

**Anwendung mikropartikulärer Marker zur  
Untersuchung der Verdauungsphysiologie  
von *Brachionus plicatilis* (Rotatoria)**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

**Nicole Anita Lindemann  
aus Duisburg**

**Köln 2001**

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kleinow  
Prof. Dr. M. Dambach  
Prof. Dr. H. Arndt

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2001

*Meiner Familie*



---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abstract</b>		<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>5</b>
2.1	Häufig verwendete Abkürzungen	5
2.2	Chemikalien	6
2.3	Spezielle Materialien	8
<b>2.4</b>	<b>Methoden der mikroskopischen Beobachtung</b>	<b>10</b>
2.4.1	Lichtmikroskop	10
2.4.2	Fluoreszenzmikroskop	10
2.4.3	Mikroskopaufnahmen	10
2.4.4	Untersuchungen mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (LSM)	11
<b>2.5</b>	<b>Tiermaterial</b>	<b>14</b>
2.5.1	Aufzucht der Rädertiere	14
2.5.2	Entnahme der Rädertiere	14
2.5.3	Beobachtung lebender Rädertiere	15
2.5.4	Immobilisieren von Rädertieren mit Na-Dithionit	17
2.5.5	Herstellung des Auflösungspuffers	17
<b>2.6</b>	<b>Vorbereitung der Erythrozyten</b>	<b>18</b>
2.6.1	Gewinnung der Erythrozyten	18
2.6.2	Ermittlung von Kalibriergeraden	18
2.6.3	Fixierung von Erythrozyten mit Glutardialdehyd	19
2.6.4	Erythrozyten-Ghosts	20
2.6.4.1	Präparation von FITC-Albumin	20
2.6.4.2	Lösungen	20
2.6.4.3	Herstellung unbeladener und beladener Ghosts	20
2.6.4.4	Glutardialdehyd-fixierte Ghosts	22
2.6.5	Herstellung der gepufferten Medien für die Fütterungsansätze	23
2.6.6	Fütterungsansätze	23
<b>2.7</b>	<b>Vorbereitung der Hefezellen</b>	<b>26</b>
2.7.1	Herstellung der Hefesuspension	26
2.7.2	Herstellung des Phosphatpuffers nach Sørensen	26
2.7.3	Herstellung des Kaliumphosphatpuffers	26
2.7.4	Anfärben der Hefezellen mit Indikator-Farbstoffen	26
2.7.5	Herstellung von Hefe-Sphäroblasten	28
2.7.6	Fütterungsansätze	28

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Mikroskopische Untersuchung von Partikel- aufnahme und Nahrungspassage durch den Verdauungstrakt</b>	<b>29</b>
3.1.1	Zeitverlauf von Verdauungsvorgängen	29
3.1.2	Einfluss verschiedener Parameter auf die Nahrungspassage	34
3.1.2.1	Ernährungszustand der Rädertiere	34
3.1.2.2	Temperatur des Mediums	36
3.1.2.3	Partikeldichte	38
3.1.2.3.1	Austauschversuche	42
3.1.2.4	Mechanische Aufschließbarkeit der Partikel im Mastax	47
<b>3.2</b>	<b>Photometrische Untersuchung von Partikel- aufnahme und Nahrungspassage durch den Verdauungstrakt</b>	<b>51</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Charakterisierung der optischen Eigenschaf- ten der verwendeten Partikel</b>	<b>51</b>
3.2.1.1	Absorptionsspektren der Erythrozyten bzw. des Hämoglobins	52
3.2.1.2	Kalibrierung der Erythrozyten-Suspension bei 630 und 420 nm	55
<b>3.2.2</b>	<b>Ergebnisse aus den Fütterungsansätzen</b>	<b>63</b>
3.2.2.1	Auswertungsmöglichkeiten für die Fütterungs- versuche mit Erythrozyten	63
3.2.2.2	Bestimmung der Aufnahme rate (Ingestion rate) von <i>B. plicatilis</i>	71
3.2.2.3	Bestimmung der Filtrationsrate (Clearing rate) von <i>B. plicatilis</i>	75
<b>3.2.3</b>	<b>Volumenbestimmung des Verdauungstrakts</b>	<b>82</b>
3.2.3.1	Ausmessen von gefütterten Tieren	82
3.2.3.2	Volumenbestimmung mit Hilfe freigesetzter Hefezellen	86
3.2.3.3	Volumenbestimmung des Verdauungstrakts aus dem Verlauf der 420 nm-Kurve bei den Fütterungsversuchen	88
3.2.3.4	Volumenbestimmung des Verdauungstrakts aus dem Verlauf der 630 nm-Kurve bei den Fütterungsversuchen	90
3.2.3.5	Ermittlung des Füllungsgrades des Verdauungs- trakts nach Extraktion des Hämoglobins	92

---

<b>3.2.4</b>	<b>Einflüsse von Milieufaktoren auf die Nahrungspassage</b>	<b>96</b>
3.2.4.1	Mikroskopische Untersuchung des pH-Wertes in Magen und Intestinum von <i>B. plicatilis</i>	96
3.2.4.2	Einfluss des pH-Wertes im Medium	102
3.2.4.3	Vergleich der Aufnahme- und Filtrationsraten in gepufferten Medien	105
<b>3.2.5</b>	<b>Untersuchung von Resorptionsvorgängen im Verdauungstrakt von <i>B. plicatilis</i></b>	<b>116</b>
3.2.5.1	Resorption von Hämoglobin	116
3.2.5.2	Direkter Nachweis der Resorption von Proteinen	121
<b>3.3</b>	<b>Abschließende Bemerkungen und allgemeine Diskussion</b>	<b>125</b>
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>130</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>132</b>
	Danksagung	
	Erklärung	
	Lebenslauf	

---

## Abstract

Feeding and passage of nutrient particles through the digestive tract of the rotifer *Brachionus plicatilis* were examined by microscopical and photometrical methods using the following types of particles: mammalian (human, bovine, ovine) erythrocytes, erythrocyte-ghosts (loaded with FITC-labelled or unlabelled albumin) and yeast cells.

Erythrocytes are taken up by the rotifers like their natural food particles and they are concentrated by ciliary feeding. Therefore the digestive tract of the rotifers becomes stained intensely red by the released hemoglobin. This enables the microscopical determination of the percentage of rotifers with filled digestive tracts. On the other hand, erythrocytes are destroyed by the mechanical action of the chewing device of rotifers, the mastax. This results in a decrease of the light scattering caused by the erythrocytes which can be recorded photometrically at 630 nm. Thus, by calibrating light scattering with known erythrocyte concentrations, it becomes feasible to determine filtration and ingestion rates of the rotifers. The decrease of erythrocytes within the medium is found to follow first order kinetics. The rate constant is influenced by both the density of rotifers, and the initial density of particles in suspension at the beginning of the experiment. Passage of particles through the digestive tract depend on the supply of fresh particles taken up by the wheel organ. Passage time approximately doubles when the rotifers had no access to fresh particles or when the temperature in the feeding solution was lowered from 20-25 °C to 5-15 °C.

Due to the uptake of erythrocytes by the rotifers also the absorbancy at 420 nm ("Soretband") decreases. After some time, however, free hemoglobin is defecated by the rotifers which results in an increase of the absorbancy at 420 nm. By centrifuging the sample it is furthermore possible to distinguish between the respective absorbancy of erythrocytes and of free hemoglobin. In this way the cycling time of nutrients and the volume of the digestive tract of rotifers can be estimated from the traces of the pertinent curves.

The contents of the digestive tract of *B. plicatilis* can be quickly and easily exchanged by introducing a new type of particle to the medium. Yeast cells were used to replace the erythrocytes in the digestive tract and to examine the ability of the rotifers to control the ingestion of nutrient particles. The usage of bromthymol blue stained yeast cells makes it possible to determine differences in the pH-values of the stomach and the intestine. Furthermore, in feeding experiments these cells are useful to examine the differences in secretion of H<sup>+</sup>-ions by the intestine in culture medium of different molarity. Finally, absorptive processes could be demonstrated by replacing fluorescence-labelled erythrocyte ghosts with unlabelled ghosts, and detecting long-lasting residual fluorescence in stomach cells.

---

## 1. Einleitung

Rädertiere (Rotatorien) sind mikroskopisch kleine, aber hochorganisierte Metazoen mit echten Geweben und Organen wie Nervensystem, Sinnesorganen, Muskeln und Verdauungsorganen. Da viele Rädertiere transparent und klar strukturiert sind, eignen sie sich hervorragend für *in-vivo* Beobachtungen. Aufgrund ihrer Größe (0,2–0,5 mm) können physiologische Vorgänge durch das Mikroskop im lebenden Tier beobachtet werden. Insbesondere die Aufnahme von Partikeln und ihre Passage durch den Verdauungstrakt kann durch einfache Methoden untersucht werden.

Aufnahme- und Filtrationsraten zahlreicher Rädertiere wurden bereits durch den Einsatz verschiedener Futterpartikel ermittelt (Doohan, 1973; Starkweather & Gilbert, 1977 a, b; Bogdan et al., 1980; Wallace & Starkweather, 1983; Starkweather & Kellar, 1983; Haney et al., 1986; Ooms-Wilms et al., 1993; Hansen et al., 1997; Lie et al., 1997). Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Rädertiere Futterpartikel bestimmter Größe bevorzugen, die Art des Partikels aber meist eine untergeordnete Rolle spielt (Hino & Hirano, 1984; Rothhaupt, 1990a, -b und 1995; Vadstein et al., 1993). Allerdings scheinen bei Rädertieren auch Chemosinnesorgane eine Rolle zu spielen, denn manche Partikel werden trotz optimaler Größe abgewiesen.

Die Aufnahme der in den Experimenten verfütterten Partikel wurde entweder mittels radioaktiver Markierung oder durch Ermitteln der Zahl der entfernten Partikel bestimmt. Die Passage durch den Verdauungstrakt wurde durch direktes Beobachten oder durch Messen der aufgenommenen Radioaktivität untersucht.

Eine Übersicht über das Fressverhalten bei Rädertieren liefern Starkweather (1980) und Salt (1987).

An dem Rädertier *Brachionus plicatilis* (O. F. Müller, 1786) wurden bereits eine Reihe morphologischer und biochemischer Untersuchungen durchgeführt, da speziell an dieser Art ein kommerzielles Interesse besteht (es dient als Lebendfutter zur Aufzucht mariner Fischlarven und Krebse; Lubzens et al., 1997).

So beschäftigen sich einige Studien mit dem Einfluss verschiedener Nahrungspartikel, deren Konzentration sowie äußerer Bedingungen auf die Massenzucht (Teshima et al., 1981; Yúfera & Pascual, 1985; Hirayama, 1987; James et al., 1987; Lubzens et al., 1997; Maruyama et al., 1997; Øie & Olsen, 1997; Yúfera et al., 1997; Makridis & Olsen, 1999).

Der Verdauungstrakt von *B. plicatilis* wurde mit Hilfe des Elektronen-Mikroskops untersucht (Kleinow et al., 1991) und es wurden einige hydrolytische Enzyme, die möglicherweise bei der Verdauung eine Rolle spielen, charakterisiert (Hara et al., 1984, 1997; Hino & Hirano, 1984; Kleinow & Kühle, 1984; Kühle, 1987; Kühle & Kleinow, 1985 u. 1989; Wethmar & Kleinow, 1993).

Zur Untersuchung weiterer Aspekte der Verdauung von *B. plicatilis* wurden darüber hinaus Mikrokapseln benutzt (Teshima et al., 1981). Neben solchen künstlichen Kapseln können auch „natürliche“ Mikropartikel zu diesem Zweck eingesetzt werden. So untersuchten Kleinow & Kühle (1984) den pH-Wert der Verdauungsorgane von *B. plicatilis* mit Hilfe von Hefezellen, die mit Indikatorfarbstoffen gefärbt waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung der Verdauungsphysiologie von *B. plicatilis* mit Hefezellen fortgeführt. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich noch weitere Markerpartikel „natürlicher“ Herkunft (modifizierte und unmodifizierte Säugerythrozyten und Erythrozyten-Ghosts) zur Beobachtung der Aufnahme und Weitergabe von Partikeln durch *B. plicatilis* eingesetzt. So war es möglich, die Filtrationsrate der Rädertiere und den Einfluss verschiedener Faktoren darauf zu untersuchen.

Als wichtige Faktoren konnten die Verfügbarkeit von Partikeln im Medium, der pH-Wert und die Pufferkapazität im Verdauungstrakt ermittelt werden. Weiter konnte durch indirekte und direkte Nachweismethoden ein Einblick in die Vorgänge der Resorption bei *B. plicatilis* gewonnen werden.

Die in unseren Versuchen gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass modifizierte Erythrozyten-Ghosts auch zur Untersuchung weiterer Aspekte der Verdauung geeignet sind, wie z.B. der Lokalisierung von hydrolytischen Enzymen in den Verdauungsorganen.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Häufig verwendete Abkürzungen

DTT	1,4-Dithio-DL-Threit(ol)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
LSM	Laser-Scan-Mikroskop
MES	N-Morpholinethansulfonsäure
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRA	Triethanolamin-Hydrochlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

## 2.2 Chemikalien

<b>Hersteller, Substanz</b>	<b>Reinheitsgrad</b>
<u>Appli Chem (Darmstadt)</u>	
Albumin aus Rinderserum	
Citrat (Citronensäure-Monohydrat)	p. a.
DTT	
MES	Pufferqualität
Natriumhydroxid	p. a.
Salzsäure	p. a.
TRA	p. a.
<u>Boehringer (Mannheim)</u>	
Tris	kristallin
<u>Merck (Darmstadt)</u>	
Bromthymolblau	
Bromphenolblau	
Glutardialdehydlösung 25%	
Kaliumchlorid	p. a.
Kaliumhydrogenphosphat	p. a.
Kaliumhydroxid	reinst
Magnesiumsulfat-7-hydrat	p. a.
Natriumcarbonat	p. a.
Natriumchlorid	p. a.
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	p. a.
Natriumhydrogencarbonat	p. a.
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	p. a.
Natriumdithionit	
<u>Sera (Heinsberg)</u>	
Meersalzgemisch	

---

<u>Hersteller, Substanz</u>	<u>Reinheitsgrad</u>
<u>Serva (Heidelberg)</u>	
Chloramphenicol	research grade
Heparin	research grade
SDS	kristallin
Sucrose (Saccharose)	
<u>Sigma (München)</u>	
FITC	
HEPES	
Lyticase (aus <i>Arthrobacter luteus</i> )	
Merthiolat (Timerosal)	
<u>Riedel-de-Haën (Hannover)</u>	
Ammoniumhydrogencarbonat	reinst

Hier nicht aufgeführte Chemikalien stammen (in p. a.-Qualität) von der Firma Merck, Darmstadt.

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Lösungen mit Aqua bidest. angesetzt.

## 2.3 Spezielle Materialien

### BRAND (Wertheim / Main)

Heparinisierte Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Länge:  $75 \pm 1,00$  mm; Innendurchmesser:  $1,15 \pm 0,05$  mm; Außendurchmesser:  $1,55 \pm 0,05$  mm),

Zählkammer, Neubauer (Kammertiefe: 0,1 mm; Zählnetz: 9 Großquadrate je  $1 \text{ mm}^2$ )

### BRAUN (Melsungen)

sterile Blutlanzetten, Solofix

### CORNING COSTAR GmbH (Bodenheim)

Tanswell-Clear Polyestermembran (Durchmesser 24 mm, Porengröße  $0,4 \mu\text{m}$ )

### PLANO (Wetzlar)

Prep-Eze: Körbchen (Typ A) mit einer Maschenweite von  $75 \mu\text{m}$

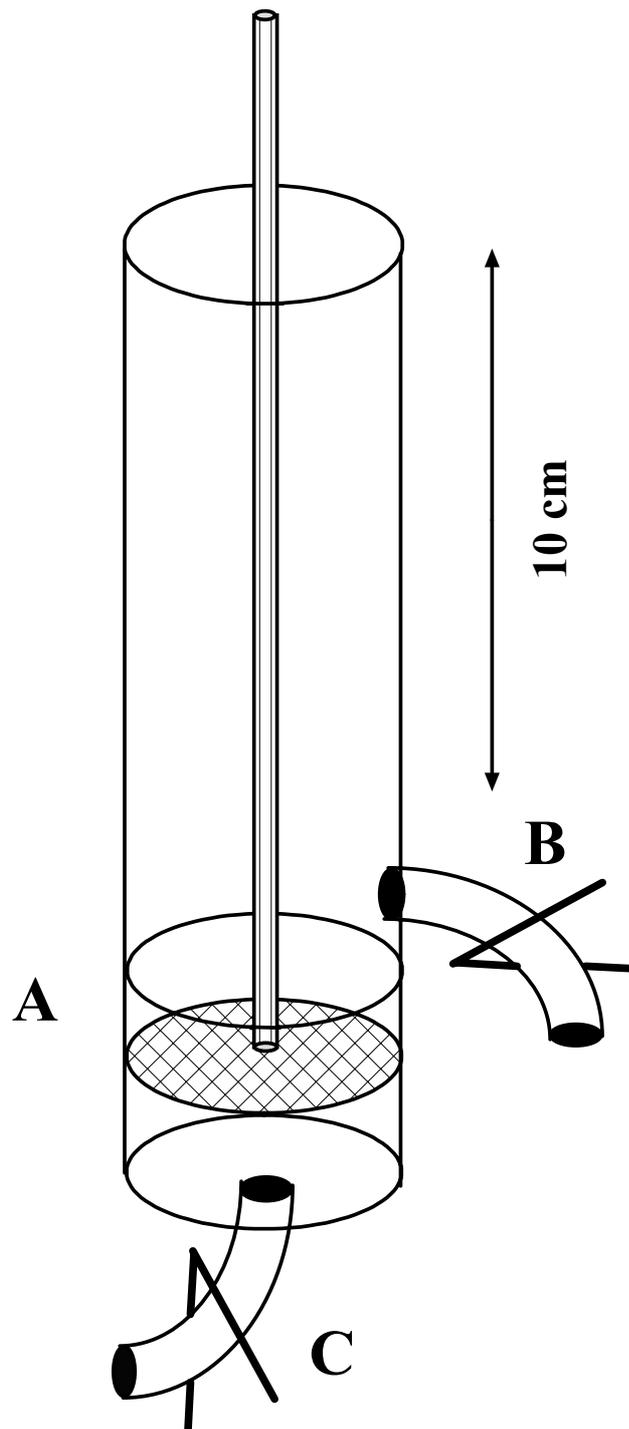
### ROTH (Karlsruhe)

Dialyseschlauch aus Zellulose, Spectra/Por<sup>®</sup> Membrane 3, MWCO:3,500

### Werkstatt des Zoologischen Institutes (Universität zu Köln)

Filterapparatur (Lindemann & Kleinow, 2000), siehe Abbildung 1, bestehend aus einem PE-Rohr mit dicht abschließendem Stempel und zwei verschließbaren Auslässen. Der Stempel ist mit einer Polymon-Gaze bespannt (PES 16/5, Schweizer Seidengazefabrik AG Zürich, Maschenweite  $16 \mu\text{m}$ ).

Kleine Filterapparatur, hergestellt aus einer 5 ml FORTUNA<sup>®</sup> OPTIMA<sup>®</sup> Glasspritze (Walter Graf u. Co. GmbH & Co., Wertheim) mit einem gazebespannten (Polymon Gaze PES 16/5, Schweizer Seidengazefabrik AG Zürich, Maschenweite  $16 \mu\text{m}$ ) PE-Stempel; Spritzenauslauf mit Schlauchquetsche verschließbar.



**Abb. 1:** Filterapparatur zur Konzentrierung von Rädertieren oder zur Entfernung kleiner Partikel (Erythrozyten, Algen oder Hefezellen) aus dem rädertierhaltigen Medium.

**A** – dicht abschließender und mit einer Polymon Gaze (Maschenweite 16  $\mu\text{m}$ ) bespannter Stempel

**B** – Ablauf für Waschmedium

**C** – Ablauf für partikelfreie, konzentrierte Rädertiere

## **2.4 Methoden der mikroskopischen Beobachtung**

### **2.4.1 Lichtmikroskop**

Benutzt wurden:

a) Ein Durchlicht-Mikroskop „Laborlux K“ (Leitz, Wetzlar, Vergrößerung zwischen 40 und 1000×).

b) Ein Durchlicht-Umkehrmikroskop „Wilover“ (Will, Wetzlar, Vergrößerung zwischen 40 und 320×).

### **2.4.2 Fluoreszenzmikroskop**

Die Fluoreszenzuntersuchungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop „Orthoplan“ (Leitz, Wetzlar, Vergrößerungen 63-400×) mit dem Anregungsfilter L2 450-490 (Teiler 510, Sperrfilter 525/20) durchgeführt.

Die Tiere wurden auf Objektträgern unter Deckgläsern beobachtet.

### **2.4.3 Mikroskopaufnahmen**

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden mit einer Minolta X-300 Spiegelreflexkamera mit Leitz Periplan Ojektivaufsatz (GF 12,5×; TL 160 mm 10×).

Zum Einsatz kamen folgende Filme: Ilford PAN F Plus 50 ASA (Schwarz-Weiß-Negativfilm), Kodak EKTAR 100 ISO 100/21° (Farbnegativfilm), Kodak EKTAR 1000-2 (Farbnegativfilm), Kodak Royal Gold 100 ISO 100/21° (Farbnegativfilm), Scotch CHROME 640-T ISO 640/29°, 3200 k (Farb-Diafilm für Glühlampenlicht).

Zur Kompensation des durch das Kunstlicht hervorgerufenen leichten Gelbstichs wurde ein Blaufilter verwendet.

Für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurde eine vollautomatische Mikroskopkamera Orthomat (Leitz, Wetzlar) benutzt, wobei Aufnahmen im Dunkelfeld mit Detail-(Selektiv-)Messung und im Hellfeld mit Integralmessung durchgeführt wurden.

Das verwendete Filmmaterial stammte von Kodak (T-MAX p3200 ISO 3200/36° DIN/ASA 22/125, Schwarz-Weiß-Negativfilm).

#### **2.4.4 Untersuchungen mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (LSM)**

Die Messungen des *in vivo* pH-Wertes bei *Brachionus plicatilis* wurden mit konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen durchgeführt. An der Universität Münster stand ein Odyssey XL (Noran Instruments, USA) zur Verfügung. Die Steuerung und Bilderfassung erfolgte über eine UNIX-Workstation (Indy 4000, SGI) mit der Software Intervision 1.5 (Noran Instruments). In das LSM war ein inverses Mikroskop (Diaphot 200, Nikon) integriert, in dessen Strahlengang drei verschiedene Lichtquellen eingekoppelt werden konnten: (1) nichtkohärentes Durchlicht (Halogenlampe), (2) Fluoreszenzanregungslicht (HG-100 W2- Lampe, Osram mit einem Filtersatz von Nikon: DM 580, BA 590, EX 510-560) und (3) Laserlicht (luftgekühlter Argon-Ionen-Laser). Der Laser konnte Licht der Wellenlängen 453, 488 und 514 nm emittieren (Baumeister, 1999). An der Universität Köln wurden die Messungen an einem LSM 510 (Zeiss, Göttingen, Jena) durchgeführt. Steuerung, Datenerfassung und Datenaustausch erfolgten über das Elektronikmodul LSM 510 Control (Zeiss, Göttingen, Jena) und einen Siemens Scenic 800 PC mit dem Betriebssystem Windows NT 4.0 und der Software LSM 510.

Für die Beobachtung am inversen Mikroskop konnten folgende Lichtquellen verwendet werden: (A) Halogenlampe, (B) Quecksilberdampfampe und (C) ein VIS Laser-Modul mit einem Argon/Krypton-Laser sowie zwei Helium/Neon-Lasern. Dieses Modul emittiert Wellenlängen von 633, 568, 543, 514, 488 und 458 nm.

Anders als bei der einfachen Beleuchtung in der konventionellen Mikroskopie, projiziert die LSM Technik das Licht einer punktförmigen Lichtquelle (Laser) als nahezu beugungslosen Brennpunkt durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur auf die interessierende Präparat-Ebene. Das reflektierte Licht oder die Fluoreszenz im Brennpunkt des Objektivs wird mit Hilfe der Objektiv- und einer Tubenlinse auf eine variable Lochblende projiziert. Der Brennpunkt in der Probe und die Lochblende sind an optisch konjugierenden Punkten ausgerichtet (confocal imaging).

Der große Vorteil dieser Anordnung ist, dass nur das Licht aus der Focusebene durch die Lochblende fällt und von einem Detektor registriert wird. Unerwünschtes Streulicht aus anderen Ebenen des Präparats wird außerhalb der Lochblende fokussiert und nur ein kleiner Teil gelangt hindurch. Streulicht von außerhalb der Präparatebene oder die Fluoreszenz eines fluoreszierenden Objekts würde das scharfe Brennpunkt-Bild stören und zu einem verschwommenen Bild mit wenig Kontrast führen. Je schmaler die Öffnung der Lochblende, desto weniger Streulicht oder Fluoreszenz aus nicht fokussierten Ebenen gelangt zum Detektor. Der Bildpunkt, der dort entsteht, ist also weitgehend frei von unerwünschtem Streulicht und damit scharf.

Am Laser-Scanning Mikroskop in Münster befand sich an Stelle einer zweiten Lochblende vor dem Detektor eine spaltförmige Blende, der sogenannte „Slit“. Ein Vorteil dieses Spaltes gegenüber einer Lochblende besteht in der erhöhten Abtastrate des Objektes. Die Breite des „Slits“ ist variabel und abhängig von der Beschaffenheit des Präparates sowie des verwendeten Objektivs: je enger der „Slit“ gewählt wird, desto schärfer ist die Auflösung der z-Ebene. Dies wirkt sich jedoch negativ auf die detektierte Fluoreszenz aus, weil die Intensität geringer wird (Baumeister, 1999).

Um ein Bild der gesamten gewünschten Präparat-Ebene zu erhalten, ist es notwendig, die Ebene Punkt für Punkt, Zeile für Zeile in XY-Richtung zu rastern. Die Detektoren – für gewöhnlich Photoverstärker – konvertieren die optischen Informationen in elektrische Signale. Dies ermöglicht es, ein Bild von jeder Objektebene innerhalb weniger Sekunden zu erstellen und abzuspeichern. Durch definierte Bewegung der Focusebene in der Z-Achse ist es möglich, jede Ebene des Präparates zu betrachten. Durch Abtasten einer

Reihe von aufeinanderfolgenden Ebenen innerhalb eines Präparates, kann ein Stapel von Schnittbildern erstellt werden. Diese Schnittbildstapel ermöglichen es dem Computer, Strukturen dreidimensional darzustellen.

In Münster wurden die von der Betriebssoftware des LSMs erhaltenen Bilder mit dem Bildverarbeitungsprogramm „2-D-Analysis“ (Noran Instruments) bearbeitet.

Durch Einsatz des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes SNARF-1-Ester (Haugland, 1994), der den Rädertieren in einem Fütterungsansatz gegeben wurde, wurde nach Anregung durch den Laser das pH-Niveau in den Verdauungsorganen der Rotatorien *in vivo* bestimmt.

Diese Versuche konnten bei einem Gastaufenthalt in der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt werden. Dort wird an *Daphnia magna* der pH-Wert der Hämolymphe untersucht. Zur Skalierung der Falschfarben wurden die an diesem Versuchstier ermittelten Kalibrierungen des pH-Wertes übernommen. Daher sind keine verlässlichen Angaben über die absoluten pH-Werte in den Verdauungsorganen von *B. plicatilis* möglich, immerhin lassen sich aber pH-Unterschiede zwischen Magen und Intestinum erkennen.

Zur Volumenbestimmung des Verdauungstraktes von *B. plicatilis* und zur dreidimensionalen Darstellung wurden die Rädertiere mit FITC-Albumin beladenen Ghosts gefüttert und nach einer Aufnahmezeit von 10–30 min abgefiltriert. Einzelne Tiere wurden dann, nach Immobilisierung mit Na-Dithionit, auf einen Objektträger mit Deckgläschen überführt und im LSM bei einer Laserwellenlänge von 488 nm, unter Einsatz eines Breitbandfilters von 505-550 nm, gescannt. An den entstandenen Bildern wurden die Abmessungen des Verdauungstraktes mit Hilfe eines Messprogramms bestimmt. Die Auswertung verschiedener Scanebenen lieferte außerdem ein virtuelles dreidimensionales Bild der betreffenden Strukturen.

## **2.5 Tiermaterial**

### **2.5.1 Aufzucht der Rädertiere**

Die Aufzucht von *Brachionus plicatilis* erfolgte, wie bereits beschrieben (Kühle und Kleinow, 1985 und 1989; Wethmar und Kleinow, 1993), in xenischer Kultur in 3-5 l Zuchtbecken.

Für Untersuchungen im Fluoreszenzmikroskop wurden die Rotatorien in algenfreiem Medium gehalten, um Eigenfluoreszenz durch Algenbestandteile zu vermeiden. Diese Tiere erhielten als Nahrung nur in Seewasser gelöste Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae* (0,2 g Bäckerhefe in 30 ml Seewasser). Es wurde gerade soviel Hefesuspension hinzugefügt, dass eine leichte Trübung im Becken zu sehen war, da es bei zu hoher Futterkonzentration schnell zu einer Eutrophierung des Mediums und damit zu rascher Algenbildung kommt. Sobald Algen auftraten (in der Regel nach 3-5 Tagen) wurden die Rotatorien abgefiltert und in frisches Seewasser umgesetzt (Lindemann, 1998).

Um Tiere mit leerem Verdauungstrakt für die Untersuchung der Nahrungspassage bereitzustellen, wurde das Kulturmedium abgefiltert und die Rädertiere über Nacht (16-18 Stunden) in Seewasser ohne Nahrungspartikel gehalten.

### **2.5.2 Entnahme der Rädertiere**

Für die Versuchsansätze entnahmen wir die Rotatorien direkt aus dem Zuchtbecken oder aus den „Hungerbecken“, bevorzugt aus den Ecken, da dort deren Dichte besonders hoch war. Zur orientierenden Zählung wurden 20 µl der Rotatorien-Suspension auf einen Hohlschliff-Objektträger gegeben und auf dunklem Hintergrund bei seitlicher Beleuchtung unter der Stereolupe (Vergrößerung 12×) ausgezählt (Kleinow, Praktikumskript, unveröffentlicht). Die Rotatorienzahl sollte dabei zwischen 200-700 Rotatorien/ml lie-

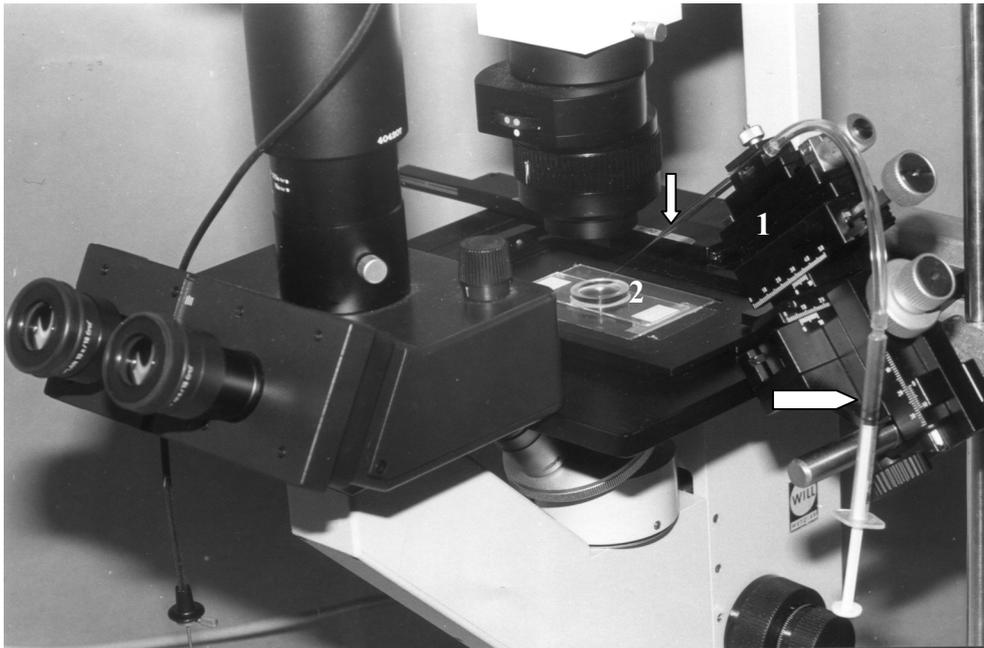
---

gen. War die Rotatorien-Dichte zu gering, wurde sie mit Hilfe einer Filterapparatur (Abb. 1, S. 9) erhöht (Lindemann & Kleinow, 2000).

### **2.5.3 Beobachtung lebender Rädertiere**

Um den Verdauungsvorgang eines einzelnen Tieres kontinuierlich zu beobachten, befestigten wir ein Rädertier mit Hilfe einer biegsamen Pyrex-  
Glaskapillare (Neuhoff, 1973) an einem Mikromanipulator (Lindemann, 1998). Mit Hilfe einer Injektionspritze wurde ein Unterdruck erzeugt, der den caudalen Teil des Rädertier-Panzers an die 40-50  $\mu\text{m}$  große Öffnung der Kapillare saugte. So ließ sich ein Individuum innerhalb eines mit Seewasser gefüllten 1-ml-Objektträger-Aufsatzes nach Belieben bewegen, ohne dass dessen Cilienbewegung gestört wurde (Abb. 2). Nach Zugabe von Partikeln wurden die Vorgänge im Verdauungstrakt des Rädertieres durch ein Wilovert-(Umkehr-)Mikroskop beobachtet. (In dem kleinen Volumen des Beobachtungsaufsatzes befanden sich neben dem so festgehaltenen Rädertier noch eine gewisse Anzahl weiterer Tiere, die nach wie vor frei umher schwammen.)

Eine weitere Möglichkeit zum Immobilisieren lebender Tiere auf einem Objektträger bestand darin, sie zwischen Deckglas und Objektträger einzuklemmen. Durch Zugabe von Wattefäden oder Haaren wurde einerseits ein Quetschen der Tiere vermieden, andererseits konnte dadurch auch deren Bewegungsfreiheit soweit eingeschränkt werden, dass eine Beobachtung der Nahrungspassage bei hoher Vergrößerung möglich war. Das Austrocknen der Rotatorien wurde durch gelegentliches Zugeben von Medium verhindert.



**Abb. 2:** Anordnung zur Beobachtung einzelner Tiere über einen längeren Zeitraum. Die mit Hilfe einer Pyrex-Glaskapillare (◀ ) festgehaltenen Tiere werden durch ein Inversmikroskop im Fütterungsmedium beobachtet. Die Glaskapillare wird durch einen Mikromanipulator gehalten und geführt. Mit Hilfe einer 2 ml Spritze wird der Unterdruck in der Haltekapillare kontrolliert (◀ ). **1** = Mikromanipulator, **2** = Objektträger mit 1 ml Aufsatz.

---

#### **2.5.4 Immobilisieren von Rädertieren mit Na-Dithionit**

Um größere Anzahlen von Rädertieren mikroskopisch zu untersuchen, wurden die Tiere mit Na-Dithionit immobilisiert. Es wurden 500 µl rotatorienhaltiges Medium in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl Na-Dithionit (40 mg/ml) eingespritzt. Die Rädertiere sinken nach der Behandlung in völlig ausgestrecktem Zustand auf den Boden des Gefäßes ab.

Zur Bestimmung der Gesamtzahl der Tiere und der Zahl der Tiere mit gefülltem (rotgefärbtem) Verdauungstrakt, wurden, je nach Konzentration der Rädertiere, 20-100 µl aus dem Gefäß auf einen Hohlsliffobjektträger pipettiert.

#### **2.5.5 Herstellung des Auflösungs-puffers**

Die Herstellung des von Kleinow et al. (1991) entwickelten Auflösungs-puffers geschah folgendermaßen:

In 2 ml Aqua dest. wurden 0,18 M SDS und 0,03 M Ammoniumhydrogencarbonat gelöst (pH 8). Vor Versuchsbeginn wurde noch 0,04 g DTT zur Lösung hinzugefügt.

## **2.6 Vorbereitung der Erythrozyten**

### **2.6.1 Gewinnung der Erythrozyten**

Zur Gewinnung von menschlichen Erythrozyten wurde, nach Hautdesinfektion und Anstechen mit einem sterilen Hämostilet, Kapillarblut aus der Fingerbeere in heparinisierte Hämatokritröhrchen aufgenommen. Aus den Röhrchen wurden 20-150  $\mu$ l Vollblut entnommen und in 10 ml Seewasser suspendiert (Stammsuspension).

In diesem für die Erythrozyten hyperosmotischen Medium geht die bikonkave Scheibenform normaler Säuger-Erythrozyten in die „Stechapfelform“ (Echinocyt) über. Dies beeinträchtigte jedoch weder die photometrische Bestimmung der Erythrozytenkonzentration noch die Aufnahme der Blutzellen durch die Rädertiere.

Blut von Rindern und Schafen wurde vom Schlachthof Köln beschafft. Nach Zusatz von 40 mg Heparin/l waren diese Proben (bei Lagerung auf Eis) etwa eine Woche verwendbar. Die Herstellung der Stammsuspensionen geschah sinngemäß, wie oben beschrieben.

### **2.6.2 Ermittlung von Kalibriergeraden**

Die Dichte der Erythrozyten in den Versuchsansätzen wurde durch Messung ihrer Streulicht-Extinktion bei 630 nm in einem Beckman DU<sup>®</sup> 640 Spectrophotometer verfolgt. Als anderes Maß für die Aufnahme der Erythrozyten durch die Rotatorien diente die bei 420 nm messbare Extinktion, die sich aus der Absorption des Hämoglobins und einem Streulichtanteil der Erythrozyten zusammensetzt. Dieses für Hämoglobin charakteristische Extinktionsmaximum, die sogenannte „Soretbande“, zeigte sich sowohl bei Erythrozyten als auch (entsprechend erhöht) bei freigesetztem Blutfarbstoff (Discher, 2000).

---

Zur Umrechnung der Extinktion in Erythrozytenzahlen wurden Kalibriergeraden ermittelt. Dies geschah so, dass bei verschiedenen Verdünnungen der Erythrozyten-Stamm suspension in Seewasser die Absorption bei 630 und 420 nm gemessen wurde. Parallel dazu wurden die Erythrozyten mittels einer Blutzählkammer nach Neubauer ausgezählt.

### 2.6.3 Fixierung von Erythrozyten mit Glutardialdehyd

Für einige Untersuchungen wurden Erythrozyten mit 0,05% bis 0,5% Glutardialdehydlösung fixiert.

Herstellen der Glutardialdehydlösung (Bing et al., 1967):

- 10 ml einer 0,15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung (pH 8,2) wurden mit 50 ml Aqua dest. und 90 ml 0,9% NaCl-Lösung gemischt.
- 0,05–0,5 ml 25% (technischer) Glutardialdehyd-Lösung wurden mit 25 ml der obigen Mischung vermengt und auf 0 °C abgekühlt.

Zur Fixierung wurden frische Erythrozyten abzentrifugiert (10 min bei 5000 Upm) und dreimal mit 0,9 prozentiger NaCl-Lösung gewaschen. Die gepackten Zellen wurden auf Eis bis auf 4 °C abgekühlt. Pro ml gepackter Zellen kamen 100 ml der Glutardialdehydlösung hinzu. Die Lösung wirkte 15 min bei 4 °C auf die Zellen ein.

Die fixierten Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 Upm) und mit der zehnfachen Menge 0,9 prozentiger NaCl-Lösung dreimal gewaschen. Die fixierten Erythrozyten konnten als 30 prozentige Suspension in NaCl-Lösung bei 4 °C mindestens 4 Wochen aufbewahrt werden. Als Bakterio- statikum wurde Merthiolat in einer Endkonzentration von 1:10 000 (w/v) zugesetzt.

## **2.6.4 Erythrozyten-Ghosts**

### **2.6.4.1 Präparation von FITC-Albumin (Wißling, 1988 und Johnson & Halborow, 1986)**

Um zu verhindern, dass Fluoreszenzfarbstoff aus den Ghosts herausdiffundiert, wurde er an Proteine gebunden:

0,5 M alkalischer Puffer (pH 9,5) wurde durch Zufügen von 5,8 ml einer 5,3 prozentigen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zu 10 ml einer 4,2 prozentigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung bereitgestellt.

50 mg Albumin wurden in 4,5 ml 0,9 prozentigen NaCl-Lösung aufgenommen und 0,5 ml des alkalischen Puffers hinzugefügt, nach gutem Durchmischen wurden 1,5 mg FITC zugegeben und die Lösung für 2 h bei 22–25 °C gerührt.

Diese Mischung dialysierte über Nacht gegen 4 l physiologische Kochsalz-Lösung in einer Dialyse-Wippe. Der fertige Fluoreszenz-Protein-Komplex wurde kühl und dunkel aufbewahrt.

### **2.6.4.2 Lösungen**

Waschlösung:	0,9% NaCl-Lösung
hyposmotischer Puffer:	5 mM MgSO <sub>4</sub> -Lösung
Waschpuffer:	160 mM KCl/5 mM HEPES-Lösung, pH 7,4

Alle Lösungen wurden für die Präparation der Ghosts auf ca. 4 °C gekühlt.

### **2.6.4.3 Herstellung unbeladener und beladener Ghosts**

Frisches heparinisiertes Säugerblut (Schaf oder Rind) wurde 10 min mit 5000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Plasmaüberstands und der oberen leukozytenhaltigen Schicht der Zellsäule wurde das Sedi-

---

ment aus Erythrozyten in 0,9 prozentiger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut 10 min mit 5000 Upm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

Das Feuchtvolumen der gewaschenen Erythrozyten wurde mit dem zwanzigfachen Volumen einer 5 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung vermischt und 15 min unter Kühlung auf Eis gerührt. Die hyposmotische Sulfatlösung führte zum Öffnen der Erythrozytenmembran (hämolytischer Schock) und zum Auslaufen von Hämoglobin und anderen Erythrozyten-Inhaltsstoffen.

Durch Abzentrifugieren (10 min, 5000 Upm) und dreimaliges Waschen mit KCl-HEPES-Puffer wurde das Hämoglobin entfernt.

Das Sediment wurde nach der letzten Zentrifugation in 1-2 ml KCl-HEPES-Puffer gelöst und in Portionen von 500 µl in Eppendorf-Gefäße überführt.

Sollten die (zu diesem Zeitpunkt noch offenen) Ghosts beladen werden, dann wurde zu jedem Eppendorf-Gefäß 500 µl Albumin-Lösung (unmarkierte Ghosts) bzw. FITC-Albumin-Lösung (markierte Ghosts) hinzugefügt und die Mischung für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte sowohl für die unbeladenen als auch für die beladenen Ghosts eine 50-minütige Inkubation bei 37 °C, unter gelegentlicher Durchmischung der Proben. Während dieses „resealing“ (Müller & Paul, 1997 und Peters et al., 1991) ließen sich Farbstoffe bzw. fluoreszenzmarkierte Proteine in die Ghosts einschließen.

Die nun wieder verschlossenen Erythrozyten-Ghosts wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und überschüssiges Albumin bzw. FITC-Albumin durch dreimaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt.

Das Sediment des letzten Zentrifugationsschrittes wurde in 200 µl 0,9 prozentiger NaCl/Chloramphenicol-Lösung (1 mg Chloramphenicol/ml NaCl-Lösung) aufgenommen und bei 4-8 °C gelagert.

#### **2.6.4.4      Glutardialdehyd-fixierte Ghosts**

Die Präparation der beladenen Ghosts und ihre Fixierung erfolgte wie in den Abschnitten 2.6.3 und 2.6.4 beschrieben, wobei die Glutardialdehyd-Lösung, ohne vorheriges Waschen, zu den präparierten und gekühlten Ghosts gegeben wurde.

---

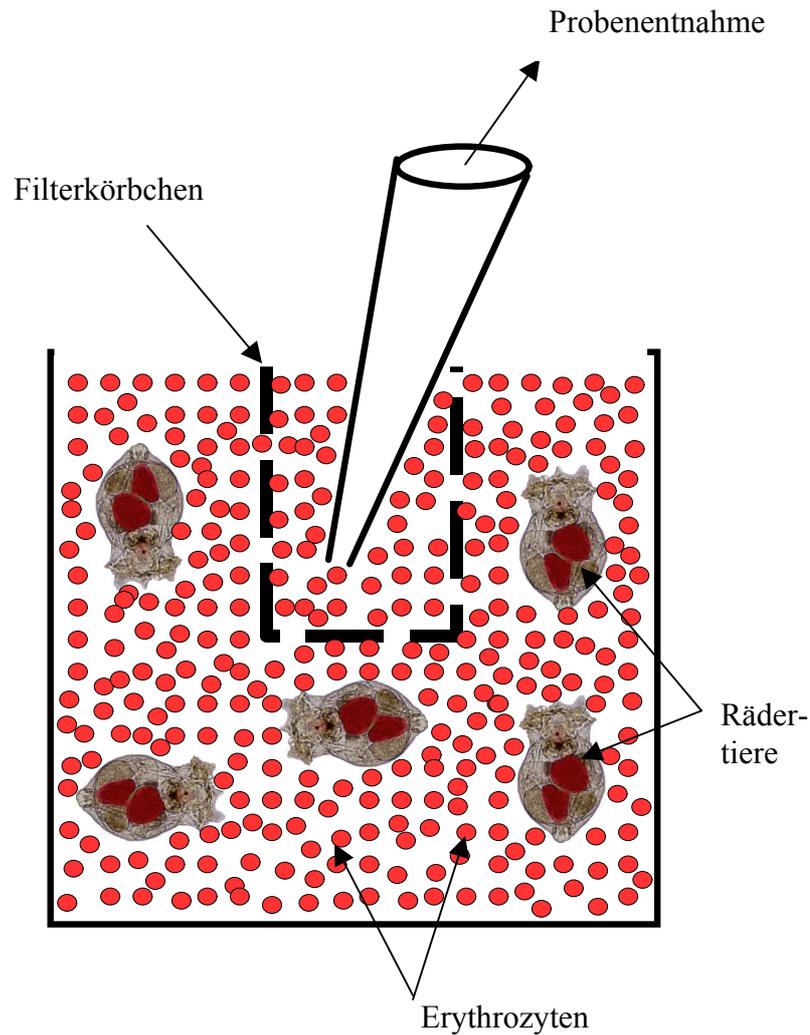
### **2.6.5 Herstellung der gepufferten Medien für die Fütterungsansätze**

Tris/HCl wurde mit 0,25 M Saccharose in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert mit 5 N HCl auf 7,8 justiert. Nach Einstellung des pH-Wertes wurde mit Aqua dest. auf das Endvolumen aufgefüllt.

TRA, Citrat und MES wurden in Seewasser angesetzt und der pH vor Aufüllen auf das endgültigen Volumen mit 5 N NaOH am pH-Meter auf 7,8 eingestellt.

### **2.6.6 Fütterungsansätze**

Für alle Versuche wurden Rotatorien aus den Zuchtbecken entnommen und nach Abfiltern der Algen in frischem Seewasser oder dem entsprechenden Puffer-Medium aufgenommen. Nach orientierendem Auszählen der Rädertiere wurden diese Stammansätze auf die gewünschten Dichten eingestellt. Jeweils 60 ml der Rotatorien-Suspension wurden in ein Becherglas (100 ml) gegeben. Um repräsentative Erythrozyten-Proben ohne Rotatorien zu erhalten, wurde ein Filterkörbchen entsprechender Maschenweite in die Versuchslösung eingehängt. Das Filterkörbchen bestand aus 1-2 „Tissue Baskets“ (Plano GmbH, Wetzlar; Maschenweite 75  $\mu\text{m}$ ) mit ausgeschnittenem Boden. Diese „Reifen“ wurden auf ein weiteres „Tissue Basket“ geklebt. So entstand ein Filterkörbchen mit einem Durchmesser von ca. 1,4 cm und einer Länge von 4-6 cm, aus dem rädertierfreie Proben entnommen werden konnten (Abb. 3). Nach Einhängen des Körbchens in die Versuchslösung wurden 4 ml Erythrozyten-Stammsuspension pro Rotatorienansatz hinzugefügt. Die Konzentration der Erythrozyten im Ansatz lag zwischen  $1 \cdot 10^5$  und  $6 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Die Fütterungsversuche wurden bei Raumtemperatur in einem Zeitraum von 60-80 min durchgeführt. Einzelne Langzeituntersuchungen dauerten bis zu 420 min.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Probenentnahme:**

Für die photometrischen Messungen pipettiert man die Probe aus einem Filterkorbchen, das für Erythrozyten, aber nicht für die Rotatorien zugänglich ist. Dies wurde durch Verkleben von 2-3 „Tissue Baskets“ (Maschenweite 75  $\mu\text{m}$ , Plano GmbH Wetzlar) erzielt.

In der ersten Stunde wurde alle 5-10 min, im weiteren Versuchsverlauf nur noch alle 20-30 min eine Probe entnommen. Bei den Probenentnahmen wurden 2 ml aus dem Filterkorbchen in eine Küvette pipettiert. Um zu gewährleisten, dass die Suspension im Filtereinsatz in etwa der Konzentration der Erythrozyten bzw. des freigesetzten Hämoglobins im umgebenden Medium entsprach, wurde vor jeder Probenentnahme der Inhalt des Filterkorbchens mehrmals mit Hilfe einer Pipette in das Außenmedium überführt.

---

Dadurch konnten Erythrozyten und freies Hämoglobin aus dem umgebenden Medium in den Filtereinsatz einströmen.

Die Extinktion der Probe wurde bei 630 und/oder 420 nm bestimmt. Sollte zusätzlich die Menge an gelöstem Hämoglobin bestimmt werden, wurde anschließend der Inhalt der Küvette abzentrifugiert (2 min, 4000 Upm) und im Überstand die Extinktionen erneut bestimmt.

Zur Ermittlung des Anteils an Tieren mit rot gefärbtem Verdauungstrakt wurden zu den Zeitpunkten der Probenentnahme zusätzlich noch 500 µl rädertierhaltiges Medium außerhalb des Filter-Kompartiments entnommen und in 500 µl Na-Dithionit (40 mg/ml) überführt.

Die Fütterungsversuche mit fixierten Erythrozyten bzw. mit Erythrozyten-Ghosts wurden grundsätzlich ebenfalls nach obigem Schema durchgeführt. Da jedoch aufgrund der Präparationsschritte eine viel geringere Probenmenge zur Verfügung stand, wurden kleinere Ansätze vorbereitet (z.B. 5 µl Glutardialdehyd-fixierte Erythrozyten zu 200 µl Rädertierkonzentrat). Um tierfreie Proben entnehmen zu können, wurden die Rotatorien mit einer kleinen Filterapparatur (ähnlich Abb. 1, Volumen 5 ml, Beschreibung siehe 2.3, S. 8) mit einem Gaze-Stempel zusammengeschoben und der Überstand, der dann keine Rotatorien enthielt, sondern nur Erythrozyten und andere kleine Partikel, abpipettiert.

## **2.7 Vorbereitung der Hefezellen**

### **2.7.1 Herstellung der Hefesuspension**

0,5 g Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden in 100 ml Seewasser gerührt, bis die Hefe gleichmäßig verteilt war.

### **2.7.2 Herstellung des Phosphatpuffers nach Sørensen**

0,2 M Phosphatpuffer pH 7,0 wurde durch Zusammengeben von 30,5 ml einer 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung und 19,5 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung hergestellt. Einen 0,067 M Sørensen-Puffer erhielten wir durch Verdünnen von 6,7 Teilen des Puffers mit 13 Teilen Aqua dest. (Dawson et al., 1969).

### **2.7.3 Herstellung des Kaliumphosphat-Puffers**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 M) wurde in Aqua dest. angesetzt und mit KOH auf pH 7 eingestellt.

### **2.7.4 Anfärben der Hefezellen mit Indikator-Farbstoff**

Anstelle der von Klaus Kühle (1983) verwendeten Hefezellen aus "Preis Microplan" kam frische Bäckerhefe zum Einsatz, so dass der erste Zentrifugationsschritt entfallen konnte. Es wurden folgende Schritte zum Anfärben der Hefezellen mit Indikator-Farbstoff durchgeführt:

- Suspendieren von 250 mg frische Bäckerhefe in einem Reagenzglas in 5,0 ml eines 1/15 M Phosphat-Puffers (Sørensen) pH 7,0.
- Zufügen von 25 mg Bromthymolblau (Indikatorbereich pH 6,0-7,8; Farbumschlag von gelb (sauer) nach blau (basisch)) oder Brom-

- 
- phenolblau (Indikatorbereich pH 3,0-4,6; Farbumschlag von gelb nach blau).
- Erhitzen der Suspension für 60 min im Wasserbad auf 100 °C (regelmäßig mit Glasstab umrühren und zur Vermeidung von Verdunstungsverlust mit einer Glaskugel abdecken).
  - Umfüllen der abgekühlten Suspension in ein Corex-Zentrifugenglas und 10 min Zentrifugation bei 800×g (Kühlzentrifuge).
  - Verwerfen des Überstands und Resuspendieren des Sediments in 10 ml Sørensen-Puffer (diesen Waschvorgang dreimal wiederholen).
  - Aufnahme der Hefezellen in 10 ml Sørensen-Puffer (ca. 10<sup>7</sup> Zellen/ml).
  - Ermitteln der Hefezelldichte durch Auszählen (Zählkammer nach Neubauer).

Im Vorfeld einer Fütterung oder vor einer Behandlung mit Lyticase, wurden die Hefezellen von überschüssigem Farbstoff befreit. Dies geschah unter Zugabe von jeweils 2 ml der Suspension auf eine Transwell-Clear-Polyestermembran (CORNING COSTAR GmbH, Bodenheim; Porengröße 0,4 µm). Mit einer Vakuumpumpe wurde mindestens sechsmal mit 5 ml Aqua dest. gespült. Die Hefezellen wurden nach dem Spülen mit ca. 2-3 ml Seewasser oder Puffer vom Filter abgespült und in die Lösung überführt.

Durch anschließende Inkubation der gewaschenen Zellen für 20–60 min in einem 30 °C Wasserbad und erneutes Erhitzen auf 100 °C (10 min) wurde eine ausgeprägte Färbung erreicht. Die so gewonnenen, intensiv gefärbten Hefezellen konnten gut verschlossen für ca. 4 Wochen bei 4-8 °C aufbewahrt werden.

### **2.7.5 Herstellung von Hefe-Sphäroblasten**

Da bei ungefärbten Hefezellen lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen unbehandelten oder durch Lyticase angedauten Zellen zu erkennen waren, wurden im Folgenden nur gefärbte Hefezellen verwendet.

#### Inkubationsansatz A (nach Vršanská et al., 1977):

200 µl einer Hefezellsuspension (Zellen mit Bromthymolblau gefärbt) wurden in 10 ml Lyticase-Ansatz (3 mg Lyticase/10 ml 0,05 M Phosphat-Puffer, pH 7,0) bei 30 °C im Wasserbad für 20, 60 oder 120 min inkubiert. Proben von je 1 ml wurden nach der Inkubation für 10 min im 100 °C Wasserbad erhitzt. Bis zum Einsatz im Versuch wurden die Zellen gut verschlossen bei 4-8 °C aufbewahrt.

#### Inkubationsansatz B (nach Vršanská et al., 1977):

1 ml einer Hefezellsuspension (Zellen mit Bromphenolblau gefärbt) wurde mit 1 ml Lyticase-Ansatz (1,5 mg in 5 ml Seewasser) in einem 30 °C Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min in einem 100 °C Wasserbad erhitzt. Diese Zellen wurden ebenfalls bei 4-8 °C aufbewahrt.

### **2.7.6 Fütterungsansätze**

Zu 0,2 ml algenfreiem, konzentriertem rädertierhaltigen Medium kamen 0,02 ml Hefe bzw. Zellen nach Protoplastenpräparation hinzu. Zu verschiedenen Zeiten wurden jeweils 0,02 ml aus dem Ansatz entnommen und auf einen Objektträger gegeben. Um ein Zerquetschen der Tiere zu verhindern, wurde zusätzlich ein Haar zwischen Objektträger und Deckgläschen eingeklemmt.

---

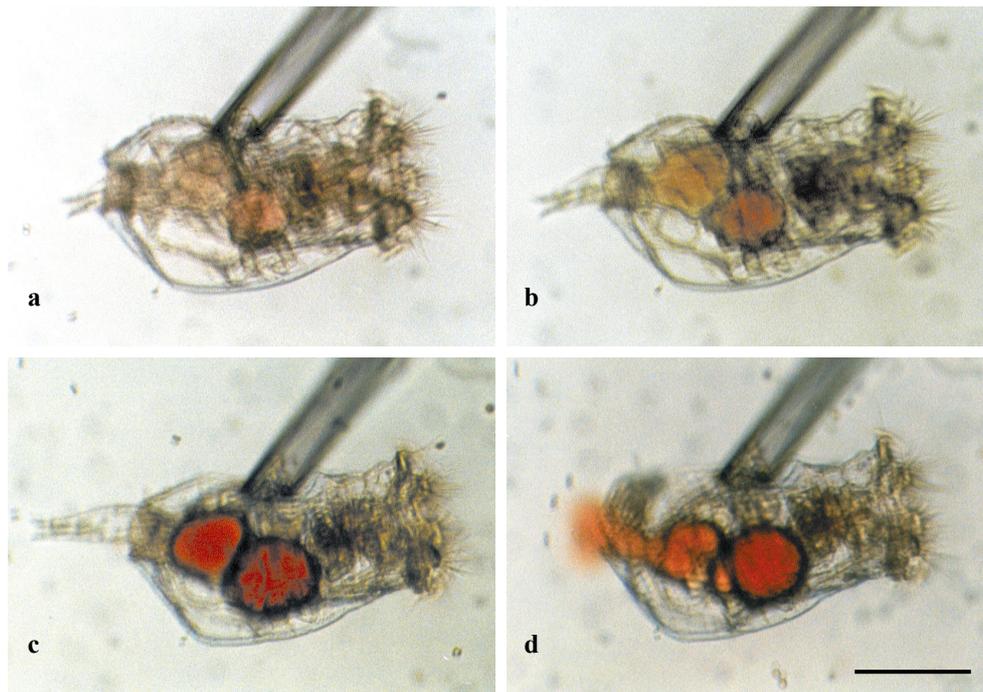
### **3. Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1 Mikroskopische Untersuchung von Partikelaufnahme und Nahrungspassage durch den Verdauungstrakt**

##### **3.1.1 Zeitverlauf von Verdauungsvorgängen**

Der Ablauf der Nahrungsaufnahme und -passage bei *B. plicatilis* wurde für den Fall von Hefezellen bereits beschrieben (Kühle, 1983). Diese Beobachtungen konnten mit allen hier verwendeten Partikeln in gleicher Weise und auch bei Tieren, die an der Pyrex-Glaskapillare befestigt waren (siehe 2.5.3, S. 15), bestätigt werden:

1. Das Räderorgan strudelt Partikel herbei, die Cilien des Buccaltubus befördern sie weiter zum Mastax. Dies lässt sich bereits innerhalb weniger Sekunden nach Partikelzugabe beobachten.
2. Im Mastax erfolgt eine mechanische Bearbeitung der eingestrudelten Partikel. Diese werden danach durch den Ösophagus in den Magen weitergeleitet. Unfixierte Erythrozyten werden im Mastax zerstört. Nach 10-20 Sekunden ist eine leichte Rotfärbung des Magens durch das freigesetzte Hämoglobin erkennbar (Abb. 4a).
3. Ist der Magen nach ca. 2 min gut gefüllt, öffnet sich ein Sphinktermuskel zwischen Magen und Intestinum, und etwa 1/3 des Mageninhalts wird in den Darm weitergeleitet. Die Trennung der beiden Teile des Verdauungstraktes ist dann vorübergehend aufgehoben (Abb. 4b).
4. Der Sphinkter schließt sich, beide Verdauungsorgane sind deutlich sichtbar abgegrenzt und gefüllt (4c). Der Inhalt des Intestinums wird durch die auf seiner Wand befindlichen Cilien ständig durchmischt. Die nach 12-17 Minuten erfolgende Darmentleerung kündigt sich durch verstärkte Rotation des Darminhalts an. Meist wird der gesamte Intestininhalt durch den Anus ausgestoßen und driftet, unterstützt durch das Schlagen des Füßchens, auseinander (Abb. 4d). Das leere Intestinum füllt sich sofort wieder, solange *Brachionus* ununterbrochen Nahrung aufnimmt.



**Abb. 4a-d: Aufnahme und Weiterleitung von Erythrozyten im Verdauungstrakt von *B. plicatilis*.** Typischer Ablauf nach Zugabe von Erythrozyten zum Zeitpunkt 0, beobachtet an einem Rädertier, dass durch Ansaugen an der Öffnung einer Pyrex-Glaskapillare festgehalten wurde. Bei dieser Vergrößerung war es nicht möglich das gesamte Tier im Focus zu fotografieren. Aufgrund der Bewegung der Tiere im Medium mussten kurze Belichtungszeiten mit großer Blende gewählt werden. Kalibrierungsbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

- a) Nach 10-20 Sekunden wird eine leichte Rotfärbung des Magens sichtbar.
- b) Nach 180 Sekunden ist der Magen deutlich gefüllt und eine erste Färbung des Intestinums erkennbar.
- c) Nach 15 Minuten sind Magen und Intestinum intensiv rot gefärbt.
- d) Nach 17 Minuten wird der Inhalt des Intestinums durch den Anus ausgestoßen.

Die auf den ersten Vorgang folgenden Passageprozesse liefen in der Regel beschleunigt ab, so dass die nächste Darmentleerung dann schon nach 10 Minuten erfolgte.

Bei allen verwendeten Säuger-Erythrozyten (Mensch, Rind und Schaf) waren im Fäzes nur noch Membranbruchstücke und die aus dem freigesetzten Hämoglobin bestehende rote Farbwolke erkennbar, die sich rasch im Medium verteilte. Bei einzelnen, bei der ersten Darmentleerung noch sichtbaren,

---

zellulären Strukturen, handelte es sich anscheinend um restliche Algen- oder Hefezellen, die mit dem Hämoglobin aus dem Verdauungstrakt gespült wurden.

Gab man Hefezellen in den Fütterungsansatz, so wurden diese zwar auch ohne weiteres von den Rotatorien aufgenommen, doch sind hier im Magen und Intestinum eindeutig zelluläre Partikel zu erkennen (siehe Abb. 27, S. 99). Die Zellen waren auch noch in den Ausscheidungen enthalten. Damit bestätigt sich die von Klaus Kühle (1983) gemachte Beobachtung, dass Hefezellen von den Rädertieren aufgenommen und rasch durch den Verdauungstrakt geschleust werden. Ein mechanischer Aufschluss ist dabei nicht erkennbar.

Obwohl lichtmikroskopisch keine Unterschiede zwischen frischen Hefezellen und den bereits ausgeschiedenen zu sehen waren, nimmt *B. plicatilis* nur solche Hefezellen auf, die den Darmkanal noch nicht passiert hatten. Im Verlauf der Inkubation wurde eine immer größere Anzahl von Hefezellen am Räderorgan abgewiesen. Anscheinend besitzen die Tiere sensorische Strukturen im Bereich des Strudelapparates, die bereits „verdaute“ Nahrung erkennen und deren erneute Aufnahme verhindern (Kühle, 1983; DeMott, 1986; Snell, 1998). Die bei anderen Rädertier-Arten beschriebenen Abwehrmechanismen (Gilbert & Starkweather, 1977 und Hino & Hirano, 1984) gegen den Einstrom von zu großen Partikeln, konnten auch bei *B. plicatilis* beobachtet werden. Bereits ausgeschiedene Partikel wurden, ebenso wie zu große Partikel (z.B. Hefezell-Aggregate), durch Querlegen der medial angeordneten Cilien des Räderorgans abgewehrt oder durch Umkehrung des Cilienschlages aus dem Buccalfeld entfernt. Durch Umkehr der Kieferbewegung konnten kleinere Partikel, die bereits mit dem eingestrudelten Medium bis in den Pharynx vorgedrungen waren, wieder aus dem Bereich des Mastax ausgestoßen werden.

Da eine lichtmikroskopische Untersuchung der Verdauungspassage ungefärbter Hefezellen nur bei starken Vergrößerungen möglich war, wurden die Zellen für weitere Untersuchungen mit den Farbstoffen Bromthymolblau bzw. Bromphenolblau angefärbt.

Eine weitere Methode zur lichtmikroskopischen Untersuchung der Verdauungsvorgänge ergab sich durch den Einsatz von beladenen Erythrozyten-Ghosts. Da Erythrozyten ohne weiteres von den Rädertieren eingestrudelt werden, ist dies auch bei Erythrozyten-Ghosts, also bei hämoglobinfreien membranumhüllten Strukturen zu erwarten.

Durch Befüllen mit dem an Albumin gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoff FITC war mit diesen Ghosts eine Untersuchung der Nahrungsaufnahme und Weitergabe unter dem Fluoreszenz-Mikroskop möglich.

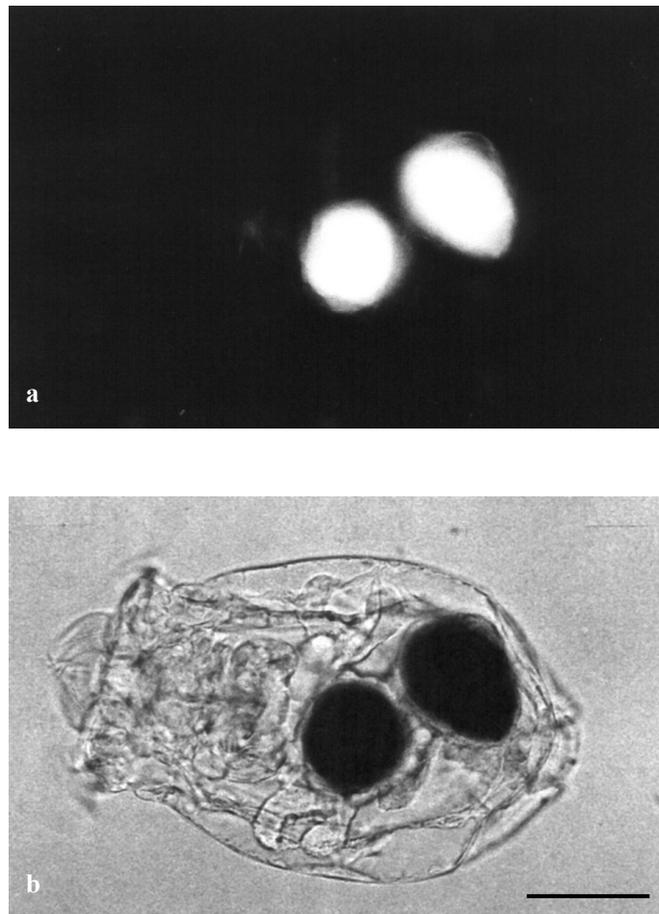
In der Suspension außerhalb der Rotatorien sind die FITC-Albumin beladenen Ghosts als deutlich voneinander getrennte, stark fluoreszierende Kugeln zu erkennen. Die Rädertiere nehmen die Ghosts auf und leiten sie in den Mastax. Dort erfolgt der mechanische Aufschluss und im Magen wird eine diffus verteilte intensive Fluoreszenz sichtbar, die nach wenigen Minuten auch auf das Intestinum übergeht (Abb. 5).

Nach Darmentleerung verteilen sich im Medium noch schwach fluoreszierende Nahrungsreste. Werden alle Partikel aus dem Medium entfernt, so ist die in Magen und Intestinum freigesetzte Fluoreszenz noch über 2 Stunden sichtbar. Wie sich durch weitere Untersuchungen herausstellte (siehe 3.2.5, S. 116), handelt es sich bei dieser Restfluoreszenz um bereits in die Magen-zellen resorbiertes fluoreszierendes Material.

Aufgrund der schnellen Schädigung der Tiere durch die UV-Strahlung war die kontinuierliche Untersuchung eines Individuums nicht möglich, daher mussten verschiedene Tiere des gleichen Fütterungsansatzes nach unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht werden. Aus diesem Grund ließ sich der genaue Zeitablauf der einzelnen Verdauungsschritte nicht bestimmen.

Farbstoffe, die kein UV-Licht zur Anregung brauchen, standen aus technischen Gründen nicht zur Verfügung, u. a. da die Anregungswellenlängen im verwendeten Mikroskop die Wahl der Farbstoffe einschränkten. Eine Kopplung anderer Fluorochrome an Protein oder die Beladung der Erythrozyten-Ghosts mit freien Fluoreszenzfarbstoffen war nicht erfolgreich.

Falls derartige Probleme gelöst werden könnten, wäre der Einsatz von Ghosts, die mit fluorogenen Enzym-Substraten befüllt wurden, für weitergehende Untersuchungen denkbar. So könnte diese Methode eingesetzt werden, um z.B. Enzyme im Verdauungstrakt zu lokalisieren.



**Abb. 5a-b:** Hellfeld- und Fluoreszenzphotografie eines Rädertieres 5 min nach Fütterung mit Ghosts, die mit FITC-markiertem Albumin gefüllt waren (Kalibrierungsbalken = 50  $\mu\text{m}$ ).

Zu 500  $\mu\text{l}$  rädertierhaltigem Medium wurden 50  $\mu\text{l}$  einer Suspension mit FITC-Albumin-Ghosts gegeben. Nach fünfminütiger Partikelaufnahme wurden die Rotatorien, durch mehrmaliges Spülen über einem 16  $\mu\text{m}$  Nylonfilter, von freien Fluoreszenz-Ghosts befreit und eine Tierprobe auf einen Objektträger mit Deckgläschen überführt.

**a)** Fluoreszenzbild, **b)** zur Lokalisation der Fluoreszenz im Verdauungstrakt wurde Bild **a** invertiert und über eine Hellfeldaufnahme des gleichen Tieres gelegt.

### **3.1.2 Einfluss verschiedener Parameter auf den Verdauungsprozess**

Die bei der Beobachtung von einzelnen Rädertieren ermittelten Passagezeiten lagen zwischen 10 und 25 min. Wie bereits bei der kontinuierlichen Beobachtung von Einzeltieren festgestellt, verlaufen die auf die erste Passage folgenden Durchgänge in der Regel schneller. In weiteren Versuchen mit festgelegten und frei schwimmenden Tieren wurde geprüft, welche Parameter die Verdauungspassage sonst noch beeinflussen.

Zur Untersuchung größerer Tierpopulationen wurde während der bis zu 4 Stunden dauernden Beobachtung, alle 15-30 min mit einer Pipette 500 µl rotatorienhaltige Probe entnommen. Diese Proben wurden in 500 µl Na-Dithionit gespritzt und die darin enthaltenen Rädertiere ausgezählt. So konnte sowohl die Gesamtzahl der Tiere, als auch die Verteilung und Intensität der Rotfärbung ermittelt werden (siehe 2.5.4, S. 17).

#### **3.1.2.1 Ernährungszustand der Rädertiere**

Es wurde geprüft, ob der Ernährungszustand Einfluss auf die Geschwindigkeit der Nahrungsaufnahme und –weiterleitung haben könnte. Hierzu dienten Fütterungsversuche mit „Hungertieren“ (2.5.1, S. 14). Rotatorien, die bis zu 48 Stunden kein Futter erhielten, wurden mit (gefütterten) Tieren aus den Zuchtbecken verglichen. Wurden die Tiere bei konstanter Temperatur von 25 °C und ausreichender Sauerstoffzufuhr gehalten, zeigten sich kaum Unterschiede im Fressverhalten. Vereinzelt hatte es den Anschein, als ob die ungefütterten Rotatorien die Erythrozyten schneller aufnahmen. Dies könnte allerdings auch daran gelegen haben, dass aufgrund des leeren Verdauungstraktes die Rotfärbung besser zu erkennen war. Im Durchschnitt verliefen die Verdauungsvorgänge aber in den oben beschriebenen Zeiträumen.

In Tab. 1 sind die Ergebnisse von Fütterungsversuchen mit festgelegten Rädertieren zusammengefasst. Die an einer Mikrokapillare befestigten Tiere wurden in Seewasser mit Erythrozyten gefüttert und die Aufnahme und Weitergabe der Blutzellen mikroskopisch verfolgt.

**Tab. 1: Auswirkung des Ernährungszustands der Rädertiere** auf die Aufnahme und Weiterleitung von Erythrozyten. Nach Festlegung eines Rädertieres wurden 100 µl Erythrozyten-Stamm suspension (20 µl menschliches Blut in 10 ml Seewasser) in 500 µl Medium pipettiert. In der Tabelle sind die Extremwerte der Ergebnisse von Fütterungsversuchen zusammengefasst (n = Anzahl der beobachteten Tiere).

Hungerzeit der Tiere vor Versuchsbeginn [h]	Zeit bis zur Rotfärbung des Magens [min]	Zeit bis zur Rotfärbung des Intestinums [min]	Zeit bis zur Darmentleerung [min]
24 (n=5)	0,3-2,0	1,5-4,3	15,6-26,0
48 (n=2)	0,1-0,3	2,3-2,6	11,3-12,7
>48 (n=5)	10	n.b.	30-90

Tiere, die länger als 48 Stunden keine Nahrung erhalten hatten, zeigten dagegen deutliche Unterschiede. Die Aufnahme und Weiterleitung der Nahrung war offensichtlich verlangsamt und erfolgte zunächst auch in kleineren „Portionen“. Eine schwache Rotfärbung des Verdauungstraktes war erst nach 10 min zu erkennen und die erste Entleerung des Darms fand nach 30-90 min statt. Dies könnte so gedeutet werden, dass entweder bei steigendem Bedarf an Nährstoffen die Nahrungspartikel effektiver aufgeschlossen und gründlicher verdaut werden oder aber, dass die Tiere nach einer derart langen Hungerzeit geschädigt sind und dies nur langsam rückgängig machen können. Bei solchen Rädertieren hatte man mitunter auch den Eindruck, als seien ihre Magendrüsen kleiner als bei normal gefütterten Tieren.

### 3.1.2.2 Temperatur des Mediums

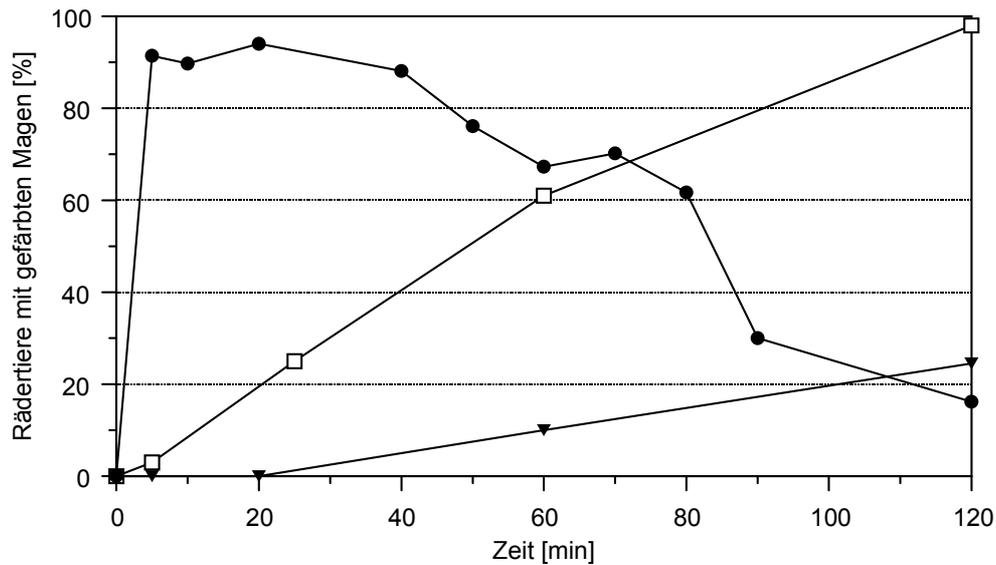
Ein anderer Faktor, der die Nahrungsaufnahme sicher beeinflussen kann, ist die während der Fütterungsversuche herrschende Temperatur im Medium. Neben Untersuchungen, die normalerweise bei 20-25 °C erfolgten, wurden daher auch Versuche bei 0 °C, 5 °C und 10-15 °C durchgeführt.

Für diese Fütterungsansätze wurde das rotatorienhaltige Medium und die hinzugefügte Erythrozyten-Suspension auf die gewünschte Temperatur gebracht.

Bei 0 °C lagen alle Rotatorien regungslos am Boden des Gefäßes vor, die meisten hatten ihr Räderorgan in den Panzer zurückgezogen. Mastaxbewegungen und damit Nahrungsaufnahme waren nicht zu erkennen. Wurde die Probe aus dem Eiswasser entfernt, so nahm die Aktivität der Tiere mit steigender Temperatur im Medium wieder zu. Je länger allerdings die Rotatorien bei 0 °C gehalten wurden, desto langsamer erholten sie sich wieder und desto mehr Exemplare schienen permanent geschädigt zu sein.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse von Fütterungsansätzen bei unterschiedlichen Temperaturen. Bei 20-25 °C dauert es nur 5 min, bis nahezu 100% der Rotatorien einen deutlich rot gefärbten Magen vorweisen. Bei 15 °C haben nach 50 min erst 50% der Tiere einen rot gefärbten Verdauungstrakt. In dem 5 °C-Ansatz sind selbst nach 120 min noch 75% der Rädertiere schwach oder gar nicht gefärbt und nur 25% zeigen eine deutliche Rotfärbung von Magen und Intestinum.

Bei einigen ungefärbten Tieren war deutlich zu erkennen, dass Erythrozyten in den Pharynx aufgenommen wurden, sich aber dort vor dem Mastax stauten und nicht weitergeleitet wurden.



**Abb. 6: Prozentualer Anteil von Rädertieren mit rot gefärbtem Magen** nach Fütterung mit menschlichen Erythrozyten bei Versuchstemperaturen von 20-25 °C (ein typischer Verlauf, zum Vergleich siehe auch Abb. 20b, S. 70), 10-15 °C und 5 °C. Es wurden jeweils 10 ml Erythrozyten-Stammsuspension zu 50 ml Rädertier-Medium gegeben (Rädertierdichte: ca. 100-160 Tiere/ml).

(—●— 20-25 °C, —□— 10-15 °C, —▼— 5 °C)

Aus Abbildung 6 ist auch zu erkennen, dass bei 20-25 °C der prozentuale Anteil der Rädertiere mit rot gefärbtem Magen ab 40 min wieder deutlich sinkt. Dies ist so zu erklären, dass unter diesen Bedingungen ab diesem Zeitpunkt die Konzentration der Erythrozyten im Medium bereits so weit reduziert ist, dass nicht mehr ausreichend Partikel für alle Tiere zur Verfügung stehen (siehe auch Abb. 7 und 8, S. 39 und 41). Bei niedrigeren Temperaturen ist die Aufnahmegeschwindigkeit dagegen so weit herabgesetzt, dass eine Erschöpfung des Nahrungsangebotes im beobachteten Zeitraum nicht eintritt.

Wurde die Temperatur umgekehrt auf ca. 30 °C erhöht, so verlangsamte sich auch in diesem Fall die Aufnahme und ein Teil der Tiere nahm keine Nahrung mehr zu sich.

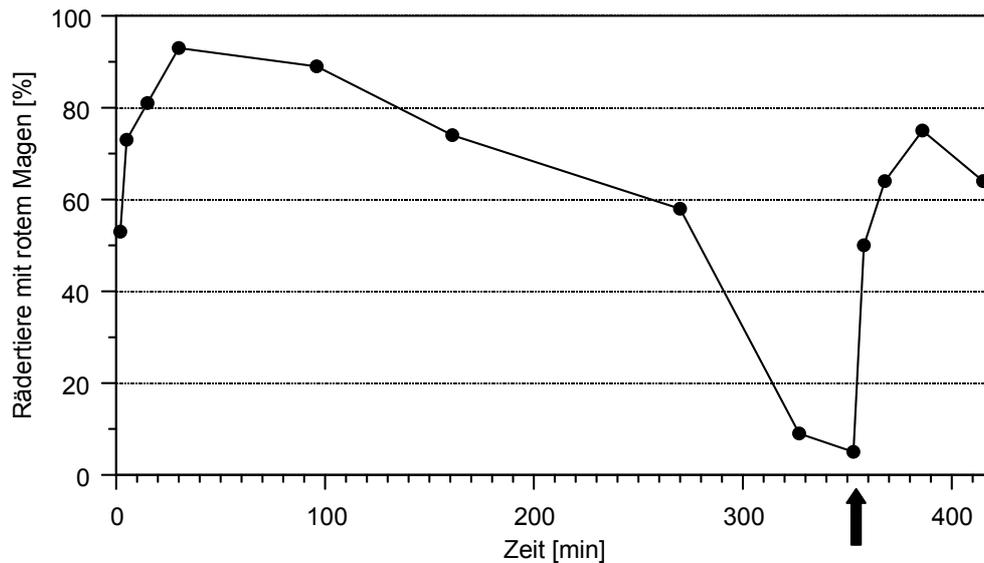
### 3.1.2.3 Partikeldichte

Ein weiterer Parameter, der Einfluss auf die Passagezeiten hat, ist die Konzentration der Partikel im Medium. Mit steigender Erythrozyten-Konzentration nimmt die Aufnahmegeschwindigkeit deutlich zu. Da die Nahrung von den Rotatorien eingestrudelt wird, ist die Wahrscheinlichkeit, Erythrozyten aufzunehmen, bei höherer Konzentration der Partikel größer (Tab. 2). Überschreitet die Dichte der Erythrozyten/ml Medium allerdings einen Optimalwert (dieser ist abhängig von der Art der verwendeten Erythrozyten), so nimmt die Geschwindigkeit der Nahrungsaufnahme nicht weiter zu. In diesem Fall kann mikroskopisch beobachtet werden, dass sich die Rädertiere nur mühsam durch das partikelreiche Medium bewegen und immer wieder den Strudelapparat in den Panzer zurückziehen.

**Tab. 2: Erythrozytenaufnahme durch die Rädertiere in Abhängigkeit von der Zelldichte im Medium.** Unterschiedliche Verdünnungen einer Erythrozyten-Suspension wurden zu Ansätzen mit ca. 100 Rädertieren/ml gegeben. Die Abnahme der Erythrozytendichte im Medium wurde durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 630 nm über 60 min verfolgt. Die Zahl der Erythrozyten/ml Medium wurde durch Multiplikation dieser Extinktionen mit dem Faktor  $13,2 \cdot 10^6$  (aus den Kalibriergeraden Tab. 4, S. 58) berechnet. Mittels Division der Erythrozytendichte durch die Anzahl der Tiere wurde die durchschnittlich von einem Rädertier pro Minute aufgenommene Zahl an Blutzellen errechnet.

Anzahl der Erythrozyten/ml·10 <sup>6</sup> bei Versuchsbeginn	Abnahme der Erythrozyten/min	Erythrozytenaufnahme durch die Rädertiere [Erythrozyten·Rädertier <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]
2,2	18 000	<b>180</b>
1,1	13 000	<b>130</b>
0,4	8 500	<b>69</b>

In Fütterungsansätzen, die über mehrere Stunden beobachtet wurden (siehe Abb. 7), konnte gezeigt werden, dass die Partikelaufnahme und deren Verweilzeit im Verdauungstrakt vom Angebot dieser Partikel im Medium abhängt. Dies bestätigt die bereits von Kühle (1983) gemachten Beobachtungen nach Fütterung mit Hefezellen.



**Abb. 7: Rotfärbung des Verdauungstraktes** von *B. plicatilis* nach der Aufnahme von Erythrozyten aus dem Medium. Zugabe von menschlichen Erythrozyten zu einem Rotatorienansatz zum Zeitpunkt 0 min (10 ml Erythrozyten-Suspension in 50 ml Rädertier-Medium; 124 Tiere/ml Medium). Nach 358 min (Pfeil), nachdem der prozentuale Anteil der rot gefärbten Rädertiere stark abgenommen hatte, wurden erneut 10 ml Erythrozyten-Stammsuspension hinzugefügt.

Abb. 7 zeigt den typischen Verlauf des prozentualen Anteils an rot gefärbten Rädertieren in einem Fütterungsversuch mit Erythrozyten. Die zum Zeitpunkt 0 min gefütterten Tiere nehmen die Zellen rasch auf, so dass bereits nach 10 min 70% der Tiere einen deutlich gefärbten Magen aufweisen. Nach 30 min ist der Magen von über 90% der Rotatorien gefärbt. Sinkt die Konzentration der Zellen im Medium, so lässt auch die Färbung des Verdauungstraktes allmählich nach (siehe auch Abb. 8 und 9, S. 41 und 45).

Nach 350 min fällt der Prozentsatz der Tiere mit intensiver Rotfärbung auf ca. 5% ab. Gibt man zu diesem Zeitpunkt frische Erythrozyten ins Medium, so steigt der Prozentsatz an Rädertieren mit rotem Magen innerhalb von 30 min wieder auf 75% an.

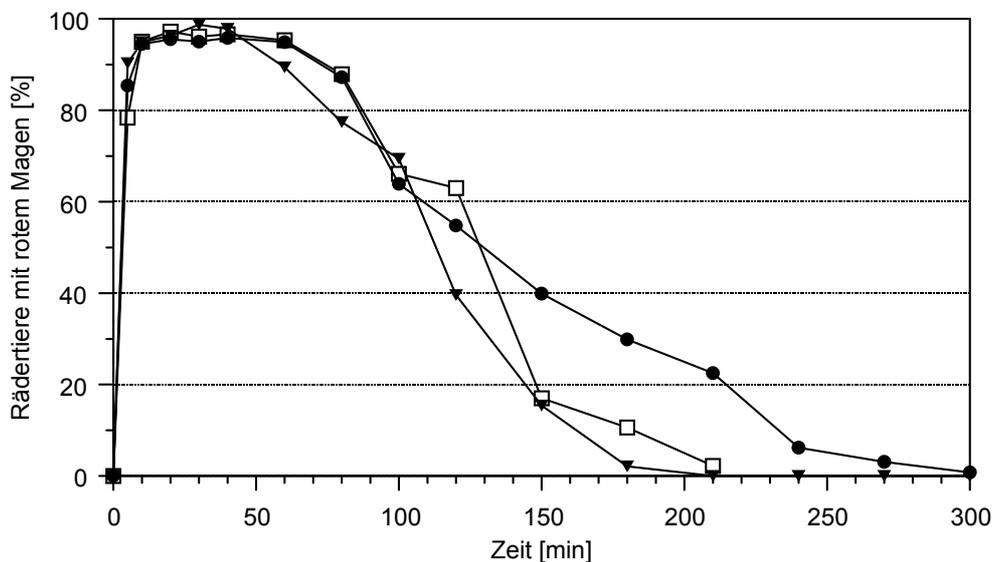
Die Rotatoriendichte hatte in zweierlei Hinsicht Einfluss auf die Nahrungsaufnahme:

1. Je mehr Rädertiere/ml Medium vorlagen, desto mehr Partikel wurden eingestrudelt. Die Konzentration der Partikel im Medium nahm also schneller ab.
2. Bei den festgelegten Tieren konnte bei sehr hohen Rotatoriendichten im Beobachtungsgefäß zudem bemerkt werden, dass die Aufnahme-rate abnahm. Bei Kontakt mit anderen Rotatorien wurde nämlich häufig der Strudel-Apparat für einige Sekunden eingezogen und die Nahrungsaufnahme unterbrochen.

In der Literatur sind Massenzuchten mit bis zu 4000 Tieren/ml beschrieben (Chlorella Industry Co., Ltd., 1997). Dort wird jedoch nicht erwähnt, in welchem Maße sich die hohe Tierdichte auf die Nahrungsaufnahme auswirkt und/oder wie solche Störungen verhindert werden können.

Nach Auswertung von insgesamt 12 Fütterungsversuchen über je fünf Stunden zeigte sich, dass die Zahl der Rotatorien pro ml Medium den entscheidenden Einfluss auf den prozentualen Anteil an rot gefärbten Rädertieren hatte. War die Zahl der Rädertiere pro ml Ansatz gering, so verlief die Kurve flacher. Es dauerte länger, bis sich der Prozentsatz an Tieren mit rot gefärbtem Magen verringerte, da pro Tier mehr Partikel zur Verfügung standen. Bei hohen Tierdichten war der Abfall der Kurve steiler, weil entsprechend weniger Partikel von einem Rädertier aufgenommen wurden (siehe Abb. 20, S. 70).

In der Verarbeitung der verschiedenen Erythrozyten scheinen nur geringe Unterschiede zu bestehen. Die in Abb. 8 zum Vergleich aufgetragenen Prozentwerte von Tieren mit rot gefärbten Mägen bei Ansätzen mit ähnlichen Rädertierdichten (ca. 300 Tiere/ml), aber unterschiedlichen Erythrozytenarten zeigen, dass die Rotfärbung des Verdauungstraktes der Rotatorien nach Fütterung mit menschlichen Erythrozyten allmählich über einen Zeitraum von fünf Stunden abnimmt. Bei Füttern mit Erythrozyten vom Rind und vom Schaf erscheint der Abfall der Kurve etwas steiler, so dass bereits nach ca. 3–3 ½ Stunden keine Rädertiere mit deutlich rotem Verdauungstrakt beobachtet werden können.



**Abb. 8: Prozentsatz der Rädertiere mit rotem Magen** nach Füttern mit menschlichen Erythrozyten, Rinder- und Schafserythrozyten. Die Rädertierdichten sind in allen Versuchen fast identisch.

- Mensch 298 Rädertiere/ml
- ▼— Rind 289 Rädertiere/ml
- Schaf 296 Rädertiere/ml

### 3.1.2.3.1 Austauschversuche

Durch Beobachten im Mikroskop wurde der Eindruck gewonnen, dass die Tiere dauernd einstrudeln, solange ausreichend Partikel im Medium vorhanden sind. Hat die Partikeldichte hingegen stark abgenommen, wird der Transport im Verdauungstrakt verlangsamt.

Um diesen Eindruck zu überprüfen, wurde mit zwei gut unterscheidbaren Partikelsorten der Einfluss des Nahrungsangebots auf die Passagezeiten getestet. Zur Durchführung der Austauschversuche wurden die Tiere zunächst mit einer Partikelsorte gefüttert. Mit Hilfe einer Filterapparatur (Abb. 1, S. 9) entfernten wir alle nicht aufgenommenen Nahrungspartikel aus dem Medium. Anschließend wurden die anderen Partikel hinzugefügt und deren Aufnahme beobachtet.

Abb. 9a) (S. 45) zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs, bei dem die Rädertiere zunächst 30 min mit Erythrozyten gefüttert wurden. Dann wurde der Ansatz in drei gleiche Teile geteilt. Ein Teil diente als Kontrollansatz und wurde ohne Abfiltern der noch vorhandenen Erythrozyten und ohne Zusatz weiterer Partikel über fünf Stunden beobachtet. Aus den beiden anderen Teilen wurden dagegen nach den 30 min alle Erythrozyten entfernt. Einem dieser Teile wurde das gleiche Volumen einer 0,5 prozentigen Hefezell-Suspension hinzugefügt, während der andere Teil mit reinem Seewasser aufgefüllt wurde.

Nach Auszählen der Tiere und Auftrag des Prozentsatzes an Tieren mit rot gefärbten Magen gegen die Zeit, können die Ergebniskurven in 3 Aussagen zusammengefasst werden:

1. Bleiben die Erythrozyten im Medium, so fällt der prozentuale Anteil an gefärbten Tieren nur langsam ab. Dies bestätigt die Ergebnisse der Versuche in Abb. 7 (S. 39) und 8 (S. 41). Erst nach fünf Stunden sind die Erythrozyten vollständig aus dem Medium entfernt, den Rädertieren stehen dann keine frischen Zellen mehr zur Verfügung.

2. Werden alle Erythrozyten nach 30 min abgefiltert, so nimmt der Anteil an Rädertieren mit rotem Verdauungstrakt schneller ab als im Kontrollansatz und ist nach knapp 2 Stunden auf 10% gesunken. Da keine frischen Blutzellen aufgenommen werden können, scheint die Abnahme der Rotfärbung in den Verdauungsorganen in diesem Fall davon abzuhängen, wie der physiologische Weitertransport von Nahrung im Darmtrakt geschieht.
3. Gibt man nach Abfiltern der Erythrozyten das gleiche Volumen einer Hefezellsuspension zum Ansatz, so wird die Ausscheidung des Hämoglobins aus dem Verdauungstrakt beschleunigt. Die Prozentzahl an Tieren mit rotem Magen sinkt rasch ab. Bereits 30 min nach Entfernen der Erythrozyten und Zugabe der Hefezellen sind nur noch vereinzelt Tiere mit rot gefärbtem Verdauungstrakt zu erkennen. Eine leichte orange Färbung der Verdauungsorgane ist jedoch noch 60 Minuten sichtbar, obwohl der Verdauungstrakt mit Hefezellen angefüllt ist (siehe auch 3.2.5, S. 116 ff).

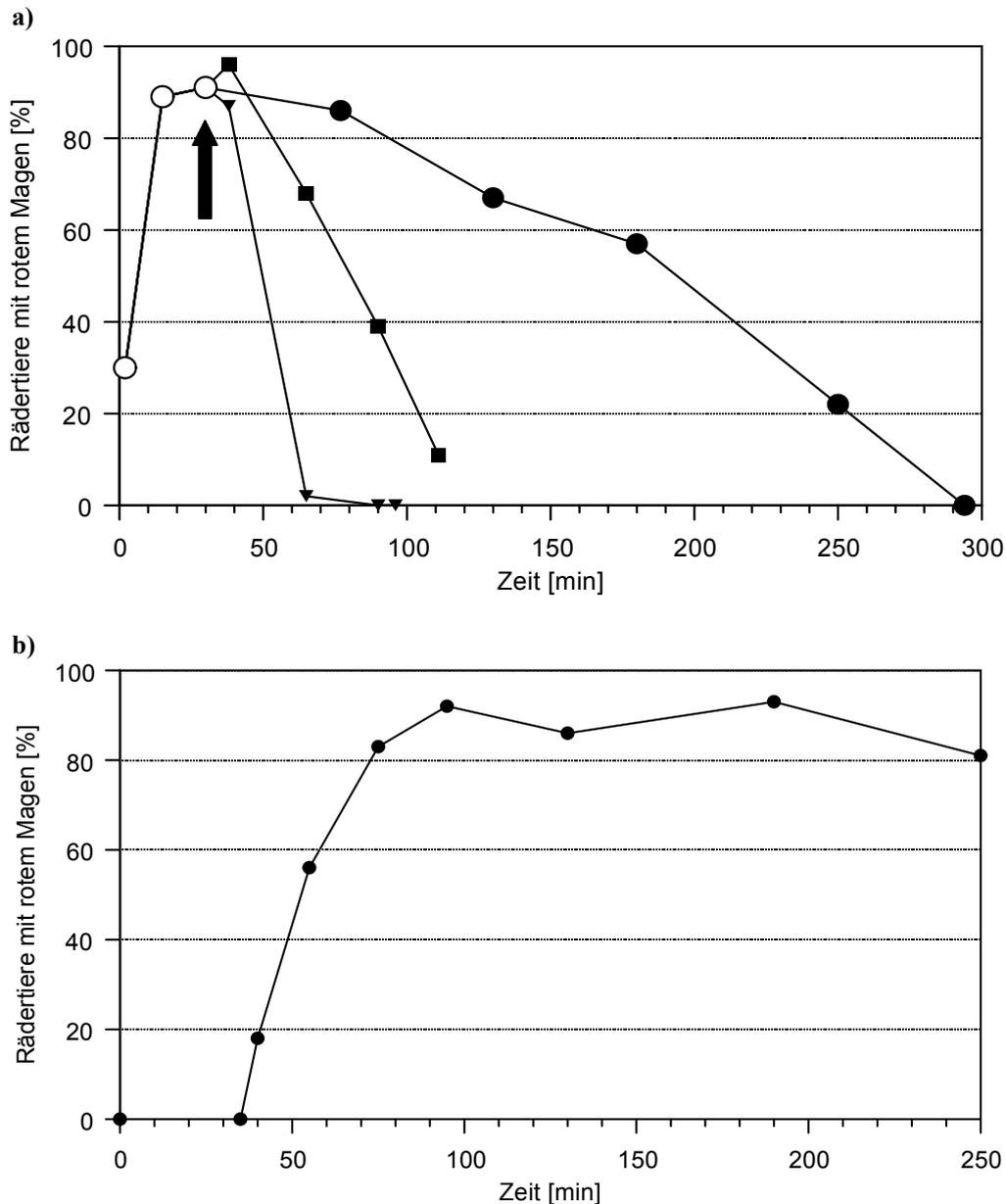
Bei Zufuhr von Hefezellen wurden also vorher aufgenommene Erythrozyten sehr rasch aus dem Verdauungstrakt ausgestoßen, um Platz für die neu eingestrudelten Hefezellen zu gewinnen. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht damit zu erklären, dass die Rädertiere Hefezellen als Nahrungspartikel bevorzugen. Das konnte dadurch nachgewiesen werden, dass das Experiment auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt wurde:

Die Ergebnisse eines derartigen Austauschversuchs sind in Abbildung 9b) (S. 45) dargestellt. Hier fütterten wir die Rotatorien zunächst mit Hefezellen. Diese Zellen wurden nach 30 min abgefiltert und anschließend Erythrozyten ins Medium gegeben.

Magen und Intestinum färben sich nun innerhalb weniger Minuten rot. Die Färbung ist zunächst nicht so intensiv wie bei Tieren, die vor der Zugabe von Blutzellen keine Nahrung erhalten hatten, doch 20 min nach Zugabe haben bereits 58% der Rotatorien einen roten Magen.

Nach 2–3maliger Darmentleerung, d.h. ca. 60 min nach Erythrozyten-Zugabe, sind keinerlei zellartige Strukturen mehr in den ausgestoßenen Verdauungsresten zu erkennen und 90% der Tiere zeigen die bereits beschriebene leuchtend rote Färbung der Verdauungsorgane durch das freigesetzte Hämoglobin.

Diese Beobachtung beweist, dass „artifizielle“ Partikel wie z.B. die Erythrozyten als „Nahrung“ von *B. plicatilis* akzeptiert werden, solange sie die richtige Größe haben. Hefezellen als eher „natürliche“ Nahrungspartikel werden demgegenüber nicht nachweisbar bevorzugt.



**Abb. 9: Austausch von Nahrungspartikeln aus dem Verdauungstrakt von *B. plicatilis*.**

Der prozentuale Anteil an Tieren mit rotem Magen ist gegen die Zeit aufgetragen.

**a)** Zum Zeitpunkt 0 min wurden die Rädertiere mit menschlichen Erythrozyten gefüttert (20 ml Erythrozyten-Stamm suspension zu 100 ml Rädertier-Medium, ca. 190 Rädertiere/ml). Nach 30 min (Pfeil) wurde der Ansatz gleichmäßig auf 3 Gefäße verteilt und wie folgt behandelt:

- Rädertiere nach Fütterung mit Erythrozyten (Gesamtansatz)
- Kontrolle (ohne Abfiltrieren der Erythrozyten)
- Rädertiere nach Abfiltrieren der Erythrozyten
- ▼ Rädertiere nach Abfiltrieren der Erythrozyten und Zusatz des gleichen Volumens einer Hefezellsuspension (0,5 g Hefe/100 ml Seewasser).

**b)** Die Rädertiere wurden 30 min mit Hefezellen gefüttert. Nach Abfiltrieren der Zellen wurden Erythrozyten ins Medium gegeben.

Weitere Austauschversuche wurden mit Erythrozyten-Ghosts durchgeführt, die mit FITC-markiertem Albumin beladen waren. Der Vorteil der Fluoreszenz-Markierung wird bei Beobachtungen über mehrere Stunden deutlich: Da das Fluoreszenz-Signal sehr intensiv ist, sind auch kleine Mengen Markersubstanz im Verdauungstrakt über Stunden nachweisbar. Allerdings war eine quantitative Bestimmung der aufgenommen fluoreszierenden Substanz nicht möglich.

Die Austauschversuche von fluoreszierenden mit fluoreszenzfreien Ghosts zeigten ähnliche Ergebnisse, wie die Austauschversuche von Erythrozyten mit Hefezellen. Wurden Rotatorien mit FITC-Albumin-Ghosts gefüttert und nach kurzer Inkubation alle überschüssigen Ghosts aus dem Medium entfernt, so war eine intensive Fluoreszenz noch bis zu 90 min nachher sichtbar.

Nach Zugabe fluoreszenzfreier Partikel verschwand der Hauptteil an fluoreszierendem Material schneller aus dem Lumen des Verdauungstrakts. Eine schwache Restfluoreszenz blieb dabei allerdings auch hier noch über einen Zeitraum von fast zwei Stunden erhalten (siehe 3.2.5.2, S. 121).

Bei den Austauschversuchen war zu beobachten, dass erst bei hoher Konzentration der Nahrungspartikel die Aufnahme- und Austauschgeschwindigkeiten von freischwimmenden und festgelegten Tieren einander glichen. Die arretierten Tiere sind darauf angewiesen, dass der Nachschub an Partikeln im „Einzugsbereich“ des Räderorgans nicht abnimmt. Die freien Rädertiere hingegen schwimmen im Medium umher und sind daher weniger von einer lokalen Abnahme der Partikel betroffen.

Die hier beschriebene Möglichkeit, Partikel im Verdauungstrakt von *B. pliocatilis* rasch und vollständig auszutauschen, wird in späteren Abschnitten auch noch zur Untersuchung von Resorptionsvorgängen eingesetzt (siehe 3.2.5, S. 116).

#### **3.1.2.4 Mechanische Aufschließbarkeit der Partikel im Mastax**

Eine weitere Frage ist, ob die Art der eingesetzten Partikel auch Einfluss auf die Vorgänge im Kaumagen und damit auf die Weiterleitung hat.

Bereits die mikroskopische Beobachtung zeigte, dass sich die mechanische Behandlung im Mastax auf die eingesetzten Partikel unterschiedlich auswirkte. Erythrozyten wurden im Mastax zerstört, Hefezellen blieben als zelluläre Strukturen erkennbar.

In einigen Versuchen wurden Erythrozyten verfüttert, die mit Glutardialdehyd-Lösungen unterschiedlicher Konzentration fixiert wurden. Die fixierten Erythrozyten, die sich lichtmikroskopisch lediglich durch ihre braun-rote Färbung von den unbehandelten Erythrozyten unterschieden, wurden ebenso rasch wie diese von den Rädertieren eingestrudelt. Ein deutlicher Unterschied konnte aber nach Messung des durch den Mastax freigesetzten Hämoglobins deutlich gemacht werden (Abb. 10). Die durch die Rädertiere freigesetzte Menge des Blutfarbstoffs wurde hier als Anzeichen gewertet, wie erfolgreich die fixierten Zellen durch den Kaumagen aufgeschlossen wurden.

Aus unfixierten Erythrozyten setzten die Rädertiere rasch das Hämoglobin frei: nach 30 min waren 47%, nach 60 min 69% und nach 90 min 81% des Blutfarbstoffes im Medium nachweisbar

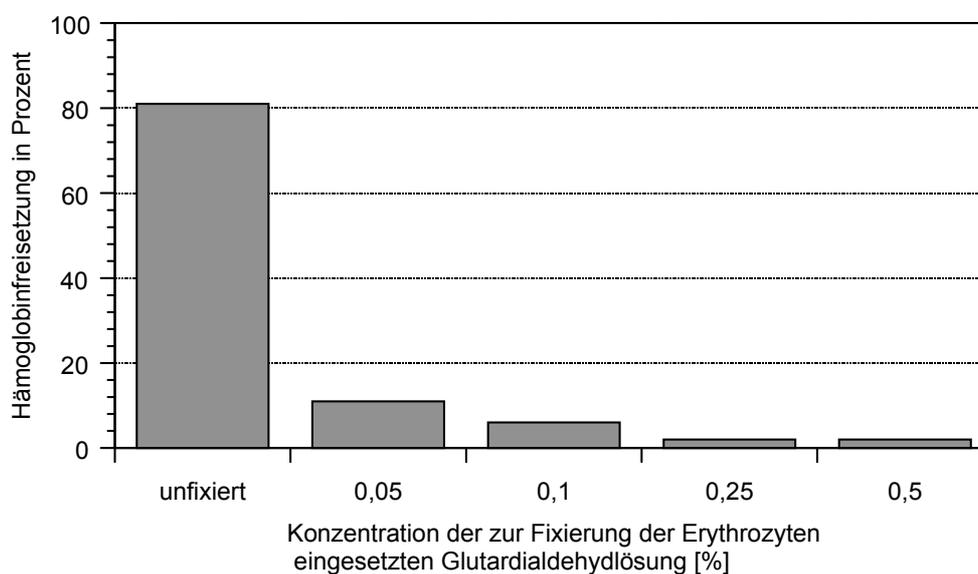
Wurden die Zellen mit Glutardialdehyd-Konzentrationen von 0,05-0,1% fixiert, so stieg das photometrisch messbar freigesetzte Hämoglobin im Laufe des 90-minütigen Fütterungsansatzes an, jedoch nicht mehr so steil wie bei unfixierten Erythrozyten. Nach Fixierung mit 0,05 prozentiger Glutardialdehydlösung erreichte der Prozentsatz des freigesetzten Hämoglobin nach 60 min nur 9% und nach 90 min 11% des insgesamt in allen Erythrozyten enthaltenen Blutfarbstoffes

Aus Erythrozyten, die mit 0,1 prozentiger Glutardialdehydlösung fixiert wurden, konnten die Rädertiere kaum Hämoglobin freisetzen. Der prozentu-

ale Anteil an freigesetztem Hämoglobin stieg über 60 min nur um 1% an und erreichte nach 90 min 6% des Gesamtgehalts an Blutfarbstoff.

Das Fixieren der Blutzellen mit einer 0,25-0,5 prozentigen Glutardialdehyd-Lösung führte zu einer geringen Freisetzung von Hämoglobin durch die Rotatorien. Es wurden ähnliche Werte wie nach Vermischen der fixierten Erythrozyten mit rädertierfreiem Seewasser gemessen (1%-2%). In Magen und Intestinum waren dann deutlich einzelne Zellen erkennbar. Nach der Darmentleerung lagen die abgegebenen Zellen dicht aneinander als kompakte Gebilde vor, die sich nach einigen Minuten voneinander lösten und im Medium verteilten.

Bei den mit 0,5% Glutardialdehyd fixierten Erythrozyten konnte zudem beobachtet werden, dass sich der Mastax langsamer bewegte und die Verweildauer der Zellen im Mastax, verglichen mit unfixierten Zellen, länger war. An den Passagezeiten änderte dieses Verhalten nichts, die Darmentleerung fand wie bei den unfixierten Erythrozyten nach ca. 20 min statt.



**Abb. 10: Hämoglobinfreisetzung** (in Prozent) in rädertierhaltigem Medium, 90 min nach Fütterung mit **unfixierten und fixierten Erythrozyten**.

200 µl Erythrozytensuspension wurden mit 20 ml Medium vermischt. Die Freisetzung des Hämoglobins wurde über 90 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Zur Berechnung der prozentualen Hämoglobinfreisetzung wurde die Extinktion einer Probe unfixierter Erythrozyten in Aqua dest. gleich 100 Prozent gesetzt.

---

Ähnliche Vorgänge waren auch nach der Fütterung mit fixierten FITC-Albumin-Ghosts zu beobachten (siehe 3.2.5.2, S. 121). Solch fixierte fluorigene Ghosts wurden auch zur Kontrolle bei der Untersuchung der Resorption von Proteinen durch *B. plicatilis* eingesetzt.

Da auch Hefezellen scheinbar unverändert den Verdauungstrakt passierten, führten wir eine Behandlung der Zellen mit Lyticase durch. Ziel war es zu versuchen die Hefezellwand kontrolliert anzudauen, um Bedingungen zu schaffen, unter denen auch Hefezellen im Mastax nachweisbar zerkaut werden können. Lyticase ist ein Enzym, das  $\beta$ -1,3-glucosidische Bindungen (die z.B. auch im Glucan der Hefe-Zellwand vorkommen) hydrolysiert (Vršanská et al., 1977). Die Zellen mit angedauter Zellwand (bzw. Hefe-Sphäroblasten) wurden zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit des Mastax eingesetzt. Als Nachweis für das Aufschließen der Zellen diente die Indikator-Färbung, da durch den Andau der Zellwand das Eindringen der  $H^+$ -Ionen erleichtert und somit ein deutlicher Farbumschlag im sauren Milieu sichtbar werden sollte.

Wurden die Bromthymolblau-gefärbten Hefezellen mit Lyticase behandelt und nach dem Andau an die Rotatorien verfüttert, so war der Ablauf der Verdauungsvorgänge grundsätzlich ähnlich wie bei unbehandelten Zellen (Abb. 26, S. 38).

Allerdings zeigten sich Unterschiede in Einzelheiten:

Der Farbumschlag der Zellen im Intestinum war deutlicher zu erkennen und die Weitergabe der Hefen vom Magen an das Intestinum (nach 25 min) sowie die Ausscheidung des Darminhalts (35 min nach Hefezugabe) war etwas verlangsamt. Die im Verdauungstrakt erkennbaren Partikel erschienen weniger kontrastreich als unbehandelte Hefezellen und lagen nach der Ausscheidung als kompakte Gebilde vor, die sich nicht im Medium verteilten (Abb. 11).

Diese Beobachtungen lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Durch den Vorverdau der Zellwand mit Lyticase werden die Hefezellen so verändert, dass sie im Mastax teilweise aufgeschlossen werden können. Dies

führt gleichzeitig zu einem tieferen Eindringen der  $H^+$ -Ionen und einem deutlichen Umschlag der Indikatorfärbung im Intestinum.

Zellen und Zellbruchstücke verkleben untereinander und bilden zusammenhängende „Gebilde“. Ein vollständiger Aufschluss der Zellen wird durch den enzymatischen Vorverdau hingegen nicht erreicht.



**Abb. 11:** Hellfeldaufnahme eines Rädertieres 35 min nach Fütterung mit Lyticase behandelten und mit Bromthymolblau gefärbten Hefezellen. Die zuvor enzymatisch angedauten Hefezellen sind im Magen deutlich grün gefärbt, aber nicht so kontrastreich wie intakte Hefezellen. Nach der Ausscheidung liegen kompakte „Gebilde“ im Medium vor (Kalibrierungsbalken = 50  $\mu\text{m}$ ).

---

## **3.2 Photometrische Untersuchung von Partikelaufnahme und Nahrungspassage durch den Verdauungstrakt**

Die mikroskopischen Beobachtungen an einzelnen Tieren weisen daraufhin, dass der physiologische Zustand des jeweils untersuchten Tieres Einfluss auf den Prozess der Nahrungsaufnahme und -weiterleitung haben könnte.

Bei der Untersuchung von größeren Ansätzen ist die Beurteilung des Grades der Rotfärbung des Verdauungstraktes kaum standardisierbar und wird durch subjektive Eindrücke beeinflusst. Daher wurden ergänzend zu den vorangegangenen Untersuchungen die entsprechenden Vorgänge bei *B. pliocatilis* quantitativ photometrisch untersucht (Methodik siehe 2.6.6, S. 23).

### **3.2.1 Charakterisierung der optischen Eigenschaften der verwendeten Partikel**

Im Photometer wurde die Veränderung der Lichtabsorption des Untersuchungsmediums bei 630 und 420 nm erfasst.

Nach Aufnahme durch die Rotatorien werden die Erythrozyten im Mastax zerstört. Dies führt zu einer Abnahme der Partikeldichte im Medium. In Folge dessen nimmt auch die durch die Erythrozyten verursachte Lichtstreuung bei 630 nm ab. Bei dieser Wellenlänge trägt das Hämoglobin selbst nicht zur Absorption bei.

Nach Passage durch den Rotatoriendarm wird das aus den Erythrozyten stammende Hämoglobin freigesetzt. Die Freisetzung des Hämoglobins kann durch Messen der Extinktion bei 420 nm verfolgt werden. Bei der Extinktion dieser Wellenlänge handelt es sich um ein komplexes Signal. Neben dem Beitrag des frei gelösten Hämoglobins im Medium trägt noch der Streulichtanteil der Erythrozyten und die Absorption des in ihnen verpackten Blutfarbstoffes zur Extinktion bei.

Hefezellen eignen sich dagegen nur für die mikroskopische Bestimmung von Verdauungsvorgängen. Sie verursachen zwar auch eine konzentrations-

abhängige Lichtstreuung im Photometer, es kann jedoch kaum eine Abnahme der Extinktion nach Verfütterung an die Rädertiere gemessen werden. Das liegt daran, dass sie als ganze Partikel wieder ausgeschieden werden (Kühle, 1983).

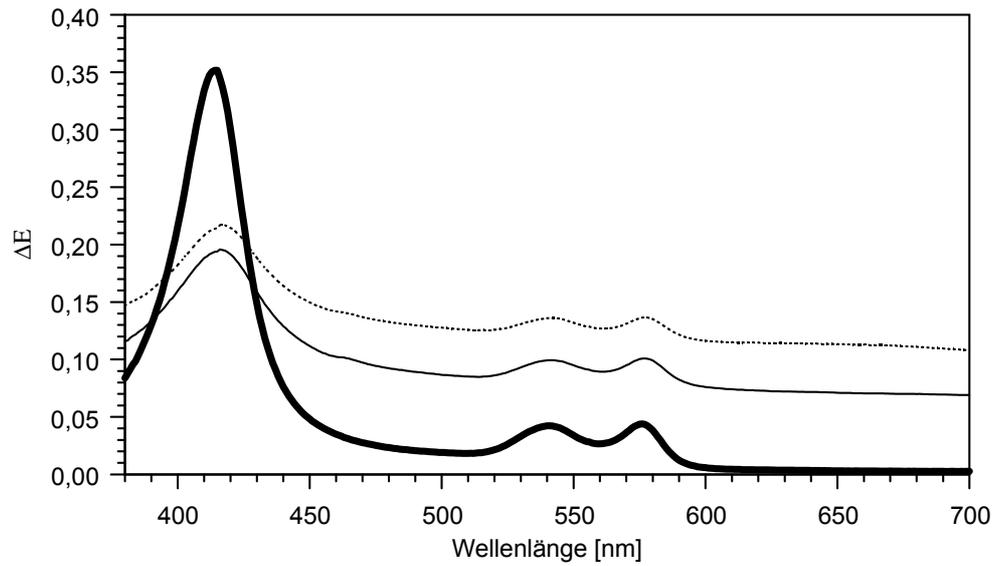
### **3.2.1.1 Absorptionsspektren der Erythrozyten bzw. des Hämoglobins**

Die unterschiedliche Aussagekraft der Extinktionsmessungen bei 420 und 630 nm lässt sich am besten erkennen, wenn man die Absorptionsspektren der Erythrozyten bzw. des Hämoglobins betrachtet, die in verschiedenen Medien aufgenommen wurden.

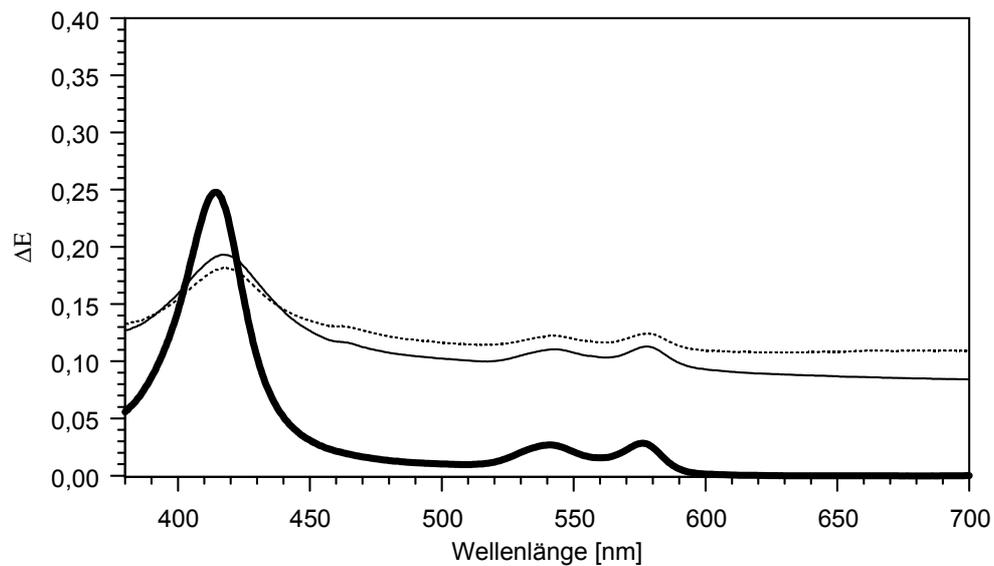
Abbildung 12 zeigt Absorptionsspektren von Erythrozyten in 0,9 prozentiger NaCl-Lösung, in Seewasser und (des freigesetzten Hämoglobins) in Aqua dest. Für die Stammsuspensionen wurden jeweils 50 µl Vollblut mit 10 ml der obigen Medien vermischt. Zum Erfassen der Spektren wurden diese Stammsuspensionen so verdünnt, dass jeweils identische Erythrozyten-Konzentrationen vorlagen.

In allen Spektren ist die „Soretbande“ des Hämoglobins (Kaboth & Bege-  
mann, 1971) als Extinktionsmaximum bei ca. 420 nm erkennbar. Die viel niedrigeren Nebenmaxima bei 540 nm und bei 575-578 nm sind für oxygeniertes Hämoglobin typisch. Für die photometrische Bestimmung des Hämoglobins wurde stets die Extinktion bei 420 nm benutzt, obwohl sich das tatsächliche Maximum der Soretbande je nach Medium in der Wellenlänge etwas verschob. Der Unterschied war jedoch unerheblich.

## a) menschliches Blut



## b) Schafsblut



**Abb. 12: Absorptionsspektren von Erythrozyten-Suspensionen** in 0,9 prozentiger NaCl-Lösung (—), Seewasser (·····) und Aqua dest. (—). Für die Aufnahme der Spektren wurde aus einer Stammsuspension (50  $\mu$ l Vollblut in 10 ml der entsprechenden Lösung) 2 ml entnommen und in 30 ml NaCl-Lösung bzw. Seewasser bzw. Aqua dest. aufgenommen.

Die in den verschiedenen untersuchten Medien entlang der Ordinate parallel verschobenen Spektren sind darauf zurückzuführen, dass Streulicht in unterschiedlicher Weise zur Extinktion beiträgt. Während das aus den hämolysierten Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin kein Streulicht zeigt (siehe Ansatz der Erythrozyten in Aqua dest.), bewirken die intakten Erythrozyten im isotonen (0,9 prozentige NaCl-Lösung: ca. 0,3 osmol/l) oder hypertonen Medium (Seewasser: ca. 1 osmol/l) über den ganzen Wellenlängenbereich eine Anhebung der Extinktion durch Streulichtanteile (Fortnagel et al., 2001). Besonders deutlich zeigt sich das im längerwelligen Bereich, in dem Hämoglobin selbst nicht absorbiert.

Die Extinktion bei 630 nm beruht allein auf Lichtstreuung durch die Erythrozyten. Die unterschiedliche Extinktion der Erythrozyten im iso- sowie im hypertonen Medium wird durch Oberflächenveränderungen („Stechapfelform“) verursacht, die bei Zellen in hypertonem Seewasser auftreten. Die auftreffenden Lichtstrahlen werden dadurch stärker gestreut.

Wenn man die Extinktion bei 630 nm als Grundlinie nimmt, ist die Soretbande bei hämolysierten Erythrozyten viel höher, als bei intakten Erythrozyten. Auf Grund der dichten Packung der Farbstoffmoleküle in den Erythrozyten gilt nämlich das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht. Nach diesem Gesetz ( $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) ergäbe sich die Extinktion einer Lösung aus dem Produkt des spezifischen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), der Konzentration des Stoffes ( $c$ ) und der Schichtdicke der Küvette ( $d$ ). Die Abbildung zeigt jedoch, dass die Extinktion der hämolysierten Erythrozyten bei einer Wellenlänge von 420 nm absolut und relativ höher ist, als die Soretbande einer gleichen Hämoglobinmenge in intakten Erythrozyten.

Aus dem Verhältnis der Absorptionsmaxima der Erythrozyten in Seewasser und des Hämoglobins in Aqua dest.

$$\frac{(E_{420} \text{ Hämoglobin in Aqua dest.} - E_{630} \text{ Hämoglobin in Aqua dest.})}{(E_{420} \text{ Erythrozyten in Seewasser} - E_{630} \text{ Hämoglobin in Aqua dest.})}$$

lässt sich ein Faktor für die Umrechnung der Erythrozytendichte in daraus

---

freisetzbare Hämoglobin gewinnen. Bei menschlichem Blut muss dazu die Extinktion der Erythrozyten mit dem Faktor 1,4 multipliziert werden, bei Schafsblut mit 1,2.

### **3.2.1.2 Kalibrierung der Erythrozyten-Suspension bei 630 nm und 420 nm**

Um aus den in den Fütterungsversuchen gemessenen Extinktionen die Zahl der aufgenommenen Erythrozyten errechnen zu können, mussten die Extinktionen bei 630 nm oder 420 nm gegen die Erythrozytdichten kalibriert werden (2.6.2, S. 18).

Ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion ist bei menschlichen Blutzellen bis zu einer Dichte von  $6 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml, bei Schafserythrozyten bis zu einer Dichte von  $7,5 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml und bei Rindererythrozyten bis ca.  $10 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml gegeben (Discher, 2000). Unsere Messungen wurden daher nur im Bereich unterhalb dieser Grenzwerte durchgeführt.

Abbildung 13 zeigt für die Extinktion bei 630 nm, dass die Kalibriergeraden für Erythrozyten der verschiedenen Säuger in ihrer Steigung voneinander abweichen, innerhalb einer Art jedoch alle Verdünnungsreihen ähnliche Ergebnisse liefern.

Da die Zahl der Erythrozyten/ $\mu$ l Vollblut von Individuum zu Individuum schwankt (siehe auch Toleranzbereiche in Tabelle 3, S. 56) und auch von äußeren Bedingungen wie z.B. Stress (vor allem bei Blut vom Schlachthof), Flüssigkeitszufuhr und sportlicher Aktivität abhängt, lassen sich die Abweichungen innerhalb einer Säugergruppe erklären. Zudem sind die Zählungen in der Blutzählkammer fehlerbehaftet. Insgesamt übersteigt der relative Fehler jedoch 5% nicht, so dass die Ergebnisse davon nicht signifikant verändert werden, besonders da es in den Versuchen ja eher auf die relativen Änderungen der Erythrozytenzahlen ankommt. Beim Ermitteln der Filtrations-

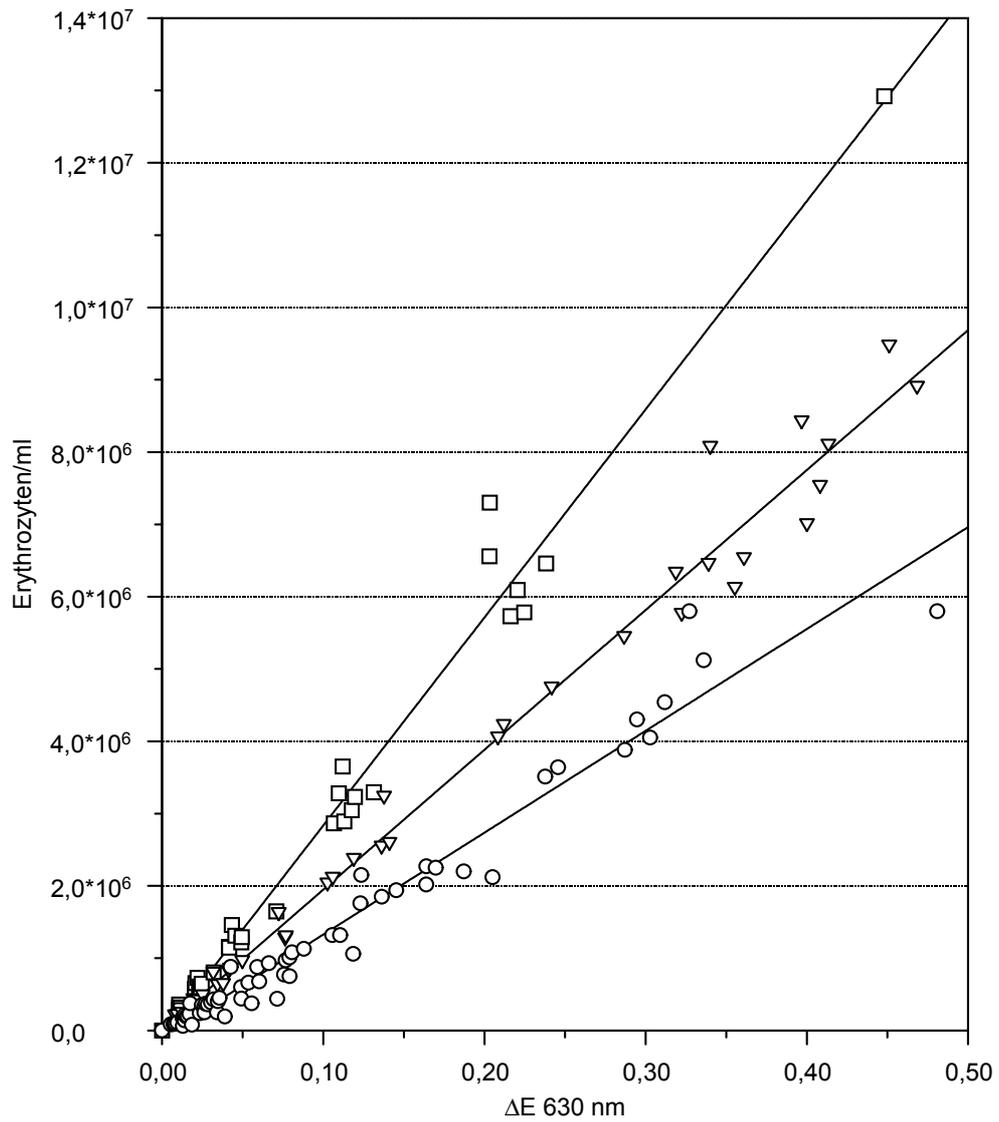
rate etwa fällt die Partikelzahl gar nicht ins Gewicht. Die Änderungen der Erythrozyten-Dichten dienen eher der Veranschaulichung des Fraßvorgangs. Mit Hilfe der Erythrozytenzahlen ist es auch möglich, die Ergebnisse von Versuchen mit menschlichem Blut mit Werten aus Versuchen mit Rinder- oder Schafsblut zu vergleichen.

Ein Vergleich der Größe der verschiedenen Säuger-Erythrozyten (Tabelle 3) mit den Kalibriergeraden (Abb. 13, S. 57) zeigt, dass mit der Zunahme des Erythrozytenvolumens die Steigung der Geraden abnimmt. Das Licht wird bei einer Wellenlänge von 630 nm an größeren Partikeln stärker gestreut, als in Suspensionen mit kleinen Partikeln. Die Oberflächenveränderungen im hypertonen Seewasser wirken sich bei den kleineren Partikeln hingegen nur geringfügig auf die Lichtstreuung aus (Abb. 12, S. 53).

**Tab. 3: Normwerte von menschlichem, Rinder- und Schafsblut** (nach Altmann, P. L., 1961). Die Werte in Klammern geben die Variationsbreite wieder.

m= männlich, w= weiblich

	<b>Mensch</b>	<b>Rind</b>	<b>Schaf</b>
<b>Zahl der Erythrozyten/<math>\mu</math>l Vollblut</b>	m 5,4 (4,6-6,2) $\times 10^6$ w 4,8 (4,2-5,4) $\times 10^6$	8,1 (6,1-10,7) $\times 10^6$	10,3 (9,4-11,1) $\times 10^6$
<b>Hämatokrit [ml/100 ml Blut]</b>	m 47 (40-54) w 42 (37-47)	40 (33-47)	31,7 (29,9-33,6)
<b>Durchmesser der Erythrozyten [<math>\mu</math>]</b>	7,5 (7,2-7,8)	5,9	4,8
<b>Volumen der Erythrozyten [<math>\mu\text{m}^3 = \text{fl}</math>]</b>	m 87 (70-94) w 87 (74-98)	50 (47-54)	31 (30-32)
<b>Hämoglobingehalt des Blutes [g/100 ml Blut]</b>	m 16,3 (14,5-18,1) w 14,5 (12,3-16,7)	11,5 (8,7-14,5)	10,9 (10,0-11,8)
<b>Hämoglobingehalt der Erythrozyten [g/100 ml Erythrozyten]</b>	33,5 (30-40)	29,0	34,5 (34-35)
<b>Hämoglobingehalt/Erythrozyt [pg]</b>	m 29 (25-34) w 29 (24-33)	16 (14-19)	11-13



**Abb. 13:** Regressionsgeraden der Kalibrierungen bei **630 nm**. Die Geraden aller untersuchten Säuger (—○— Mensch, —▽— Rind, —□— Schaf ) wurden zum Vergleich in einer Grafik aufgetragen.

Für die weitere Berechnung der Erythrozyten-Konzentrationen und für die Ermittlung der Filtrationsrate wird das arithmetischen Mittel, das sich aus den Steigungen aller Kalibriergeraden eines Säugers ergibt (Tabelle 4), als Umrechnungsfaktor herangezogen.

**Tab. 4: Steigungen der Kalibriergeraden** [Zellen/ml bei  $\Delta E=1,0$ ] von menschlichen Erythrozyten, Rinder- und Schafserythrozyten in Seewasser bei **630 nm**. In den Klammern sind die Standardabweichung und der Standard-Fehler in Prozent vom Mittelwert angegeben.

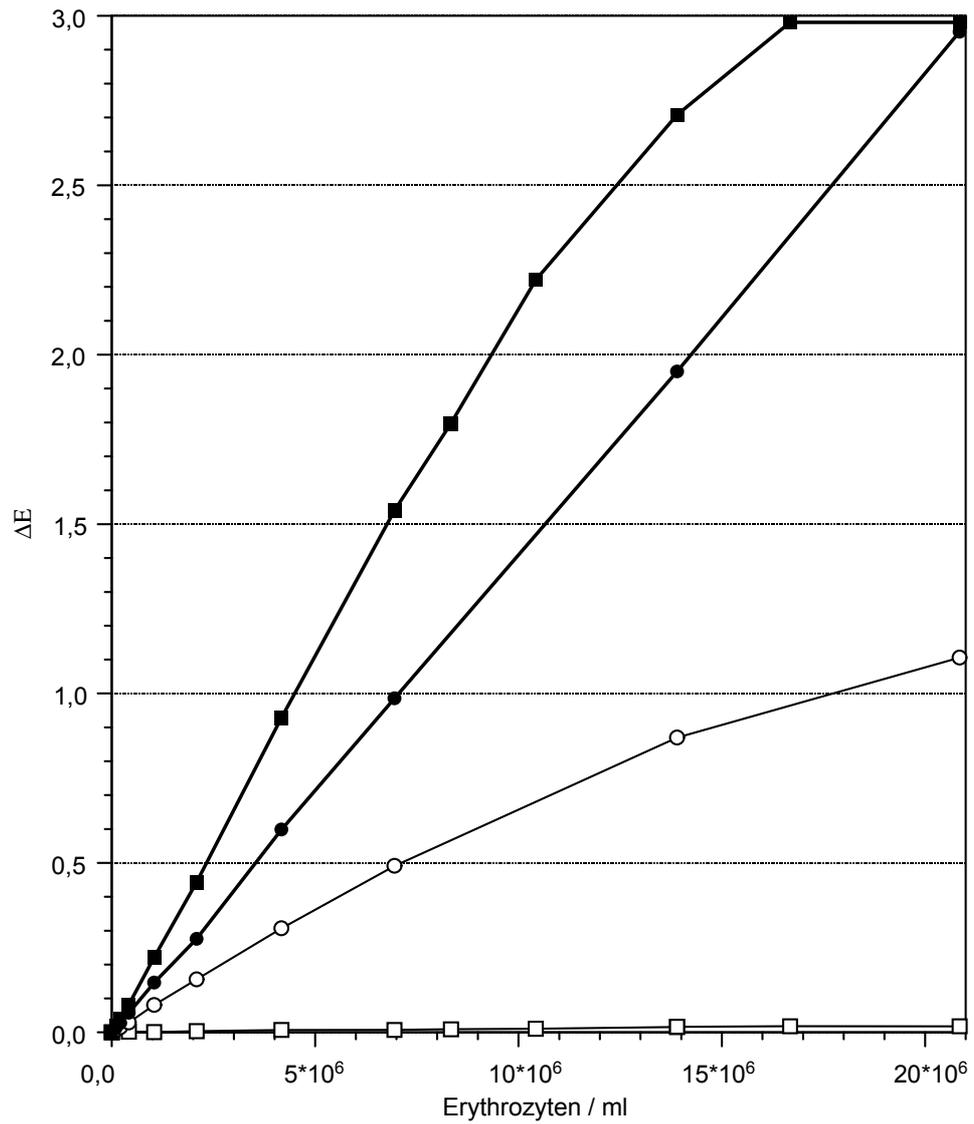
	<b>Mensch</b>	<b>Rind</b>	<b>Schaf</b>
Anzahl der ermittelten Kalibriergeraden	12	7	7
<b>Arithmetischer Mittelwert</b>	<b><math>13,2 \cdot 10^6</math></b>	<b><math>20,4 \cdot 10^6</math></b>	<b><math>29,5 \cdot 10^6</math></b>
Standard-Abweichung	$\pm 1,8 \cdot 10^6$ (14%)	$\pm 1,7 \cdot 10^6$ (8%)	$\pm 3,8 \cdot 10^6$ (13%)
Standard-Fehler	$\pm 0,5 \cdot 10^6$ (4%)	$\pm 0,7 \cdot 10^6$ (3%)	$\pm 1,4 \cdot 10^6$ (5%)
Steigung der Kalibriergerade bei Auftragung aller Punkte	$13,6 \cdot 10^6$	$19,4 \cdot 10^6$	$30,1 \cdot 10^6$

---

In ähnlicher Weise wurden auch Kalibriergeraden für die Extinktion bei 420 nm ermittelt. Bei dieser Wellenlänge tragen sowohl die Absorption des Hämoglobins, als auch die Lichtstreuung der Erythrozyten zur Extinktion bei (Abb. 12, S. 53). Um beide Einflüsse zu veranschaulichen wurden zusätzlich Kalibriergeraden in hypertonem Medium und in hypotonem Medium (100% Hämolyse) ermittelt. Dies geschah folgendermaßen:

1. Eine Verdünnungsreihe von Erythrozyten wurde in Seewasser angesetzt und bei 420 nm im Photometer gemessen (und parallel dazu die Zahl der Zellen bestimmt).
2. Erythrozytenverdünnungen wie unter Punkt 1 wurden auch in Aqua dest. angesetzt und nach 20 min Hämolyse ebenfalls bei 420 nm gemessen.

Abb. 13 zeigt die Extinktionskurven von menschlichen Erythrozyten in Seewasser (Hämoglobin in Zellen) und von hämolysierten Erythrozyten mit daraus freigesetztem Hämoglobin in Aqua dest. In Seewasser steigt die Extinktion bei 420 nm linear zur Erythrozytendichte von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/ml an. Die Extinktion des freien Hämoglobins steigt demgegenüber steiler und zeigt einen linearen Anstieg nur bis zu einer Extinktion von 1,55 oder einer Konzentration entsprechend  $6 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml.

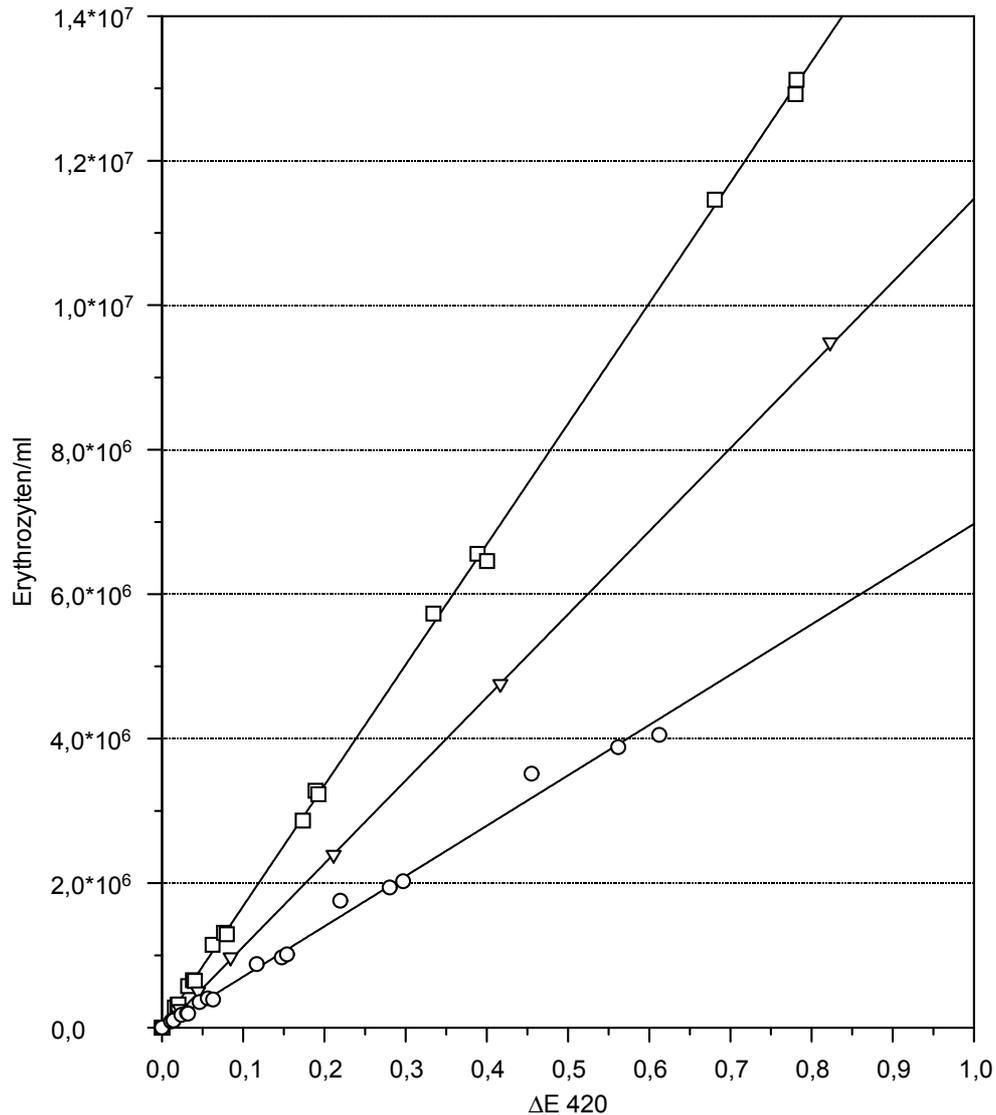


**Abb. 14:** Extinktionsmessungen von **menschlichen Erythrozyten** in Seewasser und daraus **freigesetztem Hämoglobin** in Aqua dest. Es wurde jeweils die gleiche Erythrozytenzahl eingesetzt.

(● ΔE 420 Seewasser, ○ ΔE 630 Seewasser, ■ ΔE 420 A.dest., □ ΔE 630 A.dest.)

Vergleicht man die Kalibriergeraden bei 420 nm für Säuger-Erythrozyten unterschiedlicher Herkunft in Seewasser miteinander, so ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Kalibriergeraden für 630 nm (Vergleiche Abb. 15 mit Abb. 13, S. 57).

Zur weiteren Berechnung wurden erneut die arithmetischen Mittelwerte herangezogen (Tab. 5).



**Abb. 15:** Regressionsgeraden der Kalibrierungen bei 420 nm. Die Geraden aller untersuchten Säugereythrozyten (—○— Mensch, —▽— Rind, —□— Schaf) wurden zum Vergleich in einer Grafik aufgetragen.

**Tab. 5: Steigungen der Kalibriergeraden** [Zellen/ml bei  $\Delta E=1,0$ ] von menschlichen Erythrozyten, Rinder- und Schafserythrozyten in Seewasser bei **420 nm**. Beim Rinderblut wurde nur eine Verdünnungsreihe gemessen.

Die Standardabweichung und der Standard-Fehler in Prozent vom Mittelwert sind in Klammern angegeben.

	<b>Mensch</b>	<b>Rind</b>	<b>Schaf</b>
Anzahl der ermittelten Kalibriergeraden	3	1	3
<b>Arithmetischer Mittelwert</b>	<b><math>7,1 \cdot 10^6</math></b>		<b><math>16,7 \cdot 10^6</math></b>
Standard-Abweichung	$\pm 0,6 \cdot 10^6$ (8%)		$\pm 0,2 \cdot 10^6$ (1%)
Standard-Fehler	$\pm 0,3 \cdot 10^6$ (5%)		$\pm 0,1 \cdot 10^6$ (1%)
Steigung der Kalibriergerade bei Auftragung aller Punkte	$7,0 \cdot 10^6$	$11,5 \cdot 10^6$	$16,7 \cdot 10^6$

### 3.2.2 Ergebnisse aus den Fütterungsansätzen

Insgesamt wurden 60 Versuche zum Fressverhalten von *B. plicatilis* durchgeführt. Die Versuche mit Human-, Rind- und Schafserythrozyten brachten vergleichbare Ergebnisse.

Zunächst soll die Auswertung zweier typischer Versuche in allen Einzelheiten besprochen werden. Daran soll erläutert werden, wie die Änderungen der Extinktionen von Erythrozyten-Suspensionen in verschiedener Weise genutzt werden können, um Auskunft über unterschiedliche Aspekte der Nahrungsaufnahme bei *B. plicatilis* zu erhalten.

#### 3.2.2.1 Auswertungsmöglichkeiten für die Fütterungsversuche mit Erythrozyten

In einem Fütterungsansatz (siehe 2.6.6, S. 23 f) wurden nach dem Mischen der Erythrozyten-Suspension mit den Rotatorien alle 5-10 min rädertierfreie Proben aus dem Filtereinsatz entnommen und deren Extinktion bei 420 und 630 nm bestimmt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Extinktion des Überstands bei 420 nm ermittelt.

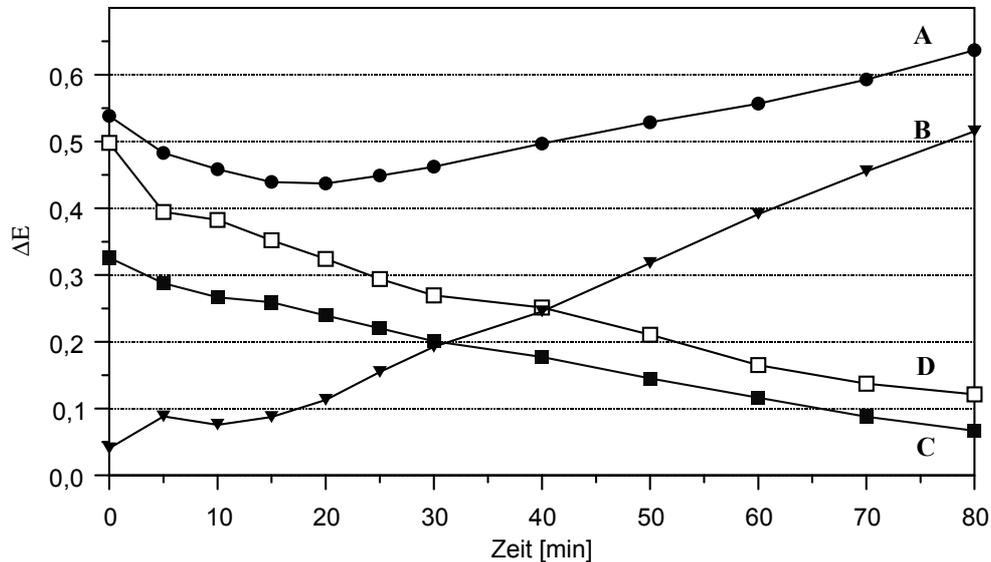
Abb. 16 zeigt das Ergebnis aller Extinktionsmessungen eines Ansatzes zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn.

Die Extinktion bei 630 nm nimmt mit der Zeit ab (Kurve C). Dadurch, dass die Blutzellen von den Rädertieren aufgenommen werden, sinkt der Anteil der Zellen im Medium und im gleichen Maße die durch sie verursachte Lichtstreuung. Sind alle Erythrozyten aus dem Medium entfernt so geht die Extinktion gegen Null. Die Abnahme ist allerdings nicht linear, sondern folgt einer Exponentialfunktion:

$$c_t = c_0 \cdot \exp(k \cdot t) \quad (\text{Formel 1}).$$

Nach Durchführen einer nicht-linearen Kurvenanpassung (Abb. 17, S. 65), zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung mit den entsprechenden Messpunkten. In dieser Gleichung entspricht  $c_t$  der Erythrozytenkonzentration

zum Zeitpunkt  $t$ ;  $c_0$  steht für die Konzentration der Erythrozyten zum Versuchsbeginn; der Exponent  $k$  gibt die Geschwindigkeits-Konstante wieder und  $t$  die Zeit in min.

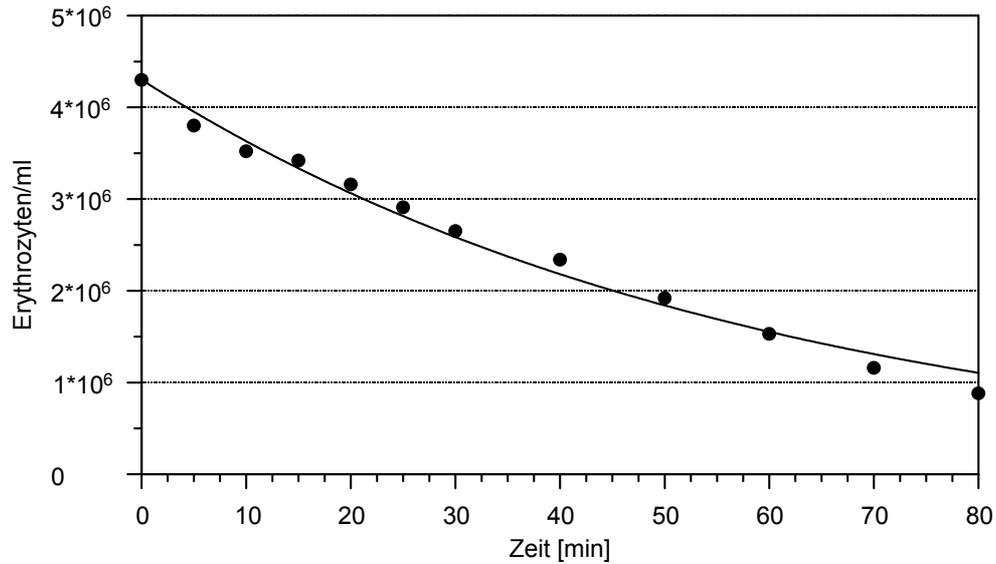


**Abb. 16: Aufnahme von menschlichen Erythrozyten durch *B. plicatilis*.** Zusammenfassung der Messwerte aus einem Fütterungsansatz mit 434 Rädertieren/ml Seewasser. Nach Probenentnahme aus dem Filterkörbchen wurden folgende Extinktionen photometrisch bestimmt:

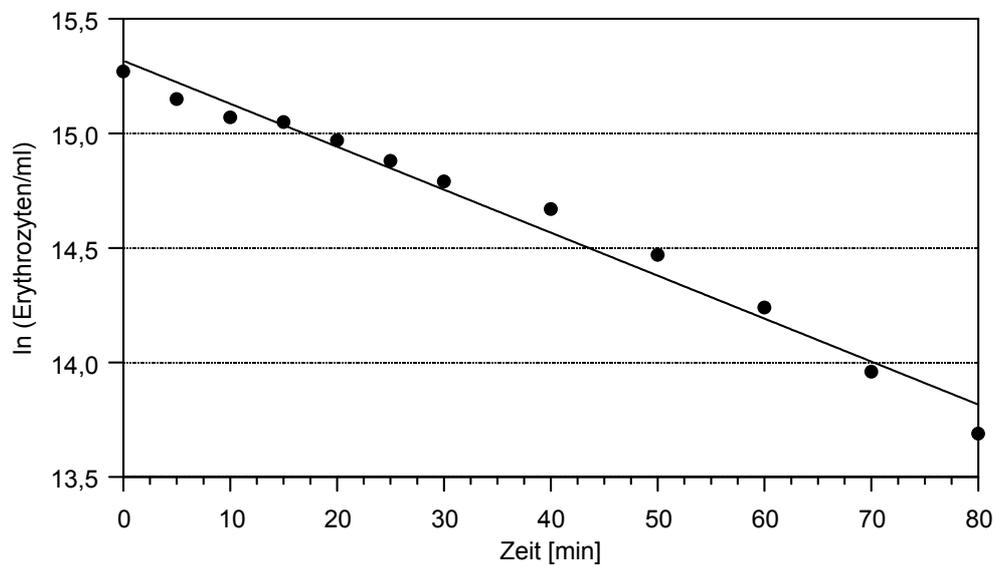
- $\Delta E$  420 von Erythrozyten und Hämoglobin (A)
- ▼—  $\Delta E$  420 von freiem Hämoglobin im Überstand nach Zentrifugation der Probe (B)
- $\Delta E$  630 der Erythrozytensuspension (C)
- $\Delta E$  420 der Erythrozyten nach Subtraktion der Extinktionswerte des freien Hämoglobins (D)

Werden die Logarithmen der Werte gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich eine Gerade (Abb.18), was bei einer Exponentialfunktion zu erwarten ist. Die Zahl an Zellen, die pro Zeiteinheit aus dem Medium eliminiert werden, ist zu jeder Zeit der Dichte der noch vorhandenen Zellen/ml proportional. Die Abnahme an Erythrozyten folgt also einer Kinetik erster Ordnung. Sie ist von der Anzahl der pro Rädertier zur Verfügung stehenden Zellen im Fütterungsansatz abhängig.

Nimmt im Laufe des Versuches die Dichte der Erythrozyten in der Lösung ab, so muss zwangsläufig die Aufnahmerate der Rotatorien absinken.



**Abb. 17: Abnahme der Erythrozytendichten** im Medium nach Fütterung von *B. plicatilis* mit menschlichen Erythrozyten (Fütterungsansatz mit 434 Rädertieren/ml Seewasser). Die gemessenen Extinktionen bei 630 nm (Abb. 16, S. 64) wurden durch Multiplikation mit dem Faktor  $13,2 \cdot 10^6$  (aus den Kalibriergeraden) in Erythrozytenzahlen/ml umgerechnet. Anschließend wurde eine nichtlineare Kurvenanpassung durchgeführt, die die Funktionsgleichung  $c_t = 4,3 \cdot 10^6 \cdot \exp(0,017 \cdot t)$  ergab (Erläuterungen siehe Text).



**Abb. 18: Abnahme der Erythrozytendichten** gegen die Zeit in halblogarithmischer Darstellung (Fütterungsansatz mit 434 Rädertieren/ml Seewasser, siehe Abb.16, S. 64). Nach Logarithmierung der Erythrozytendichten lässt sich die Abnahme der Erythrozyten im Medium als Gerade darstellen ( $\ln(c_t) = \ln(4,3 \cdot 10^6) + 0,019 \cdot t$ ).

Betrachtet man in Abb. 16 (S. 64) den Verlauf der Extinktion bei 420 nm (Kurve A), so ergibt sich ein ganz anderes Bild:

Die Extinktion nimmt in den ersten 20 min ab, steigt anschließend wieder an und übersteigt nach ca. 50 min den Ausgangswert.

Dieser Kurvenverlauf lässt sich folgendermaßen erklären:

In den ersten Minuten werden nur rote Blutkörperchen aus dem Medium entfernt, so dass die Lichtstreuung abnimmt. Nach 20 min setzen bei den Versuchstieren die ersten Darmentleerungen ein (mittlere Darmpassagezeit) und das aus dem Verdauungstrakt ins Medium ausgeschiedene Hämoglobin führt zu einem Wiederanstieg der Extinktion bei 420 nm. Da freies Hämoglobin ein höheres Absorptionsmaximum hat (siehe Abb. 12, S. 53) als das in den Erythrozyten verpackte, wird nun sogar eine höhere Extinktion gemessen.

Bei langfristigen Versuchen (über 2 Stunden) erreicht die Extinktion schließlich ein Plateau (Abbildung 20a, S. 70), das über der Ausgangsextinktion liegt. Ob dieses Plateau in der Versuchszeit erreicht wird, ist von der Konzentration der Rotatorien und der Dichte der eingesetzten Erythrozyten abhängig.

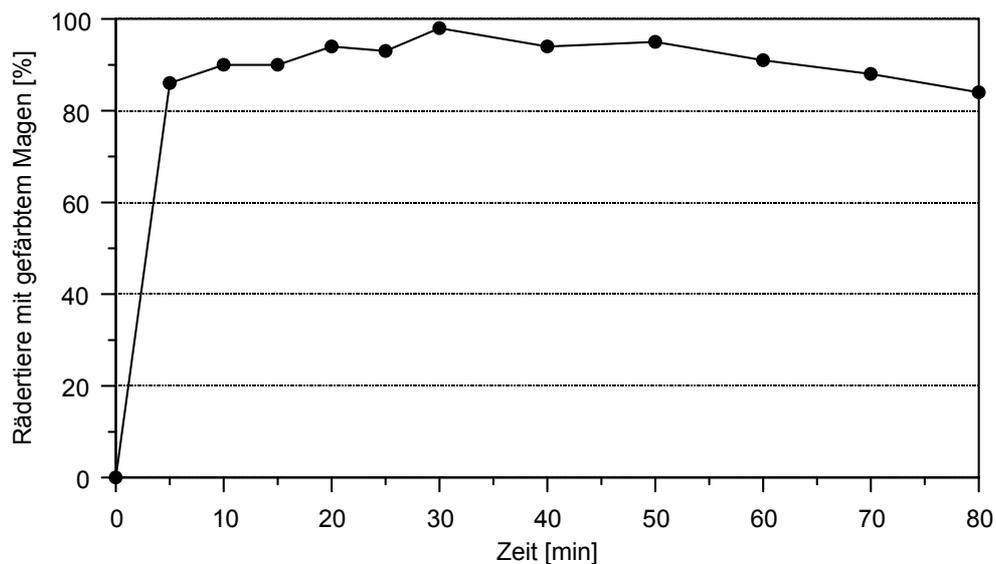
Nach Zentrifugieren der Proben und photometrischer Messung des Überstandes bei einer Wellenlänge von 420 nm war der Anteil an gelöstem Hämoglobin, der nach der Nahrungspassage aus dem Verdauungstrakt der Rotatorien frei wurde, im Medium bestimmbar.

In Abbildung 16 (S. 64) ist zu erkennen, dass die Kurve (B) der so ermittelten Extinktionen über die ersten 20 min nur langsam ansteigt, da die Rädertiere zwar Erythrozyten aus dem Medium in den Verdauungstrakt aufnehmen, jedoch kein Hämoglobin ausscheiden. Erst nach dieser „cycling time“ wird der Anstieg steiler und schließlich linear, da nun Hämoglobin ins Medium ausgeschieden wird, solange der Nachschub an Erythrozyten nicht nachlässt.

Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten ist die Extinktion bei 420 nm insgesamt niedriger, da nun die durch die Zellen verursachte Lichtstreuung nicht in die Messung einfließt.

Werden die Werte für das freigesetzte Hämoglobin (Abb. 16, Kurve B) von den 420 nm-Werten vor der Zentrifugation (Abb. 16, Kurve A) abgezogen, so erhält man eine exponentiell abfallende Kurve (Abb. 16, Kurve D). Diese entspricht nun nur noch der Änderung der Streulicht-Extinktion bei 420 nm, ähnlich der Extinktionsmessung bei 630 nm. Die so ermittelte Kurve stimmt in ihren Parametern (Steigung = -0,017) mit der 630 nm-Kurve (Abb. 16, Kurve C) überein.

In Abbildung 19 wird dem Verlauf der Extinktionen bei 630 und 420 nm (Abb. 16, S. 64) ein weiteres Diagramm gegenübergestellt, in dem (im selben Versuch) der Prozentsatz der Rädertiere mit deutlich rot gefärbtem Magen gegen die Zeit aufgetragen ist (Methodik S. 17).



**Abb. 19:** Prozentsatz von Rädertieren mit **rot gefärbtem Magen** nach Fütterung mit menschlichen Erythrozyten. Gleicher Ansatz wie in den Abbildungen 16-18 (S. 64-65) mit 434 Rädertieren/ml Seewasser.

Innerhalb der ersten 5 Minuten nach Zugabe der Erythrozyten steigt der prozentuale Anteil an Tieren mit gefärbten Mägen von 0 auf fast 90% an.

Nach 30 min haben ca. 100% der Tiere rot gefärbte Mägen, anschließend sinkt der Anteil dieser Rotatorien allmählich ab. Nach 80 min sind noch 85% der Tiere deutlich gefärbt.

Vergleicht man den Verlauf der Erythrozytenkonzentration im Medium (Abb. 17 und 18, S. 65) mit der Änderung des Prozentsatzes an gefärbten Tieren über die Zeit, so wird deutlich, dass diese voneinander abhängig sind. Nimmt die Dichte der Blutzellen um ca.  $2 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml ab, so verringert sich deutlich der prozentuale Anteil an Tieren mit rotem Magen.

Dieser Zusammenhang wird aus den Daten eines anderen Versuches noch deutlicher, dessen Ergebnisse in Abbildung 20a (S. 70) dargestellt sind. In dieser Abbildung ist der zeitliche Verlauf der Extinktionen bei 420 und 630 nm in zwei Ansätzen mit etwa 100 und 300 Rädertieren/ml aufgetragen.

Bei 630 nm ist in beiden Ansätzen der exponentielle Verlauf der Erythrozytenabnahme zu erkennen. Im Ansatz mit der höheren Rädertierdichte nimmt die Extinktion innerhalb von 60 min rasch ab und erreicht bei 100 min einen Tiefstwert, der sich nicht mehr ändert und den gänzlichen Verbrauch der Erythrozyten aus dem Medium anzeigt. Im Ansatz mit ca. 100 Rädertieren sinkt die Extinktion dagegen allmählicher ab und erreicht innerhalb des untersuchten Zeitraums nicht ihren Endwert.

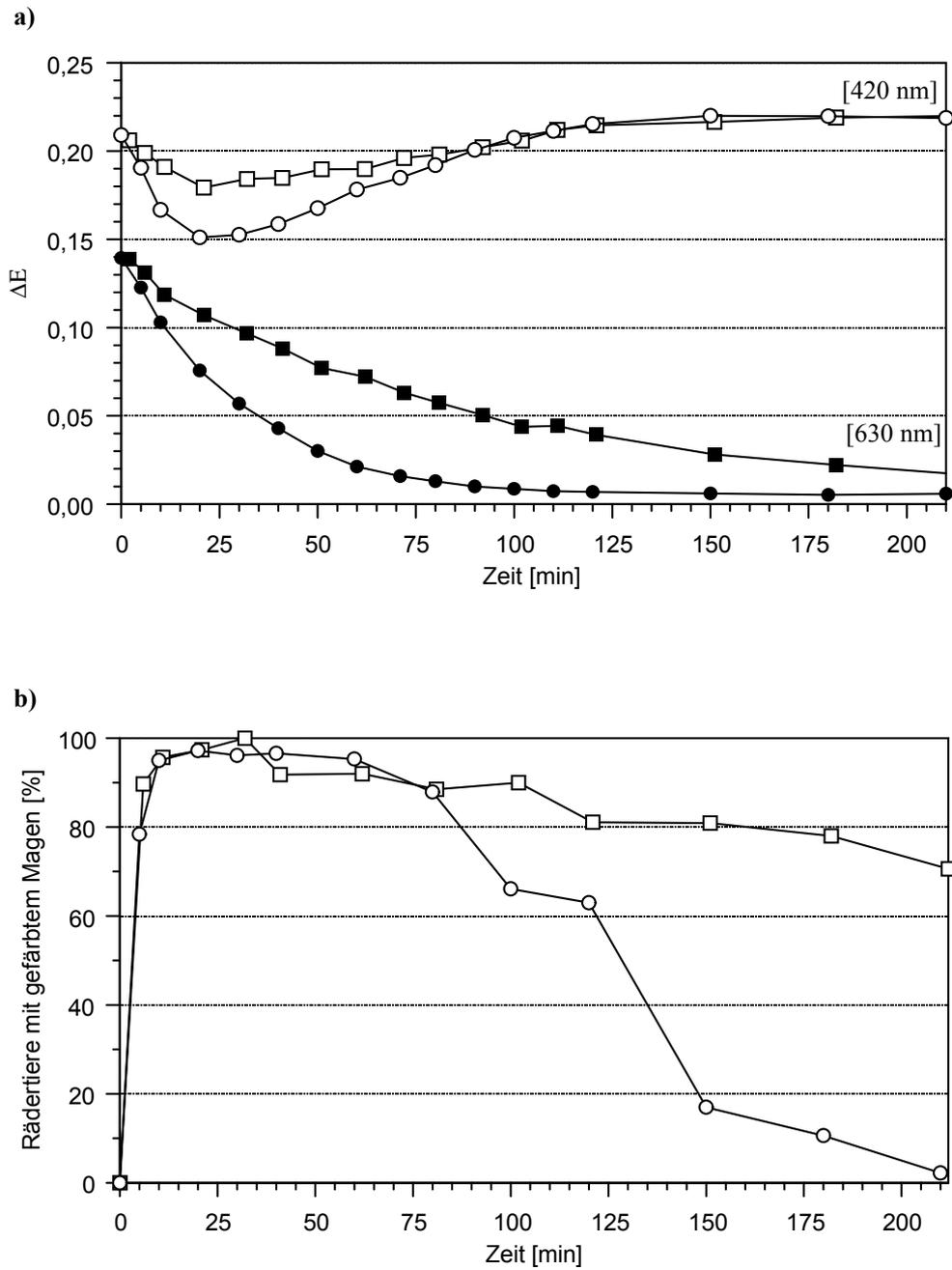
Die Kurvenverläufe der Extinktionswerte bei 420 nm haben bei 20 min das für diese Messungen typische Minimum (siehe S. 66). Im Ansatz mit 300 Rotatorien/ml ist die Abnahme der Extinktion in diesem Zeitraum ausgeprägter, als die bei 100 Rotatorien/ml. Nach dem Minimum steigen die Extinktionen kontinuierlich an und erreichen nach ca. 125 min ein Plateau, dessen Wert sich über die Zeit nicht mehr ändert.

Der Verlauf der Kurve bei 420 nm fällt bei 300 Rädertieren/ml in den ersten 20 min steiler ab, da mehr Erythrozyten aus dem Medium aufgenommen werden und der Anteil des Streulichts an der Extinktion schneller reduziert

---

wird. Aufgrund der höheren Tierkonzentration wird nach der Passage der Erythrozyten durch den Verdauungstrakt anschließend mehr Hämoglobin/ml Medium freigesetzt, so dass die Extinktion bei 420 nm daher auch steiler ansteigt als beim Ansatz mit geringerer Tierdichte (100 Rädertiere/ml).

Zum Vergleich sind diesen Kurven in Abbildung 20b die prozentualen Anteile an Rädertieren mit rot gefärbtem Magen aus den zwei Ansätzen, mit unterschiedlichen Tierdichten, gegenübergestellt. In beiden Ansätzen haben nach 10 min über 90% der Tiere einen deutlich rot gefärbten Magen. Diese intensive Rotfärbung hält je nach Konzentration der Rotatorien 50–90 min an. Danach nimmt der Prozentsatz der gefärbten Rädertiere wieder ab und zwar umso deutlicher, je höher die Dichte der Rädertiere im Versuchsansatz ist. Während im Ansatz mit 100 Tieren/ml der Prozentsatz an Tieren mit gefärbtem Verdauungstrakt in 210 min auf ca. 70% sinkt, fällt die Kurve bei einer Tierdichte von 300 Rotatorien/ml steiler und sinkt im gleichen Zeitraum fast auf Null ab. Ein Vergleich mit der Abnahme der Erythrozytenextinktion bei 630 nm (Abb. 20a) zeigt, dass der Anteil der rot gefärbten Rotatorien etwa 100 min nach Start der Messung deutlich zu sinken beginnt, zu dem Zeitpunkt, zu dem nahezu alle Zellen aus dem Medium eliminiert waren.



**Abb. 20: Auswirkung unterschiedlicher Rädertierdichten auf die Aufnahme von Schafserythrozyten durch *B. plicatilis*.**

a) Verlauf der Extinktionskurven bei einer Wellenlänge von 420 und 630 nm.

b) Prozentsatz von Rädertieren mit Rotfärbung des Verdauungstraktes.

—○— und —●— = 296 Rädertiere/ml,

—□— und —■— = 96 Rädertiere/ml

### 3.2.2.2 Bestimmung der Aufnahmerate (Ingestion rate) von *B. plicatilis*

Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass die Konzentration der Erythrozyten im Verlauf des Versuches exponentiell abnimmt (Formel 1, S. 63). Dies muss zu einer Abnahme der Aufnahmerate führen, da die pro Rädertier zur Verfügung stehende Zahl an Erythrozyten stetig sinkt. Wird die Kurvengleichung für die exponentielle Abnahme der Erythrozyten logarithmisch umgewandelt, so erhält man die Gleichung:

$$\ln c_t = \ln c_0 - (k \cdot t) \quad (\text{Formel 2}).$$

Für die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ergibt sich daher:

$$k = \frac{\ln c_0 - \ln c_t}{t} \quad (\text{Formel 3}).$$

Ist  $c_0$  die Erythrozytenkonzentration zum Versuchsbeginn und  $c_t$  die Erythrozytenkonzentration zum Zeitpunkt  $t$ , so errechnet sich das geometrische Mittel durch:

$$\sqrt{c_0 \cdot c_t} \quad (\text{Formel 4}).$$

Die mittlere Aufnahmerate  $I$  eines Tieres lässt sich dann nach Division der Partikelkonzentration  $p$  durch die Rädertierkonzentration  $r$  über die folgende Gleichung bestimmen:

$$I = (\ln c_0 - \ln c_t) \cdot p \cdot t^{-1} \cdot r^{-1} \cdot \sqrt{c_0 \cdot c_t} \quad (\text{Formel 5}).$$

Diese Gleichung entspricht der durch Yúfera und Pascual (1985) zur Berechnung der Aufnahmerate vorgeschlagenen Gleichung:

$$I = F \cdot \sqrt{c_0 \cdot c_t} \quad (\text{Formel 6}).$$

( $F$  = von einem Rädertier pro Minute filtriertes Volumen  
 $c_0$  = Konzentration der Erythrozyten zum Versuchsbeginn  
 $c_t$  = Erythrozytenkonzentration zum Zeitpunkt  $t$ )

In Tabelle 6 sind zum Vergleich die durchschnittlichen Aufnahmeraten bei Versuchen mit Erythrozyten der verschiedenen Säugerarten zusammenge-

fasst. Sie unterscheiden sich deutlich in der Zahl der pro Minute aufgenommenen Zellen. Bei Einsatz von menschlichem Blut wurden durchschnittlich 73 Zellen pro Rädertier und Minute aufgenommen. Die Fütterung mit Rinder- oder Schafserythrozyten ergab höhere Werte, von 101 bzw. 264 Zellen-Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. Hier zeigt sich eine indirekte Korrelation zum Durchmesser und der Zahl der Erythrozyten (Tab.1, S. 35). Rinder und Schafe haben nicht nur kleinere, sondern auch mehr Erythrozyten pro Volumen Blut, als der Mensch. Die Erythrozyten-Stammsuspensionen wurden bei allen eingesetzten Säugerarten mit dem gleichen Volumen an Vollblut angesetzt. Daher muss davon ausgegangen werden, dass in den Fütterungsansätzen (entsprechend der unterschiedlichen Zahl an Erythrozyten/μl Vollblut) verschiedene Erythrozytendichten vorliegen. Die Rädertiere im Fütterungsansatz mit Rinder- oder Schafsblut konnten also mehr Blutzellen aufnehmen, als die Tiere, die mit menschlichen Erythrozyten gefüttert wurden.

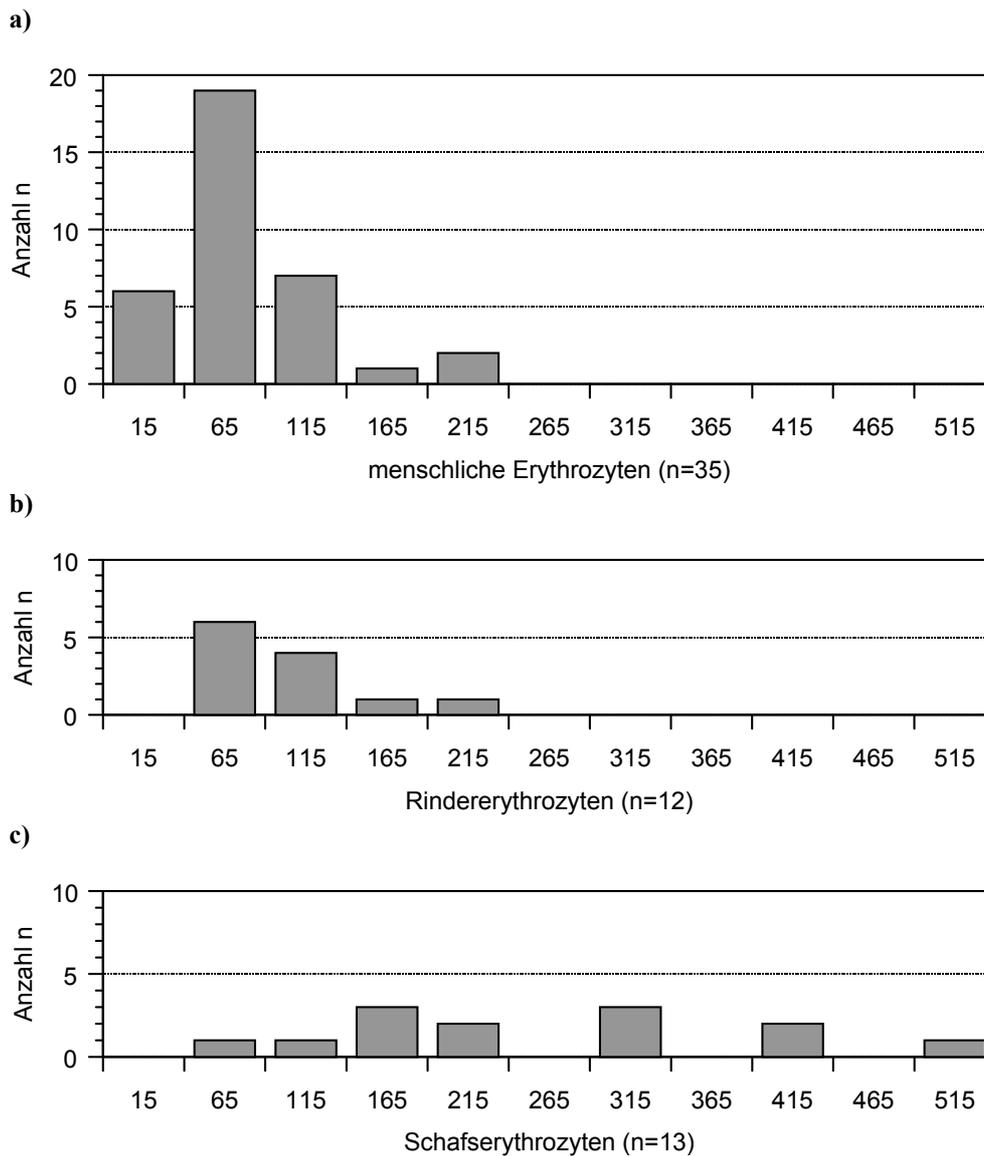
**Tab. 6: Mittlere Aufnahmerate (Ingestion rate = Erythrozyten·Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) von *B. plicatilis* nach Zugabe unterschiedlicher Säugererythrozyten in Seewasser.**

In Klammern ist die Standardabweichung und der Standardfehler in Prozent vom Mittelwert angegeben.

	<b>menschliche Erythrozyten</b>	<b>Rinder-Erythrozyten</b>	<b>Schafs-Erythrozyten</b>
Anzahl der Versuche	35	12	13
<b>Arithmetischer Mittelwert</b>	<b>72,7</b>	<b>100,6</b>	<b>263,7</b>
Standard-Abweichung	± 46,9 (65%)	± 44,0 (44%)	± 124,8 (47%)
Standard-Fehler	± 7,9 (11%)	± 12,7 (13%)	± 34,6 (13%)

In Abb. 21 werden die Aufnahme­raten für die verschiedenen Erythrozyten in einem Histogramm dargestellt. Die Aufnahme­raten nach der Fütterung mit menschlichen oder Rindererythrozyten verteilen sich auf die ersten Klassen mit einem Maximum um  $65 \text{ Erythrozyten} \cdot \text{Rädertier}^{-1} \cdot \text{Minute}^{-1}$ . Bei Schafserythrozyten ist die Streubreite der Aufnahme­raten sehr groß, allerdings ist bei dieser Darstellung eine tendenzielle Verschiebung zu höheren Erythrozytenzahlen/Rädertier erkennbar.

Wie die Standard-Abweichung (Tab. 6) erkennen lässt, sind auch bei Fütterung mit nur einer Blutsorte zwischen den einzelnen Fütterungsversuchen große Unterschiede in der Aufnahme­rate zu beobachten. Sicher beeinflussen hier besonders die in den Versuchen variierenden Verhältnisse der Erythrozytendichten zur Zahl der Rotatorien/ml die Aufnahme­rate.



**Abb. 21:** Verteilung der **Aufnahmerate** [Erythrozyten-Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>] auf Klassen. Die ermittelten Aufnahmeraten wurden nach der Häufigkeit ihres Auftretens in den Versuchen auf Klassen mit einer Klassenbreite von  $\pm 50$  Erythrozyten-Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> zusammengefasst. Die Zahlen auf der Abszisse geben die Klassenmitten an. (n = Anzahl der Versuche)

### 3.2.2.3 Bestimmung der Filtrationsrate (Clearing rate) von *B. plicatilis*

Die bisher ermittelten Größen zur Bestimmung der Partikelaufnahme und deren Weiterleitung bei *B. plicatilis* (Aufnahmerate und Darmpassagezeit) werden von äußeren Parametern, wie der Konzentration von Rädertieren und Erythrozyten im Versuchsansatz bestimmt.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt dargestellt, kann die Abnahme der Erythrozyten im Medium durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden (Formel 1, S. 63). Im gleichen Maß, wie die Zahl der Partikel abnimmt, wird das pro Partikel zur Verfügung stehende Volumen des Mediums zunehmen. Die exponentielle Abnahme der Partikelkonzentration bedeutet also gleichzeitig, dass das von einem Rädertier pro Zeiteinheit gefilterte Medienvolumen während des Versuchs in etwa gleich bleibt.

Zur Beschreibung der Filteraktivität von Wasserorganismen wurde von Gauld (1951) eine Formel vorgeschlagen, die sich ebenfalls auf die Aufnahme von Erythrozyten durch Rotatorien anwenden lässt:

$$F = v \cdot k \quad (\text{Formel 7})$$

( $F$  = Filtrationsrate,  $v$  = Volumen/Tier,  $k$  = Geschwindigkeitskonstante).

Diese Formel ermittelt die benötigten Größen über eine logarithmische Umwandlung der Exponentialfunktion (Formel 2 und 3, S. 71).

Nach Einsetzen dieser Funktion lässt sich die Gleichung nach Gauld in folgender Form wiedergeben:

$$F = v \cdot \frac{\ln c_0 - \ln c_t}{t} \quad (\text{Formel 8}).$$

oder auch

$$F = v \cdot \frac{\log c_0 - \log c_t}{t \cdot \log e} \quad (\text{Formel 9})$$

( $c_0$  = Erythrozytenkonzentration zu Versuchsbeginn,  $c_t$  = Erythrozytenkonzentration zum Zeitpunkt  $t$ ).

Die Filtering rate (Clearing rate) entspricht also dem Mediumvolumen, welches die Zellzahl enthält, die von einem Tier pro Zeiteinheit aufgenommen

werden kann (Hargis, 1977; Starkweather et al., 1979 und Starkweather, 1980).

Für die Berechnung der Filtrationsrate werden die Rotatorien- und Erythrozytendichten bei Versuchsbeginn zugrunde gelegt. Damit ist auch ein Vergleich mit bereits in der Literatur erschienenen Ergebnissen zur Verfütterung von Partikeln verschiedenster Art (Tab. 7) möglich.

Wie der Literatur zu entnehmen ist, wurden bisherige Untersuchungen hauptsächlich mit unterschiedlichen Algen (Hirayama et al., 1972; Dewey, 1976; Yúfera & Pascual, 1985; Korstad et al., 1989; Vadstein et al., 1993; Hansen et al., 1997 und Navarro, 1999), Bakterien (Ito, 1955 und Vadstein et al., 1993) und Hefezellen (Hino & Hirano, 1984) durchgeführt. Neben diesen „natürlichen Partikeln“ wurden auch künstliche Partikel (Latex-Kugeln) zur Bestimmung der Filtrationsrate eingesetzt (Vadstein et al., 1993 und Ronneberger, 1998).

**Tab. 7: Filtrationsraten (Clearing rate =  $\mu\text{l}\cdot\text{Individuum}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) bei *B. plicatilis* (nach Zugabe unterschiedlicher Futterpartikel). Angaben aus der Literatur, die Autoren sind verzeichnet (k. A. = keine Angaben).**

<b>Futterpartikel</b>	<b>Größe der Partikel</b>	<b>Filtrationsrate [<math>\mu\text{l}\cdot\text{ind}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>]</b>	<b>Autor</b>
Synechococcus	k. A.	> 3	Ito, 1955
Chlorella	k. A.	<b>0.18 – 6.0</b>	Hirayama et al., 1972
Dunaliella spp.	k. A.	<b>1.0 – 9.0</b>	Dewey, 1976
baker's yeast	4.74-4.97 $\mu\text{m}$	<b>8.28</b>	Hino et al., 1984
„	4.31-4.45 $\mu\text{m}$	<b>6.78</b>	Hino et al., 1984
„	4.31-4.45 $\mu\text{m}$	<b>5.67</b>	Hino et al., 1984
„	4.74-4.97 $\mu\text{m}$	<b>4.55</b>	Hino et al., 1984
„	4.20-4.31 $\mu\text{m}$	<b>3.11</b>	Hino et al., 1984
„	4.97-5.20 $\mu\text{m}$	<b>2.95</b>	Hino et al., 1984
„	4.20-4.45 $\mu\text{m}$	<b>2.65</b>	Hino et al., 1984
„	4.05-4.20 $\mu\text{m}$	<b>1.96</b>	Hino et al., 1984
„	4.45-4.57 $\mu\text{m}$	<b>1.65</b>	Hino et al., 1984
„	4.05-4.20 $\mu\text{m}$	<b>1.31</b>	Hino et al., 1984
Nannochloris oculata	1.8 $\mu\text{m}$	<b>6</b> <b>Max. 14.64</b>	Yúfera et al., 1985
Nannochloris maculata	2.1 $\mu\text{m}$	<b>6</b> <b>Max. 14.64</b>	Yúfera et al., 1985
Nannochloropsis oculata	2.5 $\mu\text{m}$	<b>6</b> <b>Max. 14.64</b>	Yúfera et al., 1985
Nannochloropsis granditana	2.7 $\mu\text{m}$	<b>6</b> <b>Max. 14.64</b>	Yúfera et al., 1985
Isochrysis galbana	k. A.	<b>Max. 3.4 – 6.9</b>	Korstad et al., 1989
Isochrysis galbana	3.5 $\mu\text{m}$	<b>4.88 <math>\pm</math> 0.93</b>	Vadstein et al., 1993
Latex beads	0.28 $\mu\text{m}$	<b>0.011 <math>\pm</math> 0.003</b>	Vadstein et al., 1993
Latex beads	0.57 $\mu\text{m}$	<b>0.009 <math>\pm</math> 0.003</b>	Vadstein et al., 1993
Latex beads	1.1 $\mu\text{m}$	<b>0.044 <math>\pm</math> 0.016</b>	Vadstein et al., 1993
Latex beads	2.0 $\mu\text{m}$	<b>0.18 <math>\pm</math> 0.05</b>	Vadstein et al., 1993
Latex beads	3.1 $\mu\text{m}$	<b>0.17 <math>\pm</math> 0.02</b>	Vadstein et al., 1993
Bacterial community 1	0.37 $\mu\text{m}$	<b>4.11 <math>\pm</math> 0.87</b>	Vadstein et al., 1993
Bacterial community 2	0.37 $\mu\text{m}$	<b>2.41 <math>\pm</math> 0.66</b>	Vadstein et al., 1993
Rhodomonas baltica	6.5 $\mu\text{m}$	k. A.	Hansen et al., 1997
Tetraselmis suecica	8.3 $\mu\text{m}$	k. A.	Hansen et al., 1997
Thalassiosira fluviatilis	12.9 $\mu\text{m}$	k. A.	Hansen et al., 1997
live and freeze-dried Nannochloropsis oculata	k. A.	<b>Max. 4.46 – 5.24</b>	Navarro, 1999

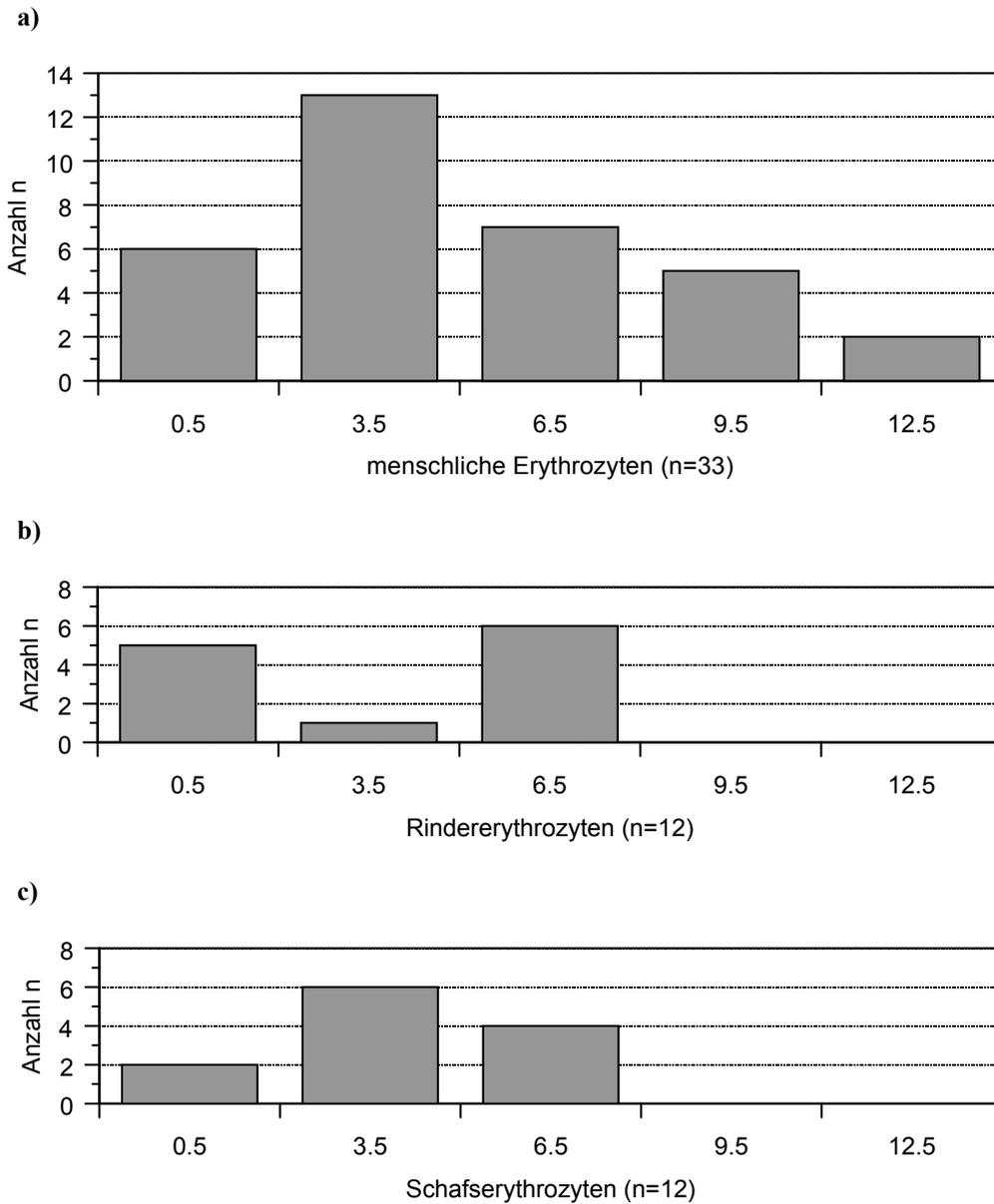
In Tabelle 8 sind die aus unseren Fütterungsversuchen berechneten Mittelwerte für die Filtrationsrate festgehalten. Überraschenderweise streuen hier die Abweichungen zwischen den Versuchen mehr, als bei den Aufnahme-raten. Andererseits fällt auf, dass die Mittelwerte für die verschiedenen Säugererythrozyten viel ähnlicher sind, als die der Aufnahme-raten (Tab. 6, S. 72). In einer Stunde werden zwischen 3,5  $\mu\text{l}$  (Rindererythrozyten), 4,8  $\mu\text{l}$  (Schafserythrozyten) und 6,5  $\mu\text{l}$  (menschliche Erythrozyten) Medium von einem Rädertier „geklärt“, d.h. von den enthaltenen Partikeln befreit.

Der Durchmesser der Erythrozyten scheint also kaum Einfluss auf die Filtrations-Aktivität zu haben.

**Tab. 8: Mittlere Filtrationsrate (Clearing rate =  $\mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) von *B. plicatilis* nach Zugabe unterschiedlicher Säugererythrozyten in Seewasser. In Klammern ist die Standardabweichung und der Standardfehler in Prozent vom Mittelwert angegeben.**

	<b>menschliche Erythrozyten</b>	<b>Rinder-Erythrozyten</b>	<b>Schafs-Erythrozyten</b>
Anzahl der Versuche	35	12	13
<b>Arithmetischer Mittelwert</b>	<b>6,5</b>	<b>3,5</b>	<b>4,8</b>
Standard-Abweichung	$\pm 6,8$ (105%)	$\pm 3,1$ (89%)	$\pm 3,4$ (71%)
Standard-Fehler	$\pm 1,1$ (17%)	$\pm 0,9$ (25%)	$\pm 0,9$ (20%)

Auch die Histogrammdarstellung der Filtrationsraten (Abb. 22) macht deutlich, dass die Raten, die bei Versuchen mit Rinder- und Schafserythrozyten erreicht wurden, im Rahmen derer für menschliche Erythrozyten lagen. Raten um 3,5-6,5  $\mu\text{l}$  pro Stunde konnten am häufigsten beobachtet werden. Dies entspricht den aus der Literatur bekannten Filtrationsraten (Tab. 7, S. 77).



**Abb. 22:** Verteilung der **Filtrationsraten** [ $\mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ] auf Klassen. Die ermittelten Filtrationsraten wurden nach der Häufigkeit ihres Auftretens in den Versuchen auf Klassen mit einer Klassenbreite von  $\pm 3 \mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  zusammengefasst. Die Zahlen auf der Abszisse geben die Klassenmitten an.

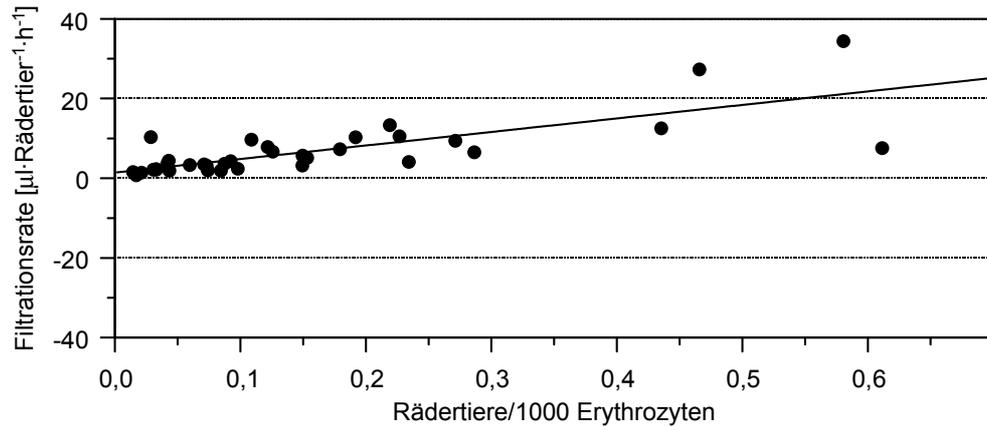
(n = Anzahl der Versuche)

Bei Auswertung aller Versuche ergibt sich ein Hinweis darauf, dass die Filtrationsrate auch von der Erythrozytendichte beeinflusst wird.

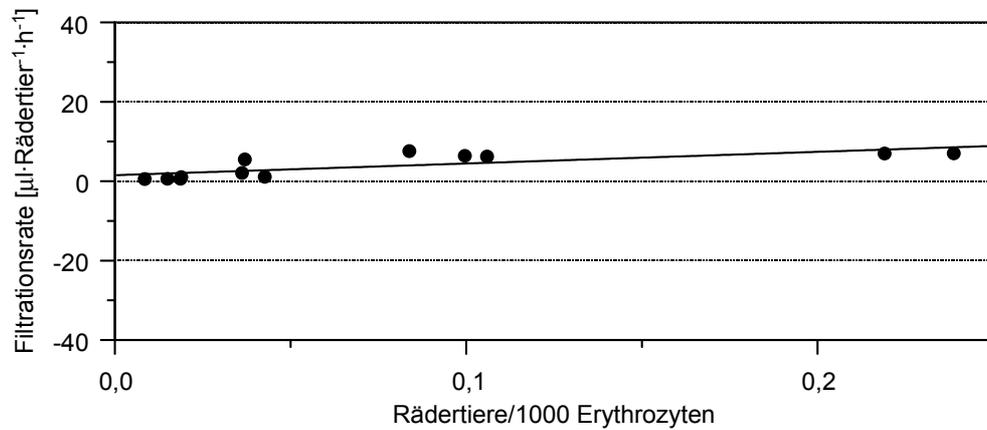
Dies zeigt die folgende Zusammenstellung (Abb. 23). Hier sind die Filtrationsraten gegen die Anzahl der Rädertiere pro 1000 Erythrozyten aufgetragen. In diesem Diagramm entspricht die linke Seite hohen und die rechte Seite niedrigen Erythrozytendichten.

In Konzentrationsbereichen, in denen die Zahl der pro Rädertier vorliegenden Erythrozyten sehr hoch ist, ist die erreichte Filtrationsrate bei allen Erythrozytenarten konstant. Steigt die Dichte der Rädertiere oder sind weniger Erythrozyten/ml vorhanden, so ist ein ausreichender Nachschub an Erythrozyten nicht gewährleistet. Die leichten Steigungen der Regressionsgeraden könnten andeuten, dass die Rotatorien versuchen, den „Futtermangel“ durch Steigern der Filtrationsrate auszugleichen.

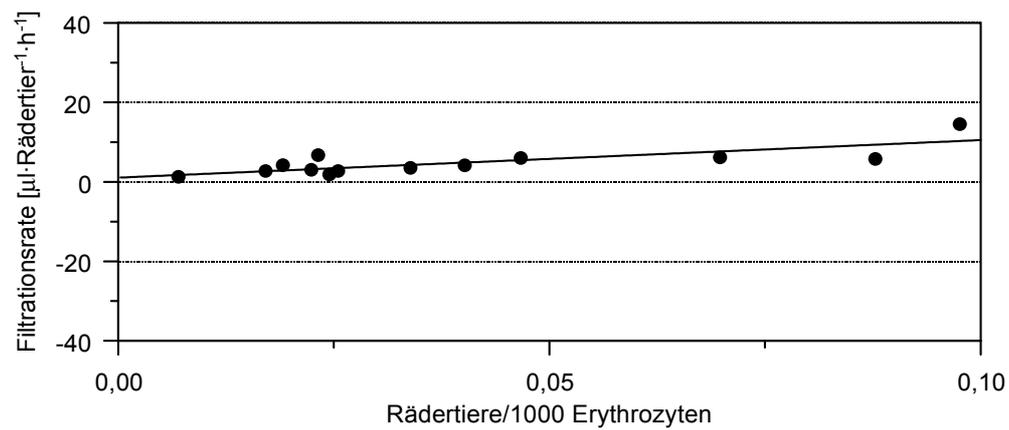
a) **menschliche Erythrozyten in Seewasser (n=35)**



b) **Rindererythrozyten in Seewasser (n=12)**



c) **Schafserythrozyten in Seewasser (n=13)**



**Abb. 23:** Auftragung der **Filtrationsrate gegen die Zahl der Rädertiere pro 1000 Erythrozyten**. Die leichten Steigungen der Regressionsgeraden deuten an, dass die Filtrationsrate steigen kann, wenn das Angebot an Erythrozyten/Rädertier sehr gering wird.

a) Steigung = 33,9; b) Steigung = 29,4; c) Steigung = 94,4.

### 3.2.3 Volumenbestimmung des Verdauungstrakts

In den Fütterungsansätzen konnte beobachtet werden, dass *B. plicatilis* Partikel einstrudelt, solange solche im Medium verfügbar waren. In Abhängigkeit von der Partikeldichte verlief die Darmpassage schneller oder langsamer (siehe S. 38). Zur Überprüfung dieser Zusammenhänge ist auch die Kenntnis des Volumens der Verdauungsorgane wichtig. Mit solchen Werten lassen sich dann die Aufnahmezeiten, die Aufnahmekapazitäten und die Passagezeiten miteinander vergleichen.

Die hier verwendeten Techniken liefern eine Reihe von Möglichkeiten das Volumen der Verdauungsorgane zu ermitteln.

#### 3.2.3.1 Ausmessen von gefütterten Tieren

Die einfachste Vorgehensweise, das Volumen der Organe des Verdauungstraktes zu bestimmen, bestand in der Fütterung von Rädertieren mit Erythrozyten und anschließender Ausmessung der Verdauungsorgane.

Wie beobachtet werden konnte, nahmen die Tiere so viele Erythrozyten auf, dass Magen und Intestinum bald maximal gefüllt waren. Durch das freigesetzte Hämoglobin färbte sich der Verdauungstrakt intensiv rot. Die Rädertiere konnten anschließend durch Dithionit im ausgestreckten Zustand abgetötet und am Lichtmikroskop fotografiert werden.

Die Abmessungen von Magen und Intestinum wurden dann mit Hilfe der Objektmikrometer-Skala bestimmt. Zur Berechnung des Volumens wurden die Gleichungen für Kugeln bzw. Ellipsoide angewendet:

$$\text{Volumen einer Kugel:} \quad V = 4/3 \cdot r^3 \cdot \pi \quad (\text{Formel 10})$$

$$\text{Volumen eines Ellipsoids:} \quad V = 4/3 \cdot a^2 \cdot b \cdot \pi \quad (\text{Formel 11})$$

(2·b = Drehachse)

(r = Radius, a = ½ Höhe, b = ½ Drehachse)

---

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse dieser Volumenbestimmung zusammengefasst. Im Mittel können hiernach die Tiere 249  $\mu\text{l}$  in ihren Verdauungstrakt aufnehmen.

Die aus Tabelle 9 ersichtliche Streuung der Messungen innerhalb einer Population ist nicht unerwartet. Die Tiere sind unterschiedlich groß, neben ausgewachsenen Rädertieren befinden sich auch Jugendstadien in den Zuchtbecken.

Die Menge an aufgenommenen Partikeln unterscheidet sich von Tier zu Tier, was sich auf die Volumenbestimmung des Magens auswirkte. Hinzu kam, dass bei einigen Tieren der Darm gerade entleert worden war und wegen der nun fehlenden Rotfärbung in diesen Fällen auch keine Volumenbestimmung des Intestinums möglich war.

Auch mit Hilfe von FITC-Albumin gefüllten Erythrozyten-Ghosts ließ sich das Volumen des Verdauungstraktes bestimmen. Das Volumen konnte ähnlich der oben beschriebenen Methode über eine Fotografie am Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Die an vier Tieren durchgeführten Messungen ergaben ein Magenvolumen von 121-310  $\mu\text{l}$  (Mittelwert:  $205 \pm 35\%$ ) und ein Intestinumvolumen von 108-219  $\mu\text{l}$  (Mittelwert  $153 \pm 27\%$ ). Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen des Verdauungstraktes von durchschnittlich 358  $\mu\text{l}$  ( $\pm 30\%$ ).

Die ermittelten Volumina waren höher als nach Fütterung mit Erythrozyten. Hier spielte sicherlich eine Rolle, dass durch die intensive Fluoreszenz im Verdauungstrakt die Zellen der Magen- und Intestinumwand nicht mehr deutlich vom Lumen der Verdauungsorgane unterscheidbar waren.

**Tab. 9: Volumenbestimmung durch Ausmessen des Verdauungstrakts von *B. plicatilis*.** Nach Fütterung mit Erythrozyten wurden einzelne Tiere mit deutlich rot gefärbtem Verdauungstrakt fotografiert und das Volumen der einzelnen Organe und das Gesamtvolumen durch Berechnung des Rauminhalts bestimmt. Eine Bestimmung des Darmvolumens war nicht bei allen untersuchten Rädertieren möglich. (In Klammern ist die Standardabweichung und der Standardfehler in Prozent vom Mittelwert angegeben.)

<b>Tier</b>	<b>Volumen des Magens [pL]</b>	<b>Volumen des Darms [pL]</b>	<b>Volumen des Verdauungstraktes [pL]</b>
1	163	-	-
2	115	-	-
3	229	143	372
4	137	95	232
5	180	-	-
6	242	62	304
7	137	-	-
8	113	-	-
9	180	-	-
10	99	-	-
11	151	-	-
12	212	-	-
13	199	-	-
14	137	75	212
15	129	44	173
16	165	69	234
17	165	59	224
18	230	59	289
19	160	100	260
20	125	65	190
21	235	-	-
22	165	-	-
<b>Arithmetischer Mittelwert</b>	<b>166,7</b>	<b>77,1</b>	<b>249</b>
Standard-Abweichung	± 42,5 (25%)	± 28,6 (37%)	± 59,3 (24%)
Standard-Fehler	± 9,1 (5%)	± 9,1 (12%)	± 18,8 (8%)

Nach Fluoreszenzmarkierung konnte das Volumen des Verdauungstraktes mit Hilfe eines Mess-Programms auch am gescannten Bild des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops ermittelt werden.

Um zu überprüfen, ob diese Methode praktikabel ist, wurde sie an einem Tier erprobt. Das Ausmessen des Tieres ergab ein Volumen des Verdauungstraktes von 110 pl (Magen 40 pl, Intestinum 70 pl). Dieser Wert ist zwar niedriger, als bei den vorherigen Bestimmungen, lässt jedoch keine Rückschlüsse auf eine Unzuverlässigkeit dieses Verfahrens zu.

Die Werte liegen innerhalb der vorab gemessenen Toleranzen. Diese Methode ist aber im Vergleich zu den vorherigen technisch wesentlich aufwendiger.

### 3.2.3.2 Volumenbestimmung mit Hilfe freigesetzter Hefezellen

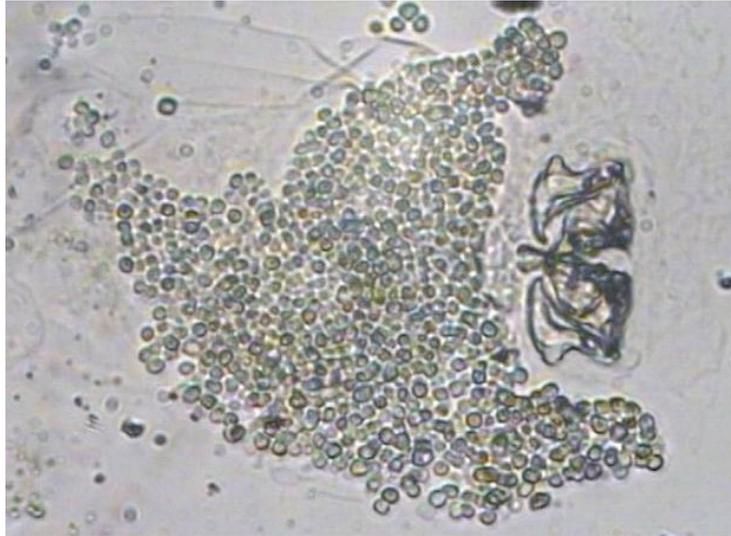
Rotatorien wurden mit gefärbten Hefezellen (100  $\mu\text{l}$  gefärbte Zellen/ml Ansatz) gefüttert und die Aufnahme der Zellen im Verdauungstrakt unter dem Mikroskop verfolgt.

Dabei konnte beobachtet werden, dass Hefezellen vom Mastax nicht oder kaum zerstört werden und als kugelige Gebilde in den Verdauungsorganen sichtbar bleiben. Nach ca. 10 min wurde ein einzelnes Tier mit möglichst wenig Medium entnommen und nach einer von Kleinow et al. (1991) entwickelten Methode mit 5  $\mu\text{l}$  Auflösungspuffer (siehe 2.5.5, S. 17) auf einen Objektträger mit Deckgläschen gegeben.

Der Auflösungspuffer löste durch die Kombination von denaturierenden und reduzierenden Reagenzien das Rädertier (bis auf die Hartteile des Mastax) vollständig auf (Bender & Kleinow, 1988). Nach Abschluss des Auflösungs Vorganges (ca. 5 min) sind daher im Wesentlichen nur noch die vorher im Verdauungstrakt enthaltenen Hefezellen sichtbar, die nicht angegriffen werden (Abb. 24). Die nun frei vorliegenden Hefezellen wurden im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Über die Anzahl und das mittlere Volumen der Hefezellen ließ sich dann die Größe des Verdauungstraktes bestimmen.

Diese Methode hat den Vorteil, dass durch die Kontrolle der Tiere im Fütterungsansatz ein maximal gefülltes Einzeltier für die Volumenbestimmung ausgewählt werden kann. Allerdings ist ein Auszählen der freigesetzten Hefezellen sehr mühsam und nicht immer möglich, da die Zellen manchmal sehr dicht und in mehreren Lagen übereinander liegen. Nur bei wenigen Versuchen gelang es durch leichtes Klopfen auf das Deckgläschen die Hefen auf dem Objektträger gleichmäßig auf einer Ebene zu verteilen.

Mit dieser Methode konnte bei zwei Tieren die Zahl der aufgenommenen Hefezellen ermittelt werden. Aus dem Verdauungstrakt eines Tieres wurden 1182 Hefezellen freigesetzt, das andere Tier enthielt 2023 Hefezellen. Bei einer mittleren Zellgröße von 6  $\mu\text{m}$  (Volumen = 113  $\mu\text{m}^3$  bzw. fl) ergibt sich ein Volumen des Verdauungstraktes von 134 bzw. 229 pl.



**Abb. 24:** Phasenkontrastaufnahme von Hefezellen, die nach Behandlung eines Rädertieres mit Auflösungspuffer (0,18 M SDS + 0,03 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8, in 2 ml Aqua dest. + 0,04 g DTT) aus dem Verdauungstrakt freigesetzt wurden. Neben den Hefezellen sind noch die Hartteile des Mastax zu erkennen.

### **3.2.3.3 Volumenbestimmung des Verdauungstrakts aus dem Verlauf der 420 nm-Kurve bei den Fütterungsversuchen**

Auch die Auswertung der Fütterungsexperimente lieferte eine Möglichkeit, das mittlere Volumen des Verdauungstraktes der Rädertiere abzuschätzen. Dessen mittlerer Füllungsgrad ließ sich aus der photometrischen Bestimmung der Erythrozytenabnahme bei 630 nm oder 420 nm und der Bestimmung des freigesetzten Hämoglobins (bei 420 nm) in den Fütterungsansätzen berechnen (siehe 3.2.2, S. 63 ff).

Das nach ca. 20 min erreichte Extinktionsminimum bei 420 nm (siehe Abb.16, S. 64) kennzeichnete den Beginn der Ausscheidungsphase.

Wurden die Proben zentrifugiert und deren Absorption bei 420 nm erneut bestimmt, so entsprachen die erhaltenen Extinktionswerte dem freien Hämoglobin, da intakte Blutzellen und auch Ghosts sedimentiert waren. Die so erhaltenen Werte aus den ersten 20 min wurden von den Messwerten vor der Zentrifugation subtrahiert. Die Differenz der erhaltenen Absorptionswerte wurde mit dem aus den Kalibriergeraden ermittelten Faktor (Tab. 5, S. 62) multipliziert und ergab damit die Zahl der von den Rädertieren aufgenommenen Erythrozyten. Nach Division durch die Zahl der in der Probe enthaltenen Rotatorien war eine Abschätzung des mittleren Füllungsgrades des Verdauungstrakts möglich.

In Tabelle 10 sind die aus dem Verlauf der Extinktionskurven bei 420 nm berechneten Volumina des Verdauungstrakts für neun Fütterungsansätze (menschliche Erythrozyten in Seewasser) zusammengefasst. Das arithmetische Mittel von 241 pl entspricht dem Wert, der beim Ausmessen des Verdauungstrakts ermittelt wurde (Tab. 9, S. 84).

**Tab. 10: Volumenbestimmung aus dem Kurvenverlauf der Extinktionen bei 420 nm** (neun Fütterungsversuche mit menschlichen Erythrozyten in Seewasser). Nach Ermittlung der Zahl der Erythrozyten/Rädertier ist die Volumenberechnung des Verdauungstraktes eines Rädertieres möglich (Methodik siehe S. 88)

	<b>Räder- tiere/ml</b>	<b>Abnahme der Erythro- zytenzahl in 20 min</b>	<b>Erythrozy- ten / Rädertier in 20 min</b>	<b>durch- schnittliches Volumen des Verdauungs- traktes [pl]</b>
1	960	$1,0 \cdot 10^6$	1042	<b>90</b>
2	388	$0,8 \cdot 10^6$	1949	<b>170</b>
3	441	$1,6 \cdot 10^6$	3628	<b>316</b>
4	109	$0,4 \cdot 10^6$	3670	<b>319</b>
5	434	$1,2 \cdot 10^6$	2765	<b>241</b>
6	299	$1,0 \cdot 10^6$	3344	<b>291</b>
7	643	$2,5 \cdot 10^6$	3888	<b>338</b>
8	284	$0,7 \cdot 10^6$	2465	<b>214</b>
9	369	$0,8 \cdot 10^6$	2168	<b>189</b>
<b>Arithmeti- scher Mittelwert</b>				<b>241</b>
Standard- Abweichung				$\pm 82,8$ (34%)
Standard- Fehler				$\pm 27,6$ (11%)

#### **3.2.3.4 Volumenbestimmung des Verdauungstrakts aus dem Verlauf der 630 nm-Kurve bei den Fütterungsversuchen**

Unter der Voraussetzung, dass die Rädertiere des Fütterungsansatzes ihren Verdauungstrakt nach 20 min erstmalig maximal gefüllt haben, kann dessen Volumen in ähnlicher Weise wie in 3.2.3.3 (S. 88) aus dem Verlauf der 630 nm-Kurve (Erythrozytenabnahme im Medium) berechnet werden. Extinktionswerte bei dieser Wellenlänge wurden bereits für die Berechnung der Aufnahmeraten (siehe Tab. 6, S. 72) in Fütterungsexperimenten mit unterschiedlichen Erythrozytenarten gemessen. Diese Aufnahmeraten gaben die Erythrozytenzahl an, die durchschnittlich von einem Rädertier in einer Minute aufgenommen werden konnte. In den 20 min bis zur maximalen Befüllung des Verdauungstraktes konnte ein Rädertier ca. das zwanzigfache der pro min aufgenommenen Zahl an Erythrozyten zu sich nehmen. Durch Multiplikation des so ermittelten Füllungsgrades mit dem durchschnittlichen Volumen der eingesetzten Erythrozytenarten, ergab sich das mittlere Volumen des Verdauungstraktes eines Rädertieres.

Tabelle 11 listet die in 20 min von einem Rädertier aufgenommene Zahl an Erythrozyten und die daraus berechneten mittleren Volumina der Verdauungstrakte der Rotatorien auf.

Je kleiner die Erythrozyten einer Sorte sind, umso mehr kann ein Rädertier davon aufnehmen. Vorrausgesetzt, dass das durchschnittliche Erythrozytenvolumen während des Zerkleinerungsvorgangs im Mastax nicht verändert wurde, konnten von den großen Humanerythrozyten etwa 1500 und von den kleineren Schaferythrozyten ca. 5300 Zellen in den Verdauungstrakt eines durchschnittlichen Rädertieres aufgenommen werden.

Zur Abschätzung des Verdauungstraktvolumens mussten die ermittelten Erythrozytenzahlen/Rädertier mit dem durchschnittlichen Erythrozytenvolumen der im Versuch eingesetzten Blutsorten multipliziert werden.

Wie erwartet sind die nach Fütterung mit verschiedenen Erythrozyten berechneten Volumina sehr ähnlich. Aus den Fütterungsansätzen mit Humanerythrozyten ergab sich ein mittleres Volumen des Verdauungstraktes von

ca. 127 pl. In den Versuchen mit Rinder- und Schafserythrozyten wurde ein Volumen des Verdauungstraktes von ca. 101 bzw. 164 pl bestimmt.

Die relativ hohe Standard-Abweichung lässt sich durch den zeitlich nicht exakt bestimmbaren maximalen Füllungsgrad erklären. So war aufgrund der Versuchsdurchführung eine Messung der Extinktionswerte nur in Abständen von 10 min möglich. Zudem wurde die Aufnahme der Erythrozyten bei Populationen untersucht, die Tiere unterschiedlichen Alters und damit unterschiedlicher Größe enthielten.

**Tab. 11: Volumenbestimmung aus dem Kurvenverlauf der Extinktionen bei 630 nm.** Zahl der in den ersten 20 min aufgenommenen Zellen [Erythrozyten·Rädertier<sup>-1</sup>·20 min<sup>-1</sup>] und daraus ermitteltes Volumen [pl] des Verdauungstraktes von *B. plicatilis* nach Zugabe unterschiedlicher Säugererythrozyten in Seewasser. In Klammern sind die Standardabweichung und der Standardfehler in Prozent vom Mittelwert angegeben.

	<b>menschliche Erythrozyten</b>	<b>Rinder-Erythrozyten</b>	<b>Schafs-Erythrozyten</b>
Anzahl der Versuche	35	12	13
<b>Arithmetischer Mittelwert der in 20 min aufgenommenen Erythrozyten</b>	<b>1453,8</b>	<b>2010,9</b>	<b>5273,4</b>
Standard-Abweichung	± 937,7 (64%)	± 880,1 (44%)	± 2495,7 (47%)
Standard-Fehler	± 158,5 (11%)	± 254,1 (13%)	± 692,2 (13%)
Erythrozytenvolumen [ $\mu\text{m}^3=\text{fl}$ ]	87	50	31
<b>Arithmetischer Mittelwert des berechneten Volumens</b>	<b>126,5</b>	<b>100,6</b>	<b>163,5</b>
Standard-Abweichung des Volumens	± 81,6 (65%)	± 44,0 (44%)	± 77,4 (47%)
Standard-Fehler des Volumens	± 13,8 (11%)	± 12,7 (13%)	± 21,5 (13%)

### **3.2.3.5 Ermittlung des Füllungsgrades des Verdauungstrakts nach Extraktion des Hämoglobins**

Das Volumen des Verdauungstrakts konnte, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, über die Abnahme der Partikel im Medium ermittelt werden. Es ist jedoch auch möglich, das in den Verdauungsorganen enthaltene Hämoglobin zu extrahieren, photometrisch zu bestimmen und darüber den Füllungsgrad des Verdauungstraktes abzuschätzen. Mit dieser Methode konnten die durchschnittlichen Zahlen an Erythrozyten, die pro Rädertier im Verdauungstrakt enthalten waren, ermittelt und den mikroskopisch bestimmten Anteilen an Tieren mit rot gefärbten Verdauungstrakten gegenübergestellt werden.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dazu aus den Fütterungsansätzen rädertierhaltige Proben (1 ml) entnommen und in vorbereitete Reagenzgläser mit 20 mg festem Na-Dithionit überführt. Durch die Wirkung des Dithionit sanken die Tiere schnell zu Boden, die darüber stehende erythrozytenhaltige Flüssigkeit wurde abgenommen. Restliche freie Erythrozyten wurden durch zweimaliges Spülen der Rädertierproben mit Seewasser entfernt. Das noch im Verdauungstrakt befindliche Hämoglobin ließ sich anschließend mit Aqua dest. eluieren. Hierfür wurden 2 ml Aqua dest. zum Rädertier-Sediment gegeben und die Suspension unter gelegentlichem Durchmischen für mindestens 20 min stehen gelassen. Danach wurde im Überstand die Extinktion bei 420 nm bestimmt.

Mit Hilfe des ermittelten Faktors (3.2.1.1, S. 52) war eine Rückrechnung der Hämoglobinmenge auf die Erythrozytenzahlen/ml möglich. Die Division des Ergebnisses durch die Zahl der (rot gefärbten) Rotatorien/ml, ergab den durchschnittlichen Befüllungsgrad der Verdauungsorgane.

In Tabelle 12 sind die ermittelten Erythrozytenzahlen, die ein Rädertier im Versuchsverlauf zu sich nahm, für zwei verschiedene Fütterungsversuche mit Humanerythrozyten zusammengefasst. Im ersten Ansatz mit ca. 2548 Rädertieren/ml Fütterungsmedium waren die Tiere am Vortag zuletzt gefüttert worden. Im zweiten Ansatz mit ca. 1983 Rädertieren/ml („Hungertiere“)

lag die letzte Fütterung 48 Stunden zurück.

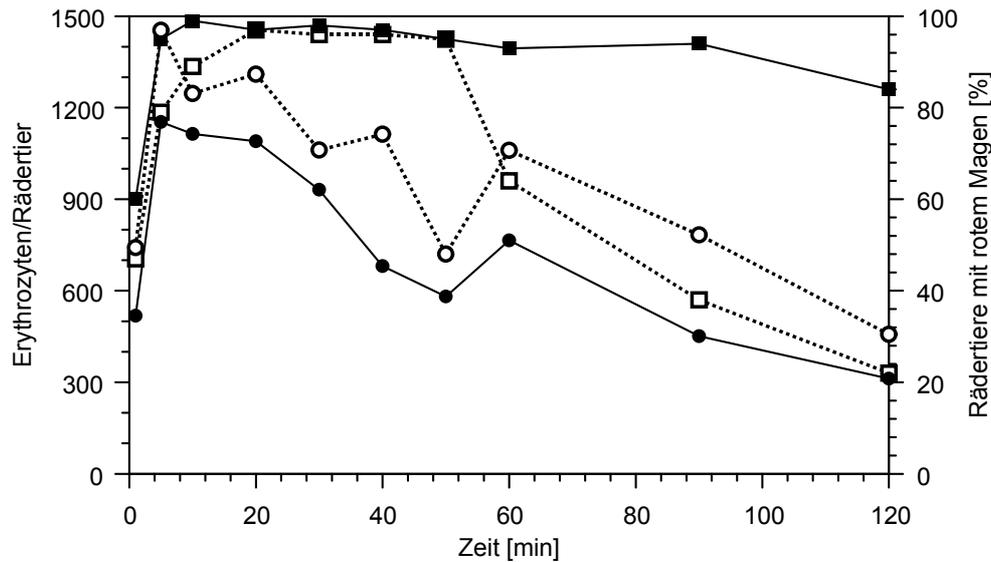
In diesen Versuchen zeigten die Rotatorien eine maximale Aufnahmekapazität von 1153 Erythrozyten/Rädertier bei den täglich gefütterten Tieren bzw. von 1454 Erythrozyten/Rädertier bei den „Hungertieren“. Durch Multiplikation dieser Werte mit dem durchschnittlichen Volumen eines menschlichen Erythrozyten ( $87 \mu\text{m}^3$ ) ließ sich das Volumen des Verdauungstraktes abschätzen. So errechnete sich ein „maximales“ Verdauungstraktvolumen von 100 pl (gefütterte Tiere) bzw. 127 pl („Hungertiere“).

**Tab. 12: Füllungsgrad [Erythrozyten/Rädertier] des Verdauungstrakts von *Brachionus plicatilis*.** Nach Extraktion des Hämoglobins aus dem Verdauungstrakt und Messung der Extinktion wurde die von einem Rädertier aufgenommene Erythrozytenzahl berechnet.

Zeit [min]	gefütterte Tiere				„Hungertiere“			
	$\Delta E_{420}$	mit rotem Ma- gen/ml	mit rotem Magen [in %]	Erythro- zyten / Räder- tier mit rotem Magen	$\Delta E_{420}$	mit rotem Ma- gen/ml	mit rotem Magen [in %]	Erythro- zyten / Räder- tier mit rotem Magen
1	0,061	738	60	<b>518</b>	0,055	466	47	<b>741</b>
5	0,204	1110	95	<b>1153</b>	0,183	784	79	<b>1454</b>
10	0,234	1320	99	<b>1114</b>	0,176	882	89	<b>1247</b>
20	0,229	1312	97	<b>1090</b>	0,202	962	97	<b>1310</b>
30	0,194	1310	98	<b>931</b>	0,161	952	96	<b>1061</b>
40	0,136	1250	97	<b>681</b>	0,169	952	96	<b>1113</b>
50	0,123	1325	95	<b>581</b>	0,108	942	95	<b>720</b>
60	0,134	1100	93	<b>765</b>	0,107	634	64	<b>1060</b>
90	0,102	1412	94	<b>451</b>	0,047	377	38	<b>783</b>
120	0,049	990	84	<b>312</b>	0,016	218	22	<b>457</b>

Das mit dieser Methode bestimmte Volumen des Verdauungstrakts (100-127 pl) liegt unter den Werten der mit den bisherigen Methoden bestimmten Volumina (150-350 pl).

Die Werte von Tabelle 12 sind in Abbildung 25 graphisch dargestellt. Aus dieser Abbildung lässt sich eine mögliche Erklärung für die Abweichung der Volumina von den bisher ermittelten Werten ableiten. Hier wurden einerseits die in den Tieren mit rotem Magen enthaltenen Erythrozyten und andererseits der mikroskopisch bestimmte Anteil „gefärbter“ Rädertiere gegen die Zeit aufgetragen.



**Abb. 25: Prozentualer Anteil an Tieren mit rotem Magen und der von ihnen aufgenommenen Erythrozyten aus zwei Fütterungsansätzen mit Humanerythrozyten.**

- Erythrozyten/„Hungertier“
- Erythrozyten/„gefüttertem Tier“
- „Hungertiere“ mit rotem Magen [%]
- „gefütterte“ Tiere mit rotem Magen [%]

Eine Probe Rädertiere wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten aus dem Ansatz entnommen und mit Dithionit vermischt. Die Zahl an rot gefärbten Tieren wurde bestimmt. Die Tiere wurden in Aqua dest. gegeben, wodurch das im Verdauungstrakt enthaltene Hämoglobin eluiert wurde. Anschließend bestimmten wir die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 420 nm. Die Extinktionswerte wurden mit Hilfe des aus der Kalibriergeraden gewonnenen Faktors (3.2.1.2, S. 55) auf die Zahl der Erythrozyten zurückgerechnet, die sich durchschnittlich in den rot gefärbten Rotatorien der Probe befanden.

In beiden Versuchsansätzen zeigt der Verlauf der Kurven, dass die Zahl der von einem Rädertier aufgenommenen Erythrozyten bereits 20 min nach Versuchsbeginn abnimmt. Der Prozentsatz an Tieren, die im Mikroskop einen

deutlich roten Magen zeigten, bleibt bis zur 50. Minute relativ konstant. Erst dann nimmt ihr Anteil ab. Bei den Hungertieren sinkt der Wert rascher und erreicht nach 120 min 22%. Der Prozentsatz der rot gefärbten „gefütterten“ Tiere geht im gleichen Zeitraum lediglich auf 84% zurück.

Selbst wenn nahezu 100% der Tiere einen deutlich rot gefärbten Magen bzw. Verdauungstrakt zeigten, bedeutete das also nicht, dass alle Tiere ihren Verdauungstrakt tatsächlich maximal mit Erythrozyten bzw. Hämoglobin gefüllt hatten. Dies erklärt, warum diese Methode zu niedrigeren Werten für das Volumen des Verdauungstraktes führte. Weiter zeigte sich, dass die mikroskopische Ermittlung des Prozentsatzes von Tieren mit rot gefärbtem Magen eher eine vorläufige Abschätzung darüber erlaubte, wie die Versorgung der Tiere mit Partikeln war.

### **3.2.4 Einflüsse von Milieufaktoren auf die Nahrungspassage**

Trotz anscheinend gleicher Bedingungen streuen die Werte der Aufnahme- und Filtrationsraten beträchtlich. Daher wurde geprüft, ob weitere Parameter Einfluss auf diese Vorgänge haben.

#### **3.2.4.1 Mikroskopische Untersuchung des pH-Wertes in Magen und Intestinum von *B. plicatilis***

Zwischen Magen und Intestinum besteht bei *B. plicatilis* ein deutliches pH-Gefälle. Mittels Hefezellen, die mit einem pH-Indikator gefärbt worden waren, konnte Klaus Kühle (1983) Unterschiede im pH-Milieu von Magen und Intestinum von *B. plicatilis* nachweisen. Das Intestinum zeigte einen deutlich saureren pH (6,0) als der Magen (7,4–7,8) bzw. das umgebende Seewasser (7,8). Diese pH-Abnahme von pH 7,4 auf 6,0 ließ auf eine Abgabe von  $H^+$ -Ionen durch aktive Protonen-Pumpen schließen. Um diese Pumpen zu charakterisieren, versuchte K. Kühle, sie durch Erhöhung der Pufferkapazität im Verdauungstrakt zu erschöpfen. Tatsächlich schien eine solche Maßnahme zur Verlängerung der Nahrungsverweilzeit im Magen und schließlich zu einer völligen Blockade der Weitergabe an das Intestinum zu führen. Von diesen Ergebnissen ausgehend, wurden die pH- und Pufferverhältnisse hier noch einmal überprüft.

Zur Untersuchung des pH-Werts im Verdauungstrakt von *B. plicatilis* wurden Bromthymolblau bzw. Bromphenolblau gefärbte Hefezellen eingesetzt. Diese Zellen werden von den Rädertieren bereitwillig aufgenommen (siehe 3.1.1, S. 29 ff).

In Abwandlung der Methode nach Kühle (1983) wurde die Färbung der Hefezellen durch Inkubation in einem 30 °C Wasserbad mit anschließender Erhitzung auf 100 °C intensiviert. Der Vergleich mit nicht inkubierten Zellen zeigte, dass durch die 30 °C-Inkubation der Farbstoff tiefer in die Hefezellen eindringen kann. Daher zeigten so gefärbte Hefezellen auch

---

nicht die sonst durch den Salzfehler im Seewasser verursachte Fehlfärbung. Diese äußert sich dadurch, dass bei leicht basischen pH-Werten von Zuchtmedium (pH 7,2–7,6) und Seewasser (pH 8) der Indikator seine für den sauren Bereich typische Gelbfärbung zeigt. Salzfehler beruhen auf der Bildung von Hydrathüllen um die Salzionen. Durch die damit verbundene Bindung größerer Wassermengen verringert sich die molare Wasserkonzentration. Diese Verschiebung des Protolysegleichgewichts des Indikators bewirkt, dass die Indikatorsäuren in Salzlösungen wie z.B. Seewasser einen zu niedrigen pH-Wert anzeigen.

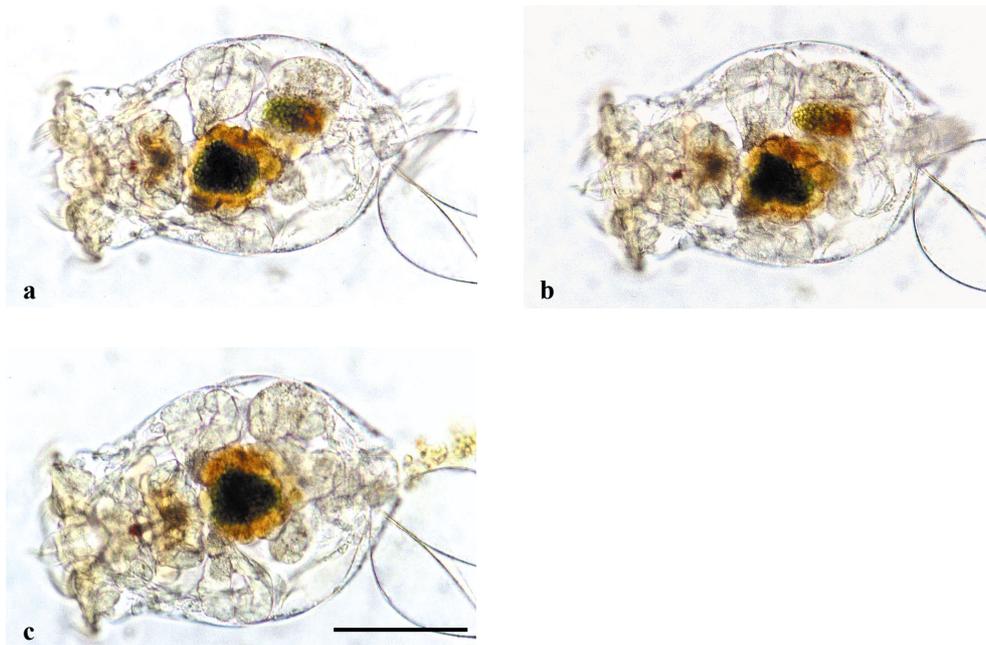
Kühle hatte zur Vermeidung des Salzfehlers alle Versuche in Saccharose-Lösung durchgeführt. Durch die oben beschriebene Änderung der Färbemethode wurde ein Einsatz der Hefezellen auch im Seewasser möglich.

Die Abbildungen 26a-c zeigen einen typischen Verdauungsvorgang nach Fütterung der Rotatorien mit intakten Hefezellen, die mit Bromthymolblau gefärbt wurden.

Die im Medium zunächst blau-grün gefärbten Zellen werden aufgenommen und sind nach wenigen Sekunden im Magen zu erkennen. Der Indikator (Indikatorbereich von pH 6,0 (gelb) bis 7,8 (blau-grün)) zeigt dort seine für einen basischen pH-Wert typische blau-grüne Färbung.

Ein mechanischer Aufschluss der Hefezellen durch die Trophi des Mastax ist nicht erkennbar: Zellige Strukturen sind sowohl im Magen als auch nach Weiterleitung in das Intestinum (10 min nach Zugabe) feststellbar. Auch dort sind die Zellen zunächst noch grün, färben sich dann aber - nach Schließen des Sphinkters - innerhalb von 5 min deutlich gelb.

Wenige Minuten nach dem Farbumschlag beginnt der Inhalt des Intestinums zu rotieren und es erfolgt die Darmentleerung. Die ausgeschiedenen Partikel zeigen weiterhin eine zelluläre Struktur und driften rasch im Medium auseinander. Dort nehmen sie innerhalb kurzer Zeit wieder die gleiche blau-grüne Färbung wie vor der Aufnahme an.



**Abb. 26a-c: Fütterung der Rädertiere mit Bromthymolblau-gefärbten Hefezellen.**

Nach Zugabe der Hefezellen wurde die Zeitdauer bis zum Farbumschlag und die Darmentleerung beobachtet. Beobachtung bei Tieren, die auf dem Objektträger festgelegt waren. Kalibrierungsbalken = 100  $\mu\text{m}$

**a** = 10 min nach Zugabe: der Magen ist mit blau-grün gefärbten Zellen gefüllt, im Intestinum erscheinen die Zellen zunächst ähnlich gefärbt, aufgrund ihrer geringen Anzahl aber etwas heller.

**b** = 15 min nach Zugabe: die Zellen im Intestinum zeigen einen deutlichen Farbumschlag zu gelb.

**c** = 17 min nach Zugabe: Entleerung des Intestinums. Die abgegebenen Partikel verteilen sich im Medium und sind zunächst noch gelb gefärbt.

Nach Färbung von Hefezellen mit Bromphenolblau, einem im pH-Bereich von 3,0–4,6 (Farbumschlag von gelb nach blau) einsetzbaren Indikator, sind im Seewasser deutlich blau gefärbte Zellen zu erkennen. Die Aufnahme und Weiterleitung dieser Zellen im Verdauungstrakt läuft in den selben, oben beschriebenen Zeiträumen ab, wobei jedoch kein Farbumschlag zu beobachten ist (Abb. 27).

Der pH-Bereich des Verdauungstraktes muss also deutlich über einem pH-Wert von 4 liegen. Bromphenolblau gefärbte Hefezellen sind daher nicht für die Messung von pH-Unterschieden im Verdauungstrakt von *B. plicatilis* geeignet. Da ihre Färbung aber sehr viel deutlicher ist, als die der Bromthymolblau gefärbten Zellen, eignen sie sich gut zur mikroskopischen Untersuchung der Partikelaufnahme und der Passage durch den Verdauungstrakt (3.1, S. 29 ff).



**Abb. 27: Fütterung eines Rädertieres mit Bromphenolblau-gefärbten Hefezellen.**

Alle 5 min wurde eine Tierprobe aus dem Fütterungsansatz entnommen und die Aufnahme und Weiterleitung der Zellen mikroskopisch verfolgt. Das Foto zeigt ein Tier, 30 min nach Zugabe der Hefezellen. Magen und Intestinum sind mit deutlich blau gefärbten Zellen gefüllt. Die Zellen liegen scheinbar unbeschädigt im Verdauungstrakt vor. Ein Farbumschlag ist nicht zu erkennen. Kalibrierungsbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur mit den Bromthymolblau gefärbten Hefezellen ein pH-Unterschied zwischen Magen und Intestinum auch im Seewasser nachweisbar ist.

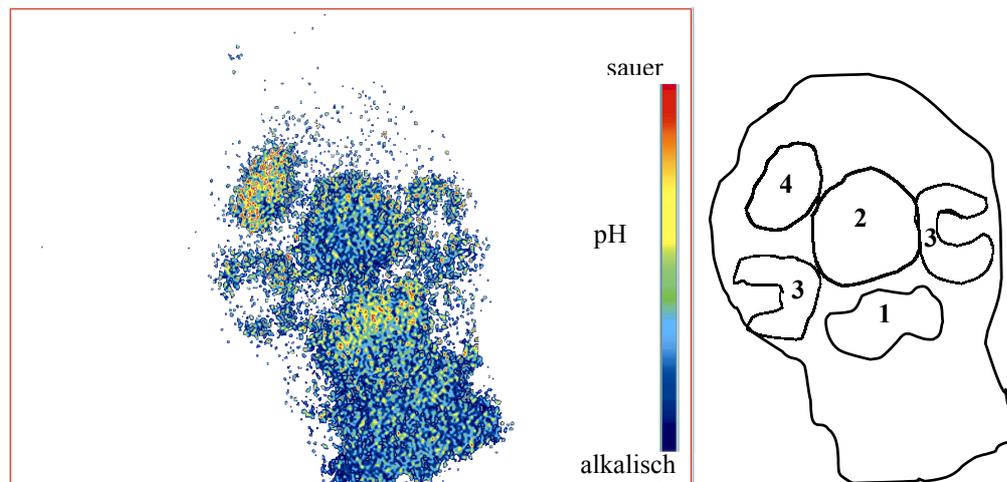
Der Farbton der im Magen beobachteten Zellen ist stärker grünlich, während im Außenmedium (pH 8) der Farbton nach blau tendiert. Scharf von beiden Farbtönen abgegrenzt ist die im Intestinum vorliegende Gelbfärbung. Das Milieu des Magens liegt also im schwach basischen Bereich bei einem pH-Wert von ca. 7,5 und im Intestinum herrscht ein saures Milieu mit einem pH-Wert von 5,0-6,0.

Das  $H^+$ -Ionenmilieu im Intestinum scheint auch eine Rolle bei der Weiterleitung der Nahrung zu spielen und die Darmentleerung zu beeinflussen. Die Darmentleerung konnte stets erst beobachtet werden, wenn die im Intestinum enthaltenen Hefezellen ihre „saure“ gelbe Färbung angenommen hatten.

Bestätigt wurden die Unterschiede des pH-Wertes von Magen und Intestinum durch Versuchsansätze am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop. Für diesen Ansatz wurden Hefezellen mit dem pH-Indikatorfarbstoff SNARF-1-Ester für 30 min inkubiert und durch dreimaliges Spülen von überschüssigem Farbstoff befreit. Die gefärbten Hefezellen wurden in Saccharose-Lösung (pH 7,0) aufgenommen und mit dem Rädertier-Medium gemischt. Diese Versuche zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen dem Milieu des Magens und des Intestins.

In Abb. 28 ist ein Tier nach Fütterung mit markierten Hefezellen in einer Falschfarbendarstellung zu sehen. Die überwiegend blaue Färbung des Magens in dieser Darstellung zeigt ein eher basisches Milieu im Lumen an. Die gelb-roten Farben im Intestinum deuten auf ein saures Milieu hin.

(Die gelblichen Farbtöne im Bereich des Mastax müssen auf andere Effekte zurückgeführt werden, da hier kein größerer Hohlraum existiert, in dem pH-Änderungen stattfinden könnten.)



**Abb. 28: Falschfarbendarstellung von *Brachionus plicatilis* nach Fütterung mit SNARF-1-Ester gefärbten Hefezellen.** (In der Übersichtszeichnung sind die Verdauungsorgane durch Zahlen markiert.) Die blaue Färbung in den Magendrüsen (3) und im Magen (2) zeigt ein alkalisches Milieu an. Gelbrote Bereiche sind im Intestinumlumen (4) zu bemerken und deuten auf ein stärker saures Milieu hin. Die gelbliche Färbung des Mastax (1) beruht vermutlich nicht auf einen pH-Einfluß.

### 3.2.4.2 Einfluss des pH-Wertes im Medium

Um den Einfluss des pH-Wertes im Außenmedium auf die Verdauungspassage zu untersuchen, führten wir Fütterungsversuche in unterschiedlich gepufferten 0,25 M Saccharoselösungen bei pH-Werten von 6,0 und 7,0 durch. Nach Ansaugen eines Tieres an die Haltekapillare wurden die gefärbten Hefezellen mit dem Medium vermischt. Durch das Inversmikroskop konnte die Aufnahme der Zellen und deren Weiterleitung im Verdauungstrakt beobachtet werden. In Tab. 13 sind die Ergebnisse dieser Fütterungsversuche zusammengestellt.

**Tab. 13: Einfluss des pH-Werts auf die Weitergabe der Hefezellen im Verdauungstrakt.** Die festgelegten Rädertiere wurden in Tris/HCl gepufferter 0,25 M Saccharoselösung bei pH-Werten von 6,0 und 7,0 mit Bromthymolblau gefärbten Hefezellen gefüttert. Pro Molaritätsstufe sind die ermittelten Zeiten von 10 beobachteten Tieren zusammengefasst.

Molarität des Tris/HCl-Puffers [M]	pH-Wert des Puffers	Verweildauer der Hefezellen im Magen [min]	Zeit bis zum Farbumschlag nach Weitergabe an das Intestinum [min]
0,05	6,0	$\infty$	keine Weitergabe
	7,0	4-15	5-10
0,71	6,0	6->20	bereits gelb
	7,0	2-12	<1 sec

Bei einem pH von 6,0 in 0,05 molaren Tris/HCl-Puffer hatten Bromthymolblau gefärbte Hefezellen bis zur Aufnahme in den Mastax eine gelbgrüne Färbung. Erst im Magen nahmen sie eine deutlich dunklere grüne Färbung an. Nach Aufnahme einiger Zellen stellten die Rädertiere ihre Kau-tätigkeit ein. Eine Weitergabe vom Magen an das Intestinum konnte nicht beobachtet werden.

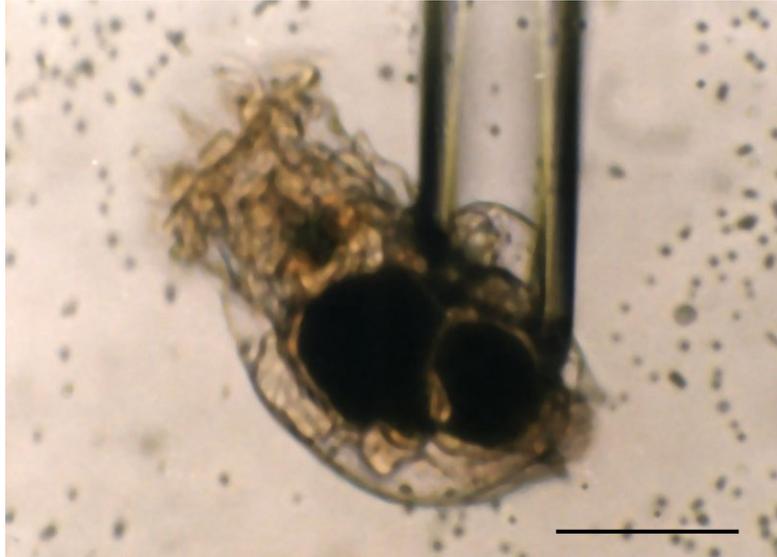
---

Bei einem pH von 7,0 in 0,05 molaren Tris/HCl-Puffer zeigten die Hefezellen im Medium eine grüne Färbung. 5–10 min nach Weitergabe an das Intestinum war ein Farbumschlag nach gelb zu beobachten. Auch bei diesem pH-Wert wurde die Kautätigkeit des Mastax mehrmals eingestellt und Hefezellen durch Umkehrung des Cilienschlags oder der Kauerbewegung nach außen befördert. Erst nach längerem Verweilen im Fütterungsmedium wurde kontinuierlich Nahrung aufgenommen und weitergeleitet.

In 0,71 molaren Tris/HCl-Puffer pH 6,0 waren die Hefezellen im Außenmedium ebenfalls gelb gefärbt und nahmen im Mastax und Magen eine helle gelb-grüne Färbung an. Die Weitergabe an das Intestinum war entweder verlangsamt (frühestens nach 20 min) oder fand nicht statt. Ein Farbumschlag im Intestinum konnte nicht beobachtet werden, da die Zellen bereits gelb gefärbt waren.

In 0,71 molaren Tris/HCl-Puffer, bei einem pH von 7,0, waren die Rotatorien wesentlich aktiver und füllten den Magen prall mit den bereits grün gefärbten Zellen. Im Intestinum angekommen, zeigten die Hefen innerhalb einer Sekunde nach Schließen des Sphinkters einen Farbumschlag nach gelb (Tab. 13). In einzelnen Fällen (in Tab. 13 nicht erfasst) führte eine stark verzögerte Weitergabe der Zellen vom Magen an das Intestinum sogar zur Ausdehnung des Magens (Abb. 29).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verdauungsvorgang bei *B. plicatilis* durch den pH-Wert des umgebenden Mediums (das vermutlich auch in den Verdauungstrakt gelangt) beeinflusst werden kann. Allerdings hat eine solche Änderung des pH-Wertes auch Einfluss auf die Aktivität der Rotatorien. Besonders im sauren Milieu stellten die Tiere immer wieder die Nahrungsaufnahme ein und zeigten keine Schwimmbewegungen mehr. Nach längerem Verweilen im sauren Medium lagen die meisten Tiere immobilisiert am Boden. Bei Überführung dieser Rotatorien in alkalisches Milieu erholten sie sich rasch wieder. Dies entspricht im Übrigen auch den Beobachtungen bei der Zucht von *B. plicatilis*. Sie gedeihen nur dann, wenn das Zuchtmedium bei schwach alkalischen Werten gehalten wird.



**Abb. 29:** Rädertier nach Fütterung mit Bromthymolblau gefärbten Hefezellen in **0,71 M Tris/HCl-Puffer pH 7,0**. Das Magenlumen ist durch die große Menge an eingestrudelten Hefezellen erweitert. Ein Teil der Zellen aus dem Magen wird gerade in das Intestinum weitergeleitet. Kalibrierungsbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.4.3 Vergleich der Aufnahme- und Filtrationsraten in gepufferten Medien

Durch Beobachten von festgelegten Einzeltieren, die mit gefärbten Hefezellen gefüttert wurden (Kühle, 1983), war bereits der Einfluss der Molarität auf die Nahrungspassage deutlich geworden.

Eigene Untersuchungen bestätigen diese Beobachtungen. So zeigten Tiere, die in Tris/HCl-Puffer steigender Molarität gehalten wurden (Molaritätsstufen 0,007-0,71 M) bei den höheren Molaritäten eine verlängerte Passagezeit. Bei einer Puffer-Molarität von 0,71 wurde bei einem pH-Wert von 6,0 die Weitergabe der Hefezellen vom Magen an das Intestinum häufig eingestellt, was zu einer starken Ausdehnung des Magens führte. Bei den niedrig molaren Puffern (0,007-0,036 M) setzte die Kautätigkeit des Mastax verspätet ein, so dass sich zunächst die Zellen im Pharynx vor dem Mastax stauten.

Aufgrund der zeitaufwendigen Beobachtung von Einzeltieren an der Haltekapillare konnten nur wenige Individuen untersucht werden. Die erhaltenen Passagezeiten zeigten zudem eine breite Streuung. Trotz der Bemühungen, die äußeren Bedingungen der Fütterungsansätze möglichst konstant zu halten, sind mehrere Parameter denkbar, die die Nahrungsaufnahme der Rotatorien negativ beeinflussen. So spielte sicher eine Rolle, wie und wo das Rädertier durch die Haltekapillare angesaugt wurde und wie oft es zu Störungen der Partikelaufnahme durch Erschütterungen oder vorbeischwimmende Rädertiere kam. Partikel sanken häufig zu Boden oder verteilten sich unregelmäßig im Medium. Die Nachlieferung von frischen Partikeln variierte daher vermutlich von Tier zu Tier.

Es wurde deshalb versucht, entsprechende Aussagen mit größeren Tierzahlen zu überprüfen. In Fütterungsexperimenten mit hoher Tierdichte ließ sich die „Cycling time“, d.h. die Passagezeit durch den Verdauungstrakt, durch Messen von freigesetztem Hämoglobin photometrisch ermitteln (3.2.2, S. 63 ff). Eine Frage war, ob sich die so ermittelte mittlere Passagezeit verlängerte, wenn die Puffer-Molarität erhöht wurde. Zur Beantwortung dieser Frage wurde folgender Versuchsansatz benutzt:

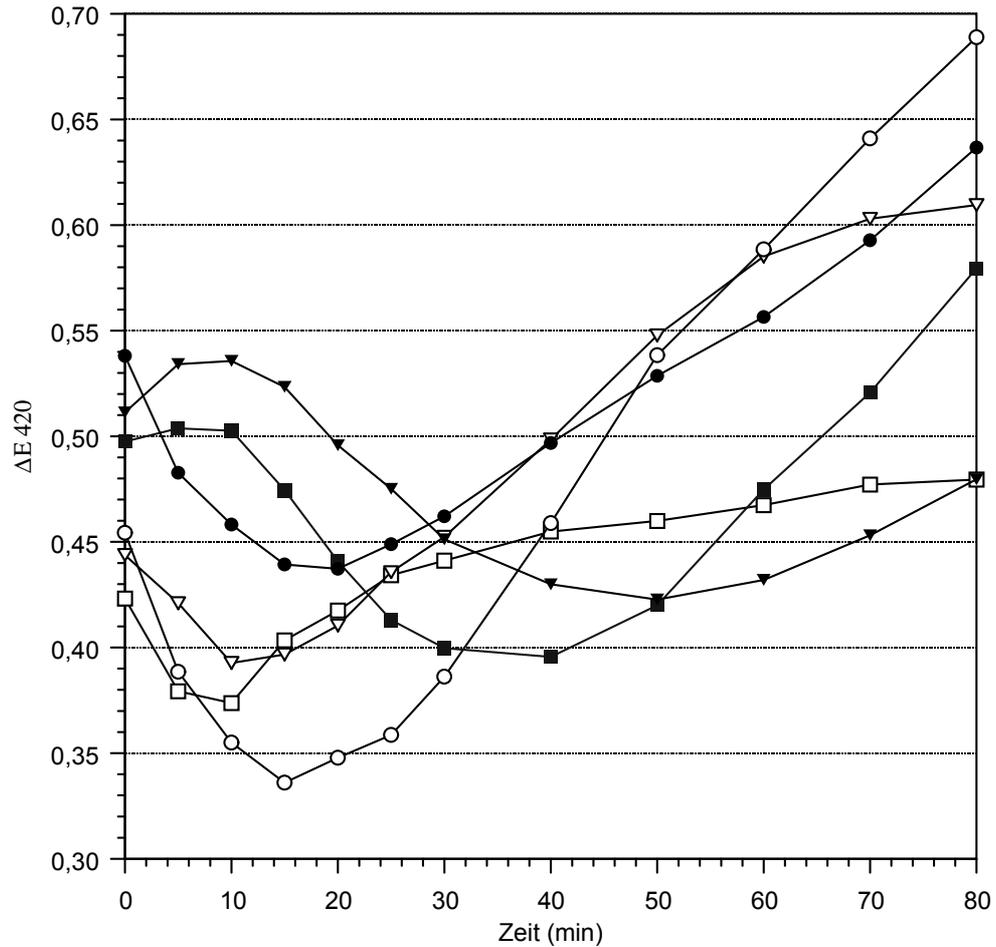
Die abgefilterten und konzentrierten Rotatorien wurden zunächst mit dem entsprechenden Puffermedium mehrfach vorgespült und so schließlich in den gewünschten Puffer überführt. Die im gleichen Puffer angesetzte Erythrozyten-Suspension wurde anschließend hinzugefügt. Alle 5-10 min wurden Proben aus dem rotatorienfreien Kompartiment entnommen (siehe 2.6.6, S. 23 ff). Innerhalb parallel geführter Versuche wurde eine ähnliche Dichte, sowohl der Erythrozyten, als auch der Rädertiere angestrebt.

Tris/HCl-Puffer wurde, wie bei Kühle (1983), in 0,25 M Saccharose-Lösung angesetzt, da die Zugabe von Tris zu Seewasser zur Trübung der Lösung führte. TRA, Citrat und MES-Puffer wurden mit Seewasser angesetzt.

Abbildung 30 zeigt die Extinktionskurven von Fütterungsansätzen in 0,25 M Saccharose-Lösung mit Tris/HCl-Puffern pH 7,8, aber unterschiedlicher Molarität.

Im ungepufferten oder nur schwach mit 0,05 M Tris/HCl gepufferten Ansatz beginnt das Entfernen der Erythrozyten aus dem Medium anscheinend mit Verzögerung. Die Passagezeiten erscheinen gegenüber Ansätzen in Seewasser verlängert, die Ausscheidung des Hämoglobins beginnt erst nach ca. 40-50 min.

Wenn Tris/HCl in höherer Molarität im Medium vorliegt, verringert sich die Darmpassagezeit. In 0,2 M Tris-Puffer liegt die Passagezeit bei 15 min, in 0,36–0,6 M Puffer geht sie auf 10 min zurück. Mit steigender Molarität verringert sich jedoch auch die Menge an freigesetztem Hämoglobin (zu erkennen an der abgeflachten Kurve der Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm). Ab einer Molarität von 0,43 M steigt die Extinktion bei 420 nm nur noch geringförmig, d.h. aus dem Verdauungstrakt der Rädertiere wird nur wenig Hämoglobin ausgeschieden.



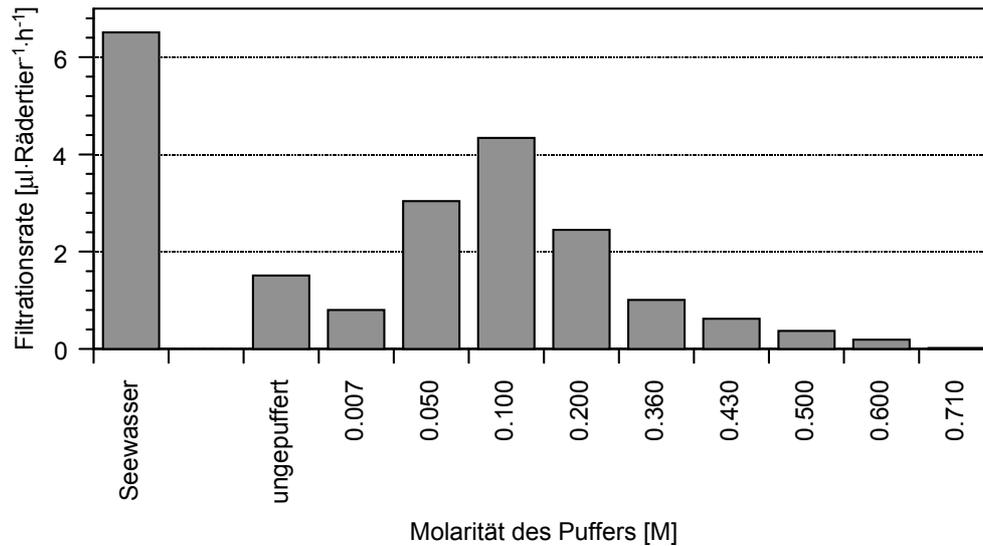
**Abb. 30: Einfluss der Puffer-Molarität** (Tris/HCl-Puffer pH 7,8 in 0,25 M Saccharose) auf die Aufnahme von menschlichen Erythrozyten bzw. die Ausscheidung von Hämoglobin durch die Rädertiere. Nach Zugabe von 4 ml Erythrozytensuspension zu 60 ml Rädertier-Medium, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten tierfreie Proben entnommen und deren Absorption im Photometer bei 420 nm bestimmt. Die Kurven geben den Verlauf der Extinktion in folgenden Medien wieder:

- ungepuffertes Seewasser
- ▼— ungepufferte Saccharose
- 0,05 M Tris/HCl in Saccharose
- 0,20 M Tris/HCl in Saccharose
- ▽— 0,36 M Tris/HCl in Saccharose
- 0,60 M Tris/HCl in Saccharose

Aus der Tabelle 14 und nach Darstellung der Filtrationsraten als Balkendiagramm (Abb. 31) ist zu sehen, dass das Puffern des Mediums mit 0,1 M Tris/HCl eine positive Wirkung auf die Nahrungsaufnahme hat. Die Filtrations- und Aufnahme rate sind bei dieser Molarität hoch, wenn auch nicht der Wert der Filtrationsrate im Seewasser erreicht wird. Eine schwächere oder stärkere Pufferung mit Tris/HCl wirkt sich hingegen negativ auf die Partikel Aufnahme durch die Rädertiere aus..

**Tab. 14: Filtrationsrate (Clearing rate, Formel 9, S. 75) und Aufnahme rate (Ingestion rate, Formel 5, S. 71) von *B. plicatilis* nach Zugabe von menschlichen Erythrozyten in Tris/HCl gepuffertem 0,25 M Saccharose-Medium. Molarität des Tris/HCl-Puffers wie angegeben. Der pH des Puffers wurde (wenn nicht anders vermerkt) auf 7,8 eingestellt.**

<b>Molarität</b>	<b>Rädertiere/ml</b>	<b>Erythrozyten/ml·10<sup>6</sup></b>	<b>Filtrationsrate</b> [μl·Rädertier <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	<b>Aufnahme rate</b> [Erythrozyten·Rädertier <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]
Seewasser	233	2,07	6,51	72,69
ohne Tris/HCl pH 5,7	406	4,08	1,51	75,61
0,050 M, pH 6,0	279	3,17	0,84	39,48
0,007 M	344	3,15	0,80	36,59
0,050 M	415	4,28	3,04	115,49
0,100 M	404	3,51	4,34	105,73
0,200 M	407	3,17	2,45	78,67
0,360 M	338	3,32	1,01	47,10
0,430 M	377	3,20	0,62	29,42
0,500 M	508	2,98	0,37	16,74
0,600 M	568	3,12	0,19	9,36
0,710 M	385	3,47	0,02	1,15



**Abb. 31:** Filtrationsrate [ $\mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ] der Rädertiere nach Fütterung mit menschlichen Erythrozyten in **Tris/HCl gepufferter Saccharose-Lösung (pH 7,8)**. Zum Vergleich wurde zusätzlich die Filtrationsrate in ungepuffertem Seewasser und in ungepufferter Saccharoselösung aufgetragen.

In weiteren Versuchsreihen wurden Puffersubstanzen benutzt, die ohne Schwierigkeiten in Seewasser eingesetzt werden können. Dabei zeigte sich, dass neben der Molarität auch noch die chemische Natur der Substanz die Vorgänge im Verdauungstrakt beeinflusst.

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe mit TRA in Seewasser, bei einem pH-Wert von 7,8, zusammengefasst.

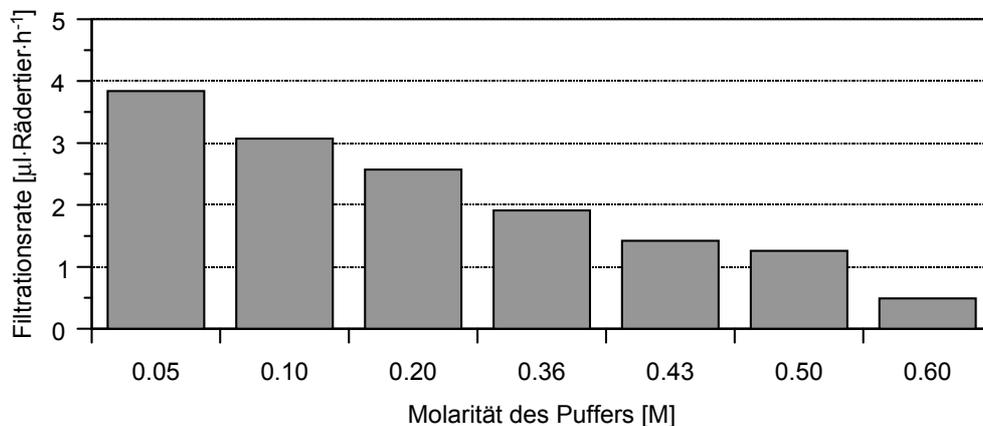
Dabei scheint 0,05 M TRA in Seewasser die Passage sogar noch gegenüber ungepuffertem Seewasser zu beschleunigen. Die Darmpassagezeit liegt in 0,05 M TRA bei ca. 15 min, während sie im Seewasser etwa 20 min beträgt.

Mit steigender Molarität nehmen die Filtrations- und Aufnahmeraten ab. So sinkt die Filtrationsrate von ca.  $4 \mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  bei 0,05 M TRA-Puffer auf  $0,05 \mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  in 0,6 M TRA-Puffer (Abb. 32). Dies bestätigt die mikroskopische Beobachtung, dass bei 0,6 M TRA die Erythrozytenaufnahme fast ganz zum Erliegen kam und die Tiere offensichtlich geschädigt

waren. Da die Zugabe von 0,6 M Puffer zu Seewasser auch eine erhebliche Erhöhung der Osmolarität bedeutete, ist eine nahe liegende Vermutung, dass die Immobilisierung der Tiere hierauf zurückzuführen sein könnte.

**Tab. 15: Filtrationsrate (Clearing rate, Formel 9, S. 75) und Aufnahmerate (Ingestion rate, Formel 5, S. 71) von *B. plicatilis* nach Zugabe von menschlichen Erythrozyten in TRA gepuffertem Seewasser mit einem pH von 7,8 bei den angegebenen Molaritäten.**

Molarität	Rädertiere/ ml	Erythro- zyten/ml·10 <sup>6</sup>	Filtrationsrate [μl·Rädertier <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	Aufnahmerate [Erythrozyten· Rädertier <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]
0,05 M	428	4,68	3,84	131,65
0,10 M	246	4,26	3,07	149,36
0,20 M	310	4,50	2,57	129,33
0,36 M	408	4,78	1,91	103,02
0,43 M	410	4,80	1,42	84,92
0,50 M	247	4,69	1,26	84,26
0,60 M	234	4,64	0,49	35,79



**Abb. 32: Filtrationsrate** der Rädertiere nach Fütterung mit menschlichen Erythrozyten in TRA gepuffertem Seewasser (pH 7,8).

Um den Einfluss der Osmolarität des Mediums auf die Aktivität der Rädertiere zu untersuchen, wurden Kontrollansätze mit Erythrozyten in doppelt konzentriertem Seewasser, das eine Osmolarität von ca. 2 osmol/l hatte, durchgeführt. Diese Kontrollversuche wurden mit „Hungertieren“ (letzte Fütterung vor 48 Stunden) und mit normal gefütterten Tieren durchgeführt. Zur Auswertung wurde zu verschiedenen Zeiten der Anteil von Tieren mit (rot) gefülltem Verdauungstrakt ermittelt.

Wurden „Hungertiere“ in doppelt konzentriertem Seewasser beobachtet, so war bereits innerhalb weniger Minuten eine Rotfärbung des Verdauungstraktes zu erkennen. Nach 10 min hatten 82 % der Tiere einen deutlich rot gefärbten Magen und innerhalb von 30 min waren 92 % intensiv rot gefärbt. Ein Nachlassen der Färbung war erst zu beobachten, wenn sich die Dichte der Erythrozyten im Medium verringert hatte.

Rädertiere, die am Vortag gefüttert wurden, zeigten unter diesen Umständen dagegen eine verlangsamte Nahrungsaufnahme. Erst nach 20 min waren 1% der ausgezählten Tiere deutlich rot gefärbt. Nach 90 min war schließlich bei 77% der Rotatorien ein gut gefüllter Magen zu erkennen.

In beiden Ansätzen schwammen die Tiere ohne Anzeichen von Beeinträchtigung aktiv im Medium herum.

Diese Ergebnisse zeigen, dass stark erhöhte Osmolarität die Aufnahme von Partikeln beeinflussen kann, aber jedenfalls zu keiner Herabsetzung der Aktivität führt.

Dies entspricht den Ergebnissen von S. Heuser (1987):

*B. plicatilis*, als osmokonformer Organismus, wird durch die osmotischen Bedingungen seiner Umgebung nicht unmittelbar geschädigt. Bei einem erhöhten Salzgehalt von Seewasser (50 ‰) oder einer reduzierten Salzkonzentration (unter 6 ‰) wird lediglich eine Wirkung auf die Wachstumsrate sichtbar.

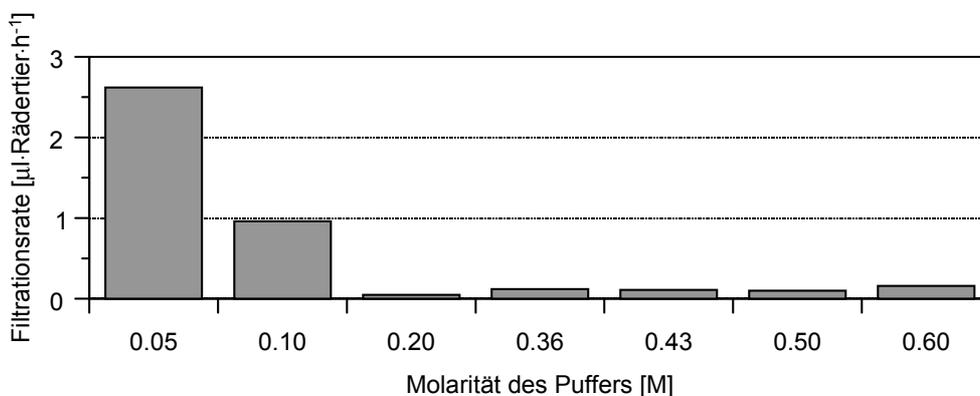
Die Einstellung der Aktivitäten von *B. plicatilis*, in Gegenwart von 0,6 M TRA, scheint daher in erster Linie auf die hohe Konzentration dieser Chemikalie zurückzuführen zu sein.

Weiter wurde Citrat als Puffersubstanz untersucht. Auch hiermit ist im Seewasser die Einstellung des pH auf 7,8 möglich.

In Tabelle 16 und Abbildung 33 werden Filtrations- und Aufnahmearten von Rädertieren in mit Citrat gepuffertem Seewasser zusammengefasst.

**Tab. 16: Filtrationsrate (Clearing rate, Formel 9, S. 75) und Aufnahmearten (Ingestion rate, Formel 5, S. 71) von *B. plicatilis* nach Zugabe von menschlichen Erythrozyten in mit Citrat gepuffertem Seewasser pH 7,8 der angegebenen Molaritäten.**

Molarität	Rädertiere/ ml	Erythro- zyten/ml·10 <sup>6</sup>	Filtrationsrate [μl·Rädertier <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	Aufnahmerate [Erythrozyten· Rädertier <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]
0,05 M	305	4,30	2,62	125,99
0,10 M	405	4,93	0,96	64,91
0,20 M	392	4,90	0,05	4,05
0,36 M	294	4,25	0,12	8,35
0,43 M	261	4,31	0,11	7,78
0,50 M	350	4,70	0,10	7,69
0,60 M	348	4,58	0,16	11,89



**Abb. 33: Filtrationsrate der Rädertiere nach Fütterung mit menschlichen Erythrozyten in Citrat gepuffertem Seewasser (pH 7,8).**

Es ist zu sehen, dass die Filtrationsrate in Seewasser mit Citrat stets niedrig ist. Bereits durch Citrat einer Molarität von 0,05 M sinkt die Filtrationsrate im Vergleich zu ungepuffertem Seewasser um mehr als die Hälfte, auf ca. 2,6 μl·Rädertier<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> ab. Nach Zusatz von 0,1 M Citrat zu Seewasser liegt die Filtrationsrate unter 1 μl·Rädertier<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> und bei höheren Molaritäten bei ca. 0,1 μl·Rädertier<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

---

Der Zusatz von Citrat zu Seewasser hatte offensichtlich ungünstigere Auswirkungen, als die bisher untersuchten Puffer. Die Messungen der Extinktionen bei 420 nm zeigten, dass sich bei einer Molarität von 0,05 M auch die Darmpassagezeit deutlich verlängerte (von 15 min im Seewasser auf 25-30 min).

In Seewasser mit 0,2 M Citrat wurden offensichtlich Verdauungsaktivitäten nahezu eingestellt (Aufnahmerate von 4 Erythrozyten-Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>). Mikroskopische Kontrollen zeigten, dass fast alle Tiere im Fütterungsansatz regungslos am Boden lagen.

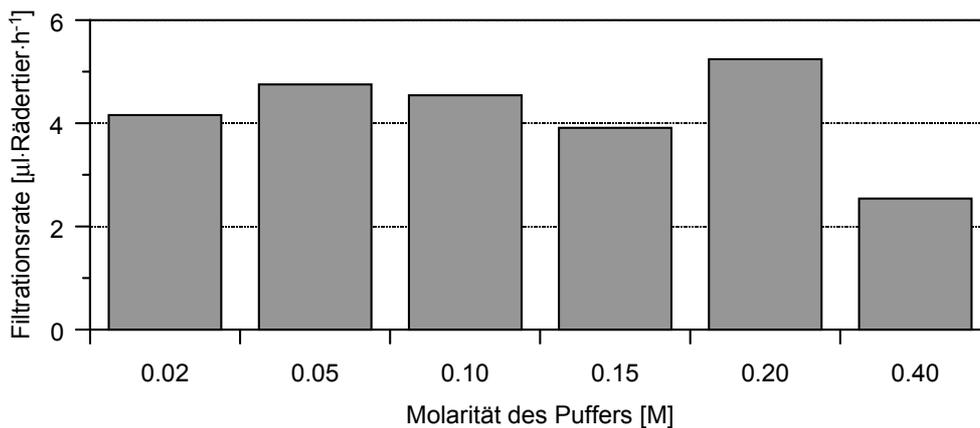
In einer nächsten Versuchsreihe wurde für diese Versuche ein „Good“-Puffer mit geeignetem pK-Wert eingesetzt. Die sogenannten „Good“-Puffer bestehen aus Substanzen, die möglichst wenig Einfluss auf physiologische Vorgänge haben sollten (Good et al., 1966). Wir benutzten MES, das einen pK-Wert von 6,15 besitzt.

In Tabelle 17 und in Abbildung 34 sind die Ergebnisse von Fütterungsversuchen in „MES“-gepuffertem Seewasser zusammengestellt. Die Filtrationsraten und die Aufnahmeraten stimmen im Rahmen der Standardabweichungen mit den Werten überein, die im Seewasser ermittelt wurden.

Bei Verwendung von MES-Puffer war auch der Verlauf der Kurven für die Extinktion bei Wellenlängen von 420 und 630 nm gegenüber denen in ungepuffertem Seewasser kaum verändert.

**Tab. 17: Filtrationsrate (Clearing rate, Formel 9, S. 75) und Aufnahme rate (Ingestion rate, Formel 5, S. 71) von *B. plicatilis* nach Zugabe von menschlichen Erythrozyten in MES gepuffertem Seewasser bei einem pH von 7,8 und den angegebenen Molaritäten.**

Molarität	Rädertiere/ ml	Erythrozy- ten/ml·10 <sup>6</sup>	Filtrationsrate [μl·Rädertier <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	Aufnahmerate [Erythrozyten· Rädertier <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ]
0,02 M	415	4,46	4,16	130,33
0,05 M	695	4,09	3,44	70,84
0,05 M	443	4,49	6,01	118,71
0,10 M	684	4,10	3,39	72,76
0,10 M	574	4,35	5,68	80,76
0,15 M	482	4,57	3,91	116,10
0,20 M	210	4,62	4,20	208,07
0,20 M	449	4,71	5,71	124,50
0,20 M	411	4,28	5,81	125,58
0,40 M	406	4,49	2,54	113,46



**Abb. 33: Filtrationsrate** der Rädertiere nach Fütterung mit menschlichen Erythrozyten in MES gepuffertem Seewasser (pH 7,8).

Das Ergebnis aller Versuchsreihen lässt sich wie folgt zusammenfassen:

Die Verlängerung der Passagezeiten in Fütterungsansätzen mit hoher Osmolarität, die durch Beobachten von Einzeltieren festgestellt wurde, kann mit diesem Versuchsansatz nicht nachgewiesen werden.

Die Zusammensetzung des Mediums hatte aber einen deutlichen Einfluss auf die Aufnahme und Weiterleitung von Partikeln im Verdauungstrakt. Die Wirkung auf die Rädertiere hing dabei stark von der chemischen Natur der eingesetzten Puffer-Substanz ab. Die Art der Substanz hatte Einfluss darauf, ab welcher Molarität eine Wirkung auf die Tiere zu beobachten ist.

### **3.2.5 Untersuchung von Resorptionsvorgängen im Verdauungstrakt von *B. plicatilis***

Da bei der Registrierung der Extinktion bei 420 nm einerseits die Abnahme der intakten Erythrozyten, andererseits aber auch der Anstieg des wieder ausgeschiedenen Hämoglobins erfasst werden konnte, scheint es auch möglich, eine Bilanzierung beider Vorgänge gegeneinander vorzunehmen.

Eine solche Bilanzierung könnte Hinweise darauf liefern, in welchem Maße aus den Erythrozyten freigesetztes Protein im Verdauungstrakt von *B. plicatilis* resorbiert wird.

#### **3.2.5.1 Resorption von Hämoglobin**

In einer Versuchsreihe wurde die Menge des durch die Rädertiere freigesetzten Hämoglobins mit der maximal in den Erythrozyten enthaltenen Hämoglobinmenge verglichen. Um einen direkten Vergleich zu haben, wurde parallel zum Fütterungsansatz die gleiche Menge an Erythrozyten in Aqua dest. (ohne Rotatorien) hämolysiert.

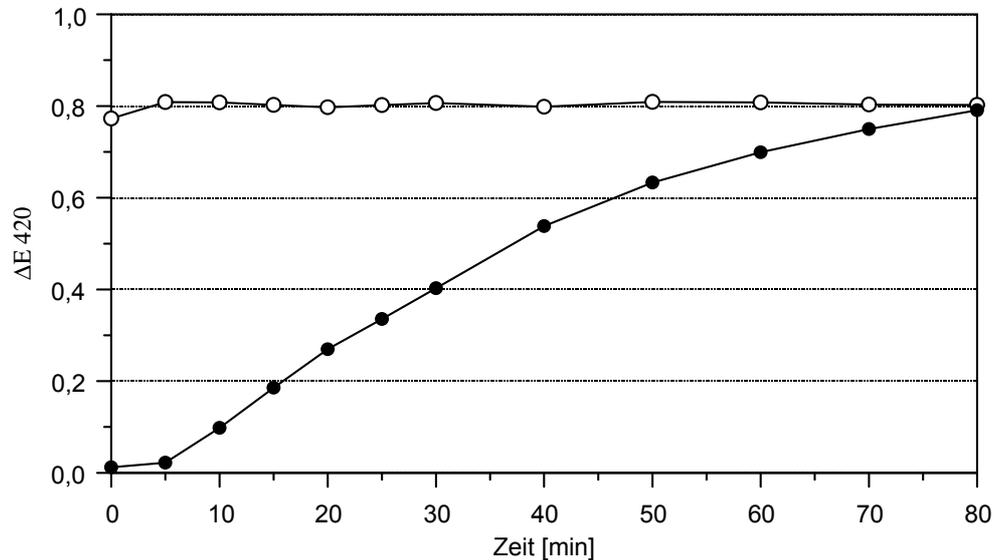
Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus beiden Ansätzen, nach Abzentrifugieren, die Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm und damit das freie Hämoglobin ermittelt.

In Abbildung 35 sind die Extinktionen von freiem Blutfarbstoff nach Zentrifugieren im Überstand des Fütterungsmediums und nach Einspritzen der Erythrozytensuspension in Aqua dest. aufgetragen.

Die Extinktion des Hämoglobins aus den hämolysierten Erythrozyten zeigt über die gesamte Versuchszeit konstant ihren Maximalwert von 0,8.

Die Rädertiere im Fütterungsansatz schließen die Erythrozyten auf und geben aus ihrem Verdauungstrakt freies Hämoglobin in das Außenmedium ab. Die Extinktion bei 420 nm nimmt, nach kurzer Verzögerung, während der ersten 20 min linear zu, anschließend flacht die Kurve ab. Nach 80 min haben die Rotatorien die Menge an Hämoglobin aus den Erythrozyten

freigesetzt, die der 100-prozentigen Freisetzung durch Hämolyse entspricht. Eine Resorption von Hämoglobin findet also nicht statt oder ist jedenfalls mit dieser Methode nicht nachweisbar.



**Abb. 35: Hämoglobinfreisetzung** aus Erythrozyten in Aqua dest. und durch Verfütterung an Rotatorien. Messung der 420 nm-Extinktion des Hämoglobins im Überstand nach der Zentrifugation.

- Fütterungsansatz
- gleiche Menge von Erythrozyten in Aqua dest.

Die Analyse weiterer Fütterungsversuche mit Erythrozyten ergab ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis. Dies muss nicht bedeuten, dass keine Resorption stattfindet, sondern dies kann auch an der ungenügenden Auflösung der hier angewendeten Differenzmethode liegen.

Anhand der Ergebnisse eines anderen Fütterungsexperiments mit menschlichen Erythrozyten in Seewasser, wird im Folgenden die Menge an möglicherweise resorbiertem Hämoglobin zusammen mit den dabei zu erwartenden Fehlern abgeschätzt:

- a) Zur Zeit 0 min wurde ein  $\Delta E_{630 \text{ nm}}$  von 0,3652 gemessen, am Versuchsende, nach 60 min, beträgt  $\Delta E_{630 \text{ nm}}$  0,1576. Durch die Multi-

plikation der Extinktion mit der mittleren Steigung der Kalibriergeraden  $13,2 \cdot 10^6 \pm 4\%$  (Tab. 4, S. 58) wurde die bei 0 bzw. 60 min pro ml Medium enthaltene Zahl der Erythrozyten ermittelt:

$$0 \text{ min} = 4,8 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6 \text{ Erythrozyten/ml}$$

$$60 \text{ min} = 2,1 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^6 \text{ Erythrozyten/ml.}$$

Aus der Differenz dieser Werte ergab sich die Zahl an Erythrozyten, die von den im Versuch eingesetzten  $441 \pm 40$  Rädertieren/ml innerhalb von 60 min aufgenommenen wurde:

$$2,7 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6 \text{ Erythrozyten/ml.}$$

Durch die mechanische Zerstörung der Erythrozyten im Mastax müssten also insgesamt  $78,3 \cdot 10^6 \pm 7,8 \cdot 10^6$  pg Hämoglobin von 441 Rädertieren freigesetzt worden sein. Das entspricht einer Menge von  $0,15 \cdot 10^6$  bis  $0,19 \cdot 10^6$  pg Hämoglobin pro Rädertier.

Umgekehrt wurden nach der Zentrifugation im Überstand die Mengen des Hämoglobins, die von Anfang an in den Erythrozyten vorhanden waren, wie folgt ermittelt:

- b) Im Überstand wurde nach 60 min ein  $\Delta E_{420 \text{ nm}}$  von 0,4269 gemessen. Die Division durch den Umrechnungsfaktor 1,4 (siehe S. 55) und die Multiplikation mit der aus den Kalibriergeraden ermittelten Steigung (Tab. 5, S. 62) ergab eine Erythrozytenkonzentration von  $2,2 \cdot 10^6 \pm 5\%$  Erythrozyten/ml.

Von den 441 Rädertieren wurden also  $63,8 \cdot 10^6 \pm 3,2 \cdot 10^6$  pg Hämoglobin freigesetzt. Das entspricht einer Menge von  $0,14 \cdot 10^6$  bis  $0,15 \cdot 10^6$  pg Hämoglobin/Rädertier.

Vergleicht man die Menge an freigesetztem Hämoglobin im Medium mit der in den aufgenommenen Erythrozyten enthaltenen Hämoglobin-Menge,

so liegen beide Werte innerhalb des statistischen Fehlers. Eine Differenz und damit Resorption ist also nicht ausgeschlossen, aber nicht nachweisbar.

Ein Grund dafür, dass auf diesem Weg Resorption nicht nachweisbar ist, kann an technischen Einzelheiten der Versuche liegen:

Um das ausgeschiedene Hämoglobin messen zu können, mussten einerseits hohe Erythrozytendichten eingesetzt werden, andererseits führten hohe Partikelkonzentrationen aber auch zu einer schnelleren Passage und zu rascherem Austausch des Inhalts des Verdauungstraktes (siehe 3.1.2.3.1, S. 42). Daher war hier die Zeit für die Resorptionsvorgänge besonders kurz und der Anteil des resorbierten am durchgeschleusten Hämoglobin besonders gering.

Dass die Hämoglobin-Resorption im Verdauungstrakt von *B. plicatilis* nicht nachweisbar ist, könnte aber auch „nicht-technische“ Gründe haben:

1. Das Hämoglobin könnte als Nahrungsstoff zu artifiziell sein.
2. *B. plicatilis* ist möglicherweise nur in der Lage, Partikel aber keine löslichen Stoffe zu resorbieren.
3. *B. plicatilis* resorbiert zwar den Proteinanteil des Hämoglobins, gibt aber das (bei einer Wellenlänge von 420 nm absorbierende) Häm wieder ab.

Die dritte Möglichkeit wurde mit folgendem Ansatz ausgeschlossen:

Rädertiere wurden mit Erythrozyten gefüttert und nach 20 min gefiltert, so dass nicht aufgenommene Zellen aus dem Medium entfernt wurden. Ein Teil der Rotatorien wurde in frisches Seewasser überführt, während die andere Hälfte der Tiere in Seewasser mit Hefezellen inkubiert wurde.

Zwei Stunden nach Zusatz der Hefe wurden beide Ansätze abgefiltert und die von Rotatorien und Hefe gereinigten Überstände in Dialyseschläuche aus Zellulose gegeben. Die eingesetzten Dialyseschläuche halten Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 3500 Da zurück, kleinere Moleküle diffundieren ins Außenmedium. Freies Häm mit einem Molekulargewicht von 620 Da sollte also ungehindert durch die Poren der semipermeablen

Membran gelangen können, während Globin-gebundenes Häm (Molekulargewicht 6200 Da) im Inneren des Schlauchs verbliebe.

Nach der Dialyse wurden Wellenlängen-Spektren gemessen. Bei keiner Probe war das für Häm typische Absorptionsspektrum erkennbar.

Dies kann nicht an der zu geringen Menge an Häm in der Probe gelegen haben, wie folgende Abschätzung zeigt:

Aus der am Ende des Fütterungsversuches gemessenen Extinktion des freigesetzten Hämoglobins ( $\Delta E_{420} = 0,1732$ ) errechnete sich eine Erythrozytenkonzentration von  $0,87 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml (siehe 3.2, S. 51 ff). Dies ergibt einen Hämoglobingehalt von  $25,23 \mu\text{g/ml}$  Medium.

Nach der Verdünnung in der Dialyse müssten noch  $2,97 \mu\text{g/ml}$  (entspricht ca. dem Hämoglobingehalt von  $1,02 \cdot 10^5$  Erythrozyten) vorliegen, eine Konzentration, die für den photometrischen Nachweis von Häm ausreichend ist. Häm lag also nicht frei im Außenmedium vor, sondern war weiter an Globin gebunden und konnte daher nicht durch die semipermeable Membran des Dialyseschlauchs diffundieren.

Zu den Alternativen 1 und 2 ist folgendes zu bemerken:

Bisher konnten in Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen mit Sicherheit die Endocytose von Partikeln im Magen beobachtet werden (Kleinow et al., 1991). Gegen eine Aufnahme nur von Partikeln spricht allerdings schon die mechanische Bearbeitung der Nahrung durch den Mastax. Auch der Nachweis von hydrolytischen Enzymen mit pH-Optima, die dem pH-Wert des Magens entsprechen (Kühle & Kleinow, 1985 und 1989), war ein Indiz dafür, dass Stoffe dort verdaut und aufgenommen werden konnten.

Ein weiterer Hinweis auf die Resorption von Hämoglobin, war die verbleibende rötliche Restfärbung im Verdauungstrakt nach Austausch der Erythrozyten durch Hefezellen (siehe 3.1.2.3.1, S. 42 ff).

In Austauschversuchen mit Albumin beladenen Erythrozyten-Ghosts konnte, nach Entfernung der vorher zugegebenen FITC-Albumin Ghosts aus dem Verdauungstrakt, mikroskopisch eine Restfluoreszenz im Magen beobachtet werden. Ob es sich hierbei wirklich um resorbierte Proteine handelte, wird im Folgenden untersucht (siehe 3.2.5.2).

### 3.2.5.2 Direkter Nachweis der Resorption von Proteinen

Wie bereits besprochen, kann der Darminhalt von *B. plicatilis* schnell ausgetauscht werden (siehe 3.1.2.3.1, S. 42 ff). Diese Technik wurde benutzt, um schlüssig die Aufnahme von in Erythrozyten-Ghosts eingeschlossenen Proteinen nachzuweisen.

Diese Versuche verliefen wie folgt:

Rädertiere wurden mit Ghosts gefüttert, die mit FITC markiertem Albumin beladen waren. Nach wenigen Minuten zeigte sich eine hell leuchtende Fluoreszenz im Verdauungstrakt. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle frei im Medium vorliegenden Ghosts abgefiltert und durch fluoreszenzfreie, mit unmarkiertem Albumin beladene Ghosts ersetzt. Dies bewirkte, dass in kurzer Zeit alle im Lumen des Verdauungstrakts befindlichen Partikel entfernt und durch gleichartige aber nicht fluoreszierende ersetzt wurden. Dennoch konnte für einen Zeitraum von bis zu 2 h eine Restfluoreszenz im Verdauungstrakt nachgewiesen werden (Abb. 36).

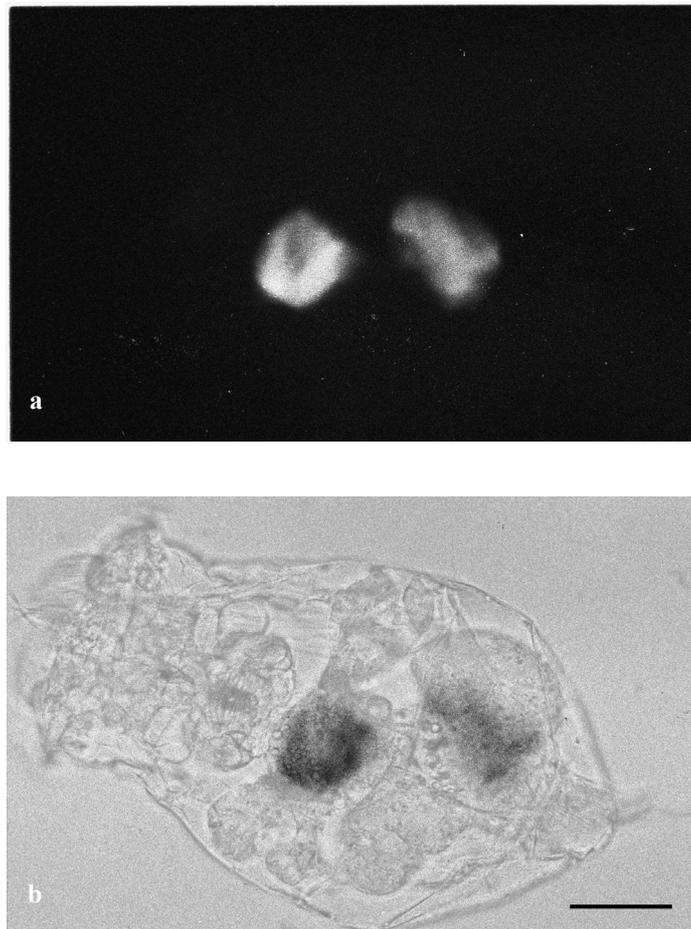
Wenn durch das Nachfüttern von unmarkierten Ghosts alle Partikel aus dem Lumen des Verdauungstraktes entfernt wurden, so kann die zurückbleibende Fluoreszenz nur darauf beruhen, dass FITC-markiertes Albumin aus dem Lumen in die Zellen der Verdauungsorgane aufgenommen wurde.

Hieran anschließend stellte sich die Frage, ob Rotatorien, die länger, d.h. über eine Stunde mit fluoreszierenden Ghosts gefüttert wurden, mehr FITC-Albumin aufnehmen können und dies durch eine intensivere Fluoreszenz in den Magenzellen anzeigen würden. Daher wurden Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Fütterungsansatz entnommen und, nach Entfernen der fluoreszierenden Ghosts, im Mikroskop die Intensität der im Verdauungstrakt zurückbleibenden Restfluoreszenz beurteilt.

Tiere, die über eine Stunde FITC-Albumin Ghosts aufnehmen konnten, zeigten jedoch eine ähnliche Fluoreszenz in den Magenzellen wie Tiere, die nur einige Minuten fluoreszierende Ghosts aufnahmen.

Das kann bedeuten, dass ein Unterschied der Fluoreszenzintensität lichtmik-

roskopisch schlecht feststellbar ist oder dass die Absorptionsprozesse so rasch ablaufen, dass es nicht zu einer Anreicherung von fluoreszierendem Material in den Zellen des Magens kommen konnte.



**Abb. 36a-b: Resorption von FITC markiertem Albumin durch *B. plicatilis*.**

Rädertiere wurden mit Erythrozyten-Ghosts gefüttert, die mit FITC-Albumin beladen waren. Nach 5-15 min wurden die Fluoreszenz-Ghosts durch dreimaliges Spülen der Tiere mit Seewasser in einer Filterapparatur entfernt. Alle noch im Lumen des Verdauungstrakts befindliche Fluoreszenz wurde durch anschließende Fütterung mit Erythrozyten-Ghosts, die mit nicht-fluoreszierendem Albumin beladen waren, entfernt. Die Bilder zeigen Aufnahmen eines Tieres, ca. 2 Stunden nach Fütterung mit FITC-Albumin-Ghosts:

**a)** Fluoreszenz-Bild, **b)** zur Lokalisation der Fluoreszenz im Verdauungstrakt wurde Bild **a** invertiert und über eine Hellfeldaufnahme des gleichen Tieres gelegt.

Kalibrierungsbalken = 60  $\mu$ m

---

Um die Resorptionsvorgänge genauer beobachten zu können, wurden Fütterungsexperimente bei ca. 15 °C, einer Temperatur, bei der die Aufnahme von Partikeln verlangsamt abläuft, durchgeführt. Auch hier war jedoch kein eindeutiger Unterschied in der Menge des resorbierten Materials zu erkennen.

Die beobachtete Restfluoreszenz könnte allerdings auch auf im Medium vorliegende, nicht abgefilterte FITC-Albumin Ghosts oder auf unspezifisch an der Oberfläche der Magenzellen anhaftendes FITC-Albumin beruhen. Um dies zu kontrollieren wurden diese Versuche auch mit (unterschiedlich stark) fixierten Ghosts durchgeführt. Eine Fixierung von Erythrozyten oder Ghosts mit Glutardialdehyd führt zu einer Stabilisierung der Erythrozytenmembran, sie wird so widerstandsfähiger gegenüber mechanischer Beanspruchung (3.1.2.4, S. 47).

Nach Zugabe von 0,05% Glutardialdehyd-fixierten Ghosts waren im Magen noch einzelne intakte Fluoreszenz-Ghosts sichtbar. Über 90% wurden jedoch zerkaut und die enthaltene Fluoreszenz im Lumen des Verdauungstrakts freigesetzt. Nach Filtration und Spülung mit fluoreszenzfreien Ghosts, waren keine zellulären Gebilde in den Verdauungsorganen zu erkennen. Eine abgeschwächte, diffuse Fluoreszenz blieb auch hier über Stunden erhalten.

Nach Verfütterung von FITC-Albumin-Ghosts, die mit 0,1% Glutardialdehyd fixiert wurden, waren zunächst im Magen und anschließend auch im Intestinum fluoreszierende „Kugeln“ zu erkennen. Die Fluoreszenz im Verdauungstrakt war im Vergleich zu vorherigen Versuchen deutlich schwächer. Nach Ausscheidung des Darminhalts waren noch „intakt“ aussehende Ghosts erkennbar, die sich rasch im Medium verteilten.

Durch mehrmaliges Filtern und Austausch der Zellen durch fluoreszenzfreie Albumin-Ghosts, verschwanden die Fluoreszenz-Ghosts allmählich aus dem Lumen von Magen und Intestinum und eine sehr schwache Restfluoreszenz blieb zurück. Es war deutlich zu erkennen, dass wesentlich weniger Ghosts von den Rädertieren zerkaut wurden und daher auch in geringerem Umfang

Fluoreszenz freigesetzt wurde. Somit konnte auch weniger fluoreszierendes Material vom Rädertier resorbiert werden.

Wurden die Rotatorien mit 0,5% Glutardialdehyd fixierten Ghosts gefüttert, so war zunächst eine gleich intensive Fluoreszenz wie bei den schwächer fixierten Ghosts zu sehen. Die Fluoreszenz verschwand jedoch vollständig nach Abfiltern der fluoreszierenden Zellen und Zusatz von unmarkierten Ghosts.

Mit dieser Methode ist also ein rascher und vollständiger Austausch von unverdauten Fluoreszenz-Ghosts gegen unmarkierte Ghosts möglich. Es zeigte sich außerdem, dass eine Resorption der (fluoreszenzmarkierten) Proteine nur dann erfolgte, wenn es den Tieren möglich war, die angebotenen Partikel im Mastax zu zerkauen und das FITC-Albumin im Lumen des Verdauungstraktes frei zu setzen. Die Beobachtungen belegen noch einmal, dass nach einer Fixierung mit 0,1% Glutardialdehydlösung die Erythrozytenmembran so weit stabilisiert ist, dass die mechanische Leistungsfähigkeit des Mastax ihre Grenze erreicht (siehe S. 47). Nach Behandlung mit Glutardialdehyd-Konzentrationen über 0,1% passierten die Zellen unzerkaut den Verdauungstrakt.

### 3.3 Abschließende Bemerkungen und allgemeine Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Charakterisierung der Verdauungsvorgänge von *B. plicatilis* eingesetzt. Die dafür verwendeten Partikel wurden auf Grund ihrer mikroskopischen und photometrischen Eigenschaften zur Bestimmung von Verdauungsprozessen ausgewählt. Dass einige von ihnen nicht als natürliche Nahrungsstoffe im Lebensraum der Rädertiere vorkommen, spielte dabei nur eine untergeordnete Rolle.

Die Säugererythrozyten, die auf Grund ihrer den natürlichen Nahrungspartikeln entsprechenden Größe (Mensch: 7,5  $\mu\text{m}$ ; Rind: 5,9  $\mu\text{m}$ ; Schaf: 4,8  $\mu\text{m}$ ; Literaturwert für natürliche Partikel: ca. 5  $\mu\text{m}$ ; Hino & Hirano, 1984; Vadstein et al., 1993; Rothhaupt, 1990) von den Rotatorien ohne Schwierigkeiten aufgenommen wurden, zeichnen sich durch ihre lichtmikroskopische sichtbare Rotfärbung aus. Diese auf den hohen Hämoglobingehalt (ca. 35%) zurückzuführende intensive Färbung reicherte sich, nach Aufnahme der Zellen und deren mechanischer Zerstörung durch den Mastax, im Verdauungstrakt von *B. plicatilis* an. Das Lumen der Verdauungsorgane zeigte eine leuchtende Rotfärbung.

Die Passage der Erythrozyten bzw. des aus ihnen freigesetzten Hämoglobins durch die einzelnen Abschnitte des Verdauungstrakts kann durch Festlegen von einzelnen Tieren mit Hilfe einer Saug-Kapillare und durch Beobachten der Vorgänge durch ein Inversmikroskop verfolgt werden. Da nur eine geringe Anzahl von Tieren mit dieser Methode untersucht werden konnten, zeigte sich eine große Schwankungsbreite in den ermittelten Passagezeiten (10–30 min). Dies mag daran liegen, dass die physiologische Konstitution (z.B. Alter der Tiere und Ernährungszustand) eine Rolle spielt und es außerdem nicht immer gelang, die Tiere über einen längeren Zeitraum zu fixieren.

War der erzeugte Unterdruck in der Saug-Kapillare zu groß, wurde das Rä-

dertier mit der Zeit in die Kapillare gesaugt. Manchmal gelang es einigen Individuen, sich aus der Halterung wieder zu befreien.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Passagezeiten lag darin, dass der Nachschub an Partikeln nicht konstant gehalten werden konnte. Die Erythrozyten sanken mit der Zeit auf den Gefäßboden und waren damit für die festgelegten Rotatorien unerreichbar. Trotz dieser Einschränkungen war jedoch der Ablauf der Verdauungsprozesse und deren Einordnung in grobe Zeitrahmen mit dieser Methode möglich.

Beim Beobachten von festgelegten Einzeltieren bestätigte sich, dass *B. pliocatilis* mehrere Möglichkeiten zur Kontrolle der Partikelaufnahme und deren Weiterleitung hat. Durch die Cilien des Buccalfeldes und durch „Umkehrbewegungen“ des Mastax (Clement et al., 1980) können Partikel aus dem Pharynx entfernt werden. Der Transport vom Ösophagus zum Magen und die Weiterleitung ins Intestinum wird ebenfalls durch Membranellen und Cilien gesteuert (Kleinow et al., 1991). Zusätzlich kontrollieren Sphinkter-Muskeln den Übertritt der Partikel vom Magen ins Intestinum und die Darmentleerung.

Der zusätzliche Einsatz von Hefezellen (Durchmesser: 5-7  $\mu\text{m}$ ) und Erythrozyten-Ghosts ermöglichte es, den Austausch von Partikeln aus dem Verdauungstrakt zu verfolgen. So konnte der Einfluss der Nahrungskonzentration auf die Geschwindigkeit der Nahrungspassage und die Resorption von Nahrungsbestandteilen bestimmt werden.

Der Strudelapparat nimmt bei ausreichendem Angebot ununterbrochen Partikel auf. Vom Tier werden sie dann aufgrund des begrenzten Volumens des Verdauungstraktes schnell wieder abgegeben. Demnach muss die Passagezeit und die Absorption von der Konzentration frischer Partikel abhängen. Um diesen Austausch besser beobachten zu können, wurden lichtmikroskopisch unterscheidbare Partikel eingesetzt.

---

Wurde nach Füttern der Rädertiere mit Erythrozyten das Medium entfernt und durch eine Hefezell-Suspension ersetzt, so verschwand die Rotfärbung im Verdauungstrakt von *B. plicatilis* sehr rasch, im Vergleich zu Tieren, bei denen nur die Erythrozyten entfernt wurden. Die Aufnahme von Hefezellen bewirkte also ein beschleunigtes Entfernen von Erythrozyten aus dem Verdauungstrakt und damit das Verschwinden der Rotfärbung.kehrte man den Versuch um und fütterte zunächst mit Hefezellen und dann mit Erythrozyten, so erfolgte der Austausch der Partikel mit ähnlicher Geschwindigkeit. Dies beweist, dass in diesem Fall das Freiräumen des Verdauungstraktes nicht aufgrund der Bevorzugung eines Nahrungspartikels erfolgte, sondern allein vom Angebot frischer Partikel abhängig war.

In größeren Fütterungsansätzen mit geeigneten Rotatoriendichten war es möglich, die in Einzelversuchen individuellen Schwankungen der Partikel-aufnahme und -weitergabe weitestgehend auszuschalten.

Die Bestimmung der Extinktion bei 630 nm ermöglichte es, die Abnahme der Erythrozytenkonzentration im Medium und damit die Aufnahmerate von *B. plicatilis* photometrisch zu bestimmen. Der Einsatz von Erythrozyten hat den Vorteil, dass zur Ermittlung der Aufnahmerate keine radioaktive Markierung benötigt wird (Starkweather & Gilbert, 1977a) und die Passagezeit nicht in das Ergebnis einfließt. Allerdings zeigte sich im Gegensatz zu den Versuchen mit radioaktiv markiertem Futter keine Linearität bei der Aufnahme der Erythrozyten. Dies mag daran gelegen haben, dass es nicht möglich war, die Blutzellen in einer Konzentration einzusetzen, die dem Maximalwert der Aufnahmerate entsprach. Eine Messung der Extinktion ist nur auswertbar, wenn die untersuchte Suspension einen Wert von ca. 0,5 nicht überschreitet, da ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion nur bis zu diesem Wert feststellbar ist. Bei menschlichen Erythrozyten ist diese Proportionalität bis zu einer Konzentration von  $6 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml, bei Schafserythrozyten bis zu  $7,5 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml und bei Rindererythrozyten bis ca.  $10 \cdot 10^6$  Erythrozyten/ml gegeben.

Bei diesen Erythrozytendichten sank die Aufnahme rate der Rädertiere mit Abnahme der Erythrozytenkonzentration. Dieser exponentielle Abfall scheint einer Kinetik erster Ordnung zu folgen.

Nach Ausmessen des Verdauungstraktes und nach Berechnung der Menge an enthaltenen Erythrozyten bzw. Hämoglobins war eine Abschätzung des Volumens des Verdauungstraktes möglich. Das durchschnittliche Volumen eines Rädertieres liegt zwischen 100-358  $\mu$ l.

Die Aufnahme rate betrug bei menschlichen Erythrozyten durchschnittlich  $73 \pm 47$  Zellen/Rädertier und Minute. Die maximale Befüllung des Verdauungstraktes müsste also nach den Werten aus den Fütterungsversuchen in ca. 20 min erreicht sein. Dies stimmt gut mit der Passagezeit bei den beobachteten festgelegten Einzeltieren und mit der „cycling time“ von 20–30 min bei Fütterung mit radioaktiv markierten Partikeln (Starkweather & Gilbert, 1977 a; Korstad et al., 1989) überein.

Durch den Einsatz von radioaktiv markierten Partikeln wurde ermittelt, dass nur 20% des aufgenommenen Futters im Verdauungstrakt resorbiert wird (Doohan, 1973). Diese geringe Resorptionsrate konnte auf die hohe Konzentration der zur Verfügung stehenden Futterpartikel zurückgeführt werden.

Die Beobachtung, dass sich die Passagezeit nach Entfernen aller Futterpartikel wesentlich verlängerte, unterstützt diese Annahme. Unter diesen Bedingungen ist auch mit einer erhöhten Resorptionsrate zu rechnen.

Mit Hilfe der FITC-Albumin beladenen Ghosts wurde diese Annahme überprüft. Die Intensität der absorbierten Fluoreszenz schien jedoch nicht vom Zeitpunkt der Zugabe der Austauschpartikel abhängig zu sein. Die beobachtete Fluoreszenz blieb gleich, unabhängig davon, wie lange die Rädertiere die markierten Partikeln aufnehmen konnten.

Vielleicht war ein Unterschied aufgrund des emittierten Fluoreszenzlichts nicht erkennbar oder die Resorptionsvorgänge verliefen zu schnell um sie zu verfolgen. Im letzteren Fall sollte es möglich sein, durch Fütterungsansätze bei ca. 15 °C, einer Temperatur, bei der die Aufnahme von Partikeln verlangsamt abläuft, die Vorgänge genauer zu beobachten. Auch hier war kein

eindeutiger Unterschied in der Menge des resorbierten Materials zu erkennen. Wurden nach dem Abfiltern der fluoreszierenden Partikel keine neuen Partikel angeboten, so war bei diesen Tieren eine deutlichere Fluoreszenz zu beobachten, die zudem über eine längere Zeit erhalten blieb. Dies liegt daran, dass der Austausch von Partikeln aus dem Verdauungstrakt unterbleibt, wenn nicht neue Nahrung zur Verfügung steht.

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen mit befüllten Erythrozyten-Ghosts machen ihren Einsatz für weitere Untersuchungen denkbar. So könnte, z.B. durch Befüllen mit geeigneten Substraten, ein Nachweis von Verdauungsenzymen direkt in den Verdauungsorganen möglich werden.

#### 4. Zusammenfassung

Mit Hilfe von Markerpartikeln wurden verschiedene Aspekte der Nahrungsaufnahme und der Verdauungsphysiologie des Rädertieres *Brachionus plicatilis* untersucht. Als Markerpartikel wurden fixierte und unfixierte Erythrozyten, unterschiedlich beladene Erythrozyten-Ghosts sowie gefärbte und ungefärbte Hefezellen eingesetzt.

1. An einzelnen festgelegten Rädertieren wurde der Zeitverlauf der Partikelaufnahme und deren Weiterleitung beobachtet.

*B. plicatilis* kann die Aufnahme von Partikeln aktiv regulieren. Daran beteiligt sind vor allem die Cilien des Strudelapparates; sie lassen nur Partikel bis 10  $\mu\text{m}$  durch. Neben der Größe spielen auch andere (vermutlich chemische) Partikeleigenschaften eine Rolle. Partikel, die bereits den Schlund passiert haben, werden durch Umkehrbewegungen des Mastax ausgestoßen.

2. Die Nahrungsaufnahme und die Geschwindigkeit der Weiterleitung wird durch verschiedene Parameter beeinflusst:

- a) Ernährungszustand,
- b) Temperatur des Mediums,
- c) Partikeldichte,
- d) mechanische Aufschließbarkeit der Partikel im Mastax.

3. Anhand von Fütterungsansätzen mit hohen Tierdichten wurde die Aufnahme von Erythrozyten und die Freisetzung des in ihnen enthaltenen Hämoglobins durch photometrische Bestimmung untersucht. Die Abnahme der Erythrozyten im Medium folgt einer Kinetik erster Ordnung.

4. Die mittlere Aufnahmerate (Ingestion rate) für Humanerythrozyten beträgt ca. 73 Erythrozyten·Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, bei Rindererythrozyten ca. 101 Erythrozyten·Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> und bei Schaferythrozyten ca. 264 Erythrozyten·Rädertier<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>.

- 
5. Nach Fütterung der Rotatorien mit Humanerythrozyten wurde eine mittlere Filtrationsrate von  $6,5 \mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{Stunde}^{-1}$  ermittelt. Mit Rinder- und Schaferythrozyten ergaben sich Filtrationsraten von 3,5 bzw. 4,8  $\mu\text{l}\cdot\text{Rädertier}^{-1}\cdot\text{Stunde}^{-1}$ .
  6. Das Volumen des Verdauungstraktes von *B. plicatilis* wurde mit unterschiedlichen Methoden ermittelt. Das durchschnittliche Volumen beträgt danach zwischen 100–358 pl.
  7. Ein pH-Unterschied zwischen Magen (pH 7,5) und Intestinum (pH 5–6) konnte mit Hilfe von Hefezellen, die mit verschiedenen pH-Indikatoren gefärbt wurden, nachgewiesen werden. Untersuchungen mit fluoreszierenden pH-Indikatoren im Laser-Scan-Mikroskop bestätigten die Unterschiede zwischen Magen und Intestinum.  
Ein schwach alkalischer pH des Mediums begünstigt sowohl die Nahrungsaufnahme als auch die Zucht der Rädertiere.
  8. Die Molarität des Puffers hat Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Bei den meisten der untersuchten Pufferlösungen sank die Filtrationsrate der Rädertiere, wenn die Puffer-Molarität erhöht war. MES gepuffertes Seewasser zeigte aber bis zu einer Puffer-Molarität von 0,2 M keinen Einfluss auf die Filtrationsrate.
  9. Die Resorption von Hämoglobin konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, obwohl nach Fütterung mit Erythrozyten eine leichte Rotfärbung des Verdauungstraktes über Stunden sichtbar blieb.  
Die Resorption von FITC-markiertem Albumin wurde jedoch im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.
  10. Der Einsatz von befüllten Erythrozyten-Ghosts scheint ein geeigneter Ansatz zur gezielten Freisetzung von Enzym-Substraten und Indikatoren im Verdauungstrakt von *Brachionus plicatilis* zu sein.

## 5. Literaturverzeichnis

**Altmann, P. L. (1961):**

Blood and other body fluids.  
Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington, D. C.

**Baumeister, U. (1999):**

Säure-Basen-Regulation und Respiration bei Zooplankton-Organismen.  
Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

**Bender, K. & Kleinow, W. (1988):**

Chemical properties of the lorica and related parts from the integument of *B. plicatilis* (Rotatoria).  
Comp. Biochem. Physiol. 89B: 483 – 487

**Bing, D. H., Weyand, J. G. M., Stavitsky, A. B. (1967):**

Hemagglutination with aldehyd-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124: 1166 - 1170

**Bogdan, K. G., Gilbert, J. J. & Starkweather, P. L. (1980):**

In situ clearance rates of planktonic rotifers.  
Hydrobiologia 73: 73 - 77

**Chlorella Industry Co., Ltd. (1997):**

Company Outline

**Clément, P., Amsellem, J., Cornillac, A.-M., Luciani, A., Ricci, C. (1980):**

An ultrastructural approach to feeding behaviour in *Philodina roseola* and *Brachionus calyciflorus* (rotifers).  
III. Cilia and muscles. Conclusions.  
Hydrobiologia 73: 137 - 141

**Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., Jones, K. M. (1969):**

Data for Biochemical Research  
2. Edition, Oxford University Press

**DeMott, W. R. (1986):**

The role of taste in food selection by freshwater zooplankton.  
Oecologia 69: 334 - 340

**Dewey, J. M. (1976):**

Rates of feeding, respiration and growth of the rotifer *B. plicatilis* and the dinoflagellate *Noctiluca miliaris* in the laboratory.  
Doctoral Dissertation, University of Washington (USA), 117 pp.

- Discher, L. (2000):**  
Anwendungsmöglichkeiten von Säugererythrocyten in Kursversuchen zu Freß- und Verdauungsvorgängen bei Rädertieren (Rotatoria).  
Staatsexamensarbeit an der Universität zu Köln
- Discher, L., Lindemann, N., Kleinow, W. (2000):**  
Application of microparticulate markers for examination of food uptake and processing by *Brachionus plicatilis* (Rotifera).  
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 93.1: 81
- Doohan, M. (1973):**  
An energy budget for adult *Brachionus plicatilis* Muller (Rotatoria).  
Oecologia 13: 351 - 362
- Fortnagel, P., Bergmann, R., Harnack, K., Spolaczyk, R. und Claußen, S. (2001):**  
Die Vergleichbarkeit von Trübungsmessungen (OD<sub>600</sub>) mit Standardphotometern.  
GIT Labor-Fachzeitschrift 2/2001: 138 - 142
- Gauld, D. T. (1951):**  
The grazing rate of planktonic copepods.  
Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 29: 695 – 706
- Gilbert, J. J., Starkweather, P. L. (1977):**  
Feeding in the Rotifer *Brachionus calyciflorus*, I. Regulatory mechanisms.  
Oecologia 28: 125 – 131
- Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., Singh, R. M. (1966):**  
Hydrogen ion buffers for biological research.  
Biochemistry 5: 467 - 477
- Haney, J. F., Brauer, M. & Nürnberg, G. (1986):**  
Feeding and egestion rates of individual zooplankton using Cerenkov counting.  
Hydrobiologia 141: 165 - 174
- Hansen, B., Wernberg-Møller, T., Wittrup, L. (1997):**  
Particle grazing efficiency and specific growth efficiency of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller).  
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 215: 217 - 233
- Hara, K., Arano, H. & Ishihara, T. (1984):**  
Some enzymatic properties of alkaline proteases of the rotifer *Brachionus plicatilis*.  
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 50: 1611 – 1616

**Hara, K., Pangkey, H., Osatomi, K. Yatsuda, K., Hagiwara, A., Tachibana, K. & Ishihara, T. (1997):**

Some properties of  $\beta$ -1,3-glucan hydrolyzing enzymes from the rotifer *Brachionus plicatilis*.  
Hydrobiologia 358:89 – 94

**Hargis, J. R. (1977):**

Comparison of techniques for the measurement of zooplankton filtration rates.  
Limnology and Oceanography 22: 942 - 945

**Haugland, R. P. (1994):**

Spectra of fluorescent dyes used in flow cytometry.  
Meth. Cell. Biol. 42, 641 – 663

**Heuser, S. (1987):**

Der Einfluß verschiedener Ionen auf die Zucht von *Brachionus plicatilis* (Rotatoria): Entwicklung und Erprobung einer Testmethodik.  
Staatsexamensarbeit, Universität zu Köln

**Hino, A., Hirano, R. (1984):**

Relationship between body size of the Rotifer *Brachionus plicatilis* and the minimum size of particles ingested.  
Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 50(7): 1139 - 1144

**Hirayama, K., Ogawa, S. (1972):**

Fundamental Studies on physiology of rotifer for its mass culture.  
I. Filter feeding of rotifers.  
Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 38: 1207 - 1214

**Hirayama, K. (1987):**

A consideration of why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable.  
Hydrobiologia 147: 269 - 270

**Ito, T. (1955):**

Studies on Mizukawari in eel-culture ponds. 1. Feeding activity of *Brachionus plicatilis* on phytonannoplankton.  
Report of the faculty of Fisheries (Japanese). Prefectural Univ. of Mie 2: 162 – 276

**James, C. M., Dias, P. & Salman, A. E. (1987):**

The use of marine yeast (*Candida sp.*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with *Chlorella sp.* for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*.  
Hydrobiologia 147: 263 - 268

- 
- Johnson, G. D., Halborow, E. J. (1986):**  
Preparation and use of fluorochrome conjugates  
M. Weir: Handbook of experimental immunology  
1. Immunochemistry, Blackwell, Oxford, Chapter 28
- Kaboth, W., Begemann, H. (1971):**  
Blut, Gauer, O. H., Kramer, K., Jung, R., Physiologie des Menschen,  
Band 5  
Urban & Schwarzenberg München, Berlin, Wien
- Kleinow, W., unveröffentlicht:**  
Praktikumskript: Übungen für Fortgeschrittene, Tierphysiologie
- Kleinow, W. & Kühle, K. (1984):**  
Zum pH-Optimum hydrolytischer Enzyme und zum pH-Milieu im  
Verdauungstrakt bei *Brachionus plicatilis* (Rotatoria).  
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 77: 299
- Kleinow, W., Lindemann, N., Köhler, S. (1997):**  
Untersuchung der Nahrungsaufnahme von *Brachionus plicatilis* (Ro-  
tatoria) mit Hilfe von Erythrozyten-Suspensionen.  
Verh. Dtsch. Zool. Ges., 90.1: 112
- Kleinow, W., Wratil, H., Kühle, K., Esch, B. (1991):**  
Electron microscope studies of the digestive tract of *Brachionus pli-  
catilis*.  
Zoomorphology 111: 67 – 80
- Korstad, J., Vadstein, O. & Olsen, Y. (1989):**  
Feeding kinetics of *Brachionus plicatilis* fed *Isochrysis galbana*.  
Hydrobiologia 186/187: 51 - 57
- Kühle, K. (1983):**  
Untersuchung zur Verdauungsphysiologie von *Brachionus plicatilis*  
(Rotatoria).  
Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Kühle, K. (1987):**  
Untersuchungen zur Verdauungsphysiologie von *Brachionus plicati-  
lis* (Rotatoria): Feinmorphologie des Verdauungstraktes und Versu-  
che zur Charakterisierung und Lokalisierung von Carbohydrasen.  
Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln
- Kühle, K., Kleinow, W. (1985):**  
Measurement of hydrolytic enzymes in homogenates from  
*Brachionus plicatilis* (Rotifera).  
Comp. Biochem. Physiol. 81B No 2: 437 - 442

**Kühle, K., Kleinow, W. (1989):**

Localization of hydrolytic enzyme activities within cellular fractions from *Brachionus plicatilis* (Rotifera).  
Comp. Biochem. Physiol. 93B:565 - 574

**Lie, Ø., Haaland, H., Hemre, G.-I., Maage, A., Lied, E., Rosenlund, G., Sandnes, K., Olsen, Y. (1997):**

Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae.  
Aquaculture International 5: 427 – 438

**Lindemann, N. (1998):**

Einsatz micropartikulärer Marker für die Untersuchung der Verdauungsphysiologie bei *Brachionus plicatilis*.  
Diplomarbeit, Universität zu Köln

**Lindemann, N. & Kleinow, W. (2000):**

A study of rotifer feeding and digestive processes using erythrocytes as microparticulate markers.  
Hydrobiologia 435 (1/3): 27-41

**Lindemann, N., Discher, L., Kleinow, W. (2001):**

Use of microparticulate markers in examination of rotifer physiology: results and prospects.  
Hydrobiologia 446/447: 57-61

**Lubzens, E., Minkoff, G., Barr, Y. & Zmora, O. (1997):**

Mariculture in Israel – past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae.  
Hydrobiologia 358: 13 - 20

**Makridis, P., Olsen, Y. (1999):**

Protein depletion of the rotifer *Brachionus plicatilis* during starvation.  
Aquaculture 174: 343 – 353

**Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I. Ando, Y. & Hirayama, K. (1997):**

Application of unicellular algae *Chorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*.  
Hydrobiologia 358: 133 - 138

**Müller, G., Paul, R. J. (1997):**

„Ghosts“ und Lipsomen als fluoreszierende Meßsonden für physiologische Parameter.  
Verh. Dtsch. Zool. Ges., 90.1: 65

**Navarro, N. (1999):**

Feeding behaviour of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* with two types of food: live and freeze-dried microalgae.

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 237: 75 – 87

**Neuhoff, V. (1973):**

Production of Capillary Pipettes.

In Neuhoff V. (ed.). Micromethods in Molecular Biology,

Chapter 16: 407 - 409

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

**Øie, G. & Olsen, Y. (1997):**

Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition.

Hydrobiologia 358: 251 – 258

**Ooms-Wilms, A. L., Postema, G. & Gulati, R. D. (1993):**

Clearance rates of bacteria by the rotifer *Filinia longiseta* (Ehrb.) measured using three tracers.

Hydrobiologia 255/256: 255 - 260

**Peters, R., Sauer, H., Pratsch, L., Tschopp, J., Bhakdi, S. (1991):**

Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis.

Biochim. Biophys. Acta, 1063: 137 - 146

**Ronneberger, D. (1998):**

Uptake of latex beads as size-model for food of planktonic rotifers.

Hydrobiologia 387/388: 445 - 449

**Rothhaupt, K. O. (1990a):**

Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species.

Limnol. Oceanogr. 35(1): 16 - 23

**Rothhaupt, K. O. (1990b):**

Changes of the functional responses of the rotifers *Brachionus rubens* and *Brachionus calyciflorus* with particle sizes.

Limnol. Oceanogr. 35(1): 24 – 32

**Rothhaupt, K. O. (1995):**

Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate.

Limnol. Oceanogr. 40: 1201 – 1208.

**Salt, G. W. (1987):**

The components of feeding behaviour in rotifers.

Hydrobiologia 147: 271 - 281

**Snell, T. W. (1998)**

Chemical ecology of rotifers.  
Hydrobiologia 387/388:267 - 276

**Starkweather, P. L. (1980):**

Aspects of the feeding behaviour and trophic ecology of suspension-feeding rotifers.  
Hydrobiologia 73: 63 - 72

**Starkweather, P. J., Gilbert, J. J. (1977) a:**

Radiotracer determination of feeding in *Brachionus calyciflorus*: The importance of gut passage times.  
Arch. Hydrobiol. Beih. 8: 261 – 263

**Starkweather, P. L., Gilbert, J. J. (1977) b:**

Feeding in the Rotifer *Brachionus calyciflorus*, II. Effekt of food density on feeding rates using *Euglena gracilis* and *Rhodotorula glutinis*.  
Oecologia 28: 133 - 139

**Starkweather, P. J., Gilbert, J. J. und Frost, T. M. (1979):**

Bacterial feeding by the rotifer *Brachionus calyciflorus*: Clearance and ingestion rates, behaviour and population Dynamics.  
Oecologia (Berl.) 44: 26 - 30

**Starkweather, P. J. & Kellar, P. E. (1983):**

Utilization of cyanobacteria by *Brachionus calyciflorus*: *Anabena flos-aquae* (NRC-44-1) as a sole or complementary food source.  
Hydrobiologia 104: 373 - 377

**Teshima, S., Kanazawa, A., Sakamoto, M. (1981):**

Attempt to culture the rotifers with microencapsulated diets.  
Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 47: 1575 - 1578

**Vadstein, O., Øie, G. & Olsen, Y. (1993):**

Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*.  
Hydrobiologia 255/256: 261 - 267

**Vršanská, M., Krátký, Z. und Biely, P. (1977):**

Lysis of intact yeast cells and isolated cell walls by an inducible enzyme system of *Arthrobacter* GJM-1.  
Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie 17: 391 - 402

**Wallace, R. L. & Starkweather, P. L. (1983):**

Clearance rates of sessile rotifers: In situ determinations.  
Hydrobiologia 104: 379 - 383

**Wethmar, C. & Kleinow, W. (1993):**

Characterization of a 27 kDA endopeptidase and detection of a Proteinase-Inhibitor in homogenates of *Brachionus plicatilis* (Rotifera).  
Comp. Biochem. Physiol. 106B: 359 – 368

**Wißling, K. (1988):**

Untersuchung der Proteine aus dem Hautpanzer von *Brachionus plicatilis* (Rotatoria).  
Diplomarbeit, Universität zu Köln

**Yúfera, M. & Pascual, E. (1985):**

Effects of algal food concentration on feeding and ingestion rates of *Brachionus plicatilis* in mass culture.  
Hydrobiologia 122: 181 – 187

**Yúfera, M., Parra, G. & Pascual, E. (1997):**

Energy content of rotifers (*Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis*) in relation to temperature.  
Hydrobiologia 358: 83 - 87

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kleinow, der meine Arbeit mit großem Interesse verfolgt und gefördert hat. Seine Diskussionsbereitschaft bei der Deutung der Ergebnisse, sowie seine kritischen Anmerkungen zu einem Entwurf dieser Arbeit waren mir eine große Hilfe.

Besondere Anerkennung verdient der große persönliche Einsatz von Herrn H. Wratil für meine Arbeit. Bei der Erstellung des Bildmaterials und bei der Durchführung der Experimente war er jederzeit bereit zu helfen. Dafür sei ihm an dieser Stelle nochmals herzlichst gedankt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Paul von der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, der einen Gastaufenthalt in Münster und die Benutzung des dortigen LSM ermöglichte. Mein besonderer Dank gilt Herrn U. Baumeister, der mich bei der Durchführung der *in vivo* pH-Messungen am LSM tatkräftig unterstützte.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Schlachthofs Köln, die Blutproben von Schafen und Rindern zur Verfügung stellten.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Frau A. Fißan, Herrn A. Krause und Herrn A. Lindemann für die Hilfe bei der graphischen Gestaltung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. W. Kleinow betreut worden.

Teilpublikationen:

**Kleinow, W., Lindemann, N., Köhler, S. (1997):** Untersuchung der Nahrungsaufnahme von *Brachionus plicatilis* (Rotatoria) mit Hilfe von Erythrozyten-Suspensionen. Verh. Dtsch. Zool. Ges., 90.1: 112

**Discher, L., Lindemann, N., Kleinow, W. (2000):** Application of microparticulate markers for examination of food uptake and processing by *Brachionus plicatilis* (Rotifera). Verh. Dtsch. Zool. Ges. 93.1: 81

**Lindemann, N. & Kleinow, W. (2000):** A study of rotifer feeding and digestive processes using erythrocytes as microparticulate markers. Hydrobiologia 435 (1/3): 27-41

**Lindemann, N., Discher, L., Kleinow, W. (2001):** Use of microparticulate markers in examination of rotifer physiology: results and prospects. Hydrobiologia 446/447: 57-61

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

Name: Nicole Anita Lindemann  
Geburtsdatum: 26. Mai 1968  
Geburtsort: Duisburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Wohnort: Im Sommerhausfeld 19, 50129 Bergheim

### **Schulbildung**

Grundschule: 1974 – 1978 Kath. Grundschule Am Kreuzacker, Duisburg-Wanheim

Gymnasium: 1978 – 1979 Reinhard-und-Max-Mannesmann-Gymnasium, Duisburg-Huckingen

1979 – 1987 Gymnasium Brauweiler, Pulheim-Brauweiler  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

**Praktikum:** 02/1988 – 08/1988 Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang

**Berufsausbildung:** 1988 – 1990 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin, Berufsfachschule für Technik der Rheinischen Akademie e.V. Köln, Köln-Ehrenfeld  
Abschluss: staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin

**Studium:** 1990 – 1998 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität zu Köln  
Abschluss: Diplom  
Prüfungsfächer:  
Hauptfach: Zoologie  
1. Nebenfach: Genetik  
2. Nebenfach: Biochemie  
  
ab 1998 Promotionsstudium