

Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC.

Von ROBERT STAUB

(Aus der Eidg. Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und
Gewässerschutz an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----|
| I. <i>Einleitung und Problemstellung</i> | 84 |
| II. <i>Allgemeine Arbeitsmethoden und Material</i> | 92 |
| A. FELDUNTERSUCHUNGEN | 92 |
| B. LABORUNTERSUCHUNGEN | 93 |
| 1. Kulturmethoden | 93 |
| 2. Analysenmethoden | 97 |
| III. <i>Entwicklung der Kulturmethoden</i> | 105 |
| A. DER HEUTIGE STAND DER BLAUALGENKULTURMETHODIK | 105 |
| 1. Kulturgefässe | 106 |
| 2. Substrate | 106 |
| 3. Reinigungsmethoden | 109 |
| B. ERFAHRUNGEN ANDERER AUTOREN MIT KULTUREN VON <i>Oscillatoria rubescens</i> | 111 |
| C. VORBEREITUNGSKULTUREN | 112 |
| 1. Vorversuch unter den von VOLLENWEIDER [176] empfohlenen Kulturbedingungen | 112 |
| 2. Vorversuch mit verschiedenen Nährlösungen unter Zusatz von Actidion | 115 |
| 3. Vorversuch mit festen Substraten | 120 |
| D. KLONKULTUREN MIT BEGLEITBAKTERIEN | 121 |
| 1. Isolierung einzelner Fäden von <i>Oscillatoria rubescens</i> mit der Plattenmethode | 121 |
| 2. Weiterzüchtung der Klonkulturen | 121 |
| E. REINKULTUREN | 124 |
| 1. Desinfektionsversuche mit Ultraviolettlicht | 124 |
| 2. Waschversuche mit dem Mikromanipulator | 128 |
| 3. Vorversuche zur Einführung von organischen Nährlösungen | 132 |
| 4. Vorversuche zur Verbesserung der Plattenmethode | 136 |
| 5. Desinfektionsversuche mit Antibiotika | 139 |

| | |
|--|-----|
| 6. Herstellung einer Reinkultur mit kombinierter UV- und Antibiotikadesinfektion | 147 |
| IV. Ernährungsphysiologische Versuche im Hinblick auf autökologische Fragen | 154 |
| A. QUALITATIVE UNTERSUCHUNGEN | 154 |
| 1. Photoorganotrophie und Auxoheterotrophie | 155 |
| 2. Chemotrophie | 156 |
| 3. Organische Stickstoffquellen | 158 |
| 4. Fixierung von Luftstickstoff | 158 |
| B. QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN | 159 |
| 1. Spezielle Methoden | 160 |
| 2. Kalium und Natrium | 163 |
| 3. Kalzium | 166 |
| 4. Stickstoff und Phosphor | 170 |
| V. Diskussion der allgemeinen Ergebnisse | 184 |
| VI. Zusammenfassung | 188 |
| Literaturverzeichnis | 191 |

Die vorliegenden Untersuchungen sind an der Hydrobiologischen Abteilung der Eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz an der ETH, Zürich, vom Herbst 1956 bis zum Herbst 1959 durchgeführt worden. Aus diesem Institut werden damit erstmals Resultate von algenphysiologischen Arbeiten, die auf den praktischen Gewässerschutz ausgerichtet sind, veröffentlicht. Die Beschreibung von Kulturmethoden geht daher stark in die Einzelheiten, und die Verarbeitung der einschlägigen Literatur berücksichtigt einen verhältnismässig breiten Stock von Veröffentlichungen. Es ist zu hoffen, dass spätere Untersuchungen auf Teilgebieten des hier behandelten Problemkreises auf dieser Grundlage aufbauen können.

Dem Vorsteher des Instituts, Herrn Prof. Dr. O. JAAG, und allen seinen Mitarbeitern, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben, insbesondere der tüchtigen Laborantin, Fräulein B. Egli, möchte ich hier aufrichtig danken. Ausserdem bin ich Herrn Dr. A. ZEHNDER, Seminar Wettingen, zu grossem Dank verpflichtet. Mit seinen zu Beginn dieser Arbeit teilweise noch nicht veröffentlichten Angaben über Blaualgensubstrate und -kulturbedingungen, besonders über das Antibiotikum Actidion, hat er das Experimentieren mit *Oscillatoria rubescens* – was zuvor in verschiedenen Laboratorien misslungen ist – erst eigentlich möglich und erfolgversprechend gemacht. Ich danke überdies Herrn P. ZIMMERMANN und seinen Mitarbeitern vom Chemischen Laboratorium der Stadt Zürich für ihre tatkräftige

Mithilfe bei den Probenahmen auf dem Zürichsee, Herrn Dr. R. BURKARD, Kantonschemiker, Solothurn, für die Überlassung einiger Resultate von chemischen Untersuchungen im Burgäschisee, und Herrn Dr. H. ZÄHNER vom Institut für spezielle Botanik an der ETH für ein Rovamycinpräparat und für viele wertvolle Ratschläge in Fragen der Anwendung von Antibiotika.

I. Einleitung und Problemstellung

Mit der raschen Bevölkerungszunahme in dichtbewohnten und stark industrialisierten Gegenden der Erde wird der ursprüngliche Charakter ganzer Landschaften tiefgehend umgestaltet. Auch verhältnismässig beständige und ausgleichende Elemente wie Wald und See tragen schon deutliche Spuren dieser Entwicklung, können sie doch der Intensivierung des gesamten Stoffaustausches im grossen Rahmen der Zivilisationslandschaft nicht entzogen werden. So ist die wachsende Produktivität der Gewässer als Folge der Einleitung von Überschuss- und Abfallprodukten aus dem umliegenden Gelände ein adäquates Gegenstück zum Getriebe in den Städten. Die vordem mannigfaltige Planktonbiozönose von geringer Volksdichte verändert sich in eine artenärmere Lebensgemeinschaft der erfolgreichsten Organismen in dichter Population.

Ein Schulbeispiel dieser Art ist die in vielen limnologischen Arbeiten beschriebene Massenentfaltung der Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. [23] im Plankton von Seen hauptsächlich des Alpengebietes und der Vereinigten Staaten von Amerika im 19. und 20. Jahrhundert (z. B. Schweiz: [8–12], [23], [71], [76–83], [116, 117], [164], [167–169], [179]; Österreich, Deutschland: [40, 41], [96], [108], [146]; Italien: [103], [112, 113]; USA: [37]. Vermutlich war die Blaualge in diesen Seen schon früher vereinzelt vorhanden gewesen, kam dann aber nach Veränderungen in den physikalischen und chemischen Umweltbedingungen zu dichteren Beständen, zur Dominanz und sogar zur Wasserblüte.

Beim jüngsten Beispiel eines im Laufe weniger Jahre zum *Oscillatoriage*wässer umgestalteten Alpenrandsees, des *Luganersees*, kann diese Vermutung durch eine rund 50 Jahre zurückliegende Beobachtung bestätigt werden: STEINER [159] berichtet 1912, dass BACHMANN im Zeitpunkt seiner Untersuchungen, also wohl in den Jahren 1909 bis 1911, vereinzelte Fäden von *Oscillatoria rubescens* vorgefunden habe, dass er in seinen eigenen Planktonproben aber diesen Organismus nicht angetroffen habe. 35 Jahre später (1945) konnte JAAG [83] bei halbquantitativen und sorgfältigen, qualitati-

ven Untersuchungen im Luganersee keine *O.-rubescens*-Fäden finden. Noch im Jahre 1955 wurden nach unveröffentlichten Untersuchungen von JAAG und Mitarbeitern mit der sogenannten Zürchertrichtermethode (S. 92) selbst in der Wasserschicht mit maximaler *Oscillatoria*-Volksdichte nicht mehr als 1800 Fäden im Liter Wasser gezählt (August, Seemitte bei Gandria, 10 m Tiefe). Diese Maximalzahl stieg im folgenden Jahre auf 49000 Fäden pro l (Oktober 1956, Seemitte bei Morcote, 5 m Tiefe) und im Jahre 1957 auf 121000 (Oktober, Morcote, Oberfläche). Allerdings kann die von JAAG und Mitarbeitern verwendete, halbquantitative Methode für den *Oscillatoria*-bestand kein ganz zuverlässiges Bild von der wachsenden Biomasse im Gesamtvolumen des Sees geben. Diese Angaben werfen aber zumindest wie diejenigen von anderen *Oscillatoria*-seen erneut die Frage nach den Ursachen solcher offensichtlich ausgeprägter Veränderungen im Planktonbild auf.

Zweifellos ist die hier interessierende Erscheinung irgendwie mit anthropogenen Einflüssen auf den Gesamthaushalt der betreffenden Seen in Zusammenhang zu bringen. Man denkt da in erster Linie an die ständig gesteigerte Abwasserbelastung und meint damit vor allem die Zufuhr von organischen fäulnisfähigen Abfallstoffen. In neuester Zeit ist aber am Beispiel des *Washingtonsees* gezeigt worden, dass offenbar auch bauliche Veränderungen, welche die hydrologischen Verhältnisse umgestalten – aber zunächst von unwesentlicher Bedeutung zu sein scheinen –, eine ganz auffallende Umstimmung des Seeregimes mit sich bringen können (EDMONDSON, ANDERSON und PETERSON [37], PROVASOLI [136]). Der Lake Washington ist durch einen Kanal mit dem Meere verbunden worden, worauf vermutlich sein Salzgehalt, namentlich die NaCl-Konzentration, leicht gestiegen ist. Ausserdem sind seine Ufer dichter überbaut worden. In der Folge ist *O. rubescens* zur Massenentwicklung gekommen, was vor dem Kanalbau nicht beobachtet worden ist. Hier fragt es sich also, ob nicht die vermehrte Abwasserlast als vielmehr die Natriumzufuhr den Ausschlag zu dieser Entwicklung gegeben habe.

Neben den physikalischen und chemischen müssen aber bestimmt auch eigentlich biologische Faktoren in Betracht gezogen werden, wenn man die starke Entfaltung einer bestimmten Art und nur eben gerade dieser Art verstehen lernen will. Es gilt also, die *Autökologie* in ihrem umfassenden Sinne zu Hilfe zu nehmen: die Lehre von den Beziehungen einer Organismenart zu ihrer natürlichen Umwelt. Autökologische Studien können dann eine Basis geben für das angestrebte Verständnis der *synökologischen* Zusammenhänge in der planktischen Biozönose, die ihrerseits zugleich als Ganzes umgestaltet worden ist.

In autökologischer Sicht begegnet man nun aber beim Beispiel der *Oscillatoria rubescens* einem ausserordentlich umfangreichen Fragenkomplex – dem oft genannten «*Oscillatoria*problem» –, der im folgenden kurz umrissen werden soll, damit sich die in der vorliegenden Arbeit verfolgten Einzelfragen in einen klaren Zusammenhang stellen lassen. Die Darstellung lehnt sich an die Arbeiten von MCCOMBIE [115] und SAUNDERS [147] an. Die Bemerkungen zu den verschiedenen ökologischen Faktoren sollen hier nur allgemein einleitende Hinweise vermitteln; die eingehende Bearbeitung der Probleme unter Verwendung der Literatur erfolgt dann in den speziellen Kapiteln, sofern es in den Rahmen dieser Arbeit gehört.

A. PHYSIKALISCHE FAKTOREN

I. Wasserbewegung

a) Direkter Einfluss auf die Entwicklungsmöglichkeit von *O. rubescens*

Während der Sommerstagnation schichtet sich diese Blaualge im allgemeinen in eine verhältnismässig tief liegende Wasserzone ein – oft rund 10 m unter der Oberfläche – und entwickelt dort ein lokal scharf begrenztes Maximum, womit sie den Eindruck eines ausgeprägt stenöken Organismus erweckt. Die Gründe für dieses Verhalten sollen hier noch nicht erörtert werden, doch weist die Feststellung allein schon darauf hin, dass dieser Organismus sein ökologisches Optimum in einer tiefer liegenden Wasserschicht findet als viele andere Planktophyten. Die räumliche Trennung von raschwüchsigen Konkurrenten ist aber nur während der Stagnation gewährleistet. Teilzirkulationen im Sommer und die herbstliche Vollzirkulation zerstören das typische Bild der Sommerverteilung und bringen einen grossen Teil der *Oscillatoria*population in Zonen mit einer weniger günstigen Konstellation der Umweltbedingungen.

b) Indirekter Einfluss auf die Wachstumsbedingungen

Auf dem Wege der Nährstoffversorgung durch Konvektionsströmungen kann der physikalische Faktor der Wasserbewegung indirekt sowohl positiv als auch negativ (letzteres z. B. wenn irgendein Nährstoff während der Stagnation vorzeitig erschöpft ist und nicht nachgeführt wird) auf die Entwicklungsmöglichkeiten einwirken.

2. Licht

a) *Qualität*

Nur schon die Beobachtung, dass Fadenmassen von *O. rubescens* normalerweise dunkelrotbraun gefärbt sind, führt zur Überlegung, es müsse mit dieser Pigmentierung ein anderer Spektralbereich energetisch ausnützlich sein als bei grüner oder gelber Färbung der Protoplasten. Es kann angenommen werden, dass auch diese Eigentümlichkeit dem Organismus die Möglichkeit verschafft, sich gegenüber der grossen Masse von schwebenden grünen Pflanzen erfolgreich zu behaupten, indem sie ihm einen gesonderten, tiefliegenden Lebensbereich erschliesst.

b) *Intensität*

Die bereits erwähnte Einschichtung von *O. rubescens* in tiefe Wasserzonen während der Stagnation hat dazugeführt, dass dieser Mikroorganismus zu den Schwachlichtformen gezählt wird. Dies braucht nicht unbedingt zu bedeuten, dass seine Assimilationstätigkeit schon bei schwächerer Beleuchtung in Lichtsättigung vor sich geht als diejenige von sogenannten Starklichtpflanzen oder dass starke Beleuchtung direkt schädlich wirkt. Vorsichtig interpretiert sagt diese Bezeichnung lediglich aus, dass er sich normalerweise in schwachbeleuchteten Schichten aufhält und sich dort vermehrt.

3. Temperatur

In ähnlicher Weise führt die autökologische Untersuchung am Standort zur Feststellung, dass *O. rubescens* sich während eines grossen Teils des Jahres in kühlen Wassermassen aufhält. Wiederum braucht damit nicht gesagt zu sein, der Organismus sei streng kaltstenotherm im physiologischen Sinne. Möglicherweise ist er sogar ausgeprägt eurytherm, wird aber durch andere ökologische Faktoren in einen engen Temperaturbereich – in diesem Falle in kühle Wasserzonen – gedrängt.

B. CHEMISCHE FAKTOREN

1. Nährstoffe

a) *Anorganische Nährstoffe*

Es wird allgemein angenommen, dass die Planktonproduktion in ihrem Ausmass hauptsächlich von der Menge verfügbarer anorganischer Nähr-

stoffe, vor allem Phosphor und Stickstoff, bestimmt wird. Im Sinne von MCCOMBIE [115] spricht man dann von *wachstumsbegrenzenden Faktoren*. Diesen Elementen würde eine Basisstellung im ganzen Produktionsvorgang zukommen. Im Hinblick auf die Gewässersanierung konzentriert sich das Interesse berechtigterweise auf solche Minimumstoffe, welche die stoffliche Grundlage für alle zu organischer Substanz führenden Synthesen bilden.

In diesem Zusammenhang könnte *Oscillatoria rubescens* höchstens dann eine Sonderstellung einnehmen, wenn sie z. B. die Fähigkeit hätte, gasförmigen Stickstoff zu assimilieren, wozu die Grünalgen und auch die meisten Blaualgen nicht befähigt sind. Immerhin entfernt sie sich infolge anderer, z. T. bereits erwähnter Faktoren, räumlich so weit vom Entwicklungsoptimum der gesamten Phytoplanktonbiozönose, dass sie dort auch bezüglich der Versorgung mit anorganischen Nährstoffen gewiss günstigere Bedingungen vorfindet als der Durchschnitt der übrigen Phytoplankter. In ihrer bevorzugten Tiefe zieht sie überdies unmittelbar Nutzen aus dem Mineralsalzaustausch durch die Thermokline.

b) Organische Nährstoffe

Das Auftauchen der Blaualge *O. rubescens* in unseren Seen stimmt zeitlich derart auffallend mit der vermehrten Zufuhr von organischen Abwasserstoffen überein, dass auch in dieser Beziehung ein Zusammenhang vermutet werden muss. Da ja die gelösten organischen Stoffe oft mengenmässig die im Plankton und Detritus geformt suspendierten übertreffen, könnte ein pflanzlicher Organismus mit der Befähigung zur direkten Ausnützung solcher Nährstoffquellen in der Konkurrenz mit rein photolithotroph¹⁾ lebenden Mikrophyten besonders erfolgreich sein. Wiederum legt die räumliche Trennung des autökologischen Optimums der *O. rubescens* vom synökologischen Optimum der gesamten Phytoplanktonassoziation diesen Gedanken besonders nahe: Diese Blaualge lebt ja gerade in einem Bereich, wo die abgestorbenen und absinkenden Zellen der in höheren Wasserschichten gedeihenden Plankter bereits langsam der Autolyse und bakteriellen Zersetzung anheimfallen, womit organische Stoffe gelöst verfügbar werden.

¹⁾ In der vorliegenden Arbeit wird zur physiologischen Klassifizierung der Organismen die in der neueren Literatur (z. B. FOGG [46]) gebräuchliche Nomenklatur, wie sie im *Cold Spring Harbour Symposium* 1946 [28] vorgeschlagen worden ist, angewendet. Die Zweckmässigkeit dieses Systems wird zwar berechtigterweise kritisiert (z. B. von PIRSON [129]: Photolithotrophie und Chemolithotrophie sind vom energetischen und biochemischen Standpunkt aus homologe Ausdrücke), es basiert aber immerhin auf Richtlinien, die sich praktisch konsequent einhalten lassen.

c) Spurenelemente

Mit der Terminologie von MCCOMBIE [115] darf man einzelnen Spurenstoffen eine *wachstumskontrollierende Funktion* zusprechen, was sich zwar auf das Plankton als Gesamtheit auswirken müsste, wenn nicht *O. rubescens* in dieser Hinsicht ganz besondere Ansprüche stellen würde. Es wäre aber gewiss denkbar, dass im Zusammenhang mit speziellen Stoffwechselprozessen, z. B. der Assimilation von Luftstickstoff, auch einzelne Spurenelementbedürfnisse (für das gewählte Beispiel besonders Molybdän) gesteigert wären. Dies sind jedoch innerhalb des gesamten *Oscillatoria*-problems Detailfragen von sekundärer Bedeutung.

2. Wasserstoffionenkonzentration

Sowohl aus physiologischen Versuchen als auch aus Beobachtungen *in situ* ist bekannt, dass Blaualgen im allgemeinen höhere pH-Werte bevorzugen als Grünalgen und Diatomeen. Mit intensiverer Assimilations-tätigkeit in einem fortwährend stärker eutrophierten See geht nun aber eine allgemeine Erhöhung der pH-Werte parallel, was zur Folge hat, dass Diatomeen und Grünalgen immer ungünstigere, Blaualgen immer bessere Entwicklungsbedingungen vorfinden. Eine Förderung der Blaualgen ist also gewiss auch von diesem Gesichtspunkt aus in Betracht zu ziehen.

C. BIOLOGISCHE FAKTOREN

I. Schwebenanpassungen

Unter den verschiedenen Einrichtungen, die dem Plankton erlauben, im Wasser zu schweben oder nur ganz langsam abzusinken, ist zweifellos die Anpassung des spezifischen Gewichtes an dasjenige des umgebenden Wassers mit Hilfe von Gasvakuolen, wie es bei *O. rubescens* verwirklicht ist, besonders zweckmässig. Eine langsam wachsende Alge wie *O. rubescens* kann sich mit dieser Eigenschaft perennierend in der ihr zusagenden Wasserschicht schwebend halten, während andere, z. B. Diatomeen, nach kurzer Entwicklungszeit absinken und zugrunde gehen. Wie aber diese Gasvakuolenbildung in Abhängigkeit von Umweltfaktoren wie Temperatur und Redoxpotential das spezifische Gewicht der Algen regelt, ist noch recht unklar.

2. Akklimatisation

Über diesen biologischen Faktor ist zwar im Bereich der Ökologie des Planktons noch verhältnismässig wenig bekannt. Es ist jedoch leicht einzusehen, dass z. B. Temperaturstürze oder Verdunkelung die Entwicklung von Pflanzen vorerst unterbrechen müssen, bis diese allenfalls an niedrige Temperatur oder schwächere Belichtung angepasst sind und wieder besser zu wachsen vermögen. Solche raschen Umstellungen treten in Seen beispielsweise dann ein, wenn die produktiven Wasserschichten sich am Ende der Sommerstagnation abkühlen und von Zirkulationsströmungen erfasst werden. Bezüglich der Temperatur werden dabei die vorher am tiefsten gelegenen Abschnitte der vom Phytoplankton bewohnten Zone den geringsten Veränderungen unterworfen. Das bedeutet für *O. rubescens*, die ja an tiefe Temperatur akklimatisiert ist, dass sie in dieser Zeitspanne gegenüber den anderen Algen im Vorteil ist. Ihre Entwicklungszeit dehnt sich weiter in den Herbst hinein aus als dieselbe jener Phytoplankter, die entweder an höhere Temperatur akklimatisiert oder überhaupt stenotherm streng an solche gebunden sind.

3. Wuchsstoffe

Mit vermehrter Abwasserzufuhr gelangen bestimmt ausser organischen Nährstoffen auch Wuchsstoffe in die Gewässer, sei es direkt in gelöster Form oder indirekt als Produkte der unter den veränderten Verhältnissen geförderten chemoorganotrophen Flora. Wenn auch Auxoheterotrophie unter Blaualgen nach dem heutigen Stand der Algenphysiologie eine Seltenheit wäre, so ist sie doch bei einer physiologisch-autökologischen Untersuchung von *O. rubescens* aus den gleichen Gründen in Betracht zu ziehen wie die Organotrophie allgemein.

4. Antibiotika

Es ist wohl denkbar, dass extrazelluläre, antibiotisch wirkende Stoffe auch bei *O.-rubescens*-Massenentwicklungen auftreten, wie dies von anderen Algen bekannt ist.

5. Frassverluste

Zooplankter, die in grossen Mengen *O. rubescens* verzehren und so den Bestand deutlich vermindern, gehören zwar nicht ins normale Bild der *Oscillatoriaschicht*, sind aber in Einzelfällen doch schon sehr auffällig geworden: THOMAS [162] berichtet, dass *Nassula aurea* EHRENBERG, ein

holotricher Ziliat, im Zürichsee zeitweise massenhaft *O.-rubescens*-Fäden verzehrt habe. Dieser Zooplankter ist aber nicht an *O.-rubescens*-Seen gebunden, also nicht auf dieses Futter spezialisiert, und er tritt nur sporadisch auf.

6. Parasiten

Gewiss sind parasitische Phykomyzeten auf *O. rubescens* mit der Arbeit von JAAG und NIPKOW [84] systematisch besser bekannt geworden, doch fehlen noch quantitative Angaben über die Einbusse im *Oscillatoria*-bestand, welche diese Pilze zu bewirken vermögen.

★

Mit dieser Übersicht wird das *Oscillatoria*-problem vom biologischen Standpunkt aus einigermassen im Grundriss dargestellt. Die Beantwortung der Einzelfragen lässt sich nun grundsätzlich mit zwei Methoden anstreben: 1. Es wird mit physikalischen, chemischen und biologischen Arbeitsmethoden eine Analyse der Standortsbedingungen und des dabei produzierten *Oscillatoriazell*materials vorgenommen mit der Absicht, die in grosser Zahl über eine längere Zeitspanne verteilt und an vielen örtlich verschiedenen Punkten ermittelten Einzelangaben statistisch auszuwerten. 2. Der zu untersuchende Organismus wird aus dem natürlichen Milieu herausgeholt, von begleitenden Organismen getrennt und im Laboratorium wechselnden Umweltbedingungen physikalischer, chemischer oder biologischer Art unterworfen.

Der Zeit- und Arbeitsaufwand bei statistisch-autökologischer Untersuchung führt über den Rahmen einer Einmannarbeit hinaus. Die physiologische Laboruntersuchung (2.) ist aber in ihren Aussagemöglichkeiten in autökologischer Hinsicht stark eingeschränkt. Es ist beinahe unmöglich, quantitative Angaben über die Einflüsse einzelner Umweltfaktoren auf die Lebensprozesse von künstlich kultivierten Organismen mit den natürlichen Verhältnissen zu vergleichen. Sogar qualitative Befunde können in vielen Fällen nur mit Vorbehalt auf den naturgegebenen Biotop übertragen werden. Beispielsweise darf, wenn in einem Kulturversuch ein Algenstamm als auxoheterotroph befunden worden ist, lediglich vermutet werden, dass am natürlichen Standort diese physiologische Eigentümlichkeit ebenfalls eine Rolle spielt. Es muss aber immer in Erwägung gezogen werden, dass der untersuchte Stamm vielleicht in seinem ernährungsphysiologischen Verhalten nicht dem natürlichen Zustand entspricht, sei es, weil eine durch

Mutation entstandene Besonderheit herausgezüchtet worden ist oder weil Sekundärfaktoren den Stoffwechsel umstimmen.

Trotz allen diesen Einwänden sind aber Laboruntersuchungen unumgänglich, wenn man einen Organismus physiologisch zu klassifizieren versucht, um ihn damit auch autökologisch besser verstehen zu können. Die *physiologische Ökologie* hat sich darum bereits zu einem breiten Arbeitsgebiet entwickelt (BILLINGS [16], KINNE [92]). Sie experimentiert mit physiologischen Methoden und behält dabei ständig die ökologischen Gegebenheiten im Auge. In diesem Sinne befasst sich die vorliegende Arbeit experimentell mit einzelnen Umweltfaktoren physikalischer, chemischer und biologischer Natur, die der Blaualge *Oscillatoria rubescens* ihre ganz charakteristische Stellung innerhalb der Planktonbiozönose zuweisen.

II. Allgemeine Arbeitsmethoden und Material

A. FELDUNTERSUCHUNGEN

I. Planktonprobenahme mit dem sogenannten Zürchertrichter nach JAAG, MÄRKI und BRAUN

Diese Methode zur quantitativen Planktonuntersuchung ist von den erwähnten Autoren selbst zwar bisher nirgends beschrieben worden. Das Gerät findet sich aber unter dieser Bezeichnung im Katalog der Firma *Friedinger*, Wissenschaftliche Apparate, Luzern, mit Katalog-Nr. 3013. VOLLENWEIDER und WOLFF [175] haben eine mit dieser Methode durchgeführte planktologisch-statistische Arbeit publiziert, und einige schweizerische Laboratorien haben zeitweise damit gearbeitet.

An einem 25 cm hohen, zylindrischen, verchromten Blechgefäß mit 10 cm Durchmesser und trichterförmigem Boden kann mit Bajonettring ein Nylongazernetzchen (Nr. 20 NNT Multifil der Schweiz. Seidengazefabrik in Zürich, Lochgrösse rund 60 — 60 μ) von 4 cm Durchmesser (Grösse eines Fünffrankenstückes) befestigt werden. Ein bestimmtes Volumen Seewasser, meist 750 ml, das mit der Friedinger-Schöpfflasche entnommen worden ist, wird filtriert (Abb. I in JAAG [77]). Das Netzchen, auf dem sich Zooplankter und grössere Phytoplanktonformen angesammelt haben, wird zusammengerollt und in ein Pillengläschen 15 × 85 mm (halb gefüllt mit Formol 4%) gesteckt.

Das so fixierte Planktonmaterial wird im Laboratorium mit Wasser vom Netzchen abgespült und zusammen mit dem Pillenglasinhalt unter Zusatz

von einigen Tropfen J-K]-Azetat-Lösung nach UTERMÖHL [174] und 20 Tropfen Lissin (Netzmittel der Firma Geigy, Basel, das ein Aufrahmen der *Oscillatoria*-Fäden verhindert) in Verbundkammern [174] (Volumen 50 ml) sedimentiert und im Umkehrmikroskop ausgezählt.

Die in dieser Weise ermittelten Zahlen sind für *O. rubescens* nicht absolut richtig, weil bei der Probenahme ein Teil der Fäden beim Filtrieren verlorengeht. Es handelt sich auch nicht um Relativwerte, die man untereinander vergleichen könnte, weil die Netzchen bei unterschiedlichem Gesamtplanktongehalt verschieden stark verstopft werden und infolgedessen nicht immer die gleiche Filterwirkung ausüben. Es ist daher bei der Beurteilung der Zählresultate lediglich ein grober Vergleich von Grössenordnungen zulässig.

2. Planktonprobenahme durch Pumpen

Zur Entnahme von Planktonmaterial aus der Zone maximaler *Oscillatoria*-entwicklung wurde jeweils eine Gummischlauchleitung mit Gewicht in die günstige Schicht abgesenkt und mittels einer kleinen, transportablen Benzinmotorpumpe (Homelite) Wasser emporgepumpt. Zur Anreicherung des Planktons dienten zwei ineinandergehängte, ins Oberflächenwasser eingetauchte Phytoplanktonnetze.

B. LABORUNTERSUCHUNGEN

I. Kulturmethoden

a) *Algenkulturraum*

Temperatur. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden in einem Kellerlaboratorium ausgeführt. Der Raum ist nicht streng temperaturkonstant regulierbar, doch können mit einem starken Ventilator in Verbindung mit elektrischem Ofen und Zimmerthermostat wenigstens in jenem Raumabschnitt, wo die eigentlichen Kulturversuche angestellt werden, Temperaturen zwischen 20 und 23°C eingehalten werden. Wo nichts besonderes bemerkt wird, sind alle Kulturen bei dieser Temperatur gehalten worden.

Beleuchtung. Das Tageslicht, welches durch ein kleines, halbverdunkeltes Fenster beim Arbeitstisch eintreten kann, ist im Verhältnis zur künstlichen Beleuchtung sehr schwach, und sein Einfluss auf die Kulturen darf vernachlässigt werden. Die Kulturgefässe lassen sich auf Gestellen mit

Glastablaren halten, wo mit Fluoreszenzröhren vom Typ *Osram Fl 40 W/ weiss* unterschiedliche Beleuchtungsstärken bis rund 1500 Lux eingerichtet werden können. Die Lampen bleiben durchgehend, auch nachts, in Betrieb.

Alle Angaben, die in dieser Arbeit über die Beleuchtungsstärke gemacht werden, sind mit einem Luxmeter an der Oberfläche der Kulturen in Richtung zur wichtigsten Lichtquelle gemessen worden. Streulicht von den weissen Wänden des Raumes, welches durch die Glastablare aus allen Richtungen zutreten kann, ist dabei nicht berücksichtigt worden. Bei der wechselnden Dichte der Kulturen und der unterschiedlichen Turbulenz bei verschiedenartigen optischen Eigenschaften des Substrats, z. B. beim Vergleich von flüssigen und festen Medien, ist ohnehin die pro Algenzelle eingestrahelte Lichtenergie nicht streng zu definieren. Unter der hier getroffenen Versuchsanordnung geben daher die Luxwerte lediglich einen groben Anhaltspunkt über die Beleuchtungsverhältnisse.

Schüttelmaschine. Die in diesem Laboratorium zur Verfügung stehende Schüttelmaschine besteht aus zwei in 45 cm Abstand übereinanderliegenden Holztablaren von 65 × 65 cm Ausmassen. Es lassen sich je 36 Erlenmeyerkolben (200 ml) darauf schütteln, normalerweise mit einer Hin- und Herbewegung pro s über 5 cm horizontale Weglänge.

b) *Glaswaren*

Die meistverwendeten Kulturgefässe (Erlenmeyerkolben mit 100 bzw. 200 ml Volumen und Nährbodenflaschen mit 500 ml Inhalt) bestanden aus *Jenaer Geräteglas 20*, die Petrischalen (15 × 100 mm) und Reagenzgläser (starkwandig, ohne Rand, Grösse 160 × 16 mm) aus gewöhnlichem Hartglas.

Alle Kulturgefässe durchliefen vor dem Gebrauch den von WIKÉN und ÖBLOM [184] vorgeschlagenen Reinigungsvorgang mit Sodawasser, Chromschwefelsäure, Salzsäure, Leitungswasser und destilliertem Wasser.

In einzelnen Experimenten folgte darauf noch eine *erweiterte Reinigung*, indem die Glaswaren, nachdem das destillierte Wasser ausgetropft war, wieder mit frisch destilliertem Wasser gefüllt und so im Autoklav während 20 Minuten auf 121°C erhitzt wurden. Das heisse Wasser wurde dann ausgeleert, und die Kolben oder Röhrchen blieben verkehrt aufgehängt, bis sie trocken waren. Danach wurden sie sofort mit Wattestopfen verschlossen und sterilisiert.

c) *Verschlüsse der Kulturgefässe*

Erlenmeyerkolben wurden mit Stopfen aus entfetteter, chemisch reiner Watte, Reagenzgläser mit solchen aus Rohwatte verschlossen. Grosse, be-

lüftete Kulturen in Nährbodenflaschen wurden mit durchlochtem Gummistopfen (darunter eine Schicht chemisch reiner Watte) verschlossen, und die Luftzuführ- bzw. Probenahmerohre wurden mit dichtgepackter, chemisch reiner Watte gestopft. In wenigen Spezialfällen kam bei Anaerobierkulturen in Reagenzgläsern der Verschluss mit Pyrogallol- und Sodalösung nach RITTER und DORNER [142] zur Anwendung.

d) Destilliertes Wasser

Zur Herstellung von destilliertem Wasser diente eine Durchflussapparatur aus Jenaer Geräteglas 20 mit Tauchsieder. Doppelt destilliertes Wasser wurde in einer Pyrexglasanlage mit Erhitzung von aussen zubereitet, wobei das Destillat in sterilen Nährbodenflaschen aufgefangen werden konnte. Wenn nicht sofort verwendet, wurde dieses Destillat im Autoklav sterilisiert, damit nicht durch eingeschleppte Bakterien Vitaminspuren gebildet werden konnten.

e) Chemikalien

Um eine spätere Kontrolle über die Verlässlichkeit der in dieser Arbeit beschriebenen ernährungsphysiologischen Versuche und der Analysemethoden zu gewährleisten, werden sämtliche verwendeten Chemikalien hier nach Qualität und Herkunft geordnet aufgeführt:

Chemikalien in Qualität «pro analysi». Baker, Phillipsburg, N.J. («Baker Analyzed Reagents»): K_2HPO_4 ; Zinn, feingekörnt. – *The British Drug Houses* («Analar»): $MnSO_4 \cdot 4H_2O$; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$; Na-K-Tartrat. – *Elektrokemiska A.B.*, Bohus, Schweden: NaOH. – *Kahlbaum*: K_2CO_3 . – *E. Merck*, Darmstadt: $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; $HgCl_2$; KNO_3 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; Na_2CO_3 ; $NaNO_3$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; H_3BO_3 ; HCl, spez. Gew. 1,16; H_2SO_4 conc. – *Rheinsalinen*: NaCl. – *Riedel-de Haën*, Seelze-Hannover: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $Fe_2(SO_4)_3 \cdot aq.$; KCl; KJ; KH_2PO_4 ; $NaHCO_3$; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; NH_4Cl . – *Siegfried*, Zofingen: Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz («Komplexon III»).

Chemikalien in Qualität «rein» unbekannter Herkunft. $Al_2(SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 24H_2O$; $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; $Cr(NO_3)_3 \cdot 7H_2O$; Ferricitrat; KBr; KCN; K_2SiO_3 ; Na_2SiO_3 ; $NiSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$; $V_2O_4(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$; Zitronensäure; Formalin 40%; Glycerin; Natriumsalizylat (reinst); p-Nitrophenol; Pyrogallol; 1,3-Dihydroxy-2-hydroxymethyl-2-amino-propan (Tris[hydroxymethyl]aminomethan, kurz genannt TRIS).

Besondere Präparate für organische Substrate. The British Drug Houses: Pepton (bact.); Stärke, löslich, «Analar». – *Difco Laboratories*, Detroit, Mich.: Agar; Fluid Thioglycollate Medium; Litmus Milk; Nutrient Agar; Nutrient Gelatin; Proteose-Peptide; Tryptone; Tryptone Glucose Extract Agar; Yeast Extract. – *Du Pont*: Silicagel «Ludox». – *Hoffmann-La Roche*, Basel: D(–)-Fructose; D(+)-Galactose; D(+)-Glucose, vitaminfrei; Maltose. – *Eastman Kodak*, Rochester, N.Y.: l-Asparagin. – *E. Merck*, Darmstadt: Harnstoff, reinst. – *Oxo*, London: Casein-Hydrolysate. – *Witte*, Rostock: Pepton. – *Handelsqualität*: Biomalz; Eialbumin; Fleischextrakt «Lemco»; Mannit; Natriumcaseinat; Rohrzucker.

Antibiotika. Ciba, Basel: Rovamycin (= Foromacidin). – *Glaxo*, Gleenford, England: Streptomycin (Sulfat). – *Lederle*, New York: Aureomycin-Hydrochlorid (krist., intravenös, mit Natriumglycinatpuffer). – *Pfizer*, New York: Bacitracin (intramusk./intrathek.); Polymyxin B Sulfat, Tabletten. – *Upjohn*, Kalamazoo, Mich.: Actidion. – *Wild*, Basel: SEBAS-Test-Antibiotikablättchen mit Aureomycin, Bacitracin, Chloromycetin, Erithromycin, Magnamycin, Neomycin, Oleandomycin, Penicillin, Polymyxin, Rovamycin, Sigmamycin, Streptomycin, Tetracyclin, Terramycin und einem Sulfonamid³⁾.

Vitamine. Hoffmann-La Roche, Basel: p-Aminobenzoesäure; (+)-Biotin; D-Pantothensaures Calcium; Folsäure; meso-Inosit; Vitamin B₁(Thiaminhydrochlorid); Vitamin B₁₂; Nicotinsäure. – *Sigma*, St. Louis, Miss.: Thymin.

f) Sterilisation

Der im Institut vorhandene Autoklav mit 90 l Volumen kann in 20 min auf 100°C erhitzt werden und erreicht 10 min nach Schliessen des Deckels 121°C. Normalerweise wurde diese Temperatur während 20 min eingehalten. Nach Abstellen senkte sich die Temperatur innert 35 min wieder auf 100°C.

Zur trockenen Sterilisation wurden die Glaswaren im Trockenschrank erhitzt und während einer Stunde bei 160°C belassen.

g) Impfung

Kulturen, bei denen keine besonderen Vorsichtsmassnahmen nötig waren, konnten in einem geschlossenen Raum unter Abflambieren der Öffnungen der Kulturgefässe, Pipetten, Impfnadeln u. dgl. überimpft werden.

³⁾ Die Firma Dr. Wild, Basel, lieferte sämtliche für die vorliegende Arbeit benötigten SEBAS-Test-Blättchen kostenlos, was an dieser Stelle bestens verdankt sei.

Für spezielle Zwecke stand ein Impfkasten zur Verfügung, der anfänglich mit Desogen und Formol sterilisiert wurde (Desogen zum Abwaschen der Tischplatte, 1 ml Formol verdampft). Obwohl sich in der auch nach Stunden noch etwas formolhaltigen Atmosphäre keine auffällende Schädigung der Algen beim Überimpfen bemerkbar machte, kam später vorsichtshalber die UV-Sterilisation der Luft zur Anwendung (Quarz-Quecksilberbrenner Philips Biosol Typ B1 (500 W), je 1 h von der Mitte des Impfkastens in zwei entgegengesetzte Richtungen).

2. Analysenmethoden

a) pH-Messung

Ein Polymetron-Messgerät Typ 44 mit Einstabmesskette (Glaselektrode und Kalomelbezugselektrode, Innenwiderstand 250 M Ω), geeicht mit Ingold-Pufferlösungen (pH 4, 7 bzw. 9), diente zur potentiometrischen Bestimmung der pH-Werte.

b) Trockengewichtsbestimmung

Das Algenmaterial liess sich durch Zentrifugieren (sedimentierend oder aufrahmend bei 4000 U/min) nicht immer vollständig von der Nährlösung trennen. Oft war es nötig, die Suspension noch mittels Filtration durch Membranfilter («C05» der Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen) zu klären. Sowohl das abzentrifugierte und gewaschene Zellmaterial als auch der Rest auf den Membranfiltern konnten dann bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen werden.

c) Photometrische Wachstumskontrolle

In Kulturen von *O. rubescens*, die eine gleichmässige Fadensuspension darstellten, konnte das Algenwachstum photometrisch verfolgt werden. Damit liessen sich umständliche Zählungen vermeiden. Die Anzahl der produzierten *O.-rubescens*-Zellen hätte ohnehin nur mit ausserordentlich grossem Arbeitsaufwand festgestellt werden können, z. B. durch Auszählen der Fäden und Messen der mittleren Faden- und Zelllänge (OLSON [123]). Für verlässliche Trockengewichtsbestimmungen bei geringer Dichte der Suspensionen wäre eine grosse Anzahl von Parallelkulturen notwendig gewesen.

Nephelometrische Messungen (DILLER und KERSTEN [32]) erbrachten keine befriedigenden Resultate. Dagegen konnte die *Extinktionsmessung* bei

durchtretendem Licht, wie es in vielen algenphysiologischen Arbeiten schon getan worden ist (z. B. RODHE [144], CHU [26], GROSS und KOCZY [64], HUTNER, PROVASOLI und FILFUS [74], KRATZ und MYERS [97]), sehr gut angewendet werden. Das Vorgehen hielt sich vor allem an die Methoden von KRATZ und MYERS [97].

Im *Sigris-Photometer Typ UP2/ID* konnten direkt Extinktionswerte E abgelesen werden: $E = \log_{10} I_0/I_z$, wobei die Schichtdicke z je nach Küvette 5, 10, 15 oder 35 mm betrug. I bezeichnet die Lichtintensität, hier stets bei $\lambda = 610 \text{ m}\mu$ (Filter).

Bei Verdünnungen ein und derselben *O. rubescens*-Kultur ergab sich jedoch keine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Extinktion bzw. optischer Dichte (Abb. 1). Je nach Pigmentierung und durchschnittlicher Fadenlänge veränderten sich die Verhältnisse ein wenig. Es konnte daher keine streng allgemeingültige Eichkurve für die Bestimmung des Algentrockengewichtes auf Grund der optischen Dichte aufgestellt werden. Wenn z. B. in einem bestimmten Zeitpunkt in einer Algenkultur eine Extinktion von 0,35 bestimmt worden ist, so müsste nach Verdoppelung der Zellmasse im Idealfall $E = 0,7$ gemessen werden. Nach Abbildung 1 käme man aber bloss auf $E = 0,6$, nach einer weiteren Verdoppelung auf ca. $E = 1,0$ statt

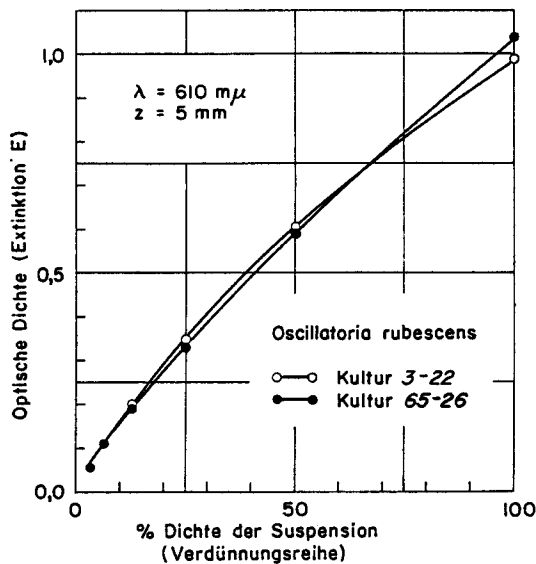


Abbildung 1
Messung der Extinktionswerte bei verschiedenen Verdünnungen zweier dichter Kulturen von *O. rubescens*.

1,4. Um vergleichbare Werte zu bekommen, müsste man also immer mit Verdünnungen von gleicher optischer Dichte arbeiten und dann auf Grund des nötigen Verdünnungsfaktors auf die ursprüngliche Dichte der Suspension schliessen.

Nach diesen Beobachtungen wurde dann das folgende Verfahren entwickelt, welches innerhalb einzelner Versuchsserien mit geringem Arbeitsaufwand vernünftige Vergleichswerte lieferte:

1. Die Suspensionen wurden grundsätzlich wenn möglich so verdünnt, dass der E -Messwert nahe bei 0,3 (Lichtdurchlässigkeit ca. 50%) lag.

2. Je eine dichte Kultur pro Mess-Serie wurde stufenweise verdünnt. Die abgelesenen E -Werte wurden durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor auf die ursprüngliche Konzentration umgerechnet. Beispiele (entsprechend Abb. 1) sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1
Extinktionsmessungen in verschiedenen Verdünnungen zweier dichter Kulturen von O. rubescens

| Kultur | Verdünnungs-Faktor F | Extinktion (gemessen) ¹⁾ E | $(F \cdot E)$ | Idealwert (aus Abb. 2) $(F \cdot E)_{0,3}$ | $(F \cdot E)$ in % von $(F \cdot E)_{0,3}$ |
|--------|---------------------------|---|---------------|--|--|
| 3-22 | 1 | 1,04 | 1,04 | 1,37 | 75,9 |
| | 2 | 0,587 | 1,17 | | 85,4 |
| | 4 | 0,334 | 1,34 | | 97,8 |
| | 8 | 0,188 | 1,50 | | 109,5 |
| | 16 | 0,104 | 1,66 | | 121,2 |
| | 32 | 0,056 | 1,79 | | 130,6 |
| 65-26 | 1 | 0,99 | 0,99 | 1,45 | 68,3 |
| | 2 | 0,605 | 1,21 | | 83,5 |
| | 4 | 0,347 | 1,39 | | 95,8 |
| | 8 | 0,201 | 1,61 | | 111,0 |
| | 16 | 0,111 | 1,78 | | 122,8 |

¹⁾ Mittelwert von 3 Einzelproben.

3. In einer graphischen Darstellung wurde nun $F \cdot E$ als Funktion von E aufgezeichnet (Abb. 2). Im Schnittpunkt der so aufgestellten Kurven mit der bei $E = 0,3$ eingetragenen Senkrechten liess sich derjenige Wert für die optische Dichte ermitteln, der bei exakter Verdünnung auf $E = 0,3$ bestimmt worden wäre. Für die beiden gewählten Beispiele betrug dieser Idealwert $(F \cdot E)_{0,3}$ 1,37 (für Kultur 3-22) bzw. 1,45 (für Kultur 65-26).

4. Der in dieser Weise durch Interpolieren ermittelte Idealextinktionswert konnte nun als 100% angenommen werden. Die bei stärkerer Ver-

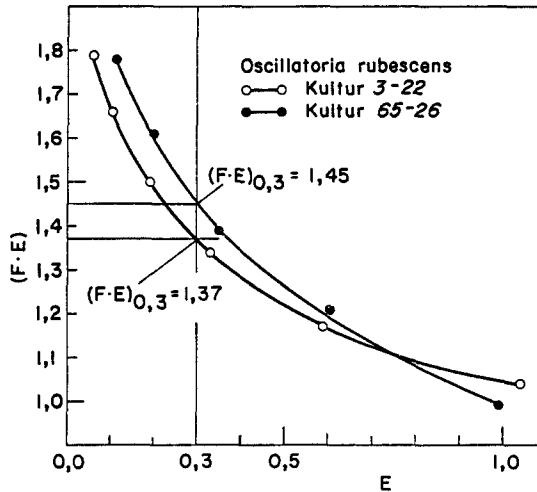


Abbildung 2

Ermittlung des Extinktionswertes $(F \cdot E)_{0,3}$ für zwei *O.-rubescens*-Kulturen auf graphischem Wege (vgl. Tab. 1).

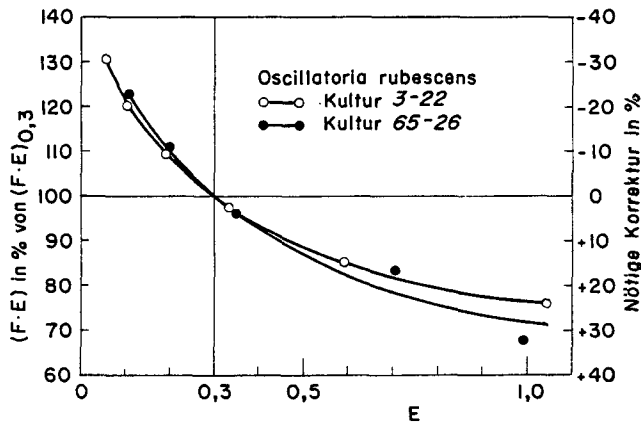


Abbildung 3

Korrektur von Extinktionsmesswerten in *O.-rubescens*-Kulturen im bezug auf die als ideal angenommene Dichte mit $E = 0,3$.

dünnung bestimmten Werte wären also zu hoch gewesen, die bei geringerer Verdünnung oder direkt gemessenen dagegen zu niedrig. Wiederum graphisch liessen sich sodann die nötigen Korrekturen für irgendeinen Messwert E in anderen, entsprechenden Kulturen der gleichen Serie (die unter gleichen Aussenbedingungen gewachsen waren) festlegen: Die Grösse $(F \cdot E)$ in % von $(F \cdot E)_{0,3}$ wurde als Funktion von E dargestellt (Abb. 3). Dieser Kurve liegen die Zahlen in der letzten Spalte von Tab. I zugrunde.

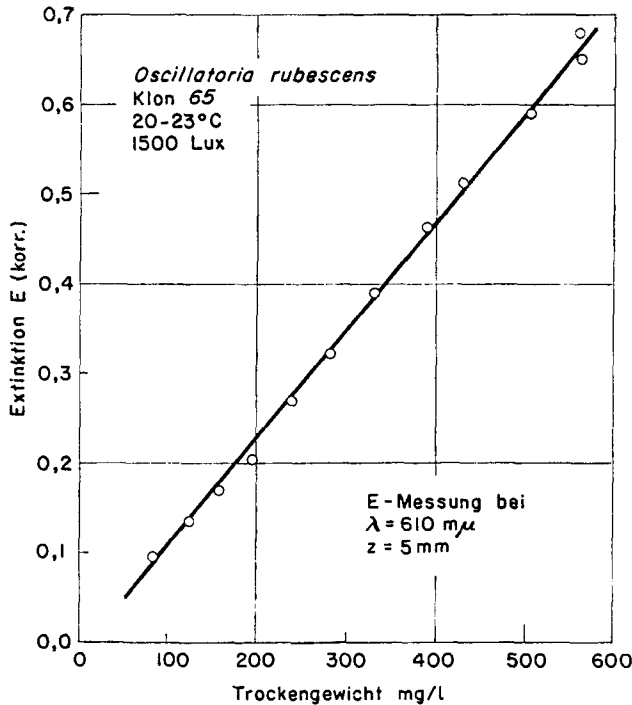


Abbildung 4

Zusammenhang zwischen Extinktionswert und Trockengewicht in verschiedenen Kulturen von *O. rubescens*. Jeder Punkt bezeichnet den Mittelwert von drei Einzelbestimmungen in verschiedenen Kulturen von gleichem Alter (17 Tage), deren Dichte infolge unterschiedlichem Nährstoffgehalt der Kulturmedien variiert. Die E -Werte sind nach dem auf Seiten 99 ff. beschriebenen Verfahren korrigiert.

Die hier als Beispiel herangezogenen Verdünnungsreihen machten verhältnismässig grosse Korrekturen nötig. In anderen Fällen, wo durchschnittlich kürzere Fäden vorlagen (z. B. bei Kulturen von der Schüttelmaschine), blieben die $(F \cdot E)$ -Werte noch sehr nahe bei 100%, auch wenn beträchtlich unter oder über $E = 0,3$ gemessen wurde. Beispielsweise stieg bei der geschüttelten Kultur 65-33 die entsprechend Abb. 3 dargestellte Kurve bei $E = 0,1$ nicht über 103% hinaus und hielt sich bis $E = 0,7$ zwischen 95 und 100%.

Zur Kontrolle über die Verlässlichkeit der hier beschriebenen Mess- und Korrekturmethode wurden in einem Wachstumsversuch parallel zu den Messungen der optischen Dichte bei verschiedenen Kulturen auch die Trockengewichte kontrolliert. Es bestand über den ganzen benötigten Bereich (0 bis 600 mg/l Trockengewicht) eine bemerkenswert gute lineare

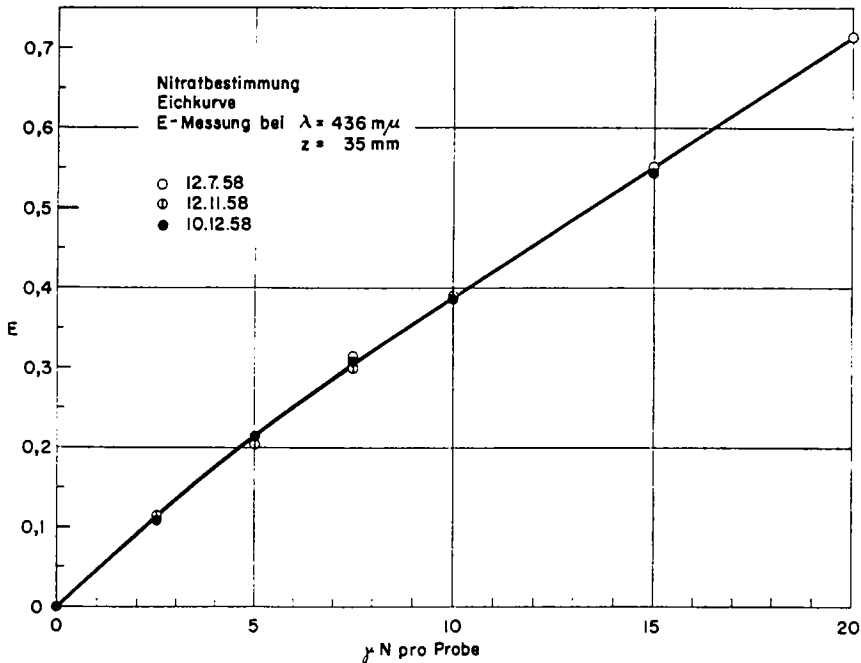


Abbildung 5

Eichkurve für die Nitratbestimmung nach SCHERINGA [148].

Beziehung der gewogenen Algenmenge und dem korrigierten Wert für die optische Dichte (Abb. 4).

Im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Versuche war es vorläufig nicht nötig, die gleiche Beziehung auch noch unter anderen Temperatur- und Beleuchtungsbedingungen und mit einer grösseren Anzahl von kultivierten Stämmen aufzustellen. Die photometrische Wachstumskontrolle diente ja nur als Hilfsmittel; sie wurde in keinem Falle zur indirekten Ermittlung von Trockengewichten benützt. Als rasch arbeitende Kontrollmethode war sie aber äusserst zweckdienlich.

d) Nitratbestimmung im Substrat

In membranfiltrierten Kulturlösungen konnte der Nitratgehalt mit einer Modifikation der *Salizylatmethode* von SCHERINGA [148] bestimmt werden. Dazu wurden je 25 ml geeigneter Verdünnungen der Substrate mit Zusatz von 1 ml Natriumsalizylatlösung (0,5%) im Trockenschrank bei 105°C eingedampft. Nach Abkühlen der trockenen Rückstände wurden diese mit

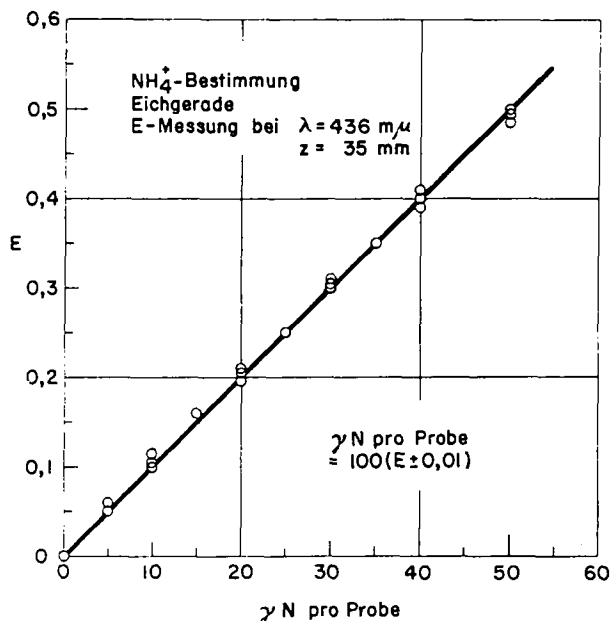


Abbildung 6

Eichgerade für die Bestimmung des NH_4^+ -Ions in Destillaten der Aufschlüsse von *O.-rubescens* Zellmaterial (Nessler-Methode).

1 ml H_2SO_4 conc. aufgelöst und mit ca. 40 ml destilliertem Wasser in Messkolben (50 ml) übergespült. Dann folgte ein Zusatz von 7 ml Natronlauge 30%, Auffüllen auf 50 ml und Extinktionsmessung bei $\lambda = 436 \text{ m}\mu$, Schichtdicke $z = 35 \text{ mm}$ im Sigrist-Photometer. Bei jeder Bestimmungsserie wurde eine Typreihe von NaNO_3 -Lösungen bestimmter Konzentrationen zur Kontrolle mitgenommen. Die Verdünnungen der Nährlösungen wurden so angesetzt, dass sie nach Möglichkeit einen Extinktionswert E zwischen 0,2 und 0,4 ergaben, doch konnten gemäss Eichkurve (Abb. 5) auch Werte in weiteren Bereichen für die Berechnung der Nitratkonzentration gebraucht werden.

e) Gesamtstickstoffbestimmung im Zellmaterial

Das Algenmaterial wurde zunächst in 200 ml-Kjeldahlkolben mit 2 ml H_2SO_4 conc. und 0,5 ml Kupfersulfatlösung (0,05 m) aufgeschlossen und darauf alkalisch destilliert in eine Vorlage von destilliertem Wasser.

Der Ammoniakgehalt dieser Destillate wurde nach der Methode von NESSLER photometrisch bei $\lambda = 436 \text{ m}\mu$ in einer Schichtdicke von 35 mm

bestimmt. Dazu wurden zu einem Probevolumen von 50 ml (geeignete Verdünnung) je 2 ml Nessler's Reagens⁴⁾ und Seignettesalzlösung⁵⁾ zugesetzt. Die Ablesung erfolgte frühestens 15, spätestens 60 min nach Zusatz. Bei jeder Probeserie kam eine Typreihe von NH_4Cl -Lösungen bekannter Konzentration zur Kontrolle mit (Eichgerade: Abb. 6).

f) Gesamtphosphorbestimmung im Zellmaterial

Das sorgfältig gewaschene Algenmaterial, welches beim Zentrifugieren aufrahmte, sich also weitgehend von schwerlöslichen Phosphatausfällungen trennen liess, wurde ebenfalls mit H_2SO_4 und Kupferkatalysator aufgeschlossen, wie unter e) angeführt. Im gleichen Aufschluss liess sich also sowohl der Gesamtstickstoff- als auch der Gesamtphosphorgehalt bestimmen.

Zur Phosphatbestimmung musste vorerst in jeder Probe derselbe Na_2SO_4 - und H_2SO_4 -Gehalt eingestellt werden: 25 ml einer geeigneten Verdünnung des Aufschlusses wurden in einem geeichten 50-ml-Nesslerzylinder mit 3 ml NaOH 32% (N-frei) und 2 Tropfen p-Nitrophenollösung (0,05%) versetzt. Mit H_2SO_4 conc. wurde dann neutralisiert und 0,2 ml H_2SO_4 im Überschuss zugegeben. Nach Auffüllen auf 50 ml folgten Umgiesen in Erlenmeyerkolben (200 ml), Zusatz von 0,25 ml KCN -Lösung (1%), 1 ml Molybdän-Wolfram-Reagens⁶⁾ und 0,25 ml Zinnchlorürlösung⁷⁾, Messung der Farbintensität im Sigrist-Photometer bei $\lambda = 660 \text{ m}\mu$, $z = 35 \text{ mm}$. Die bei jeder Bestimmungsserie mitgenommenen Na_2HPO_4 -Lösungen bekannter Konzentration erhielten dieselben Schwefelsäure-, Natriumsulfat- und Reagenzienzusätze. Die Ablesung der Molybdänblau-Farbintensität erfolgte zwischen 5 und 20 min nach Reagenzienzusatz. Es wurden nur *E*-Werte zwischen 0,1 und 0,4 zur Berechnung des Gesamtphosphorgehaltes verwendet. In diesem Bereich war die Beziehung linear,

⁴⁾ *Nessler's Reagens*: 50 g KJ werden gelöst in 50 ml heissem, destilliertem Wasser. Nach Zusatz von frischer, gesättigter HgCl_2 -Lösung (bis der entstehende Niederschlag sich nicht mehr löst) Filtration, Mischung mit einer Lösung von 108 g NaOH in 100 ml dest. Wasser, Auffüllen auf 1 l mit dest. Wasser, Zufügen von 5 ml HgCl_2 -Lösung im Überschuss. Zur Verwendung wird die klare Lösung dekantiert. Aufbewahrung im Dunkeln.

⁵⁾ *Seignettesalzlösung*: Eine Lösung von 100 g Na-K-Tartrat in 200 ml H_2O wird filtriert, mit 10 ml Nessler's Reagens versetzt und zur Verwendung dekantiert. Auch diese Lösung sollte im Dunkeln aufbewahrt werden.

⁶⁾ *Molybdän-Wolfram-Reagens*: 5 g Ammonmolybdat und 0,1 g Natriumwolframat werden unter leichtem Erwärmen in 50 ml dest. Wasser aufgelöst und mit 175 ml verd. H_2SO_4 (1 : 1) versetzt.

⁷⁾ *Zinnchlorürlösung*: 6,25 g metallisches Zinn, fein gekörnt, werden in 70 ml HCl (25%) am Rückflusskühler unter leichtem Erwärmen aufgelöst und mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt. Zum Gebrauch wird diese Stammlösung 20mal verdünnt.

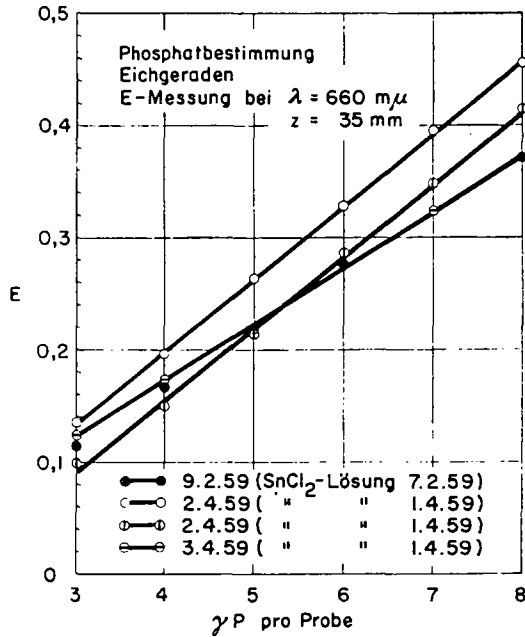


Abbildung 7

Verschiedene Eichgeraden für die Phosphatbestimmung mit Molybdänblau in Aufschlüssen von *O.-rubescens*-Zellmaterial.

veränderte sich aber zwischen den einzelnen Bestimmungsreihen etwas, je nachdem, ob die ZnCl_2 -Lösung gerade frisch hergestellt oder schon einige Tage gelagert worden war (Abb. 7).

III. Entwicklung der Kulturmethoden

A. DER HEUTIGE STAND DER BLAUALGEN-KULTURMETHODIK

Die allgemeinen Prinzipien der Algenkulturmethode sind in neuerer Zeit von BOLD [17], PRINGSHEIM [131], [133, 134], BRUNEL et al. [19], BURLEW [21] und VON WITSCH [186] dargestellt worden. Drei weitere Arbeiten befassen sich im besonderen mit den Problemen der Blaualgenkultur: GERLOFF, FITZGERALD und SKOOG [56], ALLEN [3] und KRATZ und MYERS [97]. Für eine Beurteilung der vielen Möglichkeiten und günstigsten Wege zur Kultivierung dieser Organismen steht ausserdem eine reichhaltige physiologische Literatur zur Verfügung. Es sollen hier nur jene Arbeiten zitiert werden, die in den obengenannten Zusammenfassungen

noch nicht berücksichtigt worden und doch für die im folgenden beschriebenen Versuche von Bedeutung sind. In diesem Sinne werden auch Ergebnisse von Experimenten mit Grünalgen herangezogen.

1. Kulturgefässe

Neben den herkömmlichen Methoden der Kultivierung in Erlenmeyerkolben, Reagenzgläsern und Petrischalen sind neuerdings für spezielle Zwecke sowohl zur Verwendung mit flüssigen als auch mit festen Substraten neue Gefässe und Einrichtungen vorgeschlagen worden.

Für fädige Blaualgen sollen nach DREWS [34] flüssige Medien ungünstig sein. Auf Glasfilterplatten von 5 mm Dicke, die in Petrischalen in eine 5 mm tiefe Schicht von Nährlösung gelegt werden, gedeihen solche Arten aus den Gattungen *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Anabaena* und *Cylindrospermum* hingegen sehr gut. In ähnlicher Weise verwendet KINNE-DIETRICH [93] Papierfilter, die in Petrischalen mit Nährlösung getränkt werden.

In anderen Laboratorien werden besondere Vorkehrungen für gute Turbulenz in den flüssigen Substraten getroffen, z. B. mit Hilfe von Schüttelmaschinen (ALGÆUS [1], WALKER [177]) oder durch Belüftung, sei es in kleinen Reagenzgläsern (SOROKIN und MYERS [153]) oder in grossen Kulturröhren von etwa 2 l Inhalt (REISNER und THOMPSON [141]).

In vielen Fällen ist es möglich, Blaualgenkolonien oder -zellen so gleichmässig in flüssigem Medium verteilt zu halten, dass eine kontinuierliche Verdünnung, automatisch geregelt nach Massgabe der Zuwachsrates, eine gleichbleibende Dichte der Algensuspension gewährleistet. Für bestimmte experimentelle Arbeiten ist diese Methode der kontinuierlichen Kultur mit konstanter Zellkonzentration besonders günstig. MONOD [120] gibt eine Einleitung in die theoretischen Belange dieser Technik. PHILLIPS und MYERS [127] wenden sie bei verhältnismässig kleinen Kulturvolumina an. FUJIMOTO und Mitarbeiter [52, 53] bearbeiten damit physiologische Fragen am Beispiel von *Chlorella* in Versuchsanordnungen, die im Prinzip auch bei Blaualgen verwendet werden können. Neuerdings ist auch eine wertvolle tschechische Publikation [29] über dieses Arbeitsgebiet herausgekommen.

2. Substrate

In den eingangs erwähnten allgemeinen Algenkulturanweisungen kommt zum Ausdruck, dass man zur Züchtung von Blaualgen eigentlich über *keine echten Selektivmedien* verfügt, weil ihre Nährstoffansprüche ziemlich gut mit denen der Grünalgen und anderer Mikrophyten übereinstimmen und im

grossen ganzen wenig spezialisiert sind. Besonderheiten wie relativ hohen Kalziumbedarf (bei Grünalgen besteht dagegen nur ein Bedarf in Spurenkonzentration [177]) oder beträchtliche Molybdän-, Kobalt- und Natriumansprüche kann man zwar in der Zusammensetzung der Blaualgenmedien berücksichtigen, verhindert damit aber ein Wachstum anderer Algen nicht. Will man nicht besondere Arten aus extremen Standorten züchten (z. B. die Flora der Thermalquellen), so sind daher die für andere Algen gültigen methodischen Richtlinien auch weitgehend für Blaualgen gültig.

Gegenüber Grünalgen ist lediglich eine unverkennbare Tendenz zum Bevorzugen *höherer pH-Werte* – ca. 8 bis 10 – festzustellen. Die Pufferung der Substrate in dieser Höhe bietet allerdings Schwierigkeiten. Eine Neuerung in dieser Beziehung bildet die Einführung des organischen Puffers TRIS (S. 95) durch PROVASOLI, MCLAUGHLIN und DROOP [139] für marine Algen.

Charakteristisch, aber nicht für alle Blaualgen nachgewiesen, ist ferner ein *spezifischer Natriumbedarf*, der nicht mit anderen Alkalimetallen gedeckt werden kann. Diese Eigentümlichkeit ist von BENECKE [15] 1898 erstmals beobachtet und neuerdings u. a. von ALLEN und ARNON [6] am Beispiel von *Anabaena cylindrica* wieder näher untersucht worden.

Über spezifische Wirkungen von *Spurenelementen* liegen bei Blaualgen nur wenige neuere Arbeiten vor (z. B. EYSTER [39] über Bor bei *Nostoc muscorum*, WOLFE [187] über Molybdän bei *Anabaena cylindrica* und HOLM-HANSEN, GERLOFF und SKOOG [70] über Kobalt und Molybdän bei *Calothrix*-, *Coccochloris*-, *Diplocystis*- und *Nostocarten*), so dass man immer noch darauf angewiesen ist, den Nährlösungen mit streng definierter Zusammensetzung sogenannte A-Z-Lösungen zuzusetzen, um so den allfälligen, aber nicht genau bekannten Spurenelementbedarf zu decken.

Im Bestreben, solche Elemente gelöst in den Kulturen verfügbar zu halten und Niederschläge z. B. von schwerlöslichen Eisenverbindungen zu vermeiden, werden *chelierende Zusätze* wie Zitronensäure oder Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) in modernen synthetischen Substraten fast durchwegs angewendet (z. B. [25], [139]). Ob solche Substanzen allerdings als «biologisch inerte Chelatbildner» bezeichnet werden dürfen (VON WITSCH [186]), ist fraglich: SPENCER [156] findet zwar gewiss, dass EDTA durch den Stoffwechsel einzelliger Meeresalgen nicht direkt berührt wird und stabil bleibt. Experimente von KRAUSS [98] mit C¹⁴-markierter EDTA zeigen aber, dass diese Säure von den Zellen aufgenommen und abgebaut wird. Auch die Resultate der Untersuchungen von KRUGERS und AGTERDENBOS [101] weisen darauf hin, dass EDTA am Stoffwechsel beteiligt ist.

FREDRICK [51] findet einen Effekt von EDTA auf die Enzyme, welche in der Polyglykosidsynthese wirksam sind, durch Komplexbildung mit hemmenden Metallen (bei niedriger EDTA-Konzentration) oder mit Enzymaktivatoren wie Ca und Mn (bei höherer EDTA-Konzentration). Auch WEINSTEIN, MEISS, UHLER und PURVIS [181] berichten über wachstumsfördernde Wirkungen von EDTA, und WARIS [178] weist nach, dass der pH-Bereich für Desmidiaceen in Kultur erweitert wird durch Zusatz von EDTA zur Nährlösung, was indirekt über die Löslichkeit der Nährstoffe erklärt wird. So darf EDTA gewiss nicht allgemein als biologisch inert betrachtet werden. Es können aber die früher vielfach verwendeten Erdextrakte damit teilweise oder ganz ersetzt werden. Auch Aminosäuren mögen mit der gleichen Zweckbestimmung in sonst anorganische Substrate eingeführt werden (LEVRING [107]), und in derselben Richtung wirkt GOLDBERG [61], indem er durch Überzug der Glaswände mit einem Kieselsäure-Polymerisat die Eisenadsorption an die innere Oberfläche der Kulturgefäße und damit einen Eisenmangel in der Lösung verhindert.

In zusammenfassenden Darstellungen über die *Vitaminansprüche* von Algen (z. B. [48], [99], [109], [135, 136], [147]) fällt auf, dass unter den vielen Fällen von Auxoheterotrophie nur eine einzige Blaualgenart genannt wird: PINTNER und PROVASOLI [128] finden eine nicht ganz spezifische Vitamin-B₁₂-Heterotrophie bei *Phormidium persicinum*. Andere Blaualgen, die in Kulturen schon untersucht worden sind, können die von vielen Algen benötigten Vitamine B₁, Riboflavin und Biotin offenbar selbst synthetisieren. Auxoheterotrophie ist somit unter Blaualgen eine ausgesprochene Seltenheit.

Spezifische Fähigkeiten zur Verwertung von organischen C- und N-Quellen (*fakultative Organotrophie*) sind zwar verschiedenen Blaualgen eigen, werden aber im Zusammenhang mit Kulturmethoden erst in zweiter Linie interessant, weil unter solchen Bedingungen das Wachstum von heterotrophen Begleitorganismen stark gefördert würde. Solange es sich nicht um obligate Organotrophie handelt, wird man also wenn immer möglich die Befähigung zu lithotropher Lebensweise ausnützen.

Eine weitere Besonderheit vieler Blaualgen ist die Fähigkeit zur *Assimilation von Luftstickstoff*, was bei Vertretern aus 8 verschiedenen Gattungen festgestellt worden ist [4-6], [47], [49]). Diese N₂-Verwertung geht normalerweise phototroph vor sich, und der von WINTER [185] beobachtete Fall von obligat chemotropher Stickstofffixierung mit Fruktose als Energiequelle bei endophytisch lebenden *Nostocarten* steht immer noch als einziger dieser Art da.

Wenn auch solche Eigentümlichkeiten bei Blaualgen auftreten und einzelne Arten ernährungsphysiologisch besonders stempeln, so ist doch die grosse Masse dieser Organismen allein mit geschickter Zusammensetzung der Nährlösung nicht herauszuselektionieren.

3. Reinigungsmethoden

Seit PRINGSHEIM [130] im Jahre 1913 seine ersten Blaualgenreinkulturen zustande gebracht hat, sind auf diesem Gebiet im Grunde genommen nur wenige technische Fortschritte erzielt worden. Man diskutiert auch heute noch die Vorteile der Pipetten- oder der Plattenmethode (KLINKHAMMER [94]), und es wird mit einfachen mechanischen Reinigungsmethoden gearbeitet (DROOP [35]). Durch Verdünnung der Suspensionen und Verfeinerung der Instrumente wird so seit Jahren versucht, einzelne Zellen oder Kolonien zu isolieren, zu waschen und von Begleitorganismen getrennt in Lösungen oder auf Nährböden zur Entwicklung zu bringen. Andere Möglichkeiten der mechanischen Methode verschafft die Filtration (GUPTA und Mitarbeiter [65]) und die Aerosolisierung (RUSCHMANN [145]) durch Versprühen von Algensuspensionen auf Nährböden mit einem Handvernebler.

In vielen Fällen, besonders bei Arten mit Gallerthüllen, worin Bakterien festsitzen und sich nicht auswaschen lassen, genügen die beschriebenen Mittel allerdings nicht. Das Algenmaterial muss mit physikalischen oder chemischen Desinfektionsmethoden vorbehandelt werden. In vielen Fällen hat *Bestrahlung mit Ultraviolettlicht* schon zum Erfolg geführt, indem die kleinen Begleitorganismen stärker geschädigt wurden als die grösseren Algen (z. B. GERLOFF, FITZGERALD und SKOOG [56]). Andere Autoren wiederum sind in dieser Weise nicht zum Ziel gekommen (z. B. KINNE-DIETRICH [93]).

Auch *chemische Desinfektionsmittel* wie Chlorwasser sind zur Ausschaltung von Begleitorganismen in früheren Arbeiten mit Erfolg verwendet worden (FOGG [45]), neuerdings jedoch für Blaualgen nicht mehr besonders empfohlen worden, weil solchen Stoffen eine spezifische Wirkung abgeht, was die Dosierung erschwert und besonders bei Organismen von ähnlicher Grössenordnung wie ihre unerwünschten Begleiter eine erfolgreiche Anwendung auf Zufälle angewiesen sein lässt.

Auch *Antibiotika* bringen natürlich die Gefahr mit sich, dass nebst den Begleitbakterien auch die Algen selbst geschädigt oder verändert werden. Es sei nur an den Einfluss von Streptomycin auf die Chlorophyllbildung in

Euglenen [54], [137, 138] und *CHLORELLA* [36] erinnert, der bis zur Bildung von dauernd chlorophyllosen Rassen führen kann. Allgemein ist die Wirkung von Antibiotika auf Blaualgen bis jetzt nur in wenigen Laboratorien untersucht worden. FOTER, PALMER und MALONEY [50] berichten z. B. über Versuche mit Testfilterpapierblättchen, die auf feste Nährböden aufgelegt werden. Das im Blättchen enthaltene Antibiotikum kann in den Agar hinausdiffundieren, und aus dem Durchmesser der Hemmhöfe bei den auf dem Agar kultivierten Algen kann auf die Empfindlichkeit dieser Organismen dem betreffenden Wirkstoff gegenüber geschlossen werden. In weiteren Experimenten in flüssiger Kultur lässt sich mit der Verdünnungsmethode dann die wachstumshemmende Konzentration bestimmen. FOTER und Mitarbeiter geben so einige Anhaltspunkte über den Effekt von Streptomycin, Penicillin, Bacitracin, Chloromycetin, Aureomycin, Aerosporin, Gliotoxin, Neomycin und Terramycin auf die Entwicklung von Blaualgen. Die Wirkung derselben Antibiotika den Begleitbakterien gegenüber wird aber nicht direkt damit verglichen, so dass man sich bei der praktischen Anwendung von Antibiotika zur Reinkultivierung von Blaualgen nicht auf diese Angaben stützen kann. Bei den lange dauernden Versuchen, wie sie von FOTER und Mitarbeiter beschrieben werden (etwa 1 Monat), besteht überdies die Gefahr, dass direkt resistente Bakterien herausgezüchtet werden, was den Erfolg der Reinigungsmassnahmen sofort wieder zunichte machen muss. – Auch der Bericht von BARKLEY [13] über seine Experimente mit Mischkulturen, denen er Antibiotika zusetzt und nachher die Entwicklung einzelner nicht geschädigter Arten verfolgt, führt nicht viel weiter: Es zeigt sich lediglich, dass einzelne Antibiotika wie Streptomycin, Chloromycetin und Furadantin die in der Mischkultur vorhandenen Blaualgen (z. B. *Nostoc muscorum*) begünstigen und andere ausschalten. – Günstige Resultate von Reinigungsversuchen bei anderen Algengruppen lassen die Antibiotikamethode aber jedenfalls als nützlich und brauchbar erscheinen [18], [43], [60], [62], [125], [140], [154], [171].

Den bedeutendsten Fortschritt in dieser Richtung hat aber zweifellos die Einführung von *Actidion* durch ZEHNDER und HUGHES [188] gebracht. Dieses von einzelnen *Streptomyces-griseus*-Stämmen produzierte und im Handel erhältliche Antibiotikum wird von Blaualgen bis zu Konzentrationen von 100 mg/l toleriert, während Pilze, Grünalgen und Diatomeen teilweise schon bei niedrigen Konzentrationen unterdrückt werden. Bei *Haematococcus lacustris* macht sich schon eine Actidionkonzentration von 0,016 bis 0,032 mg/l in einer Hemmung der Zellteilung bemerkbar [189].

Ausser solchen im Prinzip für alle Blaualgen anwendbaren mechanischen,

physikalischen und chemischen Desinfektionsmethoden kommen in bestimmten Fällen noch eigentlich biologische hinzu: Die Fähigkeit zur *kriechenden Fortbewegung* auf festen, feuchten Oberflächen, was mit der Ausscheidung von Schleimsubstanzen in Zusammenhang gebracht wird [20], [33], [68], [151], [170], kann bei geschickter Versuchsanordnung, eventuell unter Berücksichtigung der Phototaxis [69] zur Trennung fädiger Blaualgen von ihren Begleitbakterien benützt werden, indem die letzteren mit den von innen her erneuerten Gallertscheiden abgestreift werden und die Fäden gereinigt weiterkriechen. Dieses Verfahren ist besonders erfolgreich von ALLEN [3] angewendet worden. Bei den Versuchen von KINNE-DIETRICH [93] mit langsamkriechenden *Lynceba*-arten hat es dagegen versagt.

B. ERFAHRUNGEN ANDERER AUTOREN MIT KULTUREN VON *Oscillatoria rubescens*

VOLLENWEIDER [176] berichtet über Versuche mit Rohkulturen von *O. rubescens*, die er im Hinblick auf ökologische Fragen angestellt hat. Er stellt im Vergleich mit Diatomeen einen hohen Stickstoffbedarf (vorzugsweise als $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) fest. Die Ca-Ansprüche werden als mittel bezeichnet. Der Autor nimmt keine sukzessiven Überimpfungen des Materials über mehrere Generationen vor, sondern beschafft jeweils wieder frisches Impfmaterial aus Massenentwicklungen.

WUHRMANN (unveröffentlichte Arbeiten der biologischen Abteilung der EAWAG an der ETH, Zürich, in den Jahren 1946 bis 1952) kommt auf Grund seiner Erfahrungen mit weitgehend gereinigten Kulturen zum Schluss, *O. rubescens* lebe wahrscheinlich nicht ganz autotroph (mündliche Mitteilung). Die Mikropipetten- und Waschmethode bezeichnet er als unzweckmässig zur Reinigung der Fäden; Kriechbewegungen auf Agaroberflächen können mit Vorteil zur Isolierung benützt werden; Temperaturen von -4 bis $+40^\circ\text{C}$ werden für kurze Zeit ertragen; in den Kulturen bilden Pilzinfektionen die grösste Plage; günstige Kulturbedingungen ergeben sich auffällig immer bei Zusätzen von Nitrat oder Urin (was an die Versuche von SCHWABE [152] mit anderen Blaualgen erinnert) und bei pH-Werten von 8,0 bis 8,5. Desinfektionsversuche mit Penicillin und Streptomycin führen zum Schluss, dass die zur Ausschaltung der Bakterien benötigten Dosen (z. B. 40 mg/l Streptomycin) in flüssigen Medien auch die Oszillatorien abtöten. Vitamine wie Aneurin, Laktoflavin, Folsäure, Nikotinsäure, Pantothensäure, Biotin, p-Aminobenzoesäure und Adermin

zeigen keinen positiven Einfluss auf das Wachstum von *O. rubescens*. Verschiedene Zusätze von organischen Stickstoffquellen führen zum gleichen negativen Resultat. Es kommen keine bakterienfreien Kulturen zur Entwicklung.

Auch UNGAR [173] berichtet über lauter Misserfolge bei Versuchen zur Reinkultivierung von *O. rubescens* nach den Methoden von GERLOFF, FITZGERALD und SKOOG [56]. Temperaturen über 30°C werden als unzweckmässig bezeichnet. Reizphysiologische und zytologische Studien sowie Experimente über die Sukzessionsbedingungen bei Mischpopulationen von *O. rubescens* und einer *Mougeotia*art hat dieser Autor nur mit Planktonrohmaterial durchgeführt.

Bei allen diesen Kulturversuchen anderer Autoren scheint die Hauptschwierigkeit darin gelegen zu haben, dass raschwüchsige Algen, Pilze und Bakterien die Entwicklung von *O. rubescens* nach kurzer Zeit unterdrückten, aber mit keinem Mittel frühzeitig ausgeschieden werden konnten. Für die eigenen Experimente schien daher nur dann ein Erfolg möglich, wenn es gelingen würde, schon in der ersten Kulturperiode (vor der ersten Überimpfung) den Grossteil der Konkurrenten zu entfernen. Dazu waren aber zunächst grundlegende Vorversuche notwendig.

C. VORBEREITUNGSKULTUREN

I. Vorversuch unter den von VOLLENWEIDER [176] empfohlenen Kulturbedingungen

VOLLENWEIDER zieht im Hinblick auf seine ökologischen Fragen das flüssige Medium dem festen vor, sieht Temperaturen um 12°C als die günstigsten an und bekommt mit einer Nährlösung, die derjenigen mit Nummer 10 von CHU [26] ähnlich ist, ansprechende Resultate. Als Stickstoffquellen empfiehlt er besonders $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NH_4Cl und Asparagin. Zwei derartige Lösungstypen mit verschiedenem Stickstoffgehalt dienen zur ersten Orientierung über den vorteilhaftesten Weg zur Kultivierung von *O. rubescens*.

In einem kühlen Vorraum des Laboratoriums (Extremtemperaturen während der Versuchsdauer: 6–12°C; meistens ca. 10°C) wurde an einem kleinen Nordfenster der erste Kulturversuch angesetzt. Einerseits ruhig stehend, andererseits auf der Schüttelmaschine bewegt, wurde eine Serie von Erlenmeyerkolben (200 ml Inhalt) mit je 100 ml der Nährlösungen

V.-Am und *V.-As* (mit 2,5; 5 bzw. 10 mg/l N in Form von NH_4Cl oder Asparagin) in verschiedenem Abstand vom Fenster gehalten (zwei Beleuchtungsstufen von ca. 250 Lux – Bezeichnung h – bzw. 25 Lux – Bezeichnung d).

Nährlösungen *V.-Am* und *V.-As* (ähnlich derjenigen von VOLLENWEIDER ([176], S. 209), die eine Modifikation der Lösung Nr. 10 von CHU [26] darstellt):

Basislösung für V.-Am und V.-As

| | |
|--|----------------------|
| a) $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 50 mg/l = 0,228 mM/l |
| b) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 20 mg/l = 0,081 mM/l |
| c) K_2SiO_3 | 10 mg/l = 0,065 mM/l |
| d) Na_2CO_3 | 25 mg/l = 0,236 mM/l |
| e) KH_2PO_4 | 10 mg/l = 0,074 mM/l |
| f) Fe nach RODHE [144] ⁸⁾ | 10 ml/l = 0,004 mM/l |

Stickstoffzusätze

- g) NH_4Cl
 für Lösung *V.-Am*(2,5): 9,6 mg/l = 0,179 mM/l (2,5 mg/lN)
 für Lösung *V.-Am*(5): 19,2 mg/l = 0,358 mM/l (5,0 mg/lN)
 für Lösung *V.-Am*(10): 38,4 mg/l = 0,716 mM/l (10,0 mg/lN)
- h) Asparagin
 für Lösung *V.-As*(2,5): 11,9 mg/l = 0,090 mM/l (2,5 mg/lN)
 für Lösung *V.-As*(5): 23,8 mg/l = 0,180 mM/l (5,0 mg/lN)
 für Lösung *V.-As*(10): 47,6 mg/l = 0,360 mM/l (10,0 mg/lN)

Sterilisierung

Die Bestandteile a), b) und c) werden zusammen, d), e), f), g) und h) separat gelöst im Autoklav sterilisiert. Die fertigen Lösungen können nach Abkühlen der Einzellösungen unter sterilen Bedingungen zusammengesetzt und in trockensterilisierte Erlenmeyerkolben abgefüllt werden.

pH-Wert der fertigen Lösungen nach Sterilisieren = 7,0 bis 7,1.

Jeder Kolben wurde nun mit 2 ml einer frischen Planktonprobe aus dem Murtensee (Oberflächennetzfang, zur Verfügung gestellt von H. WOKER), in welcher *O. rubescens* dominierte, beimpft.

Bereits nach einem Tag waren dunkelrote Zusammenballungen von *Oscillatoria*-fäden zu bemerken. Nach weiteren zwei Tagen liess sich fest-

⁸⁾ *Eisenvorratslösung nach RODHE* [144]: 0,1 g Ferrizitrat und 0,1 g Zitronensäure werden separat aufgelöst, nach Zusammensetzen und Auffüllen auf 1000 ml im Autoklav sterilisiert und im Dunkeln aufbewahrt.

stellen, dass in allen ruhig stehenden Kulturen – bei beiden Beleuchtungsstärken – dort am meisten Fäden angehäuft lagen, wo relativ viel Licht zutreten konnte. Die Algen hätten also eher noch stärkere Beleuchtung bevorzugt. Die an der Oberfläche schwimmenden balligen Ansammlungen schienen in den nicht geschüttelten Kolben radial zu wachsen, wobei im mikroskopischen Bild *O. rubescens* vollkommen dominierte. In geschüttelten Kolben hingegen waren breite lichte Flocken entstanden, in denen Kieselalgen (*Tabellaria*, *Asterionella*, *Synedra*) neben *O. rubescens* zahlenmässig gut vertreten waren.

5 Tage nach der Impfung waren in nichtgeschüttelten Kolben die Kolonien wieder zerfallen, und an den Stellen, die offenbar am wärmsten waren, bildete sich am Boden ein dunkler Oscillatorienbelag. Die geschüttelten Kulturen wiesen in diesem Zeitpunkt viele kurze *Oscillatoria*fäden in gleichmässiger Verteilung auf.

Erst später machten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Substraten bemerkbar, und vier Wochen nach erfolgter Impfung mussten alle Asparaginsubstrate ausgeschieden werden, weil Bakterien und Pilze die Algen überwuchert hatten. In den ruhig stehenden *Am*-Serien waren die Fäden teils zerfallen (wenn stark belichtet) oder vom Kolbenboden her den Wänden nach hochgewachsen, oben grün werdend und vertrocknend. Über die geschüttelten Kolben mit NH_4Cl als Stickstoffquelle wurde folgendes notiert:

Beleuchtung d:

V-Am(10): bis 2 cm lange *Oscillatoria*fäden, zerstreut

V-Am(5): bis 1 cm lange *Oscillatoria*fäden, zerstreut

V-Am(2,5): Zusammenballungen von ca. 1 bis 2 mm Durchmesser

Beleuchtung h:

V-Am(10): *Mougeotia* stark entwickelt, Kultur grün

V-Am(5): weniger *Mougeotia*, *Oscillatoria* entfärbt, geballt

V-Am(2,5): Zusammenballungen, gelbbraun (Diatomeen!)

Die Versuchsergebnisse lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen: Zur Rohkultur ist Asparagin als Stickstoffquelle ungeeignet, weil es Bakterien und Pilze in der Entwicklung zu stark fördert. Die Oszillatorienansammlungen an warmen Stellen lassen vermuten, dass höhere Temperaturen günstiger wären. Die Fäden wandern zwar an die hellsten Stellen, werden dort aber von Grünalgen überwuchert. Geschüttelte Kulturen scheinen gegenüber ruhigstehenden eher besser zur Entwicklung zu kommen.

Nach diesen Erfahrungen mussten für spätere Versuche als Kulturbedingungen höhere Temperatur und stärkere Beleuchtung günstig erscheinen, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Entwicklung der Grünalgen als Konkurrenten hintangehalten werden könnte.

2. Vorversuch mit verschiedenen Nährlösungen unter Zusatz von Actidion

a) Allgemeine Versuchsanordnung

Eine Ausschaltung der Grünalgen in den Rohkulturen wurde nun durch Zusatz von Actidion angestrebt, wie es von ZEHNDER und HUGHES [188] empfohlen worden war. Gleichzeitig mussten nach dem spärlichen Wachstum in den *V*-Nährlösungen noch andere Blaualgenkulturmedien erprobt werden. Mit Rücksicht auf die bereits besprochenen Erfahrungen anderer Autoren bei der Kultur von Blaualgen durfte angenommen werden, dass ein höherer pH-Wert als der in den *V*-Substraten gemessene eher günstiger wäre (vgl. S. 107). Mit Zusätzen von NaOH bzw. HCl wurde daher der Anfangs-pH-Wert der neu zu erprobenden Lösungen etwas variiert. In den verwendeten schwach gepufferten Lösungen blieb dieser Wert jedoch unter dem Einfluss von Luft-CO₂ (beim Gasaustausch durch die Wattepfropfen) nicht konstant. – Die Beleuchtung wurde verstärkt und die Temperatur erhöht. Schematisch lässt sich die Versuchsanordnung wie folgt überblicken:

- 3 verschiedene Substrate: *V'*, *G*, *Z*;
- je 3 verschiedene Anfangs-pH-Werte: (approximativ) 7, 8, 9;
- Jedes dieser 9 Substrate mit oder ohne Zusatz von Actidion (50 mg/l);
- je 2 Parallelkulturen bei 5 verschiedenen Kombinationen der Beleuchtungsstärke mit den Bebrütungsbedingungen:
 - a) 1500 Lux (Kulturen stillstehend)
 - b) 500 Lux (Kulturen stillstehend)
 - c) 100 Lux (Kulturen stillstehend)
 - d) 1000 Lux (Kulturen auf der Schüttelmaschine bewegt)
 - e) 100 Lux (Kulturen auf der Schüttelmaschine bewegt);
- Temperatur: bei allen Kolben 20–23°C;
- insgesamt 180 Erlenmeyerkolben (200 ml Volumen) mit je 50 ml Nährlösung.

b) Substrate

Nährlösung V'. Zusammensetzung wie Lösung *V'-Am* (S. 113), jedoch mit einem erhöhten NH₄Cl-Zusatz von 250 mg/l (= 4,70 mM/l).

Nährlösung G (leicht modifiziert nach GERLOFF, FITZGERALD und SKOOG [56], die ihrerseits wie VOLLENWEIDER [176] eine Veränderung an der Lösung Nr. 10 von CHU [26] vorgenommen haben).

| | |
|---|----------------------|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 59 mg/l = 0,25 mM/l |
| K_2HPO_4 | 10 mg/l = 0,06 mM/l |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 25 mg/l = 0,10 mM/l |
| Na_2CO_3 | 20 mg/l = 0,19 mM/l |
| Na_2SiO_3 | 25 mg/l = 0,20 mM/l |
| Fe nach RODHE [144] ⁹⁾ | 30 ml/l = 0,012 mM/l |

Nährlösung Z (modifiziert nach Angaben von ZEHNDER, unveröffentlicht).

| | |
|---|----------------------|
| NaNO_3 | 467 mg/l = 5,50 mM/l |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 59 mg/l = 0,25 mM/l |
| K_2HPO_4 | 31 mg/l = 0,18 mM/l |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 25 mg/l = 0,10 mM/l |
| Na_2CO_3 | 21 mg/l = 0,20 mM/l |
| Fe-EDTA-Komplex-Lösung ¹⁰⁾ | 10 ml/l = 0,01 mM/l |
| Spurenelementlösung ¹¹⁾ | 0,08 ml/l |

Sterilisation. Alle drei Substrate werden vollständig zusammengesetzt in Portionen von je 50 ml in Erlenmeyerkolben (200 ml) im Autoklav sterilisiert.

Veränderung der Anfangs-pH-Werte. Nach Abkühlen der autoklavierten Lösungen werden mit sterilen Zusätzen von NaOH bzw. HCl die pH-Werte wie folgt variiert:

| | |
|-----------------|---|
| Nährlösung V'7: | 1,25 mM/l NaOH (ergibt pH 7,2) ¹²⁾ |
| Nährlösung V'8: | 2,00 mM/l NaOH (ergibt pH 7,8) |
| Nährlösung V'9: | 3,50 mM/l NaOH (ergibt pH 8,5) |
| Nährlösung G 7: | 1,00 mM/l HCl (ergibt pH 7,8) |
| Nährlösung G 8: | 0,75 mM/l HCl (ergibt pH 8,1) |
| Nährlösung G 9: | 0,25 mM/l NaOH (ergibt pH 8,3) |

⁹⁾ Vgl. Anm. ⁸⁾ S. 113.

¹⁰⁾ *Fe-EDTA-Komplex-Lösung:* 5 ml einer 0,1 N Lösung von $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 0,1 N HCl und 5 ml einer 0,1-N-Lösung von Komplexon III (Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure) werden zusammengesetzt und auf 500 ml aufgefüllt.

¹¹⁾ *Spurenelementlösung* (ähnlich derjenigen von GAFFRON nach HUGHES, GORHAM und ZEHNDER [72], S. 227): 100 ml enthalten 310 mg H_3BO_3 ; 223 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 3,3 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 8,8 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 11,9 mg KBr; 8,3 mg KJ; 28,7 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 15,4 mg $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 14,6 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 12,5 mg $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 19,8 mg $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 3,7 mg $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 3,5 mg $\text{V}_2\text{O}_5(\text{SO}_4)_3 \cdot 16 \text{H}_2\text{O}$; 47,4 mg $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$.

¹²⁾ Alle diese pH-Werte wurden in den sterilen Lösungen 5 Tage nach Laugen- bzw. Säurezusatz (kurz vor der Impfung) gemessen.

Nährlösung Z 7: 0,75 mM/l HCl (ergibt pH 7,0)

Nährlösung Z 8: kein Zusatz (ergibt pH 7,6)

Nährlösung Z 9: 1,00 mM/l NaOH (ergibt pH 8,1)

Zusatz von Actidion. 250 mg Actidion werden unter Schütteln in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und durch Erhitzen im Autoklav sterilisiert. Je 1 ml wird steril zu den fertigen Nährlösungen (Bezeichnung *A*) zugesetzt, was eine Konzentration von 50 mg/l ergibt.

c) *Impfmateriäl*

Ein Planktonnetzfang aus der Limmat in Zürich enthielt sehr reichlich (zahlenmässig 75%) *O. rubescens*, daneben aber 20% Diatomeenkolonien bzw. -zellen und 5% andere Plankter. Mit kombinierten mechanischen Methoden konnte *O. rubescens* mit folgendem Verfahren noch etwas angereichert werden:

1. Das Material wird an einer Saugflasche durch ein Zooplanktonnetzchen (ca. 300 μ Lochweite) von 5 cm Durchmesser gespült, wobei grössere Zooplankter zurückgehalten werden.

2. Ebenfalls an der Saugflasche wird das Material noch durch ein Phytonezchen (ca. 60 μ Lochdurchmesser) gespült, wobei die Oszillatorien durchschlüpfen, grössere Diatomeenkolonien und Rotatorien aber hängenbleiben.

3. Das in dieser Weise vorgereinigte Plankton wird auf einem Phytonez (ohne Absaugen) angereichert.

4. Durch Zentrifugieren bei 2000 U/min während je 10 min lassen sich bei dreimaliger Wiederholung die meisten Diatomeen im Sediment von den aufrahmenden Oszillatorien trennen.

Das Resultat dieser mechanischen Vorbehandlung des Impfmateriäls zeigt sich im nachfolgend bestimmten Verhältnis der vorhandenen Organismen:

| | |
|--------------------------------|-------|
| <i>O.-rubescens</i> -Fäden | 99,6% |
| Diatomeenkolonien bzw. -zellen | 0,3% |
| andere Organismen | 0,1% |

Jedes Kulturgefäss wurde dann durch Zusatz von 1 ml dieser Impfsuspension (mit je ca. 10000 *Oscillatoria*fäden) beimpft.

d) *Beobachtungen über das Wachstum*

In ruhigstehenden Kulturen rahmten die geimpften Oszillatorien zunächst auf und kletterten etwas den Glaswänden entlang hoch. In den

Schüttelkulturen bildeten sich – besonders in Lösungen mit erhöhtem pH-Wert – am Boden kleine, weisse Ballen von Niederschlägen, worauf sich *Oscillatoria*fäden festsetzten und wuchsen. Die beste Entwicklung zeigte sich bereits nach 3 Tagen in den Lösungen *G 7*, *G 8*, *G 9*, *Z 8* und *Z 9*.

Eine Woche nach der Impfung wurde folgendes notiert:

Kultur Z 9a (Index *a* bedeutet: 1500 Lux): Starke *Oscillatoria*entwicklung (grünlich!). Daneben *Mougeotia* und *Fragilaria crotonensis*. Ziliaten sehr häufig, ferner Flagellaten und Bakterien, auch *Staurastrum* und einige Chlorellen. Besonders in dichten Knäueln häufig endständig an *Oscillatoria*-fäden runde Sporangien von *Rhizopodium cf. subangulosum*, einem niederen Phycomyceten, der nach JAAG und NIPKOW [84] auf *O. rubescens* parasitiert.

Kultur Z 9.Aa (Index *A*: 50 mg/l Actidion): Nur *Oscillatoria*, fast so stark entwickelt wie in *Z 9a*. Nur eine leere *Asterionellas*schale beobachtet. Bakterien vorhanden, aber keine Flagellaten und Ziliaten.

Bestes Wachstum bei *Z 9a*, dann *Z 8a*, ferner *G 9a*, *G 8a*, *G 7a*, *V 7a*. Kulturen der Beleuchtungsserie *b* (500 Lux) viel schwächer; bei Serie *c* (100 Lux) kaum Wachstum bemerkbar. – Schüttelkulturen verhältnismässig schwach entwickelt.

So war der günstige Einfluss von Actidion beim Vergleich der Kulturen *Z 9a* und *Z 9.Aa* bereits sichtbar geworden, was dann im Zeitpunkt der Ernte (14 Tage nach der Impfung) nach den Aufzeichnungen über die stark beleuchteten Serien (*a*) noch viel offensichtlicher wurde:

V' 7: Einige Flocken von *O. rubescens*-Fäden, am Boden leicht grüner Schimmel (Flagellaten, kurze *Oscillatoria*stücke).

V' 7A: Sehr schwaches *Oscillatoria*wachstum; keine anderen Algen entwickelt.

V' 8: Bodenbelag grün (*Chlorella*); einige *Oscillatoria*büschel suspendiert, mit Rhizopodiensporangien.

V' 8A: Blaugrüne Klümpchen von *cf. Synechococcus*; *Oscillatorien* unbedeutend entwickelt.

V' 9: Am Boden Beläge von kleinen Phormidien und Chlorellen; praktisch keine *O. rubescens* gewachsen.

V' 9A: Bakterienbeläge am Boden, keine *O. rubescens*.

G 7, *G 8*, *G 9*: Am Kolbenboden braune Flecken von Diatomeen (hauptsächlich *Fragilaria crotonensis* und *Navicula sp.*); suspendiert viele *Fragilarien*, *Asterionella formosa*, *Mougeotia*, *Phormidium* und Flagellaten; verhältnismässig wenige *O. rubescens*-Fäden, die meisten davon befallen mit Rhizopidien.

G7A, G8A, G9A: Am Boden braune und blaugrüne Beläge: Bakterien, wenige *Oscillatoria*-Fäden, dünne Phormidien, blaugrüne Ansammlungen von *cf. Synechococcus*.

Z7 und *Z7A*: kein Wachstum.

Z8: Neben *O. rubescens* (ohne Rhizophidienbefall) Vertreter der Gattungen *Phormidium*, *Mongeotia*, *Chlorella*, *Fragilaria*, *Navicula*, *Staurastrum* sowie Rhizopoden vorhanden.

Z8A: Grösstenteils Phormidien und Bakterien nebst *O. rubescens* (ohne Parasiten).

Z9: Wie *Z8*, *O.-rubescens*-Fäden zerfallend, Rhizophidiensporangien massenhaft.

Z9A: *O. rubescens* sehr gut entwickelt, ohne Rhizophidien; daneben Phormidien.

In den schwächer beleuchteten Serien entwickelten sich die Verhältnisse ähnlich, jedoch viel langsamer. Die geschüttelten, stark beleuchteten Kolben der Serie *d* (1000 Lux) zeigten recht gutes Wachstum von *O.-rubescens*-Fäden in Suspension, insbesondere bei den Lösungen *Z8* und *Z9*. Daneben bildeten sich aber in actidionfreien Medien Flocken von Diatomeen und Grünalgen. Rhizophidien traten weniger häufig auf als in den nichtgeschüttelten Kolben.

e) Schlussfolgerungen

Diese Beobachtungen bestätigen die zuvor getroffene Annahme, dass stärkere Beleuchtung und höhere Temperatur als in den ersten Tastversuchen günstigere Bedingungen für Rohkulturen ergeben dürften. Der Actidionzusatz von 50 mg/l wurde von *O. rubescens* ohne weiteres ertragen und vermochte die Entwicklung von parasitischen Rhizophidien sowie von Protozoen, Flagellaten, Grünalgen und Diatomeen zu verhindern. Die Nährlösungen *G* und vor allem *Z* waren jenen mit der Bezeichnung *V'* überlegen, und diejenigen mit erhöhtem Anfangs-pH-Wert ermöglichten trotz stärkerer Niederschlagsbildung im Vergleich mit jenen von nahezu neutraler Reaktion ein besseres Wachstum von *O. rubescens*. Aus allen Varianten stachen die Kulturen in Lösung *Z9A* bei Beleuchtungsstufe *a* (1500 Lux) mit der besten *Oscillatoria*-entwicklung deutlich hervor. Allerdings nahmen kleine Phormidien und ein *Synechococcus* während der kurzen Vegetationsdauer von 14 Tagen bereits verhältnismässig stark überhand.

Es schien daher aussichtslos, das Material durch Überimpfen ohne besondere Reinigungsmassnahmen weiterhin *Oscillatoria*-reich zu erhalten.

Nachdem sich immerhin gezeigt hatte, dass die gefährlichsten Verunreinigungen (Pilze und Grünalgen) mit Actidion in ihrer Entwicklung gehemmt werden konnten, musste darum in der Folge zunächst eine Methode zur Eliminierung anderer Blaualgen gesucht werden.

3. Vorversuch mit festen Substraten

Es fragte sich nun, ob *O. rubescens* auf festen Substraten kriechend sich selbst so weit von anderen Algen entfernen würde, dass einzelne Fäden als Impfmateriale für Monokulturen gewonnen werden könnten. Ein kleiner Vorversuch zu dieser Frage erbrachte schon bald günstige Resultate:

Frisches *Oscillatoriamaterial* aus der Limmat wurde mechanisch vorgeeignet (S. 117) und in je 2 verschiedenen Mengen

1 über fertig erstarrte Agarplatten gegossen, bzw.

2 mit flüssigem Agarsubstrat (40°C) gemischt und in Petrischalen verteilt.

Als Substrat diente die Nährlösung Z 8 (S. 116) mit Zusatz von 1,5% Agar. Das im Autoklav sterilisierte Medium wurde in Portionen von 10 ml pro Petrischale verwendet. Die Plattenserie 1 wurde aufrecht, die Serie 2 mit dem Boden nach oben gekehrt bei verschiedenen Beleuchtungsstärken (1500, 500 bzw. 100 Lux) aufgestellt (20–23°C).

Die Nährböden der Serie 1 wurden im Verlauf einer Woche rasch überwachsen von hauptsächlich *O. rubescens* mit einigen Diatomeen als Begleitern nebst vielen Bakterien. In dichten Reihen lagerten sich die Fäden zu Bändern zusammen, und an manchen Stellen wanden sie sich zu Ringen und Platten, die sich drehten, wie es z. B. schon von CATALDI [24] und PRINGSHEIM [132] bei anderen *Oscillatoria*arten in Photographien gezeigt worden ist. In einer solchen Platte von 1,7 mm Durchmesser hatten sich z. B. 30 Fadenreihen in konzentrischen Kreisen ineinandergelagert. Da die Medien actidionfrei waren, liess sich in diesen Windungen eine Wirkung von *Rhizopodium deformans* vermuten, wie es von JAAG und NIPKOW [84] beschrieben worden ist; es fanden sich jedoch nirgends Sporangien dieser Pilze.

Die mittlere Beleuchtungsstufe (500 Lux) schien für diese Kulturen den beiden anderen überlegen zu sein, denn die stark beleuchteten Platten (1500 Lux) wurden bald blassgrün, während auf den übrigen dunkelrotbraune *O.-rubescens*-Beläge entstanden.

Bei den Platten der Serie 2 konnten sich die *Oscillatoria*fäden offenbar nicht an die Oberfläche bewegen und gingen bald zugrunde, möglicherweise weil sie beim Plattengiessen (40°C) bereits abgetötet worden waren.

Bei der beobachteten, raschen Bewegung der Fäden (Geschwindigkeit rund $1\mu/\text{sec}$) und dem raschen Wachstum auf dem Z8-Agar-Substrat (nach einer Woche waren Fäden bis ca. 1 cm Länge vorhanden) erübrigten sich weitere Modifikationen am gewählten Nährboden.

D. KLONKULTUREN MIT BEGLEITBAKTERIEN

1. Isolierung einzelner Fäden von *O. rubescens* mit der Plattenmethode

Nachdem sich wie erwartet in den ersten Überimpfungen der auf S. 115ff. beschriebenen Kulturen in flüssigem Medium neben *O. rubescens* viele Begleitorganismen angereichert hatten, musste nun versucht werden, einzelne *Oscillatoria*-Fäden zu isolieren und in den am günstigsten erscheinenden Nährlösungen zur Entwicklung zu bringen.

Je 10 ml zweier verschiedener fester Substrate (Z8 + 1,5% Agar bzw. Z9 + 1,5% Agar, Zusammensetzung S. 116) wurden in Petrischalen gegossen und im Zentrum mittels einer Platinöse mit einem Tropfen des Algenmaterials aus den erwähnten Kulturen (Z9A und andere Substrate) beimpft. Fäden von *O. rubescens*, die sich dann vom Zentrum aus gegen den Plattenrand hin bewegten, wurden unter der Lupe auf dem Plattenboden bezeichnet, im Impfkasten samt einer kleinen Agarscheibe (Durchmesser 5 mm) als Unterlage mit Hilfe einer rechtwinklig abgebogenen Platinöse ausgestochen und in Kulturkolben mit flüssigem Substrat (Z8 und Z9 mit oder ohne Zusatz von Actidion) überführt.

In einigen dieser Gefäße, die bei ca. 1500 Lux und 20–23°C stehen gelassen wurden, zeigte sich nach Ablauf von 2 bis 8 Wochen erstmals schwaches Wachstum von *O.-rubescens*-Fäden. Von den 21 in Substrat Z8 bzw. Z8A geimpften Einzelfäden kamen deren 6 (30%) zu Wachstum und sichtbarer Vermehrung, wogegen in den Lösungen Z9 bzw. Z9A 16 Fäden (80%) auswuchsen, was wiederum eine gewisse Überlegenheit des Substrats mit höherem Anfangs-pH-Wert anzeigt. Tab. 2 vermittelt Angaben über Herkunft und erstes Wachstum der *O.-rubescens*-Fäden in diesen Klonkulturen.

2. Weiterzüchtung der Klonkulturen

Nachdem die so gewonnenen Kulturen 14 Tage bis 3 Wochen nach erstmals bemerktem Wachstum zu beträchtlicher Dichte herangewachsen waren, wurden je 1 ml unter sterilen Bedingungen herauspipettiert und neuerdings in Erlenmeyerkolben mit der Lösung Z9 überführt. Diese

Kulturen wurden mit dem Index -2 hinter der Klonnummer (Tab. 2) bezeichnet, die nächstfolgenden Überimpfungen mit $-3, -4$ usw.

Als Stammkulturen blieben diese Klone mit ca. 500 Lux beleuchtet im Algenraum bei 20 bis 23°C und wurden regelmässig in Zeitabständen von 2 bis 3 Wochen mit je ca. 1 ml in 50 ml frisches Medium Z9 übertragen. In keinem der Klone liessen sich mikroskopisch ausser Bakterien irgendwelche Begleitorganismen auffinden.

Tabelle 2

Herkunft und Eigenschaften der einzelnen O. rubescens-Fäden, die nach Überimpfung von festen in flüssige Substrate zu Klonkulturen (mit Begleitbakterien) auswuchsen.

| Faden- (nachher Klon-) Nr. | Her- kunft Lö- sung ¹⁾ | Faden- länge μ | Weg- länge auf Agar cm ²⁾ | Bemerkungen über die Gleitspur auf Agar | Breite der Spur ³⁾ μ | Flü. Sub- strat | Wachs- tum be- obachtet nach (Wochen) |
|-------------------------------------|--|--------------------------|--|--|--|-----------------------|---|
| 1 | Z8 | 320 | 2 | gerade | 5 | Z8A | 3 |
| 2 | Z8 | 1100 | 6 | gebogen bakterienreich | 20 | Z8A | 8 |
| 3 | Z8 | 3200 | 5 | wellenförmig | 5 | Z8A | 4 |
| 6 | Z8 | 390 | 3 | gerade | 5 | Z8A | 4 |
| 18 | Z8A | 2300 | 4 | gerade, spitz auslaufend | 5-50 | Z8 | 8 |
| 19 | Z8A | 4000 | 3 | gerade | 5 | Z8 | 8 |
| 51 | Z9 | 7000 | 4 | gerade | 5 | Z9A | 3 |
| 52 | Z9 | 450 | 3 | gebogen | 30 | Z9A | 5 |
| 53 | Z9 | 2500 | 6 | gebogen | 5 | Z9A | 3 |
| 55 | Z9 | 530 | 4 | gerade | 5 | Z9A | 3 |
| 56 | Z9 | 6400 | 4 | kreisförmig ($\varnothing 1570 \mu$) | 5 | Z9A | 3 |
| 57 | Z9 | 1460 | 4 | gerade | 5 | Z9A | 5 |
| 58 | Z9 | 890 | 6 | grosser Bogen | 80 | Z9A | 3 |
| 61 | Z9A | 750 | 4 | gerade | 5 | Z9A | 5 |
| 63 | Z9A | 1100 | 4 | gerade | 10 | Z9A | 3 |
| 64 | Z9A | 570 | 3 | gerade | 10 | Z9A | 4 |
| 65 | Z9A | 1350 | 4 | gerade | 10 | Z9A | 4 |
| 66 | Z9 | 3200 | 4 | gerade | 5 | Z9 | 8 |
| 67 | Z9 | 1400 | 3 | gerade | 5 | Z9 | 8 |
| 68 | Z9 | 870 | 3 | gerade | 5 | Z9 | 8 |
| 69 | Z9A | 2600 | 3 | gerade | 5 | Z9A | 2 |
| 70 | Z9A | 1100 | 3 | gerade | 5 | Z9A | 8 |

¹⁾ Es handelt sich um Algenmaterial aus den auf S. 115 ff. beschriebenen Vorversuchen (erste Überimpfung in die gleichen Lösungen wie bei der entsprechenden Vorkultur).

²⁾ Weglänge vom Plattenzentrum bis zum Punkt, wo der Faden ausgestochen wurde.

³⁾ Die vom *Oscillatoria*-fäden mitgeschleppten Bakterien wuchsen oft von der Algenkriechspur aus seitlich zu flächigen Kolonien heran, wodurch sich die Spur langsam verbreiterte.

Nach kurzer Zeit gingen aber verschiedene Klone ein, indem sie ausblühen, sich nicht mehr vermehrten und von Bakterien überwachsen wurden: Klone 2, 66 und 68 schon nach einem Monat, Klone 67 und 69 nach

2 Monaten, und Klone 1 und 70 nach 4 Monaten. Dies legte die Befürchtung nahe, es könnte im Substrat Z9 ein wichtiger Bestandteil, vielleicht ein Vitamin oder ein Spurenelement, fehlen. Von den übriggebliebenen 15 Klonen ging dann allerdings während dreier Jahre bei regelmässiger Überimpfung in Substrat Z9 kein einziger mehr ein.

Jede dieser Stammkulturen zeichnete sich durch einen ziemlich gleichbleibenden besonderen Charakter aus, welcher nachfolgend kurz beschrieben wird. Die Angaben beziehen sich auf ausgewachsene, 14 Tage alte Kulturen, die im Substrat Z9 bei 20–23°C und ca. 500 Lux gehalten worden sind. Die Färbungen würden sich mit wechselnder Beleuchtungsstärke verändern, und regelmässig geschüttelte Kolben lassen gleichmässigeren Entwicklung zu als stillstehende.

Es darf nicht ohne weiteres auf genetisch fixierte Unterschiede von Klon zu Klon geschlossen werden, da ja an einen Einfluss der Begleitbakterienflora, die in jedem Klon wieder anders zusammengesetzt sein dürfte, gedacht werden muss. Der Einfluss von Bakterien auf den Habitus der Oscillatorienaggregate könnte z. B. als Wirkung unterschiedlicher Leistungen der schleimabbauenden Organismen angesehen werden, wie es GERLOFF und SKOOG [59] beim Vergleich der chemischen Zusammensetzung von *Microcystis-aeruginosa*-Reinkulturen mit entsprechendem Material aus Wasserblüten gefunden haben: die am natürlichen Standort zusammen mit schleimabbauenden Bakterien gewachsenen Zellen hatten einen geringeren Kohlehydratgehalt als jene aus Reinkulturen, wo sich gallertige Substanzen ansammeln konnten.

Die auffallende Konstanz der Eigenschaften dieser verschiedenen *Oscillatoria*-Bakterien-Biozönosen während einer dreijährigen Kulturperiode wäre immerhin eine genauere Untersuchung wert, was aber nicht in den Rahmen der vorliegenden Arbeit gehört.

Charakteristische Eigenschaften der Klonkulturen

- 3 Dunkelrotbraun; Fäden von mittlerer Länge, wachsen relativ gut im Medium verteilt, oft aber aufrahmend.
- 6 Noch ausgeprägter rotbraun als 3, ist am ausgesprochensten dunkelrot von allen Kulturen; wächst meist an der Oberfläche.
- 18 Grünlichbraun, dunkel; wächst grob flockig.
- 19 Grünlichbraun; lange Fäden, zu unregelmässigen Aggregaten zusammengeballt.
- 51 Rotbraun; lange Fäden, am Kolbenboden wachsend.

- 52 Hellbraun; dichte, netzartige Geflechte von Fäden, oft ballige Ansammlungen an der Oberfläche.
- 53 Hellbraun; flockig, mit langen Fäden, zu dichten, grossen Aggregaten geballt.
- 55 Rotbraun; verhältnismässig gut verteilt, rasch wachsend, wenig Flockenbildung.
- 56 Hellbräunlichgrün; flockig geballt.
- 57 Dunkelbraun; relativ gut verteilt.
- 58 Dunkelbraunrot; geballt, an der Oberfläche zusammenhängende Aggregate bildend.
- 61 Braunrot; flächige Flocken, die von Sauerstoffblasen aufgebläht an der Oberfläche schwimmen.
- 63 Hellrotbraun; gut verteilt, lange Fäden.
- 64 Dunkelrotbraun; relativ kurzfädig und gut verteilt.
- 65 Rotbraun; kürzeste Fäden, beste Verteilung derselben im Vergleich mit den anderen Klonen; günstigste Kultur für Wachstumsversuche.

E. REINKULTUREN

I. Desinfektionsversuche mit Ultraviolettlicht

a) Zielsetzung

Wenn auch das Versuchsobjekt *O. rubescens* nicht eine dicke Gallertscheide besitzt, wo sich grössere Bakterienmassen einnisten könnten, so bietet die verhältnismässig grosse Oberfläche eines einzelnen Fadens (z. B. rund $20000 \mu^2$ bei einem Faden von 1 mm Länge) doch viel Platz für epiphytisch lebende Bakterien, welche möglicherweise die ausgeschiedenen Schleimsubstanzen als Substrat verwerten oder auf frei werdende, organische Stickstoffquellen angewiesen sein könnten. Die Anwendung von gewöhnlichen Waschmethoden allein, wie es bei einzelligen Algen mit einiger Wahrscheinlichkeit zur Säuberung der Oberfläche führen kann, muss bei derart grossen, vielzelligen Organismen von vornherein als aussichtslos angesehen werden. Es gilt daher, Mittel und Wege zu finden, wie möglichst viele der festsitzenden Begleitorganismen mit einer Vorbehandlung schon abgetötet werden können, bevor überhaupt mit Waschversuchen begonnen wird.

Bei diesen Bestrebungen muss es im Einsatz von Desinfektionsmitteln wie Ultraviolettlicht darum gehen, zwar möglichst viele Aufwuchsorganismen

men zu vernichten, aber dabei den Blaualgenfaden selbst nur so weit zu schädigen, dass mindestens eine seiner Zellen noch teilungsfähig bleibt. Praktisch wird es jedoch von sehr vielen Zufällen abhängen, ob diese günstige Dosis gerade getroffen wird, ob man beim wahllosen Herauspipetieren von bestrahlten Fäden aus einer Suspension von vielen dann gerade die günstigsten trifft, und schliesslich auch, ob die wenigen noch lebensfähigen Algenzellen dann tatsächlich zur Vermehrung kommen.

Bei der Unberechenbarkeit dieser Methode und dem damit verbundenen, grossen Arbeitsaufwand wurde sie mit diesen Überlegungen zwar als Hilfsmittel vorbereitet, aber nicht sehr weit ausgebaut.

b) Versuchsanordnung

An der Schüttelmaschine wurden Quarzerlenmeyerkolben (*Vitreosil*, 200 ml Volumen) mit der zu behandelnden Algensuspension in 1 cm hoher Schicht (Nährlösung Z₉) von unten her bestrahlt mit einem Quecksilberquarzbrenner *Philips Biosol Typ B1* (500 W) in 25 cm Distanz zwischen Brenner und Kolbenboden. Diese Anordnung hält sich einigermaßen an die Angaben von PRINGSHEIM [134]. Ein Ventilator sorgte dafür, dass sich das Algenmaterial über der heissen Lampe nicht erwärmte. Für die Behandlung wurden rasch wachsende Klonkulturen mit guter Verteilung der *Oscillatoria*-fäden in nicht zu dichter Suspension (ca. 300 mg/l Trockensubstanz) ausgesucht. Nach der Bestrahlung wurden sofort Portionen von je 1 ml in Nährlösung Z₉ übertragen und verschiedene Verdünnungen auf Tryptone Glucose Extract Agar Difco (im folgenden als TGE-Agar bezeichnet) ausgesät.

c) Dosis-Wirkung-Beziehung für *O. rubescens* und Begleitbakterien

Im Hinblick auf die spätere praktische Anwendung der UV-Bestrahlungsmethode durfte als Kriterium für die Wirkung auf *Oscillatoria* einzig und allein die Vermehrungsfähigkeit im flüssigen Medium herangezogen werden. Für quantitative Angaben über die Schädigung durch Bestrahlung wären wohl andere physiologische Merkmale wie Assimilationstätigkeit und Atmung günstiger, doch wurde versucht, auch die Vermehrungsfähigkeit – immer unter den gegebenen Kulturbedingungen – einigermaßen zahlenmässig zu erfassen. Dabei diente die Inkubationszeit bis zum deutlich beginnenden Wachstum als Mass.

In Abb. 8 ist eine «Eichkurve» für die Interpretation dieser Grösse dargestellt. Es lässt sich danach aus einer bestimmten Inkubationszeit auf die

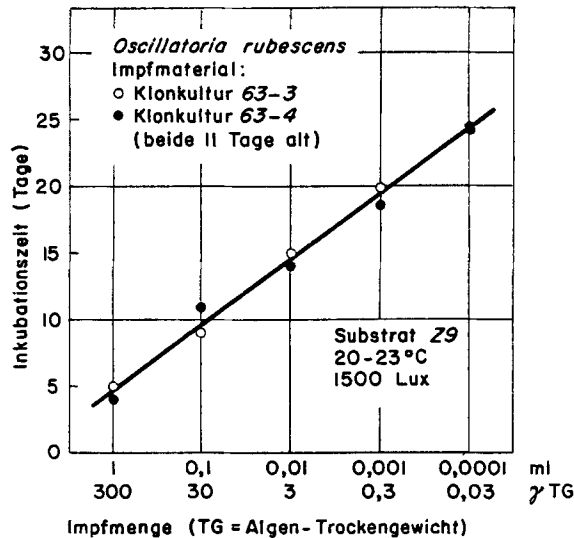


Abbildung 8

Abhängigkeit der Inkubationszeit (bis zum Beginn raschen Wachstums) von der Impfmenge. Mittelwerte aus 3 Parallelkulturen (Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Nährlösung).

Verdünnung der Impfsuspension schliessen. Wird durch UV-Bestrahlung das gleiche Impfmateriale teilweise abgetötet, in gewissem Sinne also auch verdünnt, so lässt sich der Prozentsatz von überlebenden, vermehrungsfähigen Oszillatorien wenigstens grössenordnungsmässig mit Hilfe dieser Kurve aus der Inkubationszeit bis zum Wachstumsbeginn ermitteln.

Der Beginn raschen Wachstums wurde visuell bestimmt durch Vergleich der Organismendichte in den Kulturen mit einer *Oscillatoriasuspension* von bestimmter Konzentration. Dass eine solche einfache Methode für gewisse Zwecke durchaus brauchbar sein kann, ist neuerdings wieder von LUND und TALLING [109] bemerkt worden. Zum Vergleich diente ein Kulturkolben mit der zehnfachen Impfmenge, mit Formol fixiert (Mischung von 10 ml Impfmateriale [= ca. 3 mg Trockengewicht] mit 40 ml Formol 4%). Sobald die Kulturen gleich dicht waren wie die Vergleichssuspension, wurde der «Beginn» des raschen Wachstums notiert. In diesem Zeitpunkt hatte sich die Fadenzahl aber eigentlich bereits verzehnfacht. Selbstverständlich mussten die Zellteilungen schon vor diesem Moment, allerdings zunächst in schleppendem Tempo, eingesetzt haben. Mit der Wahl eines späteren Zeitpunktes, der bereits im steileren Abschnitt der Wachstumskurve liegt, wurde die Beurteilung etwas exakter.

Die Dosis-Wirkung-Beziehung für die Begleitbakterienflora liess sich mit

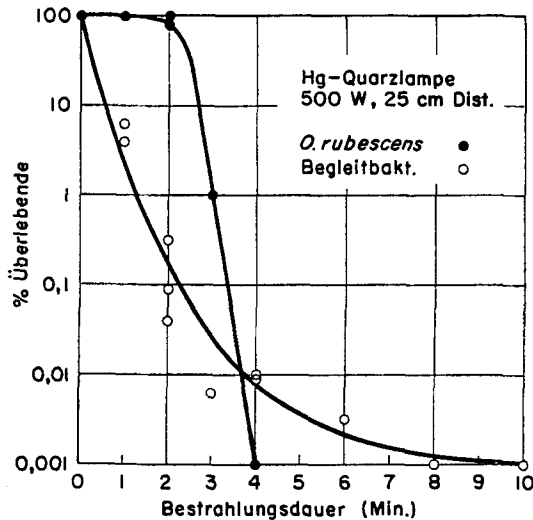


Abbildung 9

Dosis-Wirkungs-Beziehung für UV-Bestrahlung der Kulturen 63-3, 63-4 und 55-5. Anzahl überlebender Oszillatorien bestimmt nach Inkubationszeit (Abb. 8), Wirkung auf Begleitbakterien gemäss Plattentest.

der Plattenmethode ermitteln. Verschiedene Verdünnungen (in gepuffertem Verdünnungswasser) des Impfmateri als wurden mit TGE-Agar nach den in der Wasserbeurteilungspraxis üblichen Methoden in Petrischalen während 5 Tagen bei 20°C bebrütet. Die Keimzahlen (Anzahl der Kolonien, mit einer Lupe gezählt) näherten sich bei steigenden Bestrahlungszeiten einem unteren Grenzwert von rund 50 Keimen pro ml, was noch 0,001% der anfänglichen Keimzahl entsprach (Abb. 9).

Die Wirkung auf *O. rubescens* selbst war bei kurzer Bestrahlungszeit von 1 oder 2 min nach Massgabe der Inkubationszeit noch gar nicht bemerkbar, bei einer Steigerung auf 4 min jedoch bereits sehr ausgeprägt. Das 6 min lang bestrahlte Material kam nur in einer der drei Parallelkulturen nach 33 Tagen zum Wachstum, wogegen die anderen beiden Kulturen sowie alle mit noch länger bestrahltem Impfmateri al versehenen während der Beobachtungsdauer von 2 Monaten überhaupt nicht zu wachsen begannen.

d) Schlussfolgerungen

Nach diesen orientierenden Versuchen zu schliessen kann die UV-Bestrahlung mit der beschriebenen Versuchsanordnung im besten Falle zur Elimination von etwa 99,9% der agarwüchsigen Bakterien führen, wenn

das *Oscillatoria*material selbst nicht zu stark geschädigt werden soll. Nach Abb. 9 erhält man die günstigsten Bestrahlungsdosen zwischen 2 und 3 min, was noch ca. 0,1% der Bakterien überleben, während die Schädigung der Oszillatorien gerade erst bemerkbar wird. Zur gesamten Beurteilung der Wirksamkeit dieser Methode muss aber einschränkend bemerkt werden, dass unter den Bakterien nur die agarwüchsigen – die immerhin den grössten Teil der vorhandenen ausmachen mögen – berücksichtigt worden sind.

2. Waschversuche mit dem Mikromanipulator

a) *Vorbemerkung*

Die Mikromanipulortechnik ist in der Algologie und Lichenologie schon seit Jahrzehnten eingeführt und hat ihnen zu grossen Fortschritten verholfen. Sie gestattet dem Experimentator, unter visueller Kontrolle einzelne Mikroorganismen nach bestimmten Verfahren zu waschen oder mit Desinfektionsmitteln zu behandeln. Zur Reinigung von Algenkulturen wird sie am erfolgreichsten bei kleinen, einzelligen Arten zu Hilfe gezogen. Bei fädigen oder flächenhaften Kolonien spielt sofort das Problem der grossen Oberfläche wieder mit, und die Arbeit mit dem Mikromanipulator wird allgemein unsicherer, weil mit schwächeren Vergrösserungen und gröberen Pipetten vorgegangen werden muss, wobei bakterielle Verunreinigungen nicht mehr sichtbar sind. Unter solchen Umständen ist die Anwendung dieser Technik bei der Arbeit mit *O. rubescens* bestimmt höchstens als Hilfsmittel, nicht als eigentliche Reinigungsmethode, denkbar.

b) *Arbeitsmethode*

Das Vorgehen mit dem *Zeiss-Mikromanipulator* richtete sich grundsätzlich nach den Erfahrungen von JAAG [75].

Mikropipetten mit rechtwinklig abgebogener Spitze und etwa 50 bis 100 μ lichter Weite, am hinteren Ende mit Watte gestopft, wurden in Glasrohren trockensterilisiert. Die Arbeitskammer mit seitlicher Öffnung wurde in einer Petrischale ebenfalls trockensterilisiert.

*Oscillatoria*material aus Klonkulturen, zum Teil mit Ultraviolettlicht vorbehandelt, wurde nun in der sterilen Arbeitskammer in hängenden Tropfen mit steriler Nährlösung Z₉ verdünnt, bis ein einzelner Faden in die Pipette aufgenommen werden konnte. Zum Waschen derselben – wiederum in Z₉ – diente dann eine frische, sterile Pipette.

Der Waschvorgang kommt eigentlich auch einem Verdünnen gleich: Mit

der frischen Pipette, die mit wenig steriler Nährlösung gefüllt war, wurde der zu waschende *Oscillatoria*-Faden mit möglichst wenig Flüssigkeit aus dem hängenden Tropfen aufgenommen und an einer anderen Stelle des Deckglases wieder abgesetzt, wobei diesmal der hängende Tropfen möglichst gross (ca. 1–2 mm im Durchmesser, je nach Länge des Fadens) sein durfte. Nach Neufüllen der Pipette mit frischer steriler Nährlösung wiederholte sich der Vorgang: zunächst Aufnehmen des Fadens in die Pipette mit möglichst wenig Flüssigkeit, dann Ausstossen mit einem relativ grossen Volumen frischer Lösung.

Die Anzahl der aufeinanderfolgenden Waschungen wurde variiert und die so gesäuberten Fäden teils auf feste, teils in flüssige Substrate (Z9.A mit oder ohne 1,5% Agar) übertragen.

Auf den Platten konnte die Entwicklung der Einzelfäden dann laufend beobachtet werden, und Bakterienverunreinigungen zeigten sich meist schon ohne weitere Testmethoden bei der mikroskopischen Untersuchung nach wenigen Tagen. Fäden, die noch sauber zu sein schienen und bei denen ein gutes Längenwachstum messbar war, wurden mitsamt einem kreisrunden Agarstück von 5 mm Durchmesser mittels einer Pt-Öse im Impfkasten ausgestochen und in flüssiges Substrat übertragen. Diese Massnahme sollte verhindern, dass durch die unvermeidliche, langsame Verdunstung die Fäden auf dem Agar vertrockneten.

Sobald sich im flüssigen Medium Algenwachstum zeigte, musste ein Plattentest mit TGE-Agar (1 ml Algensuspension auf 10 ml Agar, bei 45°C gemischt) angestellt werden. Bakterienverunreinigungen wurden meist schon nach einem Tag Bebrütung bei 25°C sichtbar.

c) Ergebnisse

Das wichtigste Resultat der Bemühungen in dieser Richtung kann gleich vorweggenommen werden: sämtliche Kulturen, die sich nach den Desinfektions- und Waschprozessen dieser Versuchsserie entwickelten, waren nach wie vor von Begleitbakterien verunreinigt.

Trotz diesem Misserfolg vermittelten die neuen Erfahrungen über die Zweckdienlichkeit der Substrate, über die Wirkung von Ultraviolettlicht auf *O. rubescens* und über Einzelheiten in den Überimpfungsmethoden doch wertvolle Vorkenntnisse zur Gestaltung der späteren Desinfektionsversuche. In den Tab. 3 und 4 sind diese Ergebnisse summarisch zusammengestellt.

Wie daraus hervorgeht, schädigt der Waschvorgang – auch wenn er

Tabelle 3

Desinfektionsversuche mit UV-Bestrahlung und anschliessendem Waschen mit dem Mikromanipulator. Waschflüssigkeit: Nährlösung Z9. Überimpfung direkt in Nährlösung Z9 A (Erlenmeyerkolben 100 ml mit je 25 ml Lösung).

| Serie | Kultur | UV min | Anzahl der Washungen pro Einzelfaden | Anzahl der so behan- delten Ein- zelfäden | Anzahl ausgewachsener Kulturen (innert 2 Mt.) |
|-------|---|-----------|---|--|--|
| 1 | 63-4 | 0 | 0 1 2 4 8 16 | je 6 | 5 6 3 total 31 6 = 86% 5 6 |
| 2 | 63-4 | 2 | 0 1 2 4 8 16 | je 6 | 1 5 4 total 22 5 = 61% 6 1 |
| 3 | 63-4 | 3 | 0 1 2 4 8 16 | je 6 | 4 2 3 total 14 3 = 39% 1 1 |
| 5 | 3-4 51-4 53-4 55-6 58-4 64-4 | 0 | 10 10 10 10 10 10 | je 10 | 10 9 10 total 52 8 = 87% 7 8 |

16mal wiederholt wird – die Fäden mechanisch nicht so stark, dass ein Weiterwachsen verunmöglicht würde. Diese Feststellung ist nicht ganz selbstverständlich, wenn man bedenkt, dass die Fäden von im Mittel ca. 400μ Länge in eine Pipette mit 50 bis 100μ Öffnungsdurchmesser eingesogen werden, wobei sie an den teilweise recht scharfen Kanten am Ende des Glasröhrchens abgebogen und gescheuert werden, was gewiss eine sehr unnatürliche Beanspruchung ihrer Oberfläche mit sich bringt.

Ausserdem ergänzen die Tab. 3 und 4 den in Abb. 9 dargestellten Befund über die Wirkung von Ultraviolettlicht auf *O. rubescens*. Aus Tab. 3 wird ersichtlich, dass der Prozentsatz von Fäden, die – willkürlich ausgewählt –

Tabelle 4

Desinfektionsversuche mit UV-Strahlung und anschließendem Waschen mit dem Mikromanipulator. Waschlöslichkeit: Nährlösung Z₉; Überimpfung auf Z₉-Agar-Platten; Messung der Fadenlänge sofort nach Überimpfen und 3 Tage später; Weiterimpfung in Lösung Z₉A (nur die mit + und * bezeichneten Fäden; + bedeutet: innert zweier Monate nicht weitergewachsen; * bedeutet: in Z₉A weitergewachsen)

| Serie 1 (Kultur 63-4) nicht bestrahlt | | | Serie 2 (Kultur 63-4) Bestrahlung 2 min | | | Serie 3 (Kultur 63-4) Bestrahlung 3 min | | | Serie 4 (Kultur 55-5) Bestrahlung 4 min | | | |
|--|------------------|-------|--|------------------|-------|--|------------------|-------|--|------------------|-------|-----|
| Anzahl Waschg. | Fadenlänge μ | | Anzahl Waschg. | Fadenlänge μ | | Anzahl Waschg. | Fadenlänge μ | | Anzahl Waschg. | Fadenlänge μ | | |
| | 0 Tg. | 3 Tg. | | 0 Tg. | 3 Tg. | | 0 Tg. | 3 Tg. | | 0 Tg. | 3 Tg. | |
| 0 | 500 | 500 | 0 | 280 | 340 | 0 | 880 | 1710+ | 10 | 670 | 670 | |
| | 120 | 380 | | 280 | (580) | | (380) | (650) | | — | (650) | — |
| | (150) | — | | 350 | 1050 | | 1280+ | 760 | | 770 | 760 | 770 |
| 1 | (180) | — | 1 | 260 | 960 | 1 | 120 | 170+ | 2 | 420 | 420 | |
| | 230 | 300 | | 370 | 610 | | 540 | 190 | | 180 | 190 | 420 |
| | (240) | — | | 260 | 490 | | (350) | — | | 360 | 360 | 360 |
| 2 | (740) | — | 2 | 700 | 1680+ | 2 | 140 | 150 | 10 | 400 | 360 | |
| | 390 | 560 | | 350 | 530 | | 250 | 280 | | 280 | 280 | |
| | 120 | 1200 | | 400 | 550 | | 590 | (200) | | (200) | (200) | 280 |
| 4 | (550) | — | 4 | (420) | — | 4 | 300 | 430+ | 10 | 190 | 200 | |
| | 450 | 600 | | 160 | 370* | | 120 | 140 | | 200 | 200 | |
| | 750 | 1000 | | (350) | — | | 240 | 260+ | | 130 | 140 | |
| 8 | 280 | 420 | 8 | 770 | 1420* | 8 | 230 | 270 | 10 | 250 | 250 | |
| | 450 | 770 | | 770 | 1320* | | 700 | 840 | | 130 | 140 | |
| | 530 | 770 | | 450 | 510 | | 270 | 290+ | | 250 | 250 | |
| 16 | (200) | — | 16 | 110 | 200+ | 16 | 310 | 340 | 10 | 360 | 370 | |
| | 300 | 530 | | 150 | 250 | | 240 | 250+ | | 200 | 200 | |
| | 180 | 700 | | 120 | 520+ | | 350 | 360 | | 140 | 140 | |
| Mittel ¹⁾ | 360 | 640 | Mittel | 360 | 690 | Mittel | 400 | 490 | Mittel | 370 | 370 | |
| Zuwachs 280 = 80 % | | | Zuwachs 330 = 90 % | | | Zuwachs 90 = 25 % | | | Zuwachs 0 = 0 % | | | |

¹⁾ Bei der Berechnung der Mittelwerte wurden die eingeklammerten Zahlen (für Fäden, die nach 3 Tagen auf dem Agar nicht mehr gefunden wurden) nicht berücksichtigt.

sich nach Überimpfung in die Nährlösung weiterentwickeln, bei 3 min lang bestrahltem Material noch fast halb so gross ist (39%) wie jener bei nicht bestrahltem Material (86%). – Zu einer ähnlichen Feststellung führen die in Tab. 4 zusammengestellten Ergebnisse: Innert 3 Tagen wachsen die zuvor nicht oder 2 min lang bestrahlten Fäden um 80 bis 90% ihrer ursprünglichen Fadenlänge. Bei 3 min Bestrahlung sind es noch 25%, bei 4 min werden die Fäden abgetötet. – Diese neuen quantitativen Angaben über die Dosis-Wirkungs-Beziehung bei UV-bestrahltem *O.-rubescens*-Material verändern das in Abb. 9 dargestellte Bild nicht grundlegend. Es zeigt sich höchstens, dass die Alge eher noch etwas weniger UV-empfindlich ist, als wie es dort dargestellt worden ist.

3. Vorversuche zur Einführung von organischen Nährlösungen

a) Zweck

Das negative Resultat der vorangegangenen Reinigungsversuche legt die Vermutung nahe, es sei den allenfalls doch bakterienfreien Einzelfäden im Medium Z_{9A} einfach ein Wachstum nicht möglich gewesen, weil irgendwelche organischen Stoffe darin fehlen. Obwohl nicht beabsichtigt wurde, die Desinfektions- und Waschversuche in der bisherigen Weise mit organischen Nährlösungen zu wiederholen – die Arbeitsmethode erschien zu kompliziert und langwierig –, sollte in kleinen Vorexperimenten die Verwendung solcher Medien doch für spätere Versuche angestrebt werden. Dabei waren vor allem die Frage nach der zulässigen Konzentration von organischen Zusätzen und jene nach der Verschiebung der pH-Werte in den veränderten Z-Lösungen zu beantworten.

b) Einfluss von organischen Zusätzen auf den pH-Wert des Substrats Z₉

Durch verhältnismässig hochkonzentrierte, organische Zusätze ergibt sich, wie aus Tab. 5 ersichtlich ist, sofort eine starke Senkung des pH-Wertes, was vermutlich für *O. rubescens* an sich schon nicht günstig wäre. Ob aber die Zusätze selbst in diesen Konzentrationen das Wachstum hemmen oder fördern würden, lässt sich im Experiment nicht beurteilen, solange Bakterien im Impfmateriale vorhanden sind und kurz nach der Impfung schon alles überwuchern. Ein Ausweg aus dieser Situation liesse sich finden entweder bei besserer Pufferung der Substrate oder mit geringerer Konzentration der organischen Zusätze, was beides die pH-Werte höher halten könnte.

Tabelle 5

Einfluss von organischen Zusätzen auf den pH-Wert des Substrats Z9. pH-Kontrolle in Erlenmeyerkolben (200 ml) mit 50 ml Substrat. Bezeichnungen: *A* Actidion (50 mg/l wie in früheren Versuchen), *B* Biomalz (1000 mg/l), *E* Erdextrakt pH 7,7 (hergestellt nach PRINGSHEIM [134], 100 g/l), *P* Proteose-Pepton Difco (1000 mg/l).

| Substrat | frisch zusammen- gesetzte Nährlösung pH | nach dem Auto- klavieren (abgekühlt) pH | nach 14 Tagen (steril) pH | nach 2 Monaten (steril) pH |
|---------------|---|---|------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Z9A</i> | 8,0 | 8,1 | 8,1 | 8,3 |
| <i>Z9AE</i> | 8,1 | 8,2 | 8,1 | 8,3 |
| <i>Z9ABP</i> | 7,5 | 7,4 | 7,4 | 7,2 |
| <i>Z9AEBP</i> | 7,7 | 7,5 | 7,5 | 7,3 |

c) *Verbesserte Pufferung des Substrats Z*

Als geeignete Puffer für pH-Werte über 8 kommen vor allem das System 1 Karbonat-Bikarbonat oder 2 der organische Puffer TRIS, eventuell auch 3 das Gemisch Borsäure/KCl/NaOH in Frage.

1-Karbonat-Bikarbonat. In den *Z*-Lösungen ist bereits ein schwaches Karbonatpuffersystem verwirklicht, allerdings bei wattegestopften Kulturgefäßen nicht ganz richtig eingesetzt, da ja Luft-CO₂ zur Lösung zutreten kann. Aus Gründen der besseren Sterilhaltung bei den über viele Wochen erstreckten Versuchen wurde davon abgesehen, Gummizapfen als Kolbenverschluss einzuführen (wie ÖSTERLIND [124]), weil die Wattestopfen darunter von Kondenswasser feucht wurden, was eine saubere Arbeitsweise bei späterer Überimpfung erschwerte. Ohne solchen dichten Abschluss mussten aber die pH-Werte auch in Medien mit erhöhtem Sodagehalt immer wieder fallen. In frisch zusammengesetzten *Z8*-Lösungen (nicht sterilisiert) mit erhöhtem Sodagehalt von 2 bzw. 20 mM/l senkten sich die pH-Werte innert 4 Tagen (20°C, je 50 ml in Erlenmeyerkolben 200 ml, nicht geschüttelt) von 10,2 auf 8,6 bzw. von 10,9 auf 10,1. Trotz solchen Unzulänglichkeiten in der Versuchsanordnung wurde ein Experiment mit verschiedenen hohen Karbonat- und Bikarbonatzusätzen orientierungshalber angestellt. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 6.

Es geht daraus hervor, dass bis 20 mM/l Bikarbonat ertragen werden. Liegt aber die Hälfte davon als Soda vor, so steigt der pH-Wert knapp unter 10, was den Wachstumsbeginn schon zu stark verzögert. Die beträchtliche Verschiebung des K/Na-Verhältnisses zugunsten von Na hat

Tabelle 6

Orientierender Versuch über den Einfluss von verschiedenen hohen Na_2CO_3 - bzw. NaHCO_3 -Zusätzen zum Substrat Z (modifiziert) auf das Wachstum von *O. rubescens* und auf die Veränderung der pH-Werte während der Kulturperiode. Kulturbedingungen: 1500 Lux, 20–23°C, nicht geschüttelte Kolben. Abkürzungen: ZNa Substrat Z (Seite 116) ohne Na_2CO_3 , ZK Substrat Z ohne Na_2CO_3 , mit 5,5 mM/l KNO_3 statt NaNO_3 , S Na_2CO_3 -Zusatz (in Klammern: Konzentration in mM/l), B NaHCO_3 -Zusatz (in Klammern: Konzentration in mM/l), L NaOH-Zusatz (1 mM/l).

| Substrat + Zusätze | Impf- mat. Klon | Inkuba- tionszeit (Tage) ¹⁾ | Wachstum nach 1 Monat | pH (Mittel von 3 Kb.) | | |
|----------------------------|-----------------------|--|-----------------------------|-----------------------|--------------|---------|
| | | | | frisch steril | nach 1 Monat | |
| | | | | | steril | beimpft |
| ZNa + S(0,2) (= Z8) | 55 | 11 | stark | 7,5 | 7,5 | 10,0 |
| | 65 | 13 | stark | 7,5 | 7,5 | 9,7 |
| ZK + S(0,2) | 55 | 11 | stark | 7,5 | 7,6 | 10,2 |
| | 65 | 13 | stark | 7,5 | 7,6 | 9,7 |
| ZNa + S(0,2) + L (= Z9) | 55 | 10 | stark | 8,1 | 8,2 | 10,3 |
| | 65 | 11 | stark | 8,1 | 8,2 | 9,9 |
| ZK + S(0,2) + L | 55 | 10 | stark | 8,1 | 8,2 | 9,7 |
| | 65 | 11 | stark | 8,1 | 8,2 | 10,0 |
| ZNa + B(2) | 55 | 10 | stark | 8,3 | 8,4 | 9,7 |
| | 65 | 11 | stark | 8,3 | 8,4 | 9,5 |
| ZK + B(2) | 55 | 10 | stark | 8,3 | 8,4 | 9,8 |
| | 65 | 11 | stark | 8,3 | 8,4 | 9,6 |
| ZNa + B(20) | 55 | 10 | stark | 9,4 | 9,3 | 9,6 |
| | 65 | 12 | stark | 9,4 | 9,3 | 9,6 |
| ZK + B(20) | 55 | 11 | stark | 9,4 | 9,4 | 9,6 |
| | 65 | 12 | stark | 9,4 | 9,4 | 9,8 |
| ZNa + B(10) + S(10) | 55 | 18 | schwach | 9,9 | 9,4 | 9,8 |
| | 65 | 24 | sehr schwach | 9,9 | 9,4 | 9,5 |
| ZK + B(10) + S(10) | 55 | 21 | sehr schwach | 9,9 | 9,4 | 9,5 |
| | 65 | — | kein Wachstum | 9,9 | 9,4 | 9,5 |

¹⁾ Inkubationszeit bis zum eintretenden deutlichen Wachstum, beurteilt mit der auf S. 126 beschriebenen Methode.

dabei offenbar keinen wesentlichen Einfluss, sind doch die Resultate der ZNa- und ZK-Serien ungefähr dieselben.

2-TRIS (Tris[hydroxymethyl]aminomethan = 1,3-Dihydroxy-2-hydroxymethyl-2-amino-propan). Für Kulturen von marinen, pflanzlichen Organismen wird neuerdings TRIS als organischer Puffer verwendet für den pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,5 in Konzentrationen von normalerweise 1 g/l, ja sogar bis 10 g/l (PROVASOLI, MCLAUGHLIN und DROOP [139]). Ein Experiment mit *O. rubescens* zeigte jedoch sofort, dass 1 g/l, teilweise sogar schon 0,1 g/l TRIS auf diesen Organismus toxisch wirken. In Tab. 7 werden Zahlenwerte über das Wachstum zweier verschiedener Klonkulturen in TRIS-Substraten

gegeben. Wieder musste vorsichtshalber das K/Na-Verhältnis etwas zugunsten von K verschoben werden, da bekanntlich mit steigendem TRIS-Gehalt in den Medien der K-Bedarf bestimmter Algen erhöht wird (z. B. *Phormidium persicinum* [139]). Nach Tab. 7 kommt der *O.-rubescens*-Klon 65 in den beiden Medien mit TRIS überhaupt nicht zur Vermehrung; Klon 3 erträgt noch 0,1 g/l, wächst dabei aber schon weniger gut als in den übrigen Substraten. In dieser allenfalls noch erträglichen geringen Konzentration (0,83 mM/l) ist jedoch die TRIS-Pufferwirkung bereits zu gering und nicht mehr interessant.

Erstaunlicherweise kam übrigens bei diesem Versuch auch in den Medien 7-3 und 7-4 mit neutralem pH-Wert das Wachstum gut in Gang, was eine Folge der kräftigen Impfung sein mag: das Impfmateriale befand sich in einem Zustand raschen Wachstums, und der pH-Wert der schwachgepufferten Lösungen mag sich unter seinem Einfluss rasch erhöht haben (es erfolgten im Verlauf der ersten 5 Tage leider keine pH-Messungen). In den Na_2CO_3 -freien Lösungen 7-3 und 7-4 zeigte sich mit gutem *Oscillatoria*-wachstum also, dass ein Ausbleiben desselben in den Substraten 7-5 und 7-6 nicht mit dem fehlenden Karbonat, sondern mit der toxischen Wirkung von TRIS in Zusammenhang stehen muss.

3-Borsäure/KCl/NaOH. Auch Experimente mit einem Boratpuffergemisch führten zu einem ähnlichen Ergebnis: Tab. 8 liefert Angaben über diese Erfahrungen. Danach ist allenfalls noch eine Konzentration von 5 mM/l Borsäure + 5 mM/l KCl + 1 mM/l NaOH erträglich, wenn die Algen auch morphologisch nicht mehr ganz normal erscheinen (Fäden bei den Querwänden eingeschnürt). Der pH-Wert hält sich dabei zwischen 8 und 9 und wird beim Autoklavieren nicht so stark erhöht wie in Lösung Z9. Im ganzen gesehen ist jedoch die Wirkung des Borsäurezusatzes eher ungünstig und praktisch nicht auswertbar.

d) Schlussfolgerungen

Wenn in späteren Reinigungsexperimenten Substrate mit organischen Zusätzen zur Anwendung kommen, so soll deren Konzentration möglichst tief gehalten werden, damit die verwendbaren schwachen Puffer den pH-Wert noch wirksam im günstigsten Bereich zu halten vermögen. Wenn auch das Karbonat-Bikarbonat-Puffersystem das am besten geeignete wäre, so wird es doch für die Reinzüchtungsversuche nicht günstig sein, weil es die Einführung von abgeschlossenen Kulturgefäßen erfordert. Dies ist aber aus Gründen der besseren Sterilhaltung vorläufig nicht erwünscht.

Tabelle 7

Wachstum der *O.-rubescens*-Klonkulturen 3 und 65 in modifizierten Z-Substraten mit Zusatz von TRIS. Kulturbedingungen: 1500 Lux, 20–23°C. Mittelwerte von 3 Parallelkulturen.

| Zusammensetzung der Substrate ¹⁾ | Bezeichnung | 7-1 = Z 8 | 7-2 = Z 9 | 7-3 | 7-4 | 7-5 | 7-6 |
|--|---------------------------|-----------------------|--------------|------|------|------------------|----------------|
| | NaNO ₃ mM/l | 5,50 | 5,50 | 5,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 |
| KNO ₃ mM/l | 0 | 0 | 0 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| Na ₂ CO ₃ mM/l | 0,20 | 0,20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TRIS mM/l | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,83 =0,1 g/l | 8,30 =1 g/l |
| NaOH mM/l | 0 | 1,00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| pH nach Autokl. | 7,6 | 8,0 | 6,9 | 6,9 | 7,8 | 8,6 | 8,6 |
| Aussehen nach Autoklavieren | klar | leichter Niederschlag | klar | klar | klar | klar | leicht trübe |
| E- und pH-Messung ²⁾ nach 16 Tagen (Wachstum abgeschlossen) | <i>Klon 3</i> E | 1,34 | 1,40 | 1,23 | 1,46 | 1,04 | 0,02 |
| | täglich 1 mal geschüttelt | | | | | | |
| | pH | 9,2 | 9,1 | 9,1 | 9,0 | 8,9 | 8,4 |
| | <i>Klon 65</i> E | 1,37 | 1,27 | 1,09 | 1,15 | 0,16 | 0,03 |
| | täglich 1 mal geschüttelt | | | | | | |
| | pH | 8,7 | 8,7 | 8,7 | 8,8 | 8,4 | 8,4 |
| <i>Klon 65</i> E | 0,12 | 1,74 | 1,12 | 1,51 | 0,12 | 0,03 | |
| auf der Schüttelmaschine | | | | | | | |
| pH | 8,0 | 8,6 | 8,5 | 8,6 | 8,1 | 8,4 | |

¹⁾ Ausser den in der Tabelle angeführten Substanzen enthalten alle Substrate in gleichen Mengen Ca(NO₃)₂·4 H₂O, K₂HPO₄, MgSO₄·7 H₂O, Fe-EDTA-Komplex und Spurenelementlösung wie für Substrat Z auf S. 116 angegeben.

²⁾ Extinktionswerte E gemessen bei $\lambda = 610 \text{ m}\mu$, $z = 0,5 \text{ cm}$; es handelt sich um korrigierte Werte (S. 99 ff.)

4. Vorversuche zur Verbesserung der Plattenmethode

a) Agarnährböden

In einzelnen Wachstumsversuchen mit Z-Agarsubstraten waren die *O.-rubescens*-Fäden nach dem Aufsetzen sehr bald zerfallen, obwohl sie rasch wachsenden Kulturen entstammten. Vermutlich war daran der tiefe pH-Wert (6,4 bei 50°C gemessen) schuld. Nach den Erfahrungen aus den vorangehend beschriebenen Pufferversuchen liessen sich nun die Agar-substrate zweckmässig modifizieren.

In Tab. 9 sind einige Angaben über diese Nährböden zusammengestellt. Bei Impfung solcher Platten mit Fäden aus *O.-rubescens*-Klon 63 wurde dann festgestellt, dass die Nährböden 9-3 bis 9-6 den sofortigen Zerfall der

Tabelle 8

Wachstum der *O.-rubescens*-Klonkulturen 55 und 65 in modifizierten Z-Substraten mit Borsäure/KCl/NaOH-Puffer.

Substrate: 8-1 = Z8 (Seite 116)

8-2 = Z8 + 1 mM/l NaOH (= Z9)

8-3 = Z8 + 2 mM/l NaOH

8-4 = Z8 + 5 mM/l NaOH

8-5 = Z8 + 1 mM/l NaOH + 5 mM/l Borsäure + 5 mM/l KCl

8-6 = Z8 + 2 mM/l NaOH + 10 mM/l Borsäure + 10 mM/l KCl

8-7 = Z8 + 5 mM/l NaOH + 25 mM/l Borsäure + 25 mM/l KCl

Abkürzungen: Au = Autoklavsterilisation; Fi = Filtration durch Membranfiltermittel, Gruppe 6, Porendurchmesser ca. $0,2\mu$ (Membranfiltergesellschaft Göttingen).

Kulturbedingungen: 1500 Lux, 20–23°C, nicht geschüttelt.

| Substrat | Sterilisation | Klon | pH-Werte Mittel v. 3 Parall. | | | | Wachstum | Aussehen des Substrats nach der Sterilisation | Besondere Bemerkungen zum Algen- material (nach 20 Tagen) |
|----------|---------------|----------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------|--|---|
| | | | frisch, nicht sterilisiert | kurz nach Sterilisation | nach 20 Ta- gen (steril) | in Kulturen nach 20 Tg. | | | |
| 8-1 | Au | 55 65 | 7,4 | 8,2 | 8,0 | 8,0 8,0 | (:) + | klar | Material hellbraun |
| | Fi | 55 65 | 7,4 | 7,4 | 7,5 | 7,5 8,0 | + + | klar | |
| 8-2 | Au | 55 65 | 9,0 | 9,5 | 8,0 | 8,9 9,1 | + - +++ | leichter Niedersch. | Material dunkel- braunrot |
| | Fi | 55 65 | 9,0 | 9,0 | 8,0 | 8,9 9,1 | + + +++ | leichter Niedersch. | |
| 8-3 | Au | 55 65 | 9,6 | 9,8 | 8,3 | 8,7 8,5 | - - | flockiger Niedersch. | |
| | Fi | 55 65 | 9,6 | 10,0 | 8,2 | 8,6 8,5 | + + + + | flockiger Niedersch. | hell rotbraun flockig verteilt |
| 8-4 | Au | 55 65 | 10,1 | 10,4 | 8,7 | 8,8 8,8 | - - | flockiger Niedersch. | |
| | Fi | 55 65 | 10,1 | 10,1 | 8,6 | 8,8 8,8 | + + + + | flockiger Niedersch. | hell rotbraun, mikr. Bild normal |
| 8-5 | Au | 55 65 | 8,2 | 8,5 | 8,0 | 8,7 9,1 | + + + | leicht trübe | Material grünlich- braun, allgemein kurze Fäden, bei Querw. eingeschn. |
| | Fi | 55 65 | 8,2 | 8,3 | 8,0 | 8,9 9,0 | + + + + | klar | |
| 8-6 | Au | 55 65 | 8,4 | 8,5 | 8,1 | 8,2 8,2 | - - | balliger Niedersch. | |
| | Fi | 55 65 | 8,4 | 8,4 | 8,1 | 8,2 8,2 | - - | klar | |
| 8-7 | Au | 55 65 | 8,5 | 8,5 | 8,3 | 8,3 8,3 | - - | balliger Niedersch. | |
| | Fi | 55 65 | 8,5 | 8,5 | 8,3 | 8,3 8,3 | - - | klar | |

Fäden bewirkten und keine aktive Bewegung erlaubten. Auch die Böden 9-1 und 9-2 lieferten kein befriedigendes Ergebnis. In einer Wiederholung des Experiments mit verschiedenen Klonkulturen wurde dann aber erkannt, dass unterschiedliche Bewegungs- und Vermehrungsfähigkeit auf den Nährböden 9-1 und 9-2 offenbar weitgehend mit dem Zustand des Impfmaterials in Zusammenhang stehen. So kamen denn diesmal auf 9-1 und 9-2 einzelne Klone zu guter Entwicklung. In den Nährböden 9-3 bis 9-6 mussten sich aber durch den Sterilisiervorgang bei erhöhtem pH-Wert Substanzen gebildet haben, die auf *O. rubescens* toxisch wirken. Jedenfalls war auf ihnen keine Bewegung der Fäden zu bemerken, und die Algen zerfielen alle rasch. Dafür kann nicht der pH-Wert an sich verantwortlich sein, ist er doch im Vergleich mit den flüssigen Z9-Substraten nicht besonders hoch.

Tabelle 9

pH-Werte in modifizierten Z-Substraten mit Agarzusatz. Grundleistung wie Z 8 (S. 116), aber ohne Na₂CO₃, Messung der pH-Werte im flüssigen Medium bei 30°C

| Substrat | NaHCO ₃ mM/l | Agar % | pH nach dem Autoklavieren | Aussehen des flüssigen Substrats vor Erstarren |
|----------|----------------------------|-----------|------------------------------|---|
| 9-1 | 1 | 1,0 | 7,5 | klar, hellgelb/farblos |
| 9-2 | 1 | 1,5 | 7,4 | klar, hellgelb |
| 9-3 | 5 | 1,0 | 8,1 | klar, gelbbraun |
| 9-4 | 5 | 1,5 | 8,0 | klar, dunkelgelb |
| 9-5 | 10 | 1,0 | 8,3 | klar, braun |
| 9-6 | 10 | 1,5 | 8,2 | klar, braun |

b) Silicagelnährböden

Wenn zur Reinkultivierung von *O. rubescens* deren Beweglichkeit aus festen Nährsubstraten ausgenutzt werden soll, so wäre ein streng anorganisches Medium mit Silicagel als Verfestigungsmittel natürlich das am besten geeignete. Einige kleine Experimente mit solchen Substraten, wie üblich hergestellt mit Natriumsilikat und Salzsäure nach PRINGSHEIM [134], liessen diese Methode aber – in diesem Fall – als vollkommen unbrauchbar erscheinen: Bei der Herstellung der Platten konnte nicht im Autoklav sterilisiert werden, da bei der raschen Erhitzung Blasenbildung nicht zu vermeiden war. Die Dampftopfsterilisierung wurde jedoch als zuwenig sicher angesehen. Ausserdem blieb der pH-Wert zu tief.

TEMPLE [161] sowie KINGSBURY und BARGHOORN [91] berichten nun aber über modernere Kieselsäuregel-Nährböden, die besonders in der Bakteriologie dort verwendet werden, wo Agar unerwünscht ist. Das Pro-

dukt *Silicagel Ludox* (Du Pont), ein organisches Orthosilikat in kolloidaler wässriger Lösung (30%), kann nach Verdünnung auf 10% mit Wasser bzw. Nährlösung durch Erhitzen im Autoklav verfestigt werden. Dies ist jedoch nur bei pH-Werten unter dem Neutralpunkt in solcher Verdünnung möglich. Braucht man Nährböden mit alkalischer Reaktion, so muss die *Ludox*-Konzentration erhöht werden. Nach einigem Experimentieren wurden die in Tab. 10 zusammengestellten Medien als die günstigsten befunden, mit verschiedenen Klonkulturen in Erlenmeyerkolben (100 ml mit je 20 ml Substrat) beimpft und bei 500 Lux, 20–23°C, aufgestellt. Die *O. rubescens*-Fäden blühten alsbald aus und gingen zugrunde. Die hohe Konzentration des Verfestigungsmittels musste ungünstige Bedingungen geschaffen haben. Die zur Kontrolle geimpften Agarnährböden (9–2, Tab. 9, S. 138) erlaubten hingegen eine gute Entwicklung des gleichen Impfmateri- als.

Nach diesen negativen Ergebnissen wurde von weiteren Experimenten mit den an sich sehr vorteilhaft erscheinenden Kieselsäuregel-Nährböden einstweilen abgesehen.

Tabelle 10

Zusammensetzung modifizierter Z-Substrate mit Silicagel Ludox. Die Substrate 10–2 und 10–4 enthalten (mit der wässrigen Verdünnungslösung zugegeben) Mineralsalze in gleichen Mengen wie Lösung Z8. Bei 10–1 und 10–3 ist Na_2CO_3 weggelassen. Aussehen der verfestigten Nährböden: Alle Substrate praktisch farblos, ziemlich fest, im Vergleich mit Agarsubstraten zäher, trockener, weniger elastisch. Bei raschem Abkühlen nach dem Sterilisieren oder bei zu tief gesenktem pH-Wert können Risse im Nährboden entstehen.

| Substrat | Teile Ludox | Teile wässrige Verd.-lösung | pH vor dem Autoklavieren (eingestellt mit HCl) |
|----------|-------------|-----------------------------|--|
| 10–1 | 8 | 2 | 8,0 |
| 10–2 | 8 | 2 | 8,0 |
| 10–3 | 6 | 4 | 7,5 |
| 10–4 | 6 | 4 | 7,5 |

5. Desinfektionsversuche mit Antibiotika

a) Vorbemerkungen

Nach dem Erfolg mit Actidion zur Ausschaltung von Pilzen, Grünalgen, Protozoen und anderen Organismen der ursprünglichen Planktonbiozönose aus den *O. rubescens*-Kulturen musste in Betracht gezogen werden, mit anderen Antibiotika nun auch noch die Bakterien zu eliminieren. Bisher ist

aber noch kein Antibiotikum bekannt geworden, das spezifisch gegen Bakterien wirkt, Blaualgen dabei aber allgemein unbeschädigt lässt. Es durfte höchstens damit gerechnet werden, dass sich ein Produkt finden lasse, bei welchem wenigstens ein deutlicher, gradueller Unterschied in der Abtötungswirkung gegenüber den beiden Organismengruppen nachweisbar und auszunützen wäre. Damit ist aber schon gesagt, dass der Erfolg einer solchen Methode von exakter Dosierung in Konzentration und Wirkungsdauer abhängig ist. Praktisch wären wenn möglich hohe Konzentrationen, während kurzer Zeit wirksam eingesetzt, anzustreben, womit am ehesten ein Herauszüchten von resistenten Bakterienstämmen vermieden würde. Dazu müsste aber eine zuverlässige Kontrolle zur Verfügung stehen, die sofort über den Zustand der behandelten Zellen Auskunft gibt. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Algenfäden kann als Mass zweifellos nicht in Frage kommen. Sie lässt sich ja nur in Experimenten, die Tage und Wochen dauern, exakt ermitteln. Und doch müsste sich – mit Hinsicht auf den Zweck der Arbeiten – die Antibiotikadosierung vor allem nach ihrer Einwirkung auf die Zellteilungsfähigkeit der Oszillatorien richten. Für die im folgenden beschriebenen Experimente stellte sich daher zunächst die Aufgabe, zur zuverlässigen Beurteilung dieser Verhältnisse eine indirekte, rasch arbeitende Testmethode zu finden.

b) Orientierende Plattentestexperimente

Auf dicht überwachsenen Mineralagarplatten (9-2, S. 138) ist die kriechende Bewegung der *O.-rubescens*-Fäden bei mikroskopischer Betrachtung mit schwacher Vergrößerung sehr auffällig und mit einem Blick zu beurteilen. Da sich oft zwei aneinanderliegende Fäden in entgegengesetzter Richtung bewegen, wird das Kriechen besonders gut sichtbar. Bei Bestrahlung mit Ultraviolettlicht oder Einwirkung von Giftstoffen kommt die Bewegung der geschädigten Fäden bald zum Stillstand, wenn auch zunächst gar keine morphologischen Veränderungen zu bemerken sind.

Unter Ausnützung dieser sofort sichtbaren Reaktion der Algen wurden nun aktiv bewegliche Fäden auf Agarplatten direkter Antibiotikaeinwirkung unterworfen. Sterile, runde Filterpapierblättchen von 6 mm Durchmesser wurden mit einer abflambierten Präpariernadel in Lösungen verschiedener Antibiotika getaucht, darauf zur Entfernung überschüssiger Flüssigkeit kurz auf steriles Filterpapier in einer Petrischale gelegt und schliesslich in die Mitte von dicht überwachsenen Oszillatorienplatten gesetzt. Das Antibiotikum konnte in den Nährboden hinausdiffundieren, und

es ergaben sich mit zunehmendem Abstand vom Filterpapierblättchen kontinuierlich immer geringere Konzentrationen. Die Bewegung der Fäden wurde dann in bestimmten Zeitabständen vom Blättchen aus radial gegen den Petrischalenrand mikroskopisch kontrolliert.

Oft liess sich eine scharf begrenzte, runde Zone um das Blättchen abmessen, innerhalb welcher die Bewegung stillgelegt worden war. Der Durchmesser dieses Hofes (d_A in mm; Index A bezieht sich auf Algen) gab dann ein Mass für die Wirkung des Antibiotikums auf die Oszillationsbewegung.

Entsprechend konnten die in gleicher Weise mit Antibiotikallösungen getränkten Filterpapierscheibchen auch auf TGE-Agar, der kurz zuvor mit einer Suspension der unerwünschten Begleitorganismen geimpft worden war, gelegt werden. Die hier nach 24 Stunden (25°C) ablesbaren Hemmhöfe (Durchmesser = d_B in mm; Index B bezieht sich auf Bakterien) konnten dann mit den d_A -Werten verglichen werden.

Bei einzelnen Antibiotika war d_B deutlich grösser als d_A . In einer ringförmigen Zone zwischen dem d_A - und dem d_B -Kreis mussten also *Oscillatoria*-fäden vorhanden sein, die sich noch bewegten, während ihre agarwüchsigen Begleitbakterien dagegen schon bakterio-statisch oder bakterizid geschädigt worden waren.

In den Tab. 11 und 12 sind Messwerte aus solchen Experimenten zur vorläufigen Auswahl wirksamer Antibiotika zusammengestellt. Es handelt sich um Einzelwerte, die lediglich einen Hinweis geben und ungünstige Präparate ausscheiden lassen sollen. Diese Angaben wurden später bei den Desinfektionsversuchen mit Algenplatten immer wieder kontrolliert. Es ergaben sich dabei keine prinzipiellen Abweichungen vom provisorischen Befund, wie er in den Tab. 11 und 12 zum Ausdruck kommt.

Die Tab. 13 und 14 vermitteln einen Eindruck von den Unterschieden zwischen d_A und d_B bei verschiedenen Klonen mit einigen zusätzlich ausgewählten Antibiotikumpräparaten. Aus allen Wirksubstanzen sticht Aureomycin als besonders zweckdienlich hervor. Entweder hemmt es die Algenbewegung überhaupt nicht, oder im ungünstigsten Fall ist d_B immer noch gut doppelt so gross wie d_A (bei Klon 18). Die Wirkung von Streptomycin ist bei den einzelnen Klonen sehr verschieden. Wenn es bei den einen nach kurzer Einwirkungsdauer noch sehr günstig wäre (Klone 6 und 18, Tab. 13), so kommt es dagegen bei anderen gar nicht in Frage, weil d_A sogar grösser als d_B wird. Bei Chloromycetin und Neomycin liegen die Verhältnisse bezüglich der einzelnen Klone ebenfalls ganz unterschiedlich. Die d_A - und d_B -Werte bei Polymyxin, Sigmamycin, Terramycin, Tetracyclin

Tabelle 11

Wirkung verschiedener Antibiotika auf die Begleitbakterien in O.-rubecens-Klonkulturen.
 Filterpapierblättchen \varnothing 6 mm getränkt mit Antibiotikalösungen¹⁾ verschiedener Konzentrationen. Durchmesser der Hemmhöfe auf TGE-Agar-Platten (d_B in mm), abgelesen nach 24 Std. (25°C); «O» bedeutet «kein Hemmhof»; wenn zwei Zahlen angegeben sind, so ist innerhalb dieser Zone zwar das Bakterienwachstum schwächer, aber nicht ganz unterbunden.

| Antibiotikum | Konzentration mg/ml | Klonkulturen | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------------------|--------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|--|
| | | 3-10 | 6-11 | 18-10 | 19-8 | 51-13 | 53-11 | 56-7 | 63-13 | 63-14 | 64-11 | 65-13 | 65-14 | | |
| Actidion | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Aureomycin | 1 | 0-15 | 15 | 10-18 | 21 | 12 | 25-33 | 20 | 10-18 | 10-15 | 0-28 | 31 | 35 | | |
| | 10 | 27 | 20 | 27 | 25 | 17 | 37 | 23 | 22 | 30 | 33 | 40 | 40 | | |
| Bactracin | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0-12 | 0-12 | 0 | 0 | 0-8 | 10 | 12 | | |
| Polymyxin | 1 | 0 | 8 | 7 | 8 | 7 | 14 | 8 | 8 | 7 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 10 | 16 | 17 | 15 | 13 | 15 | 21 | 18 | 15 | 16 | 17 | 20 | 15 | | |
| Rovamycin | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11-16 | 10-15 | | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 30 | 0-8 | 0-12 | 15 | 11 | 27 | 28 | | |
| Streptomycin | 1 | 15 | 13 | 10-14 | 11-15 | 13 | 24 | 12-20 | 17 | 17 | 30 | 19 | 0-25 | | |
| | 10 | 25 | 18 | 20-22 | 13-23 | 18-20 | 28-32 | 20-25 | 27-29 | 26 | 31 | 30 | 30 | | |

¹⁾ Herkunft der Produkte S. 96; die entsprechenden Mengen werden in 1 ml Azeton gelöst bzw. suspendiert (nur Actidion und Rovamycin sind total azetonlöslich) und dann mit 4 ml sterillem dest. Wasser verdünnt (wobei alle in Lösung gehen; es erfolgt keine weitere Sterilisation).

Tabelle 12

Wirkung verschiedener Antibiotika und eines Sulfonamids auf die Begleitbakterien in *O. rubescens*-Klonkulturen. SEBAS-Testblättchen \varnothing 9 mm (s. S. 96). Durchmesser der Hemmhöfe auf TGE-Agarplatten (d_B in mm), abgelesen nach 24 h (25°C).

| Antibiotikum bzw. Chemo- therapeutikum | Klonkulturen | | | | |
|--|--------------|-------|-------|-------|-------|
| | 6-12 | 55-14 | 63-14 | 64-12 | 65-14 |
| | 1) | 1) | 1) | 2) | 2) |
| Aureomycin | 23 | 30 | 32 | 32 | 44 |
| Bacitracin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Chloromycetin | 19 | 30 | 30 | 38 | 43 |
| Erythromycin | 11 | 15 | 11 | 20 | 44 |
| Magnamycin | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 |
| Neomycin | 25 | 24 | 27 | 23 | 26 |
| Oleandomycin | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 |
| Penicillin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Polymyxin | 14 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| Rovamycin | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| Sigmamycin | 26 | 38 | 38 | 33 | 48 |
| Streptomycin | 22 | 32 | 28 | 32 | 35 |
| Tetracyclin | 26 | 36 | 38 | 34 | 45 |
| Terramycin | 23 | 35 | 34 | 35 | 44 |
| Sulfonamid | 22 | 35 | 33 | 24 | 48 |

1) Einzelwerte.

2) Mittelwerte aus zwei aufeinanderfolgenden Experimenten.

Tabelle 13

Vergleich der Wirkung einiger Antibiotika auf die Kriechbewegung von *O. rubescens* und auf die Vermehrung ihrer Begleitbakterien. Filterpapierblättchen \varnothing 6 mm, getränkt mit Antibiotikallösungen (je 10 mg/ml) (vgl. Anm. I, S. 142).

d_A = Durchmesser der Hemmzone, innerhalb welcher die Kriechbewegung auf Mineralagar (9-2, S. 138) zum Stillstand gebracht wird; mikroskopische Beurteilung 6, 12 und 24 Stunden nach Aufsetzen der Blättchen.

d_B = Durchmesser der Hemmzone, innerhalb welcher auf TGE-Agar keine Begleitbakterien zur Entwicklung kommen (24 h, 25°C).

| Klon- kultur | Actidion | | | Aureomycin | | | Polymyxin | | | Streptomycin | | | | | | |
|-----------------|----------|----|-------|------------|----|-------|-----------|----|-------|--------------|----|-------|----|----|----|----|
| | d_A | | d_B | d_A | | d_B | d_A | | d_B | d_A | | d_B | | | | |
| | 6 | 12 | 24 | 6 | 12 | 24 | 6 | 12 | 24 | 6 | 12 | 24 | | | | |
| 6-11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 12 | 12 | 14 | 14 | 0 | 10 | 12 | 22 | |
| 18-10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 10 | 20 | 12 | 12 | 14 | 14 | 0 | 16 | 16 | 20 |
| 19- 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 8 | 22 | 12 | 12 | 20 | 14 | 24 | 24 | 26 | 20 |
| 51-13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 12 | 12 | 20 | 13 | 20 | 20 | 24 | 18 |
| 63-13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 12 | 12 | 18 | 14 | 10 | 10 | 12 | 24 |
| 64-11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 10 | 12 | 16 | 14 | 14 | 14 | 20 | 28 |

torien aber noch beweglich blieben; 3 weit ausserhalb der d_B -Grenze, wo kein Antibiotikumeinfluss mehr vorhanden sein konnte.

Von der grossen Zahl so geimpfter Kulturen entwickelten sich bei Impfungen mit Material von der innersten Probestelle 1 doch noch 20 bis 75% weiter, nämlich 75% bei 6 Std. Kontaktzeit, 50% bei 12 Std. Kontaktzeit bzw. 20% bei 24 Std. Kontaktzeit. Von den mit Material aus der Grenzzone 2 und aus dem unbeeinflussten Bereich 3 geimpften Kolben begannen aber – je nach Klon – 75 bis 100% zu wachsen.

Die Wachstumsfähigkeit des Algenmaterials von der innersten Probestelle fiel somit – insbesondere bei längeren Kontaktzeiten – gegenüber derjenigen von ausserhalb der d_A -Grenze entnommenen Fäden deutlich ab. Die den Probestellen 2 und 3 entstammenden Oszillatorien lieferten einen ungefähr gleich hohen Prozentsatz von auswachsenden Kulturen, woraus geschlossen werden darf, dass das versuchstechnisch interessante Material aus der Grenzzone 2 wirklich nicht beträchtlich geschädigt ist, wogegen ja die Bakterien hier noch deutlich in der Entwicklung gehemmt sind. Die Bewegungsfähigkeit der Oszillatorien scheint somit einen durchaus brauchbaren Hinweis auf die algizide Wirkung der Antibiotika zu geben.

Nach diesen vorläufigen Erfahrungen schien es nun angezeigt, die Anstrengungen zur Reinkultivierung von *O. rubescens* auf die Anwendung dieser Antibiotikatechnik, vor allem mit Aureomycin, zu konzentrieren. Bei einer Anzahl von *Oscillatoriaplatten* (Impfmaterial: Kulturen 6–11, 18–10, 19–8, 51–13, 63–14, 64–11) wurden Aureomycinblättchen aufgelegt. Nach verschiedener Einwirkungsdauer (12, 24 und 48 h) direkt am Blättchenrand ausgestochene Proben (runde Agarplättchen mit 2 mm Durchmesser, je 3 Parallelproben) wurden im sterilen Impfkasten in Kolben mit Nährlösung Z9 übertragen.

Bei der kürzesten Kontaktzeit (12 h) war schon innert einer Woche in allen 18 Kolben beginnendes Wachstum festzustellen. Auch die 24 Stunden lang dem Antibiotikum ausgesetzten Proben entwickelten sich ausnahmslos alle weiter. Für die Kontaktzeit von 48 h gab es dagegen rund einen Drittel Ausfälle (13 auswachsende von 18 geimpften Kolben). – Die Prüfung auf Bakterienverunreinigungen (TGE-Agar) in diesen Kulturen ergab jedoch, dass alle noch reichlich Begleitbakterien enthielten.

Zweifellos war die Arbeitsweise in diesen Vorexperimenten noch zuwenig differenziert: Die *Oscillatoriaplatten* mussten sich ja gut eine Woche lang entwickeln, bevor die Antibiotikablättchen aufgelegt werden konnten, und in dieser Zeit hatten die in den Klonkulturen ohnehin schon reichlich vorhandenen Bakterien Gelegenheit, die Agaroberfläche zu überwuchern. Die

im Wirkungsbereich der Antibiotika vorhandene Anzahl von Bakterien war somit schon bei Beginn der Desinfektion ausserordentlich gross, womit die Wahrscheinlichkeit gegeben war, dass mit jeder Probenahme Resistente erfasst würden. – Das Vorgehen wurde nun so verfeinert, dass mit einzelnen *Oscillatoria*fäden, die schon im voraus möglichst wenige Begleitbakterien mit sich führten, experimentiert werden konnte.

c) *Behandlung einzelner O.-rubescens-Fäden mit Antibiotika*

Ähnlich wie bei den ersten Klonisierungsversuchen wurden nun kleine Tropfen von *Oscillatoria*material in die Mitte von Mineralagarplatten (9–2, S. 138) gesetzt. Die Bewegung einzelner Fäden zum Schalenrand liess sich mikroskopisch verfolgen. An günstigen Stellen – möglichst weit vom Plattenzentrum entfernt – wurden dann Antibiotikablättchen in die Nähe der sich bewegenden Fäden gelegt, ihre Reaktion verfolgt und in Protokollen festgehalten.

Zunächst wurden Aureomycinscheibchen so gelegt, dass die Kriechspuren geradewegs in den Einflussbereich des Antibiotikums hineinführen mussten. Viele Fäden drehten dann ab und gerieten in eine spiralige oder kreisförmige Bahn. Einzelne kehrten aber ihre Bewegungsrichtung einfach um und krochen wieder vom Antibiotikum weg. Einige wenige aber kamen in direkten Kontakt mit dem Aureomycinblättchen und bewegten sich am Rande desselben in einer besonders feuchten Zone weiter, eine Kreisbahn um das Filterpapierscheibchen beschreibend, wobei die Fäden sich allerdings manchmal der Beobachtung entzogen. Ein einzelner Faden, der sich in einer Schlängelbewegung vorwärtswand, geriet direkt unter ein Aureomycinblättchen und kroch auf der entgegengesetzten Seite desselben wieder hervor.

Nachdem die Einzelfäden sich dann während einiger Stunden unter dem Einfluss von Aureomycin befunden hatten, konnte versucht werden, sie mit einem darum herum ausgestochenen Agarstück als Unterlage auf eine zweite Agarplatte zu legen. Beim Weiterkriechen sollte dann ein anderes Antibiotikum in die Nähe gelegt und so eine kombinierte Desinfektionswirkung zustande gebracht werden. Nach dem Übertragen auf die neue Platte bewegten sich alle Fäden auf dem alten Agarscheibchen zunächst noch etwas weiter, kamen aber am Rand desselben ausnahmslos in die bereits erwähnte Kreisbewegung. Dort waren sie aus optischen Gründen nicht mehr gut zu beobachten, und die Kontrolle war dadurch zu sehr erschwert, so dass sich ein Weiterverfolgen nicht lohnte. Kein einziger der vielen über-

tragenen Fäden entfernte sich vom alten Agarstück. Diese Beobachtung steht in Widerspruch zu den von ALLEN [3] gemachten Erfahrungen, wonach gerade mittels wiederholtem Übertragen auf verschiedene Agarplatten – ohne jegliche weitere Desinfektionsmassnahme – gute Reinkulturen von beweglichen fädigen Blaualgen, unter anderen auch von Oscillatorien, herzustellen wären. Es scheint, dass die Art *O. rubescens* in dieser Hinsicht etwas empfindlicher ist als die von ALLEN benützten.

Eine Anzahl von *O.-rubescens*-Fäden, die in dieser Weise einzeln mit Aureomycin behandelt worden waren (höchstens während 24 h), wurde aber direkt in flüssige Nährlösung Z₉ übertragen. Von den 42 so geimpften Kulturen kam genau die Hälfte innert einem Monat zum Wachstum. Sämtliche Kulturen enthielten wiederum Begleitbakterien.

6. Herstellung einer Reinkultur mit kombinierter UV- und Antibiotikadesinfektion

a) Grundsätzliche Überlegungen

Nach den bisher gemachten Erfahrungen mussten die nachfolgend zusammengestellten Umstände als vermutliche Hauptgründe für den Misserfolg der Reinzuchtungsversuche angesehen werden:

1 Die Begleitbakterien mochten in derart grosser Arten- und Rassenmannigfaltigkeit vorliegen, dass in jeder Probe, auch nur schon an einzelnen *Oscillatoria*fäden, immer resistente Individuen vorhanden waren.

2 Resistente in grosser Zahl waren vielleicht bei den d_B -Bestimmungen übersehen worden, weil ihnen der TGE-Agar nicht zusagte, weshalb sie zwar keine Kolonien bildeten, aber trotzdem überleben mochten und sich bei späteren Überimpfungen in Z₉-Lösung wieder entwickeln konnten.

3 Die Bakterienhemmzonen bei den TGE-Agar-Plattentests mochten nur bakteriostatischer Wirkung zuzuschreiben sein.

4 Allenfalls doch bakterienfrei überimpfte *O.-rubescens*-Fäden konnten möglicherweise nicht zum Wachstum kommen, weil irgendwelche unentbehrlichen organischen Nährstoffe oder Vitamine in der Nährlösung Z₉ fehlten.

In den nächsten Experimenten wurde den unter 1 und 4 genannten Bedenken Rechnung getragen, und zwar einerseits durch Auswahl von Impfmateriale, das schon teilweise gereinigt war, das also schon ein enger begrenztes Begleitorganismenspektrum aufwies, andererseits durch Ver-

wendung von flüssigen Substraten mit Zusatz organischer Nähr- und Wuchsstoffe. Auf die unter 2 und 3 erwähnten Unsicherheitsfaktoren wurde vorerst nicht näher eingegangen.

b) Methode

Auswahl des Impfmateri als. Nach mehrmaliger Überimpfung der Klonkulturen auf anorganische Substrate war zweifellos die Anzahl verschiedener Bakterientypen unter den Begleitorganismen schon etwas zurückgegangen. Bei den Vorversuchen zur Desinfektion mit Antibiotika, insbesondere bei den sorgfältigen Experimenten mit Einzelfäden, dürften sodann wiederum einige Bakteriengruppen – wenn auch noch nicht alle – ausgeschaltet worden sein. In den meisten Fällen machte sich dies zwar bei Tests auf TGE-Agar nicht bemerkbar, weil dieser Agar sehr vielen Mikroorganismen typen ein gutes Wachstum erlaubt. Ein einziger Stamm aber enthielt keine agarwüchsigen Bakterien mehr, so dass er noch mit anderen Nährmedien geprüft werden musste. In einem halbflüssigen Substrat, das auch für Anaerobier und Mikroaerophile gute Bedingungen gewährleistet (Difco Fluid Thioglycollate Medium, empfohlen von CLAUSEN [27]), konnten sich die auch hier noch vorhandenen Stäbchenbakterien und Kokken – die physiologisch nicht differenziert wurden – gut entwickeln. Überimpfungen aus diesem Medium auf TGE-Agar wuchsen jedoch wieder nicht an. Das Organismenspektrum musste demnach bereits recht eng geworden sein.

Die *O. rubescens*-Kultur mit diesen vielversprechenden Eigenschaften war aus einem Antibiotikavorversuch mit Polymyxin (Tab. 13) hervorgegangen. Mineralagarplatten (9-2) waren mit Klonkultur 51-13 beimpft worden. Nach 7tägigem Wachstum waren Filterpapierscheibchen, getränkt mit Polymyxinlösung (10 mg/ml), aufgelegt worden. 12 Stunden nach Aufsetzen der Blättchen war die d_A -Zone mit 12 mm bestimmt worden. Auf gleichzeitig angesetzten TGE-Agarplatten hatte sich eine Bakterienhemmzone mit $d_B = 13$ mm gebildet. Die Wirkung von Polymyxin war also – wie in Tab. 13 eingetragen – gegenüber Algen und Bakterien ungefähr dieselbe. Polymyxin musste darum ja für diese speziellen Zwecke als ungünstiges Antibiotikum angesehen werden. Trotzdem waren aber innerhalb der d_A -Zone, gerade am Papierscheibchenrand, vorsichtshalber auch bei solchen anscheinend unbrauchbaren Fällen Proben erhoben und in Nährlösung Z9 überimpft worden. Erst zwei Monate später wurde dann bei der Kultur mit Impfmateri al aus der Polymyxinhemmzone deutliches *Oscillatoria*wachstum sichtbar. Die Zellen, welche sich hier entwickelt hatten, waren

somit während 12 Stunden einer Polymyxinkonzentration von gegen 10 mg/ml ausgesetzt gewesen. – Der so mit Polymyxin teilweise gereinigte Stamm des *O.-rubescens*-Klons 51 wird im folgenden mit 51 P bezeichnet.

Auch aus den Klonkulturen 6 und 63 gingen weitgehend gereinigte Stämme hervor, die allerdings für die vorliegende Arbeit nicht weiter verwendet wurden.

Vorbehandlung mit UV-Bestrahlung. Mit der auf S. 125 beschriebenen Versuchsanordnung wurden die Kulturen des Stammes 51 P während 3 min mit Ultraviolettlicht bestrahlt, was den Bakterienbestand nochmals verminderte (auf etwa 0,01 bis 0,1%). In diesem vorbehandelten Material befanden sich aber immerhin noch genügend *Oscillatoria*fäden, die sich auf Agar rasch bewegten.

Kombination der Antibiotika. Die antibiotische Aktivität von Polymyxin richtet sich ja besonders gegen gramnegative Bakterien, und so durfte angenommen werden, dass im Stamm 51 P hauptsächlich grampositive Formen übriggeblieben waren. Eine Reihe von Gramfärbungen an Material aus dem Thioglykolat-Nährmedium bestätigte diese Vermutung. Die weiteren Behandlungen mussten also vornehmlich mit Antibiotika versucht werden, die gegen grampositive (z. B. Streptomycin) oder gegen positive und negative Gruppen wirksam sind (z. B. Aureomycin, Chloromycetin, Erythromycin, Terramycin, Tetracyclin, Sigmamycin).

Die sukzessive Anwendung der verschiedenen Antibiotika schien wie erwähnt nicht gut möglich zu sein, weil die Übertragung von Agar auf Agar nicht gut gelang. Die Benützung von Lösungsgemischen wurde vorläufig vermieden. Statt nacheinander oder miteinander konnten die verschiedenen Antibiotika auf den Agarplatten aber auch nebeneinander eingesetzt werden. Bei der aktiven Bewegung der Algen durch verschiedene Antibiotikahemmhöfe, die sich zum Teil überdeckten, ergaben sich gute kombinierte Wirkungen.

Die meist getroffene Anordnung der Blättchen auf dem Agar, welche schliesslich auch mit Erfolg zu einer Reinkultur führte, ist in Abb. 10 skizziert: Verschiedene Antibiotika wurden je nach d_B - und d_A -Werten in bestimmtem Abstand voneinander rings um einen Tropfen von UV-bestrahltem *Oscillatoria*material vom Stamm 51 P angeordnet. Sie bildeten so eine Art «Antibiotikakäfig». Diejenigen *Oscillatoria*fäden, welche nach der UV-Behandlung noch zur Bewegung fähig waren, konnten zwar unversehrt aus diesem Käfig ausbrechen, wenn sie sich innerhalb der weissen Zone (Abb. 10) bewegten, ihre Begleitbakterien wurden dabei aber geschädigt. Gerieten die Oszillatorien in das schraffierte Gebiet innerhalb des d_A -Kreises, so

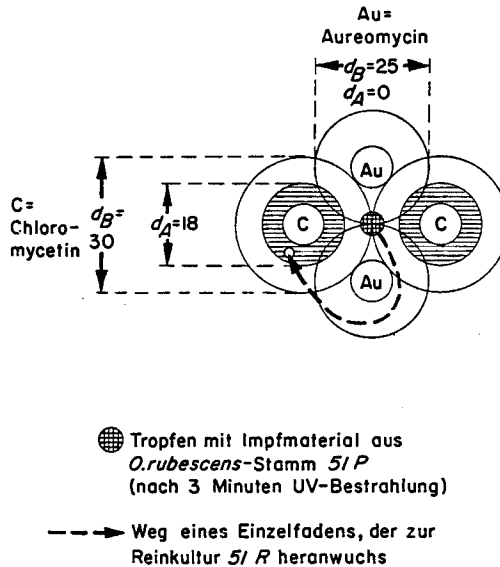


Abbildung 10

Kombinierte Desinfektion mit verschiedenen Antibiotika auf Agar («Antibiotika-Käfig»)

blieben sie dort stecken und mussten sofort in flüssiges Medium überimpft werden, wo sie nur mit geringer Wahrscheinlichkeit noch weiterwuchsen.

Alle aus dem «Käfig» herausgekrochenen und die in den d_A -Zonen steckengebliebenen *Oscillatoria*-Fäden wurden überimpft in eine Auswahl von flüssigen Substraten.

Modifizierte Z-Substrate. Ausser gewöhnlichen Z₉-Substraten wurden in dieser Versuchsserie auch 3 mit organischen Stoffen versehene flüssige Medien beimpft: Zur Nährlösung Z₈ (die anstelle von Soda 20 mM/l NaHCO₃ enthielt) wurden entweder Erdextrakt (10 ml/l, hergestellt nach PRINGSHEIM [134]) oder Pepton (Proteose-Pepton Difco, 1 g/l) oder Hefeextrakt (Yeast Extract Difco, 1 g/l) hinzugefügt. Auch alle Kombinationen dieser Zusätze wurden zusammengestellt. Die pH-Werte dieser insgesamt 7 Lösungen hielten sich zwischen 8,0 und 8,5. Nach dem Autoklavieren waren alle leicht trübe, wiesen jedoch eine weit schwächere Ausfällung auf als Substrat Z₉.

c) Vorläufige Resultate

Von 175 Einzelfäden (Stamm 51 P, 3 min UV-Bestrahlung), die mit der Antibiotika-Käfig-Methode (Aureomycin, Chloromycetin, Terramycin und Tetracyclin in verschiedenen Kombinationen) behandelt und in die er-

wählten 7 verschiedenen Substrate überimpft worden waren, entwickelten sich deren 68 weiter. Der Prozentsatz von auswachsenden Kulturen in den verschiedenen Substraten verteilte sich ziemlich gleichmässig auf alle Varianten, so dass daraus keine Schlüsse auf die Zweckdienlichkeit der Zusätze gezogen werden können. Bei den meisten waren wiederum Bakterieninfektionen sofort im mikroskopischen Bild sichtbar, bei einzelnen sogar makroskopisch durch Trübung der Lösung. Plattentests auf TGE-Agar ergaben jedoch nur in 5 Fällen ein positives Resultat. Die so nachgewiesenen Bakterien mussten nachträglich in die Kultur 51 P eingeschleppt worden sein, hatte doch dieser Stamm ursprünglich keine agarwüchsigen Bakterien mehr enthalten. Bei weiteren 62 ausgewachsenen Kulturen fiel dann auch der Test in Thioglykolat-Substrat positiv aus, was aussagte, dass von den Begleitbakterien in Stamm 51 P immer noch welche vorhanden waren.

Nur gerade in einem einzigen Kolben liess sich weder mikroskopisch noch auf TGE-Agar oder in Thioglykolat-Medium irgendeine Bakterienverunreinigung nachweisen. Gemäss Protokoll war diese Kultur ausgegangen von einem Faden, der sich bei einer «Käfigdesinfektion» (Abb. 10) auf einer bogenförmigen Bahn zunächst durch den überdeckten Einflussbereich von Chloromycetin und Aureomycin, dann innerhalb der d_B -Zone des Aureomycinblättchens bewegt hatte und schliesslich geradewegs in die d_A -Zone des Chloromycetinblättchens hineingeraten war. Dort war die Bewegung zum Stillstand gekommen, und der Faden wurde in Lösung Z 9 überimpft. Leider ist nicht genau notiert worden, wie lange der Faden sich in den einzelnen Abschnitten befunden hatte, weil er hauptsächlich nachts sehr weit gekrochen war. Die gesamte Bewegung kann jedoch nicht länger als 24 Stunden gedauert haben.

Die in dieser Weise aus dem Stamm 51 P hervorgegangene, nach den vorläufigen Tests als bakterienfrei befundene *O.-rubescens*-Kultur wird in der Folge als Stamm 51 R bezeichnet.

d) *Erweiterte Prüfung des O.-rubescens-Stammes 51 R auf bakterielle Verunreinigungen*

Wenn man eine Algenkultur mit einiger Berechtigung als rein bezeichnen will, so muss ihr Zustand laufend mit Kulturtests und im Mikroskop kontrolliert werden. Für die routinemässige Kontrolle beim jeweiligen Öffnen der Kulturgefässe sind jene Bakteriensubstrate geeignet, die einem möglichst breiten Organismenspektrum ein Wachstum erlauben. In der hier

beschriebenen Arbeit dienten der TGE-Agar und das halbflüssige Thio- glykolatmedium zu diesem vorläufigen Test. Der Stamm 51R wurde je- weils unter solcher Kontrolle in rund 20 Parallelserien überimpft, wobei bei jeder Öffnung der Erlenmeyerkolben trotz allen Vorsichtsmassnahmen etwa 10% der Kolben als neu verunreinigt ausgeschieden werden mussten.

Darüber hinaus wurde der Stamm aber vierteljährlich einmal einer er- weiterten Prüfung unterzogen, wobei auch Selektivmedien für besondere Mikroorganismengruppen, die allenfalls eine Rolle als Verunreinigung spielen könnten, zur Verwendung kamen (z. B. solche für denitrifizierende Bakterien, für N₂-fixierende und für Rhizophidien). Diese im folgenden be- schriebenen Medien blieben nach Impfung mit einer Öse der zu prüfenden *O.-rubescens*-Kultur während 3 Monaten im 25°-Thermostat. Sofern sich während dieser Zeit in allen Substraten weder makroskopisch noch mikros- kopisch irgendwelche Bakterienentwicklung entdecken liess, durfte das Material mit guten Gründen als praktisch bakterienfrei angesehen werden.

Testmedienserie T für erweiterte Reinheitsprüfung (Bebrütung normalerweise bei 25°C während 3 Monaten).

T 1 Feste Substrate

Abkürzungen:

- R Schrägagarröhrchen: 5 ml Substrat in bakt. Reagenzgläsern, Stopfen aus roher Watte; vor dem Schräglegen im Autoklav sterilisiert.
- P Petrischalen: Gusskulturen mit 10 ml Agar, gemischt bei 45°C, umgekehrt bebrütet.
- Pyr. Pyrogallolverschluss mit Gummistopfen (s. S. 18).
- T 1.1* *Tryptone Glucose Extract Agar Difco* (R)
- T 1.2* *Nutrient Agar Difco* (R)
- T 1.3* *Nutrient Gelatin Difco* (P, nur eine Woche bei 20°C).
- T 1.4* *Kaseinat-Agar* (R, TAYLOR [160]).
Pepton BDH 0,5 g, Na-Caseinat 0,5 g, lösliche Stärke 0,5 g, Glycerin 1 ml, K₂HPO₄ 0,2 g, MgSO₄·7 H₂O 0,05 g, FeCl₃·6 H₂O Spur, Agar 15 g, dest. Wasser ad 1000 ml.
- T 1.5* *Fleischextrakt-Pepton-Agar* (R, FOGG [45]).
Fleischextrakt «Lemco» 3 g, Pepton (bact.) BDH 10 g, NaCl 5 g, Agar 15 g, dest. Wasser ad 1000 ml, auf Phenolphthalein neutralisiert.
- T 1.6* *Rohrzucker-Nitrat-Erdextrakt-Agar* (R, DE [31]).
Rohrzucker 10 g, KNO₃ 0,2 g, MgSO₄·7 H₂O 0,2 g, K₂HPO₄ 0,2 g, CaCl₂·6 H₂O 0,1 g, FeCl₃·6 H₂O (1%) 2 Tropfen, Erdextrakt 40 ml, Agar 15 g, dest. Wasser ad 1000 ml.

- T 1.7 *Albuminat-Glukose-Agar* (R, FOGG [45]).
Eieralbumin, pulv., 0,25 g, K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4$ 0,2 g, Glukose 10 g, $Fe_2(SO_4)_3$ Spur, Agar 15 g, dest. Wasser ad 1000 ml; das Albumin wird mit dest. Wasser angerührt und mit 0,1-n NaOH versetzt bis zur schwachen Rosafärbung mit Phenolphthalein. Dies wird unter Rühren zu den übrigen zusammen mit Agar erhitzten und gelösten Bestandteilen gefügt.
- T 1.8 *Algenextrakt-Glukose-Agar* (R, DE [31]).
Algenextrakt¹³) 400 ml, Glukose 2 g, K_2HPO_4 0,4 g, Agar 15 g, dest. Wasser ad 1000 ml.
- T 1.9 *Nährboden für Denitrifikanten* (R + Pyr., KLUYVER und VERHOEVEN [95]).
Pepton Witte 10 g, KNO_3 10 g, Glukose 10 g, Agar 15 g, dest. Wasser ad 1000 ml, pH 7,0 bis 7,5.
- T 1.10 *Phykomyzeten-Agar* (P, WHIFFEN [182]).
Maltose 1,2 g, Pepton Witte 0,08 g, K_2HPO_4 0,3 g, KH_2PO_4 0,2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 0,1 g, $CaCl_2 \cdot 3 H_2O$ 0,1 g, $FeCl_2 \cdot 4 H_2O$ 0,01 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mg, Agar 6 g, dest. Wasser ad 1000 ml.
- T 1.11 *Rhizopidien-Agar* (P, GAERTNER [55]).
Biomalz 2g, Pepton Witte 1 g, Agar 0,8 g, dest. Wasser ad 1000 ml.

T 2 Flüssige Substrate

(je 5 ml in bakt. Reagenzgläsern mit Rohwattestopfen)

- T 2.1 *Fluid Thioglycollate Medium Difco*
- T 2.2 *Z-Lösung mit Hefeextrakt und Pepton.*
Nährlösung Z (S. 116) ohne Soda, mit Bacto Yeast Extract Difco (5 g/l) und Proteose Peptone Difco (5 g/l), pH 7,0–7,5.
- T 2.3 *Z-Bikarbonat-Lösung mit Hefeextrakt und Pepton*
wie T 2.2, zusätzlich $NaHCO_3$ (1,68 g/l = 20 mM/l), pH 8,0 bis 8,5.
- T 2.4 *Z-Lösung mit Hefeextrakt, Pepton und Glukose*
wie T 2.2, zusätzlich Glukose (20 g/l), pH = 7,0 bis 7,5.
- T 2.5 *Z-Bikarbonat-Lösung mit Hefeextrakt, Pepton und Glukose*
wie T 2.3, zusätzlich Glukose (20 g/l), pH 8,0 bis 8,5.
- T 2.6 *Robrzucker-Nitrat-Erdextrakt-Nährlösung* (DE [31])
wie T 1.6, jedoch ohne Agar.
- T 2.7 *Lackmusmilch* (als Testmedium verwendet von FOGG [45]).
- T 2.8 *Glukose-Pepton-Nährlösung* (FOGG [45]).
Glukose 10 g, Proteose-Peptone Difco 10 g, dest. H_2O ad 1 L.
- T 2.9 *Trypton-Nährlösung* (FOGG [45]).
Bacto Tryptone Difco 10 g/l.
- T 2.10 *Azotobacter-Nährlösung* (FOGG [45]).
Mannit 20 g, K_2HPO_4 0,2 g, Brunnenwasser ad 1000 ml.
- T 2.11 *Nährlösung für Denitrifikanten* (KLUYVER und VERHOEVEN [95])
wie T 1.9, jedoch ohne Agar, ohne Pyrogallolverschluss.

¹³) Algenextrakt: ca. 100 g *O.-rubescens*-Material aus rasch wachsenden Kulturen werden mit 500 ml dest. Wasser autoklaviert, der Extrakt filtriert und wieder sterilisiert.

IV. Ernährungsphysiologische Versuche im Hinblick auf autökologische Fragen

A. QUALITATIVE UNTERSUCHUNGEN

Ein Überblick über die verschiedenen Arbeitsgänge, die zur erfolgreichen Reinkultivierung des *O.-rubescens*-Stammes 51R geführt haben, lässt bereits einige vorläufige Schlüsse bezüglich der ernährungsphysiologischen Verhältnisse bei dieser Blaualge ziehen. Der Energiebedarf wird offenbar hauptsächlich durch Ausnützung der Lichtenergie gedeckt, wobei vor allem anorganische Wasserstoffdonatoren beteiligt sind. Die Hauptbestandteile der Z-Nährlösungen sind anorganischer Natur, und EDTA in geringer Konzentration ist der einzige organische Zusatz. Selbst sehr geringe Impfmengen – einzelne Fäden – vermögen sich in diesen Medien zu entwickeln. Mit guten Gründen wird man darum hier von *Photolithotrophie* sprechen. Diese Charakterisierung in bezug auf die Deckung des Energiebedarfes ist allerdings noch genauer zu überprüfen, weil schliesslich in den bisher angestellten Versuchen mit der EDTA und den Agarstückchen, die den Einzelfäden als Unterlage dienten, immer organische Stoffe in geringen Mengen ins Substrat gebracht wurden.

Zur Frage der Fähigkeit zum Synthetisieren von wesentlichen Bau- und Betriebstoffen kann vermutet werden, dass *O. rubescens* auf keinerlei äussere Zufuhr von organischen Stoffen angewiesen ist, wobei vorläufig noch die obenerwähnten Einschränkungen gelten. Es dürfte sich aber mit grosser Wahrscheinlichkeit um *Autotrophie sensu stricto* handeln, sind doch in der Lösung Z nur oxydierte Stickstoffquellen verfügbar. Während gut zweijähriger Kultivierung sind keine Anzeichen von Mangelerscheinungen aufgetreten. Allerdings müssen auch hier noch einige weitere Bedenken – vor allem wegen der Qualität des destillierten Wassers – beiseite geschafft werden, bevor die untersuchte Blaualgenart auch in dieser Beziehung vergleichend physiologisch richtig charakterisiert werden kann.

All das sind Fragen, die grundsätzlich mit qualitativen Experimenten gelöst werden können. Die hohen Anforderungen an die Qualität des Impfmaterials sind bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben worden: Für alle hier angestellten Untersuchungen werden nur Ergebnisse von Versuchen verwertet, bei denen sowohl das Impfmateriale (51R) als auch die ausgewachsenen Kulturen nach den dort aufgestellten Kriterien als praktisch bakterienfrei bezeichnet werden dürfen.

I. Photoorganotrophie und Auxoheterotrophie

Organische Verbindungen als Wasserstoffdonatoren oder Wuchsstofflieferanten mussten nun also in leicht modifizierten Z-Substraten vollkommen ausgeschlossen werden. Es wurde doppelt destilliertes, in sterilen Flaschen aufgefangenes Wasser (S. 95) verwendet, und alle Kulturgefäße, Pipetten und dergleichen durchliefen den erweiterten Reinigungsvorgang (S. 94). Anstelle des Eisen-EDTA-Komplexes wurde FeSO_4 (gelöst in 0,1-N HCl) zugesetzt (0,01 mM/l), und zwar einerseits vor dem Sterilisieren der Lösung, andererseits steril nach dem Autoklavieren der übrigen Bestandteile (im erstgenannten Fall musste ein grosser Teil des Eisens beim Erhitzen ausgefällt werden). Um bei der Impfung das Einschleppen von Agar zu vermeiden (selbst der hochwertige Difco-Agar enthält ja nach ROBBINS [143] Biotin und Spuren von Thiamin), wurden nur Suspensionen von gewaschenen Fäden in der entsprechenden Nährlösung mit einer Platinöse geimpft.

Pro Erlenmeyerkolben (200 ml) wurden jeweils auf 50 ml Nährlösung 10 bis 100 *O.-rubescens*-Fäden geimpft. Das Wachstum der Kulturen wurde innert 14 Tagen sichtbar. Nach einem Monat (1500 Lux, 20–23°C) waren die Kulturen ausgewachsen und konnten wieder überimpft werden. Nach dreimaliger Überimpfung auf dieses mit besonderen Vorsichtsmassnahmen gereinigte Substrat war noch kein Nachlassen der Wachstumsgeschwindigkeit zu bemerken. Es wurde aber doch noch ein vergleichender Versuch angestellt, der zeigen sollte, ob gewisse organische Zusätze den Beginn des Wachstums beschleunigen könnten – eventuell nur durch indirekte Wirkung als Komplexbildner.

Tab. 15 gibt Auskunft über die Ergebnisse dieses Versuchs: Die Pepton-, Hefeextrakt- und Vitaminzusätze beschleunigten in keinem Fall das Anfangswachstum im Vergleich mit jenem im Grundsubstrat. Grössere Zusätze (1 g/l Pepton, 1 g/l Hefeextrakt, 100 ml/l Vitaminmischung S3) vermochten das Wachstum sogar ganz zu hemmen. *O. rubescens* ist demnach bei phototropher Lebensweise nicht auf organische Wasserstoffdonatoren angewiesen, vermag ohne äussere Zufuhr von Vitaminen normal zu wachsen und darf daher als *photolithoautotroph (sensu stricto)* bezeichnet werden. Photoorganotrophie und Auxoheterotrophie konnten mit den hier verwendeten Methoden bei Stamm 51 R nicht festgestellt werden.

Mit Hinsicht auf die eingangs aufgeworfenen autökologischen Fragen ist daher zu sagen, dass mit grosser Wahrscheinlichkeit organische Nährstoffe und Vitamine in den Seen nicht direkt für das Ausmass des phototrophen *O.-rubescens*-Wachstums verantwortlich sind.

2. Chemotrophie

Es ist eine kleine Gruppe von fakultativ oder obligat chemoorganotroph lebenden Blaualgen bekannt. *Nostoc punctiforme* (HARDER [66], WINTER [185]), *Nostoc muscorum* (ALLISON, HOOVER und MORRIS [7]) und *Cylindrospermum* sp. (WEBSTER [180]) gehören dazu. Diese Organismen finden sich vor allem in Biotopen, die schwach belichtet, aber reich an organischen Stoffen sind. Die Pigmentierung muss nicht unbedingt wegfallen. Es wäre durchaus denkbar, dass *O. rubescens*, die ja als Schwachlichtform angesehen wird, wenigstens fakultativ chemoorganotroph einen Teil ihres Energiebedarfes aus chemischen Umsetzungen decken könnte. Wie auf S. 7 erörtert worden ist, wären die Voraussetzungen dafür in vielen Gewässern gegeben. Zwar werden nur verhältnismässig geringe Konzentrationen von organischen Stoffen überhaupt ertragen. Immerhin durfte versucht werden, ob der Stamm 51R mit einigen verschiedenen organischen Stoffen nach langsamer Akklimatisierung chemotroph wachsen könnte. Zum Substrat Z 8 (mit 10 mM/l NaHCO_3 statt Na_2CO_3) wurden je 0,01% Glukose, Galaktose, Maltose, Rohrzucker, Stärke, Zitronensäure (welche alle von HARDER [66] schon bei *Nostoc punctiforme* mit Erfolg verwendet worden waren), Fruktose, Mannit und Glycerin (nach ALLEN [3] von ihrer «acid tolerant alga» unter anderen Stoffen für Wachstum im Dunkeln ausnützlich) zugesetzt. Bei 1500 Lux wuchsen die Oszillatorien in allen diesen Substraten normal. Die erste Überimpfung wurde bei 500 Lux, die zweite bei 50 Lux aufgestellt. Dabei färbten sich die Kulturen immer dunkler und wuchsen langsamer. In der dritten Überimpfung, im abgeschlossenen Thermostaten aufgestellt (20°C), entwickelte sich innert einem Monat praktisch nichts, und die Färbung der Oszillatorien verblasste. Sobald die Kulturen aber wieder ans Licht (500 Lux) kamen, wuchsen sie alle innert 14 Tagen wieder an. Die Zusätze hatten also nicht toxisch gewirkt, aber kein Wachstum in der Dunkelheit ermöglichen können.

Wenn man wieder an autökologische Probleme denkt, so ist hier festzustellen, dass nach solchen Experimenten *O. rubescens* offenbar obligat an phototrophe Lebensweise gebunden ist und daher in den Seen nicht in beliebige Tiefen absteigen kann. Nach der Tiefe wird also der Lichtfaktor den Lebensraum unbedingt begrenzen, und es steht damit auch in Zusammenhang, dass in relativ schwach besiedelten Seen (z. B. Luganersee) das *Oscillatoriamaximum* tiefer liegen kann (z. B. 10 bis 12 m unter der Oberfläche) als in stark besiedelten, beispielsweise im Burgäschisee (Kanton Solothurn), wo es sich in rund 5 m Tiefe findet. Bei dichter Besiedlung wird ja ober-

Tabelle 15

Wachstum der O.-rubescens-Reinkultur 51 R in modifizierten Substraten mit organischen Zusätzen. Impfung mit je 10 bis 100 Fäden pro 50 ml Lösung in Erlenmeyerkolben (200 ml); 1500 Lux, 20–23°C; je 4 Parallelkulturen mit 4 verschiedenen Impfmaterialien von unterschiedlichem Alter. Beurteilung des Wachstums durch Vergleich mit fixierten Suspensionen von bestimmter Konzentration: — = kein Wachstum, + = 5–10 mg/l Algen-Trockengewicht, ++ = 25–75 mg/l Algen-Trockengewicht, +++ = 100 und mehr mg/l Algen-Trockengewicht. Grundsubstrat = Nährlösung Z8 (S. 116) mit 10 mM/l NaHCO₃ statt Soda, ohne Eisenzusatz.

| Zusammensetzung der Nährlösung | Zusatz | Eisenkomponenten | | | | | | |
|--|-----------|-----------------------|--------|--------|---------------------------------|--------|--------|-----|
| | | Fe-EDTA ¹⁾ | | | FeSO ₄ ²⁾ | | | |
| | | 7 Tg. | 14 Tg. | 30 Tg. | 7 Tg. | 14 Tg. | 30 Tg. | |
| Grundsubstrat | — | ++ | +++ | +++ | + | ++ | +++ | |
| Grundsubstrat + Pepton (Proteose Pepton Difco) | 1 mg/l | ++ | +++ | +++ | + | + | ++ | |
| | 10 mg/l | ++ | +++ | +++ | + | + | ++ | |
| | 100 mg/l | ++ | +++ | +++ | + | + | + | |
| | 1000 mg/l | — | — | — | — | — | — | |
| Grundsubstrat + Hefeextrakt (Yeast Extract Difco) | 1 mg/l | + | ++ | +++ | + | ++ | +++ | |
| | 10 mg/l | ++ | +++ | +++ | + | ++ | +++ | |
| | 100 mg/l | ++ | +++ | +++ | — | — | — | |
| | 1000 mg/l | — | — | — | — | — | — | |
| Grundsubstrat + Vitamin B ₁₂ ³⁾ | γ/l | 0,01 | + | ++ | +++ | + | ++ | +++ |
| | 0,1 | + | + | ++ | +++ | + | + | ++ |
| | 1 | + | + | ++ | +++ | + | ++ | ++ |
| | 10 | + | + | ++ | +++ | + | ++ | ++ |
| Grundsubstrat + Vitaminmischung S3 ⁴⁾ | ml/l | 0,1 | ++ | +++ | +++ | + | ++ | +++ |
| | 1 | + | +++ | +++ | + | ++ | ++ | |
| | 10 | + | ++ | +++ | + | ++ | +++ | |
| | 100 | — | — | — | — | — | — | |

¹⁾ Fe-EDTA: Normaler Fe-EDTA-Komplex-Zusatz wie für Z8 (0,01 mM/l)

²⁾ FeSO₄·7 H₂O, gelöst in HCl 0,1 N. Steriler Zusatz nach dem Autoklavieren (0,01mM/l).

³⁾ Vitamin B₁₂: Steriler Zusatz zu den fertigen Grundsubstraten.

⁴⁾ Vitamin-Mischung S3 nach PROVASOLI, McLAUGHLIN und DROOP [139] (steril zugesetzt nach Autoklavieren): 1 ml der Mischung enthält: Thiamin. HCl 0,05 mg, Nikotinsäure 0,01 mg, Kalziumpantothenat 0,01 mg, p-Aminobenzoesäure 1,0 γ, (+)-Biotin 0,1 γ, m-Inosit 0,5 mg, Folsäure 0,2 γ, Thymidin 0,3 mg.

flächlich mehr Licht absorbiert, die euphotische Zone reicht weniger tief hinab als in spärlicheren Planktonbeständen. Überdies darf man noch viel allgemeiner sagen: der experimentelle Nachweis obligater Phototrophie unterstützt die früher schon von anderen Autoren vertretene Ansicht, dass das *Oscillatoria* maximum in den Seen lichtabhängig sei (FINDENEGG, [40, 41], THOMAS [165]), und er rechtfertigt eine exakte qualitative und quantitative Untersuchung der Lichtansprüche dieses Organismus *in situ*.

3. Organische Stickstoffquellen

Der *O.-rubescens*-Stamm 51 R, in stickstofffreie Nährlösung geimpft (Z8 ohne NaNO_3 , mit CaCl_2 statt $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) stellte schon nach etwa 10 Tagen das Wachstum ein. Weiterimpfungen auf modifizierte Z-Substrate (ohne Nitrate, mit 10 mM/l NaHCO_3 statt Na_2CO_3) mit Zusätzen von je 100 mg/l Kasein-Hydrolysat, Natriumkaseinat, Harnstoff, Pepton Witte und Asparagin kamen nicht zum Wachstum, und zwar weder belichtet noch im Dunkeln. Nur NaNO_3 , KNO_3 und NH_4Cl (je 2,5 mM/l) liessen bei normaler Beleuchtung eine Weiterentwicklung in Gang kommen.

Der untersuchte *Oscillatoria*stamm ist nach diesen Experimenten in bezug auf die Stickstoffquellen als obligat autotroph anzusehen. Welche der anorganischen Stickstoffkomponenten aber rascher aufgenommen und verarbeitet werden, ob das NO_3^- - oder das NH_4^+ -Ion, müsste mit einer verfeinerten quantitativen Methode untersucht werden, was mit dem Stamm 51 R nicht möglich war.

4. Fixierung von Luftstickstoff

Bei den bereits auf S. 108 erwähnten Blaualgen, die gasförmigen Stickstoff zu assimilieren vermögen, ist die phototrophe Lebensweise der Normalfall. Stickstoffmangelkulturen des *O.-rubescens*-Stammes 51 R, die auf feste N-freie Substrate geimpft wurden, zeigten keinerlei Entwicklung. NaNO_3 -Lösung, tropfenweise auf die Agaroberfläche gesetzt, förderte dann örtlich rasches Wachstum. In flüssigem N-freiem Medium konnte auch bei guter Turbulenz in den Kolben auf der Schüttelmaschine kein Wachstum in Gang gebracht werden, wenn nicht gebundener Stickstoff als NaNO_3 -Lösung zugefügt wurde. Diese Verhältnisse werden im Abschnitt B quantitativ noch genauer untersucht (S. 170).

Die Möglichkeit der N_2 -Fixierung unter chemotrophen Bedingungen mit Glukose oder Fruktose als Wasserstoffdonatoren musste immerhin auch noch in Betracht gezogen werden (WINTER [185] bei *Nostoc punctiforme*, ALLISON, HOOVER und MORRIS [7] bei *N. muscorum*). Modifizierte Z-Lösungen (N-frei) mit Zusätzen von je 0,01% Glukose und Fruktose führten sowohl bei Flüssigkeitskulturen wie auch unter Zusatz von 1,5% Agar (in Erlenmeyerkolben) – ob hell oder dunkel gestellt – nur zu negativen Resultaten. NaNO_3 -Lösungen, die 14 Tage nach der Impfung zugefügt wurden, veranlassten die Organismen bald sich zu vermehren, erstaunlicherweise auch auf den festen Substraten, ja sogar auf den inzwischen dunkelgestellten, die doch schon leicht vertrocknet sein mussten. Die

Kohlehydrate hatten also nicht toxisch gewirkt, aber die N_2 -fixierung nicht ermöglicht.

Somit verfügt *O. rubescens* wohl weder photo- noch chemotroph über die Fähigkeit zur Stickstoffassimilation. In den Gewässern steht die Luft als unerschöpfliches Stickstoffreservoir diesem Organismus also nicht direkt ausnützbar zur Verfügung. Seiner Entwicklung wird daher nach Massgabe der gebunden vorliegenden Stickstoffkomponenten eine Grenze gesetzt sein.

B. QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN

Wenn mit Algenkulturen einigermaßen rationell quantitativ gearbeitet werden soll, so ist gleichmässige Verteilung der Zellen oder Kolonien in der Suspension eine wesentliche Voraussetzung. Vorteilhaft ist ferner eine geringe Zell- oder Koloniegrösse. Diese Bedingungen sind bei fädigen Algen von der Grösse wie *O. rubescens* nicht oder nur teilweise erfüllt. Im bakterienfreien Stamm 51 R ist ausserdem eine besondere Eigenschaft, die bei bakteriell verunreinigten Kulturen viel weniger ins Gewicht fällt, sehr lästig geworden: Die Fäden kleben zusammen zu Bündeln, Ballen und breiten Bändern. Ganz offensichtlich werden in diesen Reinkulturen die von den Zellen ausgeschiedenen Schleimsubstanzen nicht abgebaut, häufen sich an und haben das geschilderte makroskopische Bild zur Folge. GERLOFF und SKOOG [59] bemerken ja ganz ähnliche Verhältnisse bei *Microcystis aeruginosa* in Reinkultur. Mit solchem Ausgangsmaterial ist aber eine gleichmässige Impfung einer Reihe von Kolben nicht gut möglich, und die Entwicklung von Parallelkulturen geht anfänglich so ungleich vonstatten, dass eine sehr grosse Anzahl von Parallelen benötigt würde, wollte man repräsentative Durchschnittswerte bekommen.

Eine Reihe von Versuchen, den Stamm 51 R besser in der Lösung verteilt zu kultivieren (mit Schütteln, Belüften, bei verschiedenen physikalischen und chemischen Umweltbedingungen), schlug fehl, und es musste von quantitativen ernährungsphysiologischen Experimenten mit Reinkulturen vorläufig abgesehen werden.

Klonkulturen mit Begleitbakterien können aber unter bestimmten Voraussetzungen so kultiviert werden, dass sie eine Suspension von kurzen, nicht zusammengeklebten, beim Schütteln gut verteilbaren Algenfäden bilden. Wenn es um die Abklärung von ernährungsphysiologischen Fragen geht, wo die Bakterien nicht interferieren können, so ist es vernünftiger, mit solchen Biozönosen zu arbeiten. Hier sind ja die Bakterien massenmässig gegenüber den Algen ganz ohne Bedeutung. Bei *O.-rubescens*-Kultu-

ren in anorganischen Medien, besonders bei rasch wachsenden Populationen, machen sich die Begleitbakterien sogar im mikroskopischen Bild kaum bemerkbar.

Für die hier beschriebenen quantitativen Untersuchungen sind aus diesen Gründen die bakterienhaltigen Klonkulturen benützt worden. Fehler in den Schlussfolgerungen, die auf die Tätigkeit der Bakterien zurückgeführt werden könnten, werden in den einzelnen Unterabschnitten berücksichtigt. Der damit verbundene Nachteil fällt gegenüber dem grossen Vorteil, welcher die gleichmässigen Suspensionen mit sich bringen, nicht ins Gewicht.

1. Spezielle Methoden

Das Vorgehen bei experimentell physiologischen Arbeiten mit ökologischer Fragestellung muss sich von ähnlichen Untersuchungen, wo es z. B. um die praktische Auswertung eines Stoffwechselprodukts geht, grundlegend unterscheiden. Die Kulturmethoden, welche für optimale Ausbeuten von *Microcystis*antibiotika entwickelt worden sind, werden daher nicht unbedingt tauglich sein zur experimentellen Untersuchung derjenigen Faktoren, welche in Seen das *Microcystis*wachstum begrenzen. Im ersten Falle braucht man möglichst raschwachsende Kulturen, im zweiten dagegen natürliche Wachstumsgeschwindigkeiten, geringe Zelldichten bei schwachen Nährstoff- u. Pufferkonzentrationen, aber trotzdem relativ stabilen Bedingungen.

Zweifellos kommt die kontinuierliche Kultur mit automatisch konstant gehaltener, photometrisch kontrollierter Zellen- oder Koloniedichte den naturgegebenen Verhältnissen am nächsten (vgl. S. 106), wird doch auch am natürlichen Standort das Nährmedium laufend erneuert, während abgestorbene Zellen sedimentiert und dank der Turbulenz Konzentrationen ausgeglichen werden. Nach dem Volumen der pro Zeiteinheit notwendigen Nährlösungszufuhr bekommt man im Experiment ein gutes Mass für die Vermehrung der Zellen bei konstanten Bedingungen.

Mit *O. rubescens* wurden zur Einführung von kontinuierlichen Kulturen grosse Anstrengungen unternommen, die allerdings noch nicht befriedigend abgeschlossen werden konnten. Viele Experimente, die in dieser Richtung angestellt wurden, müssen daher in den folgenden Abschnitten vorläufig mit einigen kurzen Hinweisen abgetan werden.

a) Temperatur

Die vorhandenen Einrichtungen ermöglichten lediglich eine grobe Orientierung über den Temperatureinfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit

der *O.-rubescens*-Kulturen. Danach entwickelten sich die Klone 55 und 65 in Nährlösung Z9 mit 500, 1000 bzw. 1500 Lux Beleuchtungsstärke bei $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ deutlich rascher als bei 15 ± 1 und auch etwas besser als bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Bei $30 \pm 1^\circ\text{C}$ kam überhaupt keine Vermehrung der Zellen in Gang. Bei dieser hohen Temperatur könnten aber die Bakterien so stark gefördert worden sein, dass sie das Wachstum der Algen, die vielleicht an sich noch teilungsfähig gewesen wären, schon im Keime erstickten. Der Versuch wurde daher mit dem bakterienfreien Stamm 51R wiederholt. Auch hier zeigte sich jedoch bei der hohen Temperatur von 30°C überhaupt keine Entwicklung; dagegen wuchsen die Kulturen bei 25°C eher rascher als jene bei 20°C . Die 15° -Kulturen fielen noch weiter stark ab. Diese Verhältnisse veränderten sich auch bei zweimaliger Überimpfung, wo also eine Akklimatisation gegeben war, nicht.

Es scheint demnach ein Entwicklungsoptimum zwischen 20 und 25°C zu liegen. Eingehendere quantitative Temperaturversuche wurden nicht angestellt, da die in ökologischer Hinsicht interessant erscheinenden Temperaturbereiche zwischen 5 und 15°C nicht exakt eingehalten werden konnten.

b) Beleuchtung

Auch mit der Bestimmung eines Beleuchtungsoptimums oder eines Lichtsättigungswertes konnten noch keine exakten quantitativen Angaben ermittelt werden. Offenbar tritt Lichtsättigung nach Massgabe der Vermehrungsgeschwindigkeit zwar erst bei mehr als 2000 Lux ein; die Pigmentierung der Algen verändert sich bei dieser starken Beleuchtung aber schon so stark, dass *O. rubescens* kaum wiederzuerkennen ist: die Fäden werden blass gelblichgrün. Eine vernünftige Untersuchung der Lichtabhängigkeit – bezüglich Qualität und Quantität – wird sich daher nur mit parallel geführten quantitativen Pigmentbestimmungen sowohl in den Kulturen als auch am natürlichen Standort durchführen lassen, was in der vorliegenden Arbeit noch nicht in die Wege geleitet wurde. Mit der Beleuchtungsstärke von rund 1500 Lux, gemessen an der Oberfläche der Kulturen, färbten sich die Kolonien zwar schon ziemlich hellbraun, ohne aber die charakteristische Bildung akzessorischer Pigmente ganz einzustellen. Diese Beleuchtung blieb daher für alle quantitativen Experimente beibehalten.

c) Schütteln und Rühren

Regelmässiges, dauerndes Schütteln der Kulturkolben auf der Schüttelmaschine führt oft zu gleichmässiger Verteilung relativ kurzer *Oscillatoria*-

fäden im flüssigen Substrat. Ganz unkontrollierbar, besonders in Mangelkulturen (z. B. in N-freier Lösung), ballten sich aber ganze Aggregate von Oszillatorien zusammen. In parallelgeführten Kulturkolben, die täglich nur einmal geschüttelt wurden, trat diese Erscheinung nicht auf: wenn sich auch die Fäden tagsüber am Boden langsam absetzten, so liessen sie sich doch jedesmal beim Schütteln wieder gut suspendieren. Nachdem sich in verschiedenen Versuchsanordnungen entsprechende Beobachtungen machen lassen, wurde dem täglich einmaligen Schütteln gegenüber ständiger Bewegung auf der Schüttelmaschine der Vorzug gegeben.

Probeweise wurden dann auch noch Rührwerke im Dauerbetrieb eingesetzt. Magnetrührer (Länge 1,5 cm, in Glas eingeschmolzen), mit dem Substrat Z₉ in Nährbodenflaschen (500 ml) sterilisiert, von aussen her mittels eines rotierenden Magneten bewegt, brachten Turbulenz in das Medium, schädigten die Fäden aber auch bei sehr langsamer Bewegung durch mechanische Beanspruchung so stark, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Population deutlich hinter derjenigen von täglich nur einmal geschüttelten Kolbenkulturen zurücklag.

d) *Belüftung*

Es wird von verschiedenen Forschern die Ansicht vertreten, in stehenden Flüssigkeitskulturen mit Wattestopfen werde der Kohlenstoff bald wachstumsbegrenzend, und man bestimme eigentlich mit den Vermehrungsraten in diesen Gefässen indirekt die Luftdurchlässigkeit der Stopfen. Das Einleiten von Luft oder eines Luft-CO₂-Gemisches würde daher die Wachstumsgeschwindigkeit direkt fördern.

Versuche in dieser Richtung mit belüfteten Nährbodenflaschen und röhrenförmigen Gefässen mit 3 cm Durchmesser führten zu keinem vollkommen befriedigenden Ergebnis. Zwar entwickelten sich die Kulturen zu grösserer Zelldichte (über 1 g/l Trockengewicht in einem Monat) als in einfachen Erlenmeyerkolben ohne Belüftung. Die relative Wachstumsrate blieb aber im gleichen Rahmen und kam höchstens auf 0,1 log₁₀-Einheiten pro Tag. Ausserdem traten bei vielen Kulturgefässen lästige Zusammenballungen von Algen mit Bakterien auf. Auch bei erhöhter CO₂-Konzentration (0,5 Vol. % CO₂ in Luft) und in Nährlösungen ähnlich denjenigen von KRATZ und MYERS [97] – die ja bei verschiedenen Blaualgen ausserordentlich hohe Wachstumsgeschwindigkeiten ermöglicht hatten – steigerte sich die Vermehrungsgeschwindigkeit nicht. Verstärkte Beleuchtung (3000 Lux) vermochte die Vermehrung in den ersten Tagen nur un-

wesentlich zu beschleunigen, hatte dann aber starke Zusammenballungen der hellgrünen Algen zur Folge.

Die Vermutung, das unbefriedigende Resultat dieser Bemühungen könnte auf zu tiefe pH-Werte – als Folge des vermehrten CO₂-Eintrags – zurückzuführen sein, erwies sich als unbegründet. Normalerweise hielt sich der pH-Wert bei gewöhnlicher Belüftung um 7,9 bis 8,1 (Substrat Z 8 mit 1 mM/l NaHCO₃ statt Soda). Bei 0,5% CO₂-Zudosierung sank der Wert auf 7,2 bis 7,4. Ausgerechnet in diesen Kulturen kam aber gutes Wachstum in Gang, während es oft bei normaler Belüftung, also bei pH-Werten um 8, sehr unregelmässig war.

Offenbar muss eine relative Wachstumsrate in der Höhe von 0,1 log₁₀-Einheiten pro Tag (Generationszeit rund 3 Tage) für *O. rubescens* bereits als hoch angesehen werden. Im Vergleich mit anderen Blaualgen ist diese Vermehrungsgeschwindigkeit sehr gering, kommen doch *Nostoc muscorum* z. B. auf 0,5, *Anabaena variabilis* auf 0,7, *Anacystis nidulans* auf 0,9 (bei 25°C) bis 3,5 (bei 41°C) log₁₀-Einheiten pro Tag (KRATZ und MYERS [97]).

2. Kalium und Natrium

Es wird heute allgemein anerkannt, dass für alle Algen ausser C, H und O die Elemente N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Zn, Mn und Cu unentbehrlich sind (KRAUSS [99]). Bei 12 Gattungen von Blaualgen scheint K durch Na ersetzbar zu sein (ALLEN [3]). Die Unentbehrlichkeit von Na ist mit sehr gut kontrollierten Untersuchungsmethoden für *Anabaena cylindrica* (ALLEN und ARNON [6]) und *Nostoc muscorum* (KRATZ und MYERS [97]) gezeigt worden. Es sind dabei Na-Konzentrationen in der Grössenordnung von 5 mg/l für gutes Wachstum notwendig. FOGG [48] vertritt in einem vergleichend physiologischen Überblick unter Berücksichtigung noch weiterer einschlägiger experimenteller Arbeiten die Ansicht, dass der Na-Bedarf wahrscheinlich ein allgemein für Blaualgen typisches ernährungsphysiologisches Merkmal sei.

Wie schon erwähnt (S. 85), gibt diese Eigentümlichkeit auch zu wichtigen ökologischen Fragen Anlass. Es ist nicht ausgeschlossen, dass im Überhandnehmen von Blaualgen in eutrophierten Seen eine Wirkung der Natriumanreicherung gesehen werden muss [37, 136].

In einer Serie von Experimenten mit dem bakteriell verunreinigten, aber sehr gut wachsenden *O.-rubescens*-Klon 65 wurde nun die Frage abzuklären versucht, ob Natrium auch bei diesen Kulturen in Makroquantitäten vorliegen müsse wie bei *A. cylindrica* oder ob Spuren genügen. Als Vergleich wurde der Kaliumbedarf herangezogen.

Drei Modifikationen der Nährlösung Z 8 (Tab. 16) wurden beimpft mit je 1 ml einer 14 Tage alten Kultur des Klons 65. Nach 14tägigem Wachstum in Erlenmeyerkolben (täglich nur einmal geschüttelt) war die Dichte der Kulturserie 16-2 deutlich hinter jener von Serie 16-1 zurückgeblieben. In Lösung 16-3 wuchs überhaupt nur eine ganz unbeträchtliche Oszillatormenge. Es schien auf den ersten Blick ein bedeutender Na-Mangel in der Lösung 16-2 nachweisbar zu sein. Die Fadensuspensionen aus den Lösungen 16-1 und 16-2, kurz genannt «N» (normal) und «K» (aus der «Na-freien» Nährlösung mit K als einzigem Alkalimetall in Makroquantitäten), wurden nun durch Verdünnen mit den entsprechenden Nährlösungen auf gleiche optische Dichte gebracht. Mit diesen beiden Impfmaterien wurden wiederum die gleichen Nährlösungen 16-1 bis 16-3 beschriftet (Anfangskonzentration 0,25 mg Trockengewicht pro 50 ml Nährlösung) und unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkulturen gehalten.

Tabelle 16

Modifizierte Z8-Substrate mit verschiedenen K/Na-Verhältnissen. Alle Salze in Qualität «pro analysi»; doppelt destilliertes, in sterilen Flaschen aufgefangenes Wasser; Glaswaren aus erweiterter Reinigung (S. 94), Jenaer Geräteglas 20. Angaben in mM/l.

| | 16-1 (ähnlich Z 8) | 16-2 «Na-frei» | 16-3 «K-frei» |
|--|-----------------------|-------------------|------------------|
| NaNO ₃ | 2,50 | — | 2,50 |
| KNO ₃ | — | 2,50 | — |
| Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | — | — | 0,18 |
| K ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | 0,18 | 0,18 | — |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Na ₂ CO ₃ | 0,20 | — | 0,20 |
| K ₂ CO ₃ | — | 0,20 | — |
| FeSO ₄ ¹⁾ | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Spurenelemente ²⁾ | + | + | + |

¹⁾ Gelöst in HCl 0,1 N.

²⁾ Wie bei Lösung Z 8 (S. 116).

Der Verlauf des Wachstums ist in Abb. 11 graphisch dargestellt. 7 Tage nach der Impfung waren bereits deutliche Unterschiede in der Dichte der einzelnen Serien bemerkbar. Das normale Zellmaterial in K-freier Lösung 16-3 entwickelte sich von diesem Zeitpunkt an nicht mehr weiter, während auffallenderweise im gleichen K-freien Medium die Serie mit Impfmateriel K schon am weitesten vorangeschritten war und noch normal weiterwuchs.

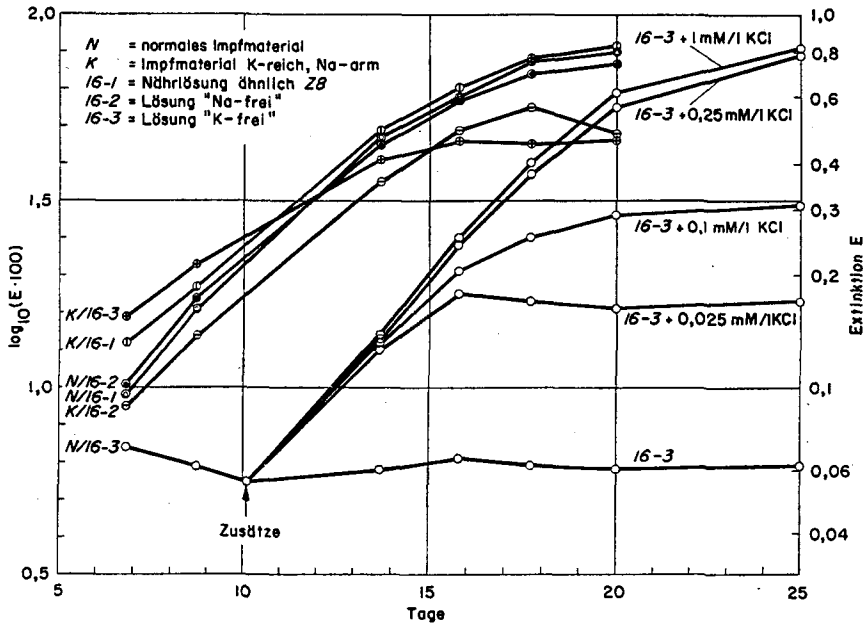


Abbildung 11

Wachstum der *O. rubescens*-Klonkultur 65 in Substraten mit verschiedenem Na/K-Verhältnis. Veränderung der optischen Dichte (Extinktion E) mit der Zeit ($\lambda = 610 \text{ m}\mu$, $z = 0,5 \text{ cm}$, Mittelwerte von 5 Parallelkulturen).

Offenbar hatte dieses Impfmateriale aus Lösung 16-2 eine ausreichende K-Reserve mitgebracht. Auch die übrigen Serien wuchsen vorerst noch gleichmässig mit einer relativen Wachstumsrate von ca. 0,1 \log_{10} -Einheiten pro Tag weiter. Nachdem die Wachstumsperiode abgeschlossen war, ergab sich folgendes Bild: die beiden normalen 16-1-Serien, sowohl mit Na-Mangelzellen als auch mit «normalen» Zellen beimpft, kamen auf E-Werte von ca. 0,8. Auch das N-Materiale in der Na-freien Lösung war beinahe gleich gut entwickelt. Dagegen fiel das Na-Mangel-Materiale, wieder in Na-freier Lösung gehalten, schon deutlich ab. Diese Zellen schienen also wirklich unter Na-Mangel zu leiden und wurden wiederum – was in Abb. 11 nicht mehr graphisch dargestellt ist, in die Lösung 16-2 überimpft. Die Entwicklung setzte normal ein, und die Kulturen wuchsen wiederum bis zu einem E-Wert von 0,6 bis 0,7. Auch in der darauffolgenden vierten Überimpfung ins Na-Mangel-Medium ergab sich das gleiche Bild. Es darf daraus geschlossen werden, dass die Natriumverunreinigungen der analysenreinen Salze ausreichen, um den Bedarf von *O. rubescens* in den Kulturen zu decken.

Allein mit 2,5 mM/l KNO_3 (Merck, p. A.) werden ja ca. 0,02 mg/l Na eingeschleppt, und es bestehen andere Natriumquellen genug, um einem Spurenelementbedarf zu genügen. Wenn auch die Erträge in den Lösungen 16-2 nicht optimal sind, so darf dies nicht ohne weiteres allein mit dem Natriummangel in Zusammenhang gebracht werden, könnten doch hier die bekannten Phänomene der Ionenkonkurrenz, des Ionenantagonismus oder des Ionensynergismus massgebende Rollen spielen.

Verglichen mit diesem geringen Natriumbedarf in Mikroquantitäten ist der Kaliumanspruch von *O. rubescens* bedeutend. Wie aus Abb. II zu ersehen ist, kommt das Wachstum in der K-Mangellösung 16-3, die mit «normalen» Zellen beimpft worden ist, nach einer Woche bei einer optischen Dichte von ca. 0,07 zum Stillstand. Der Kaliumvorrat, den das Impfmateriale mitbringt, reicht also nur zu ganz unbedeutender Zellvermehrung aus. Zur Orientierung über die Frage, ob wirklich Kaliummangel das Wachstum begrenzt hatte, wurden nun Zusätze in Form von sterilen KCl-Lösungen vorgenommen. Die Vermehrung kam danach alsbald wieder in Gang, und es zeigte sich, dass 10 mg/l K genügen, um die Kulturen voll auswachsen zu lassen. Mit der zehnfachen Menge (100 mg/l K) liess sich nur noch eine unbedeutende Wachstumssteigerung erwirken.

Vorsichtig beurteilt sagt das in Abb. II dargestellte Experiment im wesentlichen folgendes aus: der Natriumbedarf von *O. rubescens* liegt in einer ganz anderen Grössenordnung als der Kaliumbedarf. Während für optimale Entwicklung unter den hier getroffenen Kulturbedingungen etwa 10 mg/l K notwendig sind, genügen die Na-Verunreinigungen der analysenreinen Salze, um die Ansprüche von *O. rubescens* zu decken. – Experimente mit weiter gereinigten Salzen zur Abklärung des Spurenelementbedarfes wurden vorläufig nicht angestellt.

3. Kalzium

Gewiss spielt Kalzium nur in seltenen Fällen in unseren Seen die Rolle eines direkt wachstumsbegrenzenden Faktors, ebensowenig wie K, Mg und Sulfat (LUND und TALLING [109]). Auf Grund vergleichend limnologischer Untersuchungen an Gewässern im Voralpengebiet ist aber gerade dem Kalzium – wenn auch vorerst nur vermutungsweise – eine gewisse ökologisch wichtige Rolle zugesprochen worden: zwei benachbarte Gewässer wie der Zürichsee und der Greifensee unterscheiden sich nämlich chemisch lediglich im Kalziumgehalt einigermassen beträchtlich, stimmen sonst aber im Gesamtcharakter chemisch gesehen weitgehend überein.

Doch der Zürichsee ist ein ausgesprochenes *Oscillatoriagewässer*, wogegen diese Blaualge im Greifensee nur eine untergeordnete Rolle spielt. (THOMAS [163], MÄRKI, mündl. Mitt.). Im erstgenannten See findet man einen durchschnittlichen CaCO_3 -Gehalt von ca. 100 mg/l (ZIMMERMANN, mündl. Mitt. nach unveröffentl. Untersuchungen des chem. Laboratoriums der Stadt Zürich in den Jahren 1948–1957), im letzteren dagegen Werte zwischen 150 und 200 mg/l CaCO_3 (MÄRKI [114]). Die experimentelle Ermittlung einer optimalen Ca-Konzentration für *O. rubescens* wäre daher gewiss auch ökologisch aufschlussreich. Die in der vorliegenden Arbeit zu dieser Frage angestellten Versuche gingen zwar eigentlich von einem rein experimentiertechnischen Problem aus: die Ausfällungen in den Z-Substraten sollten mit geringerem Ca-Gehalt der Lösungen so gut wie möglich vermindert werden, damit Messungen der optischen Dichte (E) nicht zu stark mit dem von anorganischen Trübungen herrührenden Messfehler behaftet seien.

In zwei aufeinanderfolgenden Experimenten wurde zunächst die Wirkung verschiedenen Ca-Gehaltes bei zwei verschiedenen Herstellungsarten der

Tabelle 17

Zusammensetzung von flüssigen Substraten mit verschiedenem Kalziumgehalt. Ausser den unten zusammengestellten CaCl_2 -Zusätzen enthalten alle Substrate NaNO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , Na_2CO_3 , Fe-Komplex und Spurenelemente wie Lösung Z (S. 116). Kulturkolben aus Jenaer Geräteglas G 20 aus erweiterter Reinigung; Salze in Qualität p. A.; doppelt destilliertes Wasser. *Herstellung A:* Zusammensetzen der Lösungen, Abfüllen in Erlenmeyerkolben, Sterilisieren im Autoklav. *Herstellung B:* Sterilisieren der Lösungen ohne CaCl_2 und Na_2CO_3 , Zusatz steriler CaCl_2 - und Na_2CO_3 -Lösungen nach Abkühlen.

| Substrat | CaCl_2 mM/l | Ca mg/l |
|--------------------|-------------------------|------------|
| 17-1 | 0 | 0 |
| 17-2 | 0,01 | 0,4 |
| 17-3 | 0,10 | 4,0 |
| 17-4 | 0,25 | 10,0 |
| 17-5 ¹⁾ | 1,00 | 40,0 |

¹⁾ Entspricht im Ca-Gehalt ungefähr dem Zürichseewasser.

Nährlösungen (einerseits total autoklaviert, andererseits mit sterilen CaCl_2 - und Na_2CO_3 -Zusätzen nach Sterilisieren der übrigen Bestandteile) untersucht, dann aber auch der Effekt des Schüttelns in Betracht gezogen.

Die verwendeten Nährlösungen werden in Tab. 17 einander gegenüber-

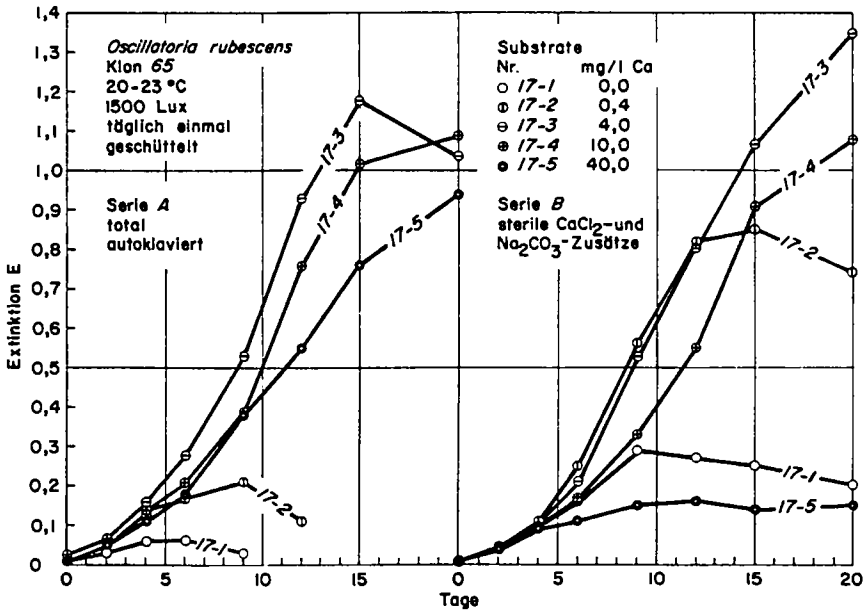


Abbildung 12

Wachstum des *O.-rubescens*-Klons 65 in Substraten mit verschiedenem Kalziumgehalt

gestellt. Die Abb. 12 und 13 veranschaulichen die Resultate der beiden Experimente. Nach Abb. 12 kommt bei beiden Serien in der Lösung 17-3 mit 4,0 mg/l Ca die grösste Algenproduktion zustande. Das Medium 17-4 bleibt nicht stark zurück, 17-5 ist aber bezüglich des Ca-Gehaltes bereits überoptimal. In Serie A wachsen die Algen darin noch ganz recht, in Serie B aber nur ganz unwesentlich. 17-5 muss in Serie B effektiv reicher an gelöstem Ca sein als in Serie A, da ja beim Autoklavieren eine beträchtliche Menge unlöslicher Ca-Salze ausfällt. Ein Gehalt von 40 mg/l Ca, wie er z. B. im Zürichsee vorkommt, wirkt somit unter den hier angeordneten Versuchsbedingungen ausgesprochen wachstumshemmend. Die Unterschiede im Herstellungsvorgang zwischen den Substratserien A und B wirken sich auch in den untersten beiden Ca-Konzentrationen deutlich aus: mit 0,4 mg/l Ca (Substrat 17-2) kann schon eine ganz beträchtliche Algenmenge produziert werden, sofern Kalzium tatsächlich echt gelöst vorliegt; wird aber ein grosser Teil davon beim Sterilisieren ausgefällt, so können sich nur noch gerade so viele Algenfäden entwickeln, wie es auch im Blindsubstrat 17-1 – das lediglich die Ca-Verunreinigungen der analysenreinen Salze enthält – bei Serie B möglich ist.

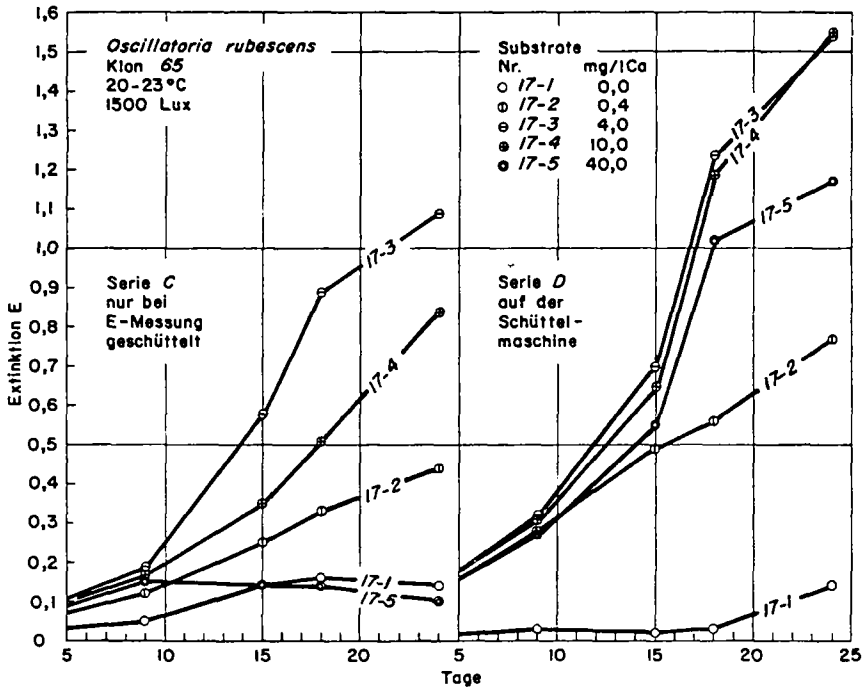


Abbildung 13

Wachstum des *O.-rubescens*-Klons 65 in Substraten mit verschiedenem Kalziumgehalt. Herstellung der Lösungen wie bei Serie B (Abb. 12).

Auch nach Abb. 13 wird unter beiden Versuchsbedingungen (Serie C: nicht geschüttelt; Serie D: auf der Schüttelmaschine) in Lösung 17-3 die günstigste Ca-Konzentration vorgelegt. Das Medium 17-4 bleibt wiederum nicht weit zurück. Mit der Konzentration 40 mg/l Ca treten dann aber wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Serien auf: wenn die Kolben dauernd geschüttelt werden, ist ganz gutes Wachstum festzustellen, wogegen die Entwicklung in stehenden Kolben bald unterbunden ist.

Bei vorsichtiger Beurteilung dieser Resultate darf man immerhin folgendes sagen: die Ca-Konzentration 4 mg/l (0,1 mM/l CaCl_2) ermöglicht unter ganz verschiedenen Versuchsbedingungen gutes Wachstum. In zehnmal höherer Konzentration können sich schon ausgesprochene Hemmungerscheinungen bemerkbar machen. Unter wechselnden Kulturbedingungen scheint sich das Ca-Optimum nicht wesentlich zu verschieben, doch müssen für eine exakte Ermittlung minimaler und maximal zulässiger Konzentrationen noch besser chemisch kontrollierte Experimente angestellt werden.

Praktisch gesehen ergibt sich, dass der Ca-Gehalt der Nährlösung Z-8 von 0,25 auf 0,1 mM/l CaCl_2 oder $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ erniedrigt werden kann.

In ökologischer Hinsicht unterstützen die beschriebenen Experimente die Auffassung, Ca sei in den Seen in überoptimalen Konzentrationen vorhanden und vermöge die Entwicklung von *O. rubescens* in einem ausgesprochen Ca-reichen See wie dem Greifensee einzuschränken. Die durchgeführten Versuche vermitteln aber nur gerade einen ersten Eindruck vom Kalziumbedarf dieser Blaualge. Eingehende Studien müssten die Verhältnisse von ein- zu zweiwertigen Ionen (PROVASOLI [136], VOLLENWEIDER [176]) und mit Rücksicht auf ionenantagonistische Wirkungen auf das Verhältnis Ca/K (LUNDEGÅRDH [110]), ferner die Vorgeschichte des Impfmaterials (WIKÉN [183], MCCOMBIE [115]) und andere Einzelheiten besser berücksichtigen.

4. Stickstoff und Phosphor

a) Grundsätzliche Vorbemerkungen

Unter den unerlässlichen Algennährstoffen kann in einzelnen *O.-rubescens*-reichen Seen der Stickstoff, in anderen der Phosphor produktionsbegrenzend wirken (vgl. z. B. THOMAS [166]). Diese heute allgemein anerkannte Ansicht bedarf allerdings noch einer näheren Überprüfung. Man ist ja namentlich bei chemischen Wasseranalysen zu dieser Auffassung gekommen, weil während der Monate der Hochproduktion in der euphoten Zone oft praktisch kein Stickstoff bzw. Phosphor mehr in Form von Salzen gelöst vorlag. Diese Beobachtung gibt aber nicht mehr als einen vorläufigen Hinweis, könnte doch die Algenproduktion auch unter solchen Bedingungen weitergehen, indem die von Strömungen laufend nachgeführten Nährstoffquellen sofort verarbeitet werden und daher mit den chemischen Analysen nicht erfassbar sind. Als unerschöpfliches Stickstoffreservoir kommt ja auch die Luft in Frage, deren gasförmiger Stickstoffanteil von turbulenten Strömungen laufend ins Wasser eingetragen wird, von bestimmten Bakterien und Algen fixiert und dem Kreislauf gelöster Stoffe zugeführt werden könnte (HUTCHINSON [73]).

Als bereits bessere Beurteilungsmethode ist das ernährungsphysiologische Experiment zu nennen, wie es im Prinzip schon von SCHREIBER (1927 [149], 1929 [150]) praktiziert worden ist. So versucht man auch heute noch (z. B. THOMAS [166]) durch Zusatz von einzelnen Nährsalzkomponenten zu sterilisierten Wasserproben und Impfung mit Planktophyten herauszufinden, welche Zusätze die beste Wachstumssteigerung zur Folge

haben, welche andere dagegen keine Verbesserung der Kulturbedingungen mit sich bringen, also demnach bereits in genügender Menge im Seewasser vorliegen müssen. – Der Wert solcher Experimente steht und fällt mit der Wahl des Impfmaterials, können sich doch hier ungezählt viele Sekundäreffekte geltend machen, wenn man nur schon an die möglichen antibiotischen Wirkungen zwischen den Algen, von Bakterien auf Algen oder umgekehrt denkt [38], [44], [67], [86, 87], [104–106], [122], [157, 158]. Besonders schwer kontrollierbar werden solche Experimente bei Impfung mit natürlichem Plankton, einer Organismengesellschaft ganz komplexer Zusammensetzung. Aber auch bei entsprechenden Versuchen mit Reinkulturen als Impfmateriale treten die wohlbekannteren Erscheinungen auf, welche den Vergleich mit den natürlichen Verhältnissen verunmöglichen: oft sind die minimal benötigten Konzentrationen eines bestimmten Nährsalzes in den Kulturen höher als die jemals in Seen tatsächlich anzutreffenden. Es ist also im Experiment – vielleicht auch nur scheinbar – eine bedeutende Verschiebung der Ansprüche eingetreten.

Solange sich die Untersuchung auf das die Organismen umgebende Medium beschränkt, muss man immer wieder solchen prinzipiellen Schwierigkeiten begegnen. Nun liegt es aber eigentlich nahe, die Plankter selbst in die chemische Analyse einzubeziehen und so ihren Ernährungszustand zu untersuchen. Ähnlich arbeiten ja Pflanzenphysiologen mit Makrophyten nach den von LUNDEGÅRDH [110] ausgearbeiteten Prinzipien der Blattanalyse. Danach wird das Wachstum einer Pflanze von der Konzentration der Nährstoffe in ihren grünen Teilen bestimmt; der Nährstoffgehalt des Bodens oder des flüssigen Mediums spielt in dieser Hinsicht erst eine sekundäre Rolle. Auf Algenpopulationen übertragen würde dies heißen, dass man aus der chemischen Analyse der Zellen einzelner Arten Auskunft über ihre Vermehrungsfähigkeit erhalten könnte. Voraussetzung wäre dabei, dass sich die Zellen dieser Art in ihrem natürlichen Zustand von anderen trennen liessen. Diese Bedingung wird bei wasserblütebildenden pflanzlichen Planktern recht gut erfüllt.

Mit solchen Ideen haben z. B. MACKERETH [111] mit *Asterionella* und ALKHOLY [2] mit *Chlorella* gearbeitet, und GERLOFF und SKOOG [57–59] haben in diesem Sinne die Ernährungsphysiologie von *Microcystis aeruginosa* studiert. Es sind bisher in dieser Weise keine anderen Blaualgen bearbeitet worden.

In den Kulturen kann der Nährstoffspiegel im Zellmaterial beliebig eingestellt werden, indem der entsprechende Nährstoff in seiner Konzentration im Nährmedium variiert wird. Bis zu einer gewissen Grenze sind dann das

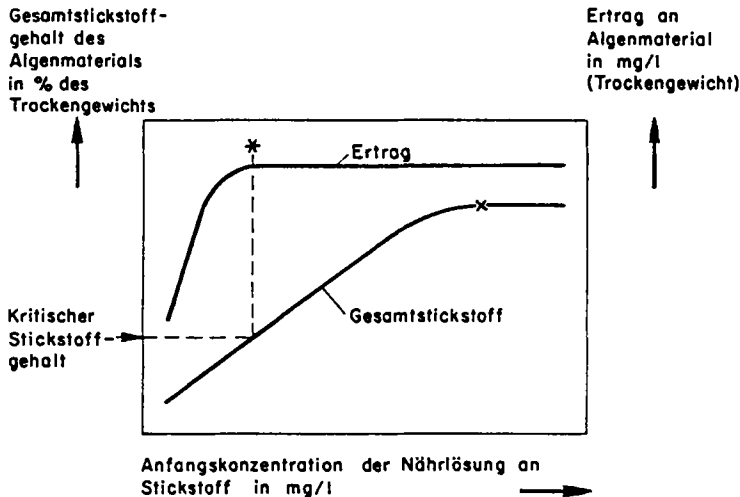


Abbildung 14

Schematische Darstellung der von GERLOFF und SKOOG [57] für *Microcystis aeruginosa* gefundenen Beziehungen zwischen Ertrag bzw. Gesamtstickstoffgehalt des Algenmaterials und der gelösten zur Verfügung gestellten Stickstoffmenge.

Wachstum und die Vermehrung direkt abhängig vom Gehalt der Zellen an Nährstoffen. Mit einem bestimmten kritischen Nährstoffgehalt wird optimales Wachstum erreicht, was sich bei weiterer Erhöhung der Nährstoffzufuhr nicht mehr weiter steigern lässt. Auch die prozentuale Nährstoffkonzentration in den Zellen geht nicht über eine obere Grenze hinaus. Abb. 14 zeigt diese Verhältnisse schematisch dargestellt für den Fall der Stickstoffernährung, wie es von GERLOFF und SKOOG bei Kulturen von *Microcystis aeruginosa* gefunden worden ist. Die Darstellung gilt sinngemäss auch für die Phosphorernährung.

Im Prinzip untersuchen GERLOFF und SKOOG dann bei *Microcystis*-material aus Wasserblüten die Frage, ob der Stickstoffgehalt der Zellen nun über oder unter dem experimentell ermittelten kritischen Wert liegt. Bei diesem direkten Vergleich müssen sie noch einen Korrekturfaktor berücksichtigen, der sich aus technischen Gründen ergibt: die Kulturen sind bakterienfrei, und es häufen sich im Laufe der Wachstumsperiode Schleimsubstanzen um die *Microcystis*-zellen an, die unter natürlichen Verhältnissen weitgehend von Bakterien abgebaut würden. Die Autoren können mit Vergleichsanalysen bei natürlichem und kultiviertem Material eine Beziehung aufstellen, die es ermöglicht, je nach Alter der Kulturen die unnatürlicherweise angesammelten Schleimsubstanzen vom Gesamttrockengewicht ab-

zuziehen. Durch diese Korrektur der Bezugsgrösse verändert sich dann auch der Wert für den prozentualen Stickstoffgehalt im Zellmaterial. Unter Berücksichtigung dieser Korrekturen finden GERLOFF und SKOOG dann bei verschiedenen Seen im *Microcystis*-material einen Stickstoffgehalt, der sehr nahe am kritischen Wert von 4%, manchmal auch leicht darunter liegt. Die nötigen Korrekturen sind allerdings recht gross (bis 2,8%), und es bleibt fraglich, ob mit derart korrekturbedürftigen Bezugsgrössen repräsentative Schlussfolgerungen erlaubt sind.

GERLOFF und SKOOG [59] ziehen denn auch noch zwei weitere Methoden heran, um sich ein richtiges Urteil über die Verfügbarkeit der Nährstoffe in Seen für das Wachstum von *M. aeruginosa* zu bilden: a) die bereits erwähnte Kulturmethode mit angereichertem Seewasser und b) Vergleiche des normalen N/P-Verhältnisses in Seen mit dem Verhältnis der minimal notwendigen N- und P-Konzentrationen in Kulturen.

Wenn man sich nun überlegt, mit welchen Methoden die in Abb. 14 schematisch dargestellten Beziehungen gefunden worden sind, so drängen sich einige kritische Bemerkungen auf:

1. Die Proben werden nach 10- bzw. 14tägigem Wachstum erhoben und analysiert, in einem Moment also, wo sich die Kulturen im logarithmischen Teil ihrer Wachstumskurve befinden sollen (die Entwicklungsperiode bei normaler Nährstoffzufuhr erstreckt sich unter den gleichen Bedingungen auf gut 20 Tage). Es fragt sich aber, ob sich tatsächlich alle Kulturen – bei jeder Stufe von Anfangs-Stickstoffkonzentrationen der Nährlösung – in diesem Moment noch in der logarithmischen Phase befinden. Möglich wäre dies unter der Voraussetzung, dass die Vermehrungsgeschwindigkeit der Algen direkt proportional zum äusseren Nährstoffgehalt zu Beginn des Wachstums bleibt. Diese Annahme widerspricht jedoch den allgemeinbekannten Prinzipien der Kinetik des Wachstums von Mikroorganismen. Danach müsste ja – zumindest innerhalb gewisser Grenzen – die relative Wachstumsrate von der Substratkonzentration unabhängig sein [118, 119], [121], [126]. Somit wäre die Wachstumsperiode bei geringem Nährstoffgehalt der Lösung früher abgeschlossen als bei hoher äusserer Konzentration. Daraus würde wiederum folgen, dass die bei geringer Stickstoffkonzentration angesetzten Kulturen nach 10 Tagen möglicherweise die Vermehrung schon eingestellt haben, während diejenigen in stickstoffreichem Milieu sich noch logarithmisch weiterentwickeln. Nun ist es aber ganz wesentlich, in welcher Entwicklungsphase die Proben erhoben werden. Nach GERLOFF und SKOOG [57] nimmt nämlich der Gesamtstickstoffgehalt in den Algen bei normalen Kulturbedingungen während einer 20tägigen Wachstums-

periode von 9 auf 4% des Trockengewichtes ab. Die in Abb. 14 mit Kreuz markierte Sättigung an Stickstoff im Algenmaterial müsste demnach in dieser Darstellungsweise bei immer höheren Abszissenwerten erreicht werden, je später die Probenahme angesetzt würde, denn der markierte Stickstoffwert müsste ja bei Weiterführung des Experiments noch weiter fallen, wenn nicht irgendein anderer Faktor die Entwicklung hier zum Stillstand bringen würde. Die Fig. 4 und 5 in der Arbeit [57] von GERLOFF und SKOOG – die sich auf die Phosphorernährung von *M. aeruginosa* beziehen, – bestätigen diese Hypothese: bei Probenahme nach 10 Tagen wird der Sättigungswert (ca. 0,6% P im Trockengewicht) in den Kulturen mit 0,5 mg/l Anfangs-P-Konzentration erreicht, bei Probenahme nach 14 Tagen (in einem anderen Experiment) aber erst in Lösungen mit 0,8 mg/l Anfangs-P-Konzentration. Die P-Kurve wird also bei Verlängerung der Versuchsdauer flacher. Die von GERLOFF und SKOOG publizierten Ertragskurven unterstützen ebenfalls die Ansicht, dass die als kritisch angesehenen Werte sich bei verschiedenen gewähltem Zeitpunkt der Probenahme verändern. Der in Abb. 14 mit * bezeichnete Punkt in der Ertragskurve wird in Experimenten mit Phosphor z. B. bei Probenahme nach 10 Tagen in den Lösungen mit anfänglich 0,15 mg/l P erreicht (ca. 90 mg/l Trockengewicht), nach 14 Tagen aber mit ca. 0,3 mg/l P (220 mg/l Trockengewicht).

Wenn sich auch diese Kardinalpunkte verschieben, so finden GERLOFF und SKOOG doch im Schnittpunkt der beiden Kurven bemerkenswert gut übereinstimmende kritische Werte für den Stickstoff- bzw. Phosphorgehalt der Algen, was ja schliesslich bei der Beurteilung der Brauchbarkeit dieser Methode ausschlaggebend ist. Die ermittelten kritischen Werte sind jedoch in ihrer Bedeutung nicht leicht zu interpretieren. So drängt sich die Vermutung auf, die Verhältnisse würden sich vielleicht vereinfachen und leichter verständlich werden, wenn das Algenmaterial erst nach Abschluss der ganzen Wachstumsperiode geerntet und analysiert würde.

2. Die auf der Abszisse (Abb. 14) eingetragene Nährstoffkonzentration der Nährlösung ist ein mit der Zeit variabler Wert, dessen Variabilität beim Wachstumsversuch mit zunehmender Grösse verhältnismässig immer geringer wird: die kleinen Nährstoffvorlagen dürften von den Algen ganz ausgeschöpft werden können, während bei grossen Angeboten noch beträchtliche Restmengen verbleiben. Es wäre zu untersuchen, ob bei konstant gehaltener Nährstoffkonzentration im Substrat – mit kontinuierlichen Kulturen – der pro Zeiteinheit erzielte Algenantrag nicht schon bei geringerem Angebot eine konstante Grösse erreichen würde, als dies sich in den von GERLOFF und SKOOG beschriebenen Versuchen ermitteln liess.

3. Die Versuchsanordnung unterscheidet sich grundsätzlich ganz bedeutend von den naturgegebenen Bedingungen in Seen. Dort befinden sich die Algen ja nicht in einem abgeschlossenen System. Es lässt sich daher keine bestimmte Anfangskonzentration an Nährsalzen für eine Entwicklungsperiode ermitteln. Diese Unstimmigkeit könnte im Prinzip umgangen werden, wenn die experimentellen Daten mittels kontinuierlicher Kultur bestimmt würden. Mit dieser Technik könnte direkt die Abhängigkeit der relativen Wachstumsrate von der Nährstoffkonzentration im Algenmaterial ermittelt werden. Diese beiden Grössen lassen sich grundsätzlich auch in Seen bestimmen, und der Vergleich zwischen kultiviertem und natürlich gewachsenem Material würde gewiss verlässlicher. –

Diese kritischen Bemerkungen zu den Arbeiten von GERLOFF und SKOOG wollen es verständlich machen, dass bei den experimentellen Untersuchungen über die Stickstoff- und Phosphoransprüche von *O. rubescens* in ökologischer Sicht mit viel Skepsis ans Werk gegangen wurde, weil es noch nicht möglich war, mit automatisch verdünnten, auf konstanter Organismendichte gehaltenen Kulturen zu arbeiten, mit der Methode also, welche nach diesen Überlegungen die einzig richtige wäre. Die im folgenden beschriebenen Versuche berücksichtigen immerhin die unter 1. erwähnten Bedenken und nützen im übrigen die unzweifelhaft wertvollen Ideen von GERLOFF und SKOOG, die ja teilweise auf LUNDEGÅRDH zurückgehen, nach Möglichkeit aus.

b) Kulturversuche zur Stickstoffernährung

Bei Wachstumsversuchen in Substraten mit abgestuften Stickstoffkonzentrationen impft man vorteilhaft mit Zellen aus Stickstoffmangelkulturen, damit nicht zu grosse Blindwerte entstehen. Die Anzucht des Impfmateri als für die nachfolgend durchgeführten Stickstoffexperimente wurde einerseits mittels Messungen der optischen Dichte der Suspensionen, andererseits durch chemische Kontrollanalysen in den Nährlösungen überwacht.

Die Medien entsprechen der mit Nr. 17–3 bezeichneten Modifikation von Lösung Z8 (Herstellungsweise B, Tab. 17, S. 167), wobei dann allerdings die NaNO_3 -Zusätze variiert wurden. NaNO_3 wurde KNO_3 vorgezogen, weil mit letzterem Salz bei geringen Konzentrationen ein Kaliumeffekt mit dem des Stickstoffs interferieren könnte. Für die Vorkulturen wurden zunächst Stickstoffkonzentrationen von 0,0; 0,01; 0,10; 1,0; 5,50 und 10,0 mM/l NaNO_3 angesetzt. Nach der Impfung mit Kultur 65–28 (11 Tage alt) entwickelten sich die einzelnen Serien nach den in Abb. 15

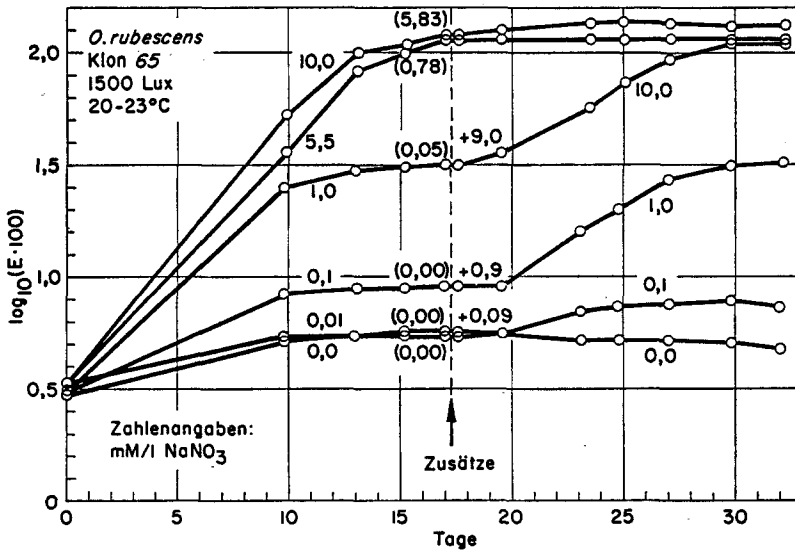


Abbildung 15

Entwicklung der *O.-rubescens*-Klonkultur 65 in flüssigen Medien mit verschiedenem Nitratgehalt. Grundsubstrat 17-3 (Tab. 17, S. 139); Zahlenangaben bei den Kurven: mM/l NaNO_3 -Zusatz; Zahlenangaben in Klammern: Restkonzentration im Substrat nach 17tägiger Wachstumsperiode (mM/l); Extinktionsmesswerte korrigiert nach Verfahren S. 97ff.

dargestellten Wachstumskurven. Nach 17 Tagen war die optische Dichte der einzelnen Serien mehr oder weniger auf konstanten Werten stehengeblieben. Substratanalysen ergaben die in Klammern angegebenen Werte: bei den unteren drei Konzentrationen war kein Nitrat mehr nachzuweisen, bei den oberen drei waren Reste übriggeblieben. Die unteren drei Serien mussten also wirkliche Stickstoffmangelzellen enthalten. Mit Zusätzen von sterilen NaNO_3 -Lösungen zu den im übrigen unveränderten Substraten wurde nun geprüft, ob dieses Hungermaterial noch zu normaler Weiterentwicklung fähig sei oder ob vielleicht irgendwelche Bakterientoxine von den Begleitorganismen oder gar Autotoxine von den Algen selbst die Entwicklung hemmen würden. Der Verlauf der Wachstumskurven zeigt, wie keinerlei derartige Sekundärwirkungen nachzuweisen waren: die Vermehrung setzte nach einer ca. 2tägigen Latenzphase wieder ein und ergab (bei 1,0 und 10,0 mM/l insgesamt zugesetztem Nitrat) während rund 7 Tagen bei logarithmischer Darstellung der Wachstumskurve eine Gerade. Die Organismendichte am Ende dieser Entwicklung entsprach dann recht genau derjenigen, die beim entsprechenden Anfangszusatz erreicht worden

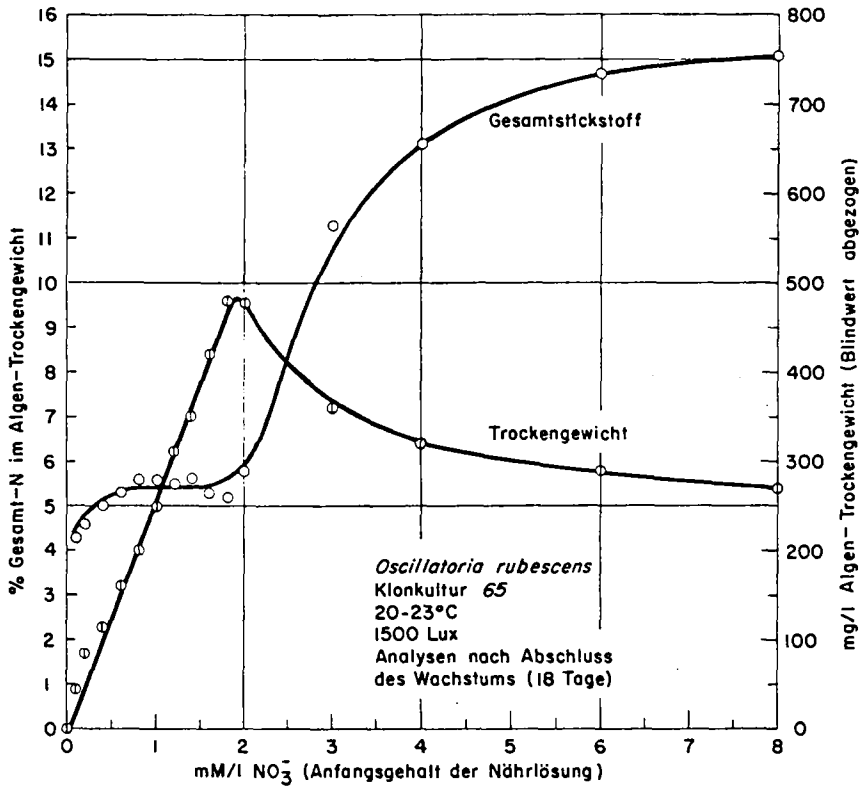


Abbildung 16

Algenproduktion und Gesamtstickstoffgehalt in Lösungen mit verschiedenem Nitratgehalt bei der *O.-rubescens*-Klonkultur 65. Ernte nach photometrisch kontrolliertem Abschluss des Wachstums.

war. Bemerkenswert bei diesen Kurven ist übrigens der Verlauf derselben nach Abschluss des Wachstums: sie halten sich ohne weiteres während 14 Tagen in derselben Höhe. Dies weist daraufhin, dass der gasförmige Stickstoff aus der Luft den Algen tatsächlich nicht verfügbar gemacht wird – weder durch eigene Stickstoffassimilation noch durch eine solche der Begleitbakterien. Ausserdem zeigt der horizontale Verlauf der Kurven, wie die Autolyse bei diesem Material nur zögernd einsetzt und wie die Begleitbakterien offensichtlich den Abbau der Algenzellen nur sehr langsam in die Wege leiten können.

Das Material aus den Vorkulturen mit einem Gesamtgehalt von 1,0 mM/l Nitrat diene dann zur Impfung einer grösseren Serie von Kulturen mit 20 Nitratgehaltstufen: 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0;

3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 mM/l NaNO_3 . Wie bei den Vorkulturen konnte mittels photometrischer Dichtemessung der Zeitpunkt bestimmt werden, wo die Kulturen ihr Wachstum abgeschlossen hatten. 18 Tage nach der Impfung war es soweit, dass das Material geerntet und analysiert werden konnte. Die Ergebnisse der Bestimmungen des Trockengewichtes und des Gesamtstickstoffgehaltes in den gewaschenen Algenzellen sind in Abb. 16 graphisch dargestellt für die Substrate bis 8 mM/l Nitrat. Die Resultate von Medien mit noch höheren Stickstoffkonzentrationen liegen denen des Substrats mit 8 mM/l sehr nahe.

Der Verlauf der in Abb. 16 dargestellten Kurven unterscheidet sich grundlegend von demselben in Abb. 14, wie er von GERLOFF und SKOOG [57] für *Microcystis aeruginosa* gefunden worden ist, stimmt aber im Prinzip weitgehend überein mit den Verhältnissen, wie sie neuerdings KAIN und FOGG [88, 89] für *Asterionella japonica* und *Isochrysis galbana* beschrieben haben. Es war nicht ausgeschlossen, dass die Begleitbakterien in den *Oscillatoriakulturen* für diese Unterschiede verantwortlich gemacht werden mussten – mindestens im Bereich höherer Nitratkonzentrationen. Zur Kontrolle wurde daher ein analog angeordnetes Experiment mit dem bakterienfreien Stamm 51 R durchgeführt. Leider war es nicht möglich, den Verlauf des Wachstums wie bei Klon 65 photometrisch zu überwachen. Die Ernte erfolgte aber nach einer Vegetationsperiode von 18 Tagen wie im vorangehenden Versuch. Unter den Parallelkulturen machte sich eine stärkere Streuung der Trockengewichtsergebnisse bemerkbar als beim ersten Versuch, da die Reinkulturen wie gewohnt unregelmässig geballt wuchsen. Immerhin stimmen die Ergebnisse, wie sie in Abb. 17 dargestellt sind, im grossen ganzen mit denen von Abb. 16 überein. Das Trockengewicht erreichte zwar hier ein nicht so hohes Maximum wie vorher, und der Stickstoffgehalt, auf das Trockengewicht bezogen, kam nicht über 12% hinaus, wogegen es vorher auf 15% gestiegen war.

Beiden Experimenten waren jedoch folgende grundsätzlichen Ergebnisse gemeinsam: 1. Die Algenproduktion kam bei 2,0 bis 2,5 mM/l Anfangs- NO_3 -Gehalt der Nährlösung zu den höchsten Werten. In noch höher konzentriertem Medium nahm die Produktion wieder ab. Bei geringerer Konzentration hingegen bestand direkte Proportionalität zwischen dem produzierten Algentrockengewicht und dem zur Verfügung gestellten Nitratstickstoff. 2. Bei suboptimalen Nitratkonzentrationen kam der Stickstoffgehalt der Algenzellen nach Einstellen der Vermehrung auf 5 bis 6% des produzierten Trockengewichtes. Bei überoptimalem Stickstoffangebot steigerte sich der Stickstoffgehalt im ausgewachsenen Algenmaterial rasch auf 12–15%.

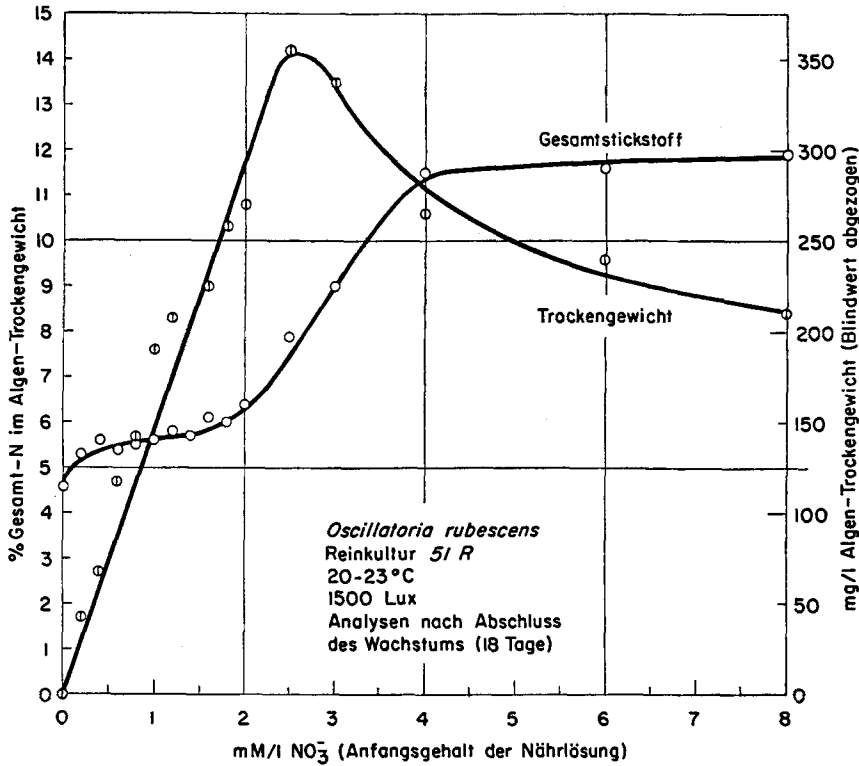


Abbildung 17

Algenproduktion und Gesamtstickstoffgehalt in Lösungen mit verschiedenem Nitratgehalt beim bakterienfreien Stamm 51 R.

Nach diesen Versuchsergebnissen müsste man den Stickstoffgehalt von 5 bis 6% als wachstumsbegrenzend anschauen. Die noch tiefer liegenden Werte in Abb. 16 und der Nullwert in Abb. 17 sind schlecht gesichert, weil sie mit sehr wenig Algenmaterial ermittelt worden sind. Die wachstumsbegrenzende Stickstoffkonzentration von 5 bis 6% darf nun aber nicht mit dem von GERLOFF und SKOOG [57] angegebenen «kritischen Stickstoffgehalt» identifiziert werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Algen mag schon bei höheren Stickstoffwerten als 5–6% verlangsamt werden, sie kommt aber wirklich zum Stillstand, wenn dieses Niveau erreicht wird. Ein direkter Vergleich der für *Microcystis aeruginosa* publizierten Zahlenwerte mit den hier für *O. rubescens* ermittelten ist wegen der grundlegend andersartigen Auswertung – im ersten Fall durch Probenahme während logarithmischem Wachstum, im zweiten Fall durch Probenahme nach Be-

endigung des Wachstums – unmöglich, zumal da für *Microcystis* nur bis in die Grössenordnung von 20 mg/l N in der Nährlösung Resultate vorliegen, was für *O. rubescens* unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen noch suboptimal wäre.

Jedenfalls sind Stickstoffkonzentrationen zwischen 5 und 15% des Trockengewichts bei *O. rubescens* möglich. Es musste nun interessieren, ob auch unter natürlichen Verhältnissen die Stickstoffwerte in den gleichen Grenzen zu finden seien, und ob diese bei Stickstoffmangel in Seen einem entsprechenden unteren Grenzwert von 5 bis 6% zustreben. Diese Frage wird im Abschnitt d dieses Kapitels (S. 182) mit einigen Ergebnissen von Felduntersuchungen beleuchtet.

c) Kulturversuche zur Phosphorernährung

Die grundsätzlichen Bemerkungen zum vorangehenden Abschnitt haben auch beim Nährstoff Phosphor Geltung, und die Laborexperimente konnten ganz analog angeordnet werden. Im gleichen Substrat wie dort (2,5 mM/l NaNO_3) wurden verschiedene Konzentrationen von K_2HPO_4 angesetzt und dabei der K-Gehalt mit entsprechenden KCl-Zusätzen konstant gehalten (39 mg/l K). Als Impfmateriale dienten zunächst Phosphormangelkulturen des Klons 65. Nach 17tägigem Wachstum konnte das Material – nach photometrischer Kontrolle der Wachstumskurven – geerntet und analysiert werden.

Die Untersuchungsergebnisse finden sich zusammengestellt in Abb. 18. Dem allgemeinen Aspekt nach gleicht dieses Kurvenbild sehr stark denjenigen, die GERLOFF und SKOOG [57] für *Microcystis aeruginosa* gefunden haben (Abb. 14). Im Bereich unter 0,20 mM/l Anfangsphosphorgehalt der Nährlösung nimmt der prozentuale Phosphoranteil im Algentrockengewicht ziemlich gleichmässig von 0,1 bis 0,6% zu, um dann bei weiterer Erhöhung des Anfangsphosphatgehaltes in der Lösung nicht mehr stark anzusteigen (bis knapp 0,8%). Der optimale Ertrag wird aber schon bei ca. 0,33% Phosphorgehalt im Algentrockengewicht erreicht. So könnte diese Konzentration von 0,33% im Sinne von GERLOFF und SKOOG als kritisch für die Phosphorernährung angesehen werden. Nun sind aber die hier wiedergegebenen Werte nicht bei raschwachsenden Kulturen bestimmt worden. Es dürfte so eigentlich analog wie bei den Versuchen über die Stickstoffernährung erwartet werden, dass innerhalb eines gewissen Bereiches von variierenden Phosphorangeboten bei der Ernte ein bestimmter P-Minimalwert in den Zellen erreicht und das Wachstum damit effektiv begrenzt

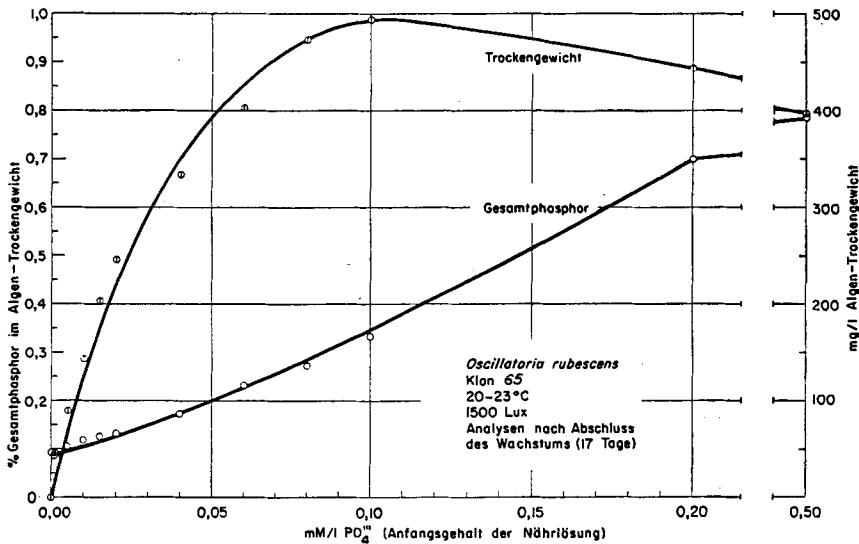


Abbildung 18

Algenproduktion und Gesamtphosphorgehalt in Substraten mit verschiedenem Phosphatgehalt bei *O. rubescens*-Klon 65. Ernte nach photometrisch kontrolliertem Abschluss des Wachstums.

würde. Da jedoch in keinem Abschnitt der Gesamtphosphorkurve ein horizontaler Verlauf festzustellen ist, muss angenommen werden, dass noch andere Faktoren bei der Begrenzung der Entwicklung mitgewirkt haben.

Auch in einem entsprechenden Experiment mit der Reinkultur 51R ergaben sich grundsätzlich dieselben Verhältnisse. Zwar entstanden höhere Streuungen, und das höchste Trockengewicht wurde erst bei 0,15 mM/l Phosphatangebot erzielt.

Gesamtstickstoffanalysen im Material aus den Phosphorversuchen sollten darüber Aufschluss geben, ob vielleicht die Stickstoff- und Phosphorer-nährung irgendwie gekoppelt vor sich gingen, ob die Substrate vielleicht mit höheren Nitratkonzentrationen versehen werden sollten. Der Stickstoffgehalt blieb aber bei allen Proben aus dem Phosphorversuch mit dem Stamm 51R zwischen 8 und 10% des Trockengewichts. Hier konnte also kein Mangel eingetreten sein.

Wenn auch die Ergebnisse dieser Kulturversuche nicht ganz befriedigen, so vermögen sie doch immerhin grössenordnungsmässig etwas über den Phosphorbedarf von *O. rubescens* auszusagen: Gesamtphosphorkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,3% des Trockengewichts dürften danach die Entwicklung verzögern oder sogar begrenzen. Diese Zahlen dürfen als Basis für Felduntersuchungen herangezogen werden.

d) *Untersuchungen im Zürichsee und Burgäschisee*

Aus früheren Zürichsee-Untersuchungen verschiedener Autoren ist bekannt, dass die Entwicklung von *O. rubescens* während der Sommerstagnation in der Tiefe von ca. 10 m innerhalb einer Wasserschicht von geringer Mächtigkeit vor sich geht. Im zeitlichen Ablauf wird diese Sommerentwicklung für die Jahre 1945–1947 in Abb. 19 dargestellt nach Zahlenangaben von THOMAS und MÄRKI [169]. Die Originalwerte der beiden Autoren (Anzahl *Oscillatoria*fäden pro ml) wurden graphisch mit Hilfe des Planimeters umgerechnet in Anzahl Fäden pro cm² Seeoberfläche, wobei einerseits Zahlen für die Wassersäule in den obersten 20 m, andererseits Werte für die Wassersäulen von der Oberfläche bis zum Grund ermittelt wurden. Die Kurven mit ausgefüllten Punkten zeigen, wie die Entwicklung von *O. rubescens* im Epilimnion in den Monaten April bis Mai einsetzt, um dann während der Sommerstagnation im Juli oder August mehr oder weniger zu einem vorläufigen Abschluss zu kommen. Selbstverständlich ist es nicht möglich, das Einstellen des Wachstums anhand der erhältlichen Zahlen genau zu datieren. Dazu müsste eine viel grössere Anzahl von Parallelproben an vielen Stellen des Sees erhoben werden. Doch wird schon so der perennierende Charakter des *Oscillatoria*bestandes deutlich sichtbar, und es muss einleuchten, dass besonders die Wachstumsphase im Sommer für ernährungsphysiologisch-autökologische Vergleichsuntersuchungen interessant ist. Wenn nämlich irgendeine chemische Komponente des natürlichen Mediums für die Einstellung des Wachstums im Spätsommer verantwortlich sein sollte, so müsste sich das in der chemischen Zusammensetzung des Algenmaterials widerspiegeln. Angenommen, der Stickstoff käme als wachstumsbegrenzender Faktor in Frage, so müsste der Gesamtstickstoffgehalt der *Oscillatoriazellen* prozentual während der Entwicklungsphase langsam abnehmen. Im April und Mai – nach der Vollzirkulation – hätten die Algen ja noch genügend Stickstoff zur Verfügung, um diesen Nährstoff gleichsam hamstern zu können, wogegen dann später bei andauernder Stagnation die Versorgung immer knapper würde und die Algen ihre eigenen Vorräte bis zu einem bestimmten Mindestgehalt in den Zellen ausschöpfen müssten.

Diese Überlegungen dienten als Arbeitshypothese für die Felduntersuchungen im Zürichsee während der Sommermonate des Jahres 1958. Unglücklicherweise blieb die *Oscillatorienentwicklung* ausgerechnet in diesem Jahr bedeutend hinter dem normalen Ausmass in früheren Jahren zurück, doch bildeten sich immerhin ausgeprägte Maxima in 6 bis 8 m Tiefe. Bei visuellem Vergleich von Schöpfproben aus verschiedenen Tiefen liess

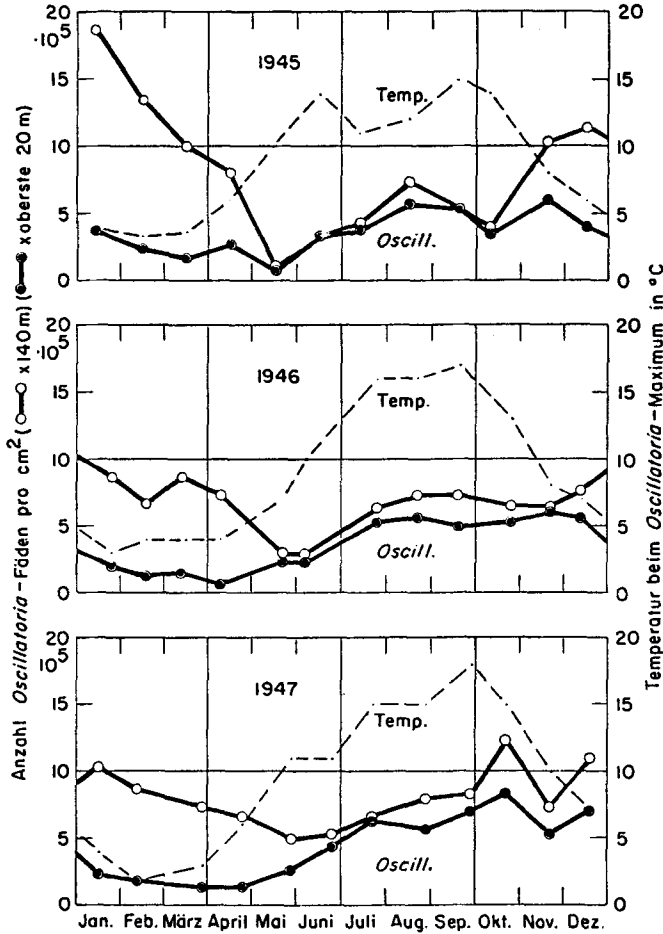


Abbildung 19

Entwicklung von *Oscillatoria rubescens* im Zürichsee in den Jahren 1945 bis 1947 (nach THOMAS und MÄRKI [169] umgerechnet).

sich das jeweilige *Oscillatoria*maximum recht gut schon auf dem See lokalisieren. Aus der entsprechenden Tiefe wurde dann mittels einer Pumpe soviel Algenmaterial abgesogen, dass es nach Filtrieren durch zwei ineinandergehängte Phytoplanktonnetze und nachträgliche mechanische Reinigung (S. 117) ein Gesamtrockengewicht von ca. 1 g ergab.

Die Ergebnisse der Gesamtstickstoffanalysen finden sich zusammengestellt in Tab. 18. Es sind dabei vergleichsweise auch zwei Einzelwerte aus dem stark eutrophierten Burgäschisee sowie Gesamtphosphoranalysen aus

denselben Proben aufgenommen worden. Beim Stickstoffgehalt zeichnet sich eine deutliche Abnahme während der Untersuchungszeit ab, wogegen die Phosphorwerte eher in gleicher Grössenordnung bleiben. Der tiefste erreichte Stickstoffgehalt kommt zwar noch nicht auf das experimentell ermittelte Minimum von 5 bis 6%. Man ist versucht, daraus zu schliessen, dass der Stickstoff noch nicht vollkommen zum Minimumstoff geworden ist. Mit solcher Schlussfolgerung würde man jedoch gewiss schon zu weit gehen, da hier ja die Konzentration nur gerade auf eine einzige Basis – das Trockengewicht – bezogen wird. Wie aus den Arbeiten von GERLOFF und SKOOG [59] bekannt ist, wäre es aber notwendig, noch andere Bezugsgrössen wie den Kohlehydratgehalt zum Vergleich zu benützen, wollte man repräsentative Vergleiche ziehen.

Es wurde nun in der vorliegenden vorläufigen Untersuchung dieser Verhältnisse mit Absicht vermieden, Korrekturfaktoren wie diejenigen von GERLOFF und SKOOG einzuführen. So wird die Schlussfolgerung aus den Zahlen in Tab. 18 auf die Feststellung beschränkt, dass der Stickstoffgehalt in Prozenten des Trockengewichts sowie das Stickstoff/Phosphorverhältnis während der Sommerstagnation deutlich abnehmen, was aussagt, es ermangle den *O.-rubescens*-Zellen offenbar in den untersuchten Fällen eher an Stickstoff denn an Phosphor.

V. Diskussion der allgemeinen Ergebnisse

Mit den vorliegenden Untersuchungen ist das einleitend umrissene *Oscillatoriaproblem* seiner Lösung nur um einen ersten Schritt nähergekommen. Es ist zwar gelungen, die Nährstoffansprüche dieser Blaualge *qualitativ* weitgehend abzuklären oder, mit der Terminologie von KETCHUM [90] ausgedrückt, ihren *absoluten* Nährstoffbedarf kennenzulernen. In quantitativer Hinsicht ist noch sehr wenig Tatsachenmaterial zusammengebracht worden, womit man die *normalen* und *minimalen* Ernährungsbedingungen dieses Organismus im direkten Vergleich mit anderen beschreiben könnte.

Die Schwierigkeit bei der sauberen experimentellen Bearbeitung der in dieser Arbeit behandelten Fragen liegt vor allem bei der Kultivierung und Reinzüchtung des Algenmaterials. Ohne die Verwendung von Actidion wäre es wohl überhaupt nicht möglich gewesen, gute *O.-rubescens*-Rohkulturen herzustellen. Die Einführung dieses antibiotischen Stoffes in die Blaualgenkulturmethoden durch ZEHNDER und HUGHES [188] darf nach den hier gewonnenen Erfahrungen als ein wirklich bedeutender Fortschritt angesehen werden.

Tabelle 18
Gesamtstickstoff- und Gesamtphosphorgehalt von O.-rubescens-Material aus dem Zürichsee bzw. Burgäschisee (abgepumpt aus der Zone maximaler Entwicklung) und Analysen des Wassers aus der gleichen Schicht.

| See | Datum (1958) | Tiefe m | Gewichts-% N im Algen- Trocken- gewicht | Gewichts-% P im Algen- Trocken- gewicht | Verhältnis N : P | Wasseranalysen ¹⁾ | | | |
|--------------|-----------------|------------|--|--|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| | | | | | | NO ₃ ⁻ mg/l | NO ₂ ⁻ mg/l | NH ₃ mg/l | PO ₄ ³⁻ mg/l |
| Zürichsee | 22. 7. | 8 | 13,1 | 0,52 | 25:1 | 0,59 | 0,025 | 0,05 | 0,01 |
| | 21. 8. | 6,5 | 10,5 | 0,48 | 22:1 | 0,10 | 0,005 | 0,06 | 0,02 |
| | 2. 9. | 8 | 10,1 | 0,34 | 30:1 | 0,19 | 0,005 | 0,04 | 0,01 |
| | 17. 9. | 8 | 8,3 | 0,45 | 19:1 | 0 | 0 | 0,05 | 0,01 |
| | 29. 9. | 8 | 7,4 | 0,49 | 15:1 | 0,02 | 0 | 0,01 | 0,01 |
| | 14. 10. | 8 | 7,5 | 0,51 | 15:1 | 0,02 | 0 | 0,06 | 0,01 |
| Burgäschisee | 10. 6. | 5 | 10,8 | 0,41 | 26:1 | 2,4 | 0,07 | <0,1 | 0,04 |
| | 19. 8. | 4,5 | 6,4 | 0,33 | 19:1 | 0,1 | <0,01 | 0,2 | <0,02 |

¹⁾ Zahlenangaben nach unveröffentlichten Untersuchungen der Herren P. ZIMMERMANN (Zürichsee) und Dr. R. BURKARD (Burgäschisee).

Nun fehlt aber immer noch ein entsprechendes hochwirksames Antibiotikum, mit dessen Hilfe sich ebenso sicher noch die Bakterien aus den Blaualgenkulturen eliminieren lassen. Dieser Wirkstoff ist auch im Verlauf der hier beschriebenen Experimente noch nicht gefunden worden. Immerhin wird eine Testmethode angewendet, die sich gewiss bei späteren Experimenten mit anderen Antibiotika wieder mit Vorteil einsetzen lässt. Die Beurteilung der antibiotischen Wirkung einzelner Stoffe auf Grund der Hemmung von beweglichen *Oscillatoria*fäden auf Agaroberflächen ist äusserst rasch möglich, erfordert keinerlei Eingriffe mit Färbemitteln und dergleichen und liefert vernünftige Befunde hinsichtlich der Vermehrungsfähigkeit der behandelten Algen. Es ist dieser einfachen Methode zu verdanken, wenn zur erfolgreichen Reinkultivierung von *O. rubescens* die geeigneten Antibiotika, unter denen vor allem Aureomycin zu erwähnen ist, gefunden und in richtiger Dosis eingesetzt werden konnten.

Das Hauptresultat bei der qualitativen Beurteilung der Nährstoffansprüche des reinkultivierten Stammes 51 R ist einer richtigen Interpretation in autökologischer Hinsicht durchaus zugänglich: der Stamm ist als *photoautotroph* (*sensu stricto*) befunden worden. Das bedeutet, dass er in seiner Entwicklung ans Licht gebunden ist, lediglich anorganische Wasserstoffdonatoren (Wasser) benötigt und sämtliche Komponenten des Bau- und Betriebsstoffwechsels aus anorganischen, oxydierten Verbindungen zu synthetisieren vermag. Es ist daraus zu schliessen, dass er bezüglich der Nährstoffgrundlage in seinem natürlichen Vorkommen durchaus nicht an eutrophierte Gewässer gebunden ist, sondern auch in oligotrophen leben könnte. Die Fähigkeit zur Assimilation von Luftstickstoff hat bei den kultivierten Stämmen nicht nachgewiesen werden können, und es ist anzunehmen, dass diese Möglichkeit der Stickstoffversorgung auch im natürlichen Biotop höchstens den Begleitbakterien, nicht aber der Blaualge selbst, zur Verfügung steht.

Mit diesen Feststellungen bleibt die Tatsache, dass nach vielen übereinstimmenden Beobachtungen starke *Oscillatoria*entwicklungen ein Zeichen beginnender Eutrophierung darstellen, unbestritten. Die Interpretation dieser Beobachtung darf aber nun dahin präzisiert werden, dass die Massenfaltung von *O. rubescens* nicht direkt auf vermehrte Zufuhr von organischen Abfallstoffen zurückzuführen ist, sondern dass sie indirekt verstanden werden muss als Nachspiel der Mineralisationsvorgänge, als «Wiederinkarnation» der zuvor durch Bakterien und Pilze abgebauten organischen Substanz, wie es die Phytoplankton-Mehrproduktion in eutrophierten Gewässern ja allgemein darstellt. Damit wird die *Oscillatoria*faltung ins

gleiche Glied gestellt wie die Entwicklung irgendwelcher anderer Phytoplankter. Im Hinblick auf die Gewässersanierung heisst das aber, dass nur mit vermehrter Abwasserreinigung, vor allem bei Verbesserung der sog. dritten Reinigungsstufe, d. h. der Elimination anorganischer Düngstoffe aus den mechanisch und biologisch gereinigten Abwässern, eine merkliche Verminderung der Produktion von *Oscillatoria*- und anderem Algenmaterial erwartet werden kann.

Die Besonderheit dieser «Burgunderblutalge» in ihrer ganzen Erscheinungsweise ist also nicht in den ernährungsphysiologischen Verhältnissen zu suchen. Auch wachstumsphysiologisch ist sie kein Ausbund. Sie kann in Kultur selbst unter günstigsten Bedingungen nur zu bescheidener Vermehrungsgeschwindigkeit gebracht werden, wenn man damit die relativen Wachstumsraten anderer Blaualgen in ähnlichem Milieu vergleicht. Diese Feststellung stimmt mit der allgemein richtigen Beobachtung überein, dass eher langsamwachsende Phytoplankter das Gesamtbild über längere Zeit beherrschen, dass raschwüchsige aber nur kurzfristig – oft darum kaum auffallend – in Erscheinung treten. Die auch in neuerer limnologischer Literatur noch anzutreffende Darstellung von *O. rubescens* als einem ausgeprägt kaltstenothermen Organismus (KUHN [102]) muss nach den experimentellen Erfahrungen in dieser Arbeit als unrichtig bezeichnet werden. Man muss in physiologischem Sinne eher von einem eurythermen Phytoplankter sprechen, der zwar in der Natur meist in Zonen tiefer Temperatur – wohin er von anderen ökologischen Faktoren gedrängt wird – vorzufinden ist. Andere Limnologen sind ja der Frage des Temperaturoptimums schon mit Felduntersuchungen sorgfältig nachgegangen und sind bei vorsichtiger Beurteilung ihrer Beobachtungen zum Schluss gekommen, dass primär eher dem Lichtfaktor und erst sekundär dem Temperaturfaktor für die räumliche Verteilung der *O.-rubescens*-Population in Seen eine Bedeutung zukommt. (FINDENEGG [40, 41], THOMAS [165]).

Das Phänomen der *Oscillatoria*massenentfaltung im Zusammenhang mit der Eutrophierung der Gewässer wird nach diesen Erkenntnissen ein vermehrtes Studium zytologischer und reizphysiologischer Eigentümlichkeiten dieser Blaualge erfordern, wenn es vollends verstanden werden will. Der Lichtfaktor in seinem Zusammenhang mit der Pigmentierung, vor allem auch die Bildung der Gasvakuolen als wirksame Schwebeanpassung in Abhängigkeit von Umweltfaktoren wie pH-Wert und Redoxpotential (CANABAEUS [22]), muss eingehender untersucht werden.

Zudem wäre noch zu überprüfen, ob alarmierende Bezeichnungen wie «Krankheitszeichen vieler schweizerischer Seen» (KUHN [102]) auf den

Charakter von *O.-rubescens*-Entwicklungen zutreffen. Es ist gut möglich, dass die Anwohner des Lago di Caldonazzo die Vorgänge schon vor 50 Jahren eher richtig beurteilten, wenn sie beim Aufrahmen von *Oscillatoria*-material sagten «il lago si purga» (LARGAIOLLI, 1902 [103]). Pflanzenmassen, die aufrahmen und mit dem Oberflächenwasser abfließen können, stellen nämlich bestimmt für den Sauerstoffhaushalt eines Sees eine geringere Belastung dar als solche, die rasch absinken. THOMAS [167] schreibt denn auch, beim Abfließen des im Zürichsee an die Oberfläche getretenen *Oscillatoria*-materials durch die Limmat dürfte in einem günstigen Herbst etwa die Hälfte der Burgunderblutalgen erfasst werden. In diesem Sinne wäre die *Oscillatoria*-entwicklung vergleichbar mit einer biologischen Reinigungsanlage – bei jährlich einmaliger Beschickung (vor der Sommerstagnation) und einmaliger 50prozentiger Entleerung (nach der Herbstvollzirkulation). Genauere statistische Erhebungen über *Oscillatoria*-bestand und Abschwemmung sind allerdings noch nicht publiziert worden.

Neben kultivierungstechnischen Neuerungen und qualitativen Angaben über die Milieuansprüche von *O. rubescens* bringt die vorliegende Arbeit auch Resultate einiger quantitativer Untersuchungen über wachstumsbegrenzende Faktoren. Die in dieser Richtung vorliegenden Ergebnisse lassen insofern noch keine sehr weitgehenden Schlussfolgerungen zu, als das Beobachtungsmaterial eigentlich noch um ein Vielfaches vermehrt werden sollte. Es können auch keine direkt vergleichbaren Werte aus der Literatur zur Diskussion herangezogen werden; die hier publizierten Daten über wechselnden Stickstoff- und Phosphorgehalt von *Oscillatoria*-zellen in Kulturen und in Seen mögen immerhin anregen, dass bei der Diskussion über Minimumstoffe in den Gewässern nicht einseitig ein Hauptaugenmerk auf den Phosphor gelegt wird, dass die Bestrebungen zur Verbesserung der Abwasserreinigungsanlagen auch auf den Stickstoff als möglichen wachstumsbegrenzenden Faktor Rücksicht nehmen, vor allem aber, dass die chemische Analyse des Planktonmaterials zur Beurteilung der Nährstoffverhältnisse in Seen vermehrt herangezogen wird.

VI. Zusammenfassung

1. Die ökologischen und physiologischen Probleme, welche sich angesichts der auffallenden Massenvermehrung von *O. rubescens*, der sog. Burgunderblutalge, in vielen mehr und mehr eutrophierten Gewässern stellen, werden umrissen.
2. Allgemeine Arbeitsmethoden, die zur experimentellen Bearbeitung dieses

Problemkreises dienlich sind, z. B. die Kontrolle des Algenwachstums in Flüssigkeitskulturen durch Messung der optischen Dichte, werden beschrieben.

3. Nach einer kurzen Darstellung des heutigen Standes der Blaualgenkulturmethodik und Hinweisen auf Erfahrungen anderer Autoren mit der Kultivierung von *O. rubescens* werden schrittweise Methoden zur Gewinnung von Reinkulturen dieser planktischen Blaualge entwickelt.

Vorbereitungskulturen können frei von Grünalgen, Pilzen und Protozoen gehalten werden durch Zusatz von Actidion (50 mg/l) zur flüssigen Nährlösung. Eine einfache, mineralische Lösung mit Anfangs-pH-Wert um 8,3, Temperaturen um 20°C und eine Beleuchtungsstärke von rund 1500 Lux werden als günstig befunden. Es gelingt, auf Agarsubstraten einzelne *O.-rubescens*-Fäden zu isolieren und in flüssiger Nährlösung zur Entwicklung zu bringen.

Ausgehend von diesen Klonkulturen wird dann versucht, Begleitbakterien mit Bestrahlung durch Ultraviolettlicht auszuschalten, was nur teilweise gelingt. Waschversuche mit dem Mikromanipulator bringen keinen Fortschritt.

Schliesslich wird die Methode der Anwendung von Antibiotika mittels Filterpapierblättchen auf Agarsubstraten eingesetzt. Einige Antibiotika, insbesondere Aureomycin, versprechen gute bakterizide Wirkung auf die Begleitflora auszuüben, ohne die Blaualge selbst zu stark zu schädigen. Aus einer grossen Anzahl von *O.-rubescens*-Einzelfäden, die kombinierte Reinigungsprozesse mit UV-Bestrahlung und verschiedenen Antibiotika zu durchlaufen haben, geht ein einziger bakterienfreier Stamm hervor (behandelt mit Polymyxin, Aureomycin und Chloromycetin nach vorangehender UV-Bestrahlung). In 22 verschiedenen Testsubstraten kommen keine Begleitbakterien zur Entwicklung.

4. Die ernährungsphysiologischen Verhältnisse werden zunächst qualitativ beim reinkultivierten *O.-rubescens*-Stamm untersucht. Danach kann dieser Organismus als *photolithoautotroph (sensu stricto)* bezeichnet werden. Eine Fähigkeit zur Assimilation von gasförmigem Stickstoff kann nicht nachgewiesen werden.

Es folgen einige quantitative Untersuchungen über verschiedene wachstumskontrollierende bzw. -begrenzende chemische Faktoren:

Aus einem Vergleich des Natrium- und Kaliumbedarfes ist ersichtlich, das höchstens Spuren von Natrium benötigt werden, während bei den hier gewählten Versuchsbedingungen erst beträchtliche Kaliumkonzentrationen (ca. 10 mg/l) ein maximales Wachstum ermöglichen.

Für Kalzium wird eine optimale Konzentration von rund 4 mg/l ermittelt, was deutlich unter dem Durchschnitt der normalen Konzentrationen in natürlichen Gewässern liegt.

Für die Nährelemente Stickstoff und Phosphor werden optimale Anfangskonzentrationen (in der Nährlösung) von ca. 30 mg/l N (2,0 bis 2,5 mM/l NO_3^-) bzw. 3 mg/l P (0,1 mM/l PO_4^{3-}) bestimmt. Analysen des Zellmaterials bezüglich Gesamtstickstoff und -phosphor lassen Konzentrationen von 5 bis 6% N bzw. 0,1 bis 0,3% P im Algen-Trockengewicht als wachstumbegrenzend erscheinen.

Der Stickstoffgehalt von vergleichsweise analysiertem *Oscillatoria*-material aus dem Zürichsee nähert sich im Lauf der Sommerstagnation (1958) langsam der experimentell ermittelten wachstumbegrenzenden Konzentration, wogegen sich für den Phosphorgehalt keine entsprechende Entwicklung nachweisen lässt. Im untersuchten Fall wird daher eher Stickstoff als Phosphor das Algenwachstum begrenzen.

5. Im Hinblick auf die Gewässersanierung wird betont, dass nach den hier gewonnenen ernährungsphysiologischen Erkenntnissen die Massentwicklung von «Burgunderblutalgen» in eutrophierten Seen sich nur dann eindämmen lässt, wenn ganz allgemein die Zufuhr von Nährstoffen – auch von anorganischen Düngstoffen – vermindert wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ALGÉUS, S., *Studies on the cultivation of algae in artificial light*, *Physiol. Plant.* 4, 742–753 (1951).
- [2] AL KHOLY, A. A., *On the assimilation of phosphorus in Chlorella pyrenoidosa*, *Physiol. Plant.* 9, 137–143 (1956).
- [3] ALLEN, M. B., *The cultivation of Myxophyceae*, *Arch. Mikrobiol.* 17, 34–53 (1952).
- [4] ALLEN, M. B., *Photosynthetic nitrogen fixation by blue-green algae*, *Sc. Monthly* 83, 100–106 (1956).
- [5] ALLEN, M. B. und ARNON, D. I., *Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen-fixation by Anabaena cylindrica Lemm.*, *Plant Physiol.* 30, 366–372 (1955).
- [6] ALLEN, M. B. und ARNON, D. I., *II. The sodium requirement of Anabaena cylindrica*, *Physiol. Plant.* 8, 653–660 (1955).
- [7] ALLISON, F. E., HOOVER, S. R. und MORRIS, H. J., *Physiological studies with the nitrogenfixing alga, Nostoc muscorum*, *Bot. Gaz.* 98, 433–463 (1937).
- [8] BACHMANN, H., *Das «Burgunderblut» im Baldeggersee*, *Biol. Centralbl.* 7, 230–241 (1897).
- [9] BACHMANN, H., *Eine Wasserblüte von Oscillatoria rubescens D. C. im Rotsee*, *Verh. Schweiz. Naturf. Ges.* 1, 1–2 (1910).
- [10] BACHMANN, H., *«Burgunderblut» im Rothsee bei Luzern*, *Naturw. Wochenschr.* 9, 602–604 (1910).
- [11] BACHMANN, H., *Hydrobiologische Untersuchungen am Rotsee*, *Schweiz. Z. Hydrol.* 5, 39–81 (1931).
- [12] BALLY, W., *Der obere Zürichsee. Beiträge zu einer Monographie*, *Arch. Hydrobiol.* 3, 113–178 (1907).
- [13] BARKLEY, F. A., *Algal Culture Notes*, *Lloydia* 19, 150–156 (1956).
- [14] BEHRE, K. und WEHRLE, E., *Welche Faktoren entscheiden über die Zusammensetzung von Algengesellschaften? Zur Kritik algenökologischer Fragestellungen*, *Arch. Hydrobiol.* 39, 1–23 (1942).
- [15] BENECKE, W., *Über Culturbedingungen einiger Algen*, *Bot. Zeit.* 56, 83–96 (1898).
- [16] BILLINGS, W. D., *Physiological ecology*, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 8, 375–392 (1957).
- [17] BOLD, H. C., *The cultivation of algae*, *Bot. Rev.* 8, 69–138 (1942).
- [18] BRIAN, P. W., *Effect of antibiotics on plants*, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8, 413–426 (1957).
- [19] BRUNEL, J., PRESCOTT, G. W. und TIFFANY, L. H. ED., *The culturing of algae. A symposium*, Ch. F. Kettering Foundation (1950).
- [20] BURKHOLDER, P. R., *Movements in the Cyanophyceae*, *Quart. Rev. Biol.* 9, 438–459 (1934).
- [21] BURLEW, J. S., ED., *Algal culture from laboratory to pilot plant*, *Carnegie Inst. Washington* (1953).
- [22] CANABAEUS, L., *Über die Heterocysten und Gasvakuolen der Blaualgen und ihre Beziehungen zueinander*, *Pflanzenforsch. H.* 13 (1929).
- [23] DE CANDOLLE, A.-P., *Notice sur la matière qui a coloré en rouge le lac de Morat au printemps de 1825*, *Mém. Soc. phys. hist. nat. Genève* 3, 29–37 (1825).

- [24] CATALDI, M. S., *Aislamiento en cultivo puro de Cianofíceas y algas monocelulares*, De Darwiniana, Buenos Aires, 5, 228-239 (1941).
- [25] CHABEREK, S., JR., BERSWORTH, F. C. und MARTELL, A. E., *Chelating agents as metal buffers in biological systems. I. Principles and use of ethylene diamine tetraacetic acid*, Arch. Biochem. Biophys. 55, 321-337 (1955).
- [26] CHU, S. P., *The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae, I. Methods and culture media*, J. Ecol. 30, 284-325 (1942).
- [27] CLAUSEN, O. G., *Modified hydrosulfite medium (Bonnel) as a new aerobic and anaerobic control medium for sterility tests*, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 38, 107-118 (1956).
- [28] Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 11, 302-303 (1946) (*Nomenclature of nutritional types of microorganisms*).
- [29] *Continuous Cultivation of Microorganisms. A Symposium*, Publ. house of the czechoslovak academy of sciences, Prag (1958).
- [30] COPELAND, J. J., *Nitrogen fixation by Myxophyceae*, Amer. J. Bot. (Suppl.) 19, 844 (1932).
- [31] DE, P. K., *The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice-fields*, Proc. Roy. Soc. B, 127, 121-139 (1939).
- [32] DILLER, V. M. und KERSTEN, H. J., *Turbidimetric determination of dry weight of algae*, Plant Physiol. 29, 492 (1954).
- [33] DODD, J. D., *A clue to the mechanism of movement in Oscillatoria*, Phycol. News Bull. 8, 6-7 (1955).
- [34] DREWS, G., *Zur Kultur der Cyanophyceen*, Naturwiss. 42, 397 (1955).
- [35] DROOP, M. R., *A note on the isolation of small marine algae and flagellates for pure cultures*, J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 33, 511-514 (1954).
- [36] DUBÉ, J. F., *Observations on a chlorophyll deficient strain of Chlorella vulgaris obtained after treatment with Streptomycin*, Science 116, 278-279 (1952).
- [37] EDMONDSON, W. T., ANDERSON, G. C. und PETERSON, D. R., *Artificial eutrophication of lake Washington*, Limnol. Oceanogr. 1, 47-53 (1956).
- [38] EMEIS, C. C., *Untersuchungen für die antibakteriellen Eigenschaften der Algen*, Arch. Hyg. Bakt. 140, 597-604 (1956).
- [39] EYSTER, C., *Necessity of boron for Nostoc muscorum*, Nature 170, 755 (1952).
- [40] FINDENEGG, I., *Untersuchungen über die Ökologie und die Produktionsverhältnisse des Planktons im Kärntner Seengebiet*, Int. Rev. Hydrobiol. Hydrogr. 43, 368-429 (1943).
- [41] FINDENEGG, I., *Über die Lichtansprüche planktischer Süßwasser-algen*, Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Kl., Abt. I, 155, 159-171 (1947).
- [42] FINDENEGG, I., *Kärntner Seen naturkundlich betrachtet*, Carinthia II, H. 15, Klagenfurt (1953).
- [43] FISH, G. R., *A method for obtaining bacteria-free cultures of a marine flagellate and Enteromorpha intestinalis using penicillin*, Acta Horti Gothoburg. 18, 81-89 (1948).
- [44] FLINT, L. H. und MORELAND, C. F., *Antibiosis in the blue-green algae*, Amer. J. Bot. 33, 218 (1946).
- [45] FOGG, G. E., *Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I. Nitrogen fixation by Anabaena cylindrica Lemm.*, J. Exptl. Biol. 19, 78-87 (1942).
- [46] FOGG, G. E., *The metabolism of algae*, London/New York (1953).
- [47] FOGG, G. E., *Nitrogen fixation by photosynthetic organisms*, Ann. Rev. Plant Physiol. 7, 51-70 (1956).

- [48] FOGG, G. E., *The comparative physiology and biochemistry of the blue-green algae*, Bact. Revs. 20, 148–165 (1956).
- [49] FOGG, G. E. und TUN, T., *Photochemical reduction of elementary nitrogen in the blue-green alga Anabaena cylindrica*, Biochim. et Biophys. Acta 30, 209–210 (1958).
- [50] FOTER, M. J., PALMER, C. M. und MALONEY, T. E., *Antialgal properties of various antibiotics*, Antibiotics & Chemotherapy 3, 505–508 (1953).
- [51] FREDRICK, J. F., *Effect of surface activity and chelation phenomena on the activity of the polyglucoside-synthesizing enzymes of Oscillatoria*, Physiol. Plant. 10, 844–857 (1957).
- [52] FUJIMOTO, Y., IWAMOTO, H. und ISHII, T., *Studies on the growth of Chlorella by continuous cultivation II*, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 20, 19–24 (1956).
- [53] FUJIMOTO, Y., IWAMOTO, H. und KATO, A., *Studies on the growth of Chlorella by continuous cultivation I*, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 20, 13–18 (1956).
- [54] FUJISHIGE, H., TERADA, T., NISHIMURA, M. und UEMURA, T., *Effect of amino acids and streptomycin on chlorophyll formation in Euglena*, Biol. J. Okayama Univ. 3, 209–222 (1957).
- [55] GAERTNER, A., *Einige physiologische und morphologische Beobachtungen an Kulturen niederer Phycomyceten (Rhizopodium, Phlyctochytrium)*, Arch. Mikrobiol. 21, 167–177 (1954).
- [56] GERLOFF, G. C., FITZGERALD, G. P. und SKOOG, F., *The isolation, purification and culture of blue-green algae*, Amer. J. Bot. 37, 216–218 (1950).
- [57] GERLOFF, G. C. und SKOOG, F., *Cell contents of nitrogen and phosphorus as a measure of their availability for growth of Microcystis aeruginosa*, Ecology 35, 348–353 (1954).
- [58] GERLOFF, G. C. und SKOOG, F., *Availability of iron and manganese in southern Wisconsin lakes for the growth of Microcystis aeruginosa*, Ecology 38, 551–556 (1957).
- [59] GERLOFF, G. C. und SKOOG, F., *Nitrogen as a limiting factor for the growth of Microcystis aeruginosa in southern Wisconsin lakes*, Ecology 38, 556–561 (1957).
- [60] GIBOR, A., *The culture of brine algae*, Woods Hole Oceanogr. Inst. Biol. Bull. 111, 223–229 (1956).
- [61] GOLDBERG, E. D., *Iron assimilation by marine diatoms*, Woods Hole Oceanogr. Inst. Bull. 102, 243–248 (1952).
- [62] GOLDZWEIG-SHELUBSKY, M., *The use of antibiotic substances for obtaining monoalgal bacteria-free cultures*, Palestine J. Bot. 5, 129–131 (1951).
- [63] GRIM, J., *Vermehrungsleistungen planktischer Algenpopulationen in Gleichgewichtsperioden*, Arch. Hydrobiol. Suppl. 20, 238–260 (1954).
- [64] GROSS, F. und KOCZY, F. F., *Photometric measurements of the growth of phytoplankton cultures*, Göteborg Vet. Samh. Handl. (B) 5, H. 2, 1–18 (1946).
- [65] GUPTA, U. S., MAHESHWARI, K. L. und SENGUPTA, S. R., *A method for obtaining algal cultures free from associated microorganisms*, Current Sci. 25, 94 (1956).
- [66] HARDER, R., *Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich dem endophytischen Nostoc punctiforme*, Z. Bot. 9, 145–242 (1917).
- [67] HARDER, R. und OPPERMANN, A., *Über antibiotische Stoffe bei den Grünalgen Stichococcus bacillaris und Protosiphon botryoides*, Arch. Mikrobiol. 19, 398–401 (1953).
- [68] HAUPT, W., *Bewegungen*, Fortschr. Bot. 20, 281–304 (1958).
- [69] HAUPT, W., *Die Phototaxis der Algen*, in: Handbuch der Pflanzenphysiologie 17/1, 318–370 (Berlin 1959).

- [70] HOLM-HANSEN, O., GERLOFF, G. C. und SKOOG, F., *Cobalt as an essential element for blue-green algae*, *Physiol. Plant.* 7, 665–675 (1954).
- [71] HUBER-PESTALOZZI, G., *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 1. Teil. Allg. Teil, Blaualgen, Bakterien, Pilze*, *Die Binnengewässer* 16, 1. Teil (Stuttgart 1938).
- [72] HUGHES, E. O., GORHAM, P. R. und ZEHNDER, A., *Toxicity of a unialgal culture of Microcystis aeruginosa*, *Can. J. Microbiol.* 4, 225–236 (1958).
- [73] HUTCHINSON, G. E., *The mechanisms of intermediary metabolism in stratified lakes*, *Ecol. Monographs* 11, 21–60 (1941).
- [74] HUTNER, S. H., PROVASOLI, L. und FILFUS, J., *Nutrition of some phagotrophic fresh-water chrysoomonads*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 56, 852–862 (1953).
- [75] JAAG, O., *Recherches experimentales sur les gonidies des lichens appartenant aux genres Parmelia et Cladonia*, Thèse (Univ. Genève 1929).
- [76] JAAG, O., *Die neuere Entwicklung und der heutige Zustand der Schweizer Seen*, *Verh. Int. Ver. Limnol.* 10, 192–209 (1949).
- [77] JAAG, O., *Die Notwendigkeit des Gewässerschutzes und unser Ziel der Abwasserreinigung in der Schweiz*, *Schweiz. Baubl. Nr.* 38 (1952).
- [78] JAAG, O., *Die neuere Entwicklung und der heutige Zustand schweizerischer Gewässer. Gewässerschutz in der Schweiz*, *Gas- u. Wasserfach H.* 6 (1952).
- [79] JAAG, O., *Die Gewässer. Stoffhaushalt und Biologie*, in: *Fisch und Fischerei* 135–164 (Zürich 1953).
- [80] JAAG, O., *Der derzeitige Zustand der schweizerischen Gewässer*, in: *Fisch und Fischerei* 343–354 (Zürich 1953).
- [81] JAAG, O., *Die Verunreinigung der Oberflächengewässer und des Grundwassers*, *Veröff. Schweiz. Verwaltungskurse HHS* 17, 1–28 (1954).
- [82] JAAG, O., *La crise des lacs et rivières de l'Europe centrale*, *Bull. Francais de Pisciculture* no. 177, 129–140 (1955).
- [83] JAAG, O., *Lo stato fisico, chimico e biologico attuale del Lago di Lugano*, *L'Acquicoltura Ticinese* 42, 6–12 (1958).
- [84] JAAG, O. und NIPKOW, F., *Neue und wenig bekannte parasitische Pilze auf Planktonorganismen schweizerischer Gewässer I*, *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 61, 478–498 (1951).
- [85] JACOBSON, L., *Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylenediamine tetra-acetate*, *Plant Physiol.* 26, 411–413 (1951).
- [86] JAKOB, H., *Etudes sur certaines substances métaboliques libérées dans le milieu de culture par le Nostoc muscorum Ag.*, *Compt. rend.* 244, 1968–1969 (1957).
- [87] JØRGENSEN, E. G., *Growth inhibiting substances formed by algae*, *Physiol. Plant.* 9, 712–726 (1956).
- [88] KAIN, J. M. und FOGG, G. E., *Studies on the growth of marine phytoplankton. I. Asterionella japonica Gran.*, *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 37, 397–413 (1958).
- [89] KAIN, J. M. und FOGG, G. E., *II. Isochrysis galbana Parke*, *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 37, 781–788 (1958).
- [90] KETCHUM, B. H., *Mineral nutrition of phytoplankton*, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 5, 55–74 (1954).
- [91] KINGSBURY, J. M. und BARGHOORN, E. S., *Silica gel as a microbiological medium: potentialities and a new method of preparation*, *Appl. Microbiol.* 2, 5–8 (1954).
- [92] KINNE, O., *Physiologische Oekologie – ein modernes Forschungsgebiet. Gedanken zur Problematik und Methodik der Oekologie*, *Biol. Zentralbl.* 76, 475–485 (1957).

- [93] KINNE-DIETRICH, E. M., *Beiträge zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie mariner Blaualgen*, Kieler Meeresf. 11, 34–47 (1955).
- [94] KLINKHAMMER, F., *Experimente mit pflanzlichen Mikroorganismen. I. Die Reinkultur von Algen*, Mikrokosmos 45, 231–236 (1956).
- [95] KLUYVER, A. J. und VERHOEVEN, W., *Studies on true dissimilatory nitrate reduction. IV. On adaptation in Micrococcus denitrificans*, Antonie van Leeuwenhoek 20, 337–358 (1954).
- [96] KOLKWITZ, R., *Oekologie der Saprobien. Über die Beziehungen der Wasserorganismen zur Umwelt*, Schr.-reihe Ver. Wasser-, Boden- u. Lufthyg., Nr. 4 (Stuttgart 1950).
- [97] KRATZ, W. A. und MYERS, J., *Nutrition and growth of several blue-green algae*, Amer. J. Bot. 42, 282–287 (1955).
- [98] KRAUSS, R. W., *Chelates as a source of micronutrients to algae*, Phycol. Soc. Amer. News Bull. 10, 27–28 (1957).
- [99] KRAUSS, R. W., *Physiology of fresh-water algae*, Ann. Rev. Plant Physiol. 9, 207–244 (1958).
- [100] KRAUSS, R. W. und GALLOWAY, R. A., *Biological action of polymyxin B*, Science 124, 939 (1956).
- [101] KRUGERS, J. und AGTERDENBOS, J., *Photosensitivity of the iron (III) ethylenediamine tetraacetate complex*, Nature 179, 45 (1957).
- [102] KUHN, H., *Lebenskunde der Gewässer. Eine Einführung in die moderne Limnologie für jedermann* (Zürich 1945).
- [103] LARGAIOLLI, V., *L'oscillatoria rubescens nel Trentino*, Tridentum 5, 112 (1902).
- [104] LEFÈVRE, M., JAKOB, H. und NISBET, M., *Action des substances excrétées en culture par certaines espèces d'algues sur le métabolisme d'autres espèces d'algues*, Verh. Int. Ver. Limnol. 10, 259–264 (1948).
- [105] LEFÈVRE, M., JAKOB, H. und NISBET, M., *Compatibilités et antagonismes entre algues d'eau douce dans les collections d'eau naturelles*, Verh. Int. Ver. Limnol. 11, 224–229 (1950).
- [106] LEFÈVRE, M., JAKOB, H. und NISBET, M., *Auto- et hétéroantagonisme chez les algues d'eau douce*, Ann. Station Centrale Hydrobiol. Appl. 4, 5–197 (1952).
- [107] LEVRING, T., *Some culture experiments with marine plankton diatoms*, Göteb. Kungl. Vetensk. Vitterhets-samh. Handl. Ser. B 3, Nr. 12, 1–18 (1945).
- [108] LIEBMANN, H., *Handbuch der Frischwasser- und Abwasser-Biologie*, Bd. 2 (München 1958/59).
- [109] LUND, J. W. G. und TALLING, J. F., *Botanical limnological methods with special reference to the algae*, Bot. Rev. 23, 489–583 (1957).
- [110] LUNDEGÅRDH, H., *Leaf analysis* (London 1951).
- [111] MACKERETH, F. J. H., *Phosphorus utilization by Asterionella formosa Hass.*, J. Exp. Bot. 4, 296–313 (1953).
- [112] MARCHESONI, V., *La biodinamica dei popolamenti ad Oscillatoria rubescens D. C. nei laghi di caldonazzo e di levico*, Boll. Pesca, Piscicult. Idrobiol. 3, H. 2 (1948).
- [113] MARCHESONI, V., *Eutrofismo e popolamento a Oscillatoria rubescens D. C. nei laghi di Caldonazzo e Levico*, La ricerca scientifica 18, 1023–1028 (1948).
- [114] MÄRKI, E., *Chemische, physikalische und bakteriologische Untersuchungen am Greifensee*, Diss. ETH (1944).
- [115] MC COMBIE, A. M., *Factors influencing the growth of Phytoplankton*, J. Fish. Res. Bd. Can. 10, 253–282 (1953).

- [116] MESSIKOMMER, E., *Die Algenflora des Zürichsees bei Zürich*, Schweiz. Z. Hydrol. 16, 27–63 (1954).
- [117] MINDER, L., *Der Zürichsee im Lichte der Seetypenlehre*, Neujahrsbl. Naturf. Ges., Zürich 145, (1943).
- [118] MONOD, J., *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes* (Paris 1942).
- [119] MONOD, J., *The growth of bacterial cultures*, Ann. Rev. Microbiol. 3, 371–394 (1949).
- [120] MONOD, J., *La technique de culture continue. Théorie et applications*. Ann. Inst. Pasteur 79, 390–410 (1950).
- [121] VAN NIEL, C. B., *The kinetics of growth of micro-organisms*, in: The chemistry and physiology of growth (Princeton Univ. Press 1949).
- [122] NIELSEN, E. S., *An effect of antibiotics produced by plankton algae*, Nature 176, 553 (1955).
- [123] OLSON, F. C. W., *Quantitative estimates of filamentous algae*, Trans. Amer. Micr. Soc. 69, 272–279 (1950).
- [124] ÖSTERLIND, S., *Growth conditions of the alga Scenedesmus quadricauda with special reference to the inorganic carbon sources*, Symb. Bot. Upsal. 10, 1–141 (1949).
- [125] PAPPAS, G. D. und HOFFMANN, H., *Anwendung von Antibiotica zur Gewinnung bakterienfreier Euglenakulturen*, Ref. Chem. Zentralbl. 124, 1351 (1953).
- [126] PHELPS, A., *Growth of protozoa in pure culture. II. Effect upon the growth curve of different concentrations of nutrient materials*, J. Exp. Zool. 72, 479–496 (1936).
- [127] PHILLIPS, J. R., JR. und MYERS, J., *Measurement of algal growth under controlled steady-state conditions*, Plant Physiol. 29, 148–152 (1954).
- [128] PINTNER, I. J. und PROVASOLI, L., *Artificial cultivation of a red-pigmented marine blue-green alga, Phormidium persicinum*, J. gen. Microbiol. 18, 190–197 (1958).
- [129] PIRSON, A., *Kultur und Stoffwechsel von Algen*, Z. Bot. 44, 140–144 (1956).
- [130] PRINGSHEIM, E. G., *Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. III. Mitteilung. Zur Physiologie der Schizophyceen*, Beitr. Biol. Pfl. 12, 49–108 (1913).
- [131] PRINGSHEIM, E. G., *Pure cultures of algae* (Cambridge 1946).
- [132] PRINGSHEIM, E. G., *Algenkulturen*, Endeavour 9, 140–145 (1950).
- [133] PRINGSHEIM, E. G., *Methods for the cultivation of algae*, in: Manual of Phycology, 347–357 (Waltham, Mass. 1951).
- [134] PRINGSHEIM, E. G., *Algenreinkulturen. Ihre Herstellung und Erhaltung* (Jena 1954).
- [135] PROVASOLI, L., *Alcune considerazioni sui caratteri morfologici e fisiologici delle alghe*, Boll. Zool. Agr. Bachicolt. 22, 143–188 (1957).
- [136] PROVASOLI, L., *Nutrition and ecology of protozoa and algae*, Ann. Rev. Microbiol. 12, 279–308 (1958).
- [137] PROVASOLI, L., HUTNER, S. H. und PINTNER, I. J., *Destruction of chloroplasts by streptomycin*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16, 113–120 (1951).
- [138] PROVASOLI, L., HUTNER, S. H. und SCHATZ, H., *Streptomycininduced chlorophyll-less races of Euglena*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 69, 279–282 (1948).
- [139] PROVASOLI, L., McLAUGHLIN, J. J. A. und DROOP, M. R., *The Development of artificial media for marine algae*, Arch. Mikrobiol. 25, 392–428 (1957).
- [140] PROVASOLI, L., PINTNER, I. J. und PACKER, L., *Use of antibiotics in obtaining pure cultures of algae and protozoa*, Proc. Amer. Soc. Protozool., 2, 6 (1951).
- [141] REISNER, G. S. und THOMPSON, J. F., *The large scale laboratory culture of Chlorella under conditions of micronutrient element deficiency*, Plant Physiol. 31, 181–185 (1956).

- [142] RITTER, W. und DORNER, W., *Behebung eines wichtigen Nachteils des anaeroben Pyrogallolverschlusses*, Zbl. Bakt. I. Orig. 125, 379–383 (1932).
- [143] ROBBINS, W. J., *Growth substances in agar*, Amer. J. Bot. 26, 772–778 (1939).
- [144] RODHE, W., *Environmental requirements of fresh-water planktonic algae*, Symb. Bot. Upsal. 10, Nr. 2, 1–149 (1948).
- [145] RUSCHMANN, G., *Beiträge zur Mikrobiologie der Chlorella. I. Mitteilung: Chlorella-Rein- und Robkulturen*, Biol. Zentralbl. 75, 129–149 (1956).
- [146] RUTTNER, F., *Limnologische Studien an einigen Seen der Ostalpen*, Arch. Hydrobiol. 32, 167–319 (1937).
- [147] SAUNDERS, G. W., *Interrelations of dissolved organic matter and phytoplankton*, Bot. Rev. 23, 389–409 (1957).
- [148] SCHERINGA, K., *Over Nitraatbepalingen in drinkwater*, Pharm. Weekbl. 67, 1362–1363 (1930).
- [149] SCHREIBER, E., *Die Reinkultur von marinem Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers*, Wiss. Meeresunters. N. F. Abt. Helgoland 16, 1–34 (1927).
- [150] SCHREIBER, E., *Die Methoden der physiologischen Meerwasseranalyse*, Rapp. Cons. Int. Explor. Mer 53, 75–79 (1929).
- [151] SCHULZ, G., *Bewegungsstudien sowie elektronenmikroskopische Membranuntersuchungen an Cyanophyceen*, Arch. Mikrobiol. 21, 335–370 (1955).
- [152] SCHWABE, G. H., *Schizophyceen als ökologische Indikatoren und als Testorganismen*, Arch. Hydrobiol. 42, 474–482 (1949).
- [153] SOROKIN, C. und MYERS, J., *Characteristics of a high-temperature strain of chlorella*, Carnegie Inst. Wash. Yearbook 53, 177–179 (1954).
- [154] SPENCER, C. P., *On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms*, J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 31, 97–106 (1952).
- [155] SPENCER, C. P., *Studies on the cultures of a marine diatom*, J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 33, 265–290 (1954).
- [156] SPENCER, C. P., *Utilization of trace elements by marine unicellular algae*, J. Gen. Microbiol. 16, 282–285 (1957).
- [157] STEEMANN NIELSEN, E., *An effect of antibiotics produced by plankton algae*, Nature 176, 553 (1955).
- [158] STEEMANN NIELSEN, E., *The production of antibiotics by plankton algae and its effect upon bacterial activities in the sea*, Pap. Mar. Biol. Oceanogr. Deep-Sea Res. Suppl. 3, 281–286 (1955).
- [159] STEINER, H., *Das Plankton und die makrophytische Uferflora des Luganersees*, Diss. ETH (1912).
- [160] TAYLOR, C. B., *Bacteriology of fresh water. I. Distribution of bacteria in english lakes*, J. Hyg. 40, 616 (1940).
- [161] TEMPLE, K. L., *A new method for the preparation of silica gel plates*, J. Bact. 57, 383 (1949).
- [162] THOMAS, E. A., *Beitrag zur Kenntnis des Planktons dreier Zürcher Seen*, Schweiz. Z. Hydrol. 9, 34–49 (1941).
- [163] THOMAS, E. A., *Untersuchungen der öffentlichen Gewässer des Kantons Zürich. X. Biologische Untersuchungen am Greifensee*, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 54, 141–196 (1944).
- [164] THOMAS, E. A., *Regionallimnologische Studien an 25 Seen der Nordschweiz*, Verh. int. Ver. Limnol. 10, 489–495 (1949).

- [165] THOMAS, E. A., *Auffällige biologische Folgen von Sprungschichtneigungen im Zürichsee*, Schweiz. Z. Hydrol. 12, 1–24 (1950).
- [166] THOMAS, E. A., *Zur Bekämpfung der See-Eutrophierung: Empirische und experimentelle Untersuchungen zur Kenntnis der Minimumstoffe in 46 Seen der Schweiz und angrenzender Gebiete*, Monatsbull. Schweiz. Ver. Gas- u. Wasserfachm. 33, 25–32 (1953).
- [167] THOMAS, E. A., *Der Zürichsee, sein Wasser und sein Boden*, Jahrb. vom Zürichsee 17, 173–208 (1956/57).
- [168] THOMAS, E. A., *Versuche mit Plankton-Test-Loten im Baldeggersee. Erster Teil, vom 19. März bis 31. Mai 1958*, Vierteljahrsschr. Naturf. Ges. Zürich 104, 330–340 (1959).
- [169] THOMAS, E. A. und MÄRKI, E., *Der heutige Zustand des Zürichsees*, Verh. int. Ver. Limnol. 10, 476–488 (1949).
- [170] TOMAN, M., *Teorie pohybu Oscillatorii*, Arb. II. Sekt. Slowak. Wiss. Akad. Biol. Ser. 1, 5–24 (1955).
- [171] TOMISEK, A., REID, M. R., SHORT, W. A. und SKIPPER, H. E., *Studies on the photosynthetic reaction. III. The effects of various inhibitors upon growth and carbonate fixation in Chlorella pyrenoidosa*, Plant Physiol. 32, 7–10 (1957).
- [172] ULRICH, A., *Physiological bases for assessing the nutritional requirements of plants*, Ann. Rev. Plant Physiol. 3, 207–228 (1952).
- [173] UNGAR, E., *Ökologisch-physiologische Versuche mit Oscillatoria rubescens D. C.*, Inst. f. Spez. Bot., ETH Zürich, unveröffentlicht (1951).
- [174] UTERMÖHL, H., *Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik*, Mitt. int. Ver. Limnol. Nr. 9 (1958).
- [175] VOLLENWEIDER, R. und WOLFF, H., *Zur Methodik der Planktonstatistik. Kritische Bemerkungen zur Verwendung des sogenannten Zürchertrichters*, Schweiz. Z. Hydrol. 11, 254–262 (1949).
- [176] VOLLENWEIDER, R. A., *Ökologische Untersuchungen von planktischen Algen auf experimenteller Grundlage*, Schweiz. Z. Hydrol. 12, 193–262 (1950).
- [177] WALKER, J. B., *Inorganic micronutrient requirements of Chlorella. I. Requirements for Calcium (or Strontium), Copper, and Molybdenum*, Arch. Biochem. Biophys. 46, 1–11 (1953).
- [178] WARIS, H., *The significance for algae of chelating substances in the nutrient solution*, Physiol. Plant. 6, 538–543 (1953).
- [179] WASER, E. und BLÖCHLIGER, G., *Untersuchung des Zürichsees 1936–1938*, Unters. öff. Gewässer Kt. Zürich V (Stäfa 1939).
- [180] WEBSTER, G. C., *Studies on the respiration of blue-green algae*, Amer. J. Bot. 37, 682 (1950).

Addendum zur Arbeit R. Staub, Seite 198a
Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen
an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC.

- [181] WEINSTEIN, L. H., MEISS, A. N., UHLER, R. L., und PURVIS, E. R., *Growth-promoting effects of ethylene-diaminetetraacetic acid*, Nature 178, 1188 (1956).
- [182] WHIFFEN, A. J., *Cellulose decomposition by the saprophytic Cbytrids*, J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 57, 321-331 (1941).
- [183] WIKÉN, T., *Bedarf der Mikroorganismen an Mineralstoffen, besonders an Kalium*, Kalium. Symposium 1954, 123-156.
- [184] WIKÉN, T., und ÖBLÖM, K., *Some observations on effects produced by different kinds of resistance glass upon growth of mycelium and formation of antibacterial substance in cultures of a strain of Penicillium cbryogenum Thom.*, Arkiv för Botanik (A) 33, H. 14, 1-16 (1947).
- [185] WINTER, G., *Über die Assimilation des Luftstickstoffs durch endophytische Blaualgen*, Beitr. Biol. Pfl. 23, 295-335 (1935).
- [186] VON WITSCH, H., *Die Algenkultur*, Handbuch für Pflanzenphysiologie 4, 90-99 (1958).
- [187] WOLFE, M., *The effect of molybdenum upon the nitrogen metabolism of Anabaena cylindrica*. II. *A more detailed study of the action of Molybdenum in nitrate assimilation*, Ann. Bot. (Lond.) 18, 309-325 (1954).
- [188] ZEHNDER, A., und HUGHES, E. O., *Acti-dione, an antibiotic for green algal contaminants in cultures of blue-green algae*, Phycol. Soc. Amer. News Bull. 8, 4 (1955).
- [189] ZEHNDER, A., und HUGHES, E. O., *The antialgal activity of Acti-dione*, Can. J. Microbiol. 4, 399-408 (1958).