

**Wirkung von Chemikalien auf die Phagozytoseleistung
von Protozoen in Belebtschlämmen
- ein neues Testverfahren**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Dipl. Biol. Viktoria Pauli

aus Berlin

Berlin, 2013

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Rudolf Achazi im Zeitraum zwischen September 2001 und Dezember 2012 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf K. Achazi

Disputation am: 01.07.2013

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Rudolf Achazi erstellt, dem ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die unkomplizierte und freundliche Betreuung sowie die kritische Durchsicht meines Manuskripts an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Grundlage für die hier dargelegten Ergebnisse bildete ein vom Umweltbundesamt gefördertes Forschungs- & Entwicklungsvorhaben [1], das von Herrn Dr. Wilfried Pauli initiiert und fachlich-inhaltlich begleitet wurde. An dieser Stelle möchte ich mich besonders dafür bedanken, dass er mir dieses Projekt zur Bearbeitung überlassen hat und mir stets durch seine umfassende Unterstützung sowie ständige Diskussionsbereitschaft zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel spreche ich meinen Dank aus für sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme der Erstbegutachtung. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Rudolf Achazi für die Übernahme des Koreferats.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfestellungen bei kleineren und größeren Problemen bedanken.

Inhalt

Einleitung	9
Problemstellung	9
Wissenschaftlicher Hintergrund	10
Protozoen als Teil der Abwasserreinigung	10
Ernährungsweise	13
Bedeutung für die Abwasserreinigung	14
Schadstoffe und Protozoen	16
Zielsetzung	18
Lösungsweg	18
Material & Methoden	23
Medien	23
Künstliches Abwasser (Belebtschlamm-Respirationstest)	23
Terrific Broth (TB, Anzucht von <i>E. coli</i>)	23
PPY-Medium (Ciliaten-Anzucht)	24
Nährsubstrat auf Bakterienbasis (Belebtschlamm-Phagozytostest)	25
Belebtschlamm	26
„Biochemical tools“ und Testchemikalien	27
Spezifische Hemmstoffe	27
Testsubstanzen	28
Messungen & Testverfahren	30
Hydrophobizitätsmessung (H_R -Wert Bestimmung)	30
Oberflächenpotentialmessung	31
Mikroskopische Bestimmung der Bakteriendichte	31
Elektronische Partikelanalyse	32

Bestimmung der Respirationsrate von Klärschlammproben	32
Letalitätsmessung von Tetrahymena	33
Schlammcharakterisierung	34
Vitalitätsmessung der Belebtschlammfauna.....	36
Thermische Behandlung des Belebtschlammes.....	37
Schlammfraktionierung	37
Messung der Phagozytoseaktivität von Belebtschlamm	38
Ergebnisse	44
Teil 1 – Erfassung der Phagozytoseaktivität	44
Selektive Defaunierung	44
Trübungsabnahme.....	48
Unspezifische Bindung von <i>E. coli</i>	49
Phagozytosemessung	50
Ermittlung von Konzentrations-Wirkungskurven.....	53
Hauptakteure der Phagozytose.....	54
Teil 2 – Charakteristika der Phagozytose	55
Kinetik	55
Temperaturabhängigkeit.....	56
Lokalisation.....	57
Zeitliche Schwankungen	58
Lagerfähigkeit des Belebtschlammes	61
Teil 3 - Rahmenbedingungen für ein Testprotokoll	62
Verschlüsse der Testgefäße.....	62
Neigungswinkel und Schüttelgeschwindigkeit der Testgefäße.....	63
Festlegung des Testzeitraumes	65
Belebtschlamm- und Substratkonzentration im Test	66
Verdünnungsmedium	67
Lösungsmittel	68

Teil 4 - Schadstoffmessungen	70
Konzentrations-Wirkungskurven.....	70
Messung von flüchtigen Stoffen.....	70
EC ₅₀ -Werte und Lipophilie	72
Phagozytoseinhibition von Belebtschlamm und Tetrahymena	73
Teil 5 – Entwurf einer Testvorschrift.....	76
Testsystem.....	76
Testdurchführung.....	76
Auswertung der Testergebnisse.....	86
Diskussion	89
Teil 1 Erfassung der Phagozytoseaktivität	89
Selektive Defaunierung	89
Trübungsabnahme / Reduktion bakterieller Suspensionsgehalte.....	91
Unspezifische Bindung von <i>E. coli</i>	92
Phagozytosemessung	93
Ermittlung von Konzentrations-Wirkungskurven.....	94
Hauptakteure der Phagozytose	94
Teil 2 – Charakteristika der Phagozytose	96
Kinetik	96
Temperaturabhängigkeit.....	97
Lokalisation der Phagozytoseaktivität.....	98
Zeitliche Schwankungen	99
Lagerfähigkeit der Proben	100
Teil 3 – Rahmenbedingungen für ein Testprotokoll	101
Teil 4 - Schadstoffmessungen	102
Konzentrations-Wirkungskurven.....	102
Messung von flüchtigen Stoffen.....	103
EC ₅₀ -Werte und Lipophilie	103

Teil 5 – Schlussfolgerung und Ausblick	108
Zusammenfassung	110
Abstract	112
Literaturverzeichnis	114
Lebenslauf	142
Anhang	143
Teil 1 – Konzentrations-Wirkungskurven	143
Teil 2 – Kurzfassung Testanleitung/Testvorschrift.....	154
Protokoll Testvorbereitung	154
Schema Testvorbereitung	155
Testprotokoll	156

EINLEITUNG

Problemstellung

In der Natur bilden enge mikrobielle Verbundsysteme aus Bakterien und Protozoen die Grundlage der „natürlichen Selbstreinigung“. Sie sind es, die in der Natur den wesentlichen Anteil am Abbau organischer Stoffe haben. Auch in der Abwasserreinigung sind Bakterien und Protozoen für die Bewältigung der Schmutzfracht aus Haushalten, Industrie, Gewerbe und Handwerk verantwortlich. Hier werden sie - technisch optimiert - mit dem Ziel einer möglichst hohen Reinigungsleistung eingesetzt.

Während Bakterien den eigentlichen Abbau der organischen Schmutzfracht des Abwassers leisten, erfolgt durch die Protozoen in der Abwasserreinigung die eigentliche „Klärung“ des Abwassers (vgl. Abb. 1); durch Protozoen werden im Wesentlichen gerade diejenigen Bakterien eliminiert, die in suspendierter Form vorliegen und eine Trübung des gereinigten Abwassers und eine deutlich sichtbare organische Belastung des Anlagenablaufs hervorrufen würden.



Abb. 1: Verschmutztes, trübes Abwasser vor der Reinigung im Anlagenzulauf (links) und „geklärt“ nach der Reinigung im Anlagenablauf (rechts).

Gelangen Umweltchemikalien in das Abwasser, können – ebenso wie es für die natürlichen Kreisläufe gilt – die mikrobiellen Abbau- und Reinigungsprozesse emp-

findlich gestört werden – mit der Folge eines Austrages von Schmutz- und Giftstoffen aus dem Klärwerk in Flüsse und Seen. Um eine Gefährdungsabschätzung für derartige Risikoszenarien vornehmen zu können, wird auf Ergebnisse zurückgegriffen, wie sie in standardisierten Biotests mit Vertretern relevanter Organismengruppen ermittelt werden. Während solche Standardtests für die Gruppe der Bakterien - als ein wesentlicher Teil der an den biologischen Abbauvorgängen beteiligten Organismen - zur Verfügung stehen, fehlen vergleichbare Vorschriften für Protozoen völlig.

Diese Problematik wurde auch von Umweltbehörden erkannt. So wird auf europäischer Ebene schon seit mehr als einem Jahrzehnt offiziell ein Bedarf zur Entwicklung und Etablierung eines Tests zur Gefährdungsabschätzung von Chemikalien im Hinblick auf die funktionelle Leistung von originär der Kläranlagenbiomasse entstammenden Protozoen-Populationen immer wieder formuliert [2].

Wissenschaftlicher Hintergrund

Protozoen als Teil der Abwasserreinigung

Protozoen stellen einen typischen Bestandteil der Biozönose in Abwasserreinigungsanlagen dar. Das geht aus vielen systematischen Untersuchungen an Kläranlagen hervor (z.B. [3] [4] [5] [6]). Ihr Auftreten ist in diesen eng an Biofilme gebunden und beschränkt sich weitgehend auf aerobe Verfahrenstechniken. An anaeroben Prozessen sind nur wenige Spezialisten unter den Protozoen beteiligt. So sind Protozoengemeinschaften in Belebungsanlagen typischerweise im Belebungsbecken sowie im Nachklärbecken anzutreffen, während das überstehende Abwasser des Nachklärbeckens (Überlauf) - abgesehen von Störsituationen - sowie der Faulschlamm keine oder nur wenige Protozoen enthalten [7].

Im Belebtschlamm stellen Protozoen mit einem Anteil von über 90% den größten Anteil an der eukaryotischen Biomasse (Abb. 2). Obwohl alle drei Großgruppen der Protozoen: Flagellaten, Ciliaten und Amöben (Nackt- und Schalenamöben) in biologischen Abwasserreinigungsanlagen anzutreffen sind, stellen Ciliaten hinsichtlich Biomasse und Artenzahl sowohl in Belebtschlammanlagen als auch bei Festbettverfahren den größten Anteil [4] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14].

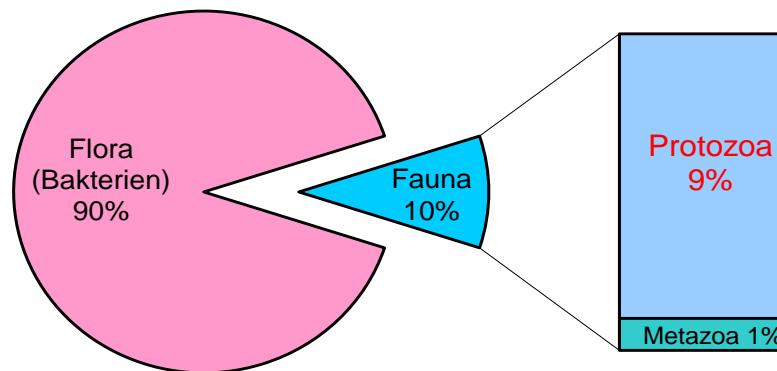


Abb. 2: Biomassezusammensetzung des Belebtschlammes. Links: Prokaryoten (Bakterien) gegenüber eukaryotischen Organismen, rechts: Anteil der Einzeller (Protozoen) und Metazoen an den nichtbakteriellen, eukaryotischen Organismen des Belebtschlammes, nach [9] [10] [13][15].

Die Artenzusammensetzung der Ciliaten wird wiederum von einigen wenigen, vorrangig sessilen (peritrichen) und kriechenden (hypotrichen) Spezies bestimmt (Abb. 3). Während, wie allgemein angenommen wird, freischwimmende Ciliaten mit dem gereinigten Abwasser leicht ausgewaschen werden, sind kriechende und besonders sessile Ciliaten (vgl. Abb. 4) eng mit den bakteriellen Biofilmen (Flocken und Aufwuchs) assoziiert [38]. Im Falle von Festbetтанlagen verbleiben sie mit dem trägergebundenen Aufwuchs in der Anlage; beim Belebtschlammverfahren sedimentieren sie mit dem Belebtschlamm und werden so durch die kontinuierliche Schlammrückführung in der Anlage zurückgehalten. Mit Zelltitern von durchschnittlich mehr als $10^4/\text{mL}$ übertreffen die hier im artifiziellen Reinigungssystem anzutreffenden Ciliatenpopulationen die im Plankton eutropher Gewässer auftretenden Dichten um mehr als das 100-fache [16].

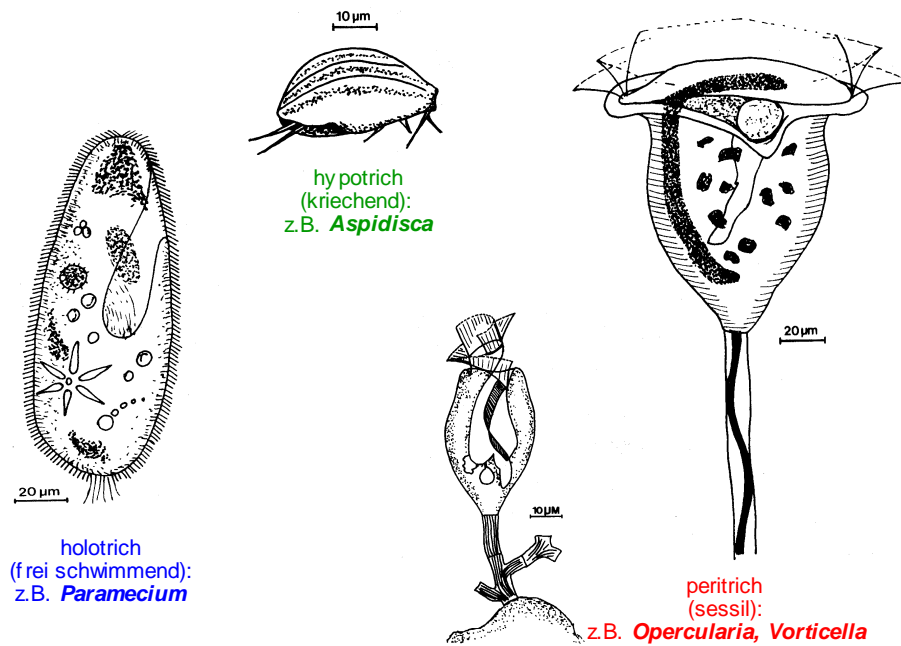


Abb. 3: Beispiele für kläranlagentypische Ciliaten (frei schwimmend, kriechend, sessil, Zeichnungen aus [17], nachbearbeitet.

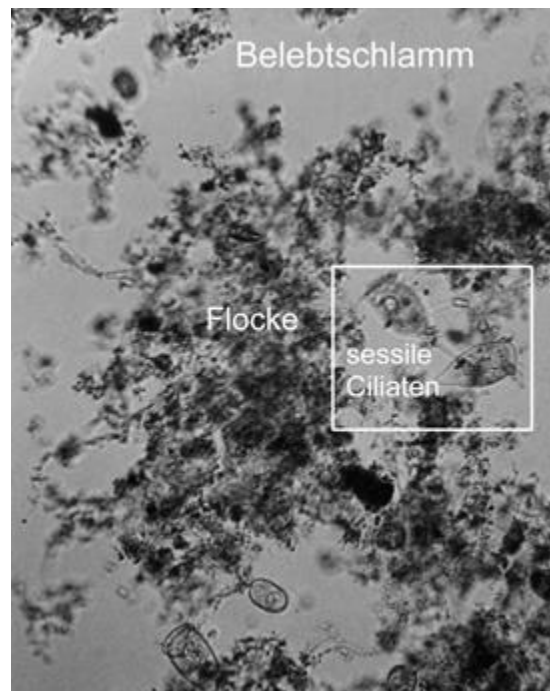


Abb. 4: Typische Belebtschlammflocke mit sessilen (aufsitzenden) Wimpertierchen (Ciliaten, Protozoen), Bild aus [18], nachbearbeitet

Ernährungsweise

Ciliaten verfügen über verschiedene Möglichkeiten, Nahrung bzw. Nährstoffe aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Neben der aktiven und passiven, „Carrier“-vermittelten Aufnahme über die Plasmamembran [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25], der pinocytotischen Nahrungsaufnahme ('cell-drinking') über submikroskopische, partikelfreie Plasmamembran-Vesikel [26] [27], kann partikuläre Nahrung über den bei Ciliaten hochspezialisierten Mundapparat aufgenommen werden. Dabei werden Partikel vor der Aufnahme ins Zellinnere stark aufkonzentriert. Das mittels ihrer Cilien herbeigestrudelte Wasser mit den darin enthaltenen Partikeln muss ein Sieb passieren, das Teilchen mit Größen zwischen 0,2 und mehreren Mikrometern zurückhält [28] [29] [27] (vgl. auch Abb. 55). Paramecien beispielsweise reichern so Nahrungspartikel um etwa ein Tausendfaches vor der Ingestion an [30]. Im Vergleich zum tatsächlich aufgenommenen Volumen von nur wenigen Pikolitern pro Stunde und Zelle werden von einem Ciliaten im Mittel 100 nL pro Stunde und mehr partikelfrei filtriert [9] [31] [32] [33] [34] [35]. Bei durchschnittlichen Ciliatendichten von 10^4 /mL bedeutet das, dass innerhalb von weniger als 1 Stunde das gesamte Volumen eines Belebungsbeckens einmal durchfiltriert wird.

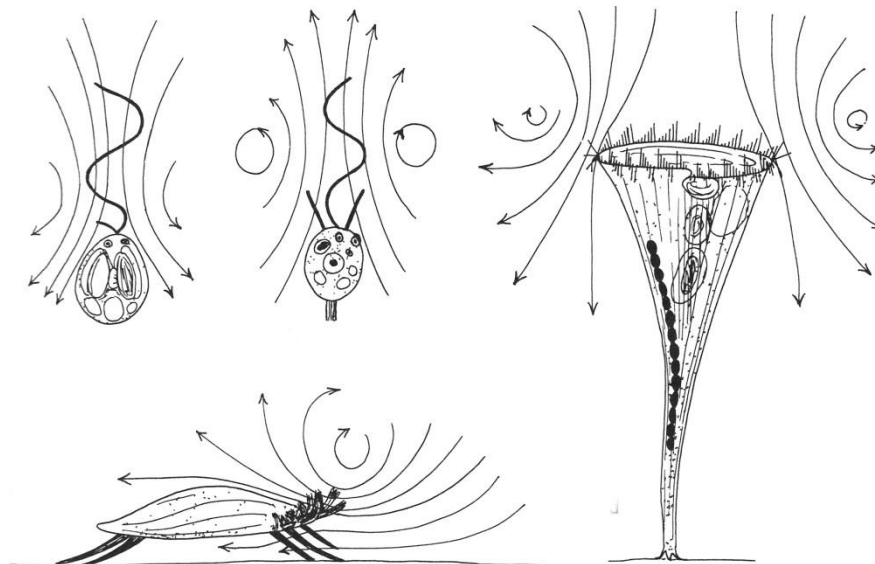


Abb. 5: Mechanismen der Nahrungsaufnahme von Protozoen: Durch den Cilien- bzw. Flagellenschlag werden Wasserströme erzeugt, mit deren Hilfe Nahrungspartikel in die Mundregion gestrudelt und - wie bei Ciliaten - effektiv ausfiltriert werden (aus [27]).

Dies lässt den Fraßdruck erahnen, der auf den Bakterienpopulationen im Belebtschlamm lastet und nur entschärft werden kann, wenn effektive Abwehrmechanismen der Fraßresistenz dagegen ergriffen werden.

Bedeutung für die Abwasserreinigung

Der wohl nachhaltigste Mechanismus des Schutzes vor dem Fraßdruck durch Protozoen ist die Bildung von Aggregaten, d.h. die Organisation in Biofilmen bzw. – wie im Belebtschlamm – die komplexe Wuchsform in (Schlamm-)Flocken [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50], deren Größe die direkte Aufnahme durch Protozoen verhindert. Wenn aber die Flockenstruktur der Bakterien deren Fraß durch Protozoen verhindert, wie ist dann die Anwesenheit und das Überleben von Protozoen in diesem scheinbar nahrungslosen Milieu zu erklären? Obwohl über die direkten Nahrungszusammenhänge nur wenig belastbare Literatur existiert, erscheint es dennoch naheliegend, dass es die Schlammflocken selbst sind, die einen entscheidenden Beitrag zur Nahrungsversorgung der Protozoen leisten.

Zwischen den in Flocken organisierten Bakterienkolonien und frei suspendierten Einzelzellen besteht nämlich ein dynamisches Gleichgewicht (vgl. hierzu auch Abb. 6). Durch sogenanntes ‘detachment’ werden kontinuierlich Bakterien oder kleine Zellcluster von den Schlammflocken in das umgebende Medium abgegeben [51] [52] [53] [54] [50] [55]. Nach Schätzungen von Baty et al. [56] können sich so innerhalb von nur 8 Tagen ganze Biofilmkolonien einmal vollständig erneuern. Auch wenn die Bakterien im normalen Belebtschlamm nur als Flocken in Erscheinung treten und der Überstand klar ist, so weist dies nur darauf hin, dass die Protozoen ihre Funktion als Bakterienfiltrierer erfüllen. Fehlen die Protozoen, entsteht in der Regel ein trüber, durch hohe Bakterientiter gekennzeichnete Überstand. Dies zeigten zum ersten Mal ganz deutlich die – schon lange vor dem Wissen um das Verhalten von Bakterien in Biofilmen gemachten – Untersuchungen von Curds et al. aus dem Jahr 1968 [57], die in den Folgejahren in vielen weiteren Arbeiten grundsätzlich bestätigt wurden (z.B. [4] [58] [7] [39] [59] [60] [61] [62] [63]).

Curds et al. konnten unter Laborbedingungen den Nachweis erbringen, dass Protozoen hauptverantwortlich für die eigentliche „Klärung“ des Abwassers sind [57]. Wurden Protozoen selektiv aus der biologischen Stufe der Abwasserreinigung ent-

fernt, wies der Kläranlagenablauf eine starke, durch einen hohen Suspensagehalt an Bakterien verursachte Trübung auf. Wurden Protozoen nachgezüchtet, stellte sich wieder eine normale Reinigungsleistung ein und die Trübung des Ablaufwassers verschwand (Abb. 7). In Abwesenheit von Protozoen konnten sich einzeln vorliegende Bakterien, sog. Solitärformen, die nicht an Flocken (Belebung) oder Biofilme (Festbettverfahren) gebunden waren, stark vermehren. Ein Teil der Bakterienbiomasse der biologischen Reinigungsstufe lag damit nicht mehr an feste Strukturen gebunden vor, sondern trieb suspendiert im Abwasser umher und verursachte damit eine klar erkennbare Trübung des Anlagenablaufs.

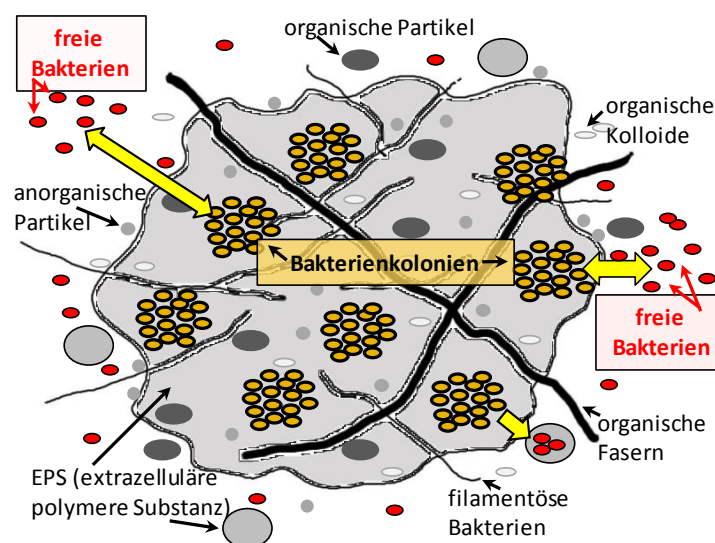


Abb. 6: schematische Darstellung einer Belebtschlammflocke. Die gelben Pfeile sollen den kontinuierlichen und gegenläufig stattfindenden Prozess der Organisation suspendierter Bakterien in Biofilm-Mikrokolonien sowie der Flocken-Erosion in Form der Ablösung einzelner Zellen oder kleiner Cluster des Biofilms ('detachment') wiedergeben (nach [50]).

Durch Protozoen werden aber nicht nur diese in der Anlage ständig neu entstehenden frei suspendierten Einzelbakterien auf einem niedrigen Niveau gehalten (s.a. [40] [43] [64] [65] [66] [67]), es werden auch - z.T. hoch pathogene - Bakterien ausgefiltert, die mit dem Zulauf in die Kläranlage gespült werden [68]. Zwischen 7 und 25% der Schadstofffracht, gemessen als chemischer Sauerstoffbedarf (CSB-Wert), werden hierbei allein heterotrophen Bakterien zugeschrieben [69] [70] [71]. In Partikeldichten ausgedrückt heißt dies, dass mit dem Zulauf etwa $1,5 \times 10^8$ Bakterien/mL in das Belebungsbecken gelangen [69]. Hier bleiben sie für etwa 3-8 Stunden [72]. Dies führt zu einer bakteriellen Nahrungsquelle durch den Zufluss von

etwa $2\text{-}5 \times 10^7$ Bakterien/mL x h. Nach Macek [73] liegt die minimale Versorgung der Protozoenpopulationen im Belebtschlamm bei 2×10^7 Bakterien/mL x h - nur knapp unter der durchschnittlich mit dem Abwasser einströmenden Bakterienmenge. Es ist also den Protozoen ohne weiteres möglich, neben Bakterien, die sich von den Flocken gelöst haben, einen Anteil von 7-25% der Abwasser-(CSB)-Schmutzfracht aus dem einströmenden Abwasser durch Phagozytose zu filtrieren und als Nahrungsquelle zu nutzen.

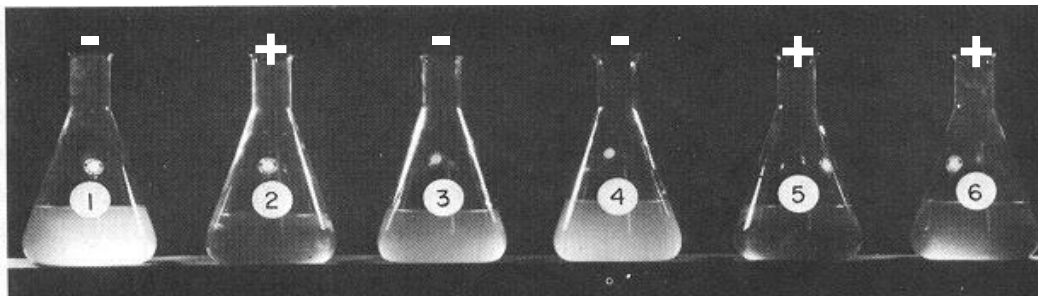
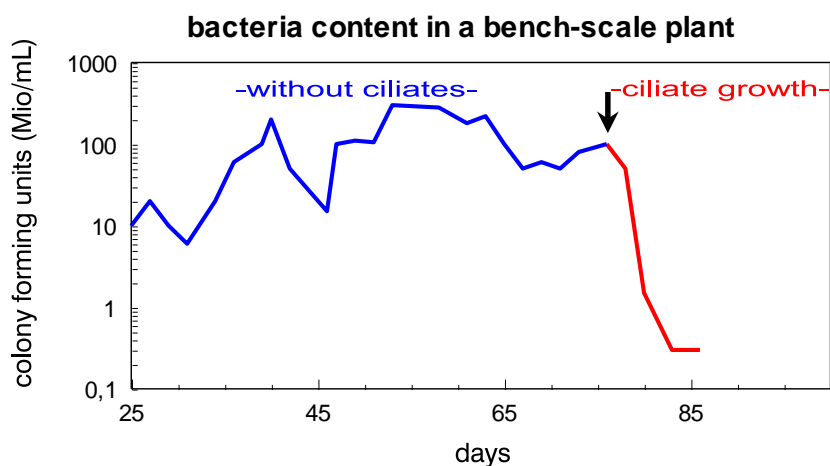


Abb. 7: Oben: Bakterielle Suspensionsgehalte einer Labor-Belebtschlammanlage in Abwesenheit und in Gegenwart von Ciliaten (nach [57]). Unten: Trübungen im Anlagenablauf von parallel arbeitenden Labor-Belebtschlammanlagen. Proben 2, 5 und 6 entstammen einer Anlage mit normaler Ciliatenbiozönose (+), im Falle der Nummern 1, 3 und 4 enthielt der Belebtschlamm keine Ciliaten (-), nach [74].

Schadstoffe und Protozoen

Häufig gelangen mit dem Abwasser auch toxisch wirkende Inhaltsstoffe in die Kläranlage. Im Resultat wird die biologische Reinigungsleistung vermindert oder kommt sogar zum Erliegen. Für eine Reihe von potentiell toxischen Stoffen wurden in diesem Zusammenhang bereits Toxizitätstests mit abwassertypischen Protozoen

durchgeführt. Auffällig ist, dass Protozoentests keine Übereinstimmung der Wirkpotentiale mit herkömmlichen Toxizitätstests an Bakterien erkennen lassen. Stoffe, die sich gegenüber Protozoen als hochtoxisch erweisen, können mit Bakterientests, welche bislang im Belebtschlamm ausschließlich als Indikatoren schädigender Effekte dienen, nicht ausreichend erfasst werden [67] [75] [76]. Die folgende Abb. 8 verdeutlicht dies. Hier sind Hemmwerte für Protozoen toxikologischen Daten von Bakterien gegenübergestellt (aus: [76]). Die Punkte streuen zufällig um die Winkelhalbierende, ein Zusammenhang ist nicht erkennbar. Auch die Statistik unterstreicht mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,00007$ die geringe Wahrscheinlichkeit eines (linearen) Zusammenhanges zwischen Bakterien- und Protozoentoxizität.

Offensichtlich treten bei Protozoen eine Reihe zusätzlicher toxischer Interaktionen hervor, die durch Tests an Bakterien nicht wiedergegeben werden. Um eine realistischere Abschätzung der Gefährdungspotentiale und eine Festlegung von Grenzwerten vornehmen zu können, sind weitere biologische Testverfahren unerlässlich,

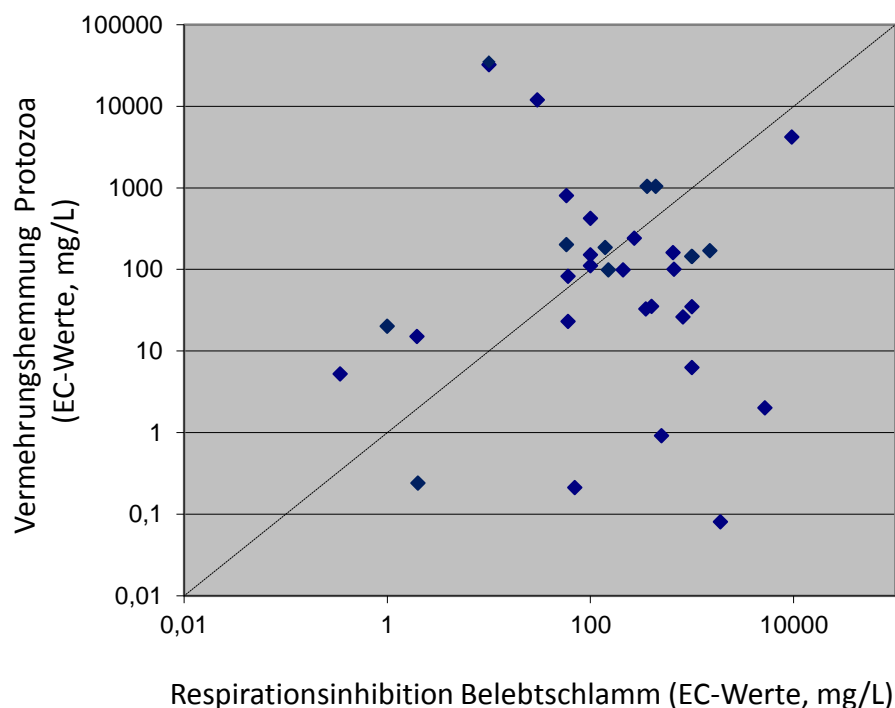


Abb. 8: Toxikologischer Vergleich von Bakterien (Standardtest: Respirationsinhibition) und Protozoen, aus [76]. Die eingezeichnete Linie gibt die Winkelhalbierende (gleiche Effekte) wieder.

die anhand repräsentativer Organismen eine summarische Erfassung der Wirkung toxischer Stoffe gewährleisten und zugleich das Spektrum der für das biologische System charakteristischen und bedeutsamen Organismengruppen abdecken. Ein Test mit Protozoen aus Abwassereinigungsanlagen verspricht hier eine bedeutende Lücke in der regulativen Chemikalienbewertung zu schließen.

Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, einen Ökotoxizitätstest zu entwickeln, mit dem sich die schädigende Wirkung von Umweltchemikalien gegenüber Protozoen in Abwassereinigungsanlagen quantitativ erfassen lässt. Ausgehend von den Anforderungen der "Technical Recommendation" [2] sollte mit dem Test

- a) ein zentraler funktioneller Parameter von Protozoen erfasst und
- b) die Toxizität gegenüber der Protozoenbiozönose möglichst in ihrer Gesamtheit detektiert werden können.

Aus Gründen der Anwenderfreundlichkeit war es zudem erklärtes Ziel, den Test so zu gestalten, dass

- a) der „Testorganismus“ praktisch jederzeit leicht verfügbar ist und
- b) eine kostengünstige, einfache und schnelle Durchführbarkeit des Tests bei hohem Probendurchsatz gewährleistet wird.

In einem ersten Validierungsschritt sollte das Testsystem schließlich anhand einer möglichst repräsentativen Auswahl umweltrelevanter Chemikalien auf seine Anwendungsbreite und Zuverlässigkeit hin überprüft werden.

Lösungsweg

Berücksichtigung der technischen Anforderungen

- Toxische Einflüsse sollten integrativ anhand der Filtrationsleistung als wichtigster ökologischer Funktion der Belebtschlamm-Protozoengemeinschaft überprüft werden (Testendpunkt ist also ein Funktionsparameter, in den die Leistung der Protozoen, nicht die der bakteriellen Mikroorganismen eingeht).
- Da sich im Allgemeinen nur für städtische (kommunale), nicht aber für industrielle Abwässer einheitliche Aussagen über die Art und Menge der Schmutzfracht

und damit die Schlammeigenschaften machen lassen, beschränkte sich das Testmaterial auf Belebtschlamm aus vorwiegend mit häuslichem Abwasser gespeisten kommunalen Anlagen.

- Als Testmaterial wurde Belebtschlamm herangezogen. Belebtschlamm hat den Vorteil, durch die allgemein weite Verbreitung der Belebtschlammtechnologie praktisch überall verfügbar zu sein (leichte Verfügbarkeit). Im Gegensatz zu Schlämmen von Festbettverfahren (Tropfkörper oder Scheibentauchkörper) lassen sich im Falle des suspendierten Schlammes von Belebungsanlagen zu jeder Jahreszeit definierte Schlammengen aus dem Belebungsbecken bzw. dem Rücklaufschlamm ohne Schwierigkeiten entnehmen (homogenes Testmaterial).

Zu berücksichtigende Probleme bei der Entwicklung des Testsystems

Im Reinigungsprozess von Kläranlagen stellen einzeln suspendierte Bakterien die Hauptnahrungsquelle für Protozoen dar. Für toxikologische Zwecke diese natürlichen Verhältnisse im „Labor“ nachzustellen, d.h. die Phagozytoseleistung in nativen, unveränderten Schlammproben zu verfolgen und als Endpunkt toxischer Effekte heranzuziehen, gestaltet sich schwierig. Zum einen sind die Einflussgrößen dieses durch Räuber-Beute-Beziehungen gekennzeichneten Mikrokosmos kaum bekannt, zum anderen lässt sich hier die Filtrationsleistung nur umständlich und/oder mit hohem messtechnischen Aufwand verfolgen. Einen Ausweg böte die Nährstoffversorgung der Belebtschlamm-Protozoen durch direkte Zugabe suspendierter Bakterien: Belebtschlamm aus dem Belebungsablauf ist weitestgehend befreit von den organischen Belastungen des einströmenden Abwassers (z.B. [77]). Auch die Trübung, hervorgerufen durch hohe Partikelgehalte im Zulauf, ist fast verschwunden (s. auch Abb. 1).

Nach Entnahme ist der Belebtschlamm von jeglicher weiterer Nährstoffzufuhr abgeschnitten. Damit fehlt sowohl den Bakterienflocken als auch den assoziierten Protozoen praktisch jegliche verwertbare Nahrungsquelle. Die autochthonen Bakterienpopulationen sind im Hungerzustand und können sich nicht vermehren – was Veränderungen der bakteriellen Suspensionsgehalte verhindert. Die Protozoen ihrerseits sind in der entnommenen Belebtschlammprobe ebenfalls von weiterer Nährstoffzufuhr isoliert und somit durch Zugabe von bakteriellem Substrat in ihrer Aktivität von außen beeinfluss- und steuerbar (vgl. Abb. 9).



Abb. 9: Als Lösungsansatz zu Grunde gelegtes Testprinzip. Nach Entnahme ist die Belebtschlammprobe von der Nährstoffzufuhr abgeschnitten. Durch ausschließliche Zugabe von Bakterien wird selektiv die partikuläre Nährstoffzufuhr der Protozoen gesteuert.

- Aus diesem Grunde wurden die bakteriellen Suspensagehalte künstlich durch Zudotieren von Bakterien definiert vorgegeben und anschließend die Elimination der Bakterien mit einfachen photometrischen Methoden verfolgt (Abb. 10). Damit lässt sich die funktionale Integrität der Protozoengemeinschaft in ihrer Gesamtheit erfassen und die Filtrationsleistung aller in der Schlammprobe vorhandenen Protozoen-Spezies unabhängig von ihrem Einzelbeitrag integrativ verfolgen.
- Die Testdauer wurde auf einen Zeitraum von 18-24 Stunden festgelegt. Dies entspricht in etwa den typischen Verweilzeiten moderner Belebungsanlagen (persönl. Mitteil.) & z.B. [78] [79]. Diese für biologische Tests relativ geringe Dauer hat zudem den Vorteil, schnell Aussagen zum toxikologischen Potential von Umweltchemikalien treffen zu können. Zugleich wurden die arbeits- und messintensiven Abschnitte im Testprozedere auf den Anfang und das Ende dieses Zeitraumes beschränkt, so dass sich die Testdurchführung auch problemlos in den Laboralltag integrieren lässt.
- Mit einer statischen Kultivierung der Testansätze unter Batch-Bedingungen, d.h. ohne kontinuierliche Nährstoffversorgung, sollte schließlich eine einfache Handhabung erreicht werden. Durch eine gleichzeitige Reduktion des Probenvolumens auf den mL-Maßstab sollte darüber hinaus ein hoher Probendurchsatz auf kleinstem Raum gewährleistet werden (s.a. Abb. 10).

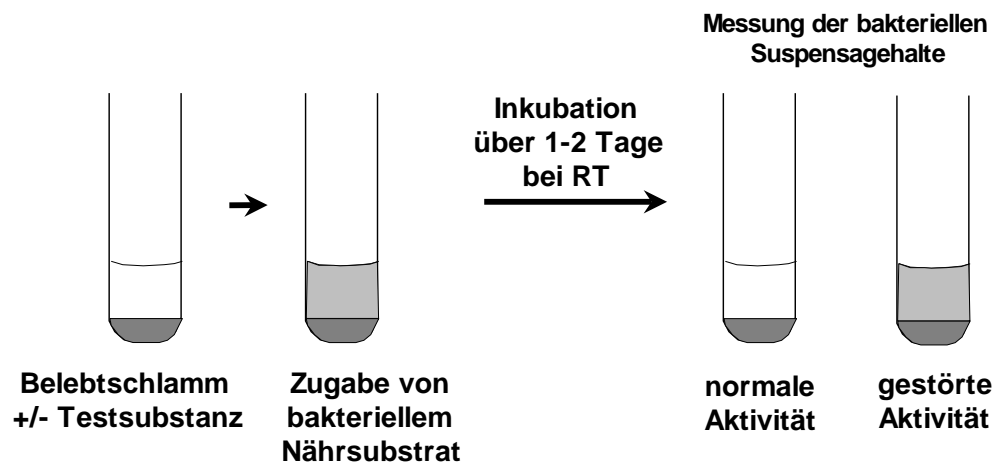


Abb. 10: vorgesehener Lösungsansatz für das Testschema zur Erfassung der funktionellen Integrität von Protozoen in Belebtschlämmen (Teströhrchen mit Testvolumina von wenigen Millilitern). Die als „Testorganismus“ dienende Belebtschlammprobe wird dem Belebungsablauf entnommen. Die hier weitgehend klare und substratarmer Probe (s. Text) wird erneut durch definierte, äußere Zugabe von Bakterien eingetrübt. Anschließend wird die Abnahme der Trübung als integrativer Ausdruck der Phagozytoseleistung der (Gesamt-) Protozoenbiozönose gemessen.

Neben Protozoen kommen in Belebtschlämmen weitere, potentiell die Phagozytose beeinflussende Organismen wie Rotatorien und Nematoden vor. Durch ihre z.T. hohen Individuendichten in Belebtschlämmen können dabei Rotatorien durchaus als potentielle Nahrungskonkurrenten von Protozoen aufgefasst werden (z.B. [80]). Damit hier ein Eindruck von der Leistungsfähigkeit der Protozoen gewonnen und der anteilige Einfluss weiterer phagozytotisch aktiver Organismengruppen abgeschätzt werden konnte, wurden Methoden entwickelt, die eine selektive Inhibition der Aktivitäten von Rotatorien und Nematoden erlauben.

Um einen ersten Schritt in Richtung einer Testvalidierung zu erreichen, wurde ein Chemikalien-Testset nach folgenden Kriterien zusammengestellt:

- a) Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und Spezifität des Testsystems wurden zum einen „biochemical tools“, d.h. Substanzen mit bekanntem spezifischen Wirkmodus in die Wirkanalyse mit einbezogen.
- b) Im Hinblick auf die Anwendungsbreite des ökotoxikologischen Nachweises wurden zum anderen Chemikalien gewählt, die eine möglichst große Bandbreite umweltrelevanter Stoffe mit möglichst verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften und unterschiedlichen Wirkmechanismen repräsentieren [81].

- c) Ein letztes und zugleich mit entscheidendes Kriterium bei der Auswahl des Chemikaliensets bildete das Vorliegen von toxikologischen Vergleichsdaten, besonders für Protozoen und hierbei wiederum für das Testmerkmal der Phagozytose-Inhibition.

MATERIAL & METHODEN

Medien

Künstliches Abwasser (Belebtschlamm-Respirationstest)

Künstliches Abwasser wurde aus 4 getrennten Stammlösungen folgender Zusammensetzung (s.u.) hergestellt. Alle Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert. Zur Testdurchführung wurden 50 mL der Lösung I, 3,3 mL der Lösung II, 5 mL der Lösung III und 1 mL der Lösung IV auf 1 L mit H_2O aufgefüllt. In Abhängigkeit des im Test eingesetzten Belebtschlammgehaltes (g TS/L) wurde nochmals mit H_2O im Verhältnis 1:5 (Tests mit 2 g TS/L) bzw. 1:10 (Versuche mit Belebtschlammgehalten von 1 g TS/L) weiter verdünnt. Dieses vorverdünnte synthetische Abwasser wurde sofort verwendet.

Lösung I	Pepton	62,4 g/L
	Ethanol	27,0 g/L
	Harnstoff	10,8 g/L
	NaCl	2,4 g/L
	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,6 g/L
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,8 g/L

Lösung IV	$\text{FeCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	9,0 g/L
	$\text{Co Cl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1,4 g/L
	H_3BO_3	1,0 g/L
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/L
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/L
	$\text{MnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/L
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	20,0 g/L

Lösung II	Folsäure	0,1 g/L
-----------	----------	---------

Lösung III	NaH_2PO_4	195 g/L
	NH_4Cl	117 g/L
	KCl	111 g/L
	Citronensäure	96 g/L
	MgCl_2	119 g/L
	CaCl_2	27 g/L
	Na_2MoO_4	5 g/L

Im Test nach folgender Vorverdünnung eingesetzt:	
Lösung I	50 mL
Lösung II	3,3 mL
Lösung III	5 mL
Lösung IV	1 mL
ad 1 Liter mit H_2O	
1:5 mit H_2O für Tests mit 2 g TS/L bzw. 1:10 bei	
Belebtschlammgehalten von 1 g TS/L weiterverdünnt	

Terrific Broth (TB, Anzucht von E. coli)

TB-Medium (Sigma) ist ein reichhaltiges Medium, das typischerweise zur Anzucht und Vermehrung von *E. coli* eingesetzt wird und hohe Zelldichten erlaubt. TB-

Medium setzt sich wie folgt zusammen: Trypton (12 g/L), Hefeextrakt (24 g/L), K_2HPO_4 (9.4 g/L), KH_2PO_4 (2.2 g/L), Glycerin (4 mL/L), pH 7,0. Die Mediumbestandteile wurden in 1 Liter bidion. Wasser gelöst und für 20 min bei 121°C autoklaviert.

PPY-Medium (Ciliaten-Anzucht)

Die Ciliaten *Tetrahymena pyriformis* und *T. thermophila* wurden axenisch auf Basis eines Vollmediums folgender Zusammensetzung kultiviert:

Organische Bestandteile:

- 5 g/L Proteose-Pepton (Difco, Detroit, USA)
- 1 g/L Hefe-Extrakt (Difco)
- 5 g/L Glucose (Merck, Darmstadt)

Salze / Spurenelemente, die zusätzlich dem Kulturmedium zugegeben werden:

50	mg/L	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	werden als 100x konzentrierte Salzlösung 1 zugegeben.
5	mg/L	$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	
1.25	mg/L	$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	
100	mg/L	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	werden als 100x konzentrierte Salzlösung 2 (getrennt von 1) zugegeben.
25	mg/L	$Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	
0.5	mg/L	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	
0.05	mg/L	$ZnCl_2$	

(Alle Salze von Sigma-Aldrich Chemie)

Puffer:

10 mM Mops (3-(N-morpholino)propansulfonsäure, Biomol), pH 7,2, NaOH.

Nach Zugabe aller Komponenten wurde das Medium autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min) oder nach Erhitzen auf 80°C und anschließendem Abkühlen auf RT sterilfiltriert (0,2 µm, Filtropur S, Sarstedt).

Nährsubstrat auf Bakterienbasis (Belebtschlamm-Phagozytostest)

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein typischer Bewohner des menschlichen und tierischen Dickdarms. Er stellt etwa 1-2% der Darmbakterien und wird pro Tag in Mengen von mehr als einer Billion (10^{12}) ausgeschieden. *E. coli* findet sich daher in hohen Konzentrationen im Abwasser und gilt als sicherer Indikator für fäkale Verunreinigungen von Gewässern. Neben seiner bedeutenden Rolle als Abwasserkeim repräsentiert *E. coli* den wohl bestuntersuchten Modellorganismus prokaryotischer Zellen. Obwohl *E. coli* als fakultativ pathogen eingeordnet wird, stehen für Forschungs- und Versuchszwecke eine Reihe harmloser - Risk Group 1 - "Schulstämme" ohne gesundheitliche Bedenken zur Verfügung.

Folgende Stämme wurden in den Untersuchungen eingesetzt.

E. coli ATCC 8739 (Sigma-Aldrich), test strain (Risk Group 2¹)

E. coli ATCC 9637 (Sigma-Aldrich), test strain (Risk Group 1²)

E. coli ATCC 11303 (Sigma-Aldrich), teaching strain (Risk Group 1²)

E. coli K12 (Sigma-Aldrich), teaching strain (Risk Group 1²)

Als Nährsubstrat wurde ausschließlich das Lyophilisat der Bakterienstämme in einer Konzentration von 0,4 mg/mL (gelöst in H₂O) eingesetzt. Hierbei wurde in den überwiegenden Fällen das von der Firma Sigma-Aldrich bezogene und bei -20°C gelagerte Lyophilisat herangezogen. Versuchsweise wurden aber auch, wie im Falle der beiden *E. coli*-Stämme ATCC 8739 und ATCC 9637, aus dem Lyophilisat von Sigma bakterielle Stammkulturen angezüchtet und eigenes Lyophilisat – ohne erkennbare Unterschiede zum kommerziellen Produkt - für Testzwecke hergestellt.

Stammkultivierung

Zur Langzeitlagerung wurde ein Teil der *E. coli*-Trockensubstanz mit einem Spatel in 2 mL TB-Medium in 12 mL-Reagenzröhrchen mit Kappe überführt und bei 37°C

¹ Der Stamm ATCC 8739 unterliegt seit 2004 dem Infektionsschutzgesetz und der Risk Group 2 (RG2) zugeordnet: Agents that are associated with human disease which is rarely serious and for which preventive or therapeutic interventions are often available.

² Risk Group 1 (RG1): Agents that are not associated with disease in healthy adult humans.

und 200 rpm im Schüttelinkubator über Nacht bebrütet. Ein Aliquot von 100 µL der Übernachtskultur wurde anschließend mit 15% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren (Stammkultur).

Herstellung von Lyophilisat

Zur Vermehrung wurden ca. 5 µL der Stammkultur steril entnommen und 50 bzw. 100 mL TB-Medium in 200 bzw. 500 mL-Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kultivierung erfolgte im Schüttler unter guter Belüftung (200 rpm) bei 37°C. Nach einer Inkubation von 16-18 Stunden wurden die früh-stationären Zellen durch Zentrifugation bei $10^4 \times g$ pelletiert, einmal in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und lyophilisiert. Hierzu wurde die Zellmasse in einem -80°C-Tiefkühlschrank eingefroren und anschließend der restliche Flüssigkeitsgehalt nach Evakuierung im Gefriertrockner (Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4 LD, Martin Christ) verdampft. Das so erhaltene Lyophilisat konnte bei -20°C über mehrere Monate ohne erkennbare Veränderungen aufbewahrt werden.

Belebtschlamm

Probennahme

Basis der Untersuchungen bildete die kommunale Abwasserreinigungsanlage Stahnsdorf³. Der Belebtschlamm wurde - soweit nicht anders beschrieben - mit Hilfe eines Schöpfers meist vormittags zwischen 9 und 11 Uhr unmittelbar aus dem Ablauf eines Belebungsbeckens der Kläranlage entnommen. Die starke Belüftung des Belebungsbeckens gewährleistete dabei die Homogenität der Proben. Bei jeder Probennahme wurden etwa 0,5-1 Liter Belebtschlamm in verschließbare Po-

³ Das Klärwerk Stahnsdorf ist eine von aktuell 6 Abwasserreinigungsanlagen des Großraum Berlins und wird überwiegend mit Abwasser der südlichen Berliner Bezirke gespeist. Mit einer Abwassermenge von etwa 22.500.000 m³/a reinigt die Anlage etwa 8% der Abwässer Berlins und umliegender Gemeinden. Das Klärwerk ist mit biologischen Reinigungsstufen einschließlich Nährstoffelimination ausgerüstet. Das Abwasser durchläuft die mechanische Reinigung mit Sandfängen und Absetzbecken, danach die biologische Reinigung, deren Belebungsbecken mit anaeroben, anoxischen und aeroben Zonen zur biologischen Phosphor- und Stickstoffentfernung ausgestattet sind. Das gereinigte Abwasser wird in den Teltowkanal abgeleitet.

lypropylenflaschen abgefüllt, innerhalb etwa einer halben Stunde ins Labor transportiert und dort biologisch und physikalisch charakterisiert (s.u.).

Lagerung

Der zur Schlammcharakterisierung nicht benötigte Belebtschlamm verblieb in den verschließbaren, transparenten Polypropylenflaschen und wurde ohne weitere Verarbeitungsschritte im Kühlschrank bei 4-6°C mit dicht aufsitzendem Schraubverschluss gelagert.

„Biochemical tools“ und Testchemikalien

Spezifische Hemmstoffe

Zur Unterdrückung der Aktivität der Belebtschlammfauna und damit der Phagozytoseleistung überhaupt wurde Digitonin⁴ (Sigma-Aldrich), gelöst in H₂O, verwendet. Die als typischer Eukaryoteninhibitor angesehene Substanz Digitonin [82] hatte sich in Vortests als selektiver Inhibitor der Belebtschlammfauna erwiesen und wurde in den Positivkontrollen in Konzentrationen von (nominell) 200 mg/L mitgeführt.

Die Substanz Cytochalasin B wurde ebenfalls herangezogen, um spezifisch die Phagozytoseaktivität zu inhibieren. Als Lösungsmittel für die 1000-fach konzentrierte Stammlösung diente Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO selbst zeigt bis zu Konzentrationen von 0,2% v/v keine Wirkung auf die in dieser Arbeit untersuchte biologische Aktivität des Belebtschlammes.

Zur selektiven Hemmung der Metazoen des Belebtschlammes wurden die Stoffe Carbofuran⁵ (Riedel de Haën), Dichlorvos⁵ (Riedel de Haën), Digoxin⁶ (Fluka), Levamisol⁵ (Riedel de Haën) und Paraoxon⁵ (Fluka) eingesetzt.

⁴ Bei dem hier verwendeten Produkt handelt es sich um ein Substanzgemisch, für das von der Fa. Sigma-Aldrich ein Digitoningehalt von etwa 50% (dünnschichtchromatographisch bestimmt) angegeben wird.

⁵ Spezifische Hemmung der Acetylcholinesterase

⁶ Spezifische Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase

Testsubstanzen

Zur Validierung des Testsystems „Phagozytoseaktivität des Belebtschlammes“ wurde bei der Auswahl der Testchemikalien versucht, auf die Besonderheit der Unspezifität der Wirkung von Umweltschadstoffen einzugehen und die bei umweltrelevanten Chemikalien anzutreffende Divergenz der physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie die Vielschichtigkeit der Wirkungsmuster zu berücksichtigen: Neben 10 nichtpolar narkotisch und 6 polar narkotisch wirkenden Substanzen mit sowohl hydrophilen als auch stark lipophilen Eigenschaften ($\log\text{Pow}^7$ zwischen -1,38 und 7,54) wurden 4 reaktive oder reaktive Vorstufen von Chemikalien eingesetzt. Zusätzlich wurden eine Carbonsäure, Cadmiumchlorid als Vertreter von Schwermetallen und 5 Substanzen mit spezifischer, d.h. an bestimmte Stoffwechselwege und funktionelle Strukturen gebundener Wirkung in die Untersuchung mit einbezogen (vgl. Tab. 1, S. 29).

Als Lösungsmittel der Substanzen diente Leitungswasser, das auch generell zur Verdünnung des Belebtschlammes eingesetzt wurde. Nur von den schwer wasserlöslichen Substanzen Phenylether, 1-Bromoctan, Pentachlorphenol, Hexachlorophen sowie trans-Methyl- β -nitrostyrol (vgl. die Nummern 9, 10, 16, 17 und 18, Tab. 1) wurden Stammlösungen in dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Für den Einsatz im Test wurden von diesen DMSO-Stammlösungen Verdünnungen mit Leitungswasser hergestellt. Die Endkonzentration an DMSO im Testansatz lag dabei jeweils unterhalb der Schwelle beobachtbarer Effekte ($\leq 0,2\%$).

Zum Vergleich der hier im Belebtschlamm beobachteten Hemmeffekte sind Einzelspezies-Testdaten zur Phagozytoseaktivität des Ciliaten *Tetrahymena* (aus: [83] [84]) angeführt (Tab. 2). Im Gegensatz zum Belebtschlammtest, bei dem die Wirkung nach einem Zeitraum von 22 h erfasst wird, liegen hier die Expositionszeiträume allerdings bei nur 30 min [83] bzw. 15 min [84].

⁷ $\log\text{Pow}$: Logarithmus₁₀ des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (Standardmaß der Lipophilie)

Tab. 1: gibt einen Überblick über die 27 Testsubstanzen, deren CAS-Nummern, Hersteller, Molekulargewichte, Summenformeln, Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (logPow-Werte) sowie deren bekanntem bzw. vermutetem Wirkmechanismus. Die Kategorisierung der Wirkmechanismen folgt dabei der in der aquatischen Ökotoxikologie gängigen Einteilung in inerte (nonpolar narcotic) und weniger inerte (polar narcotic), reaktive und spezifisch wirkende Chemikalien (vgl. hierzu [81] [85] und Übersicht in [86]), wobei die Toxizität der „narkotisch“ wirkenden Stoffe anhand ihrer Lipophilie (logPow) ökotoxikologisch beschrieben werden kann und die Kategorie der 'nonpolar narcotics' für die Festlegung einer „minimalen“ oder „Basistoxizität“ herangezogen wird.

Nr.	Name	CAS-Nr.	Firma	MW	Formel	log Pow	Wirkmechanismus
1	Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5	Sig-Ald	78,13	C ₂ H ₆ SO	-1,35 ^a	nonpolar narcotic ⁶
2	Methanol	67-56-1	Sig-Ald	119,38	CH ₄ O	-0,77 ^a	nonpolar narcotic ⁸
3	Ethanol	64-17-5	Merck	46,07	C ₂ H ₆ O	-0,31 ^a	nonpolar narcotic ²
4	Aceton	67-64-1	Sig-Ald	58,08	C ₃ H ₆ O	-0,24 ^a	nonpolar narcotic ⁹
5	n-Butyramid	541-35-5	Fluka	87,12	C ₄ H ₉ NO	-0,21 ^a	nonpolar narcotic ¹
6	tert. Butanol	75-65-0	Fluka	74,12	C ₄ H ₁₀ O	0,35 ^a	nonpolar narcotic ²
7	Chloroform	67-66-3	Sig-Ald	119,38	CHCl ₃	1,97 ^a	nonpolar narcotic ⁹
8	Hexanol	111-27-3	Merck	102,18	C ₆ H ₁₄ O	2,03 ^a	nonpolar narcotic ³
9	Diphenylether	101-84-8	Sig-Ald.	170,21	C ₁₂ H ₁₀ O	4,21 ^a	nonpolar narcotic (flüchtig) ¹
10	1-Bromoctan	111-83-1	Sig-Ald.	193,12	C ₈ H ₁₇ Br	4,89 ^b	nonpolar narcotic (schwach flüchtig) ⁶
11	Natrium Octanoat	1984-06-1	Sig-Ald.	166,2	C ₈ H ₁₅ NaO ₂	-1,38 ^f	carboxylic salt ⁷
12	Phenol	108-95-2	Sig-Ald.	94,11	C ₆ H ₆ O	1,46 ^a	polar narcotic ⁹
13	4-Chlorphenol	106-48-9	R.d.H	128,56	C ₆ H ₅ ClO	2,39 ^a	polar narcotic, schwacher Entkoppler ⁵
14	1-Octylamin	111-86-4	Fluka	129,24	C ₈ H ₁₉ N	2,9 ^c	polar narcotic ⁶
15	2,4-Dichlorphenol	120-83-2	R.d.H	163	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	3,06 ^a	polar narcotic, schwacher Entkoppler ⁵
16	Pentachlorphenol	87-86-5	Sig-Ald.	266,34	C ₆ HCl ₅ O	5,12 ^a	polar narcotic & Entkoppler ¹
17	Hexachlorophen	70-30-4	R.d.H	406,9	C ₁₃ H ₆ Cl ₆ O ₂	7,54 ^a	polar narcotic ⁵
18	trans-4-Methyl-β-nitrostyrol	5153-68-4	Sig-Ald.	163,17	C ₉ H ₉ NO ₂	-	reaktiv (acylierend) ¹
19	2-Brom-2-nitro-1,3-propanediol	52-51-7	Sig-Ald.	199,99	C ₃ H ₆ BrNO ₄	0,18 ^e	reaktiv (elektrophil) ¹
20	Propyl Bromacetat	35223-80-4	Sig-Ald.	181,03	C ₅ H ₉ BrO ₂	1,7 ^d	reaktiv (elektrophil) ¹
21	2-Octyn-1-ol	20739-58-6	Fluka	126,2	C ₈ H ₁₄ O	2,034 ^c	(reaktiv) pro-elektrophil ⁶
22	Cadmiumchlorid	10108-64-2	R.d.H	183,32	CdCl ₂	-	Schwermetall
23	Theophyllin	58-55-9	Sig-Ald.	180,17	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	-0,02 ^a	PDE-Inhibitor ^c
24	Neomycin	1405-10-3	Sig-Ald.	908,9	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃ ·3H ₂ SO ₄	0,5 ^a	PBS-Inhibitor (Prokaryoten/Mitochondrien) ^c & CCB ^b
25	Chloramphenicol	56-75-7	Sig-Ald.	323,13	C ₁₁ H ₁₂ Cl	1,14 ^a	PBS-Inhibitor (Prokaryoten/Mitochondrien) ^c
26	Isobutylmethylxanthin (IBMX)	28822-58-4	Sig-Ald.	222,24	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₂	1,15 ^a	PDE-Inhibitor ^c
27	Polymyxin-B-sulfat (PMBS)	1405-20-5	Sig-Ald.	1.385,61	C ₅₅ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃ ·2H ₂ SO ₄	-	kationisches Detergens ^h

Abkürzungen: CAS (Chemical Abstracts Service), MW (Molekulargewicht); logPow (log₁₀ des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten); Sig.-Ald. (Sigma-Aldrich); R.d.H. (Riedel de Haën); PDE: Phosphodiesterase; PBS: Proteinbiosynthese; CCB: Calcium channel blocker

¹⁾ [88], ²⁾ [89], ³⁾ [90], ⁴⁾ [91], ⁵⁾ [92], ⁶⁾ [93], ⁷⁾ [94], ⁸⁾ [95], ⁹⁾ [96], ^{a)} [97], ^{b)} [98], ^{c)} [99], ^{d)} [100], ^{e)} [101], ^{f)} [102], ^{g)} [103], ^{h)} [104]

Tab. 2: Auflistung der (öko-)toxikologischen Vergleichswerte: Einzelspezies-Phagozytosemessungen nach [83]^a & [84]^b am Ciliaten *Tetrahymena pyriformis*.

Name	EC ₅₀ (mg/L) Phagozytose (<i>T. pyr.</i>)	Lit.quelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	17700	a
Ethanol	9530	b
n-Butyramide	7260	a
tert. Butanol	2970	b
Hexanol	297	b
Diphenylether	16,4	a
1-Bromooctane	14,2	a
Natrium Octanoat	515	a
4-Chlorphenol	31,9	b
1-Octylamin	97,1	a
2,4-Dichlorphenol	11,4	b
Pentachlorphenol	0,148	a
Hexachlorophen	1,23	a
2-Brom-2-nitro-1,3-propandiol	2,41	a
trans-4-Methyl-β-nitrostyrol	0,0805	a
2-Octyn-1-ol	251	a
Cadmiumchlorid	1,79	b
Theophyllin	508	b
Neomycin	177	b
Chloramphenicol	317	b
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	284	b
Polymyxin-B-sulfat (PMBS)	18,4	b

Messungen & Testverfahren

Hydrophobizitätsmessung (H_R-Wert-Bestimmung)

Die Bestimmung der Hydrophobizität erfolgte nach Rosenberg, 1984 [104]. Mit diesem sogenannten BATH-Test wird die Hydrophobizität von Zelloberflächen durch Auftrennung der Zellen in einem lipophil-hydrophilen Zweiphasensystem nach kurzzeitigem Mischen durch Trübungsmessung ermittelt.

Als Ausgangsmaterial diente bakterielles Lyophilisat, das in Leitungswasser suspendiert wurde, so dass die Lösung eine optische Dichte zwischen 0,3 und 0,6 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 440$ nm in einem 12 mL-Rundbodenglasröhrchen mit

einem Innendurchmesser von ca. 14 mm erreichte (Wert 1). 5 mL dieser Zellsuspension wurden im gleichen Rundbodenglasröhrchen mit 1 mL Hexadecan (Fluka) vermischt. Das Zweiphasensystem wurde anschließend 10 Sekunden bei 2500 rpm (höchste Geschwindigkeit, Modell Reax control, Heidolph) gevortext und dann 15 min zur Phasentrennung stehen gelassen. Schließlich wurde die optische Dichte (Wert 2) der wässrigen (unteren) Phase ein zweites Mal direkt im Rundbodenglasröhrchen bei $\lambda = 440$ nm bestimmt. Beide Messungen erfolgten in einem Spektralphotometer mit Rundküvetteneinsatz (Odyssey DR 2500, Hach)⁸. Die relative (prozentuale) Hydrophobizität wurde dann nach folgender Gleichung 1 berechnet:

$$H_R\text{-Wert (relative Hydrophobizität)} = \frac{\text{Wert1} - \text{Wert2}}{\text{Wert1}} \quad \text{Gl. 1}$$

Oberflächenpotentialmessung

Die Messung der Oberflächenpotentiale wurde anhand von Zeta-Potentialmessungen (Zeta Sizer 3000HS, Malvern Instrument GmbH) am Fraunhofer IZM Berlin mit Unterstützung von Herrn Dr. Stefan Fiedler durchgeführt. An dieser Stelle ein herzliches Dankeschön für die freundliche und unkomplizierte Hilfe. Zur Bestimmung des Oberflächenpotentials (Zeta-Potential) wurden die als Nährsubstrat eingesetzten Standardsuspensionen der vier *E.coli*-Stämme (in H₂O suspendiertes Lyophilisat mit einer Konzentration von 0,4 mg/mL) in Leitungswasser 1:2000 vorverdünnt. Die angegebenen Werte zum Oberflächenpotential (Zeta-Potential) der *E.coli*-Stämme geben die Mittelwerte aus jeweils drei Einzelmessungen wieder.

Mikroskopische Bestimmung der Bakteriendichte

Die Bestimmung des (hohen) Titers der im Test eingesetzten bakteriellen Substratlösung erfolgte mikroskopisch (BH2 Auflichtmikroskop, Olympus). Hierzu wurde bakterielles Lyophilisat in einer Konzentration von 0,1 mg/mL in H₂O gelöst und in eine Helber-Zählkammer (Kammertiefe: 20 μ m) überführt. Anschließend erfolgte

⁸ Hexadecan ist leichter als Wasser (obere Phase), d.h. der Lichtstrahl des Photometers tritt auch nach der Zugabe von Hexadecan nur durch die wässrige Phase hindurch: Wert 1 (vor Hexadecanzugabe) bzw. Wert 2 (nach Hexadecanzugabe) kann in derselben Küvette gemessen werden.

die Zählung der bakteriellen Partikel im Phasenkontrast bei 400-facher (40x-Objektiv) Vergrößerung. Der Titer wurde als Mittel von 4 Zählungen von jeweils 8-13 Zählfeldern (ca. 20 Partikel/Zählfeld) ermittelt.

Elektronische Partikelanalyse

Die (relativ geringe) Anzahl von Partikeln im (klaren) Belebtschlammüberstand (Titer nach vollständiger Phagozytose) wurde mittels elektronischer Partikelanalyse (Cell Counter und Analyse System Casy1 TTC, ausgestattet mit einer 45 µm Messkapillare, Schärfe System, Reutlingen) bestimmt. Vor der elektronischen Messung wurde der Überstand zum Einstellen der elektrischen Leitfähigkeit und zum Fixieren der Probe mit einer NaCl/Glutardialdehyd-Lösung (Endkonzentration: 0,9% w/v NaCl, 2% v/v Glutardialdehyd) 1:2 verdünnt. Vom Gerät wurden 200 µL der Untersuchungslösung analysiert. Der im Ergebnisteil angegebene Wert gibt das um den Hintergrund (NaCl/Glutardialdehyd-Lösung, 0,9% bzw. 2%) korrigierte Messergebnis wieder.

Bestimmung der Respirationsrate von Klärschlammproben

Frischer Belebtschlamm wurde mit Leitungswasser auf eine Endkonzentration von 2,5 g/L (Trockengewicht) verdünnt. Jeweils 2 mL des verdünnten Belebtschlammes wurden in mit Silikonkappen verschließbare 12 mL-Reagenzgläser überführt und bei Raumtemperatur (ca. 22°C) in Schräglage (20°) über 24 h bei 200 U/min geschüttelt (Rotamax 120, Fa. Heidolph). Nach der Inkubation (\pm Testsubstanz) erfolgte die Messung der Respirationsrate. Zur Sicherstellung eines optimalen Nährstoffangebotes und - damit verbunden – eines maximalen Sauerstoffverbrauchs wurden jeder Probe unmittelbar vor der Messung 0,5 mL künstliches Abwasser (5-fach konzentriert) zugegeben. Anschließend wurden die Probelösungen durch kräftiges Schütteln (Vortexen) mit Sauerstoff gesättigt und sofort in die Messkammer eingefüllt. Die Abnahme des Sauerstoffgehaltes wurde über einen Zeitraum von ca. 10 min aufgezeichnet (Oxygraph 5/6, Gilson Medical Electronics). Der Kurvenverlauf war hierbei nahezu linear. Die Respirationsrate der mit Schadstoff behandelten Proben wurde als prozentuales Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

Letalitätsmessung von Tetrahymena

Die Ciliaten *Tetrahymena pyriformis*, Stamm GL, und *Tetrahymena thermophila*, Stamm B3, wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Per Hellung-Larsen, Universität Kopenhagen, bzw. von Herrn Prof. Dr. A. Tiedke, Universität Münster, zur Verfügung gestellt.

Die Stammkultivierung der Einzeller erfolgte steril bei normaler Raumtemperatur in 5 mL PPY-Medium (s.o.) in aufrecht stehenden Rundboden-Glasröhrchen (Maße: 160 x 16 mm oder 100 x 16 mm). Als Schutz vor Kontaminationen dienten Aluminium- oder Silikonkappen. Alle 8-10 Wochen wurden die Stammkulturen keimfrei in neues Medium umgesetzt.

Zur Herstellung von Ausgangsmaterial für die Vitalitätsmessungen wurden 100 µL Zellsuspension den Stammkulturen entnommen und in 5 mL PPY-Medium in Polystyrol-Zellkulturflaschen (Fa. Sarstedt, Gesamtvolumen 50 mL) bei 28°C (*T. pyriformis*) bzw. bei 32°C (*T. thermophila*) im Brutschrank (Heraeus Thermo B6) kultiviert. Nach Erreichen der (früh-) stationären Wachstumsphase wurden die Zellen 1:20 mit Belebtschlamm-Überstand verdünnt. Von der so erhaltenen Zellsuspension wurden jeweils 2 mL in 6-well Gewebekulturschalen (Fa. Corning) überführt und verschiedenen Digitoninkonzentrationen exponiert. Digitonin wurde als 50-fach konzentrierte Stammlösung in H₂O (10 g/L) den einzelnen 2 mL-Testansätzen zugegeben (die konzentrierte Digitoninlösung wurde jeweils aktuell vor jeder Messung durch Erhitzen auf ca. 95°C für etwa 3-5 min und anschließendem Abkühlen in Lösung gebracht). Nach einer 30-minütigen Inkubation⁹ bei Raumtemperatur wurden die Zellkonzentrationen in den 6-well Gewebekulturschalen mikroskopisch (2-fach Objektiv, Inversmikroskop IMT-2, Fa. Olympus) bestimmt. Hierzu wurden von jeder Probe Digitalaufnahmen (Canon EOS 450D, PC-ferngesteuert, mit Mikroskopadapter der Fa. icon-biotech) gemacht und anschließend auf dem PC-Monitor ausge-

⁹ Zusätzlich zur 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen auch über einen deutlich längeren Zeitraum von 22-24 Stunden Digitonin exponiert. Diese längere Einwirkung bleibt allerdings ohne Einfluss auf die Stärke des letalen, zelllysierenden Effekts.

zählt (die letale Wirkung ist anhand der Zellkonzentration leicht zu erkennen: vitale Zellen behalten ihre typische birnenförmige Gestalt, während absterbende Zellen schnell lysieren). Alle Werte Digitonin-behandelter Proben wurden auf Kontrollansätze ohne Digitonin (100% Vitalität bzw. 0% Letalität) bezogen.

Schlammcharakterisierung

Absetz-/Schlammvolumen VS (ml/L)

Unter dem Absetzvolumen versteht man den Anteil des Volumens, den der eigentliche Schlamm im Schlamm-Wasser-Gemisch nach ungestörtem Absetzen innerhalb von 30 Minuten einnimmt. Der Wert dient vor allem der Berechnung des Schlammdindex (s. S. 35). Ein Messzylinder wird mit Belebtschlamm bis auf 100 ml aufgefüllt. Nach einer halben Stunde wird das Volumen des abgesetzten Schlammes abgelesen. Mit dem Faktor 10 multipliziert ergibt sich das Absetzvolumen pro Liter.

Trockensubstanz TS (g/l)

Als abfiltrierbare Stoffe werden alle Partikel bezeichnet, die sich durch ein quantitatives Cellulose-Filtrierpapier abtrennen lassen und nach Trocknung gewogen werden. Der Trockenrückstand gibt Aufschluss über den Gehalt an gelösten und ungelösten Inhaltsstoffen einer Wasserprobe, die nach dem Verdampfen und Trocknen zurückbleiben. Das Verfahren lässt eine Aussage über die Biomassekonzentration einer Belebtschlammanlage zu, ohne jedoch zwischen belebter und unbelebter Materie zu unterscheiden.

Mit Hilfe einer Absaugflasche und einer Wasserstrahlpumpe wurden 50 mL der nativen Belebtschlammprobe über einen Abwasser-Filter (Sorte 589/1- Schwarzband, Fa. Schleicher & Schuell, Durchmesser 96 mm¹⁰) abfiltriert. Das Retentat wurde zusammen mit dem Filter 30 min in der Mikrowelle (225 Watt, Stufe 2) und anschließend 20 min im Exsikkator getrocknet. Die Trockensubstanz des Be-

¹⁰ Als günstig hat sich ein Verhältnis der Filteroberfläche (cm²) zum Flüssigkeitsvolumen (mL) von etwa 1,6 erwiesen (Beispiele: Filter Ø = 10 cm, Probenvol.= 50 mL; Filter Ø = 5 cm -> Probenvol.= 12,5 mL)

lebtschlammes in g/l ergibt sich aus der Differenz der beiden Wägungen multipliziert mit dem Faktor 20 (von 50 mL auf einen Liter hochgerechnet).

Schlammindex ISV (ml/g)

Der Quotient aus Absetzvolumen und Trockensubstanz ergibt den Schlammindex (S_i oder IND). Er ist das Schlammvolumen, das 1 g Trockensubstanz einnimmt. Ist der Index größer als 150 mL/g spricht man von Blähschlamm - einem Belebtschlamm mit schlechten Sedimentationseigenschaften, der durch „Schlammabtrieb“ zu einem Verlust der Reinigungsleistung und zu einer Belastung des Vorfluters bzw. der Oberflächengewässer führen kann.

Mikroskopische Beurteilung der Schlammqualität

Bestimmend für die Funktion einer Kläranlage sind die Organismen, welche die organischen Abwasserinhaltsstoffe durch ihren Stoffwechsel aus dem Abwasser eliminieren. Durch Auswertung der Flockenstruktur und der Besiedlung erhält man wichtige Hinweise auf die Leistungsfähigkeit bzw. Beeinträchtigungen der "Biologie" der Anlage. Ähnlich, wie bei der biologischen Gewässeruntersuchung besitzen viele Organismen einen Zeigerwert, so dass man nach der Bestimmung von Art und Häufigkeit der dominierenden Organismen Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Abwassers oder Unregelmäßigkeiten bei der Betriebsführung ziehen kann. Die anhand der biologischen Schlammuntersuchung gewonnenen Informationen stellen ein wichtiges Hilfsmittel dar, um eventuelle Veränderungen des allgemeinen mikroskopischen Bildes mit Veränderungen der Protozoenaktivität korrelieren zu können.

Die Beurteilung des mikroskopischen Bildes erfolgte nach [18] [17] [105]. Neben der Struktur, der Gestalt und der Festigkeit der Flocken werden hier auch das Auftreten fadenförmiger Bakterien sowie die Zusammensetzung der Protozoengemeinschaft für eine Beurteilung herangezogen. Maximal eine Stunde nach Probenahme wurde routinemäßig 1 mL nativer Belebtschlamm mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in eine Petrischale (\varnothing 5 cm) überführt, auf eine Endkonzentration von 1 g/L mit Leitungswasser verdünnt (dies entspricht bei den typischen Trockengewichten des Stahnsdorfer Belebtschlammes von 3,5 – 4 g/L einer Verdün-

nung von 1:3,5 bis 1:4) und der biologische Zustand des Schlammes bei einer 40-100-fachen Vergrößerung (4 bis 10-fach Objektiv) unter einem Inversmikroskop (Olympus IMT2) untersucht.

Vitalitätsmessung der Belebtschlammfauna

Nach Verdünnen frischen nativen Belebtschlammes mit Belebtschlammüberstand auf 1g/L wurden jeweils 2 mL in 6-well Gewebekulturschalen (Fa. Corning) überführt. Zu diesen 6 Proben wurde Digitonin in 5 unterschiedlichen geometrischen Verdünnungsstufen von 100 mg/L bis 6,25 mg/L (Endkonzentration) als 50-fach konzentrierte Stammlösung pipettiert (Digitonin wurde hierbei durch kurzzeitiges Erhitzen auf ca. 95°C in Lösung gebracht, den Ansätzen wurde anschließend die abgekühlte Lösung zugegeben). Die unbehandelte sechste Probe diente als Kontrollwert, auf den alle behandelten Testansätze zur Berechnung der prozentualen Letalität bezogen wurden. Zur Bestimmung des letalen Effekts wurde die Individuendichte aktiver eukaryotischer Organismen (Protozoen, Rotatorien, selten Nematoden) durch Auszählen von jeweils 10-20 Zählfeldern mikroskopisch (Inversmikroskop IMT-2, 10fach Objektiv) in den 6-well Gewebekulturschalen nach einer Digitoninexposition von etwa 1,5 Stunden¹¹ herangezogen. In den unbehandelten Kontrollen wurden hierbei Durchschnittswerte der Ciliatendichte von etwa $1,5 \times 10^4/\text{mL}$ ¹² beobachtet. Zur Zählung wurde die Belebtschlammfauna in grobe Kategorien entsprechend der „mikroskopischen Schlammuntersuchung“ nach Eikelboom [17] eingeteilt, wobei hierbei etwa 60% von frei schwimmenden und kriechenden Formen gestellt werden und die restlichen ca. 40% auf sessile Ciliaten entfallen. Im Hinblick auf die letalen Effekte von Digitonin konnte keine besondere, differenzierte Wirkung gegenüber einer der Tiergruppen bzw. den verschiedenen mikroskopisch erfassten Gattungen festgestellt werden (nicht dargestellt). Zur pro-

¹¹ Längere Expositionszeiten führten hier zu keiner Zunahme des letalen Effekts gegenüber der Belebtschlammfauna, dies ergaben Messungen zur letalen Wirkung über längere Zeiträume bis 22 Stunden (nicht dargestellt, vgl. auch die letale Wirkung von Digitonin auf die Einzelspezies *Tetrahymena*, S.33).

¹² Diese Angabe ist als Näherungswert aufzufassen, da besonders koloniebildende sessile Ciliaten eine sehr inhomogene Verteilung im Belebtschlamm aufweisen und sich hier im Falle dichtgewachsener Kolonien nur grobe Angaben zur Zahl einzelner Individuen machen lassen.

zentualen Berechnung der letalen Wirkung wurde daher die Anzahl aller mikroskopisch gezählten Eukaryoten – unterschiedslos – herangezogen.

Thermische Behandlung des Belebtschlammes

2 mL Belebtschlammproben wurden in 12 mL-Glasröhrchen auf Temperaturen zwischen 40 und 50°C im Wasserbad über unterschiedliche Zeiträume von 5 bis 20 min erhitzt. Zur Messung der Überstandstrübung (oberes Bild) wurden die 2 mL-Proben im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt; nach 30-minütiger Sedimentation wurde anschließend die Trübung photometrisch oberhalb des abgesetzten Schlammes bestimmt ($\lambda = 440\text{nm}$). Die Proben zur Erfassung der Phagozytoseaktivität (OD-Abnahme) und zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurden zum Abkühlen mit Leitungswasser 1:5 verdünnt, durch anschließende Zentrifugation (15 min, 750xg, Raumtemperatur: Minifuge GL, Heraeus-Christ) gewaschen und in 2 mL Leitungswasser aufgenommen (der Waschvorgang erfolgte, um eventuelle Lysisprodukte, die im folgenden 22-stündigen Inkubationszeitraum als Nährmedium für Bakterien zur Verfügung gestanden hätten, von der thermisch behandelten Probe abzutrennen). Die Aktivität der Fauna wurde in den gewaschenen 2 mL-Proben anhand der Trübungsabnahme (OD_{440}) nach anfänglicher Zugabe von 0,4 mg/mL *E.coli*-Lyophilisat über einen 22-stündigen Zeitraum verfolgt (vgl. „Messung der Phagozytoseaktivität von Belebtschlamm“, S. 38). Die Sauerstoffmessung erfolgte wie unter „Bestimmung der Respirationsrate von Klärschlammproben“, S. 32) beschrieben.

Schlammfraktionierung

Zur Messung der Verteilung der Phagozytoseaktivität auf Überstand und abgesetzten Schlamm sowie zur Bestimmung der Aktivität in verschiedenen Flockengrößen wurde der Belebtschlamm mit Leitungswasser auf 1 g/L in einem Glaszylinder verdünnt (Endvolumen 100 mL). Nach mehrfachem Schwenken und Schütteln wurde die Probe über einen Zeitraum von 20 min ruhen gelassen. Anschließend wurde der Überstand bis knapp über dem Schlammmeniskus entnommen und in den Messungen eingesetzt. Die entnommene Überstandsmenge wurde dann mit Leitungswasser ersetzt, alles erneut mehrfach geschüttelt und nach 20-minütigem Absetzen des Schlammes der Überstand erneut bis dicht über der abgesetzten

Schlammsschicht entnommen (→ Überstand 2). Dieser Vorgang wurde ein drittes Mal durchgeführt (→ Überstand 3). Schließlich wurde der Schlamm mit Leitungswasser aufgefüllt und die phagozytotische Gesamtaktivität des „Rest“-Belebtschlammes (Schlamm nach insgesamt 3-maligem „Spülen“) bestimmt.

Zur Fraktionierung wurde der native Belebtschlamm (ca. 50 mL) durch ein 60 µm bzw. 100 µm Nylonsieb (Fa. Schuran) unter Kreisbewegung gesiebt. Im 100 µm-Filtrat waren eine deutliche Trübung sowie kleine Flocken zu erkennen, das 60 µm-Filtrat zeichnete sich durch eine leichte Trübung sowie sehr kleine Flocken und partikuläre Strukturen aus.

Messung der Phagozytoseaktivität von Belebtschlamm

Testgefäße

Als Testgefäße wurden zwei unterschiedlich dimensionierte Röhrrchen (12 mL- und 4 mL-Röhrrchen) aus Glas eingesetzt (Abb. 11). Glas ist die erste Wahl zur Durchführung toxikologischer Untersuchungen, da es als weitgehend inert gegenüber Umweltchemikalien gilt. Das Probenvolumen von 2 mL nimmt hierbei etwa 1/6 bzw. die Hälfte des gesamten Röhrrchenvolumens ein. Anfänglich wurde ausschließlich der größere Röhrrchentyp für die Messungen herangezogen, da hier bereits Erfahrungen zur Kultivierung von Protozoen vorlagen [87]. Die Verwendung der kleineren Variante hat ihren Ursprung in der Suche nach einer Möglichkeit, mit einem stark reduzierten Volumen der Gasphase im Testgefäß auch leicht flüchtige Schadstoffe erfassen zu können. Der Durchmesser von 16 bzw. 15 mm beider Röhrrchentypen ist so bemessen, dass gängige Kolorimeter- bzw. Photometeradapter Verwendung finden können und somit eine direkte (nicht-invasive) Vermessung der Proben im Photometer ohne Entnahme von Belebtschlamm und einem damit verbundenen Öffnen der Testgefäße während der Inkubationszeit möglich ist. Die Glasröhrrchen wurden durch sauerstoffdurchlässige Schraubkappen mit Teflon- bzw. Teflon-/Silikoneinlage verschlossen.

Probenvorbereitung

Für Versuchszwecke wurde das jeweils benötigte Belebtschlammvolumen aus den im Kühlschrank gelagerten Polypropylenflaschen entnommen und zur Einstellung

der entsprechenden Endkonzentration (soweit nicht anders angegeben: 1 g TS/L) in einem Messzylinder mit Leitungswasser verdünnt.

Testansatz / Testvorbereitung

Zur Erfassung der phagozytotischen Aktivität wurden jeweils 2 mL dieses verdünnten Belebtschlammes in 12 mL Rundbodenglasröhrchen (GPI 18-400 oder DIN 18; Außenmaße 16x100 mm) mit sauerstoffdurchlässiger Schraubkappe (gelochter Verschluss mit Tefloneinlage) bzw. in 4 mL-Glasröhrchen¹³ (Supelco, 15x45mm) mit gelochtem Schraubverschluss und Silikon/Tefloneinlage (vgl. Abb. 11) mit Hilfe einer 5 mL-Automatikpipette überführt. Damit beim Pipettieren des Belebtschlammes keine flockenzerstörenden Scherkräfte auftraten, wurden die Pipettenspitzen etwa 5 mm oberhalb der Spitze abgeschnitten und damit die Öffnung auf etwa 3 mm vergrößert.

Gestartet wurde der Test durch Zugabe von 50-fach konzentrierter *E.coli*-Suspension¹⁴ (Endkonzentration 0,4 mg/mL, was einer optischen Dichte bei 440 nm von ca. 1,35 entspricht), die kurz vorher durch Lösen von bakteriellem Lyophilisat in H₂O hergestellt wurde. Wie Messungen der optischen Dichte in Abhängigkeit der eingesetzten Suspensionskonzentration zeigten, besteht bis zu dem hier maximal eingesetzten Gehalt an *E.coli* von 0,4 mg/mL ein näherungsweise linearer Zusammenhang. Auf Grund dieses direkt proportionalen Zusammenhanges lassen Veränderungen der Trübung also direkten Rückschluss auf den Substratverbrauch und damit die Phagozytoseaktivität zu (vgl. hierzu Abb. 12).

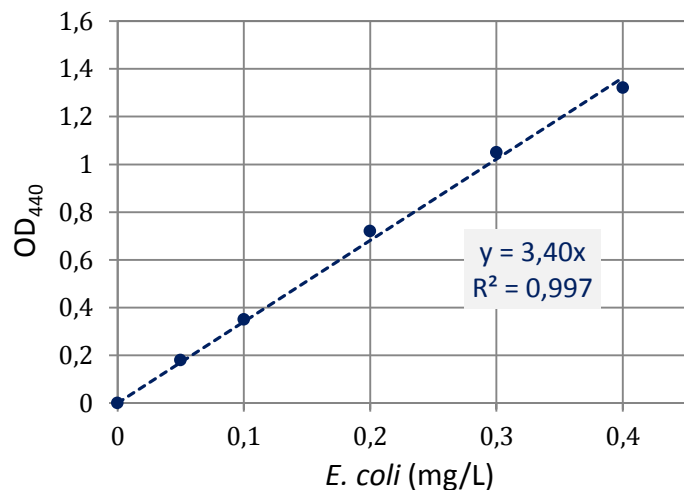
¹³ Diese kleineren 4 mL-„autosampler vials“ hatten sich besonders zur Messung der Effekte der beiden flüchtigen Substanzen 1-Bromoctan und Diphenylether bewährt.

¹⁴ Überwiegend wurde hierbei der *E.coli*-Stamm ATCC 9637 verwandt (vgl. Ergebnisteil, Phagozytosemessungen)



Abb. 11: Teströhrchen mit einem Gesamtvolumen von 4 mL (links) bzw. 12 mL (rechts). Beide Röhrchen bestehen aus Glas und sind mit einer sauerstoffdurchlässigen Schraubkappe verschließbar.

Abb. 12: Zusammenhang zwischen Suspensionskonzentration am Beispiel des *E.coli*-Stammes ATCC 9637 und der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 440 \text{ nm}$ (OD_{440}). In der Abbildung sind auch die Gleichung für die lineare Regression sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben.



Die Testansätze wurden als Parallelen (Duplikate) zur Bestimmung von Doppelwerten angesetzt. Um Veränderungen des Belebtschlammes innerhalb der Testzeitspanne sichtbar zu machen, wurden jeweils Testansätze ohne Zugabe von bakteriellem Substrat mitgeführt (Ansatz $-E.coli$).

Nachdem sich in umfangreichen Vortests Digitonin als selektiver Inhibitor der Belebtschlammfauna erwiesen hatte, wurden Testansätze mit einer Digitoninkonzentration von 200 mg/L bei jeder Versuchsreihe parallel mitgeführt. Einerseits war mit dieser Totalhemmung der phagozytotischen Aktivität eine jeweils aktuelle Positivkontrolle gesichert und andererseits konnte durch die Hemmung der Fraßtätigkeit das Adsorptions- und Aggregationsverhalten der zugesetzten *E. coli*-Bakterien und der damit verbundene Einfluss auf die optische Dichte der Bakteriensuspension, d.h. des Nährsubstrates, erfasst werden.

Testdurchführung

Alle Testansätze wurden auf einem Kreisschüttler (Reax control, Fa. Heidolph) kräftig durchmischt und zum Absetzen des Belebtschlammes über eine Zeitspanne von 30 min stehen gelassen. Nach dem Absetzen des Belebtschlammes wurde der Überstand in den Teströhrchen vorsichtig, d.h. ohne Aufwirbeln des abgesetzten Schlammes, in einem Rundküvetten-Photometer bei 440 nm vermessen¹⁵ (OD-Messung 1). Im Anschluss an die erste photometrische Messung des Überstandes wurden alle Testansätze – sofern nicht anders angegeben - über 22 Stunden bei 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) unter Schütteln (Inkubationsschüttler Rotamax 120, Heidolph) bei 140 U/min (12 mL-Röhrchen) bzw. bei 250 U/min (4 mL-Röhrchen) inkubiert, wobei die Teströhrchen in einem Winkel von 20° (12 mL-Röhrchen) bzw. 40° (4 mL-Röhrchen) zur Horizontalen geneigt auf dem Schüttler angebracht waren, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten (Abb. 13) . Nach der Inkubation erfolgte analog der ersten Messung der optischen Dichte die zweite photometrische Bestimmung der Trübung des Überstandes bei 440 nm (OD-Messung 2).

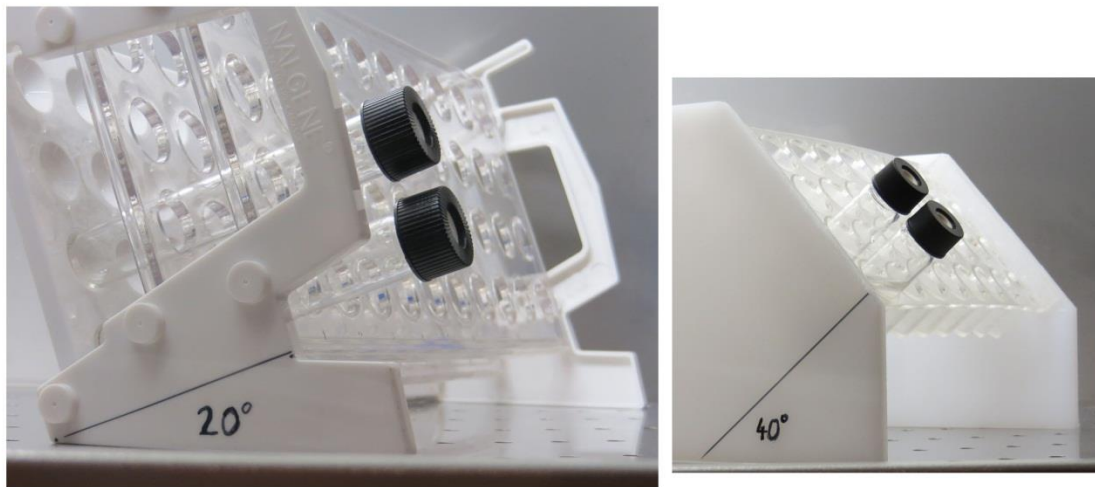


Abb. 13: 12 mL- (links) und 4 mL-Teströhrchen (rechts) in der jeweiligen Halterung mit einer Neigung von 20° bzw. 40°. Die Gestelle (links: „slant rack“, Fa. Nalgene, rechts: Prototyp nach eigenen Vorgaben, Fa. icon biotech, Teltow) wurden - wie hier dargestellt – ohne weitere Fixierung der Probengefäße direkt auf dem Schüttler befestigt.

¹⁵ Der Belebtschlamm muss während der Messung auf dem Boden des Teströhrchens bleiben und der Küvetteinsatz des Photometers muss so bemessen sein, dass der Lichtstrahl des Photometers über dem abgesetzten Schlamm durch den Überstand im Glasröhrchen tritt.

Auswertung

Zur Berechnung der Trübungsabnahme wurde die Differenz zwischen der anfänglichen optischen Dichte (OD-Messung 1) und der zweiten Messung nach der 22-stündigen Inkubation (OD-Messung 2) gebildet. Im Falle der Belebtschlammproben mit Zusatz von *E.coli* ergibt sich die Abnahme in Anwesenheit von Protozoen. Wurde die Probe durch Digitonin defauniert, stellt die OD-Differenz eine Veränderung der Trübung dar, die nicht durch die Aktivität der Protozoen hervorgerufen worden sein kann, sondern auf fraßunabhängige Veränderungen der zudotierten Bakteriensuspension zurückgeführt werden kann. Die reine Fraßaktivität (ΔOD_{korr}) wurde durch Subtraktion der OD-Differenz der Digitonin-(Positiv-)Kontrollen (ΔOD_{Dig} : Belebtschlamm plus *E. coli* plus Digitonin) von der OD-Differenz der unbehandelten Kontrollen (ΔOD : Belebtschlamm plus *E. coli*) ermittelt.

Folgende Gleichung fasst die Berechnung der Fraßaktivität noch einmal zusammen:

$$\Delta OD_{\text{korr}} \text{ (Fraßaktivität)} = \Delta OD \text{ (Fraß + unspezifische OD-Änderungen)} - \Delta OD_{\text{Dig}} \text{ (kein Fraß)} \quad \text{Gl. 2}$$

wobei: die Testansätze folgendermaßen zusammengesetzt sind:

...zur Erfassung der ΔOD : Belebtschlamm plus *E.coli*

...zur Erfassung der ΔOD_{Dig} : Belebtschlamm plus *E. coli* plus Digitonin

Anhand der OD-Differenz ΔOD_{korr} wurde für jede Probe die Hemmung als prozentuales Verhältnis zur unbehandelten (Negativ-) Kontrolle angegeben.

Konzentration-Wirkungskurven

Um die Hemmung der Fraßaktivität durch die hier eingesetzten spezifischen Hemmstoffe sowie Umweltchemikalien zu erfassen, wurden die Substanzen nach einem 'Screening' (Verdünnungsfaktor 10) in geometrischen Verdünnungsstufen (Faktor 2-3) den Testansätzen mit Belebtschlamm zugegeben. Der Kontroll-Ansatz blieb schadstofffrei. Für jede Chemikalie wurden i.d.R. mindestens 5 Verdünnungsstufen vermessen. Dabei wurde versucht, die Testkonzentrationen so zu wählen, dass ein Wirkungsbereich von 10-90% Hemmung abgedeckt wurde. Alle angegebenen

Hemmwirkungen wurden aus zwei bis drei Testläufen an verschiedenen Tagen und überwiegend mit unterschiedlichem Belebtschlamm ermittelt.

Die EC_{50} -Werte wurden statistisch ermittelt: Alle Messwerte wurden durch Bezug auf die Kontrollwerte normalisiert (Mittel aus 2 bis 3 Parallelproben). Konzentrations-Wirkungskurven wurden durch nicht-lineare Kurvenanpassung an logarithmierte₁₀ Konzentrationen (x-Achse) und die mittleren prozentualen Hemmwerte (y-Achse) mit Hilfe des Softwareprogrammes Table Curve 2D, Vers. 4 (SPSS Science, Chicago, USA) berechnet. Aus den Konzentrationswirkungskurven wurden wiederum die EC_{50} -Werte ermittelt.

OD-Veränderungen der nativen Belebtschlammprobe, d.h. ohne weiteren Zusatz von *E. coli* und Digitonin, blieben während des 22-stündigen Testzeitraumes vernachlässigbar gering. Diese Größe wurde deshalb nicht in die Berechnungen der Phagozytoseaktivität mit einbezogen, sondern diente ausschließlich zur Absicherung stabiler Schlammeigenschaften unter Testbedingungen.

ERGEBNISSE

Teil 1 – Erfassung der Phagozytoseaktivität

Selektive Defaunierung

Ein wesentliches Ziel der anfänglichen Arbeiten war, die Phagozytoseleistung von Belebtschlamm in einer Art erfassbar zu machen, die einfach und zuverlässig in der Handhabung ist, in maximal 24 Stunden Messwerte liefert und zugleich den für einen Biotest notwendigen hohen Probendurchsatz bei geringen Testvolumina gewährleistet. Ein Hauptproblem stellte dabei die selektive Suppression der Fauna, vor allem von Protozoen, dar. In einem ersten Schritt musste also eine so genannte „Positivkontrolle“ etabliert werden, mit der parallel und zeitgleich mit dem eigentlichen Testansatz der Nachweis erbracht wird, in welchem Maße die Abnahme der bakteriellen Suspensionsdichte im Belebtschlamm von der phagozytotischen Aktivität abhängt.

In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze zur Elimination der Fauna in Belebtschlämmen. Neben chemischen Inhibitoren (z.B. [106] [107] [108]) wurden thermische und mechanische Methoden herangezogen, um Protozoen selektiv zu hemmen bzw. zu entfernen (z.B. [38]). In der Regel wurden hierbei Belebtschlammvolumina von mehreren Litern der jeweiligen Behandlung unterzogen, wobei, sofern Chemikalien eingesetzt wurden, meist die Einwirkzeit der Hemmstoffe viele Stunden bis Tage betrug.

In der vorliegenden Arbeit haben sich mechanische und thermische Verfahren als wenig vielversprechend herausgestellt. Obwohl sich mittels Ultraschall, im Potter-Elvehjem-Verfahren und mit Hilfe eines Messerhomogenisators prinzipiell faunafreier Belebtschlamm erzielen lässt, führt das Einwirken starker Scher- (Dispergieren) bzw. Mikrokavitationskräfte (Ultraschall) zu einer Zerstörung der Bakterienflocken. Als Folge verschlechtern sich die Absetzeigenschaften des Schlammes und im Überstand entsteht eine unerwünschte Trübung (nicht dargestellt). Auch die Versuche durch eine erhöhte Temperatur die Fauna selektiv zu schädigen, führten zu keinem befriedigenden Resultat (Abb. 14). Erhitzen auf 45°C über einen Zeitraum

von 5 min führt zwar in den Proben bereits zu einer messbaren Abnahme der mikroskopisch nachweisbaren Protozoen im Belebtschlamm und ab einer Hitzebehandlung von 50°C und einer Dauer von 5 min sind die Protozoen aus dem mikroskopischen Bild verschwunden (mittleres Bild in (Abb. 14), allerdings hat diese Behandlung auch negative Folgen für die Belebtschlammeneigenschaften. Bei protozoenschädigenden Temperaturen von 50°C und einer Einwirkzeit von 5 min beginnt die ansonsten klare Flockenstruktur zu zerfallen, was – vergleichbar den mechanischen Verfahren - zu einer deutlichen Trübungszunahme im Überstand führt (oberes Bild in Abb. 14). Parallel zu den verschlechterten Absetzeigenschaften wird auch die Stoffwechsellistung der Bakterien beeinträchtigt und der (durch Bakterien verursachte) Sauerstoffverbrauch des Schlammes sinkt infolge der Temperatur-Behandlung auf unter 40% des Kontrollwertes ab (Bild unten in Abb. 14).

Zur chemischen Defaunierung wird in der Literatur überwiegend Cycloheximid, häufig kombiniert mit weiteren Hemmstoffen, eingesetzt. Die Einwirkzeit beträgt dabei meist mehrere Tage, bis das eindeutige Resultat der selektiven Suppression von Protozoen beobachtet wird. Nicht näher beschrieben wird der - für die vorliegende Arbeit wichtige - Effekt innerhalb der ersten Minuten bis Stunden. Eigene Messungen mit Cycloheximid ergaben zwar auch für kürzere Einwirkzeiten eine Hemmung der Phagozytose im Belebtschlamm, diese betrug allerdings selbst bei einer sehr hohen Konzentration von 8 g/L nur 40%. Die erwünschte 100%ige Inhibition lässt sich mit dieser Konzentration erst nach 22-stündiger Exposition erreichen. Auf Grund der hier für eine Totalhemmung einerseits benötigten sehr hohen Hemmstoffkonzentrationen und der zur Entfaltung der Wirkung andererseits erforderlichen langen Vorinkubation wurde Cycloheximid nicht weiter als Mittel zur schnellen und effektiven Defaunierung in Betracht gezogen.

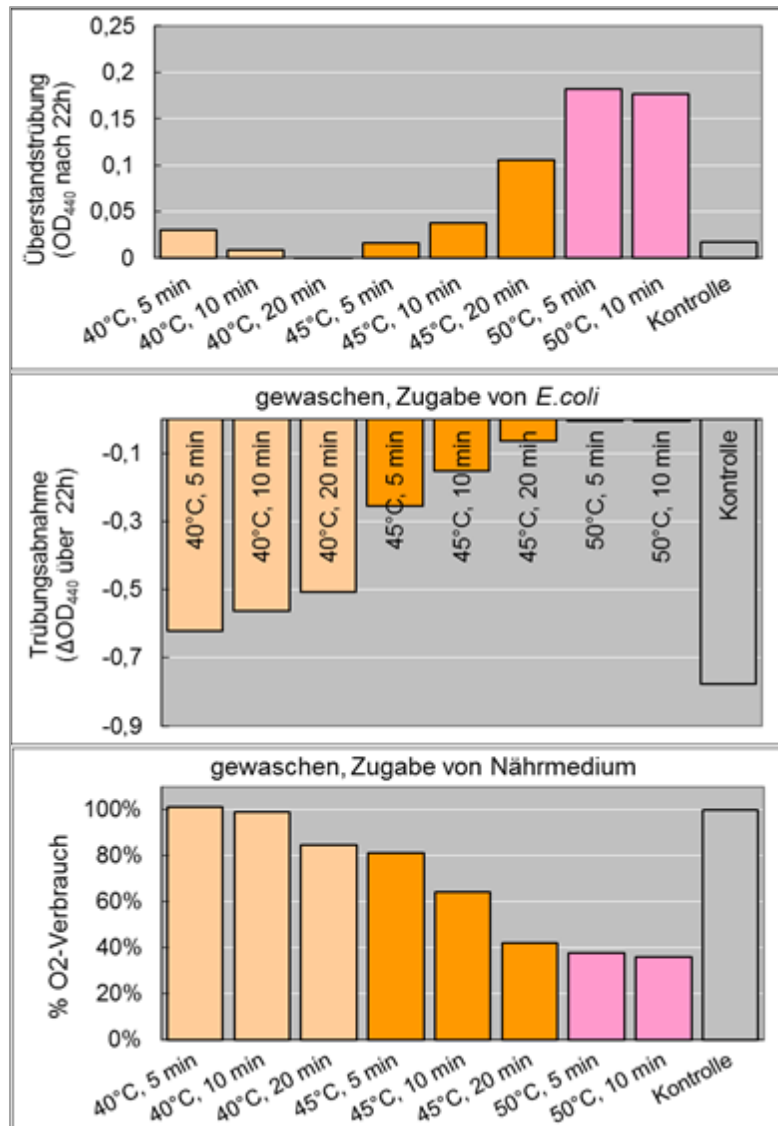


Abb. 14: Wirkung erhöhter Temperatur auf die Fauna und Flora des Belebtschlammes. Oberes Teilbild: Zeitabhängig steigt bei höheren Temperaturen die Trübung des Überstandes (optische Dichte bei 440nm). Mitte: 5 Minuten bei 50°C reichen aus, um die Phagozytoseaktivität vollständig zu hemmen (keine OD-Abnahme, d.h. kein *E.coli*-Verbrauch). Unten: Der Sauerstoffverbrauch als Ausdruck der bakteriellen Aktivität sinkt mit zunehmender Temperatur und Einwirkdauer; um die Phagozytose auszuschließen, muss ein bakterieller Aktivitätsverlust von 60% und mehr in Kauf genommen werden. Die Temperatureffekte wurden direkt nach der Behandlung (O₂-Verbrauch) bzw. nach einer 22-stündigen Inkubation bei 22°C auf dem Schüttler (200 rpm) bestimmt (Zunahme & Abnahme der OD). Die Kontrolle zeigt das Verhalten der Probe bei 22°C.

Erst mit der Substanz Digitonin konnte ein Hemmstoff gefunden werden, der alle Kriterien im Hinblick auf Selektivität und Effektivität erfüllt. Die Wirkung von Di-

gintonin setzt innerhalb weniger Minuten ein und geht mit einem völligen Verschwinden der Protozoen aus dem mikroskopischen Bild einher. Die Flockenstruktur des Belebtschlammes wird durch Digitonin nicht erkennbar beeinträchtigt und die Substanz zeigt keinerlei Wirkung auf die Stoffwechselleistung der Flora des Belebtschlammes (Abb. 15). Ab Konzentrationen von 10 mg/L Digitonin beginnen sowohl die Fauna des Belebtschlammes als auch die hier zusätzlich untersuchten Reinkulturen der Ciliaten *Tetrahymena thermophila* und *T. pyriformis* abzusterben. Konzentrationen von 100 mg/L und höher wirken vollständig letal auf die eukaryotischen Organismen, sowohl auf die Protozoen, die Rotatorien sowie die Nematoden des Belebtschlammes als auch auf die Ciliaten Monokulturen. Keine Wirkung entfaltet Digitonin dagegen auf die für die funktionelle Integrität der Flora stehende Respirationsaktivität; selbst die höchste getestete Konzentration von 1600 mg/L zeigt hier keinen Effekt.

Während also der Belebtschlamm mit 200 mg/L Digitonin vollständig defauniert werden kann, bleibt diese und selbst beinahe 10-fach höhere Konzentrationen ohne Wirkung auf typisch bakterielle Aktivitäten.

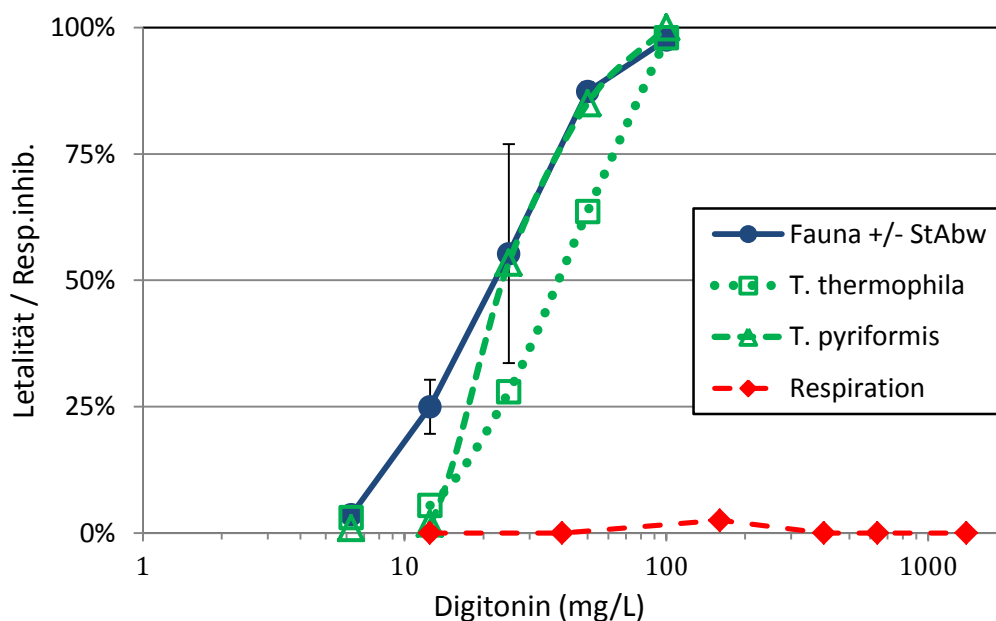


Abb. 15. Selektive Wirkung von Digitonin. Die letalen Effekte gegenüber Belebtschlammekaryoten (= Fauna: Mittelwerte \pm St.Abw. aus 3 Messungen mit unterschiedlichen Belebtschlammproben) sowie auf die beiden Ciliaten-Reinkulturen mit *Tetrahymena thermophila* & *T. pyriformis* wurden innerhalb der ersten 2 Stunden nach Applikation gemessen. Der letalen Wirkung sind Messungen der Schlamm-Respiration (22-stündige Exposition) gegenübergestellt, die allgemein als Summenparameter der bakteriellen Belebtschlammaktivität herangezogen wird (rote Punkte).

Trübungsabnahme

Werden dem nativen Belebtschlamm frei suspendierte Bakterien beigemischt, so zeigt sich eine deutliche Abnahme der bakteriell verursachten Trübung¹⁶. Die Trübungsabnahme ist für die einzelnen *E. coli*-Stämme unterschiedlich stark ausgeprägt und liegt im 22h-Messintervall zwischen etwa 30% und 70% bezogen auf die anfängliche optische Dichte (vgl. blaue Balken in Abb. 16). Nach einer Zugabe von letalen Digitonin-Konzentrationen würde man nun erwarten, dass die anfängliche optische Dichte erhalten bleibt und es zu keiner Abnahme der bakteriell verursachten Trübung kommt. Dennoch ist auch hier, in vollständig defaunierten Belebtschlammproben (vgl. Selektive Defaunierung, S. 44), bei drei der vier *E. coli*-Stämme eine - wenn auch deutlich geringere - Trübungsabnahme zwischen etwa 10 und 25% messbar (vgl. rote Balken in Abb. 16). Bei höheren Schlammkonzentrationen verstärkt sich dieser Effekt, während er in reinem Überstand von Belebtschlämmen verschwindet (nicht gezeigt).

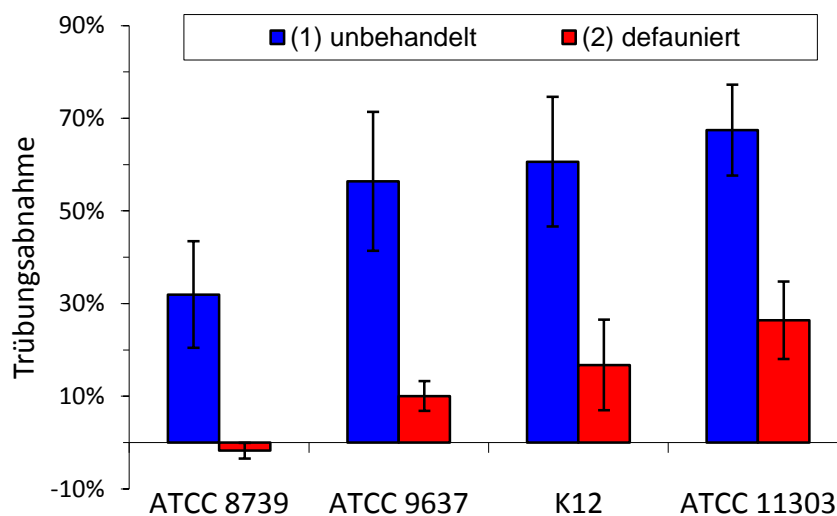


Abb. 16: Prozentuale Trübungsabnahme (ΔOD_{440}) von unbehandelten (blau) und defaunierten (rot) Belebtschlammproben nach Zugabe der angegebenen *E. coli*-Stämme über den Testzeitraum von 22h.

¹⁶ photometrisch erfasst als optische Dichte bei 440 nm (OD_{440})

Unspezifische Bindung von *E. coli*

Um die Ursache für diese Beobachtungen in defaunierten Proben näher zu beleuchten, wurden deren prozentualen Werte der Trübungsveränderung der Hydrophobizität und dem Oberflächenpotential der Bakterien gegenübergestellt. Beide physikalischen Größen bestimmen wesentlich das unspezifische Bindungsverhalten von Bakterien an Oberflächen und Biofilmen. Wie aus Abb. 17 zu ersehen ist, lässt sich ein enger Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität und der jeweiligen Trübungsveränderung herstellen ($R^2=0,99$, $n=4$), während die Oberflächenladungen keine oder eine nur untergeordnete Rolle spielen ($R^2 = 0,72$). Damit lässt sich das Verhalten der zudotierten *E. coli* klar einem auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführenden, unspezifischen Bindungsverhalten (Adsorption) an die Belebtschlammflocken zuordnen. Für die einzelnen Stämme ergibt sich folgende Reihung mit ansteigender Bindungstendenz: ATCC 8739 < ATCC 9637 < K12 < ATCC 11303.

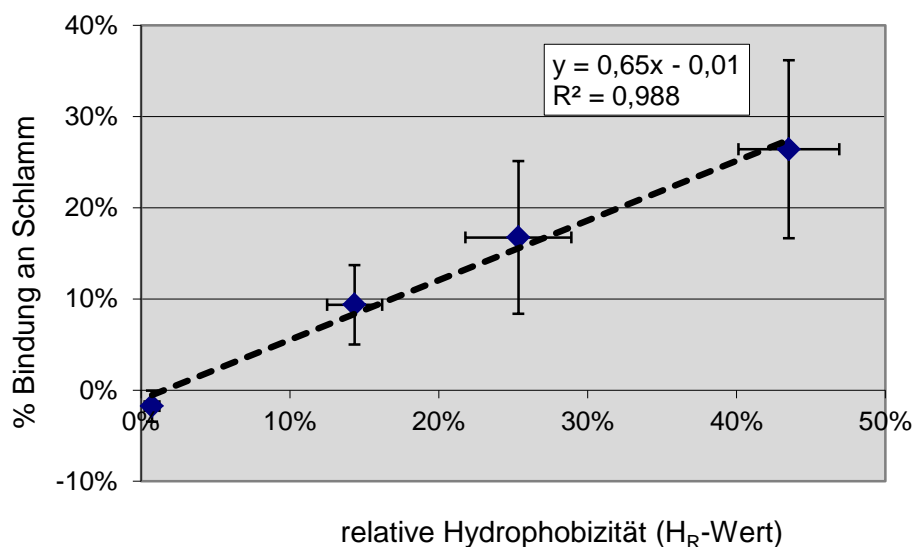


Abb. 17. Trübungsveränderung im Messintervall, wie sie in defaunierten Belebtschlammproben (1 g/L) für die vier *E.coli*-Teststämme (Konzentration: 0,4 mg/mL) zu beobachten ist, in Abhängigkeit der *E.coli*-Hydrophobizität (v.l.n.r.: ATCC 8739, ATCC 9637, K12, ATCC 11303). Die Punkte geben die Mittelwerte aus 2 Messungen wieder. Die Fehlerbalken stehen für die jeweiligen Standardabweichungen der Messpunkte.

Phagozytosemessung

Für die über die unspezifische Bindung hinaus gehende Reduktion der suspendierten Bakterien ist die Phagozytoseaktivität des Belebtschlammes verantwortlich. Dies lässt sich nicht nur aus den Messungen defaunierter Proben schlussfolgern, sondern wird auch durch Untersuchungen mit dem Phagozytoseinhibitor Cytochalasin B bestätigt. Ebenso wie bei letalen Digitonin-Konzentrationen von 200 mg/L wird auch hier, in Anwesenheit von 50 mg/L Cytochalasin B die – über die unspezifische Bindung hinausgehende - Enttrübung der Proben verhindert. Aus der Differenz der Trübungsabnahme in unbehandeltem Belebtschlamm und der unspezifischen Trübungsveränderung in defaunierten Proben lässt sich also ein direktes Maß für die Stärke der Phagozytoseaktivität angeben (Abb. 18).

Für die in dieser Arbeit untersuchten *E. coli* ergibt sich das in Abb. 19 dargestellte Bild der Phagozytierbarkeit durch Belebtschlamm: am durchschnittlich besten wird der *E.coli*-Stamm ATCC 9637 aufgenommen; gefolgt wird dieser von dem Stamm ATCC 11202, dem Stamm K12 und dem Stamm ATCC 8739.

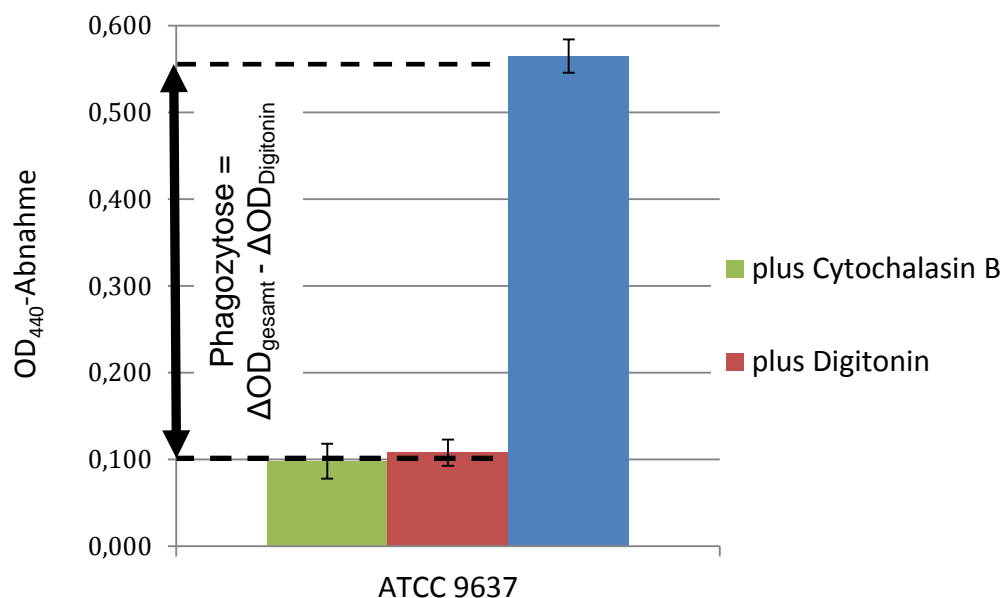


Abb. 18. Reduktion der bakteriellen Trübung (OD_{440}) in unbehandeltem und in defauniertem (plus Digitonin) Belebtschlamm sowie in Proben, die zur selektiven Hemmung der Phagozytoseaktivität mit Cytochalasin B versetzt wurden. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Testläufen mit *E. coli* ATCC 9637 über einen Zeitraum von 22 h.

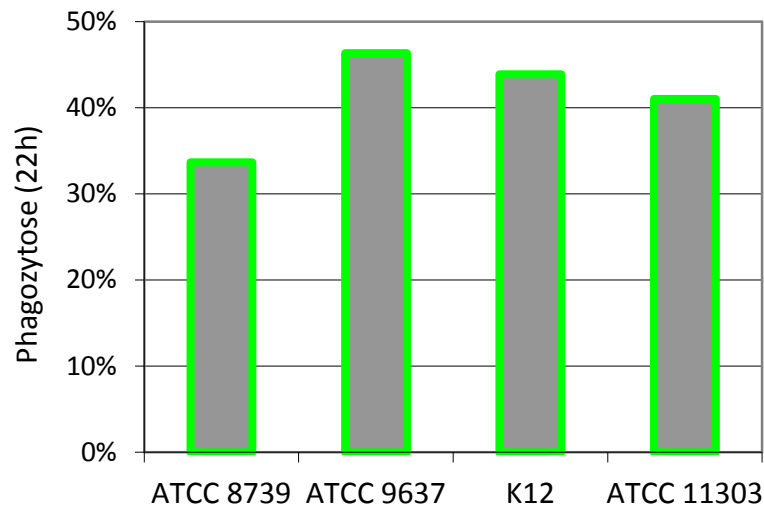


Abb. 19. Durchschnittliche prozentuale Aufnahme von zudotierten *E. coli* im Testzeitraum. Die Darstellung zeigt die Differenzen aus der Gesamtabnahme der Trübung und der Trübungsabnahme defaunierter Proben (vgl. Abb. 16, blaue und rote Balken).

Um einen Eindruck von der Phagozytoseleistung zu vermitteln, sind in der folgenden Abbildung (Abb. 20) die Teströhrchen (hier am Beispiel von *E. coli* ATCC 9637) unmittelbar nach Zugabe des bakteriellen Substrats zum Belebtschlamm und nach vollständiger Enttrübung – Verhältnisse, wie sie auch typischerweise im Anlagenablauf anzutreffen sind – dargestellt. Der anfängliche bakterielle Suspensagehalt mit einer optischen Dichte um 1,3 ($\lambda = 440 \text{ nm}$) sinkt nach vollständig erfolgter Phagozytose um das mehr als 25-fache auf OD-Werte um 0,05 ab. Während mit dem bakteriellen Substrat anfängliche Partikeldichten¹⁷ von etwa $1,5 \times 10^9/\text{mL}$ zum Belebtschlamm hinzugegeben werden, sind im weitgehend klaren Überstand (Abb. 20 rechts) nur noch etwa 2×10^4 Partikel pro mL nachzuweisen¹⁸; ein Teil davon – abhängig von der Hydrophobizität der Bakterienoberfläche - unspezifisch gebunden an die Schlammflocken, aber der deutlich größere Teil phagozytiert durch die autochthone Fauna des Belebtschlammes (vgl. hierzu auch Abb. 18 und Abb. 23).

¹⁷ mikroskopische Zählung

¹⁸ elektronische Messung (Bestimmung von Partikeln mit einem Durchmesser von weniger als $40 \mu\text{m}$)

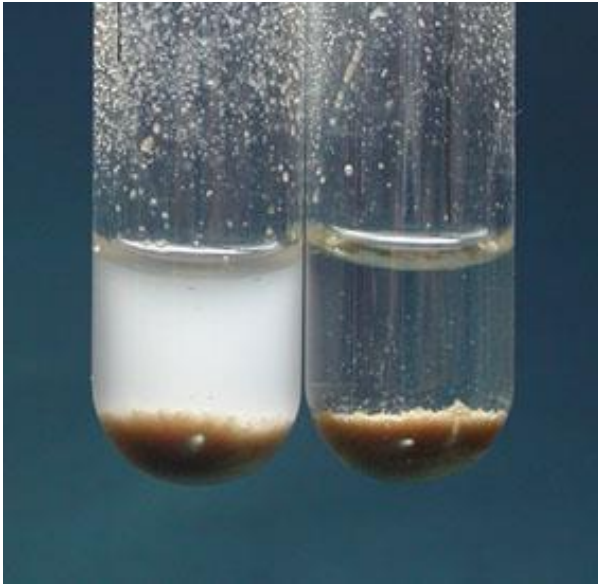


Abb. 20. Trübungsabnahme im Belebtschlammüberstand am Beispiel der typischen Substratkonzentration von 0,4 mg/mL *E. coli* ATCC 9637 direkt nach Zugabe zum Belebtschlamm (Teststart, links) sowie nach vollständiger Phagozytose (rechts). Die dunkle, untere Schicht in den Röhrchen zeigt den abgesetzten Schlamm (Konzentration: 1 g/L).

Prinzipiell sind alle untersuchten *E.coli*-Stämme geeignet, die Phagozytose von Belebtschlammproben zu erfassen. Auf Grund der z.T. notwendigen deutlichen Korrektur durch die unspezifische Bindung an den Schlamm, wurden die beiden Stämme K12 und ATCC 11303 für Routinemessungen der Phagozytoseaktivität allerdings ausgeklammert. Im Falle von *E.coli* ATCC 8739 lässt sich zwar die geringste Adsorption beobachten, hier zeigt sich aber auch die schwächste Aufnahmeleistung durch die Belebtschlammfauna. Als von den hier untersuchten Stämmen bestes Nährsubstrat erwies sich der *E. coli*-Stamm ATCC 9637. Er zeigt nur relativ geringes adsorptives Bindungsverhalten von ca. 10% und die Phagozytoseleistung ist hier am deutlichsten zu erfassen (vgl. Abb. 19). Zugleich ist der Stamm apathogen, über Kulturensammlungen leicht erhältlich und im Labor (z.B. gute Wägbarekeit) sowie im Test (bspw. gute Suspendierbarkeit) leicht zu handhaben.

Im Folgenden beziehen sich daher, soweit nicht anders angegeben, alle Daten auf Messungen mit dem *E.coli*-Stamm ATCC 9637 bei einer eingesetzten Konzentration von 0,4 mg/mL. Außerdem gehen alle in der nachfolgenden Darstellung aufgeführten Phagozytoseaktivitäten auf Schlammkonzentrationen von 1 g/L sowie Messungen bei 22°C zurück. Schließlich sind - soweit nicht gesondert angegeben - alle Angaben der Trübungsabnahme bzw. -veränderung um die unspezifische Bindung der Bakterien an den Schlamm korrigiert, d.h. alle Messungen spiegeln die tatsächliche Phagozytoseleistung wider, die sich aus der Differenz zwischen der Trübungs-

abnahme unbehandelter Proben und der Trübungsabnahme defaunierter Proben in einem Messintervall von 22 Stunden ergibt (ΔOD_{korr}).

Ermittlung von Konzentrations-Wirkungskurven

Korrigiert um diese, nicht auf die Partikelaufnahme durch die Fauna zurückzuführende Reduktion der Bakterien lassen sich Konzentrations-Wirkungskurven erzielen, die den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen und bei 100%igem Vitalitätsverlust der Gesamtfaua auch eine 100%ige Wirkung auf die Phagozytose wiedergeben¹⁹.

Abb. 21 illustriert das Resultat dieser Korrektur für die als Positivkontrolle in allen Testläufen mitgeführte Substanz Digitonin. In beinahe den gleichen Konzentrationen, in denen ein Effekt auf die Vitalität der Fauna beobachtet werden kann, verhindert Digitonin auch die Aufnahme frei suspendierter Bakterien. Ab einer Digitonin-Konzentration von 200 mg/L ist jegliche Phagozytoseaktivität in der Belebtschlammprobe zum Erliegen gekommen. Dies entspricht der letalen Wirkung auf die Fauna. Nur in geringen Konzentrationen bis etwa 30 mg/L Digitonin weichen beide Kurven – die für die letale Wirkung und die für den Effekt auf die Phagozytose – voneinander ab. Hier ist eine Inhibition der Phagozytose bereits beobachtbar, während noch kein oder ein geringerer Einfluss auf die Vitalität der Fauna nachweisbar ist.

¹⁹ ohne diese Korrektur würde die unspezifische Trübungsabnahme fälschlicherweise als Fraßaktivität gewertet werden und selbst bei Totalinhibition der Phagozytose eine Restaktivität vortäuschen.

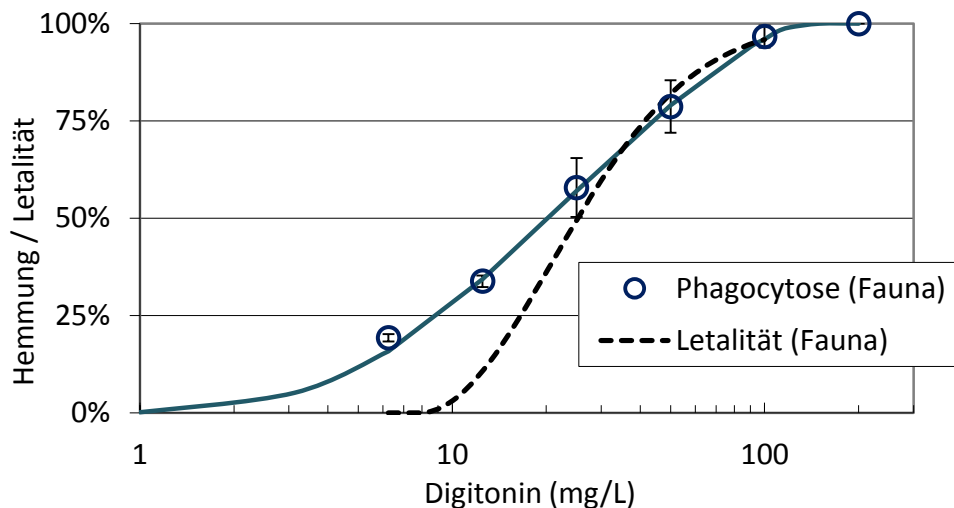


Abb. 21. Konzentrationsabhängige Wirkung von Digitonin auf die Phagozytoseleistung von Belebtschlamm (Mittelwerte \pm St.Abw. und „best fit“ aus 4 Messungen mit unterschiedlichen Belebtschlammproben, 22h-Inkubation). Der Phagozytoseleistung sind Werte der Fauna-Letalität (best fit, vgl. Werte Abb. 15, S. 47) gegenübergestellt.

Hauptakteure der Phagozytose

Rotatorien sowie Nematoden stellen neben Protozoen weitere, typisch phagozytierende Belebtschlammbewohner dar. Um deren Einfluss im Hinblick auf die phagozytotische Aktivität von der Fraßaktivität der Protozoen abgrenzen zu können, wurden der Na^+/K^+ -ATPase-Hemmstoff Digoxin sowie die Acetylcholinesteraseinhibitoren Carbofuran, Paraoxon, Levamisol und Dichlorvos eingesetzt. Nach einer Reihe von Vortests konnte mit Dichlorvos ein Hemmstoff gefunden werden, der spezifisch und letal auf Rotatorien und Nematoden wirkt, die einzelligen Protozoen aber weitgehend unbeeinflusst lässt. Abb. 22 verdeutlicht die spezifische Wirkung. Konzentrationen um 10 mg/L Dichlorvos lassen die Phagozytoseaktivität praktisch unbeeinflusst, während bereits 60% der in den Belebtschlammproben anzutreffenden Metazoen (überwiegend Rotatorien, aber auch vereinzelt Nematoden) abgetötet werden. Das mikroskopische Bild der Protozoenfauna bestätigt diese Befunde. Weder sessile, noch freischwimmende oder kriechende Ciliaten werden erkennbar gehemmt. Ebenso sind keine markanten Effekte auf die weiteren Gruppen der Protozoen wie Flagellaten und Amöben zu erkennen.

Legt man die exakten Messwerte zu Grunde, werden bei einer Konzentration von 12,5 mg/L Dichlorvos bereits 61% der mehrzelligen Fauna abgetötet, die Phagozy-

tose aber nur um 1,8% reduziert (die letale Wirkung von Dichlorvos entfaltet sich dabei bezogen auf die Gesamttestdauer von ca. 22 Stunden innerhalb sehr kurzer Zeiträume von weniger als 2 Stunden). Mit anderen Worten kann ein wesentlicher Einfluss der Metazoen auf die Phagozytoseleistung in den untersuchten Belebtschlämmen ausgeschlossen werden und den Protozoen der entscheidende Beitrag zur Bakterienfiltration zugeschrieben werden (anzumerken ist hier, dass die für die Dichlorvos-Messungen herangezogenen Belebtschlämme ungewöhnlich hohe, das normale Durchschnittsbild des Belebtschlammes etwa 5-fach übersteigende Individuendichten von Rotatorien aufwiesen).

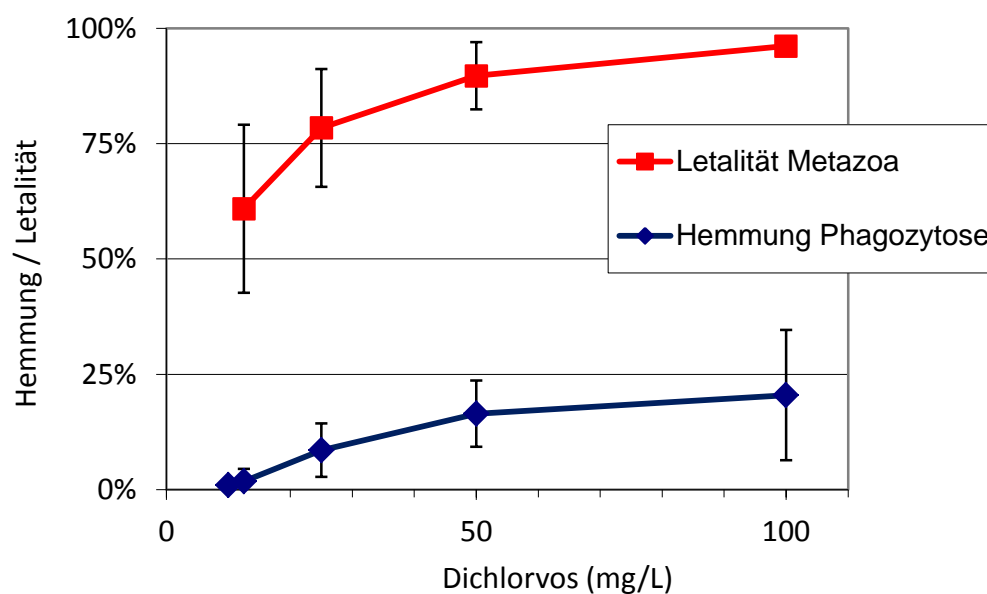


Abb. 22. Wirkung des Acetylcholinesteraseinhibitors Dichlorvos (22h Inkubation) auf die Phagozytoseaktivität von Belebtschlamm und die Lebensfähigkeit autochthoner Metazoen. Die Werte geben das Mittel (\pm St.Abw.) von 4-5 Messungen mit unterschiedlichen Belebtschlämmen und an verschiedenen Tagen wieder.

Teil 2 – Charakteristika der Phagozytose

Kinetik

Die Kinetik der Substratabnahme in Belebtschlammproben zeigt einen klar linearen Verlauf ($r^2 = 0,993$), d.h. die Rate der Phagozytose, hier gemessen als Abnahme der optischen Dichte über die Zeit ($\frac{dOD}{dt}$), bleibt über den Testzeitraum konstant. Dies gilt sowohl für die phagozytotisch aktiven als auch für die defaunierten, inaktiven

Proben. Im dargestellten Beispiel (Abb. 23) nimmt fraßbedingt die optische Dichte um etwa 0,036 Einheiten (ca. 2,6%) pro Stunde ab. Dieser Zusammenhang gilt über einen weiten Bereich: ausgehend von einem Startwert von hier $OD_{440} \approx 1,4$ bis zu einem Wert von unter 0,4 (OD_{440} -Wert nach 27-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur). Allerdings verschwindet die messbare Trübung im Überstand nicht vollständig. Eine mit dem Auge nur schwach wahrnehmbare Resttrübung von weniger als $OD_{440} = 0,05$ bleibt auch nach vollständiger Phagozytose erhalten (vgl. hierzu auch Abb. 20). Eine deutlich geringere Abnahme zeigen die defaunierten Proben; selbst wenn auch hier eine kontinuierliche Abnahme zu erkennen ist, liegt diese aber nur bei etwa $\frac{1}{7}$ der erstgenannten Probe mit aktiver Fauna.

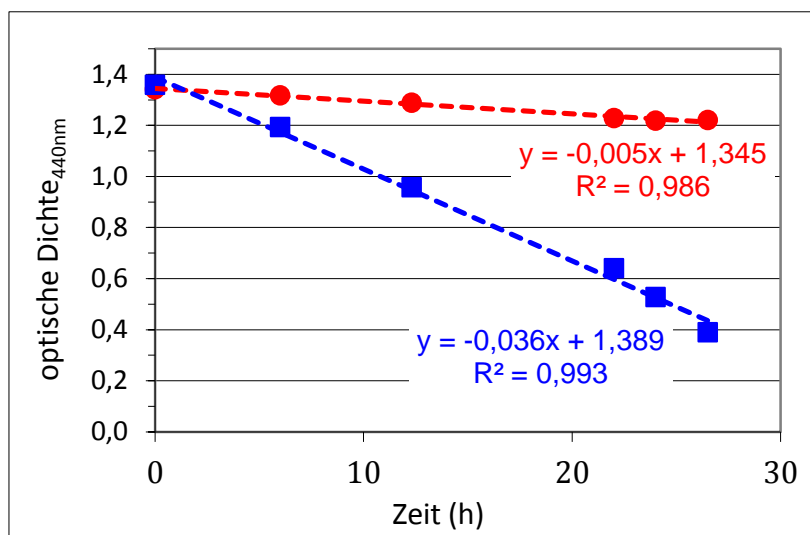


Abb. 23: Beispiel zur zeitlichen Abnahme des bakteriellen Substrates über 27 Stunden (rot: defauniert, blau: mit Fauna); entsprechend dem Testprotokoll-Entwurf wurde der bakterielle Suspensagehalt im Überstand der Belebtschlammprobe bei Raumtemperatur und einer Schlammkonzentration von 1 g/L gemessen- allerdings hier über einen Testzeitraum von 27 Stunden, statt wie im Testprotokoll vorgeschlagen über 22 h.

Temperaturabhängigkeit

Die Bedeutung der Temperatur für eine zuverlässige Erfassung der Phagozytoseaktivität wird aus Abb. 24 ersichtlich. Zwischen 13°C (niedrigster Messwert) und 30°C (höchster Messwert) steigt die Phagozytoseaktivität von unter 20% auf knapp 160% linear um 8% pro Grad Celsius an. Nur geringe Schwankungen der Umge-

bungstemperatur von $\pm 2^\circ\text{C}$ führen bereits zu Änderungen der Fraßaktivität um bereits 32% ($\pm 16\%$).

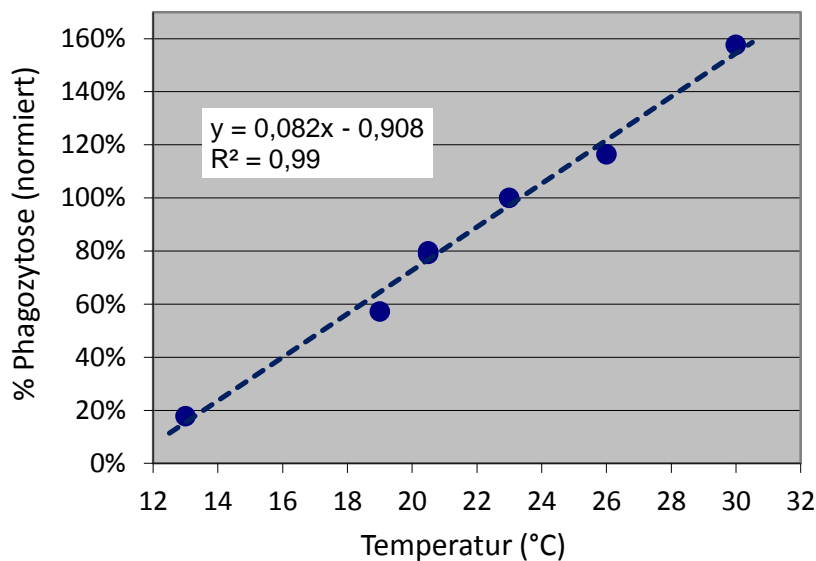


Abb. 24: Phagozytoseaktivität des Belebtschlammes als Funktion der Temperatur. Als Bezugspunkt (100%) wurde die Aktivität bei 23°C herangezogen.

Lokalisation

Die phagozytotische Aktivität ist beinahe ausschließlich an die Flocken des Belebtschlammes gebunden. Dies zeigen Untersuchungen nach Auftrennung des Belebtschlammes in Überstand und Schlamm. Selbst nach 3-maliger Entnahme des Überstandes bleibt in der Restfraktion, d.h. in den sich von selbst absetzenden Schlammflocken, praktisch die gesamte Phagozytoseaktivität erhalten (Abb. 25). Eine Aufteilung des Schlammes nach Flockengrößen von mehr als $60\ \mu\text{m}$ und mehr als $100\ \mu\text{m}$ zeigt, dass dabei mehr als 80% der gesamten Phagozytoseaktivität an Flocken größer als $60\ \mu\text{m}$ gebunden ist und selbst Flocken mit einer Größe von $100\ \mu\text{m}$ und mehr noch 76% der phagozytotischen Aktivität enthalten (Tab. 3).

Tab. 3: Phagozytoseaktivität in verschiedenen Größenfraktionen des Belebtschlammes. Die Aktivität wurde im Filtrat von 60 µm bzw. 100 µm Nylon-Maschenfiltern bestimmt. Die Werte geben das Mittel aus 6 Messungen mit 3 verschiedenen Schlämmen wieder.

Phagozytoseaktivität in:	Mittel	StAbw.
Belebtschlammprobe	100%	± 6%
Flocken größer als 60 µm	83%	± 3%
Flocken größer als 100 µm	76%	± 5%

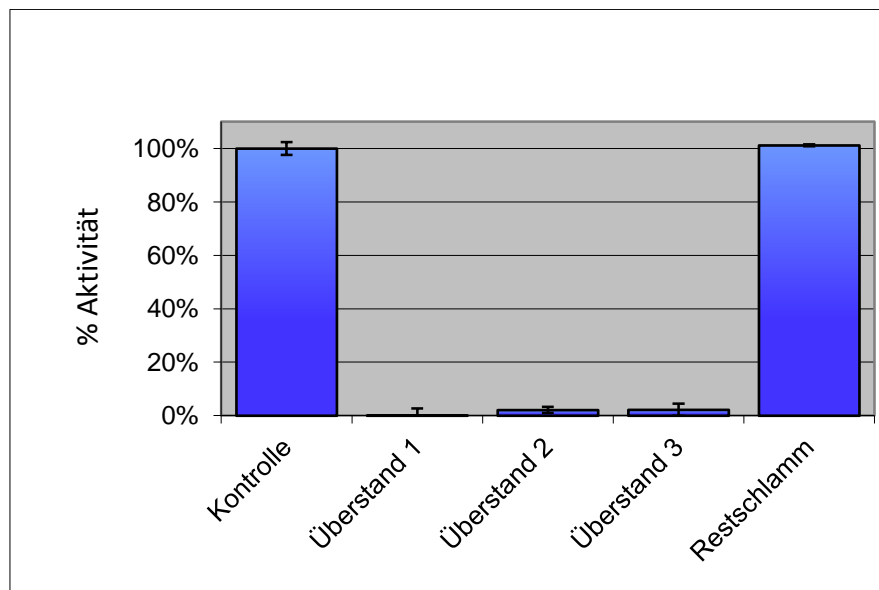


Abb. 25: Phagozytoseaktivitäten im Belebtschlamm (Kontrolle) bzw. in Überständen nach mehrfachem „Spülen“ des Belebtschlammes (Überstand 1-3) bzw. in der Rest-Schlammfraktion nach 3-maliger Überstandsentsnahme. Zur Messung wurde der Belebtschlamm entsprechend Testprotokoll auf 1 g/L mit Leitungswasser vorverdünnt, der Ersatz der Überstände erfolgte ebenfalls mit Leitungswasser.

Zeitliche Schwankungen

Etwa alle 2 Wochen wurden über einen Zeitraum von November bis August des Folgejahres Proben der Kläranlage Stahnsdorf entnommen und vermessen. Dabei wiesen die Phagozytoseleistungen z.T. erhebliche Unterschiede auf: beispielsweise betrug die Aktivität einer im Januar entnommenen Probe nur knapp die Hälfte einer Probe des Monats Juni (vgl. Abb. 26). Aber auch Messungen mit einem Abstand von nur 2 Wochen ergaben Abweichungen von mehr als 60% (vgl. z.B. Messungen im Dez./Jan. und im Juni).

Über die einzelnen Jahreszeiten gemittelt ergibt sich zwar ein Bild, das den kalten Jahreszeiten eine durchschnittlich geringere Aktivität zuordnen lässt (Abb. 27), die hohen Aktivitätsunterschiede innerhalb einer Jahreszeit und besonders zwischen zwei Probenahmen lassen sich mit dieser jahreszeitlichen Zuordnung allerdings nicht erklären.

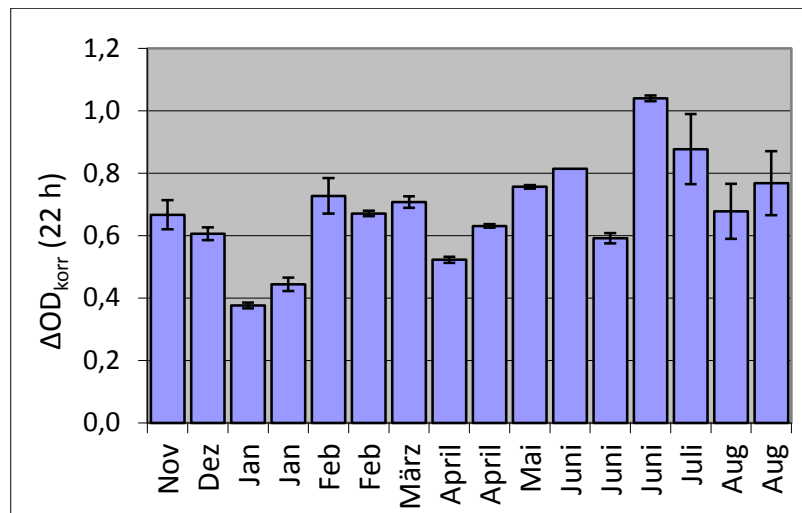


Abb. 26: Jahresgang der Phagozytoseaktivität (Mittelwerte aus jeweils 2 Parallelen \pm StAbw.) nativer Belebtschlammproben des Klärwerkes Stahnsdorf (Start der Messung etwa 2 Stunden nach Probenahme; Abstand zwischen den Probenahmen jeweils etwa 2 Wochen).

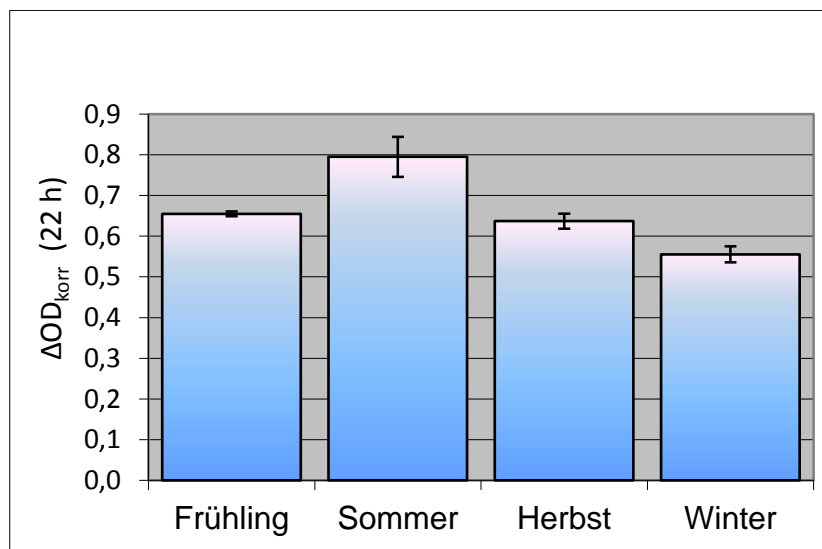


Abb. 27: Mittelwerte der Phagozytoseaktivität nativer Belebtschlammproben des Klärwerkes Stahnsdorf (Mittelwerte aus 4-6 Messungen mit 2-wöchigem Abstand \pm StAbw., Start der Messung etwa 2 Stunden nach Probenahme). Meteorologische Jahreszeiten.

Zur Erfassung der geschilderten Phagozytoseaktivität im Jahresgang wurden etwa alle 2 Wochen - nicht systematisch an bestimmten Wochentagen - Proben der Kläranlage Stahnsdorf entnommen und vermessen. Um die hier zu beobachtenden großen Aktivitätssprünge zeitlich näher aufzulösen, wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen tägliche Messungen vorgenommen. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Verlauf einer Woche bereits starke Veränderungen der Phagozytoseaktivität von 30% und mehr auftreten. Besonders auffällig sind dabei die tendenziell niedrigeren Aktivitäten zu Wochenbeginn (vgl. Abb. 28).

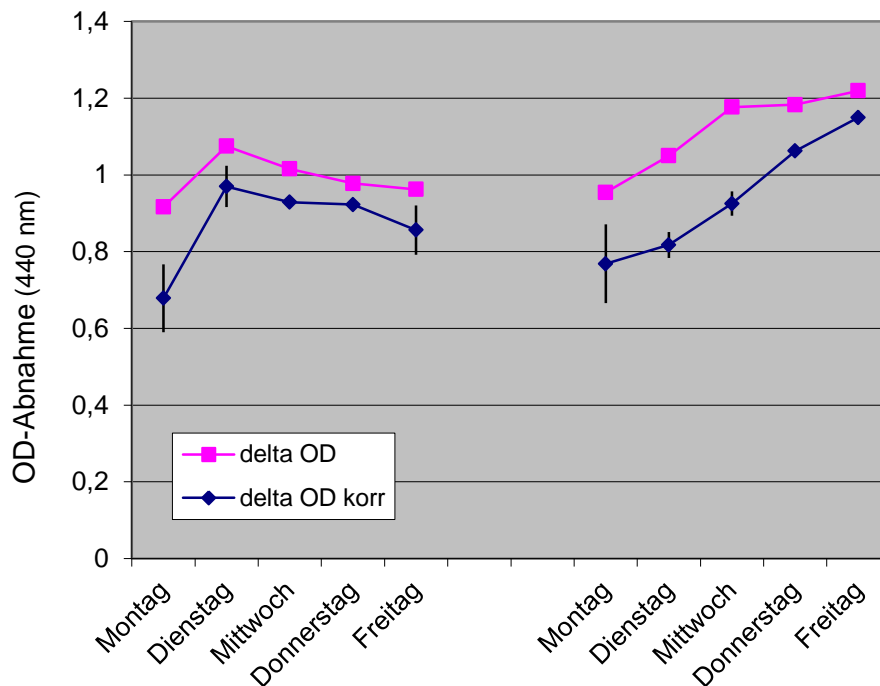


Abb. 28: Phagozytoseaktivität im Verlauf von 2 Wochen. (Werk-) tägliche Messungen der Phagozytoseaktivität nativer Belebtschlammproben des Klärwerkes Stahnsdorf über einen Zeitraum von zwei Wochen (Entnahme der Proben jeweils vormittags gegen ca. 10 Uhr, Start der Messung etwa 2 Stunden nach Probenahme), delta OD: Gesamt-OD-Abnahme, delta OD_{korr}: phagozytosebedingte OD-Abnahme (korrigiert um die unspezifische Abnahme der Digitoninkontrollen). Dargestellt sind die Mittelwerte von 2-4 Parallelmessungen \pm StAbw.

Im Gesamtergebnis lässt sich also feststellen, dass ein zeitliches Raster der Probenentnahme von zwei Wochen zu grob gefasst ist, um Veränderungen des Belebtschlammes und damit einhergehende Variationen der Phagozytoseaktivität abzubilden. Im Gegenteil scheinen vielmehr Schwankungen innerhalb einer Woche

oder sogar zwischen einzelnen Tagen ähnliche Ausmaße anzunehmen, wie Aktivitätsänderungen, die über große Zeitintervalle zu beobachten sind.

Lagerfähigkeit des Belebtschlammes

Native Belebtschlammproben lassen sich im Kühlschrank bei nur geringen Aktivitätsverlusten über mehrere Tage aufbewahren (Abb. 29). Nach fünf Tagen Lagerung bei 4-6°C beträgt die mittlere Phagozytoseaktivität noch etwa 90% der anfänglichen Aktivität, wie sie kurz nach Entnahme aus dem Belebungsbecken der Abwasserreinigungsanlage gemessen werden kann. Erst danach ist eine deutlichere Abnahme der Aktivität um etwa 5% pro Tag festzustellen (vgl. Abb. 29, gestrichelte Linie). Der Test lässt sich damit ohne großen Probenahmeaufwand in den Laboralltag einbinden: nach der Entnahme frischen Belebtschlammes zu Wochenbeginn können mit derselben Probe bis zum Ende der Woche Tests bei weitgehend gleichbleibender Phagozytoseaktivität durchgeführt werden.

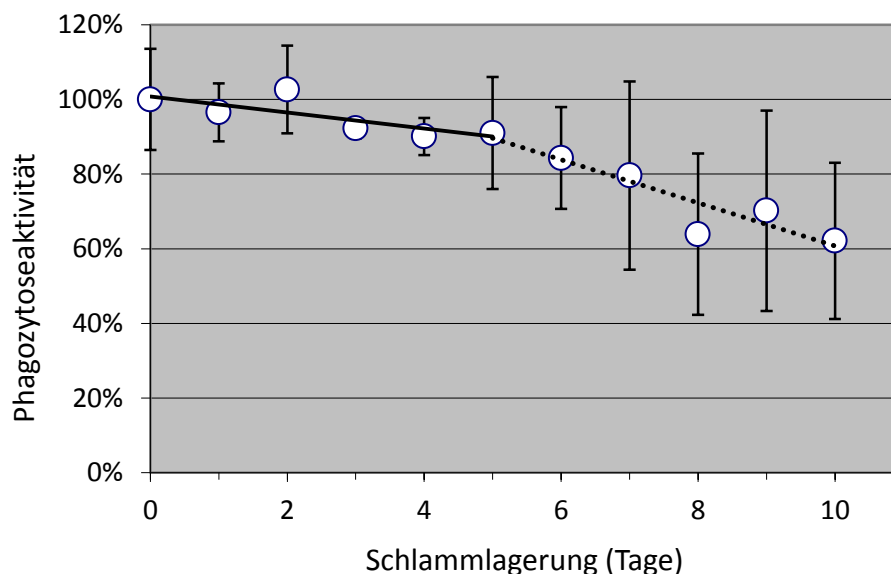


Abb. 29: Phagozytoseaktivität (OD_{440} -Abnahme über 22 h) in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit bei 4-6°C. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 3-10 Messungen mit verschiedenen Belebtschlämmen \pm StAbw. Der Zeitpunkt 0 steht für den Tag der Probenahme. Die durchgezogene Linie soll die anfänglich relativ geringe Aktivitätsabnahme verdeutlichen, während die gepunktete Linie den etwa ab dem fünften Tag der Lagerung einsetzenden stärkeren Aktivitätsverlust anzeigt.

Teil 3 - Rahmenbedingungen für ein Testprotokoll

In der Belebungsanlage wird der Klärschlamm einer intensiven Belüftung unterzogen. Durch einerseits die Testgefäßwahl und zum anderen auch die Methodik der Inkubation musste also eine permanente Versorgung des Belebtschlammes mit Luftsauerstoff gewährleistet werden, um annähernd realistische aerobe Verhältnisse im Labor nachzustellen. Ein Durchströmen der Testgefäße mit Luft schied aus, da dies nur mit größerem technischen Aufwand realisierbar schien und besonders im Hinblick auf schadstoffhaltige Proben nicht erwünscht war.

Am Anfang der Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde ausschließlich mit 12 mL-Glasröhrchen und einem Probenvolumen von 2 mL gearbeitet. Diese Art der Kultivierung stellte eine bereits etablierte Methode zur Kultivierung von Ciliaten bis hin zu sehr hohen Zelldichten dar [109]. Die Verwendung einer kleineren Röhrchenvariante (bei gleichem Probenvolumen von 2 mL) mit einem Gesamtvolumen von nur 4 mL geht zurück auf die Suche nach einer Möglichkeit, mit einem geringen Volumen der Gasphase im Testgefäß leicht flüchtige Schadstoffe besser erfassen zu können. Für beide Gefäßtypen gelten unterschiedliche Rahmenbedingungen für eine optimierte Testdurchführung. Da sowohl 12 mL- als auch 4 mL- Röhrchen vor dem Hintergrund unterschiedlicher Laborausstattung und Fragestellung für Testzwecke geeignet erscheinen, wird in den folgenden Abschnitten auf die Eckdaten für beide Gefäßgrößen eingegangen.

Verschlüsse der Testgefäße

Wichtig für die Phagozytose des Belebtschlammes ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Probe während der 22-stündigen Testphase. Einen wesentlichen Beitrag hierzu leisten sauerstoffdurchlässige Verschlusskappen. Sind die Testgefäße mit üblichen (kaum sauerstoffdurchlässigen) Phenolharzkappen verschlossen, beträgt die Phagozytoseleistung nur etwa 40% gegenüber Belebtschlammproben, die in den gleichen Testgefäßen, aber mit sauerstoffdurchlässigen Kappen inkubiert wurden (vgl. Abb. 30).

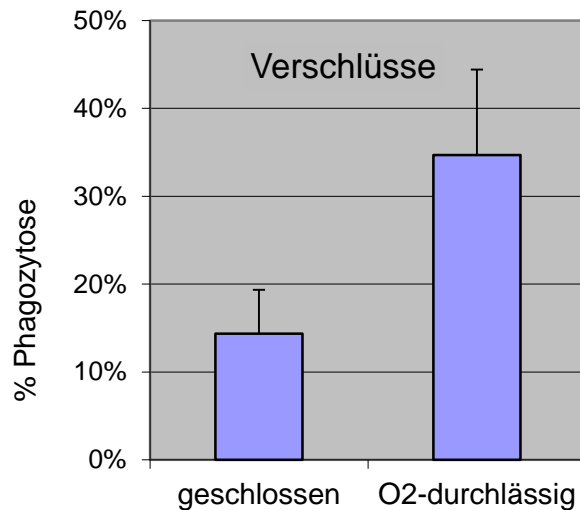


Abb. 30: Phagozytoseaktivität in 12 mL-Glasröhrchen mit Verschlüssen, die kaum Gasaustausch zulassen (geschlossen) und solchen, die durch eine Tefloneinlage für den Durchtritt von Sauerstoff konzipiert sind (durchlässig). Die Balken zeigen Mittelwerte (\pm StAbw.) aus drei Messungen an verschiedenen Tagen.

Neigungswinkel und Schüttelgeschwindigkeit der Testgefäße

Protozoen lassen sich bis zu hohen Zelldichten optimal in ruhenden Medien kultivieren [109]. Für die Phagozytoseaktivität in Belebtschlämmen ist die hierbei erreichte Sauerstoffzufuhr offensichtlich nicht ausreichend. Nur durch ein starkes Durchmischen des Schlammes - wie hier erreicht mit schräg liegenden Röhrchen auf einem Schüttler - lässt sich eine hohe Phagozytoseaktivität erreichen.

Im Falle der 12 mL-Testgefäße scheint bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 140 U/min und einer Neigung der Röhrchen von 20° relativ zur Horizontalen die phagozytotische Leistung maximal zu sein. Eine stärkere (0°) oder geringere Neigung (40°) führt zu keiner Steigerung der Phagozytoseaktivität (Abb. 31), ebenso wenig wie eine Erhöhung oder Verringerung der Schüttelfrequenz (Abb. 32). Auch bezüglich der bakteriellen Adsorption erweisen sich 140 U/min als vorteilhaft, da sich die (unerwünschte) Bindung des bakteriellen Substrats an die Flocken des Belebtschlammes einem Minimalwert nähert, der bei nur etwa der Hälfte der ungeschüttelten Probe liegt (Abb. 32).

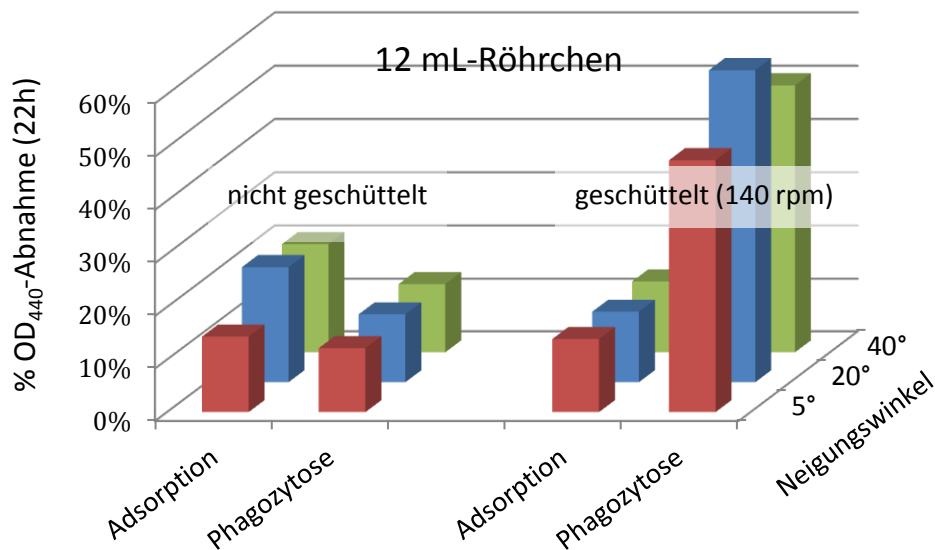


Abb. 31: Adsorption und Phagozytoseaktivität in ruhenden (links) und geschüttelten Belebtschlammproben (rechts). Die Proben wurden in 12 mL-Glasröhrchen mit sauerstoffdurchlässigem Verschluss bei verschiedener Neigung (relativ zur Horizontalen) 22 Stunden inkubiert. Die Schüttelgeschwindigkeit betrug 140 U/min.

Geringfügig anders verhält es sich bei der kleineren, 4 mL-Testgefäßvariante, bei der das Probenvolumen nicht mehr nur etwa 1/6, sondern etwa die Hälfte des Gefäßvolumens ausmacht. Für eine optimale Phagozytoseleistung und eine minimale Adsorption ist hier eine etwas höhere Schüttelgeschwindigkeit von 200-250 U/min und ein Neigungswinkel von 40° erforderlich (Abb. 32). Bei geringeren Schüttelgeschwindigkeiten reduziert sich die Phagozytoseaktivität erheblich. Zugleich steigt die Adsorption des Substrates an die Schlammflocken. Dabei hat der Neigungswinkel – untersucht wurde hier zwischen 0° (liegend) und maximal 40° - im Hinblick auf die Phagozytoseleistung keinen messbaren Einfluss. Auswirkungen der Neigung zeigen sich aber auf das Adsorptionsverhalten und die Schlammhomogenität. In den kleineren 4 mL-Teströhrchen wurde bei einem Winkel von 20° und besonders bei horizontal geneigten Proben mehrfach eine erhöhte Adsorption beobachtet. Zudem führte eine geringe Neigung von 0° und 20° immer wieder dazu, dass der Schlamm beim Schütteln nicht richtig durchmischt wurde, sondern sich an der Phasengrenze ansammelte und dort z.T. am Glas des Probenröhrchens antrocknete.

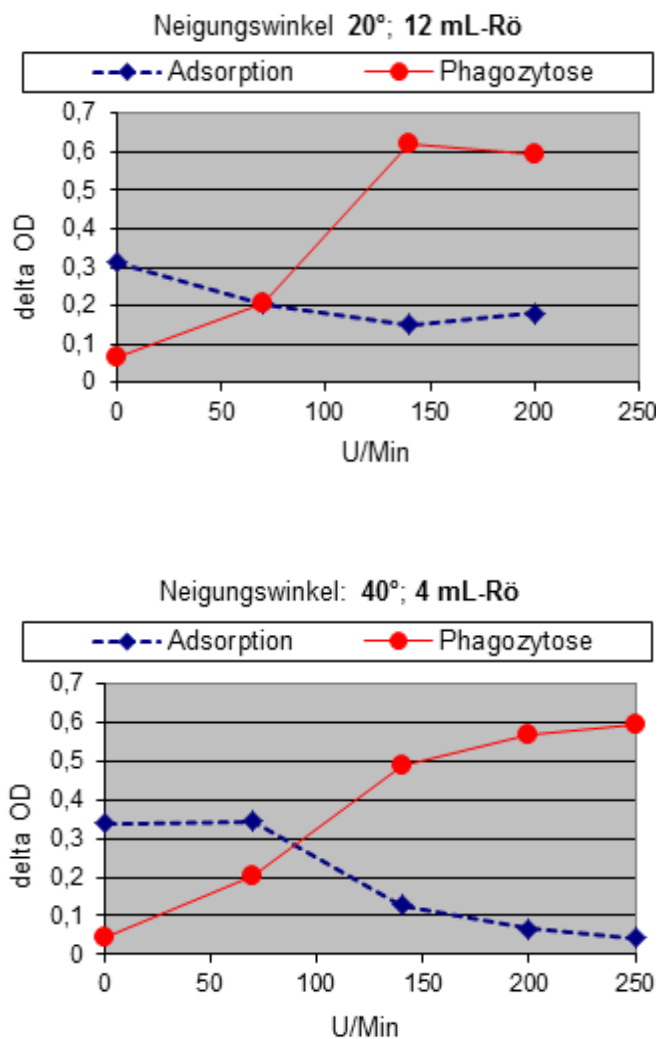


Abb. 32: Zusammenhang zwischen der Schüttelgeschwindigkeit und der Phagozytoseaktivität bzw. Adsorptionsstärke des *E.coli*-Substrates während der 22-stündigen Testdauer. Die Neigung der Teströhrchen betrug 20° (12 mL-Röhrchen) bzw. 40° (4 mL-Testgefäße) relativ zur Horizontalen. Die Schüttelgeschwindigkeit ist als Anzahl der Kreisbewegungen pro Minute (U/min) angegeben.

Festlegung des Testzeitraumes

Als feste Größe wurde bereits sehr früh der Testzeitraum von 22 Stunden festgelegt. Eine Inkubationsphase von mehr als 18 Stunden und weniger als 24 Stunden sollte dem „natürlichen“ Umstand Rechnung tragen, dass es etwa einen knappen Tag dauert, bis ein Wassertropfen eine moderne Kläranlage durchlaufen hat [110] [111] [112] und in dieser Zeit ein eingetragener Schadstoff auf die Kläranlagenbiologie einwirken kann. Zugleich sollte aber auch der Test in den Laboralltag eingliedert werden können, damit innerhalb eines normalen Arbeitstages und an aufeinanderfolgenden Tagen im selben zeitlichen Rhythmus Schadstoffmessungen erfolgen können. Ein Testzeitraum von 22 Stunden ermöglicht dies in idealer Weise. Werden beispielweise die Proben um 8 Uhr morgens vorbereitet, so dass die

Probeninkubation nach der ersten OD-Messung um 10 Uhr gestartet werden kann, fällt die zweite Messung am folgenden Tag auf 8:30 Uhr morgens (22 Stunden Inkubation plus 0,5 Stunden Sedimentation des Schlammes). Anschließend ist genügend Zeit, um einen erneuten Test im praktisch gleichen zeitlichen Ablauf durchzuführen.

Belebtschlamm- und Substratkonzentration im Test

Sowohl die Substrat- als auch die Belebtschlammkonzentration müssen aufeinander abgestimmt sein, um zu verhindern, dass das Substrat zu früh verbraucht ist - entweder durch ein zu wenig an *E. coli* oder ein zu viel an phagozytierenden Organismen. Durch eine Variation der Schlammkonzentration zwischen 4 und 1 g/L²⁰ bei gleichzeitiger Variation der *E.coli*-Suspensionsdichte zwischen 0,2 und 0,4 g/L²¹ wurde versucht, eine für den gewählten 22-stündigen Testzeitraum geeignete Konstellation von Belebtschlamm zu eingesetztem Substrat zu ermitteln. Mit einer Belebtschlammkonzentration von 1 g/L und einer Substratkonzentration von 0,4 g/L wurde schließlich ein Belebtschlamm-zu-Substrat-Verhältnis gefunden, das sich für die Vermessung der über mehrere Jahre und zu verschiedenen Jahreszeiten genommenen Belebtschlammproben als geeignet erwies. Die folgenden Zahlen verdeutlichen dies: Die Zugabe von 0,4 mg/mL *E.coli* verursacht im Überstand der Belebtschlammprobe eine durchschnittliche Trübung mit einer Extinktion (OD₄₄₀) von etwa 1,3. Werden die Proben entsprechend dem Testprotokoll bei 22°C auf dem Schüttler inkubiert, sinkt der anfängliche OD-Wert in 22 Stunden im Mittel um etwa 0,6 OD-Einheiten²² auf einen Extinktionswert von 0,7 ab. Einige der im Laufe von Jahren und zu verschiedenen Jahreszeiten gesammelten Belebtschlammproben wiesen allerdings - verursacht durch eine stärkere Adsorption und besonders

²⁰ Als Ausgangswert dient die Obergrenze normaler Belebtschlämme von etwa 4 g/L (eigene Messungen & z.B. [146] [263] [264]).

²¹ Die Obergrenze von 0,4 mg/mL *E.coli* wurde nicht überschritten, da bis zu dieser maximalen Suspensionsdichte ein linearer, direkt proportionaler Zusammenhang zwischen Trübung (OD₄₄₀) und eingesetztem bakteriellen Substrat besteht (vgl. „Material & Methoden“, Abb. 12, S. 40).

²² Der Mittelwert der OD-Abnahme von 0,6 wurde aus 29 Belebtschlammproben ermittelt, die in den Monaten November bis Juni des Folgejahres - fast wöchentlich - dem Klärwerk Stahnsdorf entnommen wurden.

durch eine höhere Phagozytoseaktivität - deutlich höhere Extinktionsabnahmen um bis zu 1,1 OD-Einheiten auf²³. Damit ergibt sich nach 22-stündiger Inkubation eine Rest-OD von nur noch etwa 0,2 (= 1,3 - 1,1), deren Unterschreiten vermieden werden sollte, da in niedrigen Extinktionsbereichen (unter einer OD von etwa 0,1-0,15) das bakterielle Substrat bereits ausgedünnt ist und keine klare Proportionalität mehr zwischen Trübung und Phagozytoseaktivität besteht.

Verdünnungsmedium

Belebtschlamm, der unter "natürlichen Verhältnissen" im Belebungsbecken meist in Konzentrationen zwischen 2 und 4 g/L vorliegt²⁴, wird im Testansatz in Konzentrationen von 1 g/L eingesetzt. Für diesen Verdünnungsschritt und ebenso zum Ansetzen von Schadstofflösungen und Verdünnungsreihen wurden frisches Leitungswasser (Lw frisch, direkt nach Entnahme aus der Leitung), mindestens einen Tag bei Raumtemperatur aufbewahrtes Leitungswasser (Lw 1 Tag), Überstand des Belebtschlammes (BS Überstand) und Volvic® Mineralwasser auf seine Eignung hin geprüft (Abb. 33). Dabei haben sich ein Tag altes, „equilibriertes“ (Berliner) Leitungswasser und Volvic® Mineralwasser bewährt²⁵. In beiden Verdünnungslösungen lassen sich hohe Phagozytoseaktivitäten mit geringen Schwankungen der Messwerte beobachten. Etwas geringere, wenn auch nicht statistisch signifikant unterschiedliche Phagozytoseaktivitäten sind mit den beiden Verdünnungslösungen „Belebtschlammüberstand“ und „frisches Leitungswasser“ verbunden. Auffällig ist die mit frischem Leitungswasser einhergehende hohe Standardabweichung. Hier weichen die an 4 verschiedenen Tagen mit 2 unterschiedlichen Belebtschlämmen durchgeführten Messungen mit einer Standardabweichung von $\pm 11\%$

²³ Die Extremwerte der Extinktionsabnahmen innerhalb des 22-stündigen Testzeitraumes betragen hierbei 0,38 (Minimum) und 1,1 (Maximum).

²⁴ Der in dieser Arbeit über mehrere Jahre entnommene Schlamm des Klärwerks Stahnsdorf wies überwiegend TS-Werte zwischen 3,5 und 4,5 g/L auf, selten unter 3 g/L und nur manchmal über 5 g/L.

²⁵ Soweit nicht anders angegeben, basieren alle Ergebnisse dieser Arbeit auf Verdünnungen der Belebtschlammprobe mit mindestens einen Tag altem Leitungswasser. Das Leitungswasser wurde hierbei in Glas-Erlenmeyerkolben meist über etwa 1 Woche bei Raumtemperatur gelagert und in dieser Zeit im Test eingesetzt.

besonders deutlich voneinander ab. Was das adsorptive Verhalten des als Substrat verwendeten E.coli-Stammes ATCC 9637 betrifft, scheinen sich alle Verdünnungslösungen in gleicher Weise zu verhalten. Alle Lösungen führen in den hier untersuchten Belebtschlammproben unterschiedslos zu Werten um 12%.

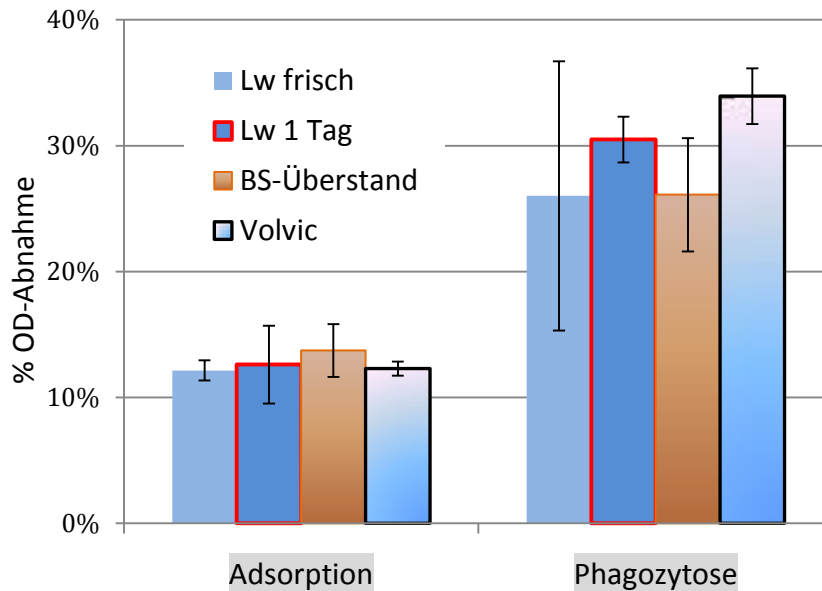


Abb. 33: Einflüsse des Verdünnungsmediums auf die Phagozytoseaktivität und das Adsorptionsverhalten des Substrates (Mittelwerte von 4 Messungen an verschiedenen Tagen mit 2, an aufeinanderfolgenden Wochen entnommenen Belebtschlammproben \pm StAbw.). Das Trockengewicht des Belebtschlammes betrug zu beiden Zeitpunkten knapp über 4 g/L, d.h. die Proben wurde etwa 1:4 mit der jeweiligen Lösung auf eine Schlammkonzentration von 1 g/L verdünnt.

Lösungsmittel

Polare Stoffe lösen sich im Allgemeinen gut in Wasser, für unpolare Chemikalien ist dagegen häufig ein unpolares, organisches Lösungsmittel erforderlich. Damit gelangt bei der Toxizitätsprüfung von Einzelsubstanzen, besonders von sehr lipophilen, oder auch infolge der Herstellung oder Aufkonzentrierung von beispielsweise Sediment- oder Bodenextrakten, auch das organische Lösungsmittel mit in den Testansatz. Es ist daher für biologisch-toxikologische Untersuchung wichtig, quantitative Informationen zur schädigenden Wirkung von Lösungsmitteln zu haben und nur solche Konzentrationen im Test einzusetzen, die ohne Wirkung sind oder unterhalb bestimmter toxikologischer Grenzwerte liegen.

In der folgenden Abbildung (Abb. 34) sind die konzentrationsabhängigen Effekte von 5 typischen Lösungsmitteln gegenüber der Phagozytoseaktivität im Belebtschlamm dargestellt. Chloroform wirkt hier über den gesamten Konzentrationsbereich deutlich, um etwa einen Faktor 10 stärker als die restlichen Lösungsmittel. Die Wirkung von Methanol, Aceton, Ethanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) ist aber auch nicht einheitlich. Besonders in geringen Konzentrationen übertrifft Methanol die gleich wirkenden Substanzen Ethanol und Aceton. Die geringste Toxizität entfaltet DMSO, das aus diesem Grund in dieser Arbeit auch als Lösungsmittel für 5 der 27 Testsubstanzen Verwendung fand (vgl. Material & Methoden, S. 28). Als höchste Konzentration im Probenansatz wurden 0,2% (v/v) DMSO zugelassen. Das ist weniger als 1/10 der Konzentration der EC_{50} (2,35% v/v) und liegt bei etwa 1/4 der EC_5 (0,81% v/v).

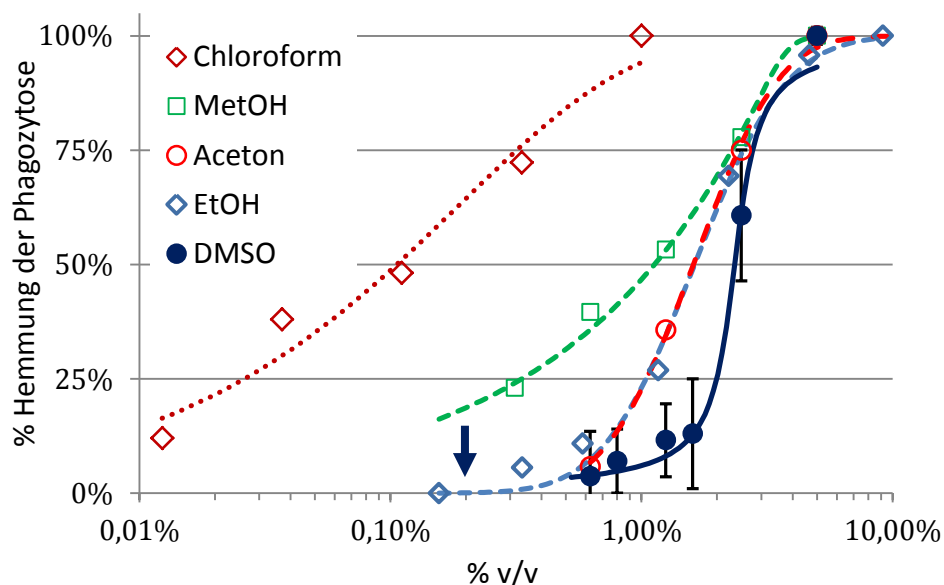


Abb. 34: Wirkung typischer, in der Ökotoxikologie gebräuchlicher Lösungsmittel auf die Phagozytoseaktivität von Belebtschlamm. Die Abkürzungen MetOH und EtOH stehen für Methanol und Ethanol, DMSO für Dimethylsulfoxid. Die Punkte illustrieren Mittelwerte aus 2 - 4 Messungen mit unterschiedlichen Schlämmen. Die Kurven geben den jeweiligen „best fit“ sigmoider Funktionen für die Datenpunkte wieder. Im Fall des als Lösungsmittel für schwerlösliche Testsubstanzen eingesetzten DMSO sind zusätzlich die Standardabweichungen (StAbw., $n = 4$) angegeben. Der Pfeil im Diagramm deutet die höchste im Testansatz zulässige DMSO-Konzentration von 0,2% an.

Teil 4 - Schadstoffmessungen

Konzentrations-Wirkungskurven

Für 24 der 27 untersuchten Testchemikalien ergaben sich in den größeren 12 mL-Testgefäßen eindeutige Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (vgl. Abb. 35 und Anhang, 143 ff.). Nur in drei Fällen, bei Diphenylether, 1-Bromoctan und trans-4-Methyl- β -nitrostyrol, zeigte sich bis zur höchsten Testkonzentration keine oder eine nur geringfügige Hemmung der Phagozytoseaktivität, so dass kein EC_{50} -Wert als spezifische toxikologische Kenngröße ermittelt werden konnte. Die höchsten Konzentrationen im Test lagen hier bei 52 mg/L (Diphenylether), 150 mg/L (1-Bromoctan) bzw. 2,9 mg/L (trans-4-Methyl- β -nitrostyrol). Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht, da alle drei Chemikalien in DMSO gelöst vorlagen und bei den angegebenen Konzentrationen das Limit von maximal 0,2% Lösungsmittel im Testansatz erreicht war (vgl. Punkt „Lösungsmittel“, S. 68).

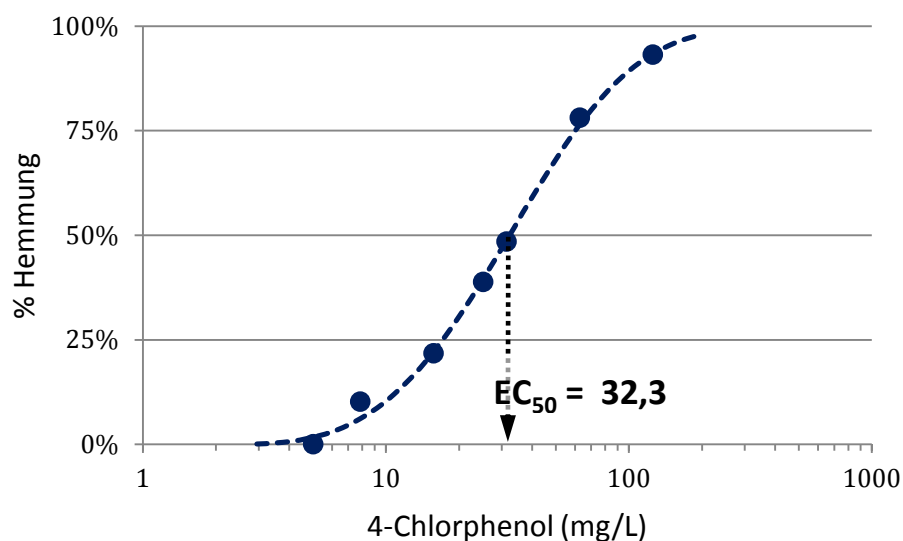


Abb. 35: Exemplarische Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Aus dem statistisch ermittelten „best fit“ (gestrichelte Kurve) wurde aus den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen aller Testsubstanzen die Konzentration mit 50% Effekt (EC_{50} , angedeutet durch die Spitze des Pfeils) errechnet.

Messung von flüchtigen Stoffen

Wie bereits erwähnt, ließ sich für die beiden Chemikalien Diphenylether und 1-Bromoctan anhand der eingesetzten Konzentrationen in den 12 mL-Testgefäßen keine Hemmwirkung nachweisen. Da es sich in beiden Fällen um flüchtige Substan-

zen handelt und in den 12 mL-Teströhrchen das Gasvolumen das Probenvolumen um etwa das 6-fache übersteigt, wurden beide Chemikalien zusätzlich in einer kleineren Gefäßvariante mit ca. 4 mL-Gesamtvolumen nachgemessen (s. hierzu auch Punkt „Neigungswinkel und Schüttelgeschwindigkeit der Testgefäße“, S. 63 und Material & Methoden, S.40 f.). Das Probenvolumen wurde hierbei beibehalten, allerdings ist die Luftsäule deutlich reduziert und entspricht in etwa dem Probenvolumen. Die kleinere Luftsäule über der Probe scheint mit einer eindeutigen Verstärkung der Chemikalienwirkung einherzugehen. Für beide Chemikalien ließen sich nun Effekte auf die Phagozytoseaktivität über den gesamten Wirkungsbereich erfassen und entsprechende Konzentrations-Wirkungsbeziehungen quantifizieren, was anhand der ursprünglichen, in den 12 mL-Röhrchen ermittelten Ergebnisse nicht möglich war (vgl. Abb. 36).

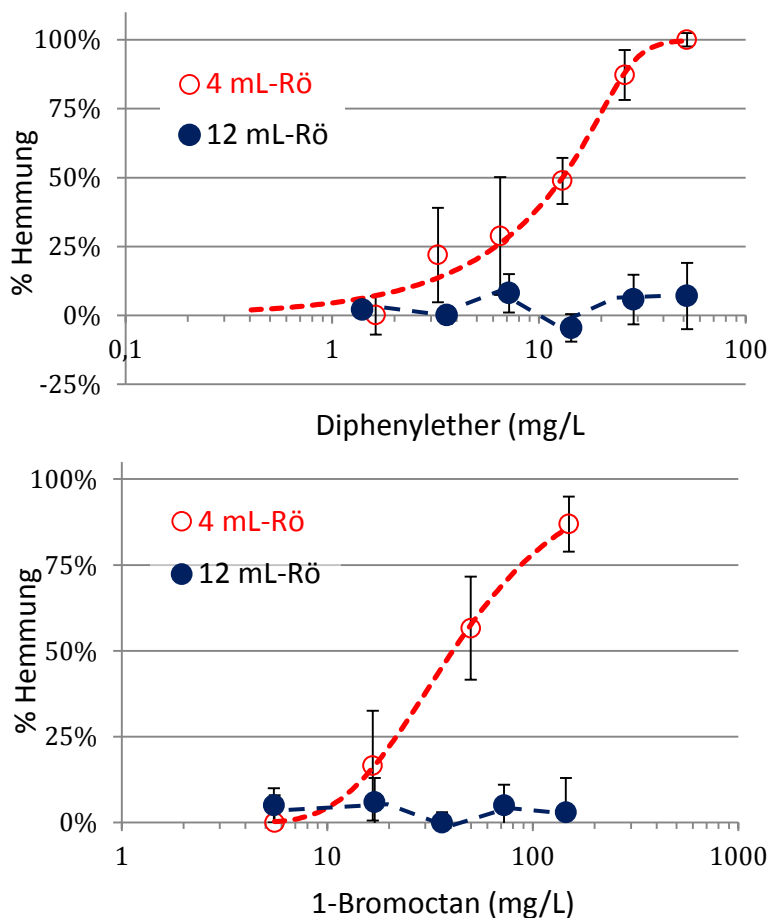


Abb. 36: Vergleich von Testläufen in 12 mL- und 4 mL-Röhrchen für die beiden flüchtigen Substanzen Diphenylether und 1-Bromoctan. Beide Röhrchenvarianten sind mit Schraubkappen verschlossen und in beiden beträgt das Probenvolumen 2 mL. Klare Unterschiede ergeben sich aber durch das Verhältnis der Probe zu der darüber stehenden Luftsäule. Im 12 mL-Röhrchen beträgt dies etwa 1:6, im kleineren 4 mL-Testgefäß ca. 1:2. Die Punkte stehen für Mittelwerte aus 2 Messungen (\pm StAbw.), die geschwungenen Kurven (rot) stehen für die statistisch beste Anpassung sigmoidaler Funktionen an die Datenpunkte.

EC₅₀-Werte und Lipophilie

Viele ökotoxische Effekte von organischen Umweltchemikalien gegenüber aquatischen Organismen lassen sich mit dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (P_{ow}) beschreiben. Er definiert die Lipophilie einer Chemikalie und ist bestimmende physiko-chemische Größe für die „minimale“ oder „Basis-Ökotoxizität“ einer Substanz (z.B. [81] & [113]). Mit dem in dieser Arbeit untersuchten Test-Set wird ein sehr weiter Bereich unterschiedlicher lipophiler Eigenschaften abgedeckt. Mehr als 9 Zehnerpotenzen weichen die P_{ow} -Werte voneinander ab. Während die Substanz DMSO mit dem geringsten $\log P_{ow}$ -Wert von -1,35 noch eine gute Wasserlöslichkeit und geringe Lipophilie zeigt²⁶, kehren sich die Verhältnisse im Falle der Substanz Hexachlorophen mit dem höchsten $\log P_{ow}$ -Wert von 7,54 drastisch um. Hier sind - in einem Zweiphasensystem - bei einem Molekül in der Wasserphase etwa 35 Millionen ($10^{7,54}$) Moleküle in der lipophilen Octanol-Phase gelöst.

Trägt man die EC_{50} -Werte gegenüber dieser ökotoxikologisch bedeutenden physiko-chemischen Größe auf²⁷, so lassen sich verschiedene Wirkmuster der Chemikalien erkennen (vgl. Abb. 37). Für die ‘non-polar’ narkotisch wirkenden Substanzen lässt sich ein linearer Zusammenhang ($R^2 = 0,91$, $n = 7$), in Abb. 37 dargestellt als blaue durchbrochene Linie, beobachten. Mit der Tendenz zu einem stärkeren Effekt, besonders bei geringer Lipophilie, zeigt sich auch zwischen den polar narkotisch wirkenden Chemikalien (grüne Dreiecke in Abb. 37) und dem $\log P_{ow}$ eine enge Korrelation ($R^2 = 0,98$, $n = 5$, grüne, untere Linie). Keinen Zusammenhang zur Lipophilie lassen dagegen die restlichen, teils reaktiven, teils spezifisch wirkenden Testchemikalien erkennen. Eine besonders stark von der Regressionsgerade für ‘non-polar’ Narkotika (sog. Basistoxizität, obere, durchbrochene Linie in Abb. 37) abweichende toxische Wirkung zeigen dabei die reaktive Substanz 2-Brom-nitro-1,3-propandiol (Nr. 19, Abb. 37) und die spezifisch wirkende Chemikalie Chlor-

²⁶ $\log P_{ow}$ steht für: Logarithmus₁₀ des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Ein $\log P_{ow}$ -Wert von -1,35 ($P_{ow} = \text{partition octanol/water} = 10^{-1,35} \approx 1/22$) bedeutet, dass sich im Zweiphasensystem Octanol und Wasser die Substanz etwa 22-fach besser in Wasser löst.

²⁷ Zur besseren Darstellung - auf Grund des Größenbereichs von meist mehreren Zehnerpotenzen - werden hierbei allgemein die logarithmierten₁₀ Werte gegenübergestellt.

amphenicol (Nr. 25, Abb. 37). Hier übertreffen die EC_{50} -Werte die anhand der Gleichung für die Basistoxizität geschätzten Effekte um das etwa 450 bzw. 1100-fache.

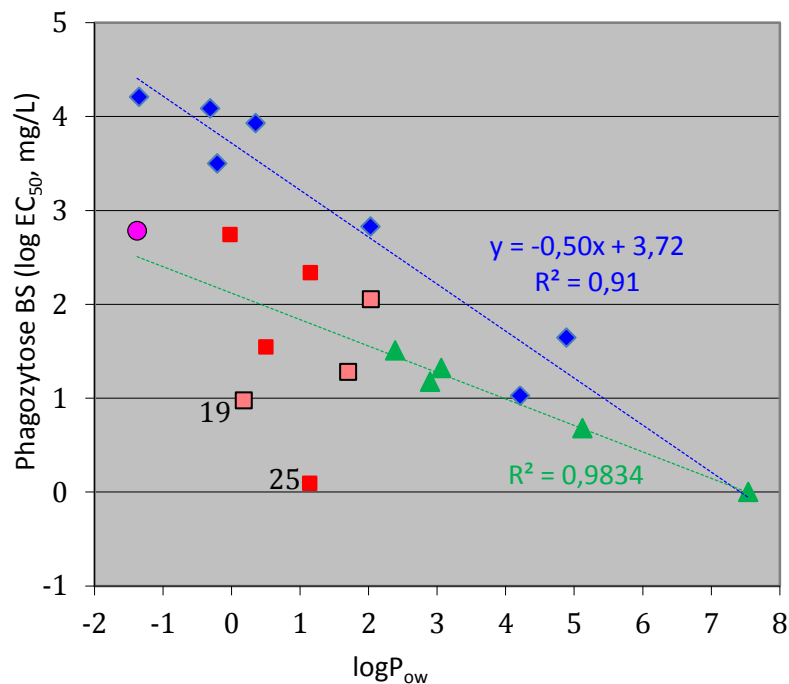


Abb. 37: Auftragung der logarithmierten₁₀ EC_{50} -Werte gegen die Lipophilie der Testchemikalien ($\log P_{ow}$). Die obere (blaue) gestrichelte Linie zeigt die Regressionsgerade (sog. Basistoxizität) für die 'non-polar' narkotischen Substanzen (blaue Rauten), die untere (grüne) durchbrochene Linie die Regressionsgerade für die Chemikalien mit polar-narkotischer Wirkung (grüne Dreiecke). R^2 steht für das jeweilige Bestimmtheitsmaß der beiden linearen Regressionen. Der violett gefüllte Kreis mit schwarzem Rand steht für die Substanz Natrium-Octanoat. Die roten Quadrate zeigen die spezifisch wirkenden, die roten Quadrate mit schwarzem Rand die reaktiven Chemikalien. Nähere Ausführungen zum Wirkmechanismus der Chemikalien (non-polar und polar narkotisch, reaktiv, spezifisch: vgl. Material & Methoden, Tab. 1, S. 29)

Phagozytoseinhibition von Belebtschlamm und Tetrahymena

Mit dem beinahe gleichen Chemikalien-Test-Set wurden in den beiden Diplomarbeiten von Ariane Kretlow [84] und Uwe Hammer [83] Phagozytosemessungen an dem Ciliaten *Tetrahymena pyriformis* durchgeführt. Der Vergleich der (Multispezies-) Belebtschlamm-Ergebnisse mit diesen Messungen an einer Einzelspezies ist in Abb. 38 dargestellt ($n = 22$).

Nur für die drei Substanzen Pentachlorphenol (Nr. 16), trans-4-Methyl- β -nitrostyrol (Nr. 18) und Chloramphenicol (Nr. 25) weichen die EC_{50} -Werte deutlich,

um mehr als das 30-fache voneinander ab (rote Dreiecke in Abb. 38). Für die Substanz trans-4-Methyl- β -nitrostyrol (Nr. 18) ist dabei anzumerken, dass mit dem Belebtschlammtest keine Hemmung bis zu einer Konzentration von 2,9 mg/L ermittelbar war. In der Grafik ist hier lediglich die höchste im Test eingesetzte Konzentration dargestellt, der tatsächliche EC_{50} -Wert liegt – angedeutet durch einen roten Pfeil nach rechts – höher. Im Falle der am stärksten abweichenden Substanz Chloramphenicol (Nr. 25) ist der zeitliche Verlauf der Wirkzunahme angedeutet. Nach einer Expositionszeit von 4 Stunden wirkt die Substanz auf die Phagozytoseaktivität des Belebtschlammes um das 3-fache stärker als auf die Partikelaufnahme von *Tetrahymena* (nicht gezeigt). Nach einer 6-stündigen Inkubation übertrifft die Wirkung im Belebtschlamm die des Einzelspezietests um bereits das 10-fache (offenes Dreieck in Abb. 38) und nach der testüblichen Expositionsdauer von 22 h steigt die Wirkung von Chloramphenicol im Belebtschlammtest gegenüber dem *Tetrahymena*-Test auf das 265-fache (gefülltes Dreieck).

Vergleichsweise gering sind dagegen die Abweichungen der EC_{50} -Werte für die restlichen 19 Substanzen. Maximal differieren die Werte der beiden Testsysteme hier um den Faktor 7. Im Mittel beträgt die Streuung (Quotient der EC_{50} -Werte) das 2,6-fache. Ohne die hier als 'outlier' gewerteten 3 Chemikalien (Nr. 16, 18 und 25) ergibt die lineare Regression zwischen den EC_{50} -Werten der beiden Phagozytosetests ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,885$ ($n = 19$). Aus den Parametern der linearen Gleichung und ihrer grafischen Darstellung (gepunktete Linie in Abb. 38) ist zu erkennen, dass die Regressionsgerade praktisch identisch mit der Winkelhalbierenden ist: die Steigung liegt bei beinahe eins (0,98), und die Gerade schneidet die Y-Achse bei fast null (-0,01). Die beiden Testsysteme – „Phagozytoseaktivität Belebtschlamm“ und „Phagozytoseaktivität *Tetrahymena*“, sind also eng korreliert und ihre mittlere Empfindlichkeit gegenüber dieser Auswahl von Schadstoffen weitgehend gleich.

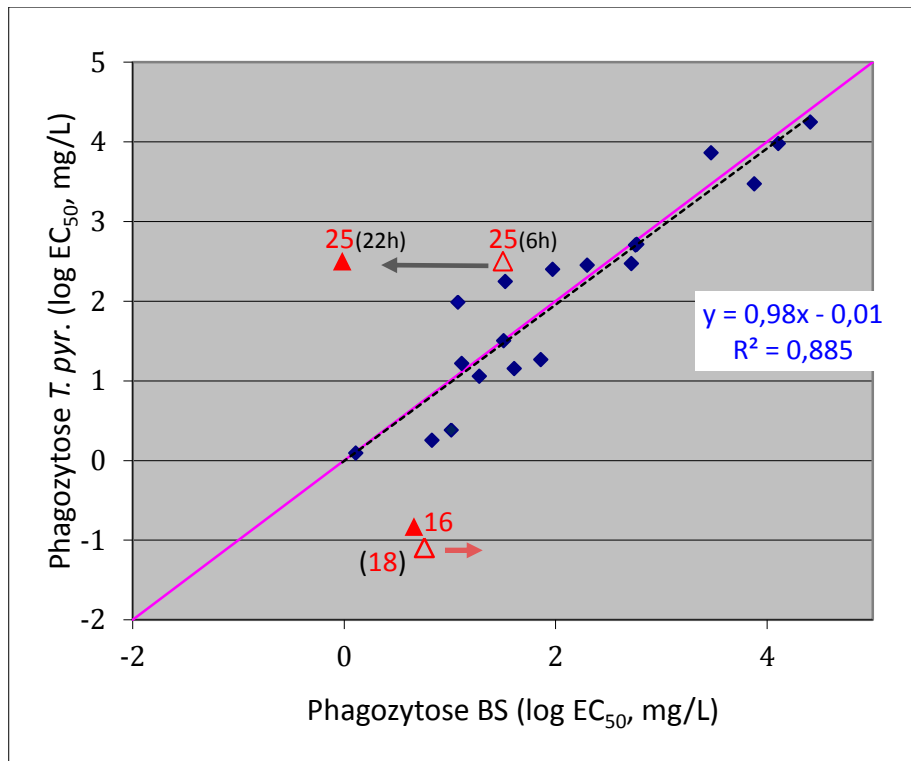


Abb. 38: Vergleich von 50% Effekten auf die Phagozytoseaktivität von Belebtschlamm und *Tetrahymena pyriformis*. In der Abbildung ist die Winkelhalbierende (zur Verdeutlichung gleicher Effekte) als durchgezogene Linie eingezeichnet. Die durchbrochene Linie gibt die lineare Regression für die als blaue Rauten dargestellten Punkte wieder. Die lineare Regression zwischen beiden Größen ist als durchbrochene Linie dargestellt. Angegeben sind zusätzlich die Parameter der linearen Regressionsgleichung sowie das Bestimmtheitsmaß (R^2). Von der Regression ausgenommen sind die rot gekennzeichneten Wertepaare (Substanz 16, 18 und 25). Für die Substanz Nr. 25 (Chloramphenicol) soll der Pfeil die zeitliche Wirkzunahme der Substanz verdeutlichen, im Falle der Chemikalie trans-4-Methyl- β -nitrostyrol (Nr. 18) deutet der Pfeil eine höhere Konzentration als dargestellt an (Näheres hierzu vgl. Text).

Teil 5 – Entwurf einer Testvorschrift

Protozoen Belebtschlammtest - Prüfung von Chemikalien

Testsystem

Im Protozoen-Belebtschlammtest wird Belebtschlamm verschiedenen Konzentrationen einer Prüfsubstanz ausgesetzt. Dabei wird die Phagozytose-hemmende Wirkung der Substanz über einen Zeitraum von 22 Stunden untersucht. Die Auswertung erfolgt mittels photometrischer Messung bei $\lambda = 440 \text{ nm}$.

Von der Prüfsubstanz werden Verdünnungsreihen mit Volvic Mineralwasser in 4 mL-Glasröhrchen, die mit sauerstoffdurchlässigen Septum-Verschläüssen versehen sind, hergestellt. Zu den Testansätzen wird Belebtschlamm und bakterielles Substrat hinzugefügt. Im Endansatz beträgt das Gesamtvolumen des Testansatzes 2 mL, die Konzentration des Belebtschlammes 1 g/L (Trockengewicht) und die des Substrates 0,4 g/L (Trockengewicht). Die Inkubation erfolgt bei 22°C unter ständigem Schütteln (250 U/min) und mit einer Neigung der Teströhrchen von 40° relativ zur Horizontalen.

Testdurchführung

Wenn die Wirkung auf die Phagozytoseaktivität von Belebtschlämmen annähernd bekannt ist, kann ein „DEFINITIVER TEST“ sofort durchgeführt werden. Sind allerdings keine toxikologischen Daten verfügbar, muss die Schädigung in einer 2-stufigen Herangehensweise ermittelt werden:

1. Schritt: Im VORVERSUCH wird der Wirkungsbereich der Chemikalie grob ermittelt.
2. Schritt: Im DEFINITIVEN TEST wird anhand feinerer Konzentrationsabstufungen die Wirkung mit 50% Effekt (EC_{50}) ermittelt.

Laborausstattung / Material

- Glasröhrchen (45 mm lang, Durchmesser von 15 mm, Gesamtvolumen von 4 mL²⁸) mit sauerstoffdurchlässigen Schraubverschlüssen
- Analysenwaage
- Volvic Mineralwasser, eventuell Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel
- Variable 2 mL- und μ L- Pipetten (10-100 μ L), Pipettenspitzen
- Halterung für die Teströhrchen, die eine Neigung der Gefäße von 40° relativ zur Horizontalen erlauben.
- (Kreis-)Schüttler mit Geschwindigkeiten bis mindestens 250 U/min.
- Digitalphotometer ($\lambda = 440$ nm) mit einem geeignetem Adapter für die Teströhrchen.

Ansetzen der Schadstofflösung

Im Falle gering und gut löslicher Substanzen wird eine Lösung mit der höchsten löslichen Konzentration der Chemikalie in Volvic® Mineralwasser hergestellt (jeweils frisch vor jedem Testlauf). Um Ungenauigkeiten beim Wägen (Feststoffe) und beim Pipettieren kleiner Volumina (Lösungen) zu vermeiden, sollte eine Grenze von 20 mg und ein Volumen von 40 μ L nicht unterschritten werden.

Generell sollte auf den Einsatz von organischen Lösungsmitteln verzichtet werden. Allerdings kann zum Lösen „sehr schwer löslicher“ und „unlöslicher“ Stoffe ein organisches Lösungsmittel notwendig sein. Hier hat sich Dimethylsulfoxid (DMSO) auf Grund seiner geringen Toxizität, seines guten Lösungsvermögens und seiner einfachen Handhabung bewährt. Die Konzentration an DMSO darf

²⁸ Anfänglich wurden Glasröhrchen mit einem größeren Volumen von 12 mL für den Test eingesetzt. Die hier angegebenen kleineren 4 mL-Röhrchen haben sich allerdings besonders bei der Messung der beiden flüchtigen Substanzen 1-Bromoctan und Diphenylether (vgl. Punkt „Messung von flüchtigen Stoffen“, S. 70) als vorteilhaft erwiesen. Hinzu kam, dass sich prinzipiell in beiden Röhrchen die gleichen Ergebnisse erzielen ließen, also die Verwendung der kleineren Röhrchenvariante mit keinerlei Nachteilen verbunden war. Es konnte ganz im Gegenteil durch kleinere Gefäße eine noch weitergehende Miniaturisierung der Testansätze erreicht werden. Auf Grund der hier klar überwiegenden Vorteile sind in der Testvorschrift ausschließlich die kleineren 4 mL-Teströhrchen für den Standardeinsatz vorgesehen.

0,2% (v/v) im Testansatz nicht übersteigen, d.h. das Lösungsmittel DMSO muss im Endansatz mindestens 500-fach verdünnt vorliegen.

Testvorgaben

- Organismen: 1 g/L Belebtschlamm (Trockengewicht)
- Substrat: 0,4 g/L Bakterien (Trockengewicht); wird als 50 x konzentrierte Lösung \cong 20 g/L, gelöst in H₂O, hinzugegeben
- Defaunieren: 200 mg/L Digitonin; wird als 50 x konzentrierte Lösung \cong 10 g/L, gelöst in H₂O²⁹, hinzugegeben

Bezeichnungen & Abkürzungen

- TG_{Schlamm}: Trockengewicht der nativen Belebtschlammprobe
- C0: Kontrolle (unbehandelt)
- C1...C5: höchste bis geringste Chemikalienkonzentration
- C0+: Kontrolle mit Digitonin (defaunierte Kontrolle)
- C1+...C5+: höchster bis geringster Chemikalienansatz mit Digitonin (defauniert)
- Vol_{BS}: Belebtschlammvolumen, das für die 2 mL-Probe benötigt wird, um eine Konzentration im Test von 1 g/L zu ergeben; Vol_{BS} hängt vom jeweiligen nativen Trockengewicht des Schlammes ab:

$$\text{Vol}_{\text{BS}} = 2\text{mL (Probe)} \cdot 1 \text{ (g/L)} : \text{TG}_{\text{Schlamm}} \text{ (g/L)}$$

- Vol_{Verdls.}: Volumen der Verdünnungslösung, Vol_{Verdls.} hängt vom Belebtschlammvolumen ab:

$$\text{Vol}_{\text{Verdls.}} = 2 \text{ mL (Probe)} - 40 \text{ }\mu\text{L (Substrat)} - \text{Vol}_{\text{BS}}$$

²⁹ Die konzentrierte Digitoninlösung bildet bei Raumtemperatur einen weißen Niederschlag. Vor der Zugabe muss Digitonin durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95-98°C (3-5 min) in Lösung gebracht werden. Digitonin bleibt anschließend auch nach dem Abkühlen über mehrere Stunden in Lösung.

Herstellen einer Verdünnungsreihe für den Vorversuch (1:10 Verdünnung)

Ausgehend von der höchsten Testkonzentration der Prüfsubstanz wird eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsschritte 1:10) in Volvic Mineralwasser hergestellt.

1. Im ersten Schritt wird die höchste Konzentration der Prüfsubstanz (C1) hergestellt.
2. Anschließend werden 7 Teströhrchen mit C0 (Duplikate) bis C5 und weitere 7 Teströhrchen mit C0+ (Duplikate) bis C5+ gekennzeichnet. C0 repräsentiert die Kontrollen und C1 bis C5 die jeweiligen Prüfsubstanz-Verdünnungsschritte. Das Pluszeichen zeigt die Zugabe von Digitonin (defaunierter Parallelansatz) an.
3. Nun wird das erforderliche Volumen an Belebtschlamm errechnet (Vol_{AS}), das benötigt wird, um im 2 mL-Endansatz eine Belebtschlammkonzentration von 1g/L (Trockengewicht) zu erhalten³⁰.
4. Das Volumen der Verdünnungslösung (Vol_{Dil}), d.h. das Volumen an Volvic Mineralwasser, das für die Verdünnungsreihe vorgelegt werden muss, ergibt sich aus der Differenz zwischen 1,96 mL und dem Belebtschlammvolumen Vol_{AS} ($Vol_{Dil} = 1,96 \text{ mL} - Vol_{AS}$).
5. Die Verdünnung der Prüfsubstanz erfolgt direkt in den Teströhrchen und für den Vorversuch in 10er Schritten³¹.

³⁰ angenommen der Belebtschlamm wurde im Klärwerk in einer Konzentration von 3,57 g/L (Trockengewicht) entnommen, dann ergibt sich eine Verdünnung von 1:3,57, um im 2 mL-Endansatz eine Belebtschlammkonzentration von 1 g/L zu erhalten. Damit müssen jeweils 0,56 mL (2 mL/3,57) des nativen Belebtschlammes in jedes Teströhrchen pipettiert werden.

³¹ um beim gleichen Beispiel zu bleiben, d.h. bei einem Belebtschlammvolumen (Vol_{BS}) von 0,56 mL, ergibt sich ein Volvic-Volumen ($Vol_{Verdilsg.}$) von 1,40 mL (2 mL Probenvolumen minus 0,04 mL Substrat = 1,96 mL; 1,96 mL minus 0,56 mL Belebtschlammvolumen = 1,40 mL = Volumen der Verdünnungslösung Volvic Wasser). Für die Verdünnungsreihe in 10er Schritten wird in die mit C1 gekennzeichneten Röhrchen jeweils 1,556 mL der höchsten Testkonzentration C1 pipettiert (1,40 mL plus 0,156 mL = 1,556 mL bzw. 9 Teile $\hat{=}$ 1,4 mL plus 1 Teil $\hat{=}$ 0,156 mL). Die übrigen Röhrchen (C0 und C2 bis C5) erhalten jeweils 1,40 mL Volvic Mineralwasser (=Verdünnungsmedium). Aus dem Röhrchen C1 werden nun 0,156 mL (1 Teil) entnommen und in das bereits mit 1,40 mL Volvic befüllte (9 Teile) und mit C2 gekennzeichnete Teströhrchen überführt. Nach Durchmischen werden aus dem Röhrchen C2 wiederum 0,156 mL entnommen und in das nächste

Tabelle: Beispiel einer 10-fach Verdünnungsreihe

Testgefäß	Konzentration der Testchemikalie (mg/L)
C1	100
C2	10
C3	1
C4	0,1
C5	0,01

→...weiter bei "Beimpfen der Teströhrchen".

Herstellen einer Verdünnungsreihe für einen DEFINITIVEN TEST

Die Verdünnungsreihe orientiert sich an den Ergebnissen des VORVERSUCHES. Dabei sollte die kleinste Konzentration mit einem 80-100%igen Effekt und die höchste Konzentration mit einem Effekt von weniger als 10% die Eckpunkte der geometrischen Konzentrationsreihe bilden. Dieser Bereich kann eine Größenordnung umfassen (Fall A) oder innerhalb von zwei Größenordnung liegen (Fall B). In den neuen Verdünnungsreihen werden die Konzentrationsstufen wieder mit C1 bis C5 gekennzeichnet.

A. C1-C5 umfassen eine Größenordnung (→ 1:2 Verdünnung)

Ausgehend von der geringsten Konzentration, die im VORVERSUCH 80-100% Effekt hervorrief, wird eine geometrische Verdünnungsreihe in 2er Schritten hergestellt.

1. Im ersten Schritt wird die höchste Konzentration der Prüfsubstanz (C1) hergestellt.

Röhrchen C3 überführt. Dieser Verdünnungsvorgang wird für alle Verdünnungsstufen fortgesetzt und in allen Parallelansätzen durchgeführt.

2. Anschließend werden 7 Teströhrchen mit C0 (Duplikate) bis C5 und weitere 7 Teströhrchen mit C0+ (Duplikate) bis C5+ gekennzeichnet. C0 repräsentiert die Kontrollen und C1 bis C5 die jeweiligen Prüfsubstanz-Verdünnungsschritte. Das Pluszeichen zeigt die Zugabe von Digitonin (defaunierter Parallelansatz) an.
3. Nun wird das benötigte Volumen an Belebtschlamm errechnet (Vol_{AS}), das benötigt wird, um im 2 mL-Endansatz eine Belebtschlammkonzentration von 1g/L (Trockengewicht) zu erhalten³².
4. Das Volumen der Verdünnungslösung (Vol_{Dil}), d.h. das Volumen an Volvic Mineralwasser, das für die Verdünnungsreihe vorgelegt werden muss, ergibt sich aus der Differenz zwischen 1,96 mL und dem Belebtschlammvolumen Vol_{AS} ($Vol_{Dil} = 1,96 \text{ mL} - Vol_{AS}$).
5. Die Verdünnung der Prüfsubstanz für den DEFINITIVEN TEST (Fall A) erfolgt direkt in den Teströhrchen und in 2er Schritten³³.

→...weiter bei "BEIMPFEN DER TESTRÖHRCHEN"

³² angenommen der Belebtschlamm wurde im Klärwerk in einer Konzentration von 3,57 g/L (Trockengewicht) entnommen, dann ergibt sich eine Verdünnung von 1:3,57, um im 2 mL-Endansatz eine Belebtschlammkonzentration von 1 g/L zu erhalten. Damit müssen jeweils 0,56 mL ($2 \text{ mL}/3,57$) des nativen Belebtschlammes in jedes Teströhrchen pipettiert werden.

³³ um beim gleichen Beispiel zu bleiben, d.h. bei einem Belebtschlammvolumen (Vol_{BS}) von 0,56 mL, ergibt sich ein Volvic-Volumen ($Vol_{Verdlsg.}$) von 1,40 mL ($2 \text{ mL Probenvolumen minus } 0,04 \text{ mL Substrat minus } 0,56 \text{ mL Belebtschlammvolumen} = \text{Volumen der Verdünnungslösung Volvic Wasser}$). Für die Verdünnungsreihe in 2er Schritten wird in die mit C1 gekennzeichneten Röhrchen jeweils 2,80 mL der höchsten Testkonzentration C1 pipettiert ($1,40 \text{ mL plus } 1,40 \text{ mL} = 2,80 \text{ mL bzw. } 1 \text{ Teil plus } 1 \text{ Teil}$, was einer 1:2 Verdünnung entspricht). Die übrigen Röhrchen (C0 und C2 bis C5) erhalten jeweils 1,40 mL Volvic Mineralwasser (=Verdünnungsmedium). Aus dem Röhrchen C1 werden nun 1,40 mL (1 Teil) entnommen und in das bereits mit 1,40 mL Volvic befüllte (1 Teil) und mit C2 gekennzeichnete Teströhrchen überführt. Nach Durchmischen werden aus dem Röhrchen C2 wiederum 1,40 mL entnommen und in das nächste Röhrchen C3 überführt. Dieser Verdünnungsvorgang wird für alle Verdünnungsstufen fortgesetzt und in allen Parallelansätzen durchgeführt.

B. C1-C5 umfassen zwei Größenordnung (→ 1:3 Verdünnung)

Ausgehend von der geringsten Konzentration, die im VORVERSUCH 80-100% Effekt hervorrief, wird eine geometrische Verdünnungsreihe in 3er Schritten hergestellt (vgl. hierzu auch Abb. 39, S. 88).

1. Im ersten Schritt wird die höchste Konzentration der Prüfsubstanz (C1) hergestellt.
2. Anschließend werden 7 Teströhrchen mit C0 (Duplikate) bis C5 und weitere 7 Teströhrchen mit C0+ (Duplikate) bis C5+ gekennzeichnet. C0 repräsentiert die Kontrollen und C1 bis C5 die jeweiligen Prüfsubstanz-Verdünnungsschritte. Das Pluszeichen zeigt die Zugabe von Digitonin (defaunierter Parallelansatz) an.
3. Nun wird das benötigte Volumen an Belebtschlamm errechnet (Vol_{AS}), das benötigt wird, um im 2 mL-Endansatz eine Belebtschlammkonzentration von 1g/L (Trockengewicht) zu erhalten³⁴.
4. Das Volumen der Verdünnungslösung (Vol_{Dil}), d.h. das Volumen an Volvic Mineralwasser, das für die Verdünnungsreihe vorgelegt werden muss, ergibt sich aus der Differenz zwischen 1,96 mL und dem Belebtschlammvolumen Vol_{AS} ($Vol_{Dil} = 1,96 \text{ mL} - Vol_{AS}$).
5. Die Verdünnung der Prüfsubstanz für den DEFINITIVEN TEST (Fall B) erfolgt direkt in den Teströhrchen und in 3er Schritten³⁵.

→...weiter bei "Beimpfen der Teströhrchen"

³⁴ vgl. Fußnote 32.

³⁵ gleiche Ausgangswerte wie in Fußnote 33. Für die Verdünnungsreihe in 3er Schritten wird in die mit C1 gekennzeichneten Röhrchen jeweils 2,10 mL der höchsten Testkonzentration C1 pipettiert (1,40 mL plus 0,70 mL = 2,10 mL bzw. 2 Teile plus 1 Teil, was einer 1:3 Verdünnung entspricht). Die übrigen Röhrchen (C0 und C2 bis C5) erhalten jeweils 1,40 mL Volvic Mineralwasser (=Verdünnungsmedium). Aus dem Röhrchen C1 werden nun 0,70 mL (1 Teil) entnommen und in das bereits mit 1,40 mL Volvic befüllte (2 Teile) und mit C2 gekennzeichnete Teströhrchen überführt. Nach Durchmischen werden aus dem Röhrchen C2 wiederum 0,70 mL entnommen und in das nächste Röhrchen C3 überführt. Dieser Verdünnungsvorgang wird für alle Verdünnungsstufen fortgesetzt und in allen Parallelansätzen durchgeführt.

Beimpfen der Teströhrchen (Zugabe von Belebtschlamm)

1. Aus dem Belebtschlammbehälter, der die native Probe aus dem Klärwerk enthält³⁶, wird ein ausreichendes Aliquot entnommen (die jeweilige Menge richtet sich nach der Anzahl der Testansätze und der Konzentration des nativen Belebtschlammes). Dabei ist es wichtig, den Behälter kurz vor der Entnahme mehrmals sanft Über-Kopf zu drehen, um eine gleichmäßige Durchmischung des Schlammes zu gewährleisten. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, etwa 50-100 mL Schlamm in ein 1L-Becherglas zu überführen. In einem Behälter dieser Größe kann diese Schlammmenge gut durch ständiges Schwenken durchmischt und der Schlamm leicht zum Beimpfen der Teströhrchen entnommen werden.
2. Aus dem Becherglas wird das jeweilige Belebtschlammvolumen (Vol_{BS}), das für eine Endkonzentration von 1 g/L im Test benötigt wird, mit einer Automatikpipette entnommen und in die Teströhrchen überführt (vgl. Vol_{BS} , Punkt „Bezeichnungen & Abkürzungen“, S.78). Um hierbei die Flocken des Belebtschlammes zu schonen, wird die Pipettenspitze um etwa 5 mm gekürzt, so dass die Öffnung der Spitze auf etwa 3 mm erweitert wird.

→...weiter bei "Zugabe des Substrates"

³⁶ Für Testzwecke kann der native Belebtschlamm nach Probennahme über eine Woche gekühlt (4-6°C) aufbewahrt werden.

Zugabe des Substrates

1. gefriergetrocknete Bakterien werden in einer Endkonzentration von 20 g/L (Trockengewicht) mit H₂O gelöst.
2. 40 µL dieser Bakteriensuspension werden in jedes Teströhrchen pipettiert.
3. Die Hälfte der Teströhrchen, die kein Digitonin erhalten soll, wird mit den Septum-Schraubkappen verschlossen (C0-Kontrollen und Chemikalienverdünnungen C1 - C5).

Zugabe von Digitonin

1. Zur zweiten Hälfte der Teströhrchen wird jeweils 40 µL Digitonin-Lösung (Stammlösung 10 g/L in H₂O) hinzugegeben (C0+ -Kontrollen und Chemikalienverdünnungen C1+ bis C5+).
2. Auch die zweite Hälfte der Digitonin-behandelten Teströhrchen wird mit den Septum-Schraubkappen verschlossen.

→...weiter bei "optische Dichte-Messung"

Messung der optischen Dichte (OD)

1. Nachdem die Testgefäße kräftig gemischt³⁷ wurden (Vortex/Kreisschüttler, höchste Stufe, ca. 3 sec), werden sie für einen Zeitraum von 30 min zum Sedimentieren des Schlammes stehen gelassen.
2. Es erfolgt ein Nullabgleich des Photometers mit Volvic Mineralwasser bei einer Wellenlänge von 440 nm.
3. Nach 30-minütiger Sedimentation des Schlammes wird die optische Dichte ($\lambda = 440 \text{ nm}$) des Überstandes in den Teströhrchen bestimmt.

³⁷ Kräftiges Schütteln für ca. 3 sec in Kreisbewegungen auf einem „Vortex“ ist einem kräftigen Schütteln zwischen den Fingern vorzuziehen, da letztere Mischmethode besonders bei Digitonin-behandelten Proben zu einer deutlichen Schaumbildung führen kann, die sich störend auf die anschließende OD-Messung auswirkt.

Bem.: Der Lichtstrahl des Photometers muss durch den Überstand oberhalb des sedimentierten Belebtschlammes hindurchtreten!

Außerdem ist darauf zu achten, dass die Testgefäße vorsichtig in das Photometer überführt werden, damit der sedimentierte Schlamm nicht aufgewirbelt wird und die OD-Messung stört!

4. Die Messdaten werden auf dem Protokoll als OD-Werte zum Zeitpunkt T1 festhalten.
5. Anschließend werden alle Testansätze über einen Zeitraum von 22 Stunden bei 22°C und 250 U/min geschüttelt. Hierbei ist auf die Neigung der Röhrchen von 40° relativ zur Horizontalen zu achten.
6. Nach der 22-stündigen Inkubation (Zeitpunkt T2) wird erneut die optische Dichte (440 nm) der Testansätze ermittelt. Hierzu erfolgt wiederum ein Nullabgleich im Photometer gegen Volvic Mineralwasser, die Ansätze werden auf dem Vortex kräftig durchmischt, die Röhrchen für 30 Minuten zum Absetzen des Schlammes stehen gelassen und zur Vermessung vorsichtig in den Photometerschacht überführt.
7. Erneut werden die Messdaten als OD-Werte zum Zeitpunkt T2 protokolliert.

Validitätskriterien

Die Zulässigkeit eines Testergebnisses sollte an folgende Anforderungen (Validitätskriterien) geknüpft sein:

Kontrollen: Die Abnahme der optischen Dichte (unbehandelter) Kontrollen infolge der phagozytotischen Aktivität (ΔOD_{korrr}) beträgt innerhalb des 22-stündigen Testzeitraumes wenigstens 30%, bezogen auf die Ausgangs- (Start-)OD.

Defaunierte Kontrollen: die (unspezifische) OD-Abnahme defaunierter (Digitonin-behandelter) Kontrollen (C0+) übersteigt nicht 25%, bezogen auf die Ausgangs- (Start-)OD.

Chemikalien-behandelte, defaunierte Proben: In manchen Fällen kann eine Zunahme der optischen Dichte nach 22-stündiger Chemikalienexposition, besonders bei hohen Konzentrationen, beobachtet werden. Defaunierte Proben mit Testchemikalie, d.h. Testansätze, die sowohl die Prüfsubstanz als auch Digitonin enthalten, werden bei der Auswertung der Testergebnisse, d.h. bei der Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven, nicht mit berücksichtigt, wenn dieser OD-Anstieg ($OD_{t2}-OD_{t1}$) 5% (bezogen auf die Ausgangs-/Start-OD) übersteigt.

Streuung der Kontrollwerte: Die Abweichung der (unkorrigierten) ΔOD -Werte der Kontrollen (C0) voneinander sollte weniger als 25% betragen.

Auswertung der Testergebnisse

- Für jeden Testansatz wird die **Differenz (ΔOD)** zwischen der anfänglichen optischen Dichte (OD_{440} zum Zeitpunkt T1) und der zweiten OD-Messung nach der 22-stündigen Inkubation (OD_{440} zum Zeitpunkt T2) gebildet:

$$\Delta OD = OD(T1) - OD(T2)$$

- Von den beiden ΔOD -Werten der Kontrollen (C0 und C0+ mit Digitonin) werden jeweils Mittelwerte berechnet: Mittel [$\Delta OD(C0)$]; Mittel [$\Delta OD(C0+)$].
- Von den ΔOD -Werten ohne Digitonin werden die ΔOD -Werte der mit Digitonin behandelten Proben abgezogen (Berechnung **korrigierte ΔOD**):

$$\Delta OD_{\text{korr}} (\text{Kontrolle}) = \text{Mittel} [\Delta OD(C0)] - \text{Mittel} [\Delta OD(C0+)]$$

$$\Delta OD_{\text{korr}} (C1) = \Delta OD(C1) - \Delta OD(C1+)$$

$$\Delta OD_{\text{korr}} (C2) = \Delta OD(C2) - \Delta OD(C2+)$$

$$\cdot \quad \cdot \quad \cdot$$

$$\cdot \quad \cdot \quad \cdot$$

$$\Delta OD_{\text{korr}} (C5) = \Delta OD(C5) - \Delta OD(C5+)$$

- Die korrigierten ΔOD -Werte [$\Delta OD_{\text{korr}}(C1...C5)$] werden ins Verhältnis zum korrigierten ΔOD -Wert der Kontrolle [$(\Delta OD_{\text{korr}}(\text{Kontrolle}))$] gesetzt, um die

Hemmwirkung der einzelnen Konzentrationen im Verhältnis zur unbehandelten Probe zu bestimmen.

$$\Delta OD_{\text{korr}}(\text{C1}) : \Delta OD_{\text{korr}}(\text{Kontrolle}) * 100 \triangleq \% \text{Restaktivität in Probe C1}$$

$$\Delta OD_{\text{korr}}(\text{C2}) : \Delta OD_{\text{korr}}(\text{Kontrolle}) * 100 \triangleq \% \text{Restaktivität in Probe C2}$$

...

...

$$\Delta OD_{\text{korr}}(\text{C5}) : \Delta OD_{\text{korr}}(\text{Kontrolle}) * 100 \triangleq \% \text{Restaktivität in Probe C5}$$

...die prozentuale Hemmung ergibt sich aus:

$$\% \text{Hemmung}(\text{C1}) = 100\% - \% \text{Restaktivität}(\text{C1})$$

$$\% \text{Hemmung}(\text{C2}) = 100\% - \% \text{Restaktivität}(\text{C2})$$

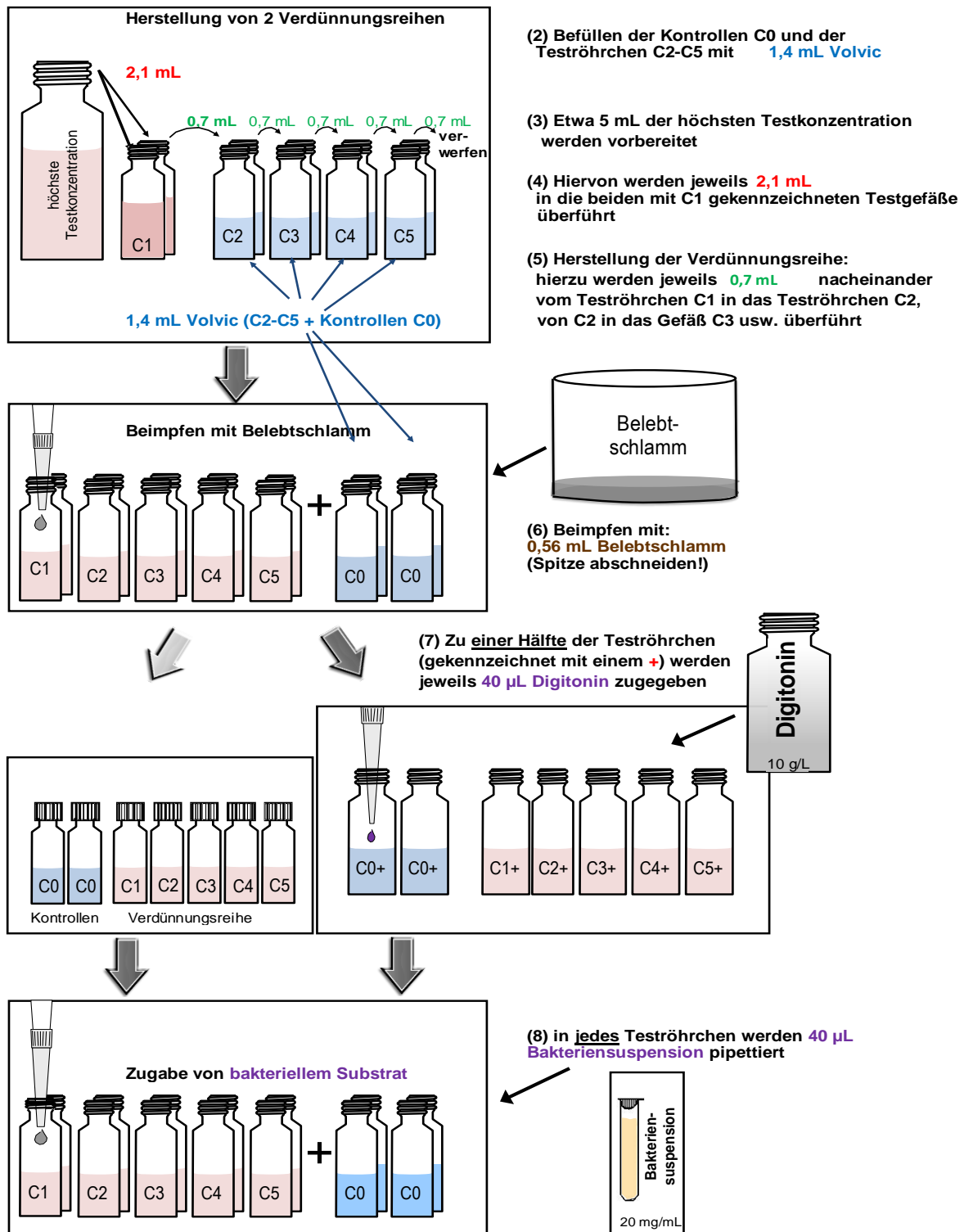
usw. ...

- Die Effekte werden zusätzlich zum Messprotokoll graphisch als Auftragung der prozentualen Hemmwerte gegenüber den logarithmierten₁₀ Konzentrationen der Proben dargestellt. Als die Toxizität der Prüfsubstanz kennzeichnende Kenngröße wird die Konzentration mit einem **50%igen Hemmeffekt (EC₅₀)** mit Hilfe statistischer Verfahren³⁸ ermittelt.

³⁸ gängige statistische Verfahren verwenden hier verschiedene sigmoide (symmetrische und nicht-symmetrische) Funktionen, die mittels nichtlinearer Regression an die Messdatenpaare (Kurvenanpassung) angepasst werden [261].

Probennahme am:

(1) Vorbereitung von 14 Testgefäßen pro Prüfsubstanz: 2 Kontrollen und 5 Verdünnungsstufen ohne sowie 2 Kontrollen und 5 Verdünnungsstufen mit Digitonin



...weitere Schritte:

- 1. Messung der OD_{440} (Zeitpunkt t1)
→ 22 h-Inkubation der Proben auf dem Schüttler (250 U/min, 22°C)
- 2. Messung der OD_{440} (Zeitpunkt t2)
- Auswertung der Ergebnisse (OD-Veränderung t1 und t2)

Abb. 39: Pipettier-Schema „Testvorbereitung“, beispielhaft anhand der im Text genannten Zahlen.

DISKUSSION

Teil 1 Erfassung der Phagozytoseaktivität

In der überwiegenden Literatur werden eindeutig die Protozoen für den Fraß von suspendiert vorliegenden Bakterien im Belebtschlamm verantwortlich gemacht [114] [115]. Um Chemikalieneffekte auf die Protozoenpopulationen im Belebtschlamm sichtbar zu machen, erschien es daher naheliegend, die Phagozytoseaktivität als Maß für deren Integrität heranzuziehen. Es existierte allerdings weder eine etablierte Methode, um Protozoen selektiv im Belebtschlamm zu hemmen, noch gab es ein Verfahren, ihre für sie typische Fraßaktivität in diesem komplexen Milieu zu erfassen. Unklar war auch, wie die den Protozoen zugeschriebene Enttrübung im Labor für einen Ökotoxizitätstest von wenigen Stunden Dauer mit einfachen Mitteln nachgestellt werden kann und welche weiteren biotischen sowie abiotischen Faktoren bei der Abnahme bakterieller Suspensagehalte von Bedeutung sind. Im Fokus der ersten Arbeitsschritte stand daher die Entwicklung einer Methodik zur selektiven Hemmung von Protozoen, um deren Einfluss gezielt ein- bzw. ausschalten zu können.

Selektive Defaunierung

Bei der Auswahl eines geeigneten Hemmstoffes wurden folgende drei Kriterien als wesentlich angesehen: (1) Der Hemmstoff muss spezifisch wirken, d.h. ausschließlich die Phagozytoseaktivität inhibieren. Wechselwirkungen mit Nicht-Zielorganismen bzw. weiteren trophischen und funktionalen Komponenten des mikrobiellen Netzes „Belebtschlamm“ sind (weitestgehend) auszuschließen. (2) Der Hemmstoff muss alle Organismen, die für die Phagozytoseaktivität im Belebtschlamm verantwortlich sind, in gleicher Weise und in ähnlichen Konzentrationen erfassen. (3) Seine Wirkung muss schnell eintreten, d.h. die Zeit bis zur Entfaltung des vollständigen Hemmeffektes muss vernachlässigbar im Vergleich zum Testzeitraum sein.

Cycloheximid gilt als starker Inhibitor von Eukaryoten [116]. Die Substanz hemmt die Proteinsynthese höherer Zellen [117] und wird allgemein in Bakterienmedien

zur Unterdrückung eukaryotischer „Kontaminanten“ [118] eingesetzt. Auch in Arbeiten über Protozoen finden sich Anwendungen dieses spezifischen Hemmstoffes (z.B. [106] [107] [108] [119] [120] [121] [122] [123] [124]). Es lag also nahe, Cycloheximid auch im Belebtschlammtest einzusetzen. Allerdings konnte selbst bei sehr hoher Konzentration von 8 g/L Cycloheximid kurzfristig, d.h. innerhalb von wenigen Minuten bis wenigen Stunden, keine völlige Unterdrückung der Phagozytose im Belebtschlamm erreicht werden. Dieses Resultat ist nicht überraschend, da sich auch in der Literatur große Unterschiede in der Cycloheximidwirkung gegenüber einzelnen Protozoenarten finden lassen [106] [122] [123]. Cycloheximid wirkt aber nicht nur auf verschiedene Spezies unterschiedlich, seine Wirkung variiert auch, abhängig vom Stadium des Zellzyklus, innerhalb einer Spezies [123] und stark zeitabhängig [121] [122]. Eine erfolgreiche Hemmung der Protozoen durch Cycloheximid wird deshalb überwiegend nur in Kombination mit weiteren Inhibitoren [106] [108] [120] oder nach Einwirkung über lange Zeiträume von mehreren Tagen bis Wochen erreicht [106] [107]. Die Phagozytose scheint dabei von Cycloheximid besonders wenig betroffen zu sein. So zeigen Untersuchungen von Nicolau und Mota [125] eine im Vergleich zur Wachstumshemmung um mehr als drei Zehnerpotenzen schwächere Wirkung von Cycloheximid auf die Fraßaktivität des Protozoen *Tetrahymena*.

Wenig befriedigend waren auch Versuche, die Protozoen selektiv mittels mechanischer (Ultraschall, starke Scherkräfte) und thermischer Verfahren (Erhitzen der Proben bis 50°C über wenige Minuten) im Belebtschlamm zu hemmen. Mit thermischen und mechanischen Methoden konnten Curds et al. in den späten 1960ern [57] ihren grundsätzlichen Nachweis der Bedeutung von Protozoen für die Abwasserreinigung bzw. für die Klärung des Abwassers führen. Beide Herangehensweisen verursachten aber immer auch eine den Versuchsablauf störende Trübung, was auf Veränderungen der Flockenstruktur hinweist und diese Methodik für die hier verfolgten Ziele ungeeignet erscheinen ließ.

Erst der Einsatz der oberflächenaktiven [126] Chemikalie Digitonin führte zu befriedigenden Ergebnissen. Oberflächenaktive Substanzen wie „Alkanate 3SL3®“ und „Synperonic NP9®“ wurden auch schon von Dohme et al. [127] erfolgreich zur selektiven Hemmung von Rumen-Ciliaten eingesetzt. Im Falle von Digitonin han-

delt es sich aber nicht nur um eine einfache Detergenswirkung, das Besondere an dem Hemmstoff ist, dass seine oberflächenaktive Wirkung auf Eukaryoten beschränkt ist [128]. Digitonin bindet an Sterole in der Plasmamembran [129] [130], die fast ausschließlich bei Eukaryoten vorkommen [131] [132], Bakterien dagegen haben keine oder kaum Sterole in ihren Membranen [133] und bleiben damit von der Digitoninwirkung verschont.

Mit Digitonin werden alle Eukaryoten und damit auch alle phagozytotisch aktiven Organismen nicht nur selektiv gehemmt, sondern durch Lysis vollständig aus der Belebtschlammprobe entfernt. Und dies erfolgt schnell, d.h. innerhalb der ersten halben Stunde nach Digitonin-Applikation. Die bakteriellen Nicht-Zielorganismen werden hierbei offensichtlich nicht substanziiell geschädigt. Dies wird zumindest durch das unveränderte mikroskopische Bild und das gleiche makroskopische Verhalten der Belebtschlammflocken nahegelegt, und dies bestätigen auch Messungen des O₂-Verbrauchs, der allgemein zum Nachweis der Integrität der im Belebtschlamm dominanten heterotrophen Bakterien [134] [135] [136] herangezogen wird [137].

Trübungsabnahme / Reduktion bakterieller Suspensionsgehalte

Die Protozoen in Kläranlagen sind vorrangig darauf spezialisiert, einzeln und in kleinen Clustern suspendierte Bakterien und Partikel mit Größen zwischen 0,3 und 5 µm auszufiltrieren [28] [29]. Damit „klären“ sie das (trübe) Abwasser und reduzieren den organischen Gehalt im Anlagenablauf [39] [138].

Zur Aufrechterhaltung typischer Protozoenpopulationen in Belebtschlämmen sind nach Angaben von Macek [73] etwa 2×10^7 Bakterien pro mL und Stunde erforderlich. Als maximale Aufnahme rate wurde in der vorliegenden Arbeit ein gut 2- bis 5-fach höherer Wert zwischen $5-11 \times 10^7$ Bakterien pro mL und Stunde für durchschnittlichen Belebtschlamm mit einem Gehalt von 2-4 g/L und einer Temperatur von 20°C ermittelt. Dem stehen etwa $2-6 \times 10^9$ Bakterien/mL [69] [139] [140] [141] [142] [143] [144] gegenüber, die in den Flocken bei einem mittleren Schlammgehalt von 2-4 g/L [145] [146] organisiert sind. Ein mehr oder weniger großer Teil dieser Mikrokolonien verlässt allerdings kontinuierlich die Flocken – nach Baty et al. [56] können so alle Bakterien des Biofilms innerhalb von nur 8 Tagen ausgetauscht

werden – und liegt dann als Einzelzelle oder kleiner Zellverband in Suspension vor. Die Mobilisierung dieses gesamten „Bakterienpools“ durch sog. ‘detachment’ [50] [51] [52] [53] [54] [55] würde ausreichen, um die Protozoen für etwa 4-12 Tage am Leben zu erhalten. Nachdem sich der Schlamm in dieser Zeitspanne in konventionellen Anlagen etwa verdoppelt [147] [148] [149], würde diese Flockenbakterien-Nahrungsquelle für die Protozoen auch nicht versiegen.

Als Substrat und zugleich Ursache für den in Abwesenheit von Protozoen trüben Anlagenablauf [57] [64] [40] kommen aber noch die mit dem Abwasser in die Anlage gespülten, suspendierten Bakterien in Frage. Immerhin machen heterotrophe Bakterien zwischen 7 und 25% der Zulauf-CSB-Fracht aus [71]. Nach Foladori et al. [69] gelangen so etwa $1,5 \times 10^8$ Bakterien/mL mit dem Abwasser in das Belebungsbecken. Hier bleiben sie für etwa 3-8 Stunden [150] [72]. Dies führt zu einer bakteriellen Nahrungsquelle durch den Zufluss von etwa $2-5 \times 10^7$ Bakterien pro mL und Stunde. Dies ist etwas mehr als (minimal) nötig ist, den ‘standing crop’ (Bestand) der Protozoenpopulationen zu halten [73] und – wie eigene Messungen zeigen – etwas weniger als Protozoen (maximal) in der Lage sind aufzunehmen.

Anhand der vorliegenden Literatur ist nicht zu entscheiden, welcher Quelle - Abwasser oder Belebtschlammflocke - die entscheidende Bedeutung bei der Versorgung der Protozoen mit Bakterien zukommt. In beiden Fällen würden die eingespülten oder theoretisch durch ‘detachment’ freigesetzten Bakterienghalte für ein Überleben der Protozoen im Belebtschlamm ausreichen. In jedem Fall wird aber durch die Phagozytoseleistung verhindert, dass trübes Wasser mit hohen Bakterientitern die Kläranlage verlässt.

Unspezifische Bindung von E. coli

Bakterien adsorbieren leicht an Schlammflocken [151] [152]. Dies reduziert die Suspensionsdichte und verfälscht die Fraßleistung. Ein unspezifisches Binden scheint in engem Zusammenhang mit der Beobachtung zu stehen, dass abhängig von der Hydrophobizität ihrer Zelloberfläche für die 4 untersuchten *E.coli*-Stämme - nach Zugabe zum Belebtschlamm - eine Abnahme der optischen Dichte zu beobachten war. Je hydrophober der jeweilige Stamm, desto stärker die Abnahme über den 22-stündigen Testzeitraum. Suspendiert im Belebtschlammüberstand,

zeigten die Bakterien diese Abnahme nicht, erst in Anwesenheit von Schlammflocken verschwand ein Teil der Bakterien aus der Suspension. In der Literatur werden für dieses mehrfach beobachtete Verhalten [151] [152] hydrophobe Domänen der extrazellulären polymeren Substanz (EPS) der Belebtschlammflocke verantwortlich gemacht [151] [153], die mit der hydrophoben Zelloberfläche in Wechselwirkung treten und die Bakterien an die Schlammflocken binden.

Phagozytosemessung

Unter Einwirkung von Digitonin lysieren die Protozoen und alle weiteren Eukaryoten des Belebtschlammes (vgl. „Selektive Defaunierung“, S. 89 ff.). Doch selbst ohne Fraß nimmt der Suspensionsgehalt von *E.coli* in den Proben leicht ab. Auf Grund der engen Korrelation zwischen der Hydrophobizität der Zelloberflächen von verschiedenen Bakterienstämmen und der Stärke dieser „zusätzlichen“ Trübungsabnahme, die nicht in Zusammenhang mit Restaktivitäten von Eukaryoten stehen konnte, wurde ein unspezifisches Bindungsverhalten des bakteriellen Substrates unterstellt (vgl. „Unspezifische Bindung von *E. coli*“, S. 92). Nicht ganz auszuschließen waren aber auch Effekte, die mit der Chemikalie Digitonin selbst oder mit Digitonin-verursachten Lysisprodukten zusammenhängen. Zur Verifizierung wurde Cytochalasin B eingesetzt, das bei Protozoen als spezifischer Hemmstoff der Phagozytoseaktivität gilt (z.B. [154] [155] [156] [157]). Mit Hilfe dieser Substanz konnte ein identisches Wirkungsmuster wie im Falle der Substanz Digitonin nachgewiesen werden. Trotz unterdrückter Phagozytose blieb auch hier eine Reduktion des bakteriellen Titers erhalten, was das tatsächliche Vorliegen unspezifischer Prozesse der Adsorption eines Teils der *E.coli*-Suspension an die Flocken des Schlammes unterstreicht.

Mit Digitonin als Positivkontrolle, in der alle phagozytotischen Aktivitäten vollständig unterdrückt werden, sowie mit der unbehandelten Kontrolle als Maß für die Fraßaktivität und die unspezifische Adsorption des bakteriellen Substrates, konnte so für jeden Testlauf als Differenz von Kontrolle und Positivkontrolle der Anteil der Phagozytose ermittelt werden. Von Digitonin scheinen dabei – wie die Messungen mit Cytochalasin B bestätigen - keine Auswirkungen auf die bakterielle Trübung und damit auf die optische Dichtemessung auszugehen. Mit der in jedem Testlauf

vorgesehenen (Digitonin-) Positivkontrolle lassen sich Schwankungen der physikalisch-chemischen Schlammeigenschaften und ihre Auswirkungen auf das Bindungsverhalten der zudotierten Bakterien erfassen und korrigieren. Als Substrat sind damit viele Bakterienstämme denkbar. Wichtig sind hierbei – das war auch für die Auswahl des in dieser Arbeit überwiegend eingesetzten *E.coli*-Stammes ATCC9637 entscheidend - besonders die Kriterien eines geringen Bindungsverhaltens, einer guten Phagozytierbarkeit, einer kommerziellen Verfügbarkeit, eines leichten ‘Handlings’ (z.B. Löslichkeit, Wägbarkeit) sowie einer gesundheitlichen Unbedenklichkeit des Bakterienstammes.

Ermittlung von Konzentrations-Wirkungskurven

Durch das Mitführen einer Digitonin(Positiv-)kontrolle für die unbehandelte Kontrolle sowie für jede Testkonzentration einer Prüfsubstanz kann der ausschließlich auf die Phagozytose entfallende Anteil der Trübungsabnahme ermittelt werden. Mit Hilfe der beiden Größen unbehandelte Kontrolle und Positivkontrolle ist außerdem der Rahmen mit 100% (unbehandelt) und 0% Aktivität (Digitoninkontrolle) bzw. 0% und 100% Hemmung vorgegeben, um prozentuale Hemmungen für die einzelnen Testkonzentrationen angeben zu können. Die Gegenüberstellung dieser Werte, von biologischer Wirkung und einwirkender Chemikalienkonzentration, erlaubt so auch die Erstellung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen, die eine Charakterisierung der Toxizität der Testsubstanz erlauben.

Hauptakteure der Phagozytose

Protozoen stellen in Belebtschlammanlagen im Allgemeinen den größten Anteil an der eukaryotischen Biomasse [9] [158]. In Relation zum gesamten Feststoffgehalt (Trockengewicht) wird ihr Anteil mit 5% angegeben [38] [159]. Das Bild der Belebtschlamm-biozönose wird aber auch durch Vertreter höherer, vielzelliger Eukaryoten geprägt. Neben Nematoden und seltener Oligochäten treten zahlenmäßig besonders Rotatorien in den Vordergrund [160] [161] [162]. Rotatorien könnten dabei in Nahrungskonkurrenz mit Protozoen treten. Ähnlich wie bei Protozoen [28] [163] [164] liegt ihr Beutebereich bei Partikeln mit Größen zwischen 0,3 und 10 µm [165] [166] [167] [168] [169] [170], wie sie typischerweise als Schwebstoffe in Belebtschlammanlagen anzutreffen sind [69] [171] [172] [173] [174] [175]. Obwohl in

einigen Arbeiten auf ihre potentielle Bedeutung im Belebtschlamm hingewiesen wird [80] [168] [170] [161] [148], werden Rotatorien aber – ebenso wie die weiteren Metazoen - gemeinhin als wenig bedeutend für den Reinigungsprozess eingestuft [160] [158] [165] [167] [176]. Letzteres bestätigen auch die vorliegenden Ergebnisse eines sehr geringen Beitrages zur Enttrübung von Belebtschlammproben durch Metazoen.

Nach eigenen Messungen wirkt Dichlorvos in Konzentrationen von 10 mg/L zu 60% letal gegenüber Rotatorien im Belebtschlamm, während die Phagozytoseaktivität unbeeinflusst bleibt und selbst bei 100 mg/L diese nur um 20% inhibieren. Der vergleichsweise starke letale Effekt von Dichlorvos gegenüber Rotatorien wird auch durch Untersuchungen von Li-Xia et al. [177] bestätigt, die bei 10 mg/L Dichlorvos einen bereits 100%ig letalen Effekt gegenüber dem Rädertierchen *Brachionus calyciflorus* finden.

Nicht mit Literaturangaben in Deckung bringen lässt sich allerdings der in dieser Arbeit beobachtete geringe Effekt auf die Fraßaktivität der Protozoen von nur 20% bei einer Dichlorvoskonzentration von 100 mg/L. Mojzis et al. [178] finden bereits bei nur 3,91 g/L Dichlorvos eine 50% letale Wirkung gegenüber dem Ciliaten *Tetrahymena pyriformis*, und auch von Rajini et al. [179] wird für den Ciliaten *Paramecium caudatum* ein stärkerer, 100% letaler Effekt bei nur 30 mg/L Dichlorvos beschrieben.

Sowohl die Aufnahme von Nahrungspartikeln bei Protozoen als auch bei Rotatorien ist im Wesentlichen größenbestimmt [28] [165] [166] [167] [180]. Die Oberflächeneigenschaften spielen nur eine untergeordnete Rolle. Mit einem Äquivalentdurchmesser von 1-2 µm und einer leicht stäbchenförmigen Gestalt [181] [182] repräsentiert *E.coli* die im Belebtschlamm am häufigsten anzutreffende Größe und Form frei suspendierter Bakterien. Dies gilt sowohl für die frei suspendierten Teilchen des Anlagenzulaufs sowie für die des Belebtschlammes. Die Partikel besitzen auch hier eine meist leicht stäbchenförmige Gestalt [171] mit einem Äquivalentdurchmesser von etwa 0,7-1,8 µm [69] [171] [172] [173] [174] [183]. Als typische Filtrierer sollten beide, sowohl Protozoen als auch Rotatorien, effektiv dieses – hinsichtlich der Partikeldichte dominante - Größenspektrum ingestieren können.

Es ist also unwahrscheinlich, dass die Fraßaktivität der Rotatorien mit *E.coli* nicht erfasst und die tatsächliche Aktivität der Rädertiere unterschätzt wurde.

Teil 2 – Charakteristika der Phagozytose

Kinetik

Unter realen Bedingungen durchläuft ein „Wassertropfen“ in ca. 18-20 Stunden eine moderne Belebungsanlage [110] [111] [112] [184]. In diesem Zeitraum wird der Abwasserstrom mehrfach in einem Kreislauf durch die Kläranlage geführt. Die Testdauer bzw. Inkubationszeit der Belebtschlammproben zum Nachweis der Phagozytoseaktivität von ca. 22 Stunden trägt dieser relativ langen Verweildauer des Abwassers in der Kläranlage Rechnung. Die Konzentration der zudosierten Bakterien beträgt bei einer Endkonzentration von 0,4 g *E.coli*/L (w/v) $1,5 \times 10^9$ Bakterien/mL. In der Literatur werden für verschiedene Ciliaten maximale Phagozytoseraten bei Bakterienkonzentrationen oberhalb von 10^7 - 10^8 /mL angegeben [28] [185]. Ausgehend von den eigenen Messwerten, d.h. einer anfänglichen OD_{440} von etwa 1,3 (bei $1,5 \times 10^9$ *E.coli*/mL) und einer End- OD_{440} im Mittel von 0,7, sinkt der bakterielle Titer um etwa 46% auf Bakteriendichten von $0,8 \times 10^9$ /mL. Bei diesen Bakterientitern ist also davon auszugehen, dass die Protozoen die suspendierten Nahrungspartikel konstant mit maximaler Rate aufnehmen und verwerten [185] [28]. Träte eine Vermehrung ein, sollte sich dies in Form einer mit der Zeit zunehmenden Phagozytoserate und damit einer nicht-linearen Beziehung sichtbar werden [76]. Obwohl für typische Belebtschlammciliaten bei vergleichbaren Temperaturen minimale Generationszeiten von 5 bis 15 Stunden angenommen werden [39] [186] und für die kleineren Flagellaten des Belebtschlammes noch kürzere Generationszeiten in der Literatur beschrieben sind [187] [188], legt der beobachtete eindeutig lineare Verlauf der Substratabnahme über die Zeit nahe, dass es im Testzeitraum zu keiner messbaren Vermehrung der phagozytierenden Organismen kommt.

Bestätigung erfährt die Annahme einer weitgehend konstanten Anzahl von Protozoen während der Messung auch durch die beobachtete geringe Wirkung der Substanz Cycloheximid. Abhängig vom jeweiligen Stadium des Zellzyklus wirkt Cyclo-

heximid während der Zellverdoppelung sehr unterschiedlich [123] und gerade die Phagozytoseaktivität scheint von der wachstumshemmenden Wirkung auf Protozoen [121] [123] [124] abgekoppelt zu sein. Bei dem Ciliaten *Tetrahymena* entfaltet Cycloheximid beispielsweise eine – im Vergleich zur Phagozytose - um mehr als 3 Zehnerpotenzen stärkere Wirkung gegenüber der Zellvermehrung [125]. Und auch bei dem Ciliaten *Paramecium* lässt sich bei einer Konzentration von 1,26 g Cycloheximid pro Liter keine Vermehrung mehr nachweisen [123], während die beinahe gleiche Konzentration von 1 g/L ohne Einfluss auf die Phagozytoseaktivität bleibt [122]. Da in den eigenen Untersuchungen, mit denen die gesamte Fraßleistung über 22 Stunden erfasst wird, erst oberhalb von etwa 1 g Cycloheximid L⁻¹ deutliche Effekt auftreten, ist eine Vermehrung der gesamten Protozoenpopulation oder wesentlicher Teile davon daher unwahrscheinlich.

Der Test orientiert sich an der mittleren Durchflusszeit eines potentiellen Schadstoffeintrages und gibt damit die Bedingungen des technischen Abwasserreinigungsablaufs wieder. Er erfasst auch eine im Verhältnis zum Lebensalter der Organismen langfristige Wirkung von Schadstoffen. Einflüsse auf die Zellvermehrung als wichtige integrale toxikologische Größe [189], die den gesamten Lebenszyklus umspannt, bleiben aber vermutlich ausgeklammert. Durch nur geringe Änderungen der Rahmenbedingungen bspw. durch Erhöhung der Inkubationstemperatur oder durch Verlängerung des Testzeitraumes wäre es allerdings durchaus möglich, auch sogenannte chronische, die mikrobielle Reproduktion betreffende Effekte in die Schadstoffanalyse miteinzubeziehen.

Temperaturabhängigkeit

Die durchschnittliche Temperatur des Wassers in Belebtschlammanlagen hängt stark von der geografischen Lage ab und verändert sich mit wechselnden Jahreszeiten [190]. Ein weiterer bestimmender Faktor kann die jeweilige Herkunft und Zusammensetzung des Abwassers sein. In der Kläranlage Stahnsdorf, aus der die Proben stammten, wurden beispielsweise selbst bei extremer Kälte von weit unter Null nur wenig unter 15°C im Belebungsbecken gemessen (eigene Untersuchungen). Als Grund für diese relativ zur Luft hohe Temperatur ist hier das weitgehend konstant temperierte Haushalts(Wasch-)abwasser der angeschlossenen Gemein-

den zu sehen (persönl. Mitteilung, [191]). Als Durchschnittswerte werden in der Literatur für kalte Regionen zwischen 7 und 18°C und für warme Regionen zwischen 13 und 30°C angegeben [190]. Die optimale Temperatur für bakterielle Aktivitäten liegt im Bereich von 25-35°C [192] [193]. Unterhalb von 5°C ist keine Nitrifikation mehr möglich und unterhalb von 2°C kommt darüber hinaus der Abbau der organischen Schmutzfracht durch heterotrophe Bakterien zum Erliegen [192]. Die Temperatur hat also wesentlichen Einfluss auf die Stoffwechselfvorgänge und damit auf die Abbauleistung einer Anlage.

Die enge Kopplung an die Temperatur gilt auch für die Phagozytoseleistung im Belebtschlamm. In Relation zur 100%-Kontrollprobe bei 23°C sinkt die Fraßaktivität bei 8°C auf nur mehr 5% ab. Bei höheren Temperaturen von 30°C steigt dagegen die Fraßrate auf das 1,6-fach der (23°C-) Kontrollprobe. In einem Bereich zwischen etwa 12°C und 30°C lässt sich dabei eine Verdoppelung der Aktivität bei Erhöhung der Temperatur um 10°C messen. Dies entspricht dem häufig bei biologischen Reaktionen beobachteten Zusammenhang zwischen Aktivität und Temperatur (RGT-Regel oder van't Hoff'sche Regel), der auch bei heterotrophen Bakterien in einem etwas weiteren Temperaturbereich von etwa 4-30°C beobachtet wird [194]. Die Abnahme der Stoffwechselaktivität der Belebtschlamm Bakterien in der Kälte scheint sich aber deutlich von der Aktivitätsabnahme der Bacterivoren zu unterscheiden. Kühlt das Wasser von 20°C auf 10°C ab, so beträgt die Respirationsaktivität des Belebtschlammes immer noch etwa 30-50% der Aktivität bei 20°C [195] [196], die Phagozytoseaktivität sinkt dagegen auf weniger als 10% im Vergleich zur Fraßleistung bei 20°C.

Lokalisation der Phagozytoseaktivität

Prinzipiell sind in biologischen Abwasserreinigungsanlagen drei Großgruppen der Protozoen vertreten: Flagellaten, Ciliaten und Amöben (Schalen- und Nacktamöben). Den größten Anteil im Hinblick auf Artenzahl und Biomasse stellen dabei die Ciliaten [4] [8] [9] [12] [13] [15] [13] [38] [158] [197] [198]. Diese kommen freischwimmend, kriechend und als sessile Form in Belebtschlamm Anlagen vor. Auch wenn die jeweiligen Anteile mit der organischen Fracht, dem Schlammalter und vielen weiteren äußeren Rahmenbedingungen zusammenhängen, so lässt sich

doch zu praktisch jeder Zeit in jeder Anlage ein mehr oder weniger bedeutender Anteil frei schwimmender Arten nachweisen [138] [197] [199] [200] [201] [202]. Zum Beispiel treten bei geringer Belastung alle drei Formen – freischwimmend, kriechend und sessil - in etwa gleicher Anzahl auf, bei mittlerer Belastung dominieren sessile Formen und bei hoher organischer Schmutzfracht stellen sessile und frei schwimmende Ciliaten jeweils etwa die Hälfte der anzutreffenden Arten [200]. Während für kriechende sowie für sessile Arten unterstellt wird, dass sie sich mit dem Schlamm absetzen und damit im Kreislauf der Anlage bleiben, wird für frei schwimmende Arten ein ständiges Ausschwemmen mit dem Anlagenablauf angenommen [138] [203] [204] [205] [206]. Über die tatsächliche Zusammensetzung der Ciliaten oder Protozoengemeinschaft im Anlagenablauf existieren allerdings nach eigener Kenntnis keine Untersuchungen, die dies belegen könnten. Infrage gestellt werden die Annahmen eines Ausschwemmens freischwimmender Protozoen durch die Untersuchungen zur Lokalisation der Phagozytoseaktivität, die praktisch keine Phagozytoseaktivität in Belebtschlammüberständen ergaben – selbst nach 3-maliger aufeinanderfolgender Durchmischung und Sedimentation derselben Belebtschlammprobe. Auch die mikroskopische Kontrolle der Überstände ergab keinen Hinweis auf Protozoen und bestätigte damit die Phagozytoseaktivitätsmessungen. Die Dauer der Sedimentation betrug im Test jeweils 20 min. Dagegen liegen im Nachklärbecken die Eindickzeiten i.d.R. zwischen 1 bis 4 h. Es kann somit allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die in der Praxis meist deutlich längeren Verweilzeiten im Absetzbecken auch Auswirkungen auf das Verhalten und damit auch die Verteilung freischwimmender Ciliaten in der Schlamm-Wassersäule haben.

Zeitliche Schwankungen

Die Mengen und die Zusammensetzung des Abwassers verändern sich ständig [207], von einer Stunde zur anderen ebenso wie auch innerhalb der Woche. Neben der schwankenden Schmutzfracht üben aber auch physikalische Variablen wie Sommer- und Wintertemperaturen besonders nachhaltigen Einfluss auf die Populationen des Schlammes aus [204]. Entsprechend dem Tag-Nacht-Rhythmus, den sozialen Gewohnheiten der Haushalte und Produktionsprozessen ergibt sich eine typische Tagesganglinie mit geringer Schmutzfracht in den Nachtstunden und ei-

nem hohen Abwasseranfall am Tage [208] [209]. Aber auch Werktage und Wochenenden können sich unterscheiden. Möglicherweise bedingt durch fehlende Abwässer aus Gewerbe und Industrie entstehen am Wochenende Hungerbedingungen [147] [210] [211]. Dieser Mangelzustand am Samstag und am Sonntag könnte in Beziehung zu der gemessenen geringen Phagozytoseaktivität des Schlammes am Montag stehen, die sich dann im Laufe der folgenden Werktage steigert, um am darauf folgenden Montag wieder bei geringen Werten zu beginnen.

Von den Ursachen für die Schwankungen innerhalb der Woche sind sicherlich die der jahreszeitlichen Veränderungen zu unterscheiden. Als entscheidender Grund für die durchschnittlich im Winter geringeren und im Sommer höheren Phagozytoseraten pro g Trockensubstanz sind in unseren Breiten die Temperaturen anzusehen. Im Winter sinken die Temperaturen auch im Belebungsbecken, was nicht nur zu einer geringeren Aktivität der Organismen führt, sondern auch zu einer anderen Zusammensetzung der Protozoenpopulationen [204]. Solche, die Protozoenbiozönose betreffenden Veränderungen bei langfristig niedrigeren Temperaturen könnten ein Grund für die beobachtete, tendenziell geringere Phagozytoseaktivität im Winter sein.

Lagerfähigkeit der Proben

Für mikrofaunistische Untersuchungen werden Protozoen möglichst unmittelbar nach der Probennahme untersucht [212] [213] [214], oder, sollte das nicht möglich sein, fixiert, um Veränderungen in der Probe zu verhindern [215] [216]. Schon während des Transportes zum Labor sollte eine Kühlung auf Eis erfolgen. Wenn Proben aufbewahrt werden, dann nur in der Kälte bei i.d.R. 4-6°C und im Dunkeln [217]. Ähnlich wird mit Bakterienentnahmen aus der Umwelt verfahren. Auch hier werden die Proben gekühlt höchstens 1-2 Tage bis zur Untersuchung aufbewahrt, um Veränderungen der Populationen zu vermeiden, z.B. [218] [219]. Auch die OECD Guideline 209 [137] sieht für den Belebtschlamm-Respirationstest eine möglichst unmittelbare Verwendung frischen Schlammes vor. Allerdings wird in der Testvorschrift auch eine Lagerfähigkeit des Schlammes über mehrere Tage bei Raumtemperatur unter Zugabe von künstlichem Abwasser als Nährsubstrat be-

schrieben. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint auch für die Phagozytosemessungen eine Lagerung der Proben über mehrere Tage möglich, allerdings nicht bei Raumtemperatur sondern gekühlt bei 4-6°C.

Von Gendig et al. [220] wurde für den Respirationstest eine abnehmende Empfindlichkeit des Belebtschlammes gegenüber Schadstoffen mit zunehmender Lagerung beschrieben. Obwohl diesbezüglich keine statistisch belastbaren Messungen im Hinblick auf die Phagozytoseleistung durchgeführt wurden, gab es auf Basis der hier durchgeführten Schadstoffuntersuchungen keine Hinweise auf Veränderungen der Hemmeffekte in Abhängigkeit des „Schlammalters“ im Kühlschrank (einschränkend muss aber angemerkt werden, dass für die Schadstoffmessungen Schlamm eingesetzt wurde, der höchstens 3 Tage gelagert war).

Teil 3 – Rahmenbedingungen für ein Testprotokoll

Mit den Rahmenbedingungen sollten wichtige Eckpunkte festgelegt werden, die für eine allgemeine Testrichtlinie zur Messung der Phagozytoseleistung in Belebtschlammern bedeutend sind und die Ausarbeitung eines konkreten Testprotokolls erlauben. Im Wesentlichen orientieren sich die Vorgaben an der speziellen Biologie des Belebtschlammes und seiner „Kultivierung“ im Belebungsbecken. Ein weiteres zentrales Kriterium ergab sich aus der (öko-)toxikologische Fragestellung, d.h. in welchen Gefäßen und in welchem Milieu wird der Schlamm den Schadstoffen exponiert.

Das Abwasser, das aus verunreinigtem Leitungswasser besteht, durchströmt in etwa 10 -24 Stunden eine kommunale Kläranlage [111] [112] [184]. Im Belebungsbecken wird zum optimalen Abbau der organischen Schmutzfracht die Biozönosen aus Bakterien, Protozoen und einigen Metazoen stark belüftet. Wesentliche Merkmale des Testdesigns waren damit vorgegeben:

- Die Testdauer von etwa einem Tag - unter Berücksichtigung der normalen Arbeitszeiten,
- eine starke Durchmischung der Probe unter genügend Sauerstoffzufuhr von außen und

- Leitungswasser als Verdünnungsmedium für den Belebtschlamm selbst sowie für die Testsubstanzen (alternativ wurde auch das leicht verfügbare und bei Protozoologen verbreitete Mineralwasser ‚Volvic‘ [221] eingesetzt).

Aus dem vorgegebenen Testzeitraum von etwa 24 Stunden ergab sich ein über die Jahreszeiten hinweg gute Ergebnisse lieferndes Verhältnis von 1 g Belebtschlamm pro Liter und einer Substratkonzentration von 0,4 g *E.coli*/L.

Im Hinblick auf die Testgefäße wurde auf den in der Ökotoxikologie nach wie vor gebräuchlichen Standard (Borosilikat-) Glas (z.B. [222, 223, 224, 225] zurückgegriffen. Obwohl auch an Glasoberflächen beispielsweise stark hydrophobe Chemikalien, Schwermetalle und Proteine adsorbieren [226, 227, 228], überwiegen nach allgemeiner Meinung die Vorteile gegenüber Kunststoffen (siehe auch z.B. [227, 229]).

Auf Lösungsmittel sollte soweit wie möglich verzichtet werden, das sehen die internationale Testguidelines so vor (z.B. [223] [225] [137]) und das ist auf Grund möglicher Kombinationswirkungen mit der eigentlichen Prüfsubstanz [230] auch sinnvoll. Dennoch lässt sich in manchen Fällen der Einsatz von Lösungsmitteln nicht vermeiden [222]. Bei Protozoen wird auf Grund seiner vergleichsweise geringen Wirkung häufig Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet [179] [231] [232]. Dies bestätigen auch die Messungen der Phagozytoseinhibition. Im Vergleich zu Chloroform, Methanol, Aceton und Ethanol zeigt DMSO den geringsten Effekt.

Teil 4 - Schadstoffmessungen

Konzentrations-Wirkungskurven

Unter Verwendung sigmoider Kurven, die typischerweise den Verlauf von toxikologischen Konzentrations-Wirkungskurven beschreiben [233] [234], wurden gute Anpassungen an die Datenpaare Hemmung versus Konzentration erreicht, wie die hohen Bestimmtheitsmaße (R^2) der nicht-linearen Regressionen zeigen (vgl. Anhang, S. 143 ff.). Zur Beschreibung der Giftigkeit bzw. Umweltgefährlichkeit und zum toxikologischen Vergleich wurde die effektive Konzentration mit 50% Effekt (EC_{50}) herangezogen, die sowohl in der Toxikologie als auch in der Ökotoxikologie eine zentrale Größe darstellt [234] [235].

Messung von flüchtigen Stoffen

Biotests werden zur Risikoabschätzung von Umweltchemikalien herangezogen – auch wenn diese flüchtig sind und in den meist offenen Testsystemen nur schwer erfassbar sind. Für diesen Problemfall sehen deshalb viele Standard-Vorschriften spezielle Verfahrensmodifikationen vor, die ein Entweichen der Prüfsubstanz verhindern helfen sollen [222].

Mit Henry-Konstanten von $5,8 \cdot 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 / \text{mol}$ [236] bzw. $0,28 \cdot 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 / \text{mol}$ [237] sind die beiden Chemikalien 1-Bromooctan und Diphenylether als flüchtig bzw. schwach flüchtig einzustufen [238]. Die Auswirkungen dieser Eigenschaft sind an den unterschiedlichen Effekten in Teströhrchen mit verschiedenen Verhältnissen von Probenvolumen zu Luftsäule erkennbar. Bei einem Verhältnis von etwa 1:6 (Probe:Luft) sind für beide Substanzen keine Effekte bis 145 mg/L bzw. 52 mg/L messbar, während in den (kleineren) Teströhrchen mit einem Verhältnis von etwa 1:2 (Probe:Luft), d.h. mit wesentlich geringerer Luftsäule über dem Testansatz, bereits 87% bzw. 100% Hemmung zu beobachten sind. Selbst bei etwa 10-fach geringeren Konzentrationen sind für beide Substanzen in den kleineren Röhrchen noch Hemmungen nachzuweisen. Beide Substanzen treten also merklich aus der Wasserphase in die Gasphase über; in den kleineren Probengefäßen mit - im Verhältnis - geringerem Luftvolumen ist dies aber minimiert, so dass für beide flüchtigen Substanzen Hemmkurven ermittelt werden konnten.

EC₅₀-Werte und Lipophilie

Umweltchemikalien bilden keine homogene Gruppe chemischer Substanzen, sondern setzen sich aus einer Vielzahl höchst unterschiedlicher Stoffe mit z.T. extrem divergierenden physikalisch-chemischen Eigenschaften zusammen. Ein Großteil der Umweltchemikalien besteht aus organischen Industriechemikalien [239], die ohne Blick auf eine besondere biologische Wirkung wie etwa bei Pestiziden entwickelt wurden und werden. Bis zum Jahr 1980 existierten rund 100.000 sogenannte Altstoffe, bei etwa 9.000 davon handelt es sich um 'HPV-chemicals' (high production volume) [240], die - in mindestens einem der OECD-Länder – in Mengen von mehr als 1.000 Tonnen pro Jahr produziert werden [241]. Jährlich kommen seitdem bis zu 2.000 neue Chemikalienanmeldung hinzu [241]. Entsprechend ihrem

meist undefinierten Wirkungsmuster werden Umweltschadstoffe - mit Ausnahme der bereits erwähnten Pestizide/Biozide - nicht nach ihrer spezifischen Wirkung auf Rezeptorebene klassifiziert. Sie werden vielmehr in ein Wirkschema eingeordnet, das eine beinahe ausschließlich unspezifische Wirkung entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften unterstellt. Unterschieden werden nicht-reaktive sowie reaktive Effekte. In der Gruppe der nicht-reaktiven Chemikalien spielen die unpolar-narkotische und die polar-narkotische Wirkung eine bedeutende Rolle, in der Kategorie der reaktiven Stoffe werden potentiell reaktive (pro-elektrophile und pro-nukleophile) Substanzen von reaktiven (elektro- bzw. nukleophilen) unterschieden [81] [242].

Neu entwickelte Biotests haben sich, soweit eine gesetzliche Anerkennung angestrebt wird, den Anforderungen an eine Testvalidierung zu stellen. Diese sieht in der Regel eine erste Phase vor, in der die Testentwicklung stattfindet und in der erste Nachweise der Robustheit und der breiten Anwendbarkeit des Tests geführt werden. Daran schließt sich – unter Mitwirkung mehrerer Labors - eine Harmonisierung der Testprotokolle sowie eine Interlaborstudie mit dem Ziel an, die Übertragbarkeit und Nachvollziehbarkeit der Testvorschrift unter Beweis zu stellen und/oder noch weiteren Entwicklungsbedarf zu ermitteln [243].

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Testentwicklung zielte darauf ab, eine wesentliche Lücke in der ökotoxikologischen Prüfung von abwasserrelevanten Stoffen zu schließen, und ein Instrumentarium zu schaffen, das die biologisch wichtige Funktion der Protozoen in der Abwasserreinigung erfasst. Um die breite Anwendbarkeit des Tests und zugleich dessen Zuverlässigkeit zu überprüfen, stand bei der Auswahl des Testchemikalien-Sets im Vordergrund, die typische Unspezifität der Wirkung von Umweltschadstoffen und zugleich die beschriebene Divergenz der physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie die Vielschichtigkeit der Wirkungsmuster abzubilden.

Die Testergebnisse bestätigen im Wesentlichen, dass sich Stoffe mit sehr unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften in ihrer Wirkung beschreiben lassen. Die Lipophilie der Testsubstanzen erstreckt sich von gut wasserlöslich bis extrem hydrophob. Aber auch Chemikalien, die Ladungen tragen, wie beispielsweise die chlorierten Phenole oder die Carboxylsäure Natrium-Octanoat, lassen sich in

dem komplexen Milieu des Belebtschlammes in ihrer Wirkung beschreiben. Selbst reaktive Substanzen mit acylierenden und elektrophilen Eigenschaften zeigen ihr typisches Wirkungsmuster, das eine allgemein höhere Toxizität als die von narkotisch wirkenden Chemikalien aufweist [81] [242]. Einen erwartet stärkeren Effekt als es der $\log P_{ow}$ erwarten lässt, rufen auch die Stoffe mit spezifischer Wirkung hervor [81] [242]. Auch wenn die protein-, huminstoff-, polysaccharidreiche Schlammflocke [141] [244] einen deutlichen Schadstoffpuffer [149] im Testansatz darstellen mag, so ließen sich – mit einer Ausnahme - in allen Fällen Konzentrationswirkungskurven erstellen und EC_{50} -Werte ermitteln.

Die Ausnahme stellt trans-4-Methyl- β -nitrostyrol dar. Die (reaktive) Chemikalie zeigte bis zu einer Konzentration von 2,9 mg/L keinen Effekt. Dies steht im Widerspruch zu Literaturangaben, die bereits deutliche Effekte bei 10-fach geringeren Konzentrationen ($EC_{50}=0,196$ mg/L) gegenüber der Wachstumsfähigkeit von *Tetrahymena* zeigen [7] und eine noch stärkere Wirkung ($EC_{50}=0,081$ mg/L) auf die Phagozytoseaktivität des Ciliaten beschreiben [83]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Phagozytostest an *Tetrahymena* und dem Test mit Belebtschlammproben ist der hohe organische Gehalt des Belebtschlammes, der als „Schadstoffpuffer“ [149] für die fehlende Schädigung der Phagozytoseaktivität im Belebtschlamm verantwortlich zu sein scheint. Dass es sich bei dieser Abweichung der Hemmwirkung eher um die Ausnahme als die Regel handelt, und die Phagozytoseaktivität im Belebtschlamm toxikologisch weitgehend der des Ciliaten *Tetrahymena* entspricht, zeigt die hohe Übereinstimmung von EC_{50} -Werten für beide „Testorganismen“ ($R^2 = 0,885$, $n = 19$). Von 22 verfügbaren Vergleichen ergeben sich nur drei deutliche Abweichungen. Ausser der bereits beschriebenen reaktiven [245] Chemikalie trans-4-Methyl- β -nitrostyrol betrifft das die Substanzen Pentachlorphenol (PCP) sowie Chloramphenicol.

Pentachlorphenol ist eine sehr hydrophobe Substanz, die allgemein stark an Boden und Sedimente adsorbiert [246] [247]. Nach Tsezos & Bell [248] lässt sich für die in dieser Arbeit eingesetzten Mengen an Belebtschlamm (1 g/L) und Substrat (0,4 g *E.coli*/L) bei einer Nominalkonzentration von 4,6 mg PCP/L (EC_{50}) eine Konzentration von etwa 0,4 mg PCP/L in der Wasserphase angeben. Die Protozoen sind demnach durch die Anwesenheit der „Biomasse“ Schlamm und *E.coli* (Summe: 1,4 g/L)

einer etwa 10-fach geringeren PCP-Konzentration exponiert, als nominell eingesetzt wurde. Mit dieser Korrektur rücken die EC_{50} -Werte der beiden Phagozytose-tests mit 0,4 mg/L (Belebtschlamm, korrigiert) bzw. 0,15 mg/L (Tetrahymena-Phagozytose) sehr nahe aneinander.

Im Gegensatz zu den beiden Chemikalien trans-4-Methyl- β -nitrostyrol und Pentachlorphenol, die beide im Belebtschlammtest eine geringere Toxizität aufwiesen, übertrifft die Wirkung der Substanz Chloramphenicol im Belebtschlammtest die Effekte gegenüber der Phagozytoseaktivität von *Tetrahymena*. Und diese stärkere Inhibition gewinnt mit zunehmender Expositionsdauer an Deutlichkeit. Nach 6 Stunden Einwirkung übertrifft die Wirkung von Chloramphenicol im Belebtschlammtest die Effekte gegenüber der Fraßaktivität von *Tetrahymena* um bereits das etwa 10-fache, und nach dem Testzeitraum von 22 Stunden liegt der EC_{50} -Wert für die „natürlichen“ Protozoen um das mehr als 300-fache höher als der EC_{50} -Wert bei *Tetrahymena*, der hier innerhalb der ersten halben Stunde nach Hemmstoffapplikation ermittelt wurde [83]. Bei dieser Gegenüberstellung gibt der Zeitfaktor offensichtlich den Ausschlag. Chloramphenicol hemmt die bakterielle und die mitochondriale Proteinbiosynthese [249] [250] [251], und diese Inhibition erfordert Zeit, um sich auf komplexere Vorgänge des Gesamtorganismus wie die Nahrungsaufnahme und die Zellvermehrung auszuwirken. Dies bestätigen jedenfalls mehrere Arbeiten an *Tetrahymena*, aus denen hervorgeht, dass die Wirkstärke gegenüber der Vermehrung [250] [252] [253] [250] und auch gegenüber der Phagozytose [254] mit der Expositionsdauer korreliert ist.

Erwähnt werden sollte noch die Wirkung der Schwermetallverbindung Cadmiumchlorid, die bei der Gegenüberstellung der beiden Phagozytose-tests mit Belebtschlamm und *Tetrahymena* zunächst keine besonderen Auffälligkeiten zeigt. Beim Vergleich mit Effekten auf die Zellvermehrung des Ciliaten ändert sich das allerdings: hier wirkt $CdCl_2$ bereits in Konzentrationen von 0,1 mg/L 50% wachstumshemmend, während die Phagozytoseaktivität im Belebtschlamm erst in Konzentrationen von 6,8 mg/L zu 50% inhibiert wird. Beide Tests laufen über einen beinahe gleichen Zeitraum (24h und 22h), was sich aber stark unterscheidet, ist die Zusammensetzung des Testmediums. Im Falle des Wachstumstests liegt der organische Gehalt des Mediums bei etwa 0,2 g/L [76] und damit deutlich niedriger als

im Belebtschlammtest, der 1 g/L Schlamm mit einem organischen Gehalt von 60-70% [173] sowie 0,4 g/L bakterielles Nährsubstrat enthält. Da CdCl_2 stark an organische Bestandteile in Umweltproben sowie an Belebtschlamm adsorbiert [255], ist wie für die organischen Testchemikalien trans-4-Methyl- β -nitrostyrol und Pentachlorphenol auch hier eine schadstoffpuffernde Wirkung des Belebtschlammes wahrscheinlich. Das Schwermetall zeigt aber nicht nur ein stark adsorptives Verhalten, seine Wirkstärke wird auch – ähnlich dem Hemmstoff Chloramphenicol (s.o.) – von der Expositionsdauer beeinflusst [256]. Das könnte erklären, weshalb CdCl_2 im wesentlich längeren (22h) Belebtschlamm-Phagozytostest mit einem vergleichsweise hohen organischen Gehalt ähnlich wirkt wie im *Tetrahymena*-Phagozytostest, der zwar einen viel geringeren organischen Gehalt aufweist, aber dafür nur wenige Minuten umfasst.

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, dass sich mit dem existierenden OECD-Belebtschlammtest an Bakterien die Wirkung von Umweltchemikalien gegenüber Ciliaten nicht beschreiben lässt. In Ermangelung eines abwasserrelevanten Biotests mit Protozoen wurde diese Aussage auf Basis von ökotoxikologischen Daten getroffen, die meist die Zellproliferationsfähigkeit von Ciliaten unter axenischen Bedingungen beschreiben und alles andere als die autochthonen Protozoenpopulationen im Belebtschlamm abbilden. Umso interessanter ist es nun, in einer erneuten Gegenüberstellung mit jetzt vorliegenden Messungen im „natürlichen“ Milieu die beiden Belebtschlammtests toxikologisch zu vergleichen. Für insgesamt 8 Testchemikalien konnten EC_{50} -Vergleichswerte in der Literatur gefunden werden (Dimethylsulfoxid, Aceton, Chloroform, Phenol, 4-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, und Pentachlorphenol aus [257] und CdCl_2 aus [258]). Auch wenn der Datensatz sehr beschränkt ist, bestätigt sich auch hier, dass mit dem Standard OECD-Test (Respirationsinhibition) die Aktivität der Protozoen im Belebtschlamm nicht erfasst wird (Abb. 40). Die Werte streuen nicht nur zufällig um die Regressionsgerade ($R^2=0,196$, $n=8$), es zeigt auch keiner der beiden Tests eine durchgängig höhere Empfindlichkeit. Dieser Vergleich unterstreicht ein weiteres Mal die Bedeutung eines Tests mit Protozoen im Belebtschlamm, um eine realistischere und sicherere Abschätzung von Gefährdungspotentialen durch Umweltchemikalien vornehmen zu können.

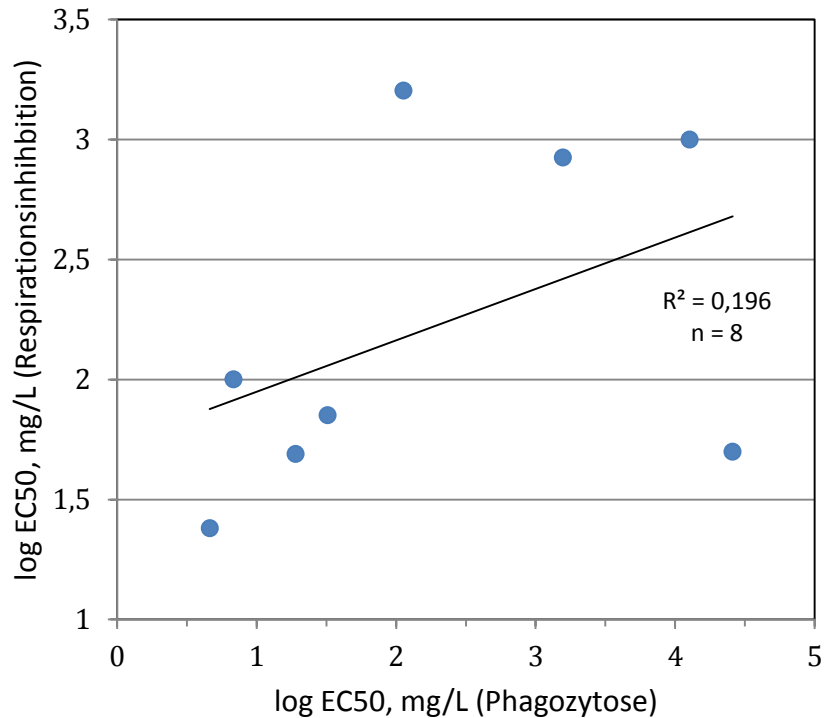


Abb. 40: Toxikologischer Vergleich von Belebtschlamm-Bakterien (OECD-Standardtest: Respirationsinhibition) und dem neu entwickelten Test mit Belebtschlamm-Protozoen (Phagozytose). Die Linie zeigt die Regressionsgerade, die Werte für den OECD-Respirationsinhibitionstest wurden aus [257] und [258] entnommen (Näheres zu den Testchemikalien siehe Text).

Teil 5 – Schlussfolgerung und Ausblick

Im Ergebnis dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass sich die Phagozytoseaktivität von Protozoen im Belebtschlamm zuverlässig und mit einfachen Mitteln bestimmen lässt. Zum Nachweis von Schädigungen durch Umweltchemikalien wurde ein Test entwickelt, der die Filtrationsleistung als funktional entscheidenden Parameter der Protozoenbiozönose von Belebtschlämmen in ihrer Gesamtheit erfasst. In einem ersten Validierungsschritt konnte gezeigt werden, dass sich der Test zur Messung einer großen Bandbreite physikalisch-chemisch sehr unterschiedlicher Chemikalien eignet.

Unter wissenschaftlichen Aspekten sind noch einige Fragen nicht zufriedenstellend geklärt, für die aber mit der entwickelten Methodik, besonders zur selektiven Dafaunierung und Inhibition der Metazoen, ein Instrumentarium für weitere Forschungsarbeiten bereitgestellt wird.

Im Hinblick auf die angestrebte Etablierung eines neuen Tests [259] mit Belebtschlammprotozoen wurde eine Ausgangsbasis für weitere Validierungsschritte in Richtung einer gesetzlich anerkannten Testrichtlinie geschaffen (vgl. nachstehendes Schema, Abb. 41). Aufbauend auf der hier vorgeschlagenen Testvorschrift wurde bereits die zweite Validierungsstufe durchlaufen. Unter Beteiligung mehrerer Labors und anhand von Belebtschlämmen unterschiedlicher Kläranlagen aus verschiedenen Ländern konnte in einer Vor-Ringstudie die allgemeine Anwendbarkeit des Tests unabhängig von der geographischen Herkunft und der spezifisch-technischen Aufbereitung des Belebtschlammes aufgezeigt werden.

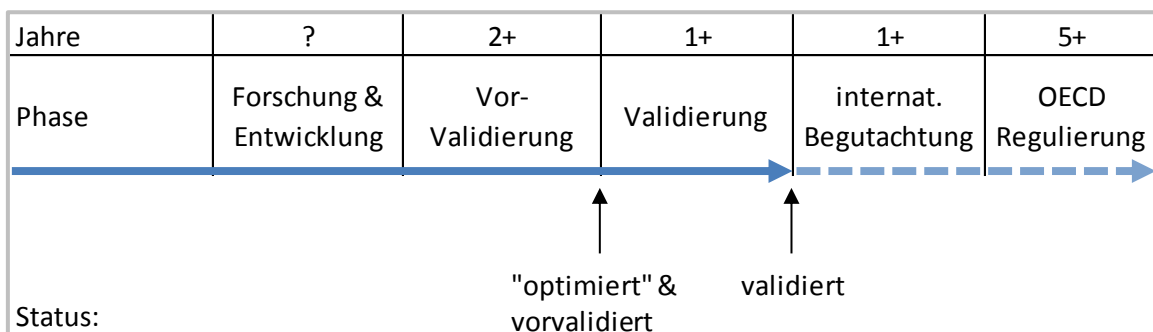


Abb. 41: Phasen der Testvalidierung (aus: [260])

In einer dritten Stufe wird aktuell im Rahmen einer internationalen Studie die Zuverlässigkeit, Praktikabilität und Robustheit des Belebtschlamm-Protozoentests überprüft. Die laufenden Bestrebungen zur Etablierung des Tests auf internationaler Ebene werden administrativ und auch fachlich wesentlich vom Deutschen Umweltbundesamt begleitet. Ziel ist die Anerkennung des im Laufe der Validierung leicht modifizierten Belebtschlamm-Protozoentests als OECD-Richtlinie.

ZUSAMMENFASSUNG

Protozoen erfüllen eine Schlüsselfunktion im mikrobiellen Nahrungsnetz und sind wesentlich an den natürlichen Abbau- und Remineralisationskreisläufen beteiligt. Sie bilden das entscheidende Bindeglied zwischen Bakterien und kleinen Vielzellern. Durch ihre Fraßaktivität kontrollieren sie den Bestand an Bakterien. Aber nicht nur in der „natürlichen Selbstreinigung“, sondern auch im technischen Prozess der Abwasserbehandlung ist ihre Anwesenheit eng mit dem Reinigungserfolg verbunden. Von ihrer Filtrationsleistung hängt ab, ob und inwieweit Einzelbakterien ausfiltriert werden und die eigentliche Klärung des Abwassers (Enttrübung) erfolgt.

Trotz der Bedeutung der Einzeller für die Abwasserreinigung existierte bisher noch kein Test, der für diesen typischen Expositionspfad umweltrelevanter Schadstoffe Aussagen zu ökotoxikologischen Effekten gegenüber der funktionell wichtigen Gruppe der Protozoen ermöglichte.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Test entwickelt, der die Phagozytoseaktivität der Protozoen im Belebtschlamm erfasst. Die Fraßleistung der Einzeller wird anhand des Verbrauchs bakterieller Suspensionen über einen Zeitraum von 22 Stunden bei 22°C mit photometrischen Methoden ermittelt. Die Phagozytoseaktivität ist stark temperaturabhängig und eng an die Belebtschlammflocken gebunden; pro Stunde werden durchschnittlich etwa $0,36 \cdot 10^8 E.coli$ -Zellen/mL bei einer Belebtschlammkonzentration von 1 g/L (TG) verbraucht. Die durchschnittliche Phagozytoseaktivität verändert sich mit den Jahreszeiten, aber auch innerhalb aufeinanderfolgender Tage sind deutliche Schwankungen zu beobachten.

Für eine erfolgreiche Testdurchführung wurden verschiedene Rahmenbedingungen festgelegt, die das Verhältnis von eingesetztem bakteriellen Substrat zu Belebtschlamm betreffen sowie Angaben über Verdünnungsmedien, Durchmischung der Proben und geeignete Testgefäße enthalten.

Anhand von 27 Testchemikalien mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften und verschiedenen Wirkmechanismen wurde das Testsystem zur Überprüfung der Anwendungsbreite, der Zuverlässigkeit sowie seiner Nachweisemp-

findlichkeit validiert. In 26 Fällen konnten EC_{50} -Werte ermittelt werden. Die ökotoxikologische Klassifizierung der Chemikalieneffekte entspricht dem typischen Wirkungsmuster narkotischer, reaktiver und spezifischer Wirkung. Ein Vergleich mit Literaturdaten ergab, dass sich die Toxizität der Substanzen in guter Näherung ($R^2=0,885$, $n=19$) mit Wirkungen auf die Phagozytoseaktivität des Ciliaten *Tetrahymena* vergleichen lässt. Bei nur 3 von 19 Vergleichssubstanzen entsprechen sich die Wirkprofile nicht. Keine Korrelation ergibt sich bei der Gegenüberstellung der EC_{50} -Werte mit Werten des OECD-Standardtests zur Erfassung von Chemikalieneffekten auf Belebtschlamm.

Eine Testvorschrift wurde in Form einer 'Standard Operating Procedure' (SOP) entworfen, die alle wesentlichen Arbeitsschritte umfasst und konkrete Angaben zur Durchführung und Auswertung des Tests enthält.

ABSTRACT

Protozoa not only play an important ecological role in the self-purification and matter cycling of natural aquatic ecosystems, but also in the artificial system of sewage treatment plants. Especially the feeding of ciliates on bacteria improves the treatment, resulting in higher transparency, i.e. lower organic load in the output water of the treated wastes. Although vital for the functioning of sewage treatment plants, protozoa are presently not covered by the currently standardized ecotoxicological test systems.

To overcome this shortcoming, a test method has been developed in this thesis to assess chemical effects towards protozoa in activated sludge. The integrity of the native protozoan populations is monitored by their ability to take up suspended bacteria. The decrease in prey concentration is followed by photometric means over a time period of 22 hrs at 22°C. The measured phagocytotic activity is highly temperature sensitive and closely associated to sludge flocs. On average, 1 g/L (dw) of activated sludge consumed about $0.36 \cdot 10^8 E.coli$ -cells/mL·h. Phagocytosis does exhibit seasonal variations in activated sludge, but there are also substantial fluctuations within the week.

A framework of technical criteria and requirements is provided specifying basic conditions for the reliable performance of the method such as appropriate food to sludge ratios, acceptable dilution waters and suitable test vessels.

The test was validated on the basis of a test set of 27 chemicals covering a wide range of different physico-chemical properties and modes of action to verify the range of applications, its robustness and sensitivity towards chemicals. In all but one case EC_{50} -values could be obtained. Effect concentrations of test chemicals could be classified according to their predicted narcotic, reactive and specific mode of action. Toxicities in activated sludge compare well with reported findings from a phagocytosis inhibition test using the ciliate *Tetrahymena* ($R^2=0,885$, $n=19$). Only three chemicals produced different results. No correlation could be found between the EC_{50} -values and data from the OECD respiration inhibition test, reflecting effects on bacteria in activated sludge.

The testing procedure is outlined in a Standard Operation Procedure (SOP), containing all basic steps and details to perform the test and to evaluate the results.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Pauli und V. Poka, „Entwicklung und Standardisierung eines Testsystems zur Überprüfung der Wirkung von Chemikalien auf zentrale Funktionen der Protozoen-Biozönose in Belebtschlämmen kommunaler Kläranlagen,“ Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit . Umweltchemikalien/Schadstoffwirkungen. Forschungsbericht 20167402. 2005.
- [2] ECB, „European Chemicals Bureau, Draft Technical Recommendation: TGD. Technical Recommendation, Chapter 3, Section 4. Effects Assessment for Microorganisms in Sewage Treatment Plants: Consideration of Protozoa Toxicity Data,“ EUROPEAN COMMISSION, DIRECTORATE GENERAL, JRC JOINT RESEARCH CENTRE, 1998.
- [3] F. Bux und H. C. Kasan, „A microbiological survey of ten activated sludge plants,“ *Water S A (Pretoria)* 20 (1), pp. 61-72, 1994.
- [4] R. C. Curds und A. Cockburn, „Protozoa in biological sewage-treatment processes. I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants,“ *Water Research* 4, pp. 225-236, 1970.
- [5] J. C. Chung und P. F. Strom, „Microbiological study of ten New Jersey rotating biological contactor wastewater treatment plants. Res J Water Pollut Control Fed 63 (1), pp. 35-43, 1991.,“ *Res J Water Pollut Control Fed* 63 (1), pp. 35-43, 1991.
- [6] P. Madoni und P. F. Ghetti, „The structure of ciliated protozoa communities in biological sewage-treatment plants,“ Bd. 83, pp. 207-215, 1981.
- [7] M. M. Varma, H. E. Finley und G. H. Bennett, „Dynamics of protozoa in wastewaters,“ *WPFC J*, Bd. 47, Nr. 1, pp. 85-92, 1975.
- [8] D. E. Hughes und D. A. Stafford, „The microbiology of the activated-sludge process,“ *Critical Reviews in Env Control*, Bd. 6, Nr. 3, pp. 233-277, 1976.

- [9] E. Aescht und W. Foissner, „Biology of a high-rate activated sludge plant of a pharmaceutical company,“ *Arch Hydrobiol* 90 (2), pp. 207-251, 1992.
- [10] D. H. J. Sydenham, „A re-assessment of the relative importance of ciliates, rhizopods and rotatorians in the ecology of activated sludge,“ *Hydrobiologia*, Bd. 38, Nr. 3-4, pp. 553-563, 1971.
- [11] H. Salvado, „Effect of mean cellular retention time on ciliated protozoan populations in urban wastewater treatment plants based on a proposed model,“ *Water Research*, Bd. 28, Nr. 6, pp. 1315-1321, 1994.
- [12] P. Madoni, „Growth and succession of ciliate populations during the establishment of a mature activated sludge,“ *Acta Hydrobiol*, Bd. 24, Nr. 3, pp. 223-232, 1982.
- [13] P. Madoni, „Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm,“ *Bioresource Technology*, Bd. 48, Nr. 3, pp. 245-249, 1994.
- [14] M. Martín-Cereceda, S. Serrano, A. Guinea. „A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants,“ *FEMS Microbiology Ecology*, Bd. 21, Nr. 4, pp. 267-276, 1996.
- [15] P. Madoni, „Microfauna biomass in activated sludge and biofilm,“ *Water Sci Technol*, Bd. 29, Nr. 7, pp. 63-66, 1994.
- [16] J. R. Beaver und T. L. Crisman, „The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems,“ *Microb Ecol* 17, pp. 111-136, 1982.
- [17] D. H. Eikelboom und H. J. J. Buijsen, Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung, München: F. Hirthammer Verlag, 1992.
- [18] H. Buck, Mikroorganismen in der Abwasserreinigung, München: ATV, F. Hirthammer Verlag, 1979.
- [19] D. L. Hill, The Biochemistry and Physiology of Tetrahymena, Academic Press, NY, London., 1972.
- [20] E. K. Hoffmann und L. Rasmussen, „Phenylalanine and methionine

- transport in *Tetrahymena pyriformis*. Characteristics of a concentrating, inducible transport system," *Biochim Biophys Acta*, Nr. 266, pp. 206-216.
- [21] E. Orias und L. Rasmussen, „Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena*. V. Utilization of amino acids and proteins," *J Cell Sci*, Nr. 36, pp. 343-353, 1979.
- [22] L. Rasmussen und M. K. Zdanowski, „Evidence for dipeptide uptake in *Tetrahymena*," *Experientia*, Nr. 36, pp. 1044-1045, 1980.
- [23] G. R. Seaman, „Metabolism of free-living ciliates," in *Biochemistry and Physiology of Protozoa, Vol 2*, S. H. Hutner und A. Lwoff, Hrsg., Academic Press, NY, 1955, pp. 91-150.
- [24] V. P. Cirillo, „Mechanisms of arabinose transport in *Tetrahymena pyriformis*," *J Bacteriol*, Nr. 84, pp. 754-758, 1962.
- [25] A. P. Andersen und P. Hellung-Larsen, „Division competence in *Tetrahymena*: Determination of minimum cell volume and rate of nutrient uptake," *Journal of Cellular Biochemistry*, Nr. 41, pp. 125-133, 1989.
- [26] J. R. Nilsson, „Phagotrophy in *Tetrahymena*," in *Biochemistry and Physiology of protozoa, 2nd ed, Vol 2*, M. Lewandowski und S. Hutner, Hrsg., Academic Press, New York, 1979.
- [27] M. A. Sleigh, *Protozoa and other protists*, M. Sleigh, Hrsg., London: Edward Arnold, 1989.
- [28] T. Fenchel, „Suspension feeding in ciliated protozoa: functional responses and particle size selection," *Microb Ecol*, Bd. 6, pp. 1-11, 1980a.
- [29] T. Fenchel, „Suspension feeding in ciliated protozoa: feeding rates and their ecological significance," *Microb Ecol*, Bd. 6, pp. 13-25, 1980b.
- [30] T. Fenchel, „Protozoan filter feeding," *Progr Protistol*, Bd. 1, pp. 65-113, 1986.
- [31] S. Baines, H. A. Hawkes, C. H. Hewitt und S. H. Jenkins, „Protozoa as

- indicators in activated sludge treatment," *Sewage indust Wastes* 25, pp. 1024-1033, 1953.
- [32] T. Fenchel und P. R. Jonsson, „The functional biology of *Strombidium sulcatum*, a marine oligotrichciliate (Ciliophora, Oligotrichina),“ *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Nr. 48, pp. 1-15, 1988.
- [33] E. B. Sherr und B. F. Sherr, „High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates,“ *Nature*, Nr. 325, 1989.
- [34] H. Augustin, W. Foissner und R. Bauer, „Die Zählung von Protozoen und kleinen Metazoen im Belebtschlamm,“ *Acta hydrochim hydrobiol* 17, pp. 375-386, 1989.
- [35] H. Güde, „Wechselbeziehungen Bakterien - Protozoen: Ein Beitrag zur ökosystemaren Betrachtungsweise der biologischen Abwasserreinigung,“ in *Ökologie der Abwasserorganismen*, H. Lemmer, T. Griebe und H. C. Flemming, Hrsg., Fischer Jena, 1996, pp. 13-24.
- [36] D. P. Witthauer, „Biocoenosis and degradation in modelwastewater treatment plants,“ *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Bd. 9, Nr. 2, pp. 151-163, 1980.
- [37] M. Clarholm, „Microbes as predators or prey,“ in *Current Perspectives on Microbial Ecology*, Washington, DC, 1984, pp. 321-326.
- [38] C. R. Curds, „The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes,“ *Annual Review of Microbiology*, Bd. 36, pp. 27-46, 1982.
- [39] R. Sudo und S. Aiba, „Role and function of protozoa in the biological treatment of polluted waters,“ *Adv Biochem Eng Biotechnol*, Nr. 29, pp. 117-141, 1984.
- [40] M. Macek, „Single-species ciliate cultures controlling bacterial flocs distribution,“ in *Biological approach to sewage treatment process: current status and perspectives*, P. Madoni, Hrsg., Perugia, Italy, Centro Luigi Bazzuchi, 1991, pp. 109-114.

- [41] M. Macek und P. Hartmann, „Elimination of special bacteria from treatment effluent by ciliates,“ *Stud Environ Sci*, Nr. 42, pp. 113-119, 1991.
- [42] M. Macek, P. Hartmann und I. Škopová, „Participation of a specific substrate degrading strain in a mixed bacteria culture as a result of ciliate grazing,“ *Int Revue ges Hydrobiol*, Bd. 78, Nr. 4, pp. 557-574, 1993.
- [43] S. R. Farrah, P. R. Scheuerman, R. D. Eubanks und G. Bitton, „Bacteria and viruses in aerobically digested sludge: influence of physical and chemical treatments on survival and association with flocs under laboratory conditions,“ *Water Sci Technol*, Bd. 17, Nr. 10, pp. 165-174, 1985.
- [44] C. H. Ratsak, B. W. Kooi und H. W. Verseveld, „Biomass reduction and mineralization increase due to the ciliate *Tetrahymena pyriformis* grazing on the bacterium *Pseudomonas fluorescens*,“ *Water Sci Technol*, Bd. 29, Nr. 7, pp. 119-128, 1994.
- [45] R. Sommaragu und R. Psenner, „Permanent presence of grazing-resistant bacteria in a hypertrophic lake,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 61, Nr. 9, pp. 3457-3459, 1995.
- [46] K. Jürgens und G. Stolpe, „Seasonal dynamics of crustacean zooplankton, heterotrophic nanoflagellates and bacteria in a shallow, eutrophic lake,“ *Freshwater Biol*, Nr. 33, pp. 27-38, 1995.
- [47] S. Shikano, L. S. Luckinbill und Y. Kurihara, „Changes of traits in a bacterial population associated with protozoan grazing,“ *Microb Ecol*, Nr. 20, pp. 75-84, 1990.
- [48] K. Jürgens, H. Arndt und H. Zimmermann, „Impact of metazoan and protozoan grazers on bacterial biomass distribution in microcosm experiments,“ *Aquat Microb Ecol*, Nr. 12, pp. 131-138, 1997.
- [49] J. F. Blom, Y. S. Zimmermann, T. Ammann und J. Pernthaler, „Scent of Danger: Floc Formation by a Freshwater Bacterium Is Induced by Supernatants from a Predator-Prey Coculture,“ *Appl Environ Microbiol.*, Bd.

- 76, Nr. 18, p. 6156–6163, 2010.
- [50] J. W. Costerton, *The Biofilm Primer*, Springer Verlag, 2007.
- [51] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber und H. M. Lappin-Scott, „Microbial biofilms,“ *Annu Rev Microbiol* 49, pp. 711-745, 1995.
- [52] P. Stoodley, S. Wilson, L. Hall-Stoodley, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott und J. W. Costerton, „Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 67, Nr. 12, p. 5608–5613, 2001.
- [53] K. Garny, H. Horn und T. R. Neu, „Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors,“ *Bioprocess Biosyst Eng*, Nr. 31, p. 619–629, 2008.
- [54] J. B. Kaplan, „Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses,“ *J Dent Res*, Bd. 89, Nr. 3, pp. 205-218, 2010.
- [55] J. S. Webb, „Differentiation and dispersal in biofilms,“ in *Bacterial Biofilm Formation and Adaptation*, S. Kjelleberg und M. Givskov, Hrsg., Horizon Scientific Press, 2006, pp. 165-174.
- [56] A. M. Baty, C. C. Eastburn, S. Techkarnjanaruk, A. E. Goodman und G. G. Geesey, „Spatial and Temporal Variations in Chitinolytic Gene Expression and Bacterial Biomass Production during Chitin Degradation,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 66, Nr. 8, p. 3574–3585, 2000.
- [57] R. C. Curds, A. Cockburn und J. M. Vandyke, „An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process,“ *Wat Pollut Control*, Bd. 67, pp. 312-329, 1968.
- [58] A. R. Pitman, „Bioflocculation as means of improving the dewatering characteristics of activated sludges,“ *Water Pollut Control*, Bd. 74, Nr. 6, pp. 688-700, 1975.

- [59] G. Esteban, C. Tellez und L. M. Bautista, „Effects of habitat quality on ciliated protozoa communities in sewage treatment plants,“ *Environ Technol*, Bd. 12, Nr. 4, pp. 381-386, 1990.
- [60] G. Fernandez-Leborans und P. Moro, „Annual performance of a full-scale activated-sludge plant. Biotic components and new criteria for process assessment,“ *Bioresour Technol*, Bd. 38, Nr. 1, pp. 7-14, 1991.
- [61] H. Salvado, M. P. Gracia und J. M. Amigo, „Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants,“ *Water Res*, Bd. 29, Nr. 4, pp. 1041-1050, 1995.
- [62] T. Sasahara und T. Ogawa, „Treatment of brewery effluent. Part VIII: Protozoa and metazoa found in the activated sludge process for brewery effluent,“ *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Nr. 11, pp. 443-448, 1983.
- [63] M. Scholz und R. Martin, „Ecological equilibrium on biological activated carbon,“ *Water Research*, Bd. 31, Nr. 12, pp. 2959-2968., 1997.
- [64] M. K. C. Sridhar und S. C. Pillai, „Enzymic approach to the study of sewage and sludges,“ *Environ Pollut*, Bd. 6, Nr. 3, pp. 195-220, 1974.
- [65] E. G. H. Lee, J. C. Mueller und C. C. Walden, „Effect of temperature and sludge loading on BOD5 [five-day biochemical oxygen demand] removal and sludge settleability in activated sludge systems treating bleached kraft effluents,“ *Tappi*, Bd. 58, Nr. 6, pp. 100-103, 1975.
- [66] N. Kakiichi, S. Kamata, O. Ito, K. Komine, H. Otsuka und K. Uchida, „Effects of orthodichlorobenzene preparation and polyhexamethylene biguanide hydrochloride on activated sludge,“ *Animal Science and Technology*, Bd. 62, Nr. 1, pp. 32-38, 1991.
- [67] N. Kakiichi, T. Yamamoto, S. Kamata, H. Otsuka und K. Uchida, „Toxicity of amphoteric surfactant, biguanide compounds and orthodichlorobenzene preparation against ciliate *Colpoda aspera*,“ *Animal Science and Technology*, Bd. 64, Nr. 10, pp. 1013-1016, 1993.

- [68] C. R. Curds und G. J. Fey, „The effect of ciliated protozoa on the fate of *Escherichia coli* in the activated-sludge process,“ *Wat Res* 3, pp. 853-867, 1969.
- [69] P. Foladori, L. Bruni, S. Tamburini und G. Ziglio, „Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry,“ *Water Research*, Bd. 44, pp. 3807-3818, 2010.
- [70] E. v. Münch und P. C. Pollards, „measuring bacterial biomass-COD in wastewater containing particulate matter,“ *Wat. Res. Vol.*, Bd. 31, Nr. 10, pp. 2550-2556, 1997.
- [71] H. Melcer, *Methods for Wastewater Characterization in Activated Sludge Modeling*, IWA Publishing, 2003.
- [72] M. P. Pescod, *Wastewater treatment and use in agriculture*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1992.
- [73] M. Macek, „Experimental approach to the role of different ecological types of Protozoa in the activated-sludge system,“ *Int Rev Ges Hydrobiol*, Bd. 74, Nr. 6, pp. 643-656, 1989.
- [74] C. Curds und H. Hawkes, Hrsg., *Ecological aspects of used-water treatment*, London, New York: Academic Press, 1975.
- [75] Y. Yoshioka, H. Nagase, Y. Ose und T. Sato, „Evaluation of the test method activated sludge, respiration inhibition test proposed by the OECD,“ *Ecotox Environ Saf*, Bd. 12, pp. 206-212, 1986.
- [76] W. Pauli und S. Berger, „A new Toxkit microbiotest with the protozoan ciliate *Tetrahymena*,“ in *New Microbiotests for Routine Toxicity Testing and Biomonitoring*, New York, 1999.
- [77] K. S. Mudrack K, *Biologie der Abwasserreinigung*, Stuttgart: G Fischer Verlag, 1994.

- [78] „<http://www.bwb.de>,“ Berliner Wasserbetriebe, [Online]. Available: http://www.bwb.de/content/language1/downloads/KW-Ruhleben_5-07.pdf. [Zugriff am 6 Mai 2011].
- [79] „<http://www.ebs.co.at>,“ ebswien hauptkläranlage Ges.m.b.H., [Online]. Available: <http://www.ebs.co.at/index.php?id=325>. [Zugriff am 6 Mai 2011].
- [80] M. Dohan, „Rotifera,“ in *Ecological Aspects of Used-water Treatment*, London, New York, San Francisco, Academic Press, 1975.
- [81] H. J. M. Verhaar, C. J. van Leeuwen und L. M. Hermens, „Classifying environmental pollutants. 1: Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicity,“ *Chemosphere*, Bd. 25, Nr. 4, pp. 471-491., 1992.
- [82] R. A. Mooney, „Use of digitonin-permeabilized adipocytes for cAMP studies,“ *Methods Enzymol.*, pp. 193-202, 1988.
- [83] U. Hammer, „Zell-basierter Biosensor mit Tetrahymena,“ Diplomarbeit FB Biologie, FU Berlin, 2004.
- [84] A. Kretlow, Phagozytose von Tetrahymena zur Kurzzeitindikation umweltrelevanter Chemikalien, Diplomarbeit, FB Biologie, FU Berlin., 2001.
- [85] T. W. Schultz, G. W. Holcombe und G. L. Phipps, „Relationships of quantitative structure-activity to comparative toxicity of selected phenols in the *Pimephales promelas* and *Tetrahymena pyriformis* test systems,“ *Ecotoxicol. Environ. Safety*, Bd. 12, pp. 146,153.
- [86] EPA White Paper, „Predicting the Toxicities of Chemicals to Aquatic Animal Species,“ 2010.
- [87] W. Pauli, „Durchführung eines internationalen Ringtests zur Validierung des Biotestsystems „Indikation ökotoxischer Wirkungen von Umweltchemikalien durch Tetrahymena“,“ Umweltbundesamt, Berlin, 2004.

- [88] W. H. J. Vaes, E. U. Ramos, H. J. M. Verhaar und J. L. M. Hermens, „Acute toxicity of nonpolar versus polar narcosis: Is there a difference?“, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 17 (7), pp. 1380-1384, 1998.
- [89] C. M. Ellison, M. T. D. Cronin, J. C. Madden und T. W. Schultz, „Definition of the structural domain of the baseline non-polar narcosis model for *Tetrahymena pyriformis*“, *SAR and QSAR in Environmental Research*, Vol. 19 (7–8), p. 751–783, 2008.
- [90] M. Pavan, A. P. Worth und T. I. Netzeva, „Preliminary Analysis of an Aquatic Toxicity Dataset and Assessment of QSAR Models for Narcosis“, EUROPEAN COMMISSION, DIRECTORATE GENERAL, JOINT RESEARCH CENTRE, Ispra (VA) Italy, 2005.
- [91] I. Lessigiarska, Development of Structure-Activity Relationships for Pharmacotoxicological Endpoints relevant to European Union Legislation, PhD Theses: Liverpool John Moores University, UK, 2006.
- [92] University of Tennessee, [Online]. Available: <http://www.vet.utk.edu/TETRATOX/pdf/AliphaticToxicityTable.pdf>. [Zugriff am 16.11.2012].
- [93] J. R. Seward und T. Schultz, „QSAR Analyses of the Toxicity of Aliphatic Carboxylic Acids and Salts to *Tetrahymena Pyriformis*“, *SAR and QSAR in Environmental Research*, Bd. 10:6, pp. 557-567, 1999.
- [94] A. P. Bearden, B. W. Gregory und T. Schultz, „Growth kinetics of preexposed and naive populations of *Tetrahymena pyriformis* to 2-decanone and acetone“, *Ecotoxicol Environ Saf.*, Bd. 37, Nr. 3, pp. 245-250, 1997.
- [95] O. Ivanciuc, „Aquatic Toxicity Prediction for Polar and Nonpolar Narcotic Pollutants with Support Vector Machines.“, *Internet Electronic Journal of Molecular Design*, Nr. 2, p. 195–208, 2003.
- [96] C. Hansch, A. Leo und D. Hoekman, Exploring QSAR, Hydrophobic, Electronic and Steric Constants, Bd. 2, Washington: American Chemical

Society, 1995, pp. 3-193.

- [97] J. Sangster, „Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds,“ *J phys chem*, Bd. 18, pp. 1111-1229, 1989.
- [98] Sigma-Aldrich, „SAFETY DATA SHEET according to Regulation (EC) No. 1907/2006, Version 4.1, Revision Date 13.09.2012, Print Date 18.11.2012“.
- [99] CSID:125245, „www.chemspider.com,“ [Online]. Available: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.125245.html>. [Zugriff am 18. 11. 2012].
- [100] IPCS Peer Review Committee, „ICSC 0415, International Chemical Safety Cards, October 23, 1995 Validated“.
- [101] A. Leo, C. Hansch und D. Elkins, „ Partition coefficients and their uses,“ *Chemical Reviews*, Bd. 71, Nr. 6, pp. 525-616, 1971.
- [102] M. Gustin und T. M. Hennessey, „Neomycin inhibits the calcium current of Paramecium,“ *Biochim.Biophys. Acta*, Nr. 940, pp. 99-104, 1988.
- [103] Polymyxin B, „Microbiology and Immunology On-line,“ 19 Februar 2010. [Online]. Available: <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/antibiotics1.htm>. [Zugriff am 22 November 2012].
- [104] M. Rosenberg, „Bacterial adherence to hydrocarbons: A useful technique for studying cell surface hydrophobicity,“ *FEMS Microbiolo. Letter*, pp. 289-295, 1984.
- [105] H. Rüfer und K. Mudrack, Anleitung zur Durchführung und Auswertung einfacher Untersuchungen in Kläranlagen, Technische Universität Hannover: Eigenverlag des Inst. f. Siedlungswasserwirtschaft, 1972.
- [106] W. Ghyoot und W. Verstraete, „Reduced sludge production in a two-stage membrane-assisted bioreactor,“ *Water Research*, Bd. 34, Nr. 1, pp. 205-215, 2000.
- [107] Y. Lee und J. A. Oleszkiewicz, „Effects of predation and ORP conditions on

- the performance of nitrifiers in activated sludge systems," *Water Res.*, Bd. 37, Nr. 17, pp. 4202-4010, 2003.
- [108] K. Rychert und T. Neu, „Protozoan impact on bacterial biofilm formation," *Biological Letters*, Bd. 47, Nr. 1, pp. 3-10, 2010.
- [109] W. Pauli, „Tetrahymena Proliferation Rate and Maximal Density," *The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology, INVITTOX Protocol 75*, pp. 1-17, 1994.
- [110] Klärwerk Ruhleben, „www.bwb.de/content/language1/downloads/KW-Ruhleben_5-07.pdf," [Online]. Available: http://www.bwb.de/content/language1/downloads/KW-Ruhleben_5-07.pdf. [Zugriff am 20.12.2012].
- [111] tinavienna, „<http://www.tinavienna.at>," 2012. [Online]. Available: <http://www.tinavienna.at/hauptklaeranlage>. [Zugriff am 20.12.2012].
- [112] Stadtentwässerung Dresden, „www.stadtentwaesserung-dresden.de," 2012. [Online]. Available: <http://www.stadtentwaesserung-dresden.de/tycon/file.php?id=2564>. [Zugriff am 20.12.2012].
- [113] T. W. Schultz, M. T. D. Cronin, J. D. Walker und A. O. Aptula, „Quantitative structure–activity relationships (QSARs) in toxicology: a historical perspective," *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, Nr. 622, pp. 1-22, 2003.
- [114] W. Pauli, „Protozoen in der biologischen Abwasserreinigung - eine Literaturübersicht," Umweltbundesamt, Berlin, 1996.
- [115] W. Pauli, K. Jax und S. Berger, „Protozoa in Wastewater Treatment: Function and Importance," in *Biodegradation and Persistence*, B. Beek, Hrsg., Berlin Heidelberg, New York, Springer, 2001, pp. 203-252.
- [116] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott und K. M. Jones, *Data for biochemical research (third edition)*, Oxford Science Publications, 1986.
- [117] T. Schneider-Poetsch, J. Ju, D. Eyler, Y. Dang, S. Bhat, W. C. Merrick, R. Green, B. Shen und J. O. Liu, „Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation

- by Cycloheximide and Lactimidomycin," *Nat Chem Biol.* 6(3), 2010.
- [118] VWR International, „Fertignährmedien, Zählung, Isolierung, Identifizierung und Kultivierung von Bakterien Hefen und Schimmelpilzen,“ 2012.
- [119] M. Clotworthy und D. Traynor, „On the effects of cycloheximide on cell motility and polarisation in *Dictyostelium discoideum*,“ *BMC Cell Biology*, Bd. 7, Nr. 5, 2006.
- [120] B. F. Sherr, E. B. Sherr, T. L. Andrew, R. D. Fallon und S. Y. Newell, „Trophic interactions between heterotrophic protozoa and bacterioplankton in estuarine water analysed using selective metabolic inhibitors,“ *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Bd. 32, pp. 169-180.
- [121] G. T. Taylor und M. L. Pace, „Validity of Eucaryote Inhibitors for Assessing Production and Grazing Mortality of Marine Bacterioplankton,“ *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, pp. 119-128, 1987.
- [122] R. W. Sanders und K. G. Porter, „Use of metabolic inhibitors to estimate protozooplankton grazing and bacterial production in a monomictic eutrophic lake with anaerobic hypolimnion,“ *Appl. Environ. Microbiol.*, Nr. 52, pp. 101-107, 1986.
- [123] M. Suhama und E. D. Hanson, „The role of protein synthesis in predivision morphogenesis of *Paramecium aurelia*,“ *J. Exp. Zool.*, Nr. 177, pp. 463-468, 1971.
- [124] E. Friedl, A. Miyake und K. Heckmann, „Requirement of successive protein syntheses for the progress of meiosis in *Blepharisma*,“ *Exp. Cell Res.*, Nr. 145, pp. 105-113, 1983.
- [125] A. Nicolau, M. Mota und N. Lima, „Physiological responses of *Tetrahymena pyriformis* to copper, zinc, cycloheximide and Triton X-100,“ *FEMS Microbiology Ecology*, Nr. 30, pp. 209-216, 1999.
- [126] G. Francis, Z. Kerem, H. P. S. Makkar und K. Becker, „The biological action of saponins in animal systems: a review,“ *British Journal of Nutrition*, Nr. 88,

- pp. 587-605, 2002.
- [127] F. Dohme, A. Machmüller, B. L. Estermann, B. Pfister, A. Wasserfallen und M. Kreuzer, „The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil,“ *Letters in Applied Microbiology*, Nr. 29, pp. 187-192, 1999.
- [128] M. Virta, K. E. O. Åkerman, P. Saviranta, C. Oker-Blom und M. T. Karp, „Real-time measurement of cell permeabilization with low-molecular weight membranolytic agents,“ *J Antimicrob Chemother*, Bd. 36, Nr. 2, pp. 303-315, 1995.
- [129] M. Nishikawa, S. Nojima, T. Akiyama, U. Sankawa und K. Inoue, „Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol,“ *J. Biochem.*, Nr. 96, pp. 1231-1239, 1984.
- [130] H. Gögelein und A. Hüby, „Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers,“ *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Bd. 773, Nr. 1, pp. 32-38, 1984.
- [131] K. Poralla und E. Kannenberg, „Hopanoids: Sterol Equivalents in Bacteria,“ *ACS Symposium Series*, Nr. 325, pp. 239-251, 1987.
- [132] L. Rothfield und A. Finkelstein, „Membrane biochemistry,“ *A. Rev. Biochem.* 37, 463-495, Nr. 37, p. 463, 1968.
- [133] A. Fiertel und H. Klein, „On sterols in bacteria,“ *J. Bacteriol.*, Bd. 78, Nr. 5, pp. 738-739, 1959.
- [134] P. E. Saikaly und D. Oerther, „Bacterial Competition in Activated Sludge: Theoretical Analysis of Varying Solids Retention Times on Diversity,“ *Micobial Ecology*, Nr. 48, pp. 274-284, 2004.
- [135] D. Mara und N. J. Horan, *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Academic press, London, 2003.
- [136] F. Holder-Snyman, A. A. H. Ismail, D. Mudaly und F. Bux, „Determination of heterotrophic active bacteria in activated sludge using novel molecular

- techniques," WRC Report No. 1178/1/05, 2005.
- [137] OECD 209, „Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation),“ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Effects on Biotic Systems, Test No. 209, 2010.
- [138] C. R. Curds, Protozoa and the water industry, Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
- [139] T. Falcioni, A. Manti, P. Boi, B. Canonico, M. Balsamo und S. Papa, „Comparison of Disruption Procedures for Enumeration of Activated Sludge Floc Bacteria by Flow Cytometry,“ *Cytometry*, Nr. 70B, p. 149–153, 2006.
- [140] K. Watanabe, M. Miyashita und S. Harayama, „Starvation Improves Survival of Bacteria Introduced into Activated Sludge,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 66, Nr. 9, p. 3905–3910, 2000.
- [141] J. L. Nielsen und P. H. Nielsen, „Enumeration of acetate-consuming bacteria by microautoradiography under oxygen and nitrate respiring conditions in activated sludge,“ *Water Research*, Nr. 36, p. 421–428, 2002.
- [142] V. R. F. Matias, M. Cammarota und G. Sant’Anna, „Extraction of activated sludge bacteria exopolymers by ultrasonication,“ *Biotechnology Letters*, Nr. 25, p. 1351–1356, 2003.
- [143] B. Frølund, R. Palmgren, K. Keiding und P. H. Nielsen, „Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin,“ *Water Res*, Nr. 30, p. 1749–1758, 1996.
- [144] T. Cloete und P. L. Steyn, „A combined membrane filter-immunofluorescent technique for the in situ identification and enumeration of Acinetobacter in activated sludge,“ *Water Res.*, Nr. 22, p. 961–969, 1988.
- [145] M. Winkler, Biological treatment of waste-water, Ellis Horwood-Publishers, Chichester, 1981.
- [146] Wikipedia - MLSS, „www.wikipedia.org,“ 2012. [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Mixed_liquor_suspended_solids. [Zugriff am

20. 12. 2012].
- [147] M. Henze, M. C. M. van Loosdrecht, G. Ekama und D. Brdjanovic, *Biological Wastewater Treatment - Principles, Modelling, and Design*, IWA Publishing, London, 2008.
- [148] N. F. Gray, *Biology of Wastewater Treatment*, World Scientific Publishing Company, 2004.
- [149] G. Bitton, *Wastewater Microbiology*, John Wiley & Sons, 2011.
- [150] T. Gentry, R. M. Maier, J. L. Pepper und C. P. Gerba, *Environmental Microbiology*, Academic Press, 2011.
- [151] A. Zita und M. Hermansson, „Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ,“ *FEMS Microbiol. Lett.*, Nr. 152, pp. 299-306, 1997.
- [152] A.-C. Olofson, A. Zita und M. Hermansson, „Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein.marked bacteria to flocs in activated sludge,“ *Microbiology*, Nr. 144, pp. 519-528, 1998.
- [153] V. Urbain, J. C. Block und J. and Manem, „Biofloculation in activated sludge: an analytical approach,“ *Water Res.*, Bd. 27, Nr. 5, p. 829–838, 1993.
- [154] E. K. Hoffmann, L. Rasmussen und E. Zeuthen, „Cytochalasin B: Aspects of phagocytosis in nutrient uptake in Tetrahymena,“ *J. Cell Sci.*, Nr. 15, pp. 403-406, 1974.
- [155] R. D. Allen und A. K. Fok, „Modulation of the digestive lysosomal system in Paramecium caudatum. III. Morphological effects of Cytochalasin B,“ *Eur. J. Cell Biol.*, Nr. 37, p. 35–43.
- [156] R. J. G. Leakey, S. A. Wills und A. W. A. Murray, „Can cytochalasin B be used as an inhibitor of feeding in grazing experiments on ciliates?,“ *Eur. J. Protistol.*, Nr. 30, p. 309–315.

- [157] H. K. Grønlien, B. T. und A. M. Løvlie, „In the polymorphic ciliate *Tetrahymena vorax*, the non-selective phagocytosis seen in microstomes changes to a highly selective process in macrostomes,“ *The Journal of Experimental Biology*, Nr. 205, p. 2089–2097, 2002.
- [158] D. H. J. Sydenham, „A re-assessment of the relative importance of ciliates, rhizopods and rotatorians in the ecology of activated sludge,“ *Hydrobiologia*, Bd. 38, Nr. 3-4, pp. 553-563, 1971.
- [159] D. H. Eikelboom, „Extra toepassingsmogelijkheden voor protozoa en metazoa bij de zuivering van afval-water, Nr. R88/286,“ Delft, 1988.
- [160] W. Foissner, „Mikroorganismen in extremen Lebensräumen,“ *Biologie in unserer Zeit*, Bd. 21, Nr. 6, p. 326–328, 1991.
- [161] F. R. Spellman, *Microbiology for Water and Wastewater Operators*, CRC Press, 1999.
- [162] O. B. Akpor und M. S. Muchie, „Bioremediation of polluted wastewater influent: Phosphorus and nitrogen removal,“ *Scientific Research and Essays*, Bd. 5, Nr. 21, pp. 3222-3230, 2010.
- [163] P. R. Jonsson, „Particle size selection, feeding rates and growth dynamics of marine planktonic oligotrichous ciliates (Ciliophora: Oligotrichina),“ *Marine Ecology-Progress Series*, Nr. 33, pp. 265-277, 1986.
- [164] T. Fenchel, „Relation between particle size selection and clearance in suspension-feeding ciliates,“ *Limnology and Oceanography*, Nr. 25, p. 733–738, 1980.
- [165] K. O. Rothhaupt, „Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species,“ *Limnol. Oceanogr.*, Bd. 35, Nr. 1, pp. 16-23, 1990.
- [166] A. Baer, C. Langdon, S. Mills, C. Schulz und K. Hamre, „Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* “Cayman” using polystyrene latex beads,“ *Aquaculture*, Nr. 282, p. 75–82,

- 2008.
- [167] O. Vadstein, G. Øie und Y. Olsen, „Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*,“ *Hydrobiologia*, Nr. 255/256, pp. 261-267, 1993.
- [168] J. Lapinski und A. Tunnacliffe, „Reduction of suspended biomass in municipal wastewater using bdelloid rotifers,“ *Water Research*, Nr. 37, p. 2027–2034, 2003.
- [169] A. Miquelis, C. Rougier und R. Pourriot, „Impact of turbulence and turbidity on the grazing rate of the rotifer *Brachionus calyciflorus* (Pallas),“ *Hydrobiologia*, Nr. 386, p. 203–211, 1998.
- [170] W. T. Calaway, „Metazoa of wastewater treatment processes - rotifers,“ *J Water Pollut Control Fed*, Bd. 40, Nr. 11, pp. 412-422, 1968.
- [171] E. v. Münch und P. C. Pollards, „measuring bacterial biomass-COD in wastewater containing particulate matter,“ *Wat. Res.*, Bd. 31, Nr. 10, pp. 2550-2556, 1997.
- [172] J. J. Garcia-Mesa, F. Delgado-Ramos, M. Muñio, E. Hontoria und J. M. Poyatos, „Comparison of Activated Sludge Technologies by Particle Size Analysis,“ *Water Air Soil Pollut*, Nr. 223, p. 4319–4331, 2012.
- [173] F. Morgan-Sagastume, P. Larsen, N. J. L. und P. H. Nielsen, „Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria,“ *Water Research*, Nr. 42, p. 843–854, 2008.
- [174] J. Vollertsen, A. Jahn, J. Lund Nielsen, T. Jacobsen und P. H. Nielsen, „Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater,“ *Wat. Res.*, Bd. 35, Nr. 7, p. 1649–1658, 2001.
- [175] J. Wu, X. Jiang und A. Wheatley, „Characterizing activated sludge process effluent by particle size distribution, respirometry and modeling,“ *Desalination*, Nr. 249, p. 969–975, 2009.

- [176] D. H. Eikelboom, Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation, IWA Publishing, London, 2000.
- [177] K. Li-Xia, X. Yi-Long, Z. Chun-Wang und D. Li-Li, „Effects of three organophosphorus pesticides on population growth and sexual reproduction of rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas,“ *Acta Ecologica Sinica*, Nr. 29, p. 182–185, 2009.
- [178] J. Mojzis, G. Mojzisova und F. Nistiar, „The effect of dichlorvos and polychlorinated biphenyl (Delor 103) on the protozoon *Tetrahymena pyriformis*,“ *Biologia (Bratisl.)*, Nr. 48, pp. 349-354, 1993.
- [179] P. S. Rajini, M. K. Krishnakumari und S. K. Majumder, „Cytotoxicity of certain organic solvents and organophosphorus insecticides to the ciliated protozoan *Paramecium caudatum*,“ *Microbios.*, Nr. 59, pp. 157-163, 1989.
- [180] M. W. Hahn und M. G. Höfle, „Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria,“ *FEMS Microbiology Ecology*, Nr. 35, pp. 113-121, 2001.
- [181] J. Miao, K. O. Hodgson, T. Ishikawa, C. A. Larabell, M. A. LeGros und Y. Nishino, „Imaging whole *Escherichia coli* bacteria by using single-particle x-ray diffraction,“ *PNAS*, Bd. 100, Nr. 1, pp. 110-112, 2003.
- [182] B. Volkmer und M. Heinemann, „Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of *Escherichia coli* to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling,“ *PLoS ONE* 6(7): e23126. doi:10.1371/journal.pone.0023126, 2011.
- [183] J. Wu und C. He, „Experimental and modeling investigation of sewage solids sedimentation based on particle size distribution and fractal dimension,“ *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, Bd. 7, Nr. 1, pp. 37-46, 2010.
- [184] A. Joss und M. Maurer, „Biofilters on the Test Bed,“ *Eawag News*, Nr. 60e, 2006.
- [185] W. D. Taylor, „Growth Responses of Ciliate Protozoa to the Abundance of

- Their Bacterial Prey," *Microbial Ecology*, Nr. 4, pp. 207-214, 1978.
- [186] N. J. Horan, Biological wastewater treatment systems. Theorie and operation, John Wiley and Sons, Chichester, 1990.
- [187] T. Fenchel, „Ecology of Heterotrophic Microflagellates.II. Bioenergetics and Growth," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Nr. 8, pp. 225-231, 1982.
- [188] Q. L. Wu, J. Boenigk und M. W. Hahn, „Successful Predation of Filamentous Bacteria by a Nanoflagellate Challenges Current Models of Flagellate Bacterivory," *Appl. Environ. Microbiol.*, Bd. 70, Nr. 1, pp. 332-339, 2004.
- [189] T. Schultz, „TETRATOX: Tetrahymena pyriformis population growth impairment endpoint - a surrogate for fish lethality," *Toxicol. Mech. Meth.*, Bd. 7, Nr. 4, p. 289–309, 1997.
- [190] R. W. Crites und G. Tchobanoglous, Small and decentralized wastewater management systems, WCB/McGraw-Hill, 1998.
- [191] Wärmerückgewinnung aus Abwasser, „<http://www.baunetzwissen.de>," 2012. [Online]. Available: http://www.baunetzwissen.de/standardartikel/Heizung_Waermerueckgewinnung-aus-Abwasser_161422.html. [Zugriff am 20 10 2012].
- [192] G. Tchobanoglous, F. L. Burton und H. D. Stensel, Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, McGraw-Hill, 2002.
- [193] P. Krzeminski, A. Iglesias-Obelleiro, G. Madebo, J. M. Garrido, J. H. J. M. van der Graaf und J. B. van Lier, „Impact of temperature on raw wastewater composition and activated sludge filterability in full-scale MBR systems for municipal sewage treatment," *Journal of Membrane Science*, Nr. 423-424, pp. 348-361, 2012.
- [194] M. von Sperling, Activated Sludge and Aerobic Biofilm Reactors Biological Wastewater Treatment Series (Volume 5), IWA Publishing, 2007.
- [195] C. N. Sawyer und G. A. Rohlich, „Activated Sludge Oxidations: IV. The Influence of Temperature upon the Rate of Oxygen Utilization by Activated

- Sludges," *Sewage Works Journal*, Bd. 11, Nr. 6, pp. 946-964, 1939.
- [196] D. Koers und D. A. Mavinic, „Aerobic Digestion of Waste Activated Sludge at Low Temperatures," *Journal (Water Pollution Control Federation)*, Bd. 49, Nr. 3, pp. 460-468, 1977.
- [197] H. Salvado, „Effect of mean cellular retention time on ciliated protozoan populations in urban wastewater treatment plants based on a proposed model," *Water Research*, Bd. 28, Nr. 6, pp. 1315-1321, 1994.
- [198] N. E. Kinner und C. R. Curds, „Development of protozoan and metazoan communities in rotating biological contactor biofilms," *Water Res*, Bd. 21, Nr. 4, pp. 481-490, 1987.
- [199] C. R. Curds, „Protozoa," in *Ecological Aspects of Used-water Treatment*, London, NY, San Francisco, Academic Press, 1975, pp. 203-268.
- [200] R. C. Curds und A. Cockburn, „Protozoa in biological sewage-treatment processes. II. Protozoa as indicators in the activated- sludge process," *Water Research 4*, pp. 237-249, 1970b.
- [201] H. Salvado und M. P. Gracia, „Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis," *Water-Research*, Bd. 27, Nr. 5, pp. 891-895, 1993.
- [202] D. Dubber und N. F. Gray, „The influence of fundamental design parameters on ciliates community structure in Irish activated sludge systems," *European Journal of Protistology*, Bd. 47, Nr. 4, pp. 274-286, 2011.
- [203] C. R. Curds und J. M. Vandyke, „The Feeding Habits and Growth Rates of Some Fresh-Water Ciliates Found in Activated-Sludge Plants," *Journal of Applied Ecology*, Bd. 3, Nr. 1, pp. 127-137, 1966.
- [204] B. Nisbet, *Nutrition and Feeding Strategies in Protozoa*, Springer Verlag, 1983.

- [205] C. R. Curds, „Computer simulations of microbial population dynamics in the activated-sludge process,“ *Water Research*, Bd. 5, Nr. 11, pp. 1049-1066, 1971.
- [206] P. Madoni, „Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency,“ in *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, D. Mara und N. J. Horan, Hrsg., Academic Press, 2003, p. 361–371.
- [207] M. Henze, „Wastewater Volumes and Composition,“ in *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes. Biological and Chemical Processes. Series: Environmental Science and Engineering. Subseries: Environmental Engineering*, U. Förstner, R. Murphy und W. H. Rulkens, Hrsg., Springer Verlag, 2002, pp. 11-42.
- [208] R. Klopp, „Berechnung und Planung der Klärwerke,“ in *Taschenbuch der Stadtentwässerung*, K. Imhof und K. R. Imhof, Hrsg., Oldenburg Industrie-verlag, 2006.
- [209] UNI Weimar, „<http://www.uni-weimar.de>,“ 2012. [Online]. Available: http://www.uni-weimar.de/Bauing/siwawi/lehre/_VL/safe/vuad_abwasser_entsorgung/6/charakterisierung_von_abwasser.pdf. [Zugriff am 10 20 2012].
- [210] S. Weijers, „Modelling, Identification and Control of Activated Sludge Plants for Nitrogen Removal,“ Dissertationsschrift Technische Universiteit Eindhoven, 2000.
- [211] P. L. Dold, R. M. Jones und I. Takacs, „Practical Guidance for WWTP Model. Calibration and Associated Data Gathering Requirement,“ *Proceedings of the Water Environment Federation, WEFTEC*, Nr. 23, pp. 202-224, 2003.
- [212] D. A. Caron, „Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures,“ *Appl Env Microbiol*, Nr. 46, pp. 491-498, 1983.

- [213] protozoa-microscopy, „www.microscopy-uk.org.uk,“ 2012. [Online]. Available: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/art97b/prointro.html>. [Zugriff am 20 10 2012].
- [214] B. M. Baldock, „A Method for Enumerating Protozoa in a Variety of Freshwater Habitats,“ *Microbial Ecology*, Bd. 12, Nr. 2, pp. 187-191, 1986.
- [215] D. K. Stoecker, D. J. Gifford und M. Putt, „Preservation of marine planktonic ciliates: losses and cell shrinkage during fixation,“ *Mar Ecol Prog Ser*, Nr. 110, pp. 293-299, 1994.
- [216] B. M. Auinger, K. K. Pfandl und J. Boenigk, „Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 74, Nr. 8, pp. 2505-2510, 2008.
- [217] T. Sime-Ngando, H. J. Hartmann und C. A. Groliere, „Rapid Quantification of Planktonic Ciliates: Comparison of Improved Live Counting with Other Methods,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 56, Nr. 7, pp. 2234-2242, 1990.
- [218] S. M. Adl, D. Acosta-Mercado, T. R. Anderson und D. H. Lynn, „Protozoa, supplementary material,“ in *Soil Sampling and Methods of Analysis, 2nd edition*, M. Carter und E. Gregorich, Hrsg., CRC Press, 2007.
- [219] A. Dopheide, G. Lear, R. Stott und G. Lewis, „Relative Diversity and Community Structure of Ciliates in Stream Biofilms According to Molecular and Microscopy Methods,“ *Appl Environ Microbiol*, Bd. 75, Nr. 16, p. 5261–5272, 2009.
- [220] C. Gendig, G. Domogala, F. Agnoli, U. Pagga und U. J. Strotmann, „Evaluation and further development of the activated sludge respiration inhibition test,“ *Chemosphere*, Nr. 52, p. 143–149, 2003.
- [221] D. Smith, M. J. Ryan und J. G. Day, Biological Resource: Properties, Maintenance and Management, The UK National Culture Collection (UKNCC), 2001.

- [222] OECD 23, „OECD Series on Testing and Assessment, Number 23, Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures,“ OECD, 2000.
- [223] OECD 201, „OECD Guidelines for testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test,“ OECD, 2011.
- [224] OECD 316, „OECD Guidelines for testing of chemicals. Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis,“ OECD, 2008.
- [225] OECD 202, „OECD Guidelines for testing of chemicals. Daphnia sp. Acute Immobilisation test,“ OECD, 2004.
- [226] P. Catalfamo, P. Primerano, I. Arrigo und F. Corigliano, „Use of a glass residue in the removal of heavy metals from wastewater,“ *Ann Chim*, Bd. 96, Nr. 7-8, pp. 487-492, 2006.
- [227] S. C. Lung, L. M. Altshul, T. E. Ford und J. D. Spengler, „Coating effects on the glass adsorption of polychlorinated biphenyl (PCB) congeners,“ *Chemosphere*, Bd. 41, Nr. 12, pp. 1865-1871, 2000.
- [228] H. B. Bull, „Adsorption of bovine serum albumin on glass,“ *Biochim. Biophys. Acta*, Nr. 19, pp. 464-471, 1956.
- [229] H. Zielke, Time-related alterations and other confounding factors in direct sediment contact tests, Dissertation RWTH Aachen, 2011.
- [230] G. W. Stratton, „The influence of solvent type on solvent-pesticide interactions in bioassays,“ *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Bd. 14, Nr. 6, pp. 651-658, 1985.
- [231] O. Yutaka, „Organic solvents and surfactants for toxicity test using aquatic organisms and their acceptable concentrations,“ *Bulletin of the National Research Institute of Fisheries Science*, Nr. 11, pp. 113-134, 1998.
- [232] J. Larsen, T. W. Schultz, L. Rasmussen, R. Hooftman und W. Pauli, „Progress in an ecotoxicological standard protocol with protozoa: results from a pilot ring test with *Tetrahymena pyriformis*,“ *Chemosphere*, Bd. 35, Nr. 5, pp.

1023-1041, 1997.

- [233] H. J. Motulsky und A. Christopoulos, *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting*, Oxford University Press, 2004.
- [234] OECD 54, „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54,“ OECD, Paris, 2006.
- [235] J. Sebaugh, „Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation,“ *Pharm Stat.*, Bd. 10, Nr. 2, pp. 128-134, 2011.
- [236] C. Book, „<http://www.chemicalbook.com>,“ 2008. [Online]. Available: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB5117046_EN.htm2008. [Zugriff am 20. 12. 2012].
- [237] TOXNET, „<http://toxnet.nlm.nih.gov>,“ 2009. [Online]. Available: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+934>. [Zugriff am 05. 12. 2012].
- [238] R. G. Thomas, „Volatilization from water,“ in *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, W. J. Lyman, W. F. Reehl und D. H. Rosenblatt, Hrsg., American Chemical Society, Washington DC, 1990, pp. 15.1-15-34.
- [239] OECD Environmental Outlook, „Environmental Outlook for the Chemicals Industry,“ Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, 2001.
- [240] OECD - HPV Chemicals , „The 2004 OECD List of High Production Volume Chemicals,“ Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, 2004.
- [241] K. van Leeuwen, T. Schultz, T. Henry, B. Diderich und G. D. Veith, „Using chemical categories to fill data gaps in hazard assessment,“ *SAR QSAR Environ. Res.*, Bd. 20, Nr. 3-4, pp. 207-220, 2009.

- [242] C. Russom, S. P. Bradbury, S. J. Broderius, D. E. Hammermeister und R. A. Drummond, „Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, *Environ. Tox. Chem.*, Bd. 16, Nr. 5, pp. 948-967, 1997.
- [243] alttox.org, „Validation, Regulatory Acceptance & International Harmonization,“ The Humane Society of the United States and Procter & Gamble, [Online]. Available: <http://alttox.org/ttrc/validation-ra/> Last Updated: December 6, 2007. [Zugriff am 20. 10. 2012].
- [244] T. Li, R. Bai und J. Liu, „Distribution and composition of extracellular polymeric substances in membrane-aerated biofilm,“ *Journal of Biotechnology*, Bd. 135, Nr. 1, pp. 52-57, 2008.
- [245] I. Zenz und H. Mayr, „Electrophilicities of trans- β -Nitrostyrenes,“ *J. Org. Chem.*, Bd. 76, Nr. 22, p. 9370–937, 2011.
- [246] B. Fisher, „Pentachlorophenol: Toxicology and Environmental Fate,“ *Journal of Pesticide Reform*, Bd. 11, Nr. 1, pp. 2-5, 1991.
- [247] WebWISER Pentachlorophenol, „WebWISER,“ US-National Library of Medicine, 2012. [Online]. Available: <http://webwiser.nlm.nih.gov/getSubstanceData.do?substanceID=101&displaySubstanceName=&UNNAID=&STCCID=&selectedDataMenuID=76>. [Zugriff am 20. 12. 2012].
- [248] M. Tsezos und J. P. Bell, „Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass,“ *Water Res.*, Bd. 23, pp. 561-568, 1989.
- [249] J. Albert, T. Millis und Y. Suyama, „Effects of Chloramphenicol and Cycloheximide on the Biosynthesis of Mitochondrial Ribosomes in Tetrahymena,“ *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 247, Nr. 12, pp. 4063-4073, 1972.
- [250] R. Perasso, J.-J. Curgy, N. Stelly und J. Andre, „Effects of Chloramphenicol on the Mitochondrial Respiratory Chain in the Wild Strain and in a Cytoplasmic Chloramphenicol-Resistant Mutant of Tetrahymena

- pyriformis," *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 2, Nr. 6, pp. 715-719, 1982.
- [251] H. J. Balbi, „Chloramphenicol: a review," *Pediatrics Rev.*, Nr. 25, p. 284–288, 2004.
- [252] G. Turner und D. Lloyd, „The Effect of Growth with Chloramphenicol on the Mitochondria of *Tetrahymena pyriformis* Strain ST," *Biochem J.*, Bd. 116, Nr. 4, p. 41p, 1970.
- [253] F. K. Gleason, M. P. Ooka, W. P. Cunningham und A. B. Hooper, „Effect of chloramphenicol on replication of mitochondria in *Tetrahymena*," *J Cell Physiol*, Bd. 85, Nr. 1, pp. 59-72, 1975.
- [254] J. R. Nilsson, „Effects of Chloramphenicol on the Physiology and Fine Structure of *Tetrahymena pyriformis* GL: Correlation Between Diminishing Inner Mitochondrial Membrane and Cell Doubling," *Protoplasma*, Nr. 135, pp. 1-11, 1986.
- [255] J. Marešová, M. Horník, M. Pipíška und J. Augustín, „Sorption of Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Cs^{+} ions by activated sludge of sewage treatment plant," *Nova Biotechnol*, Nr. 10, pp. 53-61, 2010.
- [256] J. L. Gama-Flores, S. S. S. Sarma und S. Nandini, „Exposure time-dependent cadmium toxicity to *Moina macrocopa* (Cladocera): a life table demographic study," *Aquat Ecol*, Nr. 41, p. 639–648, 2007.
- [257] IUCLID, „database IUCLID (the International Uniform Chemical Information Database)," Europäisches Chemikalienbüro (ECB), Ispra, 1998.
- [258] N. Narita, M. Takahashi und R. Shoji, „Rapid Activated Sludge Respiration Inhibition Test Performed by CO_2 Producing Rate Using a Carbon Dioxide Sensor," *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, Bd. 40, Nr. 11, pp. 1987-1996, 2005.
- [259] M. Balls, B. Blaauboer, J. Fentem, L. Bruner, R. D. Combes, B. Ekwall und R. J. Fielder, „Practical aspects of the validation of toxicity test procedures –

- the report and recommendations of ECVAM workshop 5," *ATLA*, Nr. 23, pp. 129-147, 1995.
- [260] Scientific Committee on Cosmetic Products, „Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetics Directive," ECVAM (30/04/04). SCCNFP/0834/04, Brüssel, 2004.
- [261] OECD 2006, „CURRENT APPROACHES IN THE STATISTICAL ANALYSIS OF ECOTOXICITY DATA: A GUIDANCE TO APPLICATION," OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18: , 2006.
- [262] MLSS, „wikipedia.org/wiki/Mixed_liquor_suspended_solids," 2012. [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Mixed_liquor_suspended_solids. [Zugriff am 20 12 2012].
- [263] MLSS, „water.me.vccs.edu/courses/env211/lab18_print.htm," [Online]. Available: http://water.me.vccs.edu/courses/env211/lab18_print.htm. [Zugriff am 20 12 2012].
- [264] M. Pfeifer, „Das Absetzverhalten ultraschallbehandelter Klärschlämme," Diplomarbeit, Fachhochschule Augsburg, 2002. [Online]. Available: <http://www.hs-augsburg.de/medium/download/itw/>. [Zugriff am 20 12 2012].

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

ANHANG

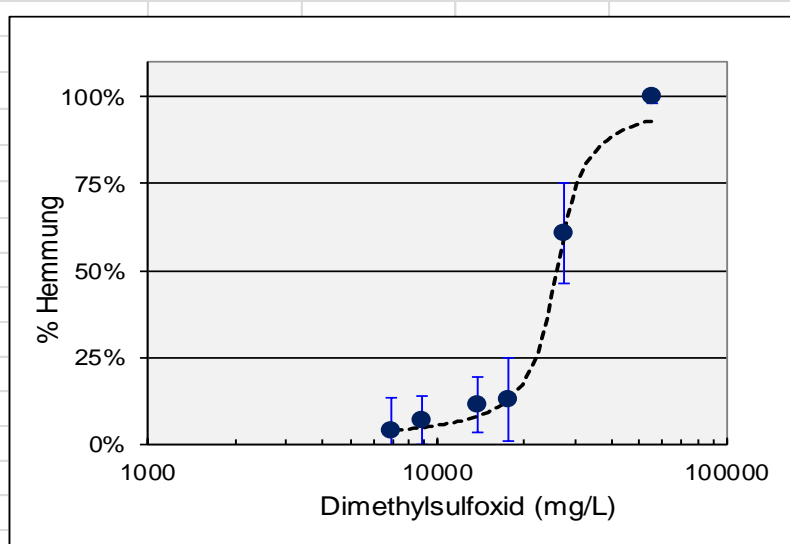
Teil 1 – Konzentrations-Wirkungskurven

Folgende sigmoide Kurvenmodelle des Programmes Table Curve 2D, Vers. 4 (SPSS Science, Chicago, USA) wurden zur Anpassung der Konzentrations-Wirkungskurven herangezogen:

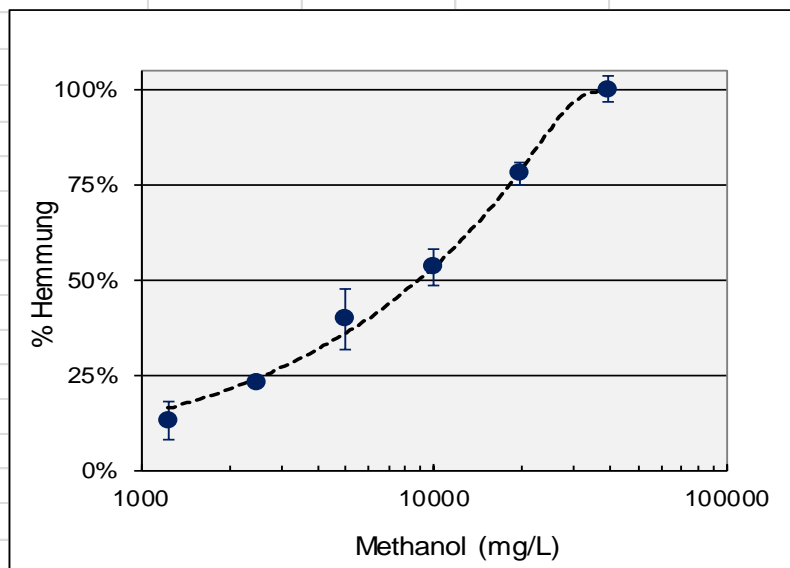
Sigmoid	Gaussian Cumulative	Lorentzian Cumulative
$y = \frac{a}{1 + \exp\left(-\frac{x-b}{c}\right)}$	$y = \frac{a}{2} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{x-b}{\sqrt{2}c}\right) \right]$	$y = \frac{a}{\pi} \left[\arctan\left(\frac{x-b}{c}\right) + \frac{\pi}{2} \right]$
Logistic Dose Response (LDR)	Weibull Cumulative	
$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c}$	$y = a \left[1 - \exp\left(-\left(\frac{x + c(\ln 2)^{1/d} - b}{c}\right)^d\right) \right]$	
Asymmetric Sigmoid		
$y = \frac{a}{\left[1 + \exp\left(-\frac{x - c \ln\left(2^{1/d} - 1\right) - b}{c}\right) \right]^d}$		

Die Messwerte und Kurven sind in folgender Reihenfolge aufgelistet:

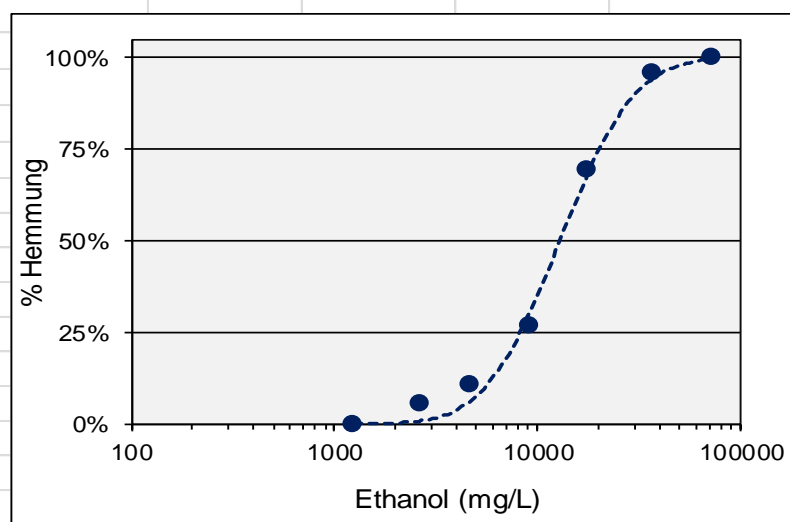
Nr.	Name	Nr.	Name
1	Dimethylsulfoxid (DMSO)	15	2,4-Dichlorphenol
2	Methanol	16	Pentachlorphenol
3	Ethanol	17	Hexachlorophen
4	Aceton	18	trans-4-Methyl- β -nitrostyrol
5	n-Butyramid	19	2-Brom-2-nitro-1,3-propandiol
6	tert. Butanol	20	Propyl Bromacetat
7	Chloroform	21	2-Octyn-1-ol
8	Hexanol	22	Cadmiumchlorid
9	Diphenylether	23	Theophyllin
10	1-Bromoctan	24	Neomycin
11	Natrium Octanoat	25	Chloramphenicol
12	Phenol	26	Isobutylmethylxanthin (IBMX)
13	4-Chlorphenol	27	Polymyxin-B-sulfat (PMBS)
14	1-Octylamin		



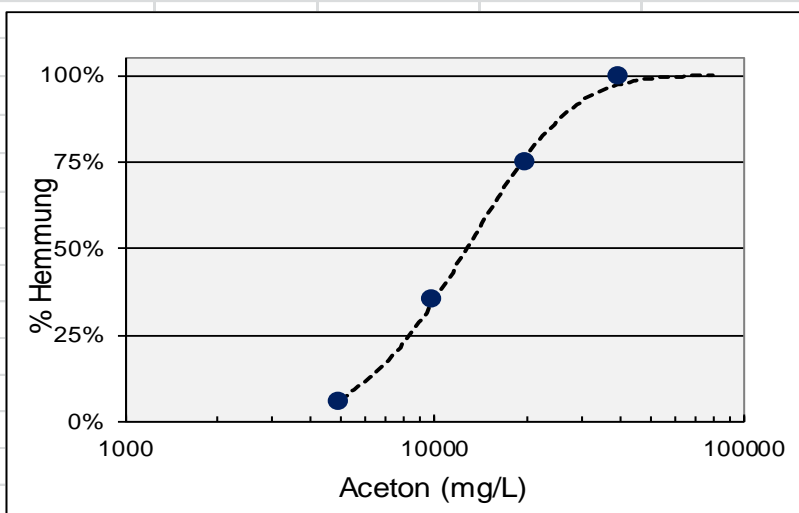
n = 3
 Fit = Lorenzcum(a,b)
 EC50 = 25855 mg/L
 2,35% (v/v)
 R2 = 0,993
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



n = 2
 Fit = asymsig(a,b,c)
 EC50 = 8903 mg/L
 R2 = 0,995
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



n = 4
 Fit = gausscum(a,b)
 EC50 = 12874 mg/L
 R2 = 0,994
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



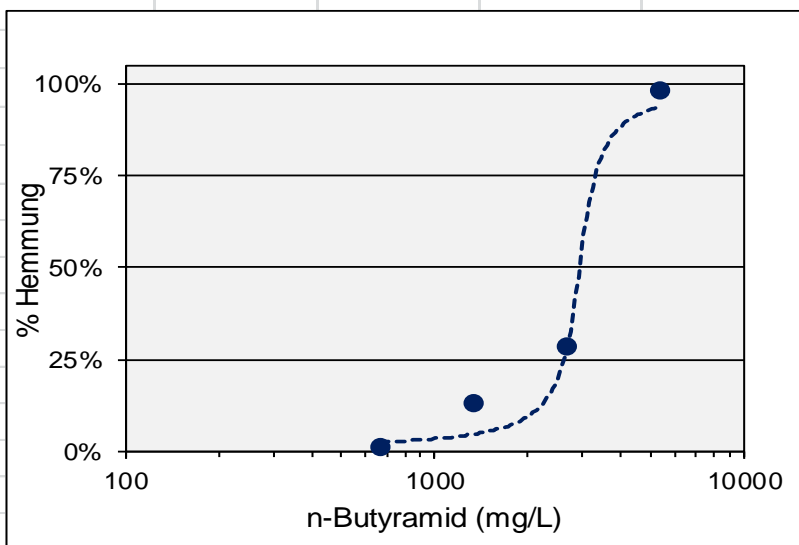
n = 2

Fit = weibullcum(a,b,c)

EC50 = 12726 mg/L

R2 = 0,998

(Test in 12 mL-Röhrchen)



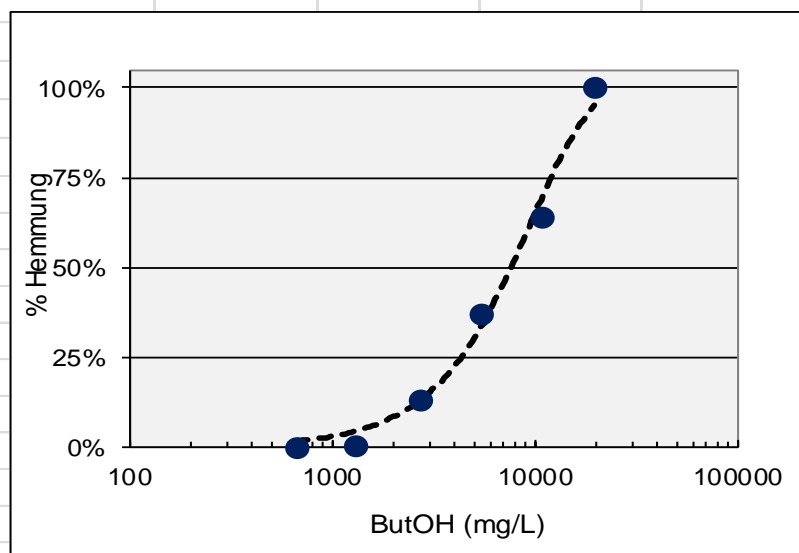
n = 3

Fit = Lorenzcum(a,b)

EC50 = 2947 mg/L

R2 = 0,985

(Test in 12 mL-Röhrchen)



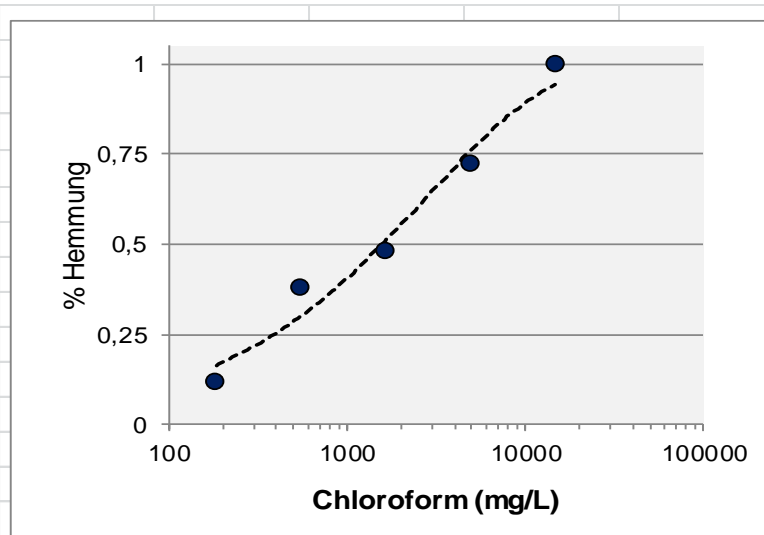
n = 4

Fit = weibullcum(a,b,c)

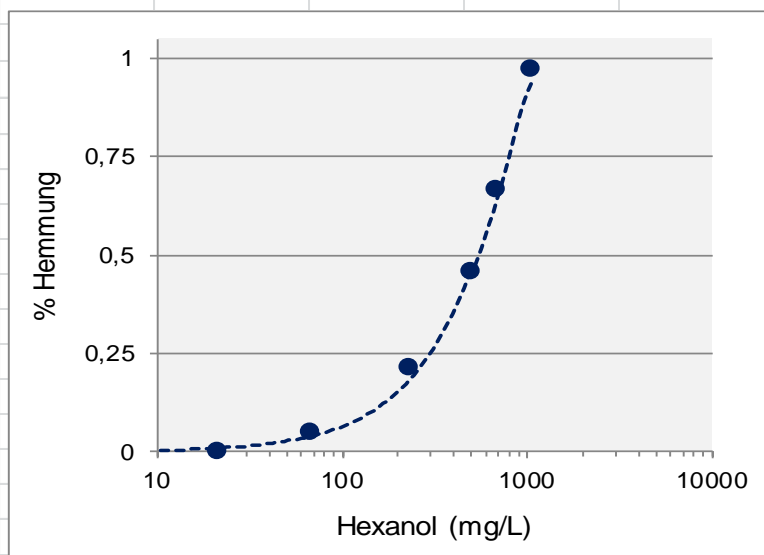
EC50 = 7620 mg/L

R2 = 0,99

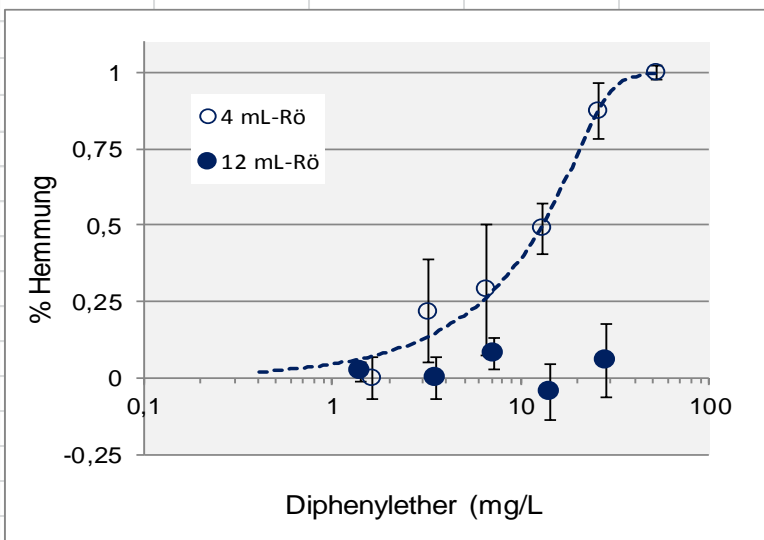
(Test in 12 mL-Röhrchen)



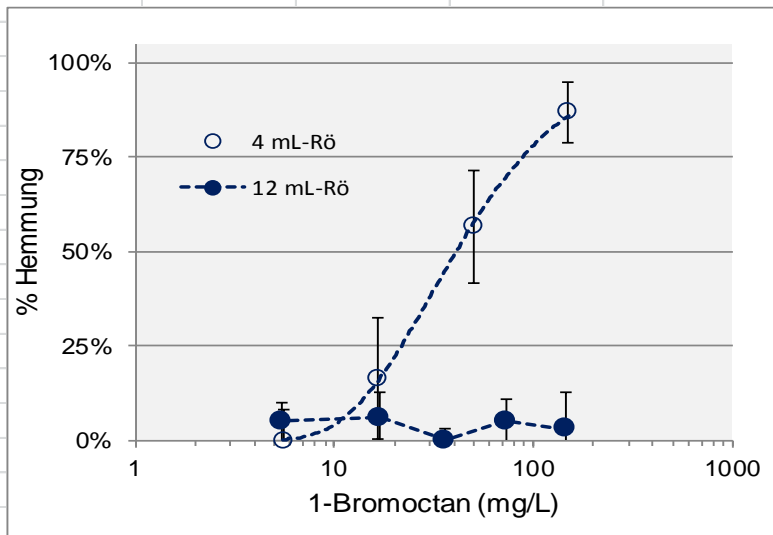
n = 2
 Fit = weibullcum(a,b,c)
 EC50 = 1566,7 mg/L
 R2 = 0,969
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



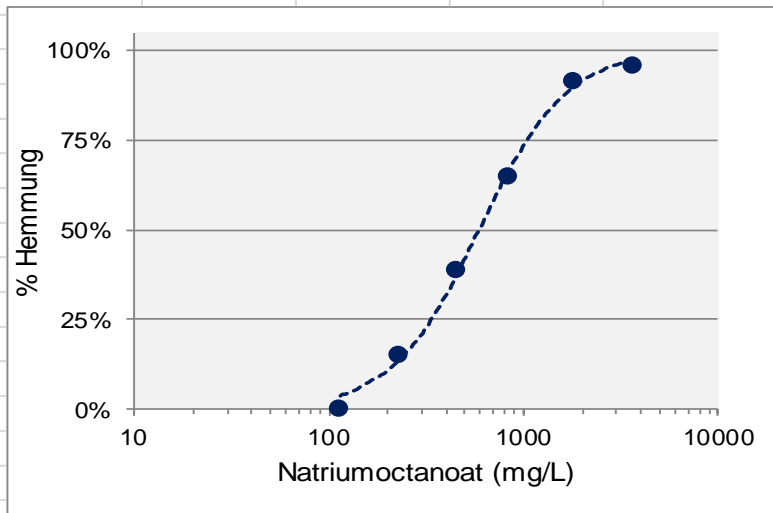
n = 3
 Fit = asymsig(a,b,c)
 EC50 = 524 mg/L
 R2 = 0,999
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



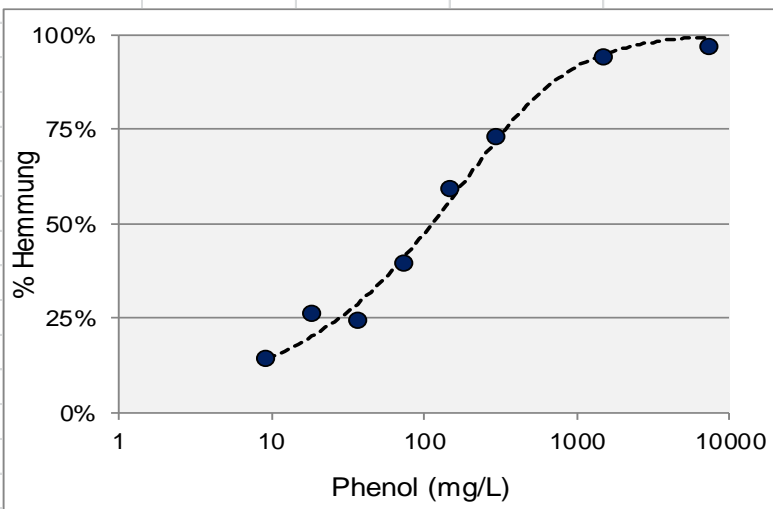
n = 2
 Fit = asymsig(a,b,c)
 EC50 = 13 mg/L
 R2 = 0,98
 (Test in 12 mL & 4 mL-Rö.)



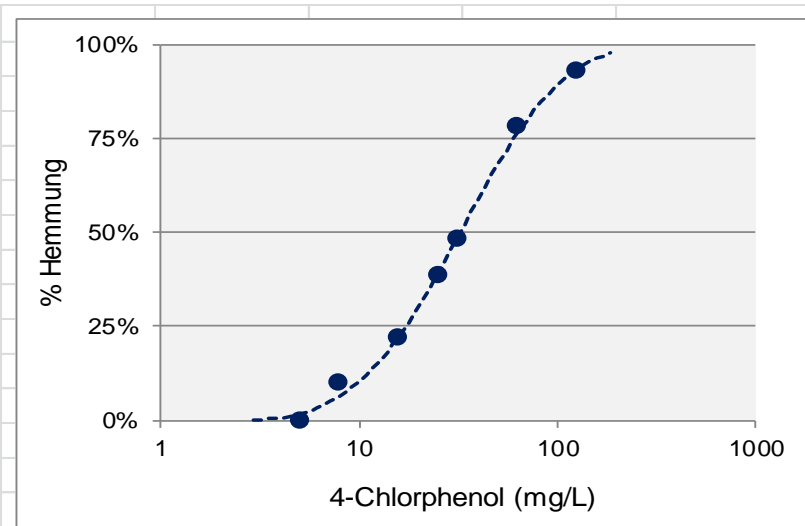
n = 2
 Fit = lognormcum(a,b)
 EC50 = 40,8 mg/L
 R2 = 1
 (Test in 12 mL & 4 mL-Rö.)



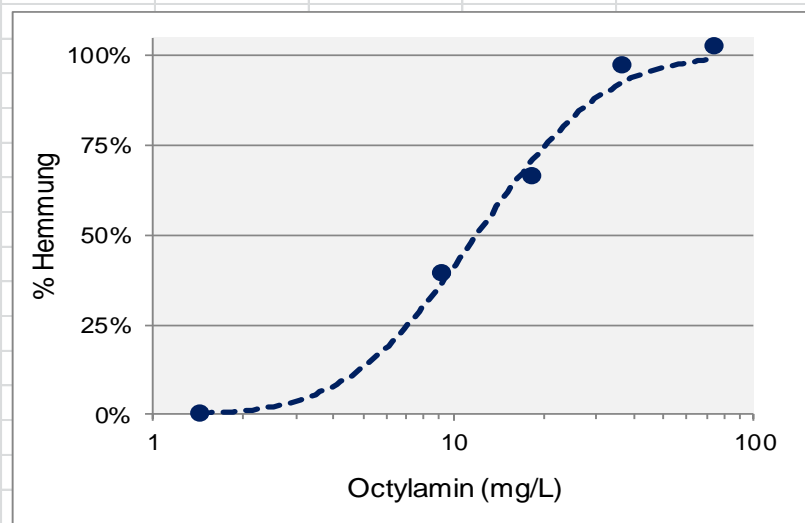
n = 3
 Fit = sigmoid(a,b)
 EC50 = 591 mg/L
 R2 = 0,996
 (Test in 12 mL-Röhrchen)



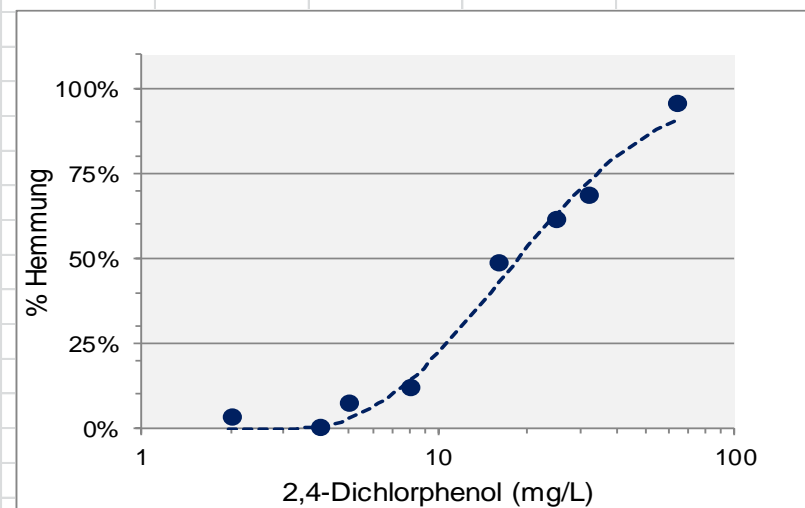
n = 2
 Fit = asymsig(a,b,c)
 EC50 = 113 mg/L
 R2 = 0,989
 (Test in 12 mL-Röhrchen)



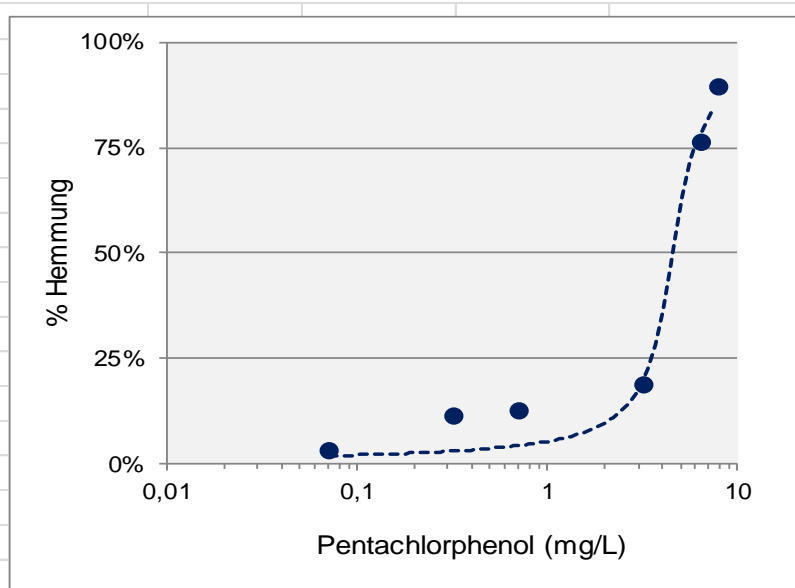
n = 2
Fit = weibullcum(a,b,c)
EC50 = 32,3 mg/L
R2 = 0,991
(Test in 12 mL -Röhrchen)



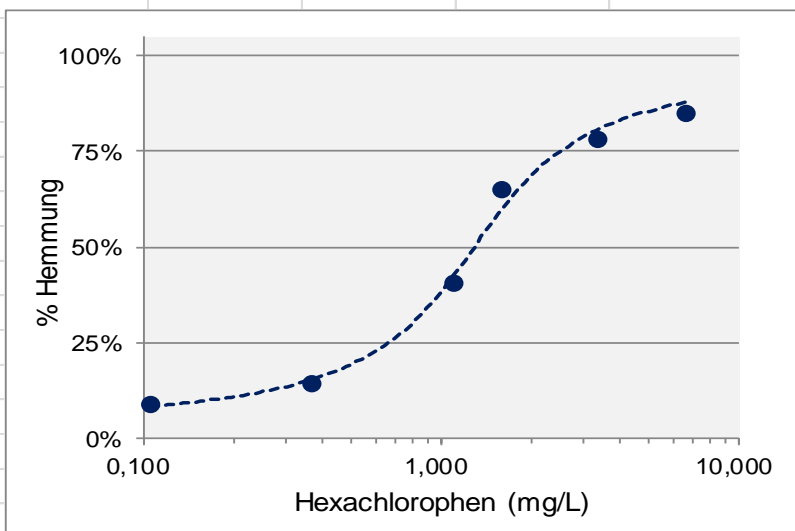
n = 3
Fit = gausscum(a,b)
EC50 = 11,9 mg/L
R2 = 0,991
(Test in 12 mL -Röhrchen)



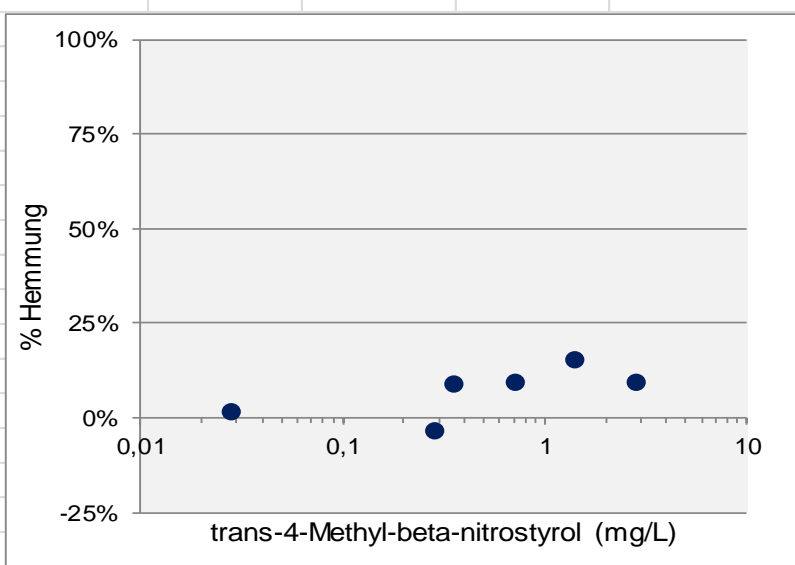
n = 3
Fit = weibullcum(a,b,c)
EC50 = 19 mg/L
R2 = 0,979
(Test in 12 mL -Röhrchen)



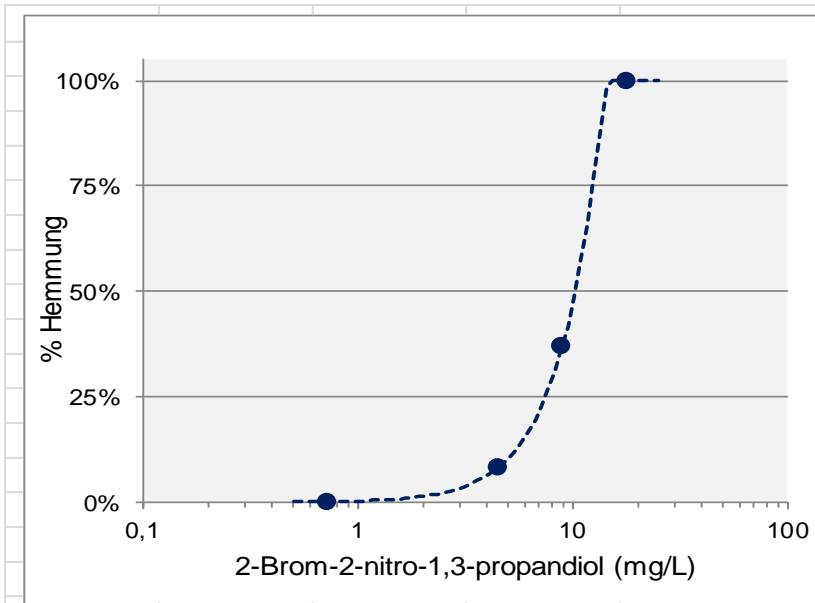
n = 2
 Fit = Lorencum(a,b)
 EC50 = 4,6 mg/L
 R2 = 0,974
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



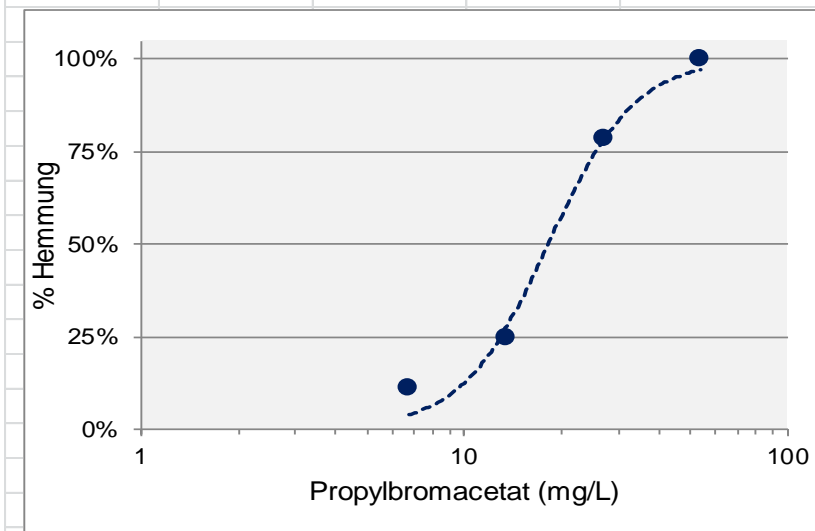
n = 5
 Fit = Lorencum(a,b)
 EC50 = 1,29 mg/L
 R2 = 0,992
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



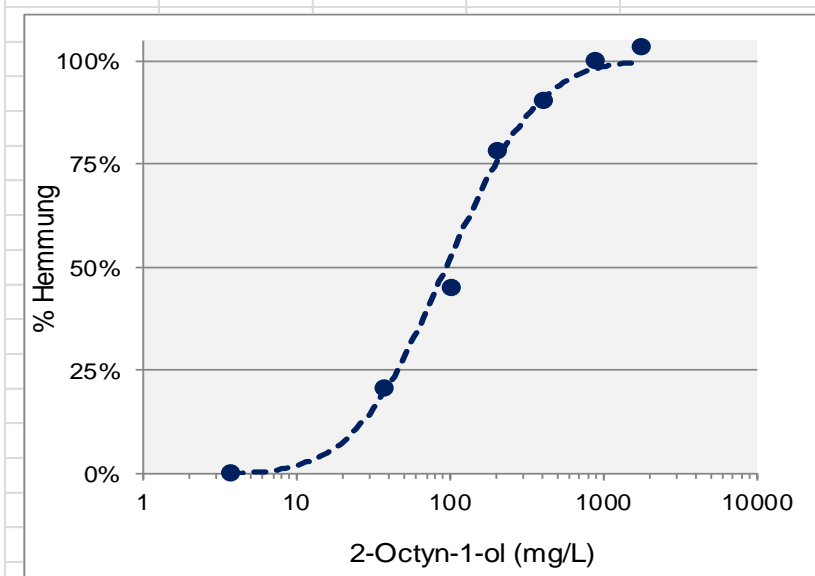
n = 2
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



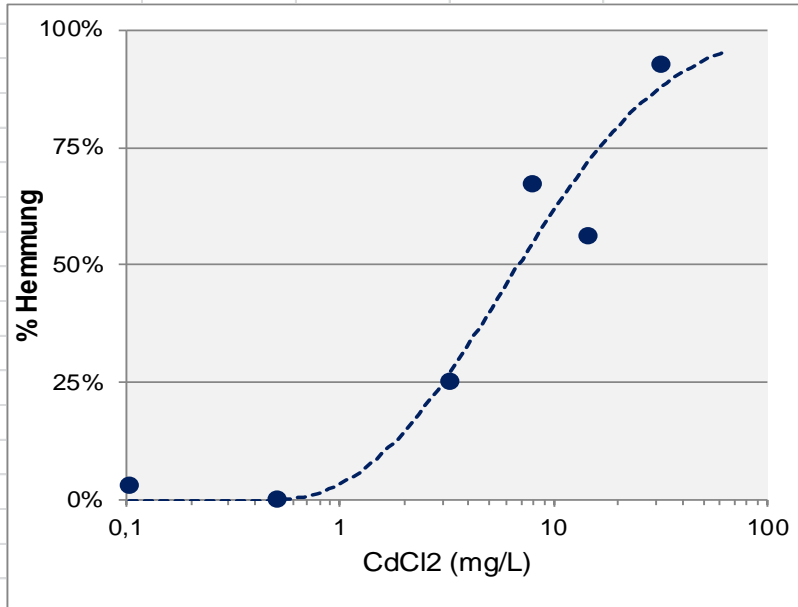
n = 2
 Fit = asymsig(a,b,c)
 EC50 = 10,3 mg/L
 R2 = 0,999
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



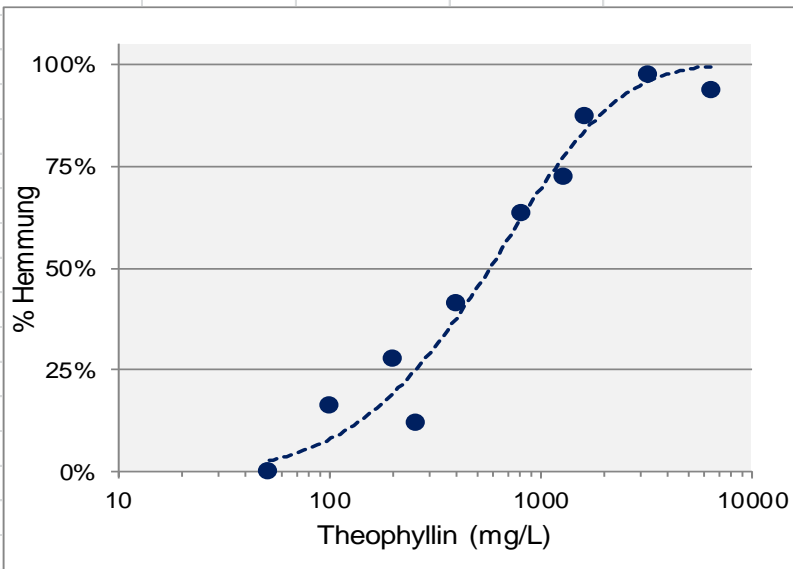
n = 2
 Fit = sigmoid(a,b)
 EC50 = 18,2 mg/L
 R2 = 0,986
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



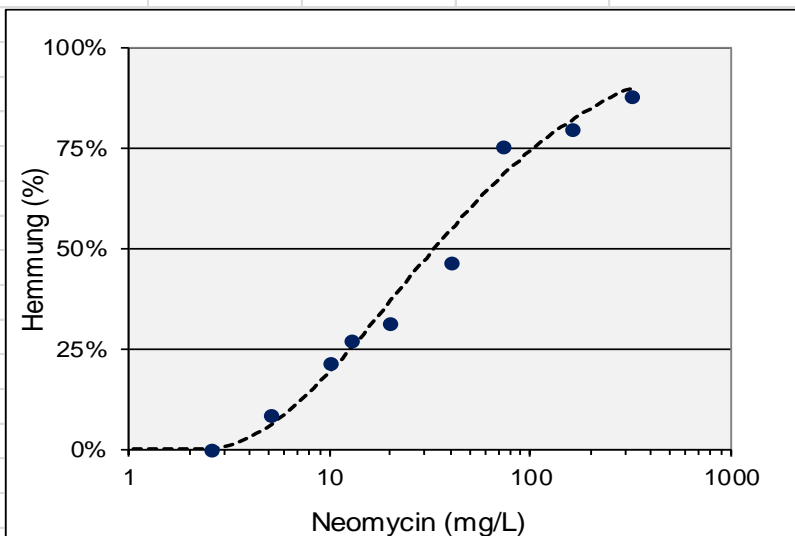
n = 2
 Fit = gausscum(a,b)
 EC50 = 93,9 mg/L
 R2 = 0,997
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



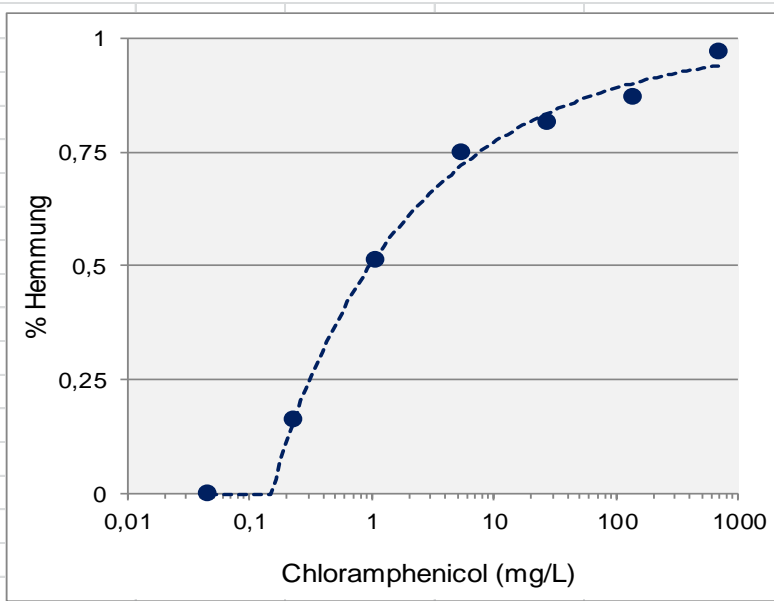
n = 2
 Fit = weibullcum(a,b,c)
 EC50 = 6,8 mg/L
 R2 = 0,955
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



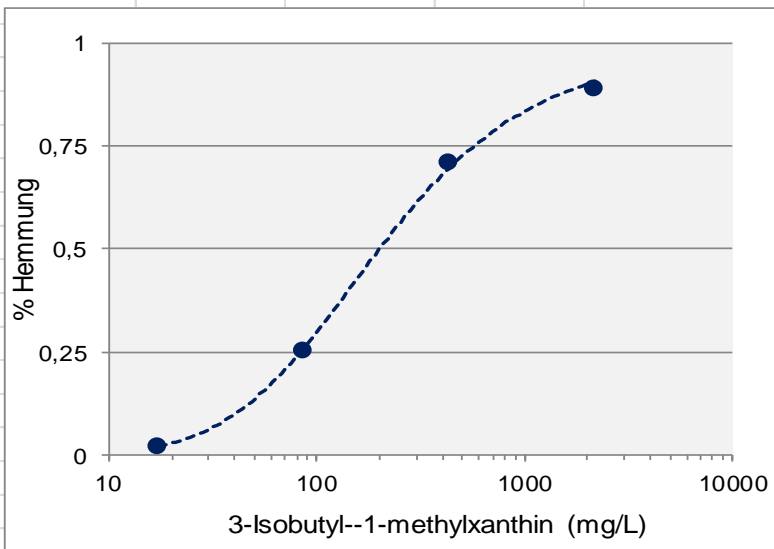
n = 2
 Fit = weibullcum(a,b,c)
 EC50 = 574 mg/L
 R2 = 0,961
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



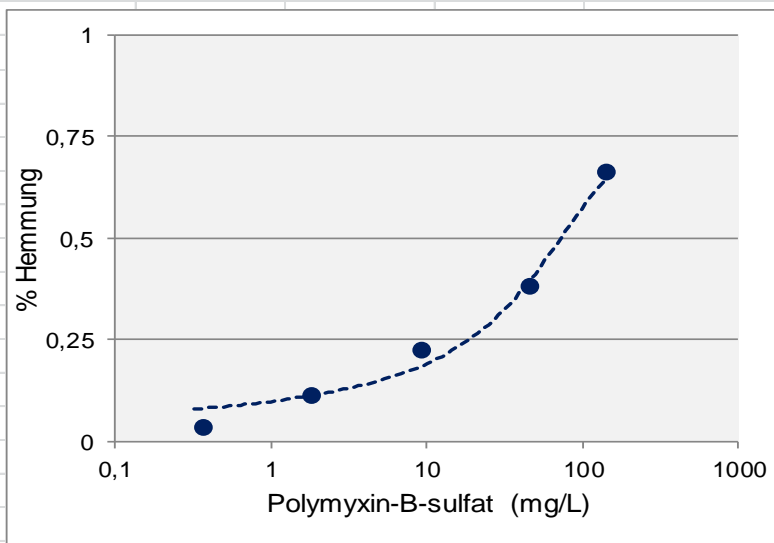
n = 2
 Fit = weibullcum(a,b,c)
 EC50 = 33,5 mg/L
 R2 = 0,966
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



n = 2
 Fit = weibullcum(a,b,c)
 EC50 = 0,964 mg/L
 R2 = 0,996
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



n = 2
 Fit = LDR(a,b)
 EC50 = 200 mg/L
 R2 = 0,999
 (Test in 12 mL -Röhrchen)



n = 2
 Fit = Lorenzcum(a,b)
 EC50 = 72,7 mg/L
 R2 = 0,981
 (Test in 12 mL -Röhrchen)

Teil 2 – Kurzfassung Testanleitung/Testvorschrift

Protokoll Testvorbereitung

Datum - BS-Probennahme
TG Belebtschlamm	3,57 g/L
BS-Volumen pro 2 mL-Ansatz	0,560 mL [Vol _{BS}]
Volumen (Volvic-Wasser))	1,400 mL [Vol _{Verdlsq.}]
Substrat-Suspensionsvolumen	40 µL (<i>E.coli</i> -Suspension)

Protozoen
Belebtschlammtest

Testsubstanz:
höchste Testkonzentration: 100 mg/L

Verdünnungsfaktor: 1: 3 (10 oder zwischen 2 - 3,2)

(deckt einen 81-fachen Konzentrationsbereich ab)
von 100 bis 1,235 mg/L

Vorbereitung von 14 Röhren pro Substanz:		2 Kontrollen und 5 Verdünnungsstufen ohne und 2 Kontrollen und 5 Verdünnungsstufen mit Digitonin
C0	C0+	Kontrollen ohne und mit (+) Digitonin
C0	C0+	Kontrollen ohne und mit (+) Digitonin
C1	C1+	höchste Konzentration im Test ohne und mit (+) Digitonin
C2	C2+	...
C3	C3+	...
C4	C4+	...
C5	C5+	geringste Konzentration im Test ohne und mit (+) Digitonin

1. Befüllen der Kontrollen (C0) und der Testgefäße C2-C5 mit	1,400 mL [Vol _{Verdlsq.}] Volvic
2 Herstellung der Verdünnungsreihe:	
Zugabe von	2,100 mL [Vol _{C1}] zu den beiden Teströhren C1
Überführen von	0,700 mL [Vol _{trans.}] von Röhren C1 in Röhren C2
transfer	0,700 mL [Vol _{trans.}] von Röhren C2 in Röhren C3
transfer	0,700 mL [Vol _{trans.}] von Röhren C3 in Röhren C4
transfer	0,700 mL [Vol _{trans.}] von Röhren C4 in Röhren C5
Verwerfen von	0,700 mL [Vol _{trans.}] der Flüssigkeit in Röhren C5
Beimpfen mit	0,560 mL Belebtschlamm ¹ in jedes Testgefäß [Vol _{AS}]
Zugabe von	40 µL Digitoninlösung ² in alle + gekennzeichneten Röhren
Zugabe von	40 µL <i>E.coli</i> -Suspension ³ zu jedem Testansatz

¹⁾ BS-Inokulum: 1g/L TG

²⁾ Digitonin im Test: 200 mg/L

³⁾ *E.coli*-Suspension im Test: 0,4 mg/mL

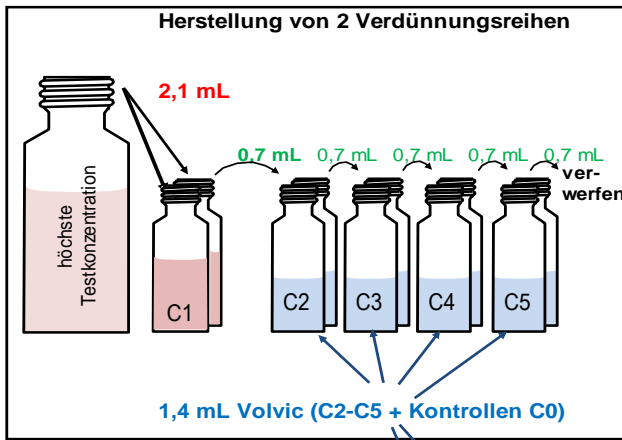
...weitere Schritte:

- OD-Messung OD₄₄₀ (0h-OD, T1)
- Schütteln (250 U/min) über 22 h bei 22°C
- OD-Messung OD₄₄₀ (22h-OD; T2)

Schema Testvorbereitung

Probennahme am:

(1) Vorbereitung von 14 Testgefäßen pro Prüfsubstanz: 2 Kontrollen und 5 Verdünnungsstufen ohne sowie 2 Kontrollen und 5 Verdünnungsstufen mit Digitonin

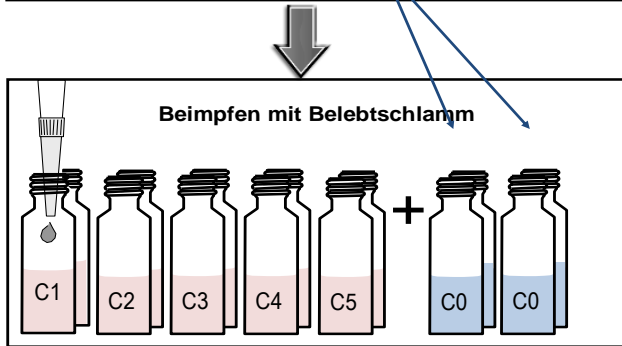


(2) Befüllen der Kontrollen C0 und der Teströhrchen C2-C5 mit 1,4 mL Volvic

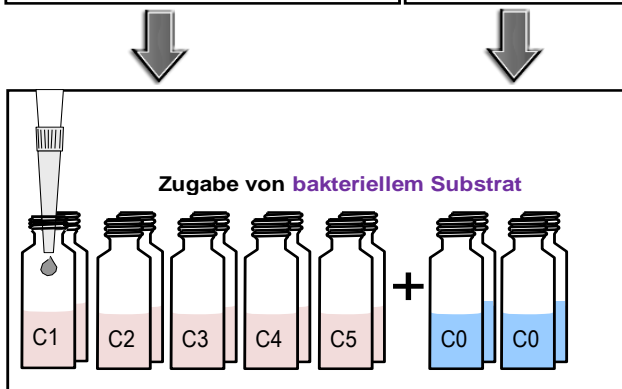
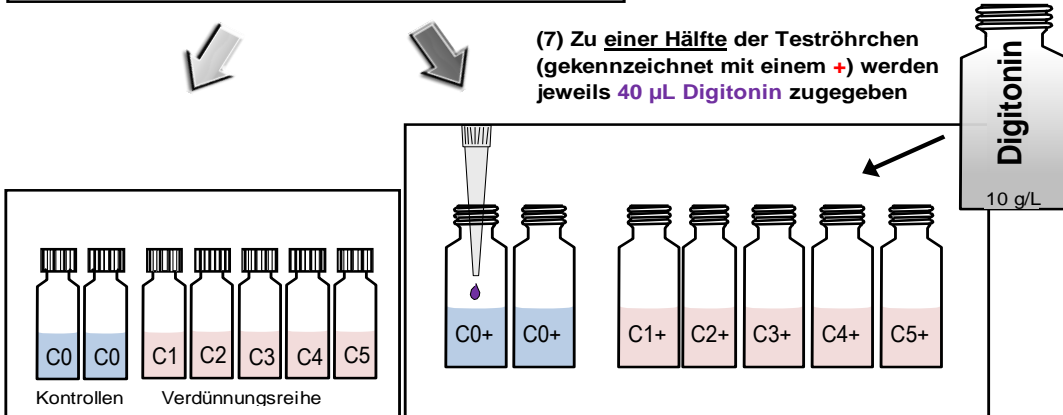
(3) Etwa 5 mL der höchsten Testkonzentration werden vorbereitet

(4) Hiervon werden jeweils 2,1 mL in die beiden mit C1 gekennzeichneten Testgefäße überführt

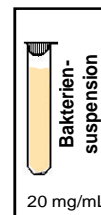
(5) Herstellung der Verdünnungsreihe: hierzu werden jeweils 0,7 mL nacheinander vom Teströhrchen C1 in das Teströhrchen C2, von C2 in das Gefäß C3 usw. überführt



(6) Beimpfen mit: 0,56 mL Belebtschlamm (Spitze abschneiden!)



(8) in jedes Teströhrchen werden 40 µL Bakteriensuspension pipettiert



...weitere Schritte:

- 1. Messung der OD₄₄₀ (Zeitpunkt t1)
→ 22 h-Inkubation der Proben auf dem Schüttler (250 U/min, 22°C)
- 2. Messung der OD₄₄₀ (Zeitpunkt t2)
- Auswertung der Ergebnisse (OD-Veränderung t1 und t2)

Testprotokoll

...Beispiel für ein Testprotokoll...

Datum Probennahme
 BS Trockengewicht/L 3,57 g/L
 Datum Testansatz
 Testsubstanz Substanz A

	Code	defauniert¹	Code
Kontrolle	C0 _a	Kontrolle	C0 _a +
Kontrolle	C0 _b	Kontrolle	C0 _b +
höchste Konz.	C1	höchste Konz.	C1+
↓	C2	↓	C2+
↓	C3	↓	C3+
↓	C4	↓	C4+
↓	C5	↓	C5+
geringste Konz.		geringste Konz.	

¹) mit Zusatz von Digitonin

Code	mg/L	0h-OD ₄₄₀	22h-OD ₄₄₀	ΔOD	ΔOD _{korrigiert}	% Hemmung	%OD-Abnahme
C0 _a	Kontrolle	1,323	0,554	0,769	0,639	0%	
C0 _b	Kontrolle	1,295	0,564	0,731			✓ 49%
C1 im Test	69,99	1,34	1,28	0,06	0,029	95%	2%
C2 im Test	23,33	1,298	1,179	0,119	0,063	90%	5%
C3 im Test	7,78	1,285	0,983	0,302	0,187	71%	15%
C4 im Test	2,59	1,266	0,758	0,508	0,422	34%	33%
C5 im Test	0,86	1,275	0,578	0,697	0,595	7%	47%
C0 _a +	Kontrolle ¹	1,352	1,243	0,109			
C0 _b +	Kontrolle ¹	1,298	1,184	0,114			✓ 8%
C1+ im Test ¹	69,99	1,298	1,267	0,031			✓ 2%
C2+ im Test ¹	23,33	1,312	1,256	0,056			✓ 4%
C3+ im Test ¹	7,78	1,336	1,221	0,115			✓ 9%
C4+ im Test ¹	2,59	1,298	1,212	0,086			✓ 7%
C5+ im Test ¹	0,86	1,315	1,213	0,102			✓ 8%

¹) mit Zusatz von Digitonin

