammengefaßt.

Tab. 19: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von Kupfer auf die Daphnienbiomasse/Kohorte zu Beginn des Meßintervalls (13. Tag), die Biomasseproduktion/72 h sowie die Daphnienbiomasse/Kohorte bei Abschluß der Messung (16. Tag). Letztere ist aufgeteilt in Gesamtbiomasse der 10 adulten Tiere und Trockengewicht der Brut. Die Ergebnisse sind jeweils als % Abweichung zum Mittelwert der Kontrollen dargestellt. Weiterhin ist die Anzahl an Jungtieren relativ zu den Kontrollen aufgeführt.

Test- ansatz [d] [µg/L]	Biomasse (13. Tag) (% Effekt)	Produktion (13.-16.Tag) (% Effekt)	Biomasse Adulte (16. Tag) (% Effekt)	Biomasse Brut (16. Tag) (% Effekt)	Neonaten- zahl (% Effekt)
1 16	-7,8 %	11,9 %	-2,8 %	12,4 %	3,5 %
1 25	-8,5 %	0,6 %	-10,2 %	9,8 %	-5,4 %
4 16	2,5 %	-0,1 %	-3,6 %	13,9 %	0,0 %
4 25	-2,1 %	-3,6 %	-3,2 %	-1,7 %	-11,2 %
4 40	-26,6 %	24,0 %	-5,0 %	6,3 %	3,4 %
13 16	-0,2 %	7,2 %	-5,0 %	20,8 %	1,5 %
13 25	4,6 %	-12,1 %	-2,8 %	-5,2 %	-4,0 %
13 40	-6,6 %	14,7 %	0,5 %	10,7 %	5,9 %

Nach 13-tägiger und vor allem nach 4-tägiger Vorexposition an 40 µg/L des Schadstoffes war eine Zunahme der Biomasseproduktion während des anschließenden Meßintervalls zu beobachten (15 bzw. 24%). Bei den nicht vorexponierten Testansätzen wiesen die adulten Daphnien bei Versuchsende eine Verminderung im Trockengewicht auf (-10,2%). Das Wachstum der Neonaten wirkte jedoch ausgleichend, so daß sich ein entsprechender Effekt nicht bei der Gesamtproduktion bemerkbar machte. Auffällig war die deutliche Trockengewichtsreduktion (-26,6%), welche zu Beginn des Meßzeitraums nach 4-tägiger Vorexposition ermittelt wurde. Nach Ablauf des 72 h-Intervalls wiesen die adulten Daphnien dagegen nur noch geringe Unterschiede zu den Kontrolltieren auf. Es ist fraglich, ob dieser Effekt als Schadstoffakklimatisierung zu bewerten ist oder ob er auf Unterschiede in der Sensitivität der Daphnien zurückzuführen ist, da für die Trockengewichtsbestimmung zu Versuchsbeginn und für die Sauerstoffverbrauchsmessung verschiedene Daphnienkohorten eingesetzt wurden. Auf die Variabilität der subletalen Effekte bei akuter Kupferexposition (1 d vorexponierte Daphnien) war zu Beginn des Abschnitts hingewiesen worden.

Auswirkung von Kupfer auf die Tag-Nachtunterschiede im Sauerstoffverbrauch

Abb. 13 zeigt den mittleren stündlichen Sauerstoffverbrauch während der drei Lichtintervalle prozentual zum mittleren stündlichen Sauerstoffverbrauch während der Dunkelintervalle in Abhängigkeit von den Expositionsbedingungen.

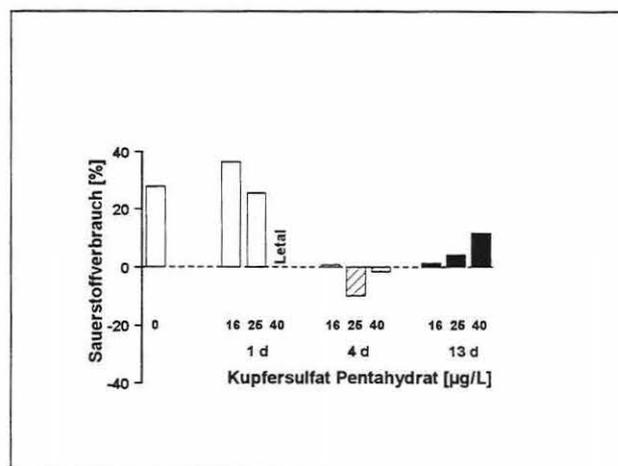


Abb. 13: Mittlerer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/\text{h}$] von Daphnien (10 adulte Daphnien und die während 4 d entlassenen Jungtiere) während der Lichtintervalle prozentual zum mittleren Sauerstoffverbrauch während der Dunkelphasen bei Exposition an Kupfersulfat Pentahydrat.

Bei niedriger Schadstoffkonzentration ohne Vorexposition war ein höherer Sauerstoffverbrauch während der Lichtperioden relativ zu den Dunkelphasen zu beobachten. Bei Daphnien, die bereits vor Meßbeginn an entsprechende Kupferkonzentrationen exponiert waren, traten keine oder nur geringe Unterschiede im mittleren Sauerstoffverbrauch bezogen auf die Licht-Dunkelintervalle auf. Eine leichte Zunahme der Aktivität während der Dunkelphase war nach 4-tägiger Vorexposition an 25 $\mu\text{g/L}$ Kupfersulfat Pentahydrat festzustellen. Ein geringfügig erhöhter Sauerstoffverbrauch während der Lichtstunden wurde nach chronischer Exposition an die höchste Testkonzentration beobachtet. Der errechnete Quotient lag jedoch unterhalb des Kontrollwertes. Bei dieser Form der Datenauswertung waren somit auch unter chronischer Kupferexposition Veränderungen relativ zu den Kontrollen festzustellen, obwohl keine Effekte bezüglich des Gesamtsauerstoffverbrauches zu beobachten waren.

4.2.2.3 Cadmium

Im akuten Toxizitätstest mit adulten Daphnien wurde für das verwendete Cadmiumsalz ein EC_{50} (72)-Wert (Letalität) von $430 \mu\text{g/L}$ ermittelt. Aufgrund des in der Literatur beschriebenen hohen Akut - Chronisch - Wirkverhältnisses des Schadstoffes (Kühn et al. 1989) wurde ein Konzentrationsbereich ausgewählt, der die im Akuttest ermittelte Schwellenkonzentration um etwa den Faktor 40 bis 400 unterschritt. Wie nach den Vorversuchen zu erwarten war, verursachte Cadmium in diesen geringen Konzentrationen keine akut-letalen Effekte. Im Verlauf der 13-tägigen Vorexposition starben 3 von 25 Daphnien, während der Respirometerexperimente trat keine Mortalität auf.

Die Ergebnisse der Respirometrie sind in Abb. 14 dargestellt.

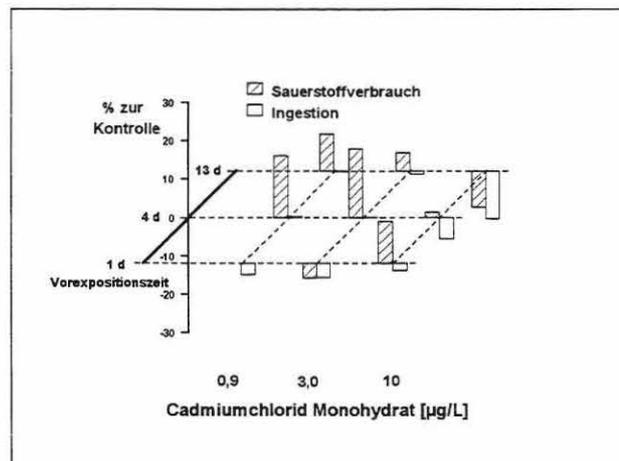


Abb.14: Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$] und Ingestion [$\text{fL Algenbiovolumen}/72 \text{ h}$] von Daphnien (10 adulte Daphnien und die während 4 d entlassenen Jungtiere) in Abhängigkeit von der Konzentration an Cadmiumchlorid Monohydrat (x-Achse) und der Expositionszeit (z-Achse), dargestellt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen.

Bei adulten Daphnien, die vor Versuchsbeginn nicht dem Schadstoff ausgesetzt waren, wurden keine Effekte auf die Ingestion festgestellt, und der Sauerstoffverbrauch war bei der höchsten Testkonzentration leicht erhöht. Nach 4-tägiger Vorexposition war im niedrigen Konzentrationsbereich eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches zu beobachten; 13-tägige Vorexposition an $10 \mu\text{g/L}$ Cadmiumchlorid Monohydrat verursachte eine Abnahme der Ingestion und eine leichte Verminderung des Sauerstoffverbrauches. Die nach kurzer Schadstoffvorexposition gemessene Zunahme im

Sauerstoffverbrauch war möglicherweise nicht durch chemikalienbedingte Streßreaktionen verursacht, sondern Folge einer höheren Reproduktionsrate während des Meßintervalls (vgl. Tab. 20). Im dritten Kapitel war eine Korrelation zwischen der Anzahl der während der Messung freigesetzten Neonaten und dem summarischen Sauerstoffverbrauch der Kohorte aufgezeigt worden. Da die Brutgröße bei Daphnien zwei Häutungszyklen vor der Neonatenfreisetzung festgelegt wird, konnte in diesem Fall ein Zusammenhang zur Cadmiumexposition ausgeschlossen werden. Jedoch wurden auch nach 13-tägiger Vorexposition, vor allem bei der höchsten Testkonzentration, deutlich mehr Neonaten während des Meßintervalls freigesetzt als bei den Kontrollen. Dementsprechend war trotz der markanten Gewichtsreduktion der adulten Daphnien gegenüber den Kontrolltieren (-28,6%) insgesamt eine Steigerung der Biomasseproduktion (22,2%) unter chronischer Cadmiumexposition zu verzeichnen. Die entsprechenden Daten sind in Tab. 20 zu finden.

Tab. 20: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von Cadmium auf die Daphnienbiomasse/Kohorte zu Beginn des Meßintervalls (13. Tag), die Biomasseproduktion/72 h sowie auf die Daphnienbiomasse/Kohorte bei Abschluß der Messung (16. Tag). Letztere ist aufgeteilt in Gesamtbiomasse der 10 adulten Tiere und Trockengewicht der Brut. Die Ergebnisse sind jeweils als % Abweichung zum Mittelwert der Kontrollen dargestellt. Weiterhin ist die Anzahl an Neonaten relativ zu den Kontrollen aufgeführt.

Test- ansatz [d]	[µg/L]	Biomasse (13. Tag) [%]	Produktion (13.-16.Tag) [%]	Biomasse Adulte (16. Tag) [%]	Biomasse Brut (16. Tag) [%]	Neonaten- zahl [%]
1	0,9	-4,0 %	6,5 %	7,9 %	-7,7 %	-9,4 %
1	3,0	3,9 %	-1,3 %	5,7 %	-4,0 %	-15,8 %
1	10	5,0 %	5,3 %	-4,4 %	17,8 %	7,9 %
4	0,9	-2,1 %	6,0 %	-2,4 %	7,6 %	10,4 %
4	3,0	-6,0 %	14,2 %	-6,8 %	18,3 %	14,6 %
4	10	-4,7 %	7,9 %	1,8 %	1,0 %	-15,1 %
13	0,9	-1,1 %	4,4 %	-2,9 %	7,3 %	15,3 %
13	3,0	-3,0 %	10,8 %	0,3 %	8,2 %	16,1 %
13	10	-21,1 %	22,2 %	-28,6 %	36,8 %	33,4 %

Wie aus Abb. 15 ersichtlich, war der nach 4-tägiger Vorexposition beobachtete Effekt bei Verrechnung des Sauerstoffverbrauches auf die Biomasseproduktion während des Meßintervalls rückläufig. Bei Bezug auf das zu Meßbeginn eingesetzte Trockengewicht wurden die Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollen deutlicher. Beide Beobachtungen sprechen dafür, daß eine Erhöhung der stoffwechselaktiven Biomasse für den gesteigerten Sauerstoffverbrauch mit verantwortlich war.

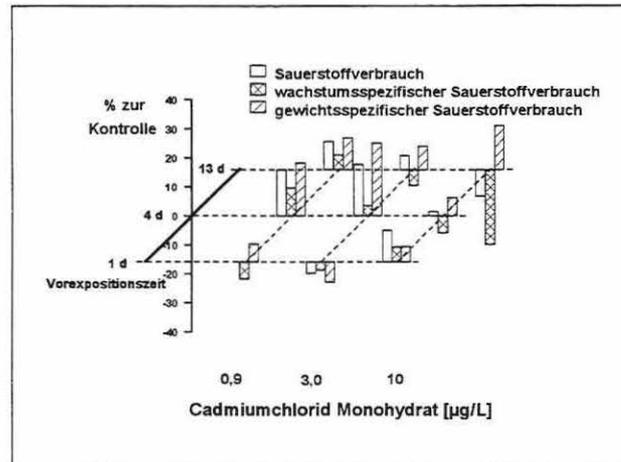


Abb. 15: Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$], wachstumsspezifischer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/mg}$ Biomasseproduktion] und gewichtsspezifischer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/mg}$ Trockengewicht bei Meßbeginn] in Abhängigkeit von der Konzentration an Cadmiumchlorid Monohydrat und der Expositionszeit, dargestellt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen.

Im chronischen Effektbereich war dagegen der biomassezuwachsspezifische Sauerstoffverbrauch deutlich erniedrigt. Hieraus ergibt sich die Vermutung, daß Effekte auf den kohortenspezifischen Sauerstoffverbrauch durch die höhere Anzahl an Neonaten und die gesteigerte Biomasseproduktion durch die Jungtiere teilweise kompensiert werden. Die höhere Neonatenzahl im Effektbereich erschwert die Interpretation der Sauerstoffverbrauchsdaten. Abweichungen in dieser Größenordnung (>30% bezogen auf Anzahl und Biomasse der Jungtiere relativ zu den Kontrollen) traten in keinem weiteren Experiment auf. Im dritten Kapitel wurde anhand der Meßdaten eines Kontrollexperimentes eine Korrelation zwischen Neonatenanzahl und Gesamtsauerstoffverbrauch bezogen auf das 72 h-Meßintervall erstellt (vgl. Abb. 2), die durch die folgende Geradengleichung beschrieben wurde:

$$\text{Gesamtsauerstoffverbrauch } [\mu\text{L}/72 \text{ h}] = 11,253 \times \text{Neonatenanzahl} + 1015,8$$

Wurde mit Hilfe dieser Gleichung jeweils der Neonatenanteil am Gesamtsauerstoffverbrauch ermittelt und die Meßwerte entsprechend korrigiert, ergab sich der in Tab. 21 aufgeführte Sauerstoffverbrauch für die Summe der adulten Daphnien eines Testansatzes. Die Daten wurden in zwei aufeinanderfolgenden Respirometermessungen erhoben und sind jeweils zusammen mit dem Sauerstoffverbrauch der mitgeführten Kontrollen aufgelistet. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu verbessern, wurden die kalkulierten Werte in den gewichtsspezifischen Sauerstoffverbrauch umgerechnet.

Die Kontrollen der zweiten Meßserie reflektierten mit einem Mittelwert von 1107 μL gut den in der oben angeführten Geradengleichung enthaltenen Parameter für den Achsenabschnitt; die Werte der ersten Messung lagen dagegen um 15% niedriger. Die Schwankungsbreite innerhalb der Kontrollen einer Meßserie war gering. Für die 4 d-vorexponierten Kohorten lag der für 10 Individuen kalkulierte Sauerstoffverbrauch wie auch der gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauch über den Kontrollwerten; für den zuletzt genannten Parameter betrug die Steigerung 19 bis 26%. Nach 13 d-Vorexposition nahm der Sauerstoffverbrauch der adulten Daphnien konzentrationsabhängig um 14% und 72% bei der höchsten Testkonzentration ab.

Auch wenn nicht der Anspruch erhoben werden kann, mit Hilfe dieses Verfahrens den Sauerstoffverbrauch der adulten Daphnien exakt zu bestimmen, konnte so zumindest der Effektbereich abgegrenzt werden. Die für Kontrollkohorten ermittelten und dort relativ gut reproduzierbaren Korrelationen ergaben für chronisch an 10 $\mu\text{g/L}$ exponierte adulte Daphnien eine deutliche Verminderung des Sauerstoffverbrauches.

Die unter Cadmiumexposition zu beobachtenden Effektmuster unterschieden sich von den bisher erzielten Ergebnissen. Exposition an Kupfer und CTAB führte zu subletalen Effekten, die zumindest teilweise bei Verlängerung der Expositionszeit rückläufig waren. Im Falle von Cadmium wurden bei niedrigen Konzentrationen längere Expositionszeiten benötigt, um Wirkungen feststellen zu können. Obwohl nach chronischer Exposition (16 d) deutliche Gewichtsreduktionen bei den Daphnien zu beobachten waren, konnten mit den gewählten Methoden ohne Vorexposition keine subletalen Effekte auf Sauerstoffverbrauch und Ingestion für die entsprechende Konzentration nachgewiesen werden. Nicht endgültig zu entscheiden ist, ob die Erhöhung im Sauerstoffverbrauch nach 4 d-Vorexposition ausschließlich durch die höhere Anzahl an Jungtieren verursacht wurde oder ob sie auch metabolische Veränderungen der Daphnien als Streßreaktion auf die Chemikalie anzeigte.

Tab. 21: Kalkulierter Sauerstoffverbrauch ($\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}/10$ Daphnien) und gewichtsspezifischer Sauerstoffverbrauch ($\mu\text{L O}_2/\text{mg}/72 \text{ h}$) der adulten Daphnien unter Cadmiumexposition nach 13 d Vorexposition (1. Meßserie) und 4 d Vorexposition (2. Meßserie)

Die Werte wurden nach der Gleichung $\text{O}_2 \text{ Adulte} = \text{GesamtO}_2 - 11,253 \times \text{Neonatenanzahl}$ errechnet.

Vorexposition 13 d	O ₂ gesamt [$\mu\text{L}/72 \text{ h}$] (gemessen)	Neonaten- zahl	O ₂ Adulte [$\mu\text{L}/72 \text{ h}$] (kalkuliert)	Biomasse Adulte [mg]	O ₂ Adulte [$\mu\text{L}/\text{mg}/72 \text{ h}$] (kalkuliert)
Kontrolle 1	2417	139	853	3,92	218
Kontrolle 2	2225	121	864	4,24	204
Kontrolle 3	2213	120	863	4,07	212
Mittelwert der Kontrollen	2285	127	860	4,08	211
0,9 $\mu\text{g}/\text{L}$	2505	146	862	3,96	218
3,0 $\mu\text{g}/\text{L}$	2393	147	739	4,09	181
10 $\mu\text{g}/\text{L}$	2072	169	171	2,91	59
Vorexposition 4 d	O ₂ gesamt [$\mu\text{L}/72 \text{ h}$] (gemessen)	Neonaten- zahl	O ₂ Adulte [$\mu\text{L}/72 \text{ h}$] (kalkuliert)	Biomasse Adulte [mg]	O ₂ Adulte [$\mu\text{L}/\text{mg}/72 \text{ h}$] (kalkuliert)
Kontrolle 1	2270	107	1066	4,55	234
Kontrolle 2	2819	146	1176	4,18	281
Kontrolle 3	2327	111	1078	4,21	256
Mittelwert der Kontrollen	2472	121	1107	4,31	257
0,9 $\mu\text{g}/\text{L}$	2868	134	1360	4,21	323
3,0 $\mu\text{g}/\text{L}$	2912	139	1348	4,02	335
10 $\mu\text{g}/\text{L}$	2506	103	1347	4,39	307

Auswirkung von Cadmium auf die Tag-Nachtunterschiede im Sauerstoffverbrauch

Abb. 16 zeigt den mittleren stündlichen Sauerstoffverbrauch während der drei Lichtintervalle prozentual zum mittleren stündlichen Sauerstoffverbrauch während der Dunkelintervalle unter Cadmiumexposition.

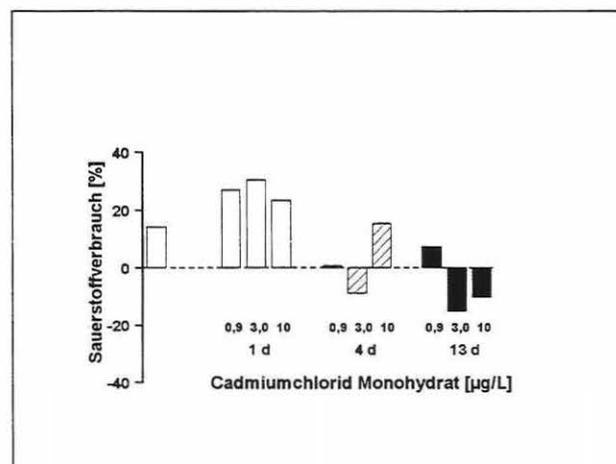


Abb. 16: Mittlerer Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/\text{h}$] von Daphnien (10 adulte Daphnien und die während 4 d entlassenen Jungtiere) während der Lichtintervalle prozentual zum mittleren Sauerstoffverbrauch während der Dunkelphasen unter Exposition an Cadmiumchlorid Monohydrat.

Während der frühen Expositionsphase führte die Anwesenheit von Cadmium zu einer Erhöhung des Quotienten; das bedeutete eine relative Steigerung im mittleren Sauerstoffverbrauch während der Lichtphasen. Bei Daphnien, die bereits vor Versuchsbeginn an Cadmium exponiert waren, war dieser Effekt rückläufig. Nach 4 d-Vorexposition traten Abweichungen zum Durchschnittswert der Kontrollen dabei nur im niedrigen Konzentrationsbereich auf, bei 13 d an 3 $\mu\text{g/L}$ und 10 $\mu\text{g/L}$ Cadmium vorexponierten Daphnien wurde im Mittel eine Zunahme im Sauerstoffverbrauch während der Dunkelphase relativ zur Lichtperiode registriert. Insgesamt waren die unter Cadmiumexposition festzustellenden Trends vergleichbar mit den durch CTAB induzierten Effekten trotz der Unterschiede, die für die beiden Stoffe bezüglich der Effekte auf den absoluten Sauerstoffverbrauch aufgezeigt wurden.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

CTAB [Konzentrationen: 22 - 33 - 50 µg/L; Vorexposition: 1 - 4 - 13 d]

- Nach 1 d-Vorexposition war eine Verminderung des Sauerstoffverbrauches zu beobachten. Reproduzierbar trat dieser Effekt bei der mittleren Konzentrationsstufe auf; die höchste Testkonzentration führte zu letalen Effekten.
- Bei einer Verlängerung der Vorexposition nahm die Mortalitätsquote ab.
- 4 d-Vorexposition hatte eine Abschwächung der Effekte auf Sauerstoffverbrauch und Ingestion zur Folge; nur bei der höchsten Testkonzentration konnte in diesem Fall noch eine Reduktion im Sauerstoffverbrauch ermittelt werden.
- Bei Daphnien, die während ihrer gesamten Juvenilphase dem Schadstoff ausgesetzt waren, war eine konzentrationsabhängige Abnahme von Sauerstoffverbrauch und Ingestion zu beobachten; der gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauch (bezogen auf das Trockengewicht zu Beginn des Meßintervalls) war dagegen nicht vermindert.
- 13 d-Vorexposition an 50 µg/L CTAB hatte eine Reduktion des Daphnientrockengewichtes zur Folge.
- Die Biomasseproduktion während des dreitägigen Meßzeitraums wurde durch die Chemikalie nicht beeinträchtigt.

Kupfer [Konzentrationen: 16 - 25 - 40 µg/L; Vorexposition: 1 - 4 - 13 d]

- Nach 1 d-Vorexposition war eine Reduktion des Sauerstoffverbrauches und der Ingestion bei einer Exposition an 25 µg/L zu beobachten (jedoch nur in einer von zwei Meßreihen; hier deutlich mit Abweichungen von >30%); bei 40 µg/L lag die Letalitätsquote bei 10 bzw. 70%.
- Nach Verlängerung der Vorexposition war eine Verminderung im Sauerstoffverbrauch nur noch bei der höchsten Konzentration festzustellen.
- 13 d-vorexponierte Daphnien unterschieden sich hinsichtlich Sauerstoffverbrauch und Ingestion nicht von den Kontrollen.
- In einigen Fällen war eine Trockengewichtsreduktion zu beobachten, so nach Abschluß der Messung bei adulten Daphnien, die vor Versuchsbeginn nicht mit der Testsubstanz konfrontiert worden waren, und nach 4 d-Vorexposition an 40 µg/L.
- Für 4 d und 13 d-vorexponierte Daphnien (40 µg/L) wurde eine gesteigerte Biomasseproduktion für das Meßintervall errechnet, daher war der gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauch gegenüber den Kontrollen deutlich vermindert.

Cadmium [Konzentrationen: 0,9 - 3,0 - 10 µg/L; Vorexposition: 1 - 4 - 13 d]:

- Nach 1 d-Vorexposition waren im gewählten Konzentrationsbereich keine Effekte zu beobachten. Nach 4 d-Vorexposition war eine Steigerung im Sauerstoffverbrauch der Daphnienkohorten meßbar, die jedoch möglicherweise auf die erhöhte Reproduktionsrate zurückzuführen war.
- Während der Vorexposition an 10 µg/L Cadmiumchlorid Monohydrat lag die Mortalitätsquote bei 12%; während der Respirometermessungen trat keine Mortalität auf.
- Nach 13 d-Vorexposition an 10 µg/L war eine deutliche Gewichtsreduktion der Daphnien zu beobachten; Sauerstoffverbrauch und Ingestion der Kohorten waren relativ zu den Kontrollen vermindert.
- Im chronischen Effektbereich war, bezogen auf den Versuchszeitraum, eine Zunahme der Reproduktionsrate (33%) zu beobachten, was zu einer Steigerung der Gesamtbiomasseproduktion führte. Der biomassezuwachsbezogene Sauerstoffverbrauch war gegenüber den unbelasteten Daphnienkohorten deutlich reduziert.

4.3 Diskussion

Die Konzentrations-Zeit-Beziehungen, die für die Effekte der drei Substanzen aufgezeigt wurden, unterschieden sich in wesentlichen Punkten voneinander.

Bei 13 d-Vorexposition an Kupfer waren bis zu einer Konzentration, die bei akuter Exposition letale Wirkungen zeigte, keine Veränderungen bezüglich des kohortenspezifischen Sauerstoffverbrauches und der Ingestion zu beobachten; in der parallel getesteten 1 d-vorexponierten Kohorte waren unterhalb des letalen Schwellenwertes Sauerstoffverbrauch und Ingestion deutlich vermindert.

Bei 13 d-Vorexposition an CTAB wurde eine Abnahme des kohortenspezifischen Sauerstoffverbrauches und der Ingestion registriert, bezogen auf einen Konzentrationsbereich, der bei akuter Exposition letale oder subletale Effekte (Abnahme des Sauerstoffverbrauches) hervorrief. Chronische Cadmium-Exposition resultierte in einer Verminderung des Sauerstoffverbrauches (knapp 10%) und der Ingestion bei einer Konzentration, die den im Akuttest ermittelten EC_{50} -Wert (72 h) für Letalität um etwa den Faktor 20 unterschritt. Bei Daphnienkohorten, die nicht vorexponiert waren, führte sie zu keinem Effekt.

Mit der Respirometrie konnten chronische Chemikalieneffekte mit vergleichbarer Empfindlichkeit aufgezeigt werden wie mit chronischen Reproduktionstests, deren Ergebnisse im folgenden Kapitel ausführlicher vorgestellt und diskutiert werden. An dieser Stelle sind daher nur einige wesentliche Aspekte zur chronischen Wirkung der Substanzen zusammengefaßt. Auch anhand von Wachstum und Reproduktion wurden chronische CTAB-Effekte erst ab einer Konzentration detektiert, die den EC_{50} (72 h) für die Letalität um weniger als den Faktor zwei unterschritt. Chronischer Cadmiumstreß machte sich bei Konzentrationen von mehr als 4,4 µg/L in einer Beeinträchtigung von Wachstum und Reproduktion bemerkbar. Im Reproduktionstest mit Kupfer stellte die Letalität einen sensitiveren Parameter dar als Wachstum und Reproduktion.

Die Zeitabhängigkeit der Effektausprägung, die sich bei der Respirometrie für Cadmium ergab, steht in Übereinstimmung mit den toxikokinetischen Eigenschaften des Schwermetalls, welches zu den kumulierenden Giften zählt. Innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches trat ein Effekt erst nach längerer Expositionsdauer auf. Bei Kupfer und CTAB hingegen war ein Rückgang letaler Wirkungen und sublethaler Veränderungen mit Verlängerung der Vorexpositionszeit festzustellen. Bei dem Tensid machte sich diese Tendenz für den subletalen Bereich jedoch nur bei einer Verlängerung der Expositionszeit von einem auf vier Tage bemerkbar. Aus diesen Reaktionsmustern ergibt sich die Vermutung, daß die Organismen während der Vorexposition Mechanismen entwickeln, die die Toleranz gegenüber letalen und

subletalen Wirkungen der Schadstoffe erhöhen. Akklimatisierung im engeren Sinne ist definiert als eine zunehmende Toleranz gegenüber erhöhten, üblicherweise letalen Schadstoffkonzentrationen nach chronischer Exposition an subletale Konzentrationen (McDonald und Wood 1993). In den dargestellten Versuchen erfolgten Vorexpositionen und Messungen jeweils in den gleichen Verdünnungsstufen; unter den Vorexpositionsbedingungen (höhere Daphnien- und Algendichte) war die Empfindlichkeit der Daphnien, gemessen an der zu beobachtenden Letalität, jedoch scheinbar geringer (vgl. 4.2.1). Die Untersuchungen von LeBlanc (1982) unterstützen die Vermutung, daß Daphnien Toleranzen gegenüber letalen Wirkungen von Kupfer entwickeln können. Nach Vorexposition der Organismen an subletale Kupferkonzentrationen beobachtete er eine deutliche Zunahme des LC_{50} -Wertes. Aus den Ergebnissen von Multigenerationsexperimenten folgert LeBlanc (1982), daß es sich dabei um physiologische Anpassungsmechanismen handelt und nicht um genetische Adaptation. Nonnotte et al. (1993) beobachteten unter chronischer Exposition an subletale Kupferkonzentrationen einen Rückgang akut toxischer Effekte (cytologische Schädigung des Kiemengewebes, Hypoxämie, Azidose) bei *Carcinus maenas*, was möglicherweise auf eine reduzierte Metallaufnahme und einen effizienteren Transfer von der Hämolymphe zum Gewebe zurückzuführen ist (Truchot und Rtal 1998). Truchot und Rtal (1998) stellten jedoch keine Erhöhung der Toleranz gegenüber letalen Effekten bei den vorexponierten Organismen fest. Bei Crustaceen und Mollusken wurden Veränderungen in der Ultrastruktur der Epithelien und Absonderung von Schleim an der Kiemenoberfläche bei Exposition an subletale Kupferkonzentrationen beobachtet, wobei teilweise ein Rückgang der Effekte auch bei andauernder Exposition beschrieben wird (Review in Spicer und Weber 1991). Akklimatisierungen gegenüber verschiedenen Schwermetallen (Al, Cu, Cd und Zn) werden bei Fischen beschrieben (Review in McDonald und Wood 1993). Wenige Informationen liegen zu diesem Thema für Tenside vor. Daphnienpopulationen, die in Fließgerinne-Mikrokosmen an das kationische Tensid Dodecyltrimethylammoniumchlorid exponiert wurden, wiesen trotz letaler Effekte im Bereich der Dosierstelle nach einigen Generationen keine signifikanten Abweichungen mehr bezüglich Organismenzahl und Gesamtbioasse auf (Woltering et al. 1987). Bei Fischen führte Exposition an LAS innerhalb der ersten 24 h der Exposition zu einem deutlichen Anstieg der Ventilationsrate, die im Verlauf der folgenden zwei Behandlungstage wieder abnahm (Maki 1979).

Insgesamt liefert die Zeitabhängigkeit in der Effektausprägung bei CTAB und Kupfer ein Indiz für die Induktion von Schutzmechanismen gegenüber dem Schadstoff; die Existenz physiologischer Anpassungsmechanismen wird zumindest für Kupfer durch die Literatur gestützt. Unabhängig davon, ob diese Prozesse letztlich als eine Akklimatisierung im engeren Sinne zu bewerten sind, wäre eine Konsequenz dieser Vermutung, daß den chronisch subletalen Effekten von CTAB andere Ursachen zu-

grunde liegen als den Veränderungen unter akuter Exposition. Indiz hierfür könnte sein, daß in einem Fall in erster Linie eine Verminderung des Sauerstoffverbrauches zu beobachten war, nach chronischer Exposition dagegen beide Parameter (Sauerstoffverbrauch und Ingestion) betroffen waren. Andererseits ist zu untersuchen, inwieweit sich die metabolischen Kosten der Organismen durch diese Prozesse verändern.

Für die Interpretation der Ergebnisse der Respirometrie wurden zwei Bezugsgrößen verwendet: das Trockengewicht, welches zu Beginn der Messung vorlag (anhand von Replikaten ermittelt), sowie die Biomasseproduktion, die demnach während des Meßintervalls erfolgte. Durch Bezug auf die bei Meßbeginn vorliegende Biomasse werden Variabilität oder auch schadstoffbedingte Wachstumsunterschiede während der Vorexposition ausgeglichen. Effekte, die auftreten, nachdem die Meßdaten im Hinblick auf die eingesetzte Biomasse vereinheitlicht wurden, sind vermutlich entweder chemikalieninduzierte metabolische Veränderungen der Daphnien und/oder die Folge einer von den Kontrollen abweichenden Biomasseproduktion. Wird der Biomassezuwachs als Bezugsgröße gewählt, sind die aufgezeigten Effekte möglicherweise ein Indiz für Schadstoffeffekte auf den Stoffwechsel, vorausgesetzt die Daphnien der verschiedenen Testansätze weisen bei Meßbeginn eine vergleichbare Biomasse auf.

Subletale physiologische Effekte können sowohl aufgrund spezifischer Wirkweisen von Chemikalien auftreten als auch Ausdruck genereller Streßantworten sein. Anhand der Konzentrations-Zeitbeziehungen wurde die Vermutung aufgestellt, daß die Daphnien gegenüber Schädwirkungen von Kupfer und auch gegenüber CTAB bis zu einem gewissen Grade Toleranzen entwickeln, wenn sie vor Beginn der Messung mit den Substanzen konfrontiert worden waren. Stuhlbacher et al. (1992) zeigten, daß die Erhöhung der Toleranz gegenüber Cadmium von einer Zunahme im Gehalt eines Metallothionein-ähnlichen Proteins begleitet wird. Der Energieaufwand für die Metallothioneinsynthese schwermetallexponierter Daphnien wird jedoch auf weniger als 5% des Gesamtstoffwechsels geschätzt (Barber et al. 1990). Veränderungen dieser Größenordnung sind bei der Respirometrie aufgrund der Meßvarianz unter Umständen nicht als signifikanter Effekt aufzulösen und sollten zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung der Energiebilanz führen. Die Ergebnisse der Respirometrie gaben keinen Hinweis darauf, daß aus diesen Anpassungsprozessen ein auf organischer Ebene meßbarer, zusätzlicher Energiebedarf resultiert, der durch Beschreitung aerober Stoffwechselwege gedeckt wird. Für beide Substanzen konnte eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauches während keiner der untersuchten Expositionsphasen beobachtet werden, unabhängig davon, welche der Bezugsgrößen hinzugezogen wurde. Eine Zunahme des Energiebedarfs ist lediglich bei Exposition

an niedrige Cadmiumkonzentrationen nach 4 d-Vorexposition nicht auszuschließen. Dagegen spricht jedoch, daß der biomassezuwachsbezogene Sauerstoffverbrauch gegenüber den Kontrollen keinen deutlichen Unterschied aufweist.

Bei 13 d-vorexponierten Daphnien werden die physiologischen Effekte auf Sauerstoffverbrauch und Ingestion möglicherweise durch die Wachstumsverminderung während der Vorexposition und die daraus resultierende geringere Menge an metabolisch aktiver Biomasse relativ zu den Kontrollen zu Meßbeginn verursacht. Zumindest bei den CTAB-exponierten Daphnien ist der gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauch gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Die Interpretation der Cadmiumdaten ist aufgrund der gesteigerten Biomasseproduktion durch die Jungtiere während des Meßintervalls erschwert.

Im folgenden soll diskutiert werden, ob Zusammenhänge zwischen den experimentell erzielten Reaktionsmustern und Stoffeigenschaften und bekannten Wirkweisen der Chemikalien erkennbar sind.

CTAB

Subletale CTAB-Konzentrationen machten sich in erster Linie im Sauerstoffverbrauch bemerkbar; die Effekte auf die Ingestion traten demgegenüber zurück. Da der Energieverbrauch als summarische Größe eine Vielzahl (sub-)organismischer Prozesse widerspiegelt, sind sowohl Verhaltensänderungen als auch die Störung physiologischer und zellulärer Prozesse einzeln oder in Kombination als Auslöser in Betracht zu ziehen. Eine mögliche Ursache für die beobachtete Abnahme im Sauerstoffverbrauch ist die Störung der Sauerstoffaufnahme über die Kiemen.

Kationische Tenside zeichnen sich durch ihre starke Sorption an eine Vielzahl von Materialien wie Sediment, Mineralien und Zellwände von Mikroorganismen aus (Review in Boethling und Lynch 1992). Sie werden in hohen Konzentrationen zur Permeabilisierung gramnegativer Bakterien eingesetzt (Varaa 1992). Rieß (1993) stellte eine inhibierende Wirkung von CTAC auf den Energiestoffwechsel von *Chlorella fusca* (Inhibierung der Respiration, Photosynthese und des Nukleotidtriphosphat-verbrauchenden Stoffwechsels) fest, die jedoch unabhängig von einer Permeabilisierung der Zellen auftrat. Boethling und Lynch (1992) vermuten, daß die Substanzen möglicherweise mit den Kiemenepithelien interferieren, indem sie sich an die negativ geladene Kiemenoberfläche anlagern oder in die Membranen interkalieren, ohne daß die Schadstoffe die Membran durchdringen. Das QAC Hexadecylpyridiniumbromid akkumuliert nach Untersuchungen von Knezovich et al. (1989) in erster Linie im Kiemengewebe. Auch bei Exposition an ein anionisches Tensid wurden histopathologische Veränderungen an den Kiemen von Fischen beobachtet (Abel und Skidmore 1975). Die Abnahme im Sauerstoffverbrauch in Gegenwart

subletaler CTAB-Konzentrationen ist daher möglicherweise auf eine Behinderung des Gasaustausches an den Kiemen zurückzuführen. Bei Karpfen tritt unter Exposition an subletale Tensidkonzentrationen (LAS) ein fortschreitender Glykogenverlust auf (Misra et al. 1991), ausgelöst vermutlich durch eine interne Hypoxie, wie sie infolge einer behinderten Kiemenatmung auftreten könnte (Heath 1995). Paul et al. (1998) stellten bei Untersuchungen mit *Daphnia magna* fest, daß unter anoxischen Bedingungen in der frühen Phase (1-2 h) in hohem Maße anaerober Metabolismus zur Energiebereitstellung genutzt wird. DeCoen (1998) vermutet aufgrund der beobachteten Veränderung in der Aktivität von Schlüsselenzymen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels eine Zunahme der metabolischen Rate bei *Daphnia magna* in Gegenwart subletaler LAS-Konzentrationen mit einer Tendenz zum anaeroben Stoffwechsel im höheren Konzentrationsbereich. Die Reduktion im für Biomasseproduktion benötigten Sauerstoffbedarf könnte ein Indiz für die zusätzliche Beschreitung anaerober Stoffwechselwege sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auch durch Energieeinsparungen zum Beispiel im Bereich der Lokomotion die Produktion aufrechterhalten werden konnte. Länger andauernde hypoxische Bedingungen führen zu einer Zunahme der Hämoglobinkonzentration und einer höheren Affinität des respiratorischen Proteins (Kobayashi und Nezu 1986, Kobayashi und Tanaka 1991). Möglicherweise sind diese Anpassungsprozesse der Grund für den Rückgang der Effekte bei vorexponierten Daphnien. Die unter chronischer Exposition auftretende Reduktion im Sauerstoffverbrauch wurde, wie bereits erwähnt, wahrscheinlich durch die Wachstumsretardierung der Organismen verursacht. In diesem Fall war auch die Ingestion betroffen. Durch welche Ursachen dieser Effekt ausgelöst wird, ist anhand der Daten nicht zu klären. Es ergeben sich keine Anhaltspunkte, daß erhöhte metabolische Kosten infolge physiologischer Anpassungsreaktionen, wie zum Beispiel eine erhöhte Hämoglobinsynthese, das für Biomasseproduktion zur Verfügung stehende Energiepotential reduzieren. Nebeker et al. (1992) untersuchten chronische Effekte niedriger Sauerstoffkonzentrationen auf die Überlebensrate und Reproduktion bei *Daphnia magna* und ermittelten für beide Parameter vergleichbare Effektkonzentrationen. Diese Ergebnisse geben keinen Hinweis darauf, daß die Überlebensrate auf Kosten der Reproduktion aufrechterhalten wird.

Die akut-subletalen CTAB-Effekte auf die Algeningestion fielen relativ schwach aus. Allen et al. (1995) kalkulierten für DTDMAC einen EC_{50} -Wert für die Inhibierung der Freßrate, der im Bereich der chronischen NOEC-Konzentration für die Reproduktion lag. Experimentelle Rahmenbedingungen während der Respirometermessungen, wie zum Beispiel die längere Versuchsdauer und die Futterlimitierung gegen Ende des Meßzeitraums, beeinträchtigten möglicherweise die Ausprägung der Effekte. Die Biomasseproduktion während der Meßintervalle variierte bei den Versuchswiederho-

lungen; bezüglich dieses Parameters zeichnete sich lediglich bei den 4 d an 50 µg/L CTAB vorexponierten Daphnien eine negative Tendenz ab.

Kupfer

Unter akuter Exposition an subletale Kupferkonzentrationen war eine deutliche Abnahme im Sauerstoffverbrauch und der Ingestion zu beobachten. Für beide Parameter wurde, allerdings nur bei einer Meßserie, eine Verminderung um mehr als 30% relativ zu den Kontrollwerten ermittelt. Da Effekte auf den Sauerstoffverbrauch nur festgestellt wurden, wenn auch die Ingestion beeinträchtigt war, sind die Ergebnisse der Respirometrie möglicherweise als eine Abnahme der metabolischen Kosten für Nahrungsaufnahme und -verarbeitung bei Schadstoffeffekten auf die Ingestion zu interpretieren.

Die Filtrier- und Ingestionsrate ist ein bei Daphnien häufiger untersuchter Effektparameter (Villaruel et al. 1998, Fernández-Casalderrey et al. 1994, Kersting und van der Honing 1981). Die auf der Basis von 4-5 h-Experimenten kalkulierten Filtrier- und Ingestionsraten von *Daphnia magna* liefern nach diesen Untersuchungen niedrigere oder vergleichbare EC_{50} -Werte wie Standard-Akutttests. Ferrando und Andreu (1993) beobachteten eine signifikante Abnahme der Filtrations- und Ingestionsraten juveniler Daphnien nach 24-stündiger Exposition an subletale Kupfersulfat-Konzentrationen ($EC_{50} / LC_{50} < 0,3$). Flickinger et al. (1982) berichten von einer tendenziellen Verminderung der Filtrationsrate juveniler Daphnien nach 6-tägiger Kupferexposition, weisen jedoch auch auf die hohe Variabilität des Parameters bei Testwiederholung hin. Nicht geklärt ist bisher, über welche Mechanismen Xenobiotika die Nahrungsaufnahme beeinträchtigen. Möglicherweise wird infolge neuronaler Dysfunktionen der Prozeß der Nahrungsaufnahme beeinträchtigt oder durch zytotoxische Wirkungen die Darmfunktion und damit die Nahrungsresorption gestört. Auch bei Fischen wird eine deutliche Inhibierung der Nahrungsaufnahme unter Kupferexposition beschrieben, die möglicherweise, zumindest teilweise, auf einen erhöhten Blutzuckergehalt infolge hormoneller Veränderungen zurückzuführen ist (Lett et al. 1976). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen tritt der Effekt nur zu Beginn der Exposition auf und ist, abhängig von der Konzentration, mit zunehmender Expositionsdauer rückläufig (Lett et al. 1976).

Die Wirkung von Schwermetallen auf das Nervensystem von Crustaceen wird durch zahlreiche Studien belegt (Review in Fingerman et al. 1996). Neuronale Störungen wirken sich nicht nur auf die Nahrungsaufnahme sondern letztlich auf die gesamte lokomotorische Aktivität von Organismen aus. Die metabolischen Kosten für lokomotorische Aktivität machen bei Daphnien ca. 80% des Hungerstoffwechsels aus (Glazier und Calow 1992). Auch geringfügigere Veränderungen der Schwimmaktivität können daher möglicherweise einen gesteigerten Energieverbrauch infolge sub-

organismischer Streßantworten im Hinblick auf die Gesamtstoffwechselverluste des Organismus kompensieren. Für das Rädertier *Brachionus calyciflorus* wurde nachgewiesen, daß bei akuter Exposition an subletale Kupferkonzentrationen die Schwimgeschwindigkeit mit steigender Konzentration abnimmt (Janssen et al. 1994) und zusätzlich auch Dauer und Häufigkeit von Phasen der Immobilität zunehmen (Charoy et al. 1995). Bei Fischen führt Exposition an subletale Kupferkonzentrationen vermutlich zu einer Erhöhung der metabolischen Rate in nicht-muskulärem Gewebe (z.B. Leber, Kiemen) bei gleichzeitiger Abnahme der spontanen Muskelaktivität, so daß Effekte auf den Netto-Sauerstoffverbrauch möglicherweise davon abhängen, inwieweit die motorische Aktivität der Fische experimentell kontrolliert wird (Heath 1995). Erhöhte metabolische Kosten, die als Folge genereller Streßantworten auftreten (z.B. Induktion von Schutzproteinen und Enzymen zur Detoxifizierung, Reparaturprozesse), sind auf organismischer Ebene daher unter Umständen nur meßbar, wenn die energetischen Kosten für Aktivität experimentell konstant gehalten werden.

Da auch die Kiemen ein Angriffspunkt für toxische Wirkungen von Kupfer darstellen, wäre ein anderer Erklärungsansatz für die beobachteten Kupfereffekte auf Sauerstoffverbrauch und Ingestion, daß die Sauerstoffaufnahme durch Störung der Kiemenfunktion (Spicer und Weber 1991) beeinträchtigt wird und als Folge dessen die Freßaktivität der Daphnien, möglicherweise aufgrund der internen Hypoxie, abnimmt.

Cadmium

Wesentliche Effekte unter Cadmiumexposition waren die deutliche Reduktion im Trockengewicht der adulten Daphnien nach 13 d-Vorexposition, begleitet von einer Steigerung der Neonatenproduktion und einer Abnahme des kohortenspezifischen Sauerstoffverbrauches und der Ingestion. Akut-subletale Effekte konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden, jedoch wurde der Konzentrationsbereich bezogen auf den akut-letalen Schwellenwert wesentlich niedriger angesetzt als bei den beiden anderen Substanzen.

Eine Reduktion im Gewichtszuwachs von Daphnien unter chronischer Cadmiumexposition wird auch von Baird et al. (1990) und Bodar et al. (1988a) beschrieben. Bodar et al. (1988a) stellten nach 14 und 21 d Exposition an 5 ppb Cadmium eine Reduktion im Trockengewicht um 37 und 31% fest; nach 7-tägiger Exposition beobachteten sie noch keine signifikanten Effekte. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnisse dieser Arbeit überein. Bodar et al. (1988a) vermuten, daß Cadmium die metabolische Aktivität insgesamt vermindert, da sie keine wesentliche Veränderung der biochemischen Zusammensetzung der Organismen außer einer leichten Ab-

nahme des Glykogengehaltes feststellten. Die Autoren beobachteten bei 14 d-alten Daphnien unter chronischer Cadmiumexposition eine Abnahme der Konsumtion um 60%. Die in dieser Arbeit gemessenen Effekte auf die Freßaktivität fielen deutlich geringer aus, jedoch ist anzunehmen, daß die entlassenen Jungtiere zu einer Effektminderung beitragen, indem sie die Nahrungsressourcen nutzen. Zudem wurde mit der verwendeten Methode auch nicht direkt die Konsumtion bestimmt.

Die Respirometerdaten lassen keine eindeutigen Aussagen zu Veränderungen der metabolischen Aktivität unter chronischem Cadmiumstreß zu, da sich der Anteil, den die Jungtiere am Gesamtsauerstoffverbrauch ausmachen, nicht eindeutig eliminieren läßt. Insgesamt ist der kohortenspezifische Sauerstoffverbrauch im Gegensatz zu den CTAB- und Kupferergebnissen tendenziell eher erhöht oder im chronischen Bereich nicht so deutlich vermindert, wie aufgrund der Wachstumsreduktion der adulten Daphnien zu erwarten wäre. In diesem Fall ist jedoch die metabolisch aktive Biomasse an Brut unter Cadmiumexposition gesteigert, der biomassezuwachsbezogene Sauerstoffverbrauch demzufolge deutlich gegenüber den Kontrollen reduziert (-26%). Dieser Effekt ist einerseits der im Mittel geringeren metabolisch aktiven Biomasse während der Messung zuzuschreiben (zu Beginn der Messung betrug die Daphnienbiomasse 79% der Kontrollen, bei Abschluß der Messung war kein Unterschied mehr festzustellen); andererseits ist aufgrund der Höhe des Effekts zu spekulieren, daß auch eine Reduktion der Stoffwechselaktivität der Organismen vorlag. Barber et al. (1990), die den Einfluß von Cadmiumstreß auf den Proteinabbau (Differenz zwischen Proteinsynthese, kalkuliert anhand des RNA:DNA-Verhältnis und der Proteinakkumulation) untersuchten, vermuten dagegen, daß der Proteinumsatz unter Streß zunimmt. Da der gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauch unter chronischer Exposition trotz der zu erwartenden Abnahme der metabolischen Kosten für SDA unverändert blieb, nehmen die Autoren einen erhöhten Energiebedarf in anderen Bereichen des Stoffwechsels an (Barber et al. 1990). In Kurzzeitexperimenten registrierten die Autoren einen Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrates. Kettle et al. (1980) beobachteten bei *Daphnia pulex* bei akuter Exposition an subletale Cadmiumkonzentrationen ebenfalls eine Erhöhung der Atmungsrate. Akut-subletale Veränderungen konnten in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Die Effekte auf den kohortenspezifischen Sauerstoffverbrauch nach 4 d Vorexposition wurden bei Bezug auf den Biomassezuwachs deutlich vermindert. Heath et al. (1995) vermuten, daß Effekte von Metallen auf die metabolische Rate von Fischen im allgemeinen Auswirkungen auf die motorische Aktivität vermitteln. Effekte auf die metabolische Rate einzelner Gewebe werden möglicherweise durch Veränderungen der motorischen Aktivität maskiert. Eine Hypothese zur Erklärung der Diskrepanzen zwischen den Befunden dieser Arbeit und den Ergebnissen von Barber et al. (1990) wäre, daß sich bei der in dieser Arbeit eingesetzten Methode Veränderungen in der lokomotori-

schen Aktivität, die möglicherweise aufgrund einer Beeinträchtigung des Zentralnervensystems durch das Schwermetall auftreten, stärker bemerkbar machen. Barber et al. (1990) verwendeten in ihren Experimenten Testvolumina von 0,5 mL/Neonate und 5-9 mL/3 Adulte. Bei Fischen wird unter subletaler Cadmiumexposition jedoch eine Zunahme der spontanen Aktivität beschrieben (Ellgaard et al. 1978), demzufolge wäre eine zusätzliche Steigerung des Sauerstoffbedarfs zu erwarten. Bei *Daphnia magna* wurde dagegen eine Abnahme der Schwimmaktivität unter akutem Cadmiumstreß (3,5 und 5 µg/L, 20-22h) beobachtet (Wolf et al. 1998). Die Respirometerversuche zeigten, daß sich unter Chemikalienstreß die Verhältnisse zwischen mittlerem Sauerstoffverbrauch während der Lichtphasen zu mittlerem Sauerstoffverbrauch während der Dunkelphasen in Abhängigkeit von der Vorexpositionszeit verschieben. Dies könnte ein Indiz sein, daß die Chemikalienexposition Veränderungen im Verhalten der Organismen induziert.

Baird et al. (1990) vermuten, daß die unter chronischem Cadmiumstreß zu beobachtende Reduktion im Wachstum möglicherweise eine Folge genereller Streßantworten darstellt und auf eine tendenzielle Verminderung der Energieaufnahme bei geringerer Produktionseffizienz (konstante respiratorische Verluste bei geringerer Produktion) zurückzuführen ist. Eine reduzierte Freßaktivität war bei den dargestellten Experimenten nur unter chronischer Cadmiumexposition zu beobachten. Unklar ist, ob dieser Effekt eine Folge oder eine Ursache der Wachstumsinhibierung darstellt, da bei kürzerer Expositionszeit keine Effekte zu beobachten waren. DeCoeen und Janssen (1998) kalkulierten für die Inhibierung der Ingestionsrate nach 90minütiger Exposition einen EC_{50} -Wert von 0,68 mg $CdCl_2/L$, eine Konzentration, die sich nicht wesentlich vom LC_{50} (24 h) unterscheidet; längere Expositionszeiten führten tendenziell zu einem Rückgang der Effekte. Andere Autoren beobachteten dagegen akute Veränderungen bezüglich der Freßaktivität auch im Bereich chronischer Wirkkonzentrationen bei Einsatz von im Medium gelöstem (Allen et al. 1995) oder an Algen adsorbiertem Cadmium (Taylor et al. 1998). Bodar et al. (1988a) fanden keine Veränderungen der Assimilationseffizienz unter chronischem Cadmiumstreß und vermuten, daß die Nahrungsresorption über das Darmepithel nicht beeinträchtigt wird. DeCoeen und Janssen (1998) zeigten, daß die Ingestion durch Cadmium deutlicher reduziert wird als die Aktivität von Verdauungsenzymen. Dieser Befund spricht ebenfalls dafür, daß primär die Nahrungsaufnahme und nicht die Verdauung oder Resorption gestört wird. Griffiths (1980) berichtet dagegen von morphologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der Darmdivertikel von Daphnien bei Exposition an subletale Cadmiumkonzentrationen. Anhand der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse läßt sich keine Aussage bezüglich der physiologischen und energetischen Ursachen der Wachstumsreduktion der Daphnien treffen.

In den Untersuchungen von Baird et al. (1990) hatte die Reduktion im Wachstum indirekte Effekte auf die Brutgröße und -masse zur Folge. Bezogen auf das viertägige Versuchsintervall wurde in dieser Arbeit jedoch eine Steigerung der Anzahl an entlassenen Neonaten und des Biomasseanteils der Jungtiere relativ zu den Kontrollen beobachtet. Der stimulierende Effekt niedriger Cadmiumkonzentrationen auf die Reproduktionsrate, gemessen als kumulative Neonatenzahl, wird auch in der Literatur beschrieben (Klüttgen und Ratte 1994, Bodar et al. 1988b). Bodar et al. (1988b) kalkulierten für Konzentrationen bis 1 ppb nicht nur eine Zunahme der Neonatenzahl, sondern auch der Gesamtbiomasseproduktion bezogen auf 25 d.

Ein bisher nicht beobachtetes Phänomen sind die unter chronischer Chemikalienexposition auftretenden Veränderungen in der Tagesrhythmik der Sauerstoffverbrauchsrate. Unabhängig von der Chemikalienwirkung erhöhte sich bei akuter Exposition tendenziell die mittlere Sauerstoffverbrauchsrate während der Lichtphasen relativ zu den Dunkelphasen, oder es ergab sich ein den Kontrollen entsprechendes Verhältnis. Mit zunehmender Expositionsdauer verminderten sich dagegen die relativen Unterschiede und zum Teil war eine Umkehrung der Tendenzen zu beobachten. An dieser Stelle wären zusätzliche Daten über die lokomotorische Aktivität und die räumliche Verteilung der Tiere in der Testkammer für eine Interpretation notwendig. Zusammenhänge zu Randeffekten, wie einer höheren Neonatenzahl im Testgefäß, einer höheren Algendichte infolge einer Reduktion der Ingestionsrate oder Chemikalieneffekte auf die Photosyntheserate der Algen, waren nicht erkennbar. Die Tendenzen waren vergleichsweise konsistent trotz variierender Anzahl an Jungtieren. Weiterhin traten sie unabhängig von einer Hemmung der Ingestion auf, wie die akute Exposition an Cadmium beziehungsweise Kupfer oder CTAB zeigte. Andererseits ergaben sich bei gleichem Effekt auf die Ingestion positive und negative Effekte bezüglich der Tag/Nachtrelation, wie die akute und chronische Exposition an CTAB bewies. Direkte Chemikalieneffekte auf die Algenphysiologie sollten dagegen unabhängig von der Vorexpositionszeit der Daphnien in Erscheinung treten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß Exposition an subletale Schadstoffkonzentrationen (CTAB und Kupfer) im höheren Konzentrationsbereich nahe des letalen Schwellenwertes tendenziell zu einer Reduktion im Sauerstoffverbrauch führt. Dies läßt eine metabolische Depression der Organismen vermuten. Diese beobachteten Effekte wurden vor dem Hintergrund bekannter Wirkungen der Stoffe diskutiert. Die für die drei Modellsubstanzen erstellten Konzentrations-Zeit-Reaktionsmuster unterstützen die Hypothese, daß subletale Streßantworten, die eine Veränderung der physiologisch-energetischen Parameter Sauerstoffverbrauch

und Ingestion hervorrufen, dynamische, zeitabhängige Prozesse sind. Die zeitlichen Veränderungen in der Effektausprägung weisen stoffspezifische Unterschiede auf und sind möglicherweise auf die Fähigkeit der Organismen, durch physiologische Anpassungsmechanismen Toleranzen gegenüber den Schädwirkungen aufzubauen, beziehungsweise auf toxikokinetische Eigenschaften der Substanzen zurückzuführen. Die Daten liefern keine Anhaltspunkte, daß suborganismische Streßreaktionen die Gesamt-Energieverluste der Organismen erhöhen, wobei Energieverluste über anaerobe Stoffwechselwege jedoch unberücksichtigt blieben. Die Sensitivität der respirometrischen Methode ist jedoch auch nicht ausreichend, um Veränderungen der metabolischen Kosten zu ermitteln, wenn diese relativ zu den Gesamtstoffwechselverlusten gering sind (<10%). Andererseits ist zu untersuchen, ob energetische Kosten durch suborganismische Streßreaktionen nicht auf organischer Ebene kompensiert werden. Die expositionszeitabhängigen Veränderungen in der Tagesrhythmik der kohortenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate sind möglicherweise ein Indiz für Verhaltensänderungen der Daphnien.

Anhand der respirometrischen Versuche ließen sich chronisch-subletale Effekte mit einer dem Reproduktionstest vergleichbaren Sensitivität ermitteln. Bei dem gewählten experimentellen Design, bei dem zwei Entwicklungsstadien (die vorexponierten adulten Daphnien und die entlassenen Jungtiere) zum Gesamtsauerstoffverbrauch beitragen, war es schwierig, die Daten verschiedener Behandlungsstufen durch eine geeignete Bezugsgröße zu vereinheitlichen. Um das Verständnis speziell chronisch-subletaler Veränderungen im Energiehaushalt zu vertiefen, wurde für weitere Messungen an vorexponierten Daphnien das Versuchskonzept dahingehend modifiziert, daß die Datenerhebung vor Freisetzung der ersten Brut abgeschlossen war. Die Ergebnisse dieser Versuche sind im folgenden Kapitel dargestellt.

5. Veränderungen im Scope for Growth unter chronischer Chemikalienexposition: Ökotoxikologische Relevanz physiologischer Streßreaktionen

5.1 Einführung

In den in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen Effekten auf Sauerstoffverbrauch und Ingestion und physiologischen Veränderungen der Individuen im Bereich Wachstum und Reproduktion herzustellen sind. Wie in der Einleitung dargelegt, läßt sich anhand der Bilanzierung von Energieaufnahme und -verlusten des Organismus der Netto-Energiegewinn quantifizieren und damit die Biomasseproduktion abschätzen. Hierzu wurden die Daten, die für Sauerstoffverbrauch und Ingestion ermittelt wurden, auf Kohlenstoffebene zueinander in Beziehung gesetzt (vgl. Gl. 1, 2). Dieses Verfahren stellte eine starke Vereinfachung gegenüber einer vollständigen quantitativen Bilanzierung dar, da die Assimilation methodisch nicht direkt erfaßt wurde und die Kohlenstoffverluste anhand des Sauerstoffverbrauches auf der Basis eines konstanten, von der Chemikalienexposition unabhängigen respiratorischen Quotienten von '1' kalkuliert wurden. Energieverluste über Exkretionsprodukte und mögliche Endprodukte anaerober Stoffwechselprozesse blieben unberücksichtigt. Daher war zunächst zu untersuchen, mit welcher Sensitivität der mit dieser Methode abgeschätzte Netto-Energiegewinn (Scope for Growth, SFG), in diesem Fall speziell der Netto-Kohlenstoffzuwachs, Chemikalieneffekte auf den empirisch anhand von Trockengewichtsbestimmungen ermittelten Biomassezuwachs widerspiegelt.

Die im vorangehenden Kapitel dargestellten Experimente hatten gezeigt, daß Effekte auf den Sauerstoffverbrauch und die Ingestion und damit letztlich auch auf den integrativen Parameter SFG von der Expositionsdauer abhängen können. Die Bestimmung von Sauerstoffverbrauch und Ingestion erfolgte an chronisch vorexponierten Tieren, um Veränderungen in der energetischen Größe mit Effekten auf Endpunkte der chronischen Reproduktionstests vergleichen zu können. Um jedoch die Problematik zu umgehen, daß Neonaten in variabler Anzahl und über einen nicht näher zu definierenden Zeitraum zum Gesamtsauerstoffverbrauch beitragen, wurden die Messungen an adoleszenten Daphnien durchgeführt und kurz vor Freisetzung der ersten Brut beendet. Bei den bisher diskutierten Daten war eine Interpretation im Hinblick auf chemikalieninduzierte Veränderungen der metabolischen Aktivität der Daphnien aufgrund der variablen Neonatenfreisetzung erschwert. Daher wurde dieser Aspekt bei den Experimenten mit adoleszenten Daphnien nochmals aufgegriffen.

Weiterhin wurde untersucht, welche Bedeutung Veränderungen im Bereich der Energieverluste und der Fraßaktivität quantitativ für den Netto-Kohlenstoffzuwachs haben.

Parallel zu den physiologischen Messungen wurden in Reproduktionstests Chemikalieneinflüsse auf die Reproduktionsrate (kumulative Neonatenzahl pro überlebender Daphnie ($\sum mx$)) und die spezifische Zuwachsrate r untersucht. Anhand der verschiedenen Endpunkte wird die Vernetzung von Chemikalienwirkungen auf verschiedenen biologischen Ebenen und die ökotoxikologische Relevanz des energetischen Ansatzes im Hinblick auf mögliche Folgen für die Populationsebene diskutiert.

Zusammenfassung der Fragestellungen, die in diesem Kapitel diskutiert werden:

- (1) Mit welcher Sensitivität zeigt das SFG chronischen Chemikalienstreß an?
- (2) Korrelieren Effekte auf das SFG mit chemikalieninduzierten Veränderungen im Wachstum der Organismen und lassen sich Veränderungen im Wachstum auf einen erhöhten Energieverbrauch und / oder auf eine Reduktion der Energieaufnahme zurückführen?
- (3) Welcher Zusammenhang besteht zwischen energetischen Veränderungen und chronischen Chemikalieneffekten auf die Reproduktion und die spezifische Zuwachsrate r ?

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Chemikalieneffekte auf das SFG

Im Rahmen dieser Meßserien wurden die Auswirkungen streßinduzierter Veränderungen im Sauerstoffverbrauch und in der Ingestion auf die Kohlenstoffbilanz untersucht. Vergleichend zu den Effekten auf die energetische Meßgröße SFG wurden Veränderungen im Trockengewicht bestimmt. Weiterhin wurde anhand der Respirometerdaten die mittlere individuelle und gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate der Daphnien unter Verwendung der im Anhang beschriebenen Datenkorrektur für die Algenphotosynthese errechnet. Die unter chronischer Exposition an die drei Testsubstanzen ermittelten Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt.

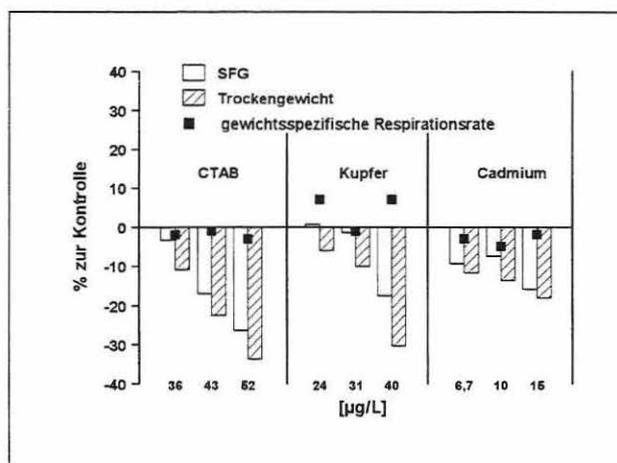


Abb. 17: Einfluß von CTAB, Kupfersulfat Pentahydrat und Cadmiumchlorid Monohydrat auf das SFG (kalkuliert als $C_{\text{Produktion}} = C_{\text{ingestiert}} - C_{\text{veratmet}}$ (Annahme: RQ 1) während des 5. bis 8. Expositionstages), das Trockengewicht (8. Tag) und die mittlere gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate ($\mu\text{L O}_2/\text{mg/h}$); die Ergebnisse sind als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von drei Kontrollen dargestellt, jeweils Mittelwerte von 2 Parallelen mit 10 Daphnien pro Konzentrationsstufe (24 und 40 $\mu\text{g/L}$ Kupfersulfat Pentahydrat Einzelwerte).

Die Bilanzierungen ergaben eine konzentrationsabhängige Abnahme des für Biomasseproduktion zur Verfügung stehenden Kohlenstoffanteils (SFG) unter chronischer Chemikalienexposition (Abb. 17). Kupfer verursachte nur bei der höchsten Testkonzentration Effekte; hier lag die Letalitätsquote während der fünftägigen Vorexposition bereits bei 30%. Bei den beiden anderen getesteten Konzentrationen starben 17 und 13% der Daphnien während der Vorexposition. Cadmium induzierte Effekte über einen breiteren Konzentrationsbereich; die Konzentrationsabhängigkeit war weniger stark ausgeprägt. Die Überlebensrate wurde in diesem Fall nicht beeinträchtigt. Die deutlichsten Abweichungen in der Energiebilanz relativ zu den Kontrollwerten waren unter CTAB-Exposition zu beobachten (-26 % bei der höchsten Testkonzentration). Die Letalitätsquote lag hier bei 30%. Wie aus Abb. 17 ersichtlich wird, wurden generell gute Korrelationen bezüglich Veränderungen im SFG und im Trockengewicht der Daphnien erzielt. Unter Cadmiumexposition wurden die Chemikalieneffekte auf das Daphniengewicht anhand der physiologischen Parameter leicht unterschätzt, deutlichere Diskrepanzen ergaben sich bei den Testsubstanzen CTAB und Kupfer. In Anlehnung an die Ergebnisse des vorangehenden Kapitels besteht eine mögliche Erklärung darin, daß Wachstumsbeeinträchtigungen vor allem aus der

frühen Expositionsphase stammen und die Effekte zum Zeitpunkt der Messungen bereits rückläufig waren.

In Abb. 18 sind die der Bilanzierung zugrunde liegenden Absolutwerte für die Größen Energieaufnahme (Kohlenstoffaufnahme) und Energieverbrauch (Kohlenstoffverbrauch) unter Chemikalienexposition sowie für die jeweiligen Kontrollen dargestellt. Die Differenz zwischen den Balken entspricht dem kalkulierten SFG. In Tab. 22 werden die absoluten Differenzen der beiden Meßparameter den relativen Abweichungen zu den unbehandelten Daphnienkohorten gegenübergestellt.

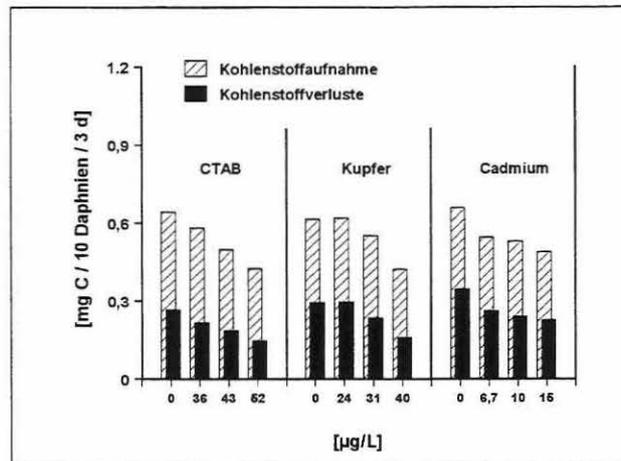


Abb. 18: Kalkulierte Absolutwerte für Kohlenstoffaufnahme und Kohlenstoffverluste (mg C/10 Daphnien/3 d; Annahme: RQ 1) unter chronischer Exposition an CTAB, Kupfersulfat Pentahydrat und Cadmiumchlorid Monohydrat während des 5. bis 8. Expositionstages, jeweils Mittelwerte von 2 Parallelen mit 10 Daphnien pro Konzentrationsstufe (24 und 40 µg/L Kupfersulfat Pentahydrat Einzelwerte); die Differenz zwischen den Balken entspricht dem SFG.

Die Reduktion im SFG resultierte bei allen drei Substanzen aus dem Umstand, daß die Kohlenstoffaufnahme infolge der Chemikalienexposition, absolut betrachtet, stärker abnahm als der Energieverbrauch. Auf Effektebene, bezogen auf die relativen Abweichungen zu den Kontrollwerten, sind die Auswirkungen auf den Sauerstoffverbrauch stärker ausgeprägt (vgl. Tab. 22). Bei einer Interpretation der Daten im Hinblick auf Mechanismen ist zu berücksichtigen, daß die anhand des Sauerstoffverbrauches kalkulierten Kohlenstoffverluste unterschätzt wurden, wenn unter Streß zusätzlich anaerobe Stoffwechselwege beschränkt wurden. Auch blieben Chemikalieneffekte auf den respiratorischen Quotienten der Daphnien und den Kohlenstoffgehalt der Algen in den Energiebilanzen unberücksichtigt.

Tab. 22: Chemikalieneffekte auf Kohlenstoffaufnahme und -verluste als prozentuale Abweichungen und als absolute Differenz zu den Kontrollen.

	Ingestion [%]	Sauerstoff- verbrauch [%]	Ingestion [mg C]	Sauerstoff- verbrauch [mg C]
CTAB [$\mu\text{g/L}$]				
36	-10	-19	-0,06	-0,05
43	-23	-31	-0,15	-0,08
52	-34	-46	-0,22	-0,12
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]				
24	1	0	0,00	0,00
31	-10	-20	-0,06	-0,06
40	-31	-46	-0,19	-0,13
$\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]				
6,7	-17	-24	-0,11	-0,08
10	-20	-31	-0,13	-0,11
15	-26	-35	-0,17	-0,12

Durch Kalkulation der gewichtsspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate wurde untersucht, welchen Einfluß Chemikalienexposition letztlich auf die metabolischen Kosten der Daphnien hat.

Für die insgesamt neun unbehandelten Kontrollkohorten der drei Experimente ergab sich nach Datenkorrektur für die Algenphotosynthese eine mittlere gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von $5,1 \pm 0,3 \mu\text{L O}_2/\text{mg/h}$. Bohrer und Lampert (1988) ermittelten für gefütterte adulte Daphnien (2. Brut tragend) eine Sauerstoffverbrauchsrate von $0,25 \pm 0,01 \mu\text{mol O}_2/\text{mg/h}$, das entspricht ca. $5,6 \mu\text{L O}_2/\text{mg/h}$. Die mit der hier verwendeten Methodik erzielten Werte liegen etwas niedriger, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß jeweils die nach Abschluß der Respirometermessungen ermittelte Biomasse als Bezugsgröße für das dreitägige Meßintervall hinzugezogen wurde und nicht ein mittleres Trockengewicht.

Die Chemikalieneffekte auf die gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate der Daphnien sind in Tab. 23 aufgeführt.

Tab. 23: Chemikalieneffekte (% zur Kontrolle) auf den kohortenspezifischen Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/10$ Tiere/3 d] und die gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate [$\mu\text{L O}_2/\text{mg TG/h}$] nach Korrektur der Meßdaten hinsichtlich der Algenphotosynthese; angegeben sind jeweils Mittelwerte von 2 Parallelansätzen mit 10 Daphnien pro Konzentrationsstufe (24 und 40 $\mu\text{g/L}$ Kupfersulfat Pentahydrat Einzelwerte).

	Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2 / 10$ Tiere/3 d] [%]	Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/\text{mg TG/h}$] [%]
CTAB [$\mu\text{g/L}$]		
36	-13	-2
43	-24	-1
52	-36	-3
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]		
24	0	7
31	-12	-1
40	-25	7
$\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ [$\mu\text{g/L}$]		
6,7	-15	-3
10	-18	-5
15	-20	-2

Die unter Schadstoffexposition zu beobachtenden konzentrationsabhängigen Abnahmen im individuellen Sauerstoffverbrauch, in diesem Fall summarisch für zehn Daphnien ermittelt, konnten durch Verrechnung des Trockengewichtes weitestgehend eliminiert werden (Tab. 23).

Die Schadstoffeffekte auf den Sauerstoffverbrauch wurden nach diesen Ergebnissen durch den reduzierten Gewichtszuwachs ausgelöst; Hinweise auf direkte chemikalieninduzierte Effekte auf die metabolischen Kosten ergaben sich nicht.

5.2.2 Wachstum und Reproduktion unter chronischer Chemikalienexposition

Parallel zu den physiologisch-energetischen Messungen zur Bestimmung des SFG wurden die Auswirkungen der drei Chemikalien auf Längenwachstum und Reproduktion von Daphnien untersucht, um Effekte auf den Energiehaushalt zu Veränderungen im Bereich Wachstum und Reproduktion in Beziehung setzen zu können. Die anhand von 10 Daphnien pro Konzentrationsstufe ermittelten Ergebnisse dieser Experimente sind in den Abb. 19-24 sowie in Tab. A6 im Anhang zusammengefaßt. In den genannten Graphiken sind jeweils Chemikalieneffekte auf die Carapaxlänge am 8. Expositionstag, die Reproduktionsrate (Σmx : kumulative Neonatenzahl pro überlebender Daphnie) und die spezifische Zuwachsrate r zusammen mit der Letalitätsquote dargestellt.

CTAB

CTAB-Exposition verursachte eine konzentrationsabhängige Abnahme des Längenwachstums während der Juvenil- beziehungsweise Adoleszenzphase der Daphnien, wie aus Abb. 19 ersichtlich wird. Die Effekte korrelierten mit der in Abb. 17 dargestellten Gewichtsreduktion. Parallel hierzu wurde eine Steigerung der Reproduktionsrate beobachtet und in Zusammenhang damit auch eine Zunahme der spezifischen Zuwachsrate r (Abb. 20). Lediglich bei der höchsten Testkonzentration wurden die Folgen der erhöhten Reproduktionsrate auf den Parameter r durch die Zunahme der Letalität ausgeglichen. Die bei Exposition an 52 $\mu\text{g/L}$ zu beobachtende Letalitätsquote von 50% entsprach etwa dem für diese Substanz kalkulierten EC_{50} -Wert (72 h) von 45 $\mu\text{g/L}$ (vgl. Tab. 13). Eine Verlängerung der Expositionszeit wirkte sich demnach nicht auf die Sensitivität gegenüber letalen Wirkungen der Substanz aus. Längenbestimmungen der Neonaten, die am 9. und 16. Expositionstag an jeweils 10 Tieren einer Konzentrationsstufe vorgenommen wurden, wobei am 9. Tag zwei Testansätze noch keine Jungtiere enthielten, ergaben keine Hinweise auf Chemikalieneffekte, jedoch war der Stichprobenumfang sehr klein (Daten nicht dargestellt). Bezüglich der Interpretation der Reproduktionsdaten ist anzumerken, daß die in diesem Experiment für die Kontrolle ermittelte mittlere kumulative Neonatenzahl sowie auch die spezifische Zuwachsrate niedriger ausfielen als üblich, wie aus den Tabellen A6 im Anhang dieser Arbeit zu ersehen ist. Die Konzentrationsabhängigkeit bezüglich der Effekte auf Längenwachstum und Neonatenproduktion deuten jedoch darauf hin, daß die altersspezifische Verteilung der Energieressourcen zwischen Reproduktion und Wachstum durch die Chemikalie verändert wird. Eine Verlängerung der Juvenilperiode als Folge des reduzierten Wachstums war nicht zu beobachten. Am 5. Versuchstag waren erstmals Brutdepositionen festzustellen; am 6. Tag wiesen, konzentrationsunabhängig, 50-80% der Daphnien Bruten auf.

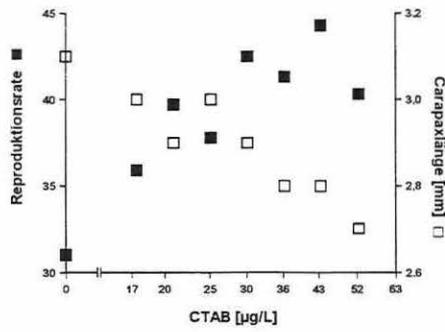


Abb. 19: CTAB

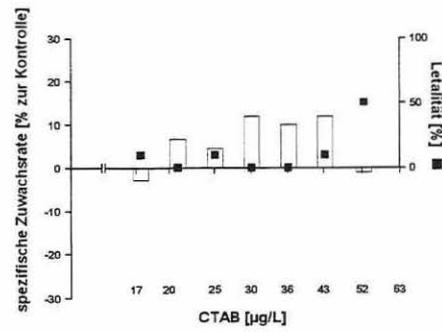


Abb. 20: CTAB

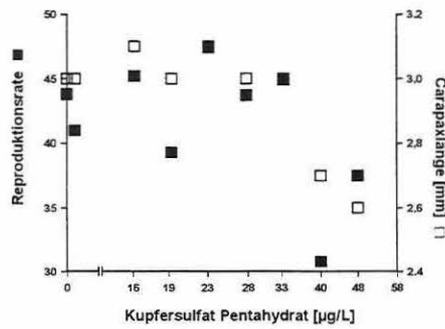


Abb. 21: Kupfer

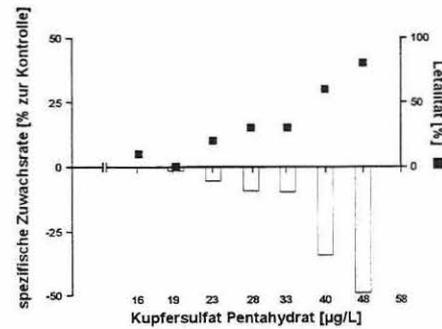


Abb. 22: Kupfer

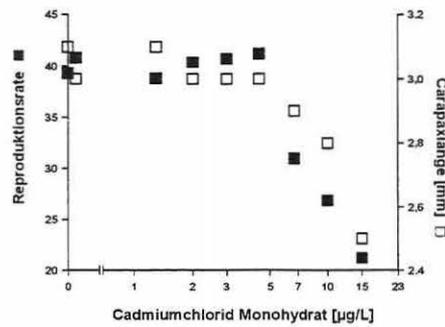


Abb. 23: Cadmium

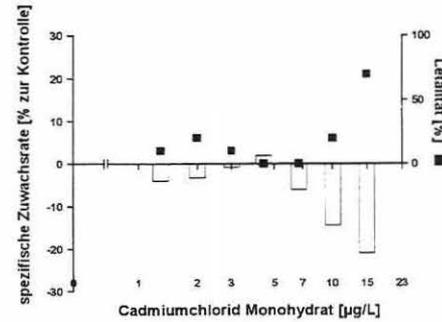


Abb. 24: Cadmium

Abb. 19-24: Ergebnisse der chronischen Reproduktionstests (17 d). Linke Spalte: Effekte auf die mittlere Carapaxlänge [mm] am 8. Expositionstag und die Reproduktionsrate (Σmx). Rechte Spalte: Effekte auf die die mittlere spezifische Zuwachsrates [% zur Kontrolle] (Balken) und die Letalitätsquote [%].

Kupfer

Die Ergebnisse des Reproduktionstests mit Kupfersulfat Pentahydrat sind in den Abb. 21 und 22 dargestellt.

Wie auch die Experimente für die Berechnung der Energiebilanzen gezeigt hatten, ist der chronische Wirkungsbereich dieses Metalls sehr eng. Erst ab einer Konzentration von 40 µg/L wurden Effekte auf Längenwachstum und Reproduktionsrate festgestellt. Die Letalitätsquote lag bei dieser Schadstoffkonzentration bei 60%. Bei Exposition an 23 bis 33 µg/L waren bereits letale Effekte zu beobachten. Anhand des Akuttests wurde, abhängig von der Wahl der Modellierung, ein EC₅₀-Wert (72 h, Letalität) von 39 und 48 µg/L Kupfersulfat Pentahydrat kalkuliert (Tab. 14).

Aus den letalen Effekte resultierte eine Abnahme der spezifischen Zuwachsrates im entsprechenden Konzentrationsbereich. Die Ergebnisse der Längenmessungen bestätigen die Daten der SFG- und Trockengewichtsbestimmungen. Bei einer Konzentration von 40 µg/L (10,2 µg Cu/L) wurde nach 8-tägiger Expositionszeit für beide Parameter eine Verminderung gegenüber unbelasteten Daphnien nachgewiesen, begleitet von einer Abnahme der Überlebensrate.

Cadmium

Chronischer Cadmiumstreß verursachte bei den Daphnien eine deutliche Verminderung des Wachstums und der Reproduktionsrate, wie Abb. 23 zeigt. Die Effekte traten ab einer Konzentration von 6,7 µg/L Cadmiumchlorid Monohydrat (3,7 µg Cd/L) auf. Auch bei dieser Testserie stimmten die Auswirkungen auf das Längenwachstum mit den zuvor bestimmten Ergebnissen bezüglich der Biomasseproduktion tendenziell überein. Effekte auf die spezifische Zuwachsrates wurden in Gegenwart von 10 und 15 µg/L sichtbar. Bei der letztgenannten Konzentrationsstufe war jedoch auch die Letalitätsquote deutlich erhöht (70%) (Abb. 24). Für den Parameter Immobilität wurde ein EC₅₀-Wert (17 d) von 14,2 µg/L Cadmiumchlorid Monohydrat kalkuliert (bezogen auf den Cadmiumanteil 7,9 µg Cd/L). Die letalen Effektkonzentrationen des Akuttests wurden damit bei Verlängerung der Expositionszeit um mehr als den Faktor 10 unterschritten. Für die Reproduktion ergab sich anhand der Konzentrations-Wirkungsbeziehung (logistisch-sigmoidale Funktion) eine EC₅₀-Konzentration von 14,7 µg/L (8,2 µg Cd/L). Ein verzögertes Einsetzen der Reife war nicht zu beobachten. Am 6. Versuchstag wurden erstmals Tiere mit Brut registriert; am 7. Tag waren bei 50-90% der Daphnien einer Konzentrationsstufe Brutdepositionen zu beobachten.

Für die Diskussion sind die Ergebnisse der Energiebilanzierungen sowie die Chemikalieneffekte auf Längenwachstum und Reproduktion bezogen auf die Gesamtbrutanlage (Neonate und Aborte), da diese für die relative Energieaufteilung maßgebend ist, nochmals in Abb. 25 zusammengefaßt.

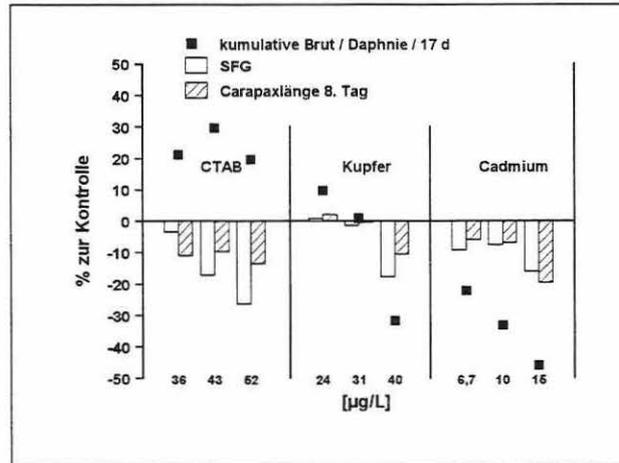


Abb. 25: Chemikalieneffekte auf das SFG, summarisch für 10 Daphnien während des 5.-8. Expositionstages ermittelt, sowie die mittlere Carapaxlänge der Primiparae und die Reproduktionsrate unter Berücksichtigung aborter Eier (kumulative Brut pro überlebender Daphnie) in den chronischen Reproduktionstests. (Im Beispiel Kupfer wurden den SFG-Daten bei einer Konzentration von 24 µg/L die bei 23 µg/L ermittelten Längen- und Reproduktionsdaten gegenübergestellt. Die unter 31 µg/L angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der im Reproduktionstest bei 28 und 33 µg/L erzielten Werten).

CTAB-Effekte auf die Carapaxlänge der Primiparae wurden anhand der Kohlenstoffbilanz deutlich überschätzt; unter Cadmiumexposition wiesen die Effekte bezüglich der verschiedenen Parameter eine größere Konsistenz auf. Bei der Interpretation ist zu berücksichtigen, daß die Daten aus unabhängigen Versuchen stammen.

5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Chronische Exposition an CTAB, Kupfer und Cadmium führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des SFG (Netto-Kohlenstoffzuwachs), kalkuliert anhand der Abnahme des Algenbiovolumens und des Sauerstoffverbrauches der Daphnienkohorten (vgl. Gl. 3, 5; Annahme: RQ 1; TOC-Gehalt der Algen verändert sich nicht unter Chemikalienexposition). Die Effekte auf das SFG, die über ein Intervall von 3 d während der ersten Brutdeposition kalkuliert wurden, spiegelten tendenziell die Reduktion im Trockengewicht und der Carapaxlänge der Primiparae wider.
- Die kalkulierte Reduktion im Netto-Kohlenstoffzuwachs resultierte aus einer Verminderung der absoluten Kohlenstoffingestion, die durch den Rückgang respiratorischer Verluste nur partiell ausgeglichen wurde. Relativ zu den unbelasteten Daphnienkohorten waren dagegen die Effekte auf den Parameter Sauerstoffverbrauch deutlicher ausgeprägt.
- Die Abnahme der individuellen Sauerstoffverbrauchsrate war in erster Linie Folge der verminderten Wachstumsrate. Effekte auf die gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate wurden nicht festgestellt.
- Unter Cadmiumexposition wurde die Reduktion im Längenwachstum der Daphnien von einer Abnahme der Reproduktionsrate begleitet, d.h. die Energieinvestition in Wachstum und Reproduktion nahm ab. Gleiche Tendenzen wurden unter Kupferexposition beobachtet. Der sensitivere Effektparameter im chronischen Reproduktionstest war jedoch die Letalitätsrate. In Gegenwart von CTAB wurde ein inverses Verhalten bezüglich Wachstum und Reproduktion beobachtet; es wurden vermehrt Ressourcen in Reproduktion investiert und weniger in Körperwachstum. Bei abnehmender Carapaxlänge der Primiparae nahm die kumulative Neontenzahl pro Daphnien bezogen auf einen Expositionszeitraum von 17 d zu.

5.3 Diskussion

Die hier vorgestellten Experimente wurden vor dem Hintergrund durchgeführt, eine mögliche Vernetzung von Wirkungen auf verschiedenen biologischen Ebenen aufzuzeigen und Erkenntnisse bezüglich der ökotoxikologischen Relevanz physiologisch-energetischer Chemikalieneffekte zu gewinnen.

Zunächst war zu klären, welche Konsequenzen Veränderungen im Energiehaushalt letztlich für das Individuum haben, d.h. in welchem Maße sich Effekte auf Ingestion und Sauerstoffverbrauch auf den Netto-Kohlenstoffzuwachs auswirken. Da die Kalkulation der energetischen Meßgröße auf verschiedenen Annahmen beruhte, die experimentell nicht verifiziert wurden, wurde im ersten Schritt untersucht, mit welcher Sensitivität die mit diesem Verfahren bestimmte energetische Meßgröße Effekte auf das Wachstum von Organismen im Vergleich zu Trockengewichtsbestimmungen erfaßt.

Für die drei Modellsubstanzen konnte gezeigt werden, daß mit der verwendeten Methode Chemikalieneffekte auf das Wachstum von Daphnien, gemessen als Längen- oder Gewichtszuwachs, anhand physiologischer Messungen über vereinfachte Energiebilanzen abgeschätzt werden können. Das SFG ist demzufolge ein geeigneter Indikator, um Effekte auf das Wachstum von Daphnien unter chemischem Streß aufzuzeigen. Der Einsatz des SFG als Indikator für Umweltstreß wird seit den 90er Jahren diskutiert. Die ersten Untersuchungen in diesem Gebiet fanden vornehmlich an Muscheln statt (Widdows und Johnson 1988, Gilfillan 1980, Koehn und Bayne 1989, Sobral und Widdows 1997), aber auch an anderen Organismen wurde das Scope for Growth-Konzept überprüft (Maltby und Naylor 1990, Din und Ahamad 1995). Bayne und Worrall (1980) wiesen dabei eine gute Korrelation zwischen Wachstum und den Ergebnissen integrativer physiologischer Messungen für *Mytilus edulis* nach. Lynch et al. (1986) berichten, daß nach ihren Messungen bei Daphnien die über die physiologischen Parameter abgeschätzte Netto-Kohlenstoffaufnahme höher liegt als der empirisch bestimmte Kohlenstoffzuwachs. Grant und Cranford (1991) stellten fest, daß SFG-Messungen die Sekundärproduktion bei Stickstoffmangel überschätzen. Hieraus wird deutlich, daß die Wahl der Meßmethodik sowie die Randbedingungen großen Einfluß auf das Ergebnis der Bilanzierung haben können.

Bezüglich der Sensitivität war die mit dieser Methode bestimmte energetische Meßgröße vergleichbar mit den Parametern der chronischen Reproduktionstests, was vor allem in den Cadmiumexperimenten aufgrund des hohen Akut : Chronisch-Wirkverhältnisses sichtbar wurde. Bei der niedrigsten getesteten Konzentration (6,7 µg/L Cadmiumchlorid Monohydrat) war das SFG bereits relativ zu den Kontrollen reduziert (-9%); bei dieser Konzentration waren auch deutliche Effekte auf die Reproduktionsrate zu beobachten (-23%).

Die hier aufgezeigten chronischen Effekte unter Cadmiumstreß korrelieren weitestgehend mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. Als LC_{50} werden in der Literatur Konzentrationen von 10 $\mu\text{g Cd/L}$ (25 d; Bodar et al. 1988b), 14 $\mu\text{g Cd/L}$ (21 d; van Leeuwen et al. 1985) und 5 $\mu\text{g Cd/L}$ (21 d; Biesinger und Christensen 1972) angegeben. Der NOEC für den Parameter Reproduktion liegt bei 0,6 $\mu\text{g/L}$ (Kühn et al. 1989), Biesinger und Christensen (1972) bestimmten einen EC_{50} -Wert von 0,7 $\mu\text{g/L}$. Eine leichte Zunahme der Reproduktion in Gegenwart niedriger Cadmiumkonzentrationen wurde von Klüttgen und Ratte (1994) beobachtet. Effekte auf die Juvenilentwicklung wiesen sie in erster Linie unter futterlimitierten Bedingungen nach; in Gegenwart hoher Algendichten erwiesen sich dagegen Reproduktion und Carapaxlänge als sensitivste Streßindikatoren. Die Sensitivität des Parameters Wachstums als Endpunkt für chronischen Cadmiumstreß bestätigen auch die Untersuchungen von van Leeuwen et al. (1985). Baird et al. (1990) vermuten, daß Cadmiumeffekte auf Brutgröße und -masse indirekt durch Reduktion des Längenwachstums verursacht werden. Andere Autoren berichten dagegen von teratogenen Effekten des Schwermetalls (van Leeuwen et al. 1985). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente lieferten keine Hinweise auf direkte Schädigung der Brut. Aborte konnten zwar, wie auch in den chronischen Experimenten mit CTAB und Kupfer, beobachtet werden, doch war deren Anzahl in den Kontrollen und in Konzentrationsstufen, in denen keine Letalität auftrat, am höchsten. Aufgrund dieser Korrelationen wurde die direkte Schädigung der Brut als negative Auswirkung der hohen Tierdichte und nicht als Schadstoffeffekt bewertet.

Zur chronischen Daphnientoxizität von CTAB liegen keine Literaturdaten vor. Für das kationische Tensid DSDMAC (Distearyldimethylammoniumchlorid) geben Lewis und Wee (1983) ein Akut : Chronisch-Wirkverhältnis (NOEC 0,38 mg/L / LC_{50} (48 h) 3,2 mg/L) von 0,12 an. Chronische CTAB-Effekte manifestierten sich dagegen nach den vorliegenden Daten lediglich in einer Reduktion im Wachstum während der Juvenilperiode ab einer Konzentration von 36 $\mu\text{g/L}$. Das SFG war in diesem Konzentrationsbereich gegenüber der Kontrolle leicht vermindert. Auf die Reproduktion wirkte die Substanz tendenziell stimulierend.

Kupfereffekte auf das SFG sowie auf die Reproduktionsrate traten bei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/L}$ Kupfersulfat Pentahydrat auf; die spezifische Zuwachsrates r war bereits ab 28 $\mu\text{g/L}$ leicht vermindert. Die Literaturangaben bezüglich Sensitivität verschiedener chronischer Endpunkte und Effektkonzentrationen sind uneinheitlich. Als LC_{50} (21 d) sind Werte von 1,4 $\mu\text{g Cu/L}$ (Dave 1984) aber auch 44 $\mu\text{g/L}$ (Biesinger und Christensen 1972) zu finden. Bezüglich der Reproduktion wurden stimulierende Effekte beobachtet (Dave 1984, Winner und Farrell 1976). Flickinger et al. (1982) folgern aus ihren Experimenten, daß die Länge der Neonaten als empfindlicher Pa-

parameter für subletalen Kupferstreß zu bewerten ist, wohingegen die Betrachtung der mittleren Brutgröße zu widersprüchlichen Aussagen führt. Nach Untersuchungen von van Leeuwen et al. (1987, 1988) waren Effekte auf die spezifische Zuwachsrates in erster Linie auf eine erhöhte Mortalitätsrate und weniger auf eine Abnahme der Reproduktionsrate zurückzuführen. Die Sensitivität der Parameter Reproduktion, Überlebensrate und Populationswachstumsrate ist nach den Untersuchungen von Winner et al. (1977) auch von der Futterqualität abhängig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Annahme, daß die Überlebensrate der Daphnien einen empfindlicheren Indikator für chronischen Kupferstreß darstellt als die Reproduktionsrate.

In der bisher geführten Diskussion stand die Empfindlichkeit des SFG als Streßindikator im Vordergrund. Im folgenden Teil soll nun erörtert werden, ob der physiologische Ansatz Einblick in Mechanismen liefert, auf denen chronische Chemikalieneffekte basieren. Für die drei Testsubstanzen wurde gezeigt, daß die Verringerung des für Produktion zur Verfügung stehenden Energieanteils in erster Linie durch eine Verminderung der Kohlenstoffaufnahme verursacht wird.

Eine Abnahme des SFG infolge einer reduzierten Nahrungsabsorption wurde ebenfalls in Experimenten mit *Gammarus* unter Zinkexposition (Maltby und Naylor 1990, Naylor et al. 1989) und infolge niedriger pH-Werte beobachtet (Naylor et al. 1989) sowie von Widdows und Johnson (1988), die den Einfluß von Kupfer und Dieselöl auf die Energiebilanz von *Mytilus edulis* untersuchten. Andere Autoren berichten, daß Kupferstreß sowohl die Energieaufnahme vermindert als auch den Energieverbrauch erhöht, wobei der Beitrag der beiden Größen zum Gesamteffekt von der Expositionsdauer abhängt (Sobral und Widdows 1997). Untersuchungen bei *Mysidopsis* ergaben eine Zunahme der metabolischen Kosten in Verbindung mit einer reduzierten Wachstumsrate unter Chemikalienexposition (McKenney und Matthews 1990, McKenney et al. 1991). DeCoen und Janssen (1997) entwickelten einen modifizierten energetischen Ansatz als Biomarker für toxischen Streß (Cellular Energy Allocation Methodology), indem sie die biochemischen Energiereserven eines Organismus dem Energieverbrauch, gemessen als Elektronentransportaktivität, gegenüberstellen. Sie vermuten, daß Quecksilber das Energiebudget von Daphnien in erster Linie über eine Reduktion der Energieaufnahme vermindert, Lindan im niedrigeren Konzentrationsbereich dagegen möglicherweise über eine Erhöhung der metabolischen Kosten. Penttinen und Kukkonen (1998) unterstützen die Hypothese, daß über Calorimetrie substanzspezifische Effekte auf den Gesamtmetabolismus nachweisbar sind, die damit Hinweise auf Wirkmechanismen liefern. Der Vergleich der Ergebnisse mit Literaturbefunden wird durch die Unterschiede in den methodischen Ansätzen, wie beispielweise unterschiedliche Expositionszeiten und Ausmaß der Behinderung der lokomotorischen Aktivität durch die Geometrie der Meßkam-

mern, erschwert. Ein weiterer Aspekt ist, daß, wie von Barber et al. (1994) zusammengefaßt, die Parameter Energieaufnahme und Energieverbrauch über die Komponente SDA direkt verknüpft sind. Eine streßinduzierte Erhöhung der Proteinsynthese resultiert in einer Zunahme der Energieverluste im Bereich der SDA ('demand side' effects); reduzierte Nahrungsaufnahme vermindert dagegen die Kosten für SDA ('supply side' effects), wobei sich beide Prozesse unter Umständen überlagern. Eine konstante gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate trotz Reduktion der Freßrate und des Wachstums ist möglicherweise als Indiz für eine Kompensation durch erhöhte Energieverluste in anderen Stoffwechselbereichen zu bewerten (Barber et al. 1990, Calow 1991), wie im vorangehenden Kapitel bereits diskutiert. Die Aussagekraft der Sauerstoffverbrauchsrate als Streßindikator ist aufgrund der Vielzahl der involvierten Prozesse begrenzt. Die Betrachtung der Kohlenstoffbilanzen läßt vermuten, daß Veränderungen der metabolischen Rate für den Netto-Kohlenstoffzuwachs vor allem unter futterlimitierten Bedingungen relevant werden, wohingegen bei Nahrungsüberschuß, wie in diesem Laborexperiment, Effekte auf die Freßaktivität dominieren (vgl. Abb. 18).

Ein weiteres Problem bei der Interpretation der Ergebnisse stellt die Unterscheidung zwischen Ursache und Wirkung dar. Eine Abnahme der Freßrate kann einerseits eine Wachstumsreduktion verursachen, andererseits aber auch sekundär aus einer Wachstumsretardierung resultieren, da die maximale Ingestionsrate (siehe McCauley et al. 1990b) und Assimilationsrate (Paloheimo et al. 1982) von der Körperlänge abhängig ist. Zusammenhänge zwischen Körpergröße und physiologischen Parametern werden über die allometrische Funktion $Y = a W^b$ beschrieben, wobei a , b über log-log Transformation der physiologischen Größe Y und der Körpergröße W ermittelt werden (siehe Kooijman 1986). Aufgrund der engen Vernetzung von Ingestion, Sauerstoffverbrauch und Wachstum wäre zur Erkennung kausaler Zusammenhänge und Mechanismen chronischer Toxizitäten eine exakte Modellierung experimenteller Daten vorteilhaft. Eine Aussage, ob die Reduktion der gemessenen Ingestion ausschließlich eine Folge der reduzierten Körpergröße ist oder ob die verminderte Energieaufnahme möglicherweise in Kombination mit einer verminderten Produktionseffizienz (konstante respiratorische Verluste bei verminderter Produktionseffizienz), wie im vorangehenden Kapitel diskutiert, die Wachstumsreduktion determiniert, ist auch anhand der Ergebnisse dieser Versuchsserie nicht zu treffen. Um die Genauigkeit der Methode zu erhöhen, wären Korrekturen hinsichtlich der Algenphotosynthese notwendig. Für die SFG-Kalkulation wurde die Algenphotosynthese nicht berücksichtigt, da Sauerstoffverbrauch und Ingestion mit der Methode unterschätzt werden (vgl. 3.3). Diese Vereinfachung ist möglicherweise mit ein Grund, daß der Sauerstoffverbrauch prozentual unter Chemikalienstreß stärker vermindert war als die Ingestion (vgl. Tab. 22), da der Fehler bezüglich der Parameter nicht exakt gleich war. Ein anderer Aspekt ist, daß anhand von C-Verlusten, selbst wenn diese

summarisch direkt erfaßt werden und nicht anhand des Sauerstoffverbrauches abgeschätzt werden, zusätzliche Energieverluste unter Chemikalienstreß unter Umständen nicht erfaßt werden. Forbes und Depledge (1992) fanden bei *Hydrobia ulvae* keine Veränderungen in den Gesamt-Kohlenstoffbilanzen unter chronischer Cadmiumexposition trotz reduzierter Wachstumsraten. Die Autoren vermuten, daß sich möglicherweise aufgrund einer zunehmenden Beschreitung anaerober Stoffwechselprozesse der Energiegehalt der Ausscheidungsprodukte erhöht und diese somit in die Bilanz mit einzubeziehen sind. Weiterhin beeinträchtigen möglicherweise auch geringfügige Veränderungen der Ingestions- und Sauerstoffverbrauchsrate, die in physiologischen Kurzzeitmessungen nicht signifikant auflösbar sind, langfristig die Nettoproduktion (Forbes und Forbes 1994).

Befürworter des Scope for Growth-Modells sehen einen weiteren Vorteil dieses Ansatzes in der Möglichkeit der Extrapolation von physiologischen Veränderungen hin zu Effekten auf höheren organisatorischen Ebenen. Der folgende Teil der Diskussion ist daher fokussiert auf die ökotoxikologische Bedeutung des Scope for Growth-Ansatzes. Aufgrund der relativ guten Übereinstimmung zwischen Chemikalieneffekten auf SFG und Längenwachstum steht grundsätzlich die Korrelation zwischen Wachstum und Reproduktionserfolg des Individuums zur Diskussion. Lampert und Trubetskova (1996) postulieren, daß die Juvenilenwachstumsrate ein Indikator für die Fitness (intrinsic rate) von Daphnienpopulationen darstellt. Auch Santojanni et al. (1998) vermuten, daß sich Effekte auf die Reproduktion auf der Basis von Längenmessungen vorhersagen lassen. Johnson und Delaney (1998) verglichen die Sensitivität eines 7-Tage Wachstumstests mit den Ergebnissen von 21d-Reproduktionstests vor dem Hintergrund einer Verbesserung des Kosten-Nutzenverhältnisses subletaler Toxizitätstestung.

Eine Korrelation zwischen Wachstum und Reproduktion basiert auf der Annahme, daß ein konstanter Anteil der Gesamtproduktion auf die Reproduktion entfällt, unabhängig von Umwelteinflüssen auf das Wachstum (Lampert und Trubetskova 1996). Während sich unter Cadmiumexposition eine positive Korrelation zwischen Wachstum und Reproduktion abzeichnete, wurde in Anwesenheit von CTAB eine inverse Effektausprägung bezüglich der beiden Parameter beobachtet. Unter Kupferexposition waren die Effekte uneinheitlicher, jedoch war der chronische Wirkungsbereich in diesem Fall begrenzt und der Stichprobenumfang durch letale Effekte bereits deutlich vermindert (vgl. Abb. 19, 21, 23).

Zur Beschreibung der Verteilung der assimilierten Energie auf Wachstum, Reproduktion und Erhaltungstoffwechsel wurden verschiedene dynamische Energiebudget (DEB)-Modelle entwickelt. Noonburg et al. (1998) teilen diese Modelle in zwei Gruppen ein: Netto-Produktionsmodellen liegt die Annahme zugrunde, daß von der assimilierten Energie zunächst der für den Erhaltungstoffwechsel notwendige

Anteil abgeführt wird. Von der verbleibenden Energiemenge steht ein Anteil $(1-\chi)$ der Reproduktion zur Verfügung, der Anteil (χ) wird für Wachstum verwendet. In Netto-Assimilationsmodellen wird zunächst ein Anteil $(1-\kappa)$ des Assimilates der Reproduktion beziehungsweise, nach dem Modell von Kooijman (1993), Entwicklung und Reproduktion zugeführt. Der Anteil κ geht in die Bereiche Erhaltungsstoffwechsel und Wachstum, wobei der Erhaltungsstoffwechsel vorrangig versorgt wird. Einen grundlegenden Unterschied zwischen den beiden Konzepten sehen die Autoren darin, daß in Netto-Produktionsmodellen Wachstum und Reproduktion gleiche Priorität haben und unabhängig von der Nahrungskonzentration sind. Noonburg et al. (1998) wiesen für beide Modelle Diskrepanzen zwischen kalkulierter und experimentell ermittelter Reproduktionsrate bei niedrigen Nahrungskonzentrationen in Verbindung mit kurzzeitigen Hungerphasen nach. Nach Kooijman und Bedaux (1996) können toxische Substanzen die Reproduktion direkt oder indirekt nach der DEB-Theorie über Assimilation, Wachstum und Respiration beeinflussen, wobei indirekte Effekte sich aufgrund der Wachstumsbeeinträchtigung gleichzeitig in einem verzögerten Einsetzen der Reife bemerkbar machen. Die Verminderung der Reproduktionsrate bei Daphnien unter Cadmiumstreß schrieben die Autoren daher direkten Effekten zu, da sie entsprechende Effekte auf die Dauer der Juvenilperiode nicht beobachteten. Nach der DEB-Theorie von Kooijman sind Abweichungen von der κ -Regel zu erwarten, wenn die Energiereserven im Hungerzustand einen Schwellenwert unterschreiten, bei dem die Energiezuteilung für Wachstum und Metabolismus insgesamt die Energieverluste des Organismus nicht mehr deckt (Kooijman 1993). Nach den Untersuchungen von Klüttgen und Ratte (1994) ist die Entwicklungsrate der Juvenilen, wie bereits erwähnt, hauptsächlich bei Kombination von Cadmiumstreß und Futterlimitation beeinträchtigt. Aus diesen Beobachtungen wäre als Hypothese abzuleiten, daß bei ausreichendem Nahrungsangebot indirekte Effekte auf die Reproduktion als Folge der Wachstumsretardierung unter Beibehaltung der κ -Regel auftreten, wohingegen der relative Energieinvest κ auf Kosten von Entwicklung und Reproduktion oder vorrangig auf Kosten der Entwicklung zunimmt, wenn der Ernährungszustand der Organismen eine kritische Grenze unterschreitet. Gestützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Barry (1996), nach denen sich chronische Effekte von Endosulfan auf *Daphnia carinata* bei hoher Futterkonzentration vornehmlich auf Länge, Trockengewicht, Brutgröße und Gesamt-Eigewicht auswirkt, wohingegen bei geringem Nahrungsangebot der Beginn der reproduktiven Phase verzögert wird.

Ein weiterer Aspekt, der bei der bisher geführten Diskussion keine Berücksichtigung fand, sind Modifikationen im Lebenszyklus von Organismen als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen.

Der Lebenszyklus eines Organismus wird bestimmt durch Wachstum, Differenzierung, Speicherung und Reproduktion. Er stellt einen Kompromiß dar in der Verteilung verfügbarer Ressourcen zwischen den einzelnen Komponenten, die den Beitrag des Individuums zur Zukunft der Population bestimmen (Begon et al. 1990). Das Leben von Organismen wird davon bestimmt, eine optimale Strategie bezüglich der Energieinvestitionen in Verhalten, Wachstum, Reproduktion und Überleben zu finden, die die größte Anzahl überlebender Nachkommen ermöglicht (Stearns 1976). Während unter Cadmiumexposition Effekte auf die Reproduktion vermutlich indirekt als Folge der Wachstumsretardierung auftreten, suggerieren die CTAB-Ergebnisse, daß der in Reproduktion investierte Energieanteil auf Kosten des somatischen Wachstums zunimmt oder zumindest aufrechterhalten wird, berücksichtigt man die relativ geringe Reproduktionsrate der Kontrolle im Vergleich zu den übrigen Experimenten. Da die Brutmasse jedoch nicht untersucht wurde, sind detaillierte Aussagen bezüglich der Energieverteilung zwischen Wachstum und Reproduktion nicht möglich. Eine Steigerung des in Reproduktion investierten Kohlenstoffanteils an der Gesamtproduktion wird bei *Daphnia magna* nach den Untersuchungen von Stibor und Macháček (1998) durch von Fischen abgesonderte chemische Signalstoffe induziert, wobei Kohlenstoffaufnahme und -verluste aufgrund der reduzierten Körpergröße abnehmen. Nach Untersuchungen von Dawidowicz und Loose (1992) werden die durch Kairomone induzierten Biomasseeinsparungen im Bereich des somatischen Wachstums nicht vollständig durch die gesteigerte Reproduktion kompensiert; die Gesamtbiomasseproduktion ist niedriger als in den Kontrollen. Das Gewicht der Eier (Dawidowicz und Loose 1992) beziehungsweise der Neonaten (Sakwinska 1998) reduziert sich. Bodar et al. (1988b) beobachteten eine Zunahme der mittleren reproduktiven Biomasseproduktion in Verbindung mit einer Abnahme der Neonatenlänge bezogen auf einen Zeitraum von 25 d als Reaktion auf niedrige Cadmiumkonzentrationen. Das Gewicht der Adulten nahm unter Cadmiumstreß ab (Bodar et al. 1988a). Der trade-off zwischen Brutquantität und -qualität ist eine vielfach beschriebene Reaktion auf Veränderungen der Futterbedingungen oder der Stockdichte (Cox et al. 1992, Trubetskova und Lampert 1995, Enserink et al. 1990, Goser 1997, Cleuvers et al. 1997, Enserink et al. 1995, Gliwicz und Guisande 1992). Oberhalb extrem niedriger Nahrungskonzentrationen führt Futterlimitation bei Daphnien zur Produktion kleinerer Bruten mit größeren, fettreicheren Neonaten. Eine Folge der verbesserten Qualität der Nachkommen ist eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit unter Hungerbedingungen (Tessier et al. 1983, Cowgill et al. 1984, Gliwicz und Guisande 1992). Über die unmittelbaren Ursachen für diese Anpassungsreaktionen ist bisher nichts bekannt; eine Veränderung im Bereich der Energiereserven der Organismen wird von Glazier (1998) eher ausgeschlossen. In diesen Fällen nimmt jedoch auch die Qualität der Eier auf Kosten der Quantität unter Streß zu. Dave (1984) konnte eine Stimulierung der Reproduktion bei *Daphnia magna* durch nied-

rige Kupferkonzentrationen erzielen, welche er als Hormesis interpretiert. Stebbing (1981) deutet dieses Phänomen als eine unspezifische Anpassungsreaktion durch Wachstumskontrollmechanismen im Sinne einer 'Überkorrektur'.

Insgesamt ist eine Trennung zwischen unspezifischen Mechanismen und Reproduktionsstrategien im Sinne von adaptativen Streßantworten auf Basis des bisherigen Wissensstandes über die beteiligten physiologischen Prozesse und hormonellen Regulationsmechanismen schwierig. Auch die Betrachtung der Energiebudgets in der hier praktizierten Form liefert keine Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Streßantworten auf CTAB- und Cadmiumexposition.

Zur Diskussion stand in diesem Arbeitsschritt die ökotoxikologische Bedeutung des SFG. Die Abnahme der spezifischen Zuwachsrate r als Index für Populationswachstum unter unlimitierten Bedingungen unter Cadmiumexposition läßt vermuten, daß sich Schadstoffeffekte auf das Energiebudget von Organismen auch auf Populationsebene negativ auswirken. Borgmann et al. (1989) wiesen experimentell nach, daß Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/L}$ Cd zur Extinktion von Daphnienpopulationen in Labor-Ökosystemen (Phytoplankton - Daphnien) führen; bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/L}$ bleibt das System stabil. Für das Beispiel Kupfer war infolge der erhöhten Mortalität der Parameter r sensitiver als die energetische Meßgröße. Dies konnte jedoch auch experimentell bedingt sein, da bis zum Zeitpunkt der Energiebilanzierung aufgrund der letalen Effekte in der frühen Expositionsphase möglicherweise bereits eine Selektion hin zu resistenteren Individuen stattgefunden hat. Subletale CTAB-Konzentrationen würden sich hingegen trotz der reduzierten Nettoproduktion der Primiparae, gemessen an der spezifischen Zuwachsrate, auf Populationsebene positiv auswirken. Voraussetzung ist unter jedoch anderem, daß die Überlebensfähigkeit der Jungtiere nicht herabgesetzt ist. An dieser Stelle wären Daten bezüglich Größe und Fettgehalt der Neonaten und biochemische Zusammensetzung der Adulten notwendig, um abschätzen zu können, ob individuelle Effekte hier letztlich für die Populationsdynamik relevant sind. Eindeutige Veränderungen bezüglich der Länge der Jungtiere unter CTAB-Exposition wurden nicht festgestellt, jedoch war der untersuchte Stichprobenumfang relativ klein.

Weiterhin ist zu diskutieren, in welchem Ausmaß die spezifische Zuwachsrate Chemikalienstreß auf Populationsebene prognostiziert. Perrin et al. (1992) zeigten, daß die Korrelation zwischen r und Fitness von den Umweltbedingungen abhängig ist, die spezifische Zuwachsrate daher nicht als genereller Indikator für Fitness zu betrachten ist. Underwood und Peterson (1988) argumentieren, daß anhand von Effekten auf physiologischer, zellulärer und subzellulärer Ebene Wachstum und Reproduktionserfolg von Individuen prognostiziert werden kann, jedoch nicht notwendigerweise deren zukünftige Abundanz.

Zusammenfassend wurde gezeigt, daß der auf der Basis von Kohlenstoffbilanzen kalkulierte Scope for Growth-Parameter ein sensibler Indikator für chemischen Stress unter Exposition an CTAB, Kupfer und Cadmium darstellt. Der nach Ablauf der Adoleszenzphase kalkulierte Netto-Kohlenstoffzuwachs korrelierte mit Veränderungen im Trockengewicht und Längenwachstum der Daphnien.

Die Verminderung des Netto-Kohlenstoffzuwachs resultierte in erster Linie aus einem Rückgang der Kohlenstoffingestion. Konkrete Aussagen, in welchem Ausmaß dieser Effekt durch die reduzierte Körperlänge verursacht wurde oder eine Wachstumsreduktion determinierte, sind jedoch nicht möglich. Die konzentrationsabhängigen Abnahmen im individuellen (kohortenspezifischen) Sauerstoffverbrauch wurden unter Bezugnahme des Trockengewichtes weitestgehend eliminiert. Chemischer Stress hatte demnach keinen Effekt auf die metabolische Aktivität. Möglicherweise ist jedoch eine Konstanz der Gesamtstoffwechselverluste bei reduziertem Wachstum (Abnahme der energetischen Kosten für SDA) als Indiz für erhöhte metabolische Kosten in anderen Stoffwechselbereichen zu bewerten.

Für eine ökotoxikologische Interpretation wurden die Effekte auf das Kohlenstoffbudget mit Veränderungen der Reproduktionsrate und der spezifischen Zuwachsrate r verglichen. Unter chronischer Cadmiumexposition konnten Korrelationen zwischen Effekten auf die Kohlenstoffbilanzen der Primiparae und r aufgezeigt werden; unter CTAB-Exposition war dagegen ein inverses Verhalten bezüglich SFG und Reproduktionsrate im chronischen Test zu beobachten. Zusammenhänge zwischen organismischen Effekten und möglichen Konsequenzen für die Populationsdynamik, gemessen an der demographischen Größe r , sind mit der hier angewandten Methode vermutlich nur herzustellen, wenn der Schadstoff die relative Energieaufteilung zwischen Wachstum und Reproduktion nicht beeinflußt und die Quantität der Brut nicht auf Kosten der Qualität erhöht wird.

6. Zusammenfassung

Wesentliche Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Erfassung konzentrations- und zeitabhängiger Effekte subletaler Chemikalienkonzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch und die Ingestion von Daphnien, eine Abschätzung von den Folgen dieser Effekte für den Netto-Kohlenstoffzuwachs (Scope for Growth) unter verlängerter Exposition und die Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen physiologisch-energetischen Veränderungen und Chemikalieneffekten auf Wachstum und Reproduktion.

Die über mehrere Tage kontinuierlich aufgezeichneten Sauerstoffverbrauchsraten unterlagen bei gefütterten Daphnien tageszeitabhängigen Schwankungen, deren Amplitude von der Nahrungsmenge abhängig war. Aus diesen Beobachtungen wurde gefolgert, daß die Organismen im Tagesverlauf Aktivitätsunterschiede aufweisen, die mit einer Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrates während der Dunkelphase und möglicherweise einer Veränderung der räumlichen Verteilung in der Testkammer verbunden sind. Die Ergebnisse zeigen, daß die Energieverluste der Daphnien während des Tages nicht konstant sind und längere Meßintervalle für Energiebilanzierungen von Vorteil sind.

Exposition an CTAB, Kupfer und Cadmium führte zu chemikalien-spezifischen, expositionszeitabhängigen Veränderungen im Sauerstoffverbrauch und in der Ingestion bei Daphnienkohorten, die sich aus zehn adulten Daphnien und den im Zeitraum von vier Tagen entlassenen Jungtieren zusammensetzten.

Akut-subletale Exposition an CTAB verursachte bei Konzentrationen nahe des letalen Schwellenwertes eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches. Bei Kupfer wurde für das entsprechende Expositionsregime parallel zu einer Verminderung des Sauerstoffverbrauches eine deutliche Reduktion der Algenaufnahme beobachtet. Mit Cadmium wurden im Bereich der akut-letalen Schwellenkonzentration keine Messungen durchgeführt. Exposition an die chronische Wirkkonzentration dieser Chemikalie hatte in dieser frühen Expositionsphase keine meßbaren Veränderungen des Sauerstoffverbrauches und der Ingestion zur Folge.

Vorexposition an CTAB und Kupfer führte tendenziell zu einem Rückgang der Effekte. Auch unter chronischer Tensidbelastung war jedoch eine konzentrationsabhängige Abnahme des Sauerstoffverbrauches und der Ingestion zu beobachten, begleitet von einer Gewichtsreduktion der Organismen. Unter Cadmiumexposition wurden Veränderungen im untersuchten Konzentrationsbereich erst nach längerer Vorexposition ermittelt. Chronische Effekte bestanden in einer Reduktion von Sauerstoffverbrauch und Ingestion der Daphnienkohorte, einer verminderten Bio-

masse der vorexponierten Tiere, begleitet von einer gesteigerten Biomasseproduktion durch die Jungtiere während des Meßintervalls.

Chronische Exposition an CTAB und Cadmium hatte eine Verschiebung des mittleren stündlichen Sauerstoffverbrauches während der Lichtphase relativ zur Dunkelphase zur Folge. Bei den Kontrollen war der Quotient (mittlere Sauerstoffverbrauchsrate im Licht / mittlere Sauerstoffverbrauchsrate im Dunkeln) als Folge der tageszeitabhängigen Aktivitätsunterschiede größer als 1; nach chronischer Vorexposition an höhere Konzentrationen lag der Wert unter 1.

Die Ergebnisse zeigen, daß (sub-)organismische Streßreaktionen dynamische Prozesse sind und, substanzspezifisch, expositionszeitabhängige Veränderungen im Energiehaushalt von Organismen zur Folge haben können.

Die Zeitabhängigkeiten der Effektausprägung unter Cadmiumexposition sind vermutlich auf die toxikokinetischen Eigenschaften des Stoffes zurückzuführen. Unter CTAB- und Kupferexposition liefern sie möglicherweise ein Indiz für Schadstoffakklimatisierungen, die im Falle des Tensids entweder unvollständig waren oder sich nachteilig auf die Entwicklung der Organismen auswirkten.

Bei Daphnien, die während der Juvenilperiode an die Schadstoffe exponiert waren, wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme des Netto-Kohlenstoffzuwachses (SFG) unter Chemikalienexposition ermittelt. Bei Exposition an Kupfer wurden Effekte erst in Verbindung mit einer erhöhten Letalitätsquote beobachtet. Die Effekte wiesen Übereinstimmungen mit Veränderungen im Trockengewicht und in der Körperlänge der Daphnien auf. Die Abnahmen im SFG waren in erster Linie auf einen Rückgang der Kohlenstoffingestion zurückzuführen. Es war jedoch nicht zu differenzieren, in welchem Ausmaß diese Veränderung als Folge der reduzierten Körperlänge auftrat oder die Wachstumsreduktion determinierte. Deutliche Effekte auf die gewichtsspezifische Sauerstoffverbrauchsrate wurden nicht ermittelt.

Die Abnahme im SFG korrelierte mit einer Verminderung der mittleren Reproduktionsrate und der spezifischen Zuwachsrates r unter chronischem Cadmiumstreß. Unter CTAB-Exposition wurde trotz der Reduktion im SFG und in der Körperlänge zu Beginn der Adultphase eine Steigerung der Reproduktion beobachtet. Veränderungen in der relativen Energieverteilung zwischen Wachstum und Reproduktion sind anhand von Kohlenstoffbilanzen mit dem in dieser Arbeit angewendeten Verfahren nicht kalkulierbar. Zusammenhänge zwischen energetischen Veränderungen und Effekten auf die Reproduktion und die demographische Größe r sind mit dieser Methode vermutlich nur herzustellen, wenn der Schadstoffstreß keine Auswirkungen auf die relative Energieverteilung im Organismus hat.

7. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, daß Exposition an toxische Stoffe die energetischen Kosten des Organismus erhöht und durch diesen zusätzlichen Energiebedarf die für Wachstum und Reproduktion verfügbaren Ressourcen vermindert werden.

Mit Hilfe der Respirometrie war bei Daphnien, die eine Reduktion im Scope for Growth unter chronischer Chemikalienexposition aufwiesen, eine Erhöhung der metabolischen Rate, gemessen am gewichtsspezifischen Sauerstoffverbrauch, nicht festzustellen. Dieser Befund widerlegt jedoch nicht die eingangs formulierte Hypothese, da der mit Streßreaktionen verbundene zusätzliche Energiebedarf unter Umständen durch Energieeinsparungen in anderen Stoffwechselbereichen kompensiert wird und sich aus diesem Grund nicht auf den Gesamt-Sauerstoffverbrauch auswirkt. Solche Kompromisse in der Ressourcenverteilung sind mit Energiebilanzierungen auf organismischer Ebene nicht zu erfassen. In der Tat sind die beobachteten Veränderungen in der Tagesrhythmik der Sauerstoffverbrauchsraten unter Chemikalienexposition möglicherweise ein Indiz für solche Umverteilungen von Energieressourcen. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Vorteile des in dieser Arbeit etablierten respirometrischen Verfahrens. Als eine Optimierung der Methode wäre eine gleichzeitige Erfassung von Sauerstoffverbrauch, lokomotorischer Aktivität und Freßaktivität der Organismen anzustreben.

Die mit den modellhaft eingesetzten Stoffen erzielten chronischen Effekte auf Wachstum, Reproduktion und Überlebensfähigkeit weisen chemikalienspezifische Unterschiede auf, die durch die Ergebnisse der Respirometrie nicht zu erklären sind. Die Komplexität der Effektmuster, die mit den drei Chemikalien erzielt wurden, läßt vermuten, daß chronische Wirkungen nicht das Resultat genereller Streßantworten sind.

Weitere Versuche sollten darauf abzielen, neben Veränderungen im Gesamt-Energieverbrauch des Individuums, Chemikalieneffekte auf wesentliche Prozesse, die zur Erhaltungs- und Synthesearbeit (vgl. Abb. 1) beitragen, gleichzeitig zu erfassen und die metabolischen Kosten individueller Komponenten des Energiebudgets zu kalkulieren. Um Zusammenhänge zwischen physiologischen Effekten und Veränderungen populationsdynamisch relevanter Parameter zu verstehen, ist eine Verbesserung des Wissensstandes bezüglich der Regulationsmechanismen, über die die Ressourcenverteilung zwischen Wachstum und Reproduktion gesteuert wird, und bezüglich der Wirkung von Chemikalien auf diese Mechanismen notwendig.

8. Literatur

- Aaseth J, Norseth T (1986): Copper. In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB (eds.): Handbook on the toxicology of metals. Vol 2, 2nd ed., Elsevier Amsterdam
- Abel PD, Skidmore JF (1975): Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. - *Water Res* **9**: 759 - 765
- Allen Y, Calow P, Baird DJ (1995): A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. - *Environ Toxicol Chem* **14** (9): 1625 - 1630
- Altenburger R, Bødeker W, Faust M, Grimme LH (1990): Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. - *Exotoxicol Environ Saf* **20**: 98 - 114
- Baird DJ, Barber I, Bradley M, Soares AMVM, Calow P (1991): A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. - *Ecotoxicol Environ Saf* **21**: 257 - 265
- Baird DJ, Barber I, Calow P (1990): Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. I. Chronic life-history effects. - *Functional Ecol* **4**: 399 - 407
- Barber I, Baird DJ, Calow P (1994): Effect of cadmium and ration level on oxygen consumption, RNA concentration and RNA-DNA ratio in two clones of *Daphnia magna* Straus. - *Aquat Toxicol* **30**: 249 - 258
- Barber I, Baird J, Calow P (1990): Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. II. Physiological effects. - *Functional Ecol* **4**: 409 - 414
- Barry MJ (1996): Effects of an organochlorine pesticide on different levels of biological organization in *Daphnia*. - *Ecotoxicol Environ Saf* **34**: 239 - 251
- Bayne BL (1980): Physiological measurements of stress. - *Rapp R-v Réunion Cons Int Explor Mer* **179**: 56 - 61
- Bayne BL, Hawkins AJS, Navarro E (1987): Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low density. - *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **11**: 1 - 22
- Bayne BL, Worrall CM (1980): Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations. - *Mar Ecol Prog Ser* **3**: 317 - 328
- Begon M, Harper JL, Townsend CR (1990): Ecology - Individuals, populations, communities. 2nd ed., Blackwell, Oxford
- Biesinger KE, Christensen GM (1972): Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. - *J Fish Res Board Can* **29**: 1691 - 1700

- Bodar CWM, van der Slius I, van Montfort JCP, Voogt PA, Zandee DI (1990): Cadmium resistance in *Daphnia magna*. - *Aquat Toxicol* **16**: 33 - 40
- Bodar CWM, van der Slius I, Voogt PA, Zandee DI (1988a): Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implications for reproduction. - *Comp Biochem Physiol* **90C** (2): 341 - 346
- Bodar CWM, van Leeuwen CJ, Voogt PA, Zandee DI (1988b): Effect of cadmium on the reproduction strategy of *Daphnia magna*. - *Aquat Toxicol* **12**: 301 - 310
- Boethling RS, Lynch DG (1992): Quaternary ammonium surfactants. In: de Oude NT (ed.): Detergents. The handbook of environmental chemistry. Vol 3, Part F, Springer Verlag, Berlin, 145 - 177
- Bohrer RN, Lampert W (1988): Simultaneous measurement of the effect of food concentration on assimilation and respiration in *Daphnia magna* Straus. - *Functional Ecol* **2**: 463 - 471
- Borgmann U, Millard ES, Charlton CC (1989): Effect of cadmium on a stable, large volume, laboratory ecosystem containing *Daphnia* and phytoplankton. - *Can J Fish Aquat Sci* **46**: 399 - 405
- Bradley MC, Baird DJ, Calow P (1991): Mechanisms of energy allocation to reproduction in the cladoceran *Daphnia magna* Straus. - *Biol J Linnean Society* **44**: 325 - 333
- Calow P (1991): Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. - *Comp Biochem Physiol* **100C** (1-2): 3 - 6
- Calow P, Sibly RM (1990): A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. - *Functional Ecol* **4**: 283 - 288
- Canton JH, Slooff W (1982): Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd²⁺) with freshwater organisms of different trophic levels. - *Ecotoxicol Environ Saf* **6**: 113 - 128
- Carey JR (1993): Applied demography for biologists with special emphasis on insects. Oxford University Press
- Chandini T (1988): Changes in food [*Chlorella*] levels and the acute toxicity of cadmium to *Daphnia carinata* (Daphnidae) and *Echinisca triserialis* (Macrothricidae) [Crustacea: Cladocera]. - *Bull Environ Contam Toxicol* **41**: 398 - 403
- Charoy CP, Janssen CR, Persoone G, Clément P (1995): The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. The use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals. - *Aquat Toxicol* **32**: 271 - 282
- Christie NT, Costa M (1984): In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA. - *Biol Trace Elem Res* **6**: 139 - 158

- Cleuvers M, Goser B, Ratte HT (1997): Life-strategy shift by intraspecific interaction in *Daphnia magna*: change in reproduction from quantity to quality. - *Oecologia* **110**: 337 - 345
- Cooper JC (1988): Review of the environmental toxicity of quarternary ammonium halides. - *Ecotoxicol Environ Saf* **16**: 65 - 71
- Cowgill UM, Williams DM, Esquivel JB (1984): Effects of maternal nutrition on fat content and longevity of neonates of *Daphnia magna*. - *J Crustacean Biol* **4**: 173 - 190
- Cox EJ, Naylor C, Bradley MC, Calow P (1992): Effect of differing maternal ration on adult fecundity and offspring size in laboratory cultures of *Daphnia magna* Straus for ecotoxicological testing. - *Aquat Toxicol* **24**: 63 - 74
- Dave G (1984): Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna*. - *Comp Biochem Physiol* **78C** (2): 439 - 443
- Dawidowicz P, Loose CJ (1992): Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration of *Daphnia*. - *Limnol Oceanogr* **37** (8): 1589 - 1595
- DeCoen WM (1998): Study of the energy metabolism and DNA damage of the waterflea *Daphnia magna* Straus under toxic stress and the relation with population dynamics. - Diss Universiteit Gent
- DeCoen WM, Janssen CR (1997): The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. - *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **6**: 43 - 55
- DeCoen WM, Janssen CR (1998): The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. - *Hydrobiologia* **367**: 199 - 209
- Deutsche Norm (1982): DIN 38 412 Teil 11 Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Daphnien - Kurzzeittest
- Din ZB, Ahamad A (1995): Changes in the scope for growth of blood cockles (*Anadara granosa*) exposed to industrial discharge. - *Mar Pollut Bull* **31** (4-12): 406 - 410
- Ebert D (1992): A food-independent maturation threshold and size at maturity in *Daphnia magna*. - *Limnol Oceanogr* **37**: 878 - 881
- Ebert D (1994): A maturation size threshold and phenotypic plasticity of age and size at maturity in *Daphnia magna*. - *Oikos* **69**: 309 - 317
- EHC - Environmental Health Criteria 135 (1992) Cadmium - Environmental aspects. WHO World Health Organization, Geneva
- Ellgaard EG, Tusa JE, Malizia AA (1978): Locomotor activity of the bluegill *Lepomis macrochirus*: hyperactivity induced by sublethal concentrations of cadmium, chromium and zinc. *J Fish Biol* **1**: 19 - 23

- Enserink EL, Kerkhofs MJJ, Baltus CAM, Koeman JH (1995): Influence of food quantity and lead exposure on maturation in *Daphnia magna*; evidence for a trade-off mechanism. - *Functional Ecol* **9**: 175 - 185
- Enserink L, Luttmer W, Maas-Diepeveen H (1990): Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. - *Aquat Toxicol* **17**: 15 - 26
- Evers EG, Kooijman SALM (1989): Feeding, digestion and oxygen consumption in *Daphnia magna*. A study in energy budgets. - *Netherlands Journal of Zoology* **39** (1-2): 56 - 78
- Fargašová (1994): Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. - *Ecotoxicol Environ Saf* **27**: 210 - 213
- Faust M, Altenburger R, Bödeker W, Grimme LH (1992): Algentoxizitätstests mit synchronisierten Kulturen. Schriftenreihe WaBoLu 89, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 311 - 321
- Fernández-Casalderrey A, Ferrando MD, Andreu-Moliner E (1994): Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. - *Ecotoxicol Environ Saf* **27**: 82 - 89
- Ferrando MD, Andreu E (1993): Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. - *Comp Biochem Physiol* **106C** (2): 327 - 331
- Fingerman M, Devi M, Reddy PS, Katyayani R (1996): Impact of heavy metal exposure on the nervous system and endocrine-mediated processes in crustaceans. - *Zoological Studies* **35** (1): 1 - 8
- Flickinger AL, Bruins RJF, Winner RW, Skillings JH (1982): Filtration and phototactic behavior as indices of chronic copper stress in *Daphnia magna* Straus. *Arch Environ Contam Toxicol* **11**: 457 - 463
- Forbes VE, Depledge MH (1992): Cadmium effects on the carbon and energy balance of mudsnails. - *Mar Biol* **113**: 263 - 269
- Forbes VE, Forbes TL (1994): *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman & Hall, London
- Friberg L, Kjellström T, Nordberg GF (1986): Cadmium. In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB (eds.): *Handbook on the toxicology of metals*. Vol 2, 2nd ed., Elsevier Amsterdam
- Gerhardt A (1996): Behavioural early warning responses to polluted water. Performance of *Gammarus pulex* L. (Crustacea) and *Hydropsyche angustipennis* (Curtis) (Insecta) to a complex industrial effluent. - *Environ Sci & Pollut Res* **3** (2): 63 - 70
- Gilfillan ES (1980): The use of scope for growth measurements in monitoring petroleum pollution. - *Rapp P-v Réun Cons int Explor Mer* **179**: 71 - 75

- Gilfillan ES, Vandermeulen JH (1978): Alterations in growth and physiology of soft-shell clams, *Mya arenaria*, chronically oiled with Bunker C from Chedabucto Bay, Nova Scotia, 1970-76. - J Fish Res Board Can **35**: 630 - 636
- Glazier DS (1991): Separating the respiration rates of embryos and brooding females of *Daphnia magna*: Implications for the cost of brooding and the allometry of metabolic rate. - Limnol Oceanogr **36** (2): 354 - 362
- Glazier DS (1998): Does body storage act as food-availability cue for adaptive adjustment of egg size and number in *Daphnia magna*? - Freshwater Biol **40**: 87 - 92
- Glazier DS, Calow P (1992): Energy allocation rules in *Daphnia magna*: clonal and age differences in the effects of food limitation. - Oecologia **90**: 540 - 549
- Gliwicz ZM, Giusande C (1992): Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. - Oecologia **91**: 463 - 467
- Goser B (1997): Dichteabhängige Änderung der Entwicklung und Reproduktion bei Cladoceren. - Diss RWTH Aachen
- Grant J, Cranford PJ (1991): Carbon and nitrogen scope for growth as a function of diet in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. - J mar biol Ass UK **71**: 437 - 450
- Green J (1954): Size and reproduction in *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). - Proc zool Soc Lond **124**: 535 - 545
- Green J (1956): Growth, size and reproduction in *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). - Proc zool Soc Lond **126**: 173 - 204
- Griffiths PRE (1980): Morphological and ultrastructural effects of sublethal cadmium poisoning on *Daphnia*. - Environmental Research **22**: 277 - 284
- Grimme LH, Boardman NK (1972): Photochemical activities of particle fraction P₁ obtained from the green alga *Chlorella fusca*. - Biochem Biophys Res Commun **49**: 1617 - 1623
- Hanazato T (1996): Combined effects of food shortage and oxygen deficiency on life history characteristics and filter screens of *Daphnia*. - J Plankton Res **18**: 757 - 765
- Hanazato T (1998): Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. - Chemosphere **36** (8): 1903 - 1909
- Hanazato T, Dodson SI (1995): Synergistic effects of low oxygen concentration, predator kairomone, and a pesticide on the cladoceran *Daphnia pulex*. - Limnol Oceanogr **40** (4): 700 - 709
- Haney JF, Hall DJ (1975): Diel vertical migration and filter-feeding activities of *Daphnia*. - Arch Hydrobiol **75** (4): 413 - 441
- Harris JE (1963): The role of endogenous rhythms in vertical migration. - J mar biol Ass UK **43**: 153 - 166
- Heath AG (1995): Water pollution and fish physiology. 2nd ed., Lewis Publishers, Boca Raton

- Heisey D, Porter KG (1977): The effect of ambient oxygen concentration on filtering and respiration rates of *Daphnia galeata mendotae* and *Daphnia magna*. - Limnol Oceanogr **22** (5): 839 - 845
- Hilbish TJ (1986): Growth trajectories of shell and soft tissue in bivalves: seasonal variation in *Mytilus edulis* L. - J Exp Mar Biol Ecol **96**: 103 - 113
- Janssen CR, Ferrando MD, Persoone G (1994): Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. - Ecotoxicol Environ Saf **28**: 244 - 255
- Johnson I, Delaney P (1998): Development of a 7-day *Daphnia magna* growth test using image analysis. - Bull Environ Contam Toxicol **61**: 355 - 362
- Jørgensen SE (1991): Modelling environmental chemistry. Development in environmental modelling 17. Elsevier, Amsterdam
- Kersting K (1978): Some features of feeding, respiration and energy conversion of *Daphnia magna*. - Hydrobiologia **59** (2): 113 - 120
- Kersting K, Holterman W (1973): The feeding behaviour of *Daphnia magna* studied with the coulter counter. - Verh Internat Verein Limnol **18**: 1434 - 1440
- Kersting K, van der Honing H (1981): Effect of the herbicide dichlobenil on the feeding and filtering rate of *Daphnia magna*. - Verh Internat Verein Limnol **21**: 1135 - 1140
- Kersting K, van der Leeuw-Leegwater C (1976): Effect of food concentration on the respiration of *Daphnia magna*. - Hydrobiologia **49** (2): 137 - 142
- Kettle WD, deNoyelles F, Lei C-H (1980): Oxygen consumption of zooplankton as affected by laboratory and field cadmium exposures. - Bull Environ Contam Toxicol **25**: 547 - 553
- Kjørboe T, Møhlenberg F, Hamburger K (1985): Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. - Mar Ecol Prog Ser **26**: 85 - 97
- Klüttgen B, Dülmer U, Engels M, Ratte HT (1994): ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. - Water Res **28** (3): 743 - 746
- Klüttgen B, Ratte HT (1994): Effects of different food doses on cadmium toxicity to *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem **13** (10): 1619 - 1627
- Knezovich JP, Lawton MP, Inouye LS (1989): Bioaccumulation and tissue distribution of a quaternary ammonium surfactant in three aquatic species. - Bull Environ Contam Toxicol **42**: 87 - 93
- Kobayashi M, Nezu T (1986): Variation of hemoglobin content in *Daphnia magna*. - Physiol Zool **69**: 35 - 42
- Kobayashi M, Tanaka Y (1991): Oxygen transporting function of hemoglobin in *Daphnia magna*. - Can J Zool **69**: 2968 - 2972

- Koehn RK, Bayne BL (1989): Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. - *Biol J Linnean Society* **37**: 157 - 171
- Koivisto S, Ketola M, Walls M (1992): Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. - *Hydrobiologia* **248**: 125 - 136
- Kooijman SALM (1986): Energy budgets can explain body size relations. - *J theor Biol* **121**: 269 - 282
- Kooijman SALM (1993): Dynamic energy budgets in biological systems. Theory and applications in ecotoxicology. Cambridge University Press
- Kooijman SALM, Bedaux JJM (1996): The analysis of aquatic toxicity data. VU University Press, Amsterdam
- Kühn R, Pattard M, Pernak K-D, Winter A (1989): Results of the harmful effects of water pollutants to *Daphnia magna* in the 21 d reproduction test. - *Water Res* **23** (4): 501 - 510
- Kungolos A, Aoyama I (1993): Interaction effect, food effect, and bioaccumulation of cadmium and chromium for the system *Daphnia magna* - *Chlorella ellipsoidea*. - *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* **8**: 351 - 369
- Lampert W (1977a): Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* DE GEER as related to environmental conditions. I. Methodological problems of the use of ¹⁴C for the measurement of carbon assimilation. - *Arch Hydrobiol/Suppl* **48**: 287 - 309
- Lampert W (1977b): Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* DE GEER as related to environmental conditions. II. The dependence of carbon assimilation on animal size, temperature, food concentration and diet species. - *Arch Hydrobiol/Suppl* **48**: 310 - 335
- Lampert W (1977c): Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* DE GEER as related to environmental conditions. III. Production and production efficiency. - *Arch Hydrobiol/Suppl* **48**: 336 - 360
- Lampert W (1984): The measurement of respiration. In: Downing JA, Rigler FH (eds.): A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. 2nd ed., IBP Handbook 17, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 413 - 468
- Lampert W (1986): Response of the respiratory rate of *Daphnia magna* to changing food conditions. - *Oecologia* **70**: 495 - 501
- Lampert W (1993): Phenotypic plasticity of the size at first reproduction in *Daphnia*: the importance of maternal size. - *Ecology* **74** (5): 1455 - 1466
- Lampert W, Bohrer R (1984): Effect of food availability on the respiratory quotient of *Daphnia magna*. - *Comp Biochem Physiol* **78A** (2): 221 - 223
- Lampert W, Trubetskova I (1996): Juvenile growth rate as a measure of fitness in *Daphnia*. - *Functional Ecol* **10**: 631 - 635

- LeBlanc GA (1982): Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. - Environ Pollut Ser A **27**: 309 - 322
- Lett PF, Farmer GF, Beamish FWH (1976): Effect of copper on some aspects of the bioenergetics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). - J Fish Res Board Can **33**: 1335 - 1342
- Lewis MA (1991): Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. - Water Res **25** (1): 101 - 113
- Lewis MA, Wee VT (1983): Aquatic safety assessment for chronic surfactants. - Environ Toxicol Chem **2**: 105 - 118
- Lynch M, Weider LJ, Lampert W (1986): Measurement of carbon balance in *Daphnia*. - Limnol Oceanogr **31** (1): 17 - 33
- Maki AW (1979): Respiratory activity of fish as a predictor of chronic fish toxicity values for surfactants. In: Marking LL, Kimerle RA (eds.): Aquatic Toxicology ASTM ATP 667, American Society for Testing Materials, 77 - 95
- Maltby L, Naylor C (1990): Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* 'scope for growth' assay: effect of zinc reproduction. - Functional Ecol **4**: 393 - 397
- McCauley E, Murdoch WW, Nisbet RM (1990a): Growth, reproduction, and mortality of *Daphnia pulex* Leydig: life at low food. - Functional Ecol **4**: 505 - 514
- McCauley E, Murdoch WW, Nisbet RM, Gurney WSC (1990b): The physiological ecology of *Daphnia*: development of a model of growth and reproduction. - Ecology **71** (2): 703 - 715
- McDonald DG, Wood CM (1993): Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin JC, Jensen FB (eds.): Fish Ecophysiology. Fish and Fisheries Series 9, Chapman & Hall, London, 297 - 321
- McKenney CL, Hamaker TL, Matthews E (1991): Changes in the physiological performance and energy metabolism of an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed in the laboratory through a complete life cycle to the defoliant DEF. - Aquat Toxicol **19**: 123 - 135
- McKenney CL, Matthews E (1990): Alterations in the energy metabolism of an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) as indicators of stress from chronic pesticide exposure. - Mar Environ Res **30**: 1 - 19
- Misra V, Kumar V, Pandey S, Viswanathan P (1991): Biochemical alterations in fish fingerlings (*Cyprinus carpio*) exposed to sublethal concentration of linear alkyl benzene sulphonate. - Arch Environ Contam Toxicol **21**: 514 - 517
- Naylor C, Maltby L, Calow P (1989): Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. - Hydrobiologia **188/189**: 517 - 523

- Nebeker AV, Cairns MA, Onjukka ST, Titus RH (1986): Effect of age on sensitivity of *Daphnia magna* to cadmium, copper and cyanine. - *Environ Toxicol Chem* **5**: 527 - 530
- Nebeker AV, Onjukka ST, Stevens DG, Chapman GA, Dominguez SE (1992): Effects of low dissolved oxygen on survival, growth and reproduction of *Daphnia*, *Hyalella* and *Gammarus*. - *Environ Toxicol Chem* **11**: 373 - 379
- Nonnotte L, Boitel F, Truchot JP (1993): Waterborne copper causes gill damage and hemolymph hypoxia in the shore crab *Carcinus maenas*. - *Can J Zool* **71**: 1569 - 1576
- Noonburg EG, Nisbet RM, McCauley E, Gurney WSC (1998): Experimental testing of dynamic energy budget models. - *Functional Ecol* **12**: 211 - 222
- Odum EP (1983): Grundlagen der Ökologie. 2nd ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- OECD Guideline (1984): OECD Guideline for testing chemicals 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test (Part I) and reproduction test (Part II)
- Paloheimo JE, Crabtree SJ, Taylor WD (1982): Growth model of *Daphnia*. - *Can J Fish Aquat Sci* **39**: 598 - 606
- Parry GD (1983): The influence of the cost of growth on ectotherm metabolism. - *J Theor Biol* **101**: 453 - 477
- Paul RJ, Colmorgen M, Pirow R, Chen Y-H, Tsai M-C (1998): Systemic and metabolic responses in *Daphnia magna* to anoxia. - *Comp Biochem Physiol A* **120**: 519-530
- Penttinen O-P, Kukkonen J (1998): Chemical stress and metabolic rate in aquatic invertebrates: threshold, dose-response relationships, and mode of toxic action. - *Environ Toxicol Chem* **17** (5): 883 - 890
- Perrin N, Baird DJ, Calow P (1992): Resource allocation, population dynamics and fitness: some experiments with *Daphnia magna* Straus. - *Arch Hydrobiol* **123** (4): 431 - 449
- Peters RH (1984): Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. In: Downing JA, Rigler FH (eds.): A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. 2nd ed., IBP Handbook 17, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 336 - 412
- Philippova TG, Postnov AL (1988): The effect of food quantity on feeding and metabolic expenditure in cladocera. - *Int Revue ges Hydrobiol* **78** (6): 601 - 615
- Pittinger CA, Woltering DM, Masters JA (1989): Bioavailability of sediment-sorbed and aqueous surfactants to *Chironomus riparius* (midge). - *Environ Toxicol Chem* **8**: 1023 - 1033
- Porter KG, Gerritsen J, Orcutt JD (1982): The effect of food concentration on swimming patterns, feeding behavior, ingestion, assimilation, and respiration by *Daphnia*. - *Limnol Oceanogr* **27** (5): 935 - 949

- Porter KG, Orcutt JD, Gerritsen J (1983): Functional response and fitness in a generalist filter feeder, *Daphnia magna* (Cladocera: Crustacea). - Ecology **64** (4): 735 - 742
- Rand GM, Wells PG, McCarty LS (1995): Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, GM (ed.): Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment. 2nd ed., Taylor & Francis, Washington DC, 3 - 66
- Ratte HT (1996): Statistical implications of end-point selection and inspection interval in the *Daphnia* reproduction test - a simulation study. - Environ Toxicol Chem **15** (10): 1831 - 1843
- Richman S (1958): The transformation of energy by *Daphnia pulex*. - Ecol Monogr **28**: 273 - 294
- Rieß MH (1993): Zur aquatischen Toxizität von Tensiden: physiologische und in-vivo-³¹P-NMR-spektroskopische Untersuchungen der Wirkung ausgewählter Tenside auf photoautotrophe Mikroalgen. Dissertation, Universität Bremen
- Ringelberg J, Servaas H (1971): A circadian rhythm in *Daphnia magna*. - Oecologia **6**: 289 - 292
- Rubner M (1902): Die Gesetze des Energieverbrauches bei der Ernährung. Deuticke, Leipzig
- Rudolph P, Boje R (1986): Ökotoxikologie - Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung nach dem Chemikaliengesetz. Ecomed Fachverlag, Landsberg/Lech
- Sakwińska O (1998): Plasticity of *Daphnia magna* life history traits in response to temperature and information about a predator. - Freshwater Biol **39**: 681 - 687
- Sánchez Leal J, Gonzáles JJ, Kaiser KLE, Palabrica VS, Comelles F, García MT (1994): On the toxicity and biodegradation of cationic surfactants. Acta hydrochim hydrobiol **22**: 13 - 18
- Santojanni A, Gorbi G, Sartore F (1998): Prediction of fecundity in chronic toxicity tests on *Daphnia magna*. - Water Res **32** (10): 3146 - 3156
- Schäfer SG, Elsenhans B, Forth W, Schümann K (1994): Metalle. In: Marquardt H, Schäfer SG (eds.): Lehrbuch der Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, 504 - 549
- Schindler DW (1968): Feeding, assimilation and respiration rates of *Daphnia magna* under various environmental conditions and their relation to production estimates. - J Anim Ecol **37**: 369 - 385
- Schlegel HG (1992): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Segner H, Braunbeck T (1998): Cellular response profile to chemical stress. In: Schüürmann G, Markert B (eds.): Ecotoxicology. John Wiley and Spektrum Akademischer Verlag, New York, 521 - 569
- Sheehan PJ, Miller DR, Butler DR, Bourdeau GC (1984): Effects of pollutants at the ecosystem level. Wiley, New York

- Sobral P, Widdows J (1997): Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from Southern Portugal. - *Mar Pollut Bull* **34** (12): 992 - 1000
- Spicer JI, Weber RE (1991): Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. - *Comp Biochem Physiol* **100C** (3): 339 - 342
- Starkweather PL (1983): Daily patterns of feeding behavior in *Daphnia* and related microcrustacea: implications for cladoceran autecology and the zooplankton community. - *Hydrobiologia* **100**: 203 - 221
- Stearns SC (1975): Light responses of *Daphnia pulex*. - *Limnol Oceanogr* **20** (4): 564 - 570
- Stearns SC (1976): Life history tactics: a review of the ideas. - *Q Rev Biol* **51**: 3 - 42
- Stebbing ARD (1981): Hormesis - stimulation of colony growth in *Campanularia flexuosa* (Hydrozoa) by copper, cadmium and other toxicants. - *Aquat Toxicol* **1**: 227 - 238
- Stibor H, Macháček J (1998): The influence of fish-exuded chemical signals on the carbon budget of *Daphnia*. - *Limnol Oceanogr* **43** (5): 997 - 1000
- Streit B (1991): Lexikon Ökotoxikologie. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim
- Stuhlbacher A, Bradley MC, Naylor C, Calow P (1992): Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. - *Comp Biochem Physiol* **101C** (3): 571 - 577
- Taylor BE, Gabriel W (1985): Reproductive strategies of two similar *Daphnia* species. - *Verh Internat Verein Limnol* **22**: 3047 - 3050
- Taylor G, Baird DJ, Soares AMVM (1998): Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. - *Environ Toxicol Chem* **17** (3): 412 - 419
- Tessier AJ, Henry LL, Goulden CE, Durand MW (1983): Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation. - *Limnol Oceanogr* **28**: 667 - 676
- Threlkeld ST (1976): Starvation and the size structure of zooplankton communities. - *Freshwater Biol* **6**: 489 - 496
- Trubetskova I, Lampert W (1995): Egg size and egg mass of *Daphnia magna*: response to food availability. - *Hydrobiologia* **307**: 139 - 145
- Truchot JP, Rital A (1998): Effects of long-term sublethal exposure to copper on subsequent uptake and distribution of metal in the shore crab *Carcinus maenas*. - *J Crustacean Biol* **18** (2): 224 - 231
- Umweltbundesamt Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Kommission Bewertung wassergefährdender Stoffe (1997): Dokumentation wassergefährdender Stoffe - Datenblattsammlung- Datenblatt Nr.600. S. Hirzel, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Underwood AJ, Peterson CH (1988): Towards an ecological framework for investigating pollution. - *Mar Ecol Prog Ser* **46**: 227 - 234

- van Bertalanffy L (1964): Basic concepts in quantitative biology of metabolism. - Helgoländer Wiss Meeresunters **9**: 5 - 37
- van Leeuwen CJ, Büchner JL, van Dijk H (1988): Intermittent flow system for population toxicity studies demonstrated with *Daphnia* and copper. - Bull Environ Contam Toxicol **40**: 496 - 502
- van Leeuwen CJ, Luttmer WJ, Griffioen PS (1985): The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example. - Ecotoxicol Environ Saf **9**: 26 - 39
- van Leeuwen CJ, Niebeek G, Rijkeboer M (1987): Effects of chemical stress on the population dynamics of *Daphnia magna*: a comparison of two test procedures. - Ecotoxicol Environ Saf **14**: 1 - 11
- van Straalen NM, Kammenga JE (1998): Assessment of ecotoxicity at the population level using demographic parameters. In: Schüürmann G, Markert B (eds.): Ecotoxicology. John Wiley and Spektrum Akademischer Verlag, New York, 621 - 644
- Varaa M (1992): Agents that increase the permeability of the outer membrane. - Microbiol Rev **56**: 395 - 411
- Viganò L (1993): Reproductive strategy of *Daphnia magna* and toxicity of organic compounds. - Water Res **27** (5): 903 - 909
- Villarroel MJ, Ferrando MD, Andreu E (1998): Toxic anorexia as a sensitive endpoint in *Daphnia magna*. - J Environ Sci Health B**33** (2): 151 - 160
- Warren CE, Davis GL (1967): Laboratory studies on the feeding of fishes. In: Gerking SD (ed.): The biological basis of freshwater fish production. Blackwell Scientific Publs, Oxford, 175 - 214
- Wicklum D, Davies RW (1996): The effects of chronic cadmium stress on energy acquisition and allocation in a freshwater benthic invertebrate predator. - Aquatic Toxicol **35**: 237 - 252
- Widdows J, Donkin P (1991): Role of physiological energetics in ecotoxicology. - Comp Biochem Physiol **100C**: 69 - 75
- Widdows J, Hawkins AJS (1989): Partitioning of rate of heat dissipation by *Mytilus edulis* into maintenance, feeding, and growth components. - Physiol Zool **62** (3): 764 - 784
- Widdows J, Johnson D (1988): Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for growth. - Mar Ecol Prog Ser **46**: 113 - 121
- Wieser W (1986): Bioenergetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Wightman JA (1977): Respirometry techniques for terrestrial invertebrates and their application to energetics studies. - N Z Journal of Zoology **4**: 453 - 469
- Winner RW, Farrell MP (1976): Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. - J Fish Res Board Can **33**: 1685 - 1691

- Winner RW, Keeling T, Yeager R, Farrell MP (1977): Effect of food type on the acute and chronic toxicity to *Daphnia magna*. - *Freshwater Biol* **7**: 343 - 349
- Wolf G, Scheunders P, Selens M (1998): Evaluation of the swimming activity of *Daphnia magna* by image analysis after administration of sublethal cadmium concentrations. - *Comp Biochem Physiol A* **128**: 99 - 105
- Woltering DM, Larson RJ, Hopping WD, Jamieson RA, de Oude, NT (1987): The environmental fate and effects of detergents. - *Tens Surf Det* **24** (5): 286 - 296
- Zaffagnini F (1987): Reproduction in *Daphnia*. In: Peters RH, de Bernardi R (eds.): *Daphnia*. *Mem Ist Ital Idrobiol* **45**: 245 - 284

9. Anhang

A 1 Korrektur der Respirometerdaten hinsichtlich der Algenphotosynthese

1. Abschätzung des mittleren physiologisch aktiven Algenbiovolumens in den Kontrollen:

Zur Vereinfachung der Kalkulation wurde angenommen, daß die Freßaktivität der Daphnien eine lineare Abnahme des Algenbiovolumens zur Folge hat.

a) Abschätzung des ingestierten Algenbiovolumens / Versuchstag:

$$\text{Ingestion}_1 \text{ (1. Tag)} = \text{Algen}_1 - \text{Rest}_1$$

$$\text{Ingestion}_2 \text{ (mittlerer Wert am 2. bzw. 3. Tag)} * = ((\text{Algen}_2 + \text{Algen}_3 + \text{Rest}_1) - \text{Rest}_3)/2$$

* nach Ablauf des 2. Tages wurde keine Partikelanalyse durchgeführt

Algen₁₋₃: Algenbiovolumen der drei Futterrationen

Rest₁: Algenbiovolumen im Replikat 24 h nach der ersten Algenapplikation

Rest₃: Algenbiovolumen in den Respirometerkammern am Ende des Meßzeitraums

b) Abschätzung des mittleren physiologisch aktiven Algenbiovolumens in den Kontrollen:

$$1. \text{ Tag: } \text{Algen}_1 - (1/3 \text{ Ingestion}_1)$$

$$2. \text{ Tag: } \text{Rest}_1 + \text{Algen}_2 - (1/3 \text{ Ingestion}_2)$$

$$3. \text{ Tag: } \text{Rest}_3 + (2/3 \text{ Ingestion}_2)$$

2. Berechnung des mittleren physiologisch aktiven Algenbiovolumens in den exponierten Testansätzen:

Die für die drei Meßtage ermittelten Werte wurden jeweils um den Anteil erhöht, der nach der kalkulierten Ingestionshemmung der Daphnien zu erwarten war.

3. Berechnung der Sauerstoffproduktion:

Die Kalkulation der Sauerstofffreisetzung erfolgte nach Gl. 6, bei CTAB-Exposition wurden die in Tab. A 2.1 aufgeführten Chemikalieneffekte auf die Algenphotosynthese berücksichtigt.

A 2 Einfluß der Testchemikalien auf die Algenphotosynthese

Tab. A 2: Effekte auf die Algenphotosynthese (Sauerstoffproduktion und Biovolumenzuwachs); dargestellt als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von 3 Kontrollen (jeweils Mittelwerte von 2 Parallelen pro Testkonzentration).

Tab. A 2.1: CTAB

	Sauerstoffproduktion	Biovolumenzuwachs
36 µg/L	- 7 %	- 11 %
43 µg/L	- 21 %	- 25 %
52 µg/L	- 32 %	- 34 %

Tab. A 2.2: Kupfersulfat Pentahydrat

	Sauerstoffproduktion	Biovolumenzuwachs
23 µg/L	0 %	49 %
33 µg/L	- 4 %	40 %
40 µg/L	- 12 %	41 %

Tab. A 2.3: Cadmiumchlorid Monohydrat

	Sauerstoffproduktion	Biovolumenzuwachs
6,7 µg/L	13 %	11 %
10 µg/L	7 %	4 %
15 µg/L	7 %	8 %

A 3 Reproduzierbarkeit der Experimente mit CTAB

Ergebnisse von 3 Messungen (1 d vorexponiert) und 2 Messungen (4 d und 13 d vorexponiert). Die Daten wurden jeweils für 10 Adulte und die während 4 d freigesetzten Jungtiere ermittelt und als prozentuale Abweichung zum Mittelwert von 3 Kontrollen dargestellt.

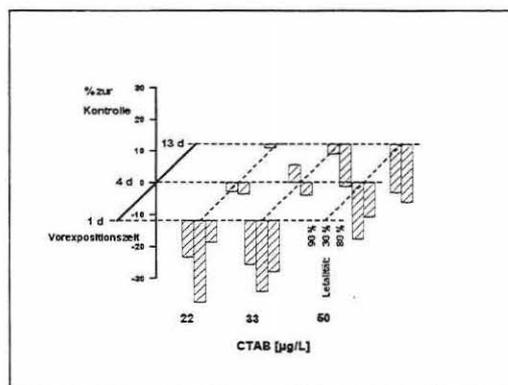


Abb. A 3.1: Sauerstoffverbrauch [µL O₂/72 h]

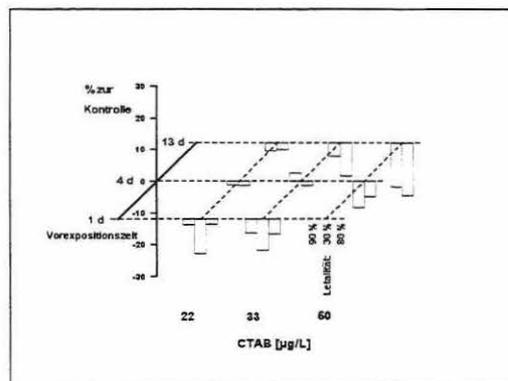


Abb. A 3.2: Ingestion [fL Algenvolumen/72 h]

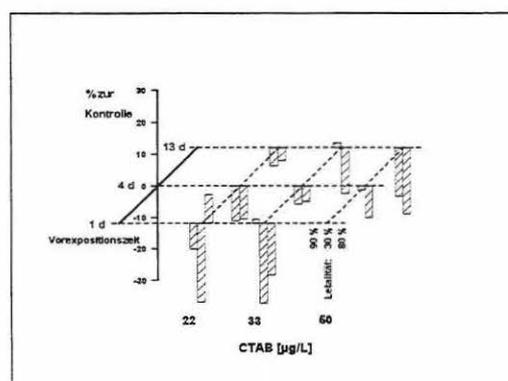


Abb. A 3.3: Wachstumsspezifischer Sauerstoffverbrauch [µL O₂/72 h/mg Biomasseproduktion].

A 4 Mittlerer Sauerstoffverbrauch während der Hell/Dunkelphasen

Tab. A 4: Mittlerer stündlicher Sauerstoffverbrauch von Daphnienkohorten (10 adulte Daphnien einschließlich der innerhalb von 4 d entlassenen Neonaten, 9×10^9 fL Algen/d) während der Lichtphasen 6-22 Uhr (L) und Dunkelphasen 22-6 Uhr (D) im Vergleich zum Mittelwert der parallel untersuchten Kontrollen.

Tab. A 4.1: CTAB (50 µg/L 1 d vorbelastet: Letalität)

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			4 d vorexponiert [µg/L]		
			22 [µL O ₂ /h]	33 [µL O ₂ /h]	50 [µL O ₂ /h]	22 [µL O ₂ /h]	33 [µL O ₂ /h]	50 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-22	-20	-18		-20	-19	-17
	D	-21	-17	-16		-20	-21	-18
2. Tag	L	-36	-33	-29		-33	-33	-27
	D	-32	-29	-26		-34	-35	-29
3. Tag	L	-53	-52	-44		-50	-48	-40
	D	-45	-41	-44		-50	-53	-45
Mittel	L	-37	-35	-31		-34	-33	-28
Mittel	D	-32	-29	-28		-35	-36	-30

Tab. A 4.2: CTAB (50 µg/L 1 d vorbelastet: Letalität)

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			13 d vorexponiert [µg/L]		
			22 [µL O ₂ /h]	33 [µL O ₂ /h]	50 [µL O ₂ /h]	22 [µL O ₂ /h]	33 [µL O ₂ /h]	50 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-17	-13	-14		-16	-14	-14
	D	-16	-10	-12		-19	-16	-15
2. Tag	L	-29	-22	-22		-26	-21	-21
	D	-27	-18	-17		-33	-28	-23
3. Tag	L	-32	-26	-27		-29	-24	-23
	D	-41	-28	-28		-46	-43	-40
Mittel	L	-26	-20	-21		-24	-20	-19
Mittel	D	-28	-18	-19		-33	-29	-26

Tab. A 4.3: CTAB (50 µg/L 1 d vorbelastet: Letalität)

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			4 d vorexponiert [µg/L]		
			22 [µL O ₂ /h]	33 [µL O ₂ /h]	50 [µL O ₂ /h]	22, [µL O ₂ /h]	33 [µL O ₂ /h]	50 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-21	-18	-16		-19	-19	-17
	D	-19	-15	-18		-22	-22	-17
2. Tag	L	-33	-30	-27		-32	-32	-26
	D	-31	-22	-26		-30	-36	-26
3. Tag	L	-48	-47	-45		-44	-49	-37
	D	-44	-35	-38		-48	-55	-42
Mittel	L	-34	-32	-29		-32	-34	-27
Mittel	D	-31	-24	-27		-33	-38	-28

Tab. A 4.4: CTAB (1 d vorexponiert nicht getestet)

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			13 d vorexponiert [µg/L]		
						22 [µL O ₂ /h]	33 [µL O ₂ /h]	50 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-18				-18	-16	-14
	D	-16				-18	-18	-16
2. Tag	L	-29				-26	-25	-21
	D	-23				-27	-27	-25
3. Tag	L	-41				-39	-37	-32
	D	-33				-36	-42	-37
Mittel	L	-29				-28	-26	-22
Mittel	D	-24				-27	-29	-26

Tab. A 4.5: Kupfersulfat Pentahydrat (40 µg/L 1 d vorexponiert: Letalität)

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			4 d vorexponiert [µg/L]		
			16 [µL O ₂ /h]	25 [µL O ₂ /h]	40 [µL O ₂ /h]	16 [µL O ₂ /h]	25 [µL O ₂ /h]	40 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-21	-19	-18		-20	-17	-16
	D	-16	-14	-13		-21	-24	-16
2. Tag	L	-33	-32	-33		-31	-26	-25
	D	-26	-26	-25		-33	-29	-26
3. Tag	L	-44	-47	-48		-45	-42	-39
	D	-36	-35	-35		-42	-42	-40
Mittel	L	-33	-32	-33		-32	-29	-27
Mittel	D	-26	-25	-24		-32	-32	-27

Tab. A 4.6: Kupfersulfat Pentahydrat (40 µg/L 1 d vorexponiert: Letalität)

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			13 d vorexponiert [µg/L]		
			16 [µL O ₂ /h]	25 [µL O ₂ /h]	40 [µL O ₂ /h]	16 [µL O ₂ /h]	25 [µL O ₂ /h]	40 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-21	-17	-11		-17	-16	-18
	D	-15	-11	-9		-18	-16	-16
2. Tag	L	-29	-26	-19		-29	-26	-28
	D	-23	-21	-19		-28	-25	-26
3. Tag	L	-42	-41	-30		-40	-39	-43
	D	-32	-27	-25		-38	-36	-38
Mittel	L	-31	-28	-20		-29	-27	-29
Mittel	D	-24	-19	-18		-28	-26	-26

Tab. A 4.7: Cadmiumchlorid Monohydrat

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			4 d vorexponiert [µg/L]		
			0,9 [µL O ₂ /h]	3,0 [µL O ₂ /h]	10 [µL O ₂ /h]	0,9 [µL O ₂ /h]	3,0 [µL O ₂ /h]	10 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-19	-26	-24	-27	-24	-28	-25
	D	-17	-17	-18	-21	-25	-37	-22
2. Tag	L	-35	-38	-36	-44	-41	-35	-33
	D	-29	-29	-31	-32	-38	-35	-29
3. Tag	L	-50	-55	-56	-60	-51	-52	-49
	D	-44	-46	-44	-47	-52	-53	-42
Mittel	L	-35	-40	-39	-44	-39	-38	-36
Mittel	D	-30	-30	-31	-33	-38	-42	-31

Tab. A 4.8: Cadmiumchlorid Monohydrat

Meßtag		Kontrolle [µL O ₂ /h]	1 d vorexponiert [µg/L]			13 d vorexponiert [µg/L]		
			0,9 [µL O ₂ /h]	3,0 [µL O ₂ /h]	10 [µL O ₂ /h]	0,9 [µL O ₂ /h]	3,0 [µL O ₂ /h]	10 [µL O ₂ /h]
1. Tag	L	-19	-19	-17	-22	-23	-18	-18
	D	-17	-18	-13	-20	-24	-20	-20
2. Tag	L	-31	-28	-26	-32	-35	-30	-25
	D	-27	-21	-20	-28	-31	-35	-26
3. Tag	L	-46	-42	-40	-44	-46	-43	-37
	D	-41	-32	-28	-38	-42	-52	-43
Mittel	L	-32	-29	-28	-32	-35	-30	-27
Mittel	D	-28	-24	-20	-29	-32	-36	-30

A 5 Chemikalieneffekte auf Sauerstoffverbrauch und Ingestion in Abhängigkeit von der Konzentration und der Expositionszeit (Daten zu den Abb. 8, 9, 11, 12, 14, 15)

Tab. A 5: CTAB-, Kupfer- und Cadmiumeffekte auf Ingestion [fL Algenbiovolumen/72 h], Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h}$], wachstumsspezifischen Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/mg}$ Biomasseproduktion] und gewichtsspezifischen Sauerstoffverbrauch [$\mu\text{L O}_2/72 \text{ h/ mg}$ Trockengewicht bei Meßbeginn]:

Zeit	Konz.	Ingestion	O ₂ -Verbrauch	wachstums- spezifischer O ₂ -Verbrauch	gewichts- spezifischer O ₂ -Verbrauch
[d]	[$\mu\text{g/L}$]	[%]	[%]	[%]	[%]
CTAB					
1	22	-6,3	-16,1	-7,8	-19,1
1	33	-7,3	-19,0	-20,8	-12,5
1	50	Letalität			
4	22	-1,3	-3,6	-10,5	-1,4
4	33	-1,4	-4,0	-4,8	-9,3
4	50	-5,0	-10,9	-10,2	-16,3
13	22	-2,0	0,1	-4,1	6,9
13	33	-10,4	-13,4	-14,5	-6,0
13	50	-16,5	-18,2	-20,9	-2,0
Kupfer					
1	16	0,6	-6,5	-16,9	1,4
1	25	-15,4	-16,8	-18,4	-9,3
1	40	Letalität			
4	16	2,7	3,9	3,3	1,2
4	25	-2,0	-4,0	-1,0	-2,0
4	40	-6,4	-12,9	-30,2	18,5
13	16	-1,7	1,1	-6,1	1,3
13	25	-2,9	-6,1	6,4	-10,2
13	40	0,7	1,1	-12,3	8,3
Cadmium					
1	0,9	-2,9	0,0	-5,9	6,3
1	3,0	-3,7	-3,9	-2,9	-7,0
1	10	-1,9	11,0	5,3	5,5
4	0,9	0,2	16,0	9,7	18,3
4	3,0	0,1	17,8	3,3	25,1
4	10	-5,5	1,3	-5,9	6,2
13	0,9	-0,2	9,6	4,9	10,8
13	3,0	-0,7	4,7	-5,6	7,9
13	10	-12,2	-9,3	-25,9	14,9

A 6 Ergebnisse der Reproduktionstests

Tab. A 6: Ergebnisse der chronischen Reproduktionstests: Länge (Mittelwert \pm sn) der Primiparae (8. Tag) und adulten Daphnien am 17. Tag [mm], Letalität während des Beobachtungszeitraums (17 d), Reproduktionsrate als mittlere kumulative Neonatenzahl / überlebender Daphnien / 17 d (Σmx) sowie als kumulative Brut / überlebender Daphnie / 17 d unter Berücksichtigung aborter Eier (Σmx^*) und geschätzte spezifische Zuwachsrate r .

Tab. A 6.1: CTAB

CTAB [$\mu\text{g/L}$]	Länge (8 d) [mm]	Länge (17 d) [mm]	Mortalität [%]	Reproduktionsrate		r
				Σmx	Σmx^*	
0	3,1 \pm 0,2	3,9 \pm 0,4	0	31,0	35,6	0,271
17	3,0 \pm 0,2	3,9 \pm 0,3	10	35,9	39,9	0,263
21	2,9 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	0	39,7	41,6	0,289
25	3,0 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	10	37,8	40,4	0,283
30	2,9 \pm 0,2	3,7 \pm 0,4	0	42,5	44,5	0,303
36	2,8 \pm 0,3	3,7 \pm 0,3	0	41,3	43,1	0,298
43	2,8 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2	10	44,3	46,1	0,303
52	2,7 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2	50	40,3	42,6	0,268

Tab. A 6.2: Kupfersulfat Pentahydrat

CuSO ₄ x 5 H ₂ O [$\mu\text{g/L}$]	Länge (8 d) [mm]	Länge (17 d) [mm]	Mortalität [%]	Reproduktionsrate		r
				Σmx	Σmx^*	
0	3,0 \pm 0,3	3,8 \pm 0,2	10	41,0	44,7	0,300
0	3,0 \pm 0,2	3,9 \pm 0,2	0	43,8	47,1	0,313
16	3,1 \pm 0,3	3,9 \pm 0,2	10	45,2	50,2	0,306
19	3,0 \pm 0,3	3,8 \pm 0,4	0	39,3	44,1	0,302
23	3,1 \pm 0,3	3,8 \pm 0,5	20	47,4	50,3	0,290
28	3,0 \pm 0,3	3,7 \pm 0,5	30	43,7	45,9	0,278
33	3,0 \pm 0,3	3,7 \pm 0,3	30	44,9	46,6	0,277
40	2,7 \pm 0,3	3,4 \pm 0,2	60	30,8	31,3	0,201
48	2,6 \pm 0,2	3,5	80	37,5	38,0	0,156

Tab. A 6.3: Cadmiumchlorid Monohydrat

CdCl ₂ × H ₂ O [µg/L]	Länge (8 d) [mm]	Länge (17 d) [mm]	Mortalität [%]	Reproduktionsrate		r
				Σmx	Σmx*	
0	3,0 ± 0,1	3,8 ± 0,2	0	40,8	42,6	0,291
0	3,1 ± 0,1	3,8 ± 0,3	0	39,3	40,0	0,286
1,3	3,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	10	38,8	39,3	0,277
2,0	3,0 ± 0,2	3,8 ± 0,2	20	40,4	41,3	0,279
3,0	3,0 ± 0,2	3,7 ± 0,4	10	40,7	41,6	0,286
4,4	3,0 ± 0,2	3,8 ± 0,1	0	41,2	42,6	0,294
6,7	2,9 ± 0,1	3,6 ± 0,2	0	31,0	32,1	0,271
10	2,8 ± 0,2	3,4 ± 0,2	20	26,9	27,5	0,247
15	2,5 ± 0,4	3,4	70	21,2	22,3	0,228

Danksagungen

Folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. I. Schuphan (RWTH Aachen, Lehrstuhl für Biologie V: Ökologie, Ökotoxikologie, Ökochemie) für die Unterstützung des Promotionsvorhabens und die Übernahme der Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Schüürmann (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektionsleiter der Sektion Chemische Ökotoxikologie) für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.

Herrn PD Dr. H. Segner (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Abteilungsleiter der Aquatischen Ökotoxikologie) für die Betreuung der Arbeit, für die hilfreichen und motivierenden Diskussionen und die Unterstützung jeglicher Art bei der Durchführung und Fertigstellung der Doktorarbeit.

Herrn PD Dr. H. T. Ratte (RWTH Aachen, Lehrstuhl für Biologie V: Ökologie, Ökotoxikologie, Ökochemie) für seine Unterstützung und die hilfreiche Diskussion.

Herrn Dr. R. Altenburger (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Laborleiter Biotest-Labor) für die fachlichen Anregungen und Diskussionen, die Hilfestellung bei der Lösung praktischer Probleme sowie die vielfältige Förderung und Aufmunterung.

Frau Monika Hammers (RWTH Aachen, Lehrstuhl für Biologie V: Ökologie, Ökotoxikologie, Ökochemie) für die Einführung in die Daphnienkultivierung und -testung.

Herrn Dr. J. Flachowsky und Frau P. Fiedler (Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Analytik) für die Durchführung der TOC-Bestimmungen.

Frau U. Kayser und Frau J. Krüger für Ihre Hilfe im Labor und bei der Daphnienkultivierung.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Aquatische Ökotoxikologie für das angenehme Arbeitsklima.

Monika Knops

Lebenslauf

02.04.1964	Geboren in Aachen
1970 - 1974	Grundschule in Aachen / Eilendorf
1974 - 1980	Geschwister-Scholl-Gymnasium in Aachen
1980 - 1984	Kaiser-Karls-Gymnasium in Aachen
Juni 1984	Abitur
1984 - 1987	Ausbildung zur Kinderkrankenschwester am Universitätsklinikum der Gesamthochschule Essen
September 1987	Examen als Kinderkrankenschwester
1987 - 1988	Tätigkeit als Kinderkrankenschwester in der Kinderklinik der RWTH Aachen
1988 - 1994	Studium der Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
November 1994	Diplom in Biologie
seit August 1995	Anfertigung der Dissertation am Umweltforschungs- zentrum Leipzig-Halle GmbH

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Chemische Ökotoxikologie
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2309
Telefax 0341/235-2401