

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Aus dem Institut für Meereskunde der Universität Kiel

Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die zelluläre Gefrierresistenz mariner Muscheln

VON HANS THEEDE

Zusammenfassung: Die zelluläre Gefrierresistenz von 12 Muschelarten der Nord- und Ostsee wurde experimentell an überlebenden Gewebestücken gemessen. Diese Resistenz ist eine artspezifische und teilweise umweltabhängige Größe, die Beziehungen zum Tiefenvorkommen und der geographischen Verbreitung der Arten erkennen läßt.

Die zelluläre Gefrierresistenz der im oberen Litoral lebenden Muscheln ist größer als die der auf tiefere Wasserschichten beschränkten Arten.

Im Brackwasser (westliche Ostsee, 15‰ S) lebende Muscheln haben wesentlich geringere zelluläre Gefrierresistenzen als Exemplare derselben Arten aus normalem Meerwasser (Nordsee, 32‰ S). In langfristigen Anpassungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß diese Unterschiede in erster Linie durch individuelle Anpassung an den Salzgehalt des Außenmediums bedingt sind.

Die nach Anpassung an Brackwasser herabgesetzte zelluläre Gefrierresistenz steht im Zusammenhang mit einem ebenfalls individuell verkleinerten Resistenzbereich gegenüber anderen abiotischen Umweltfaktoren (Salzgehalt, Hitze, hydrostatischer Druck).

Durch Zusätze geeigneter Substanzen (Saccharose, Glucose, Glycerin, Acetamid) zum Außenmedium kann die zelluläre Gefrierresistenz beträchtlich erhöht werden.

Comparative Experimental Investigations on the Freezing Resistance of Marine Bivalves (Summary): The cellular freezing resistance of 12 bivalve species from the North Sea and the Baltic Sea has been experimentally measured by means of surviving tissue pieces. This resistance is a species specific and partly environmentally induced value which is correlated to the occurrence (especially depth) and the geographical distribution of the species.

The cellular freezing resistance of bivalves living in the upper litoral is higher than that of species restricted to deeper water levels.

Bivalves living in brackish water (Western Baltic, 15‰ S) have much lower cellular freezing resistances than individuals of the same species from normal sea water (North Sea, 32‰ S). Long time adaptation experiments have shown that these differences are mainly induced by individual acclimatization to the salinity of the external medium.

The cellular freezing resistance lowered by adaptation of whole animals to brackish water is in correlation with the likewise individually reduced extent of resistance against other abiotic environmental factors (salinity, heat, hydrostatic pressure).

The individual cellular freezing resistance can be considerably increased by addition of suitable organic substances (sucrose, glucose, glycerol, acetamid) to the external medium.

I. Einleitung

Im Watt an der deutschen Nordseeküste, das bei Ebbe regelmäßig trockenfällt, treten in normalen Wintern bei starkem Frost Wasserunterkühlungen und geringe kurzfristige Eisbildungen auf, die keine größeren Schäden unter den tierischen Bewohnern hervorrufen. Nach besonders strengen Wintern (zum Beispiel 1928/29 und 1962/63) wurden aber große Schäden innerhalb der Bodenfauna und vor allem unter den Lamellibranchiern beobachtet (vgl. BLEGVAD 1929, TIEDTKE 1964, CRISP 1964, ZIEGELMEIER 1964). Im oberen Litoral wirkte sich dabei besonders der direkte Einfluß der starken Vereisung auf die sessile und hemisessile Fauna aus. In den tieferen Wasserschichten war die langandauernde Kältewirkung entscheidend. Dazu kamen noch sekundäre Auswirkungen der Eisdecke, z. B. Sauerstoffmangel. Manche Arten wurden

im Winter 1962/63 in den eisfreien tieferen Wasserschichten stellenweise praktisch vernichtet (z. B. *Angulus fabula*, *Abra alba*). Andere Arten aber überstanden die langandauernde Winterkälte gut. (z. B. *Macoma baltica*).

In dieser Arbeit soll damit begonnen werden, in Laboratoriumsuntersuchungen die Überlebensfähigkeit verschiedener benthaler Lamellibranchierarten bei Temperaturen unter dem Nullpunkt vergleichend zu analysieren. Dabei soll zunächst einmal die zelluläre Gefrierresistenz an isolierten Gewebestücken verschiedener Arten gemessen werden. Anpassungsversuche bei verschiedenen abiotischen und biotischen Bedingungen sollen dann entscheiden, ob und inwieweit die gefundenen Merkmale veränderlich sind. Weitere Experimente sind schließlich erforderlich, um über die Mechanismen der zellulären Kälte- und Gefrierresistenz bei marinen Evertebraten Aufschluß zu erhalten. Die Ergebnisse werden dann im Zusammenhang mit der Verbreitung der Arten und den erwähnten winterlichen Freilandbeobachtungen diskutiert werden müssen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. C. SCHLIEPER für wertvolle Ratschläge und die Durchsicht des Manuskriptes herzlich danken. Außerdem danke ich Fräulein I. SEIFERT für die Unterstützung bei den Versuchen sowie Herrn Kapitän OHL und der Mannschaft des F. K. HERMANN WATTENBERG, der Biologischen Anstalt Helgoland und der Dänischen Limfjords-Østers-Kompagniet (Nykøbing-Mors) für die Hilfe bei der Tierbeschaffung. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

II. Material

Folgende Bivalvier wurden untersucht:

Aus der *Macoma baltica*-Biozönose der Nordseeküste und der Kieler Förde die Plattmuschel *Macoma baltica* L., die Miesmuschel *Mytilus edulis* L., die Klaffmuschel *Mya arenaria* L. und die Herzmuschel *Cardium edule* L.

Aus der *Venus gallina*-Biozönose in der Nordsee die Muschel *Spisula solida* L. aus etwa 15—50 m Wassertiefe. Diese Art wurde mir dankenswerterweise von der Biologischen Anstalt Helgoland beschafft.

Aus der *Corbula gibba*-Biozönose in der Kieler Bucht die Islandmuschel *Cyprina islandica* L., die große Pfeffermuschel *Scrobicularia plana* DA COSTA und die weiße Pfeffermuschel *Albra alba* WOOD.

Aus der *Macoma calcarea*-Biozönose der Kieler Bucht *Astarte elliptica* BROWN und *Macoma calcarea* CHEMNITZ.

Weiterhin die große Pferdemoschel *Modiolus modiolus* L., die tiefer als *Mytilus* in der Nordsee und im Kattegat, sowie vereinzelt in der nördlichen Kieler Bucht auf Hartboden vorkommt. Unsere Versuchsexemplare wurden im Kattegatt in etwa 40 m Wassertiefe gedredht (Salzgehalt 28‰ S).

Die Europäische Auster *Ostrea edulis* L. Sie kommt in der Regel unterhalb der Gezeitenregion vor. Unsere Versuchstiere stammten aus dem Limfjord/Dänemark.

Die Tiere wurden während des Winters bis zum Versuchsbeginn im Salzgehalt des Fundortwassers und bei der Temperatur von 5° C aufbewahrt. Diese Temperatur wich nur wenig von den winterlichen Wassertemperaturen am Fundort der Tiere ab. Nach dem Ansteigen der Außentemperaturen im Frühjahr und Sommer erfolgte die Tierhaltung bei 10° C.

III. Methode

Untersuchung der zellulären Gefrierresistenz

Im Experiment sind für das Überleben von isolierten Geweben bei tiefen Temperaturen sowohl die Geschwindigkeit des Einfrierens und Auftauens als auch die Tiefe der Tempe-

ratur entscheidend, bei der das Gewebe eingefroren und in gefrorenem Zustand gehalten wird. Um eine möglichst einheitliche und vergleichbare quantitative Charakterisierung der zellulären Gefrierresistenz zu erreichen, wurde isoliertes Kiemengewebe (kleine, etwa 4 mm breite Randstücke) jeweils verschiedene Zeit der konstanten Temperatur von -10°C ausgesetzt. Diese Temperatur konnte im Kühlbad eines COLORA-Flüssigkeitskühlers mit einer Genauigkeit von $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten werden. Die zu untersuchenden Kiemenstücke wurden in einer kleinen Menge Versuchsmedium (etwa 0,5 ml) in verschlossenen dünnwandigen Plastikbechern (Durchmesser 4 cm, Höhe 7 cm) in die Kühlflüssigkeit hineingehängt. Schon nach 15–20 Sekunden war das Versuchsmedium jeweils gefroren. In geeigneten Zeitabständen wurden die Kunststoffbehälter dann aus dem Kühlbad herausgenommen und ihr Inhalt schnell (in etwa 15–20 Sekunden) aufgetaut. Anschließend wurde der Schädigungsgrad des Gewebes mikroskopisch bei 100 bis 120facher Vergrößerung und Zimmertemperatur von $18-20^{\circ}\text{C}$ beobachtet. Dabei erwies sich der Aktivitätszustand der terminalen Randcilien als ein gut verwertbares wichtiges Kriterium (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1

Bewertungsziffer für die zelluläre Aktivität	Aktivitätszustand der terminalen Randcilien
3	Praktisch alle terminalen Cilien schlagen mit unveränderter normaler Aktivität
2	Cilienschlag etwas vermindert, kann unregelmäßig sein
1,5	Cilienaktivität um 50% verringert
1	Cilienaktivität um mehr als 50% verringert
0,5	10–1% der Cilien schlagen noch deutlich
0	Cilienstillstand

Bei jeder Versuchsreihe wurden Kiemenstücke von 5–10 Tieren untersucht. Die korrespondierenden Einzelwerte der Beobachtungsreihen wurden dann zu Mittelwerten zusammengefaßt. Man kann auf diese Weise recht gut reproduzierbare Werte des Schädigungsgrades in Abhängigkeit von der Dauer der Kälteeinwirkung erhalten. (siehe Tabelle 2). Eine weitere mathematische Bearbeitung der Versuchsprotokolle wie Berechnung der Standardabweichungen und der mittleren Fehler der Mittelwerte hat nur bedingten Wert, da die Bewertungsziffern für den Schädigungsgrad der Gewebe oder die zelluläre Aktivität geschätzte Charakterisierungen darstellen.

IV. Ergebnisse

1. Artsspezifische Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz

a) Tiermaterial aus normalem Meerwasser (Salzgehalt etwa $30^{\circ}/_{00}\text{S}$)

Frostschäden sind in erster Linie die Folge von „Stresswirkungen“, die bei Geweben von empfindlicheren Organismen oft schon durch extrazelluläre, bei resistenteren Geweben mehr durch intrazelluläre Eisbildung hervorgerufen werden. Dabei spielt einerseits eine bei der Bildung von Eiskristallen eintretende Elektrolytanreicherung

Tabelle 2

Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* (Nordsee, 30‰ S) bei Kälteeinwirkung von -10°C (Dezember 1964)

Versuchsdauer (Minuten)	Cilienaktivität									
	Einzelwerte für Gewebe verschiedener Exemplare									Mittelwerte \pm Dispersion
45	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3 \pm 0
60	3	3	3	3	3	2	2	1,5		2,6 \pm 0,5
90	2	2	2	1,5	1,5	1	1	1		1,5 \pm 0,5
150	2	2	1,5	1,5	1,5	1,5	1	1		1,5 \pm 0,4
180	1,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,7 \pm 0,4
270	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0	0		0,6 \pm 0,3
300	1	1	0,5	0,5	0,5	0	0	0		0,4 \pm 0,4
330	0	0	0	0	0	0	0	0		0

(Die Mittelwerte aus dieser Tabelle sind in Abb. 1 dargestellt.)

und dadurch bedingte Dehydrierung des Protoplasmas sowie beim Auftauen einsetzende Rehydrierung eine wichtige Rolle. Andererseits sind aber auch die mechanischen Druckwirkungen, die von den Eiskristallen ausgehen können, sowie Druckänderungen beim Gefrieren und Auftauen nicht außer Acht zu lassen (vergl. LEVITT 1960, MERYMAN 1960). In vielen Fällen ist es schwierig, zu erkennen, welche der einzelnen obengenannten Komponenten welche Anteile der Frostschäden hervorrufen.

Will man die Frostschäden bei marinen Lamellibranchiern experimentell untersuchen, so ist dabei zu beachten, daß die Tiere sich bei ungünstigen Außenbedingungen durch Schalenschluß von der Außenwelt abkapseln und eine gewisse Wassermenge in der Mantelhöhle einschließen können. Die Temperaturerniedrigung im Innern größerer Muscheln mit größerem eingeschlossenen Wasservolumen erfolgt dann langsamer als bei kleinen Individuen. Dadurch wird die Überlebenszeit der Versuchstiere beeinflusst. Die Unterschiede in der Gefrierresistenz resistenter Arten wie *Mytilus edulis* und relativ empfindlicher Arten wie *Spisula solida* und *Abra alba* kommen wohl zum Teil auf diese Weise zustande (vergl. Tab. 3). Besonders in den Fällen, in denen sich die Resistenz der Gewebe weniger voneinander unterscheidet, kommt der Beeinflussung der Werte durch die Tiergröße größere Bedeutung zu, so bei *Scrobicularia plana* und *Cyprina islandica* aus der Kieler Förde. Auf jeden Fall lassen sich auf Grund vergleichender Messungen

Legenden zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 1)

Abb. 1: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes verschiedener Lamellibranchierarten aus Meerwasser von etwa 30‰ S bei der Temperatur von -10°C . Untersuchungszeitraum: Dezember 1964 bis Februar 1965. Die einzelnen Punkte sind Mittelwerte aus den Untersuchungen der Gewebestücke von jeweils 8–10 Versuchstieren.

Abb. 2: Vergleich der zellulären Gefrierresistenz verschiedener Lamellibranchierarten aus dem Nordseewatt im Winter (W) (Dezember 1964–Februar 1965) und im Sommer (S) (Anfang Juli 1965). Semilogarithmische Darstellung.

Artspezifische Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz

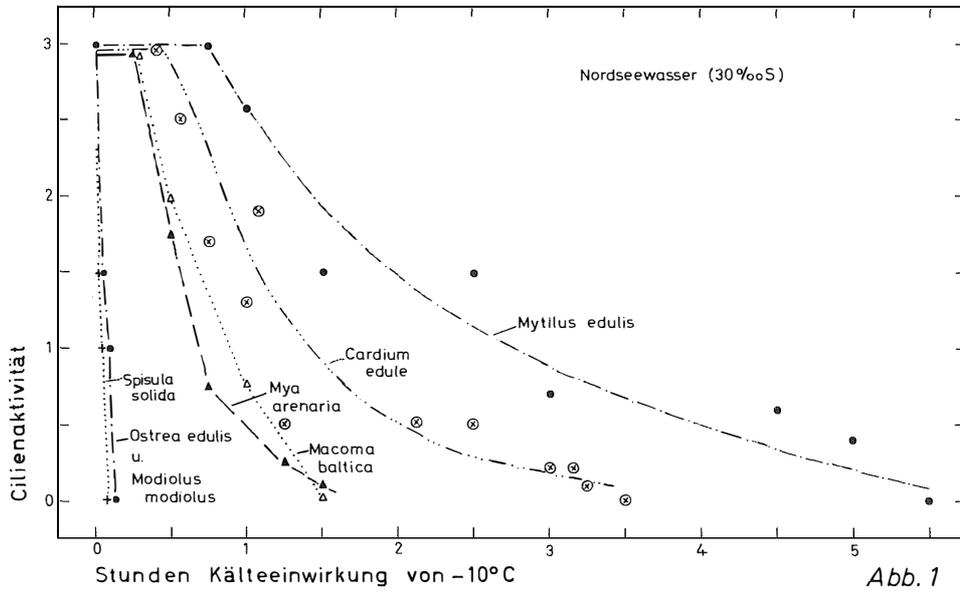


Abb. 1

Zelluläre Gefrierresistenz verschiedener Arten im Sommer (S) und im Winter (W)

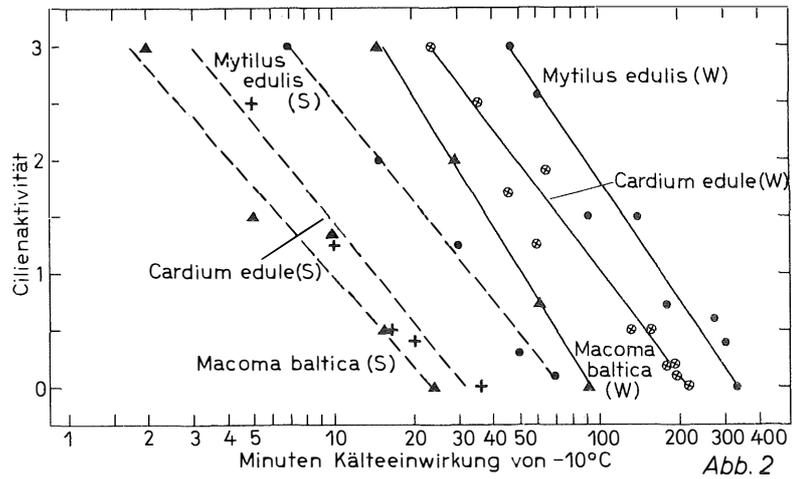
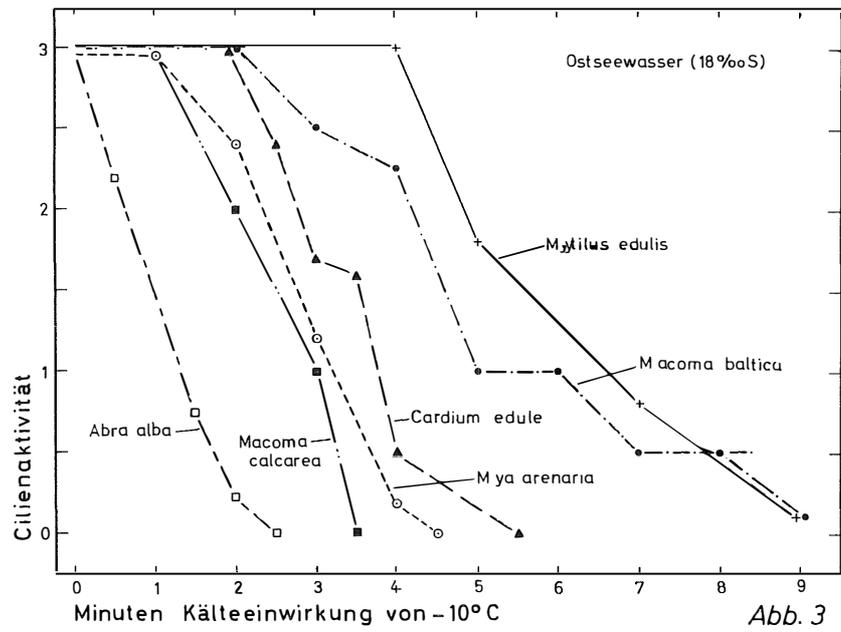


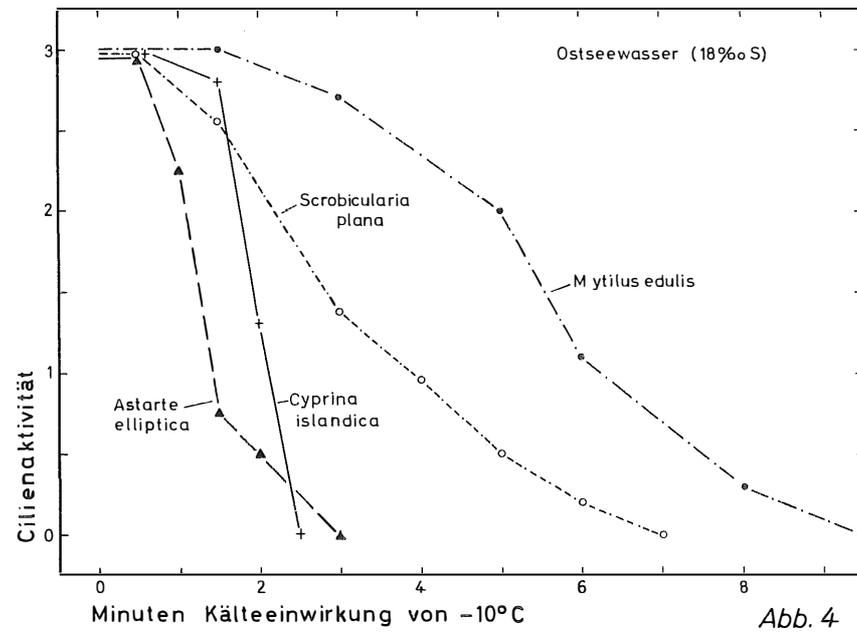
Abb. 2

Tafel 1 (zu H. Theede)

Artspezifische Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz



Artspezifische Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz



Tafel 2 (zu H. Theede)

Tabelle 3
Gefrierresistenz des Kiemengewebes bei Abkühlung ganzer trocken-
liegender Tiere (Lufttemperatur — 12° bis — 14° C)

Die Cilienaktivität wurde nach Erholung der Kiemenstücke bei Zimmertemperatur beobachtet.
Die Minutenzahlen geben die Gefrierdauer ganzer Tiere in Luft wieder.

Arten	Herkunft	Schalenlänge (cm)	Cilienaktivität		
			1,5	0,5	0
<i>Mytilus edulis</i>	Nordsee (30°/00 S)	4—5	240 Min.	500 Min.	660 Min.
<i>Spisula solida</i>	„	2—3	5 „	15 „	20 „
<i>Mytilus edulis</i>	Ostsee (15°/00 S)	4—5	100 Min.	180 Min.	240 Min.
<i>Cyprina islandica</i>	„	5—6	85 „	110 „	150 „
<i>Scrobicularia plana</i>	„	3—3,7	90 „	110 „	150 „
<i>Astarte borealis</i>	„	2,7—3,1	55 „	85 „	100 „
<i>Abra alba</i>	„	1,2—1,4	5 „	10 „	15 „

der Gefrierresistenz ganzer Tiere keine exakten Daten über die Stabilität der Zellstrukturen gegenüber den „Stresswirkungen“ des Gefrierens gewinnen. Untersucht man dagegen direkt isolierte Gewebe, so umgeht man diese Schwierigkeit.

Vergleicht man nun die bei der konstanten Temperatur von — 10° C zur gleichen Jahreszeit ermittelten Überlebenszeiten des isolierten Kiemengewebes verschiedener Muschelarten aus dem Nordseewatt miteinander (siehe Abb. 1), so fällt auf, daß diese bei der Miesmuschel *Mytilus edulis* am höchsten sind. Die Miesmuschel besitzt demnach die größte zelluläre Gefrierresistenz von diesen Arten. Das Ausfrieren wirkt erst mit zunehmender Dauer schädigend. Bis etwa 45 Minuten konnte das isolierte Gewebe bei — 10° C ohne äußerlich erkennbare Veränderungen gefroren sein. Mit weiter fortschreitender Zeit setzte zunehmende Schädigung des Gewebes ein. Die Aktivität der terminalen Cilien war nach etwa 2 Stunden auf die Hälfte reduziert. Nach 5,5 Stunden hörte der Cilienschlag ganz auf.

Die zelluläre Gefrierresistenz der Herzmuschel *Cardium edule* ist deutlich geringer als die der Miesmuschel. Einen völlig ungeschädigten Eindruck machte das isolierte Kiemengewebe noch nach 25 Minuten Aufenthalt in — 10° C. Vollständiger Stillstand des Cilienschlages wurde nach 3,5 Stunden Kälteeinwirkung beobachtet. Es deutet sich schon bei dem Vergleich dieser beiden Arten eine Beziehung zwischen der zellulären Gefrierresistenz und dem Vorkommen im Litoral an. Beide Muschelarten sind im flachen Wasser in Küstennähe recht häufig, doch lebt die Herzmuschel durch das Eingraben in den sandigen Boden etwas geschützter vor extremen Temperatureinwirkungen als die Miesmuschel, die periodisch bei Niedrigwasser im Winter kalten Lufttemperaturen direkt ausgesetzt sein kann.

Eine noch geringere zelluläre Toleranz gegenüber Gefrieren zeigt die Klaffmuschel *Mya arenaria*, die in der Gezeitenzone häufig 20—30 cm tief im Sand eingegraben und damit in vielen Fällen noch geschützter als die Herzmuschel lebt. Irreversible Zell-

Legenden zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 2)

Abb. 3 u. 4: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes verschiedener Lamellibranchierarten aus der Kieler Förde. Salzgehalt des Versuchsmediums etwa 18‰ S. Winter 1964/65.

schädigungen mit Stillstand der Cilien wurden bei dieser Art nach etwa 1,5 Stunden beobachtet.

Auch die „Rote Bohne“ *Macoma baltica* ist eine häufige Küstenform. Sie ist zwar in der Nordsee in etwas größeren Wassertiefen bis etwa 15 m häufig, kann aber vereinzelt auch im trockenfallenden Watt angetroffen werden. Sie stimmt in ihrer zellulären Gefrierresistenz etwa mit *Mya arenaria* überein.

Es schien nun von Interesse, zum Vergleich auch die zelluläre Gefrierresistenz einer Art heranzuziehen, die nicht in der oberen Gezeitenregion, sondern im etwas kühleren Tiefenwasser vorkommt, wo sie relativ geringere Temperaturschwankungen im Laufe des Jahres auszuhalten hat. Eine solche Art ist die Große Miesmuschel oder „Pferdemuschel“ *Modiolus modiolus*. Es ist auffallend, daß bei dieser Art die zelluläre Überlebensfähigkeit bei Gefrieren nicht mehr wie bisher im Bereich von Stunden liegt, sondern nur im Bereich weniger Minuten.

Tabelle 4

Artspezifische Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz bei Kälteeinwirkung von -10°C

(Untersuchungen im Winter 1964/65. Mittelwerte aus je 8 bis 10 Untersuchungen)

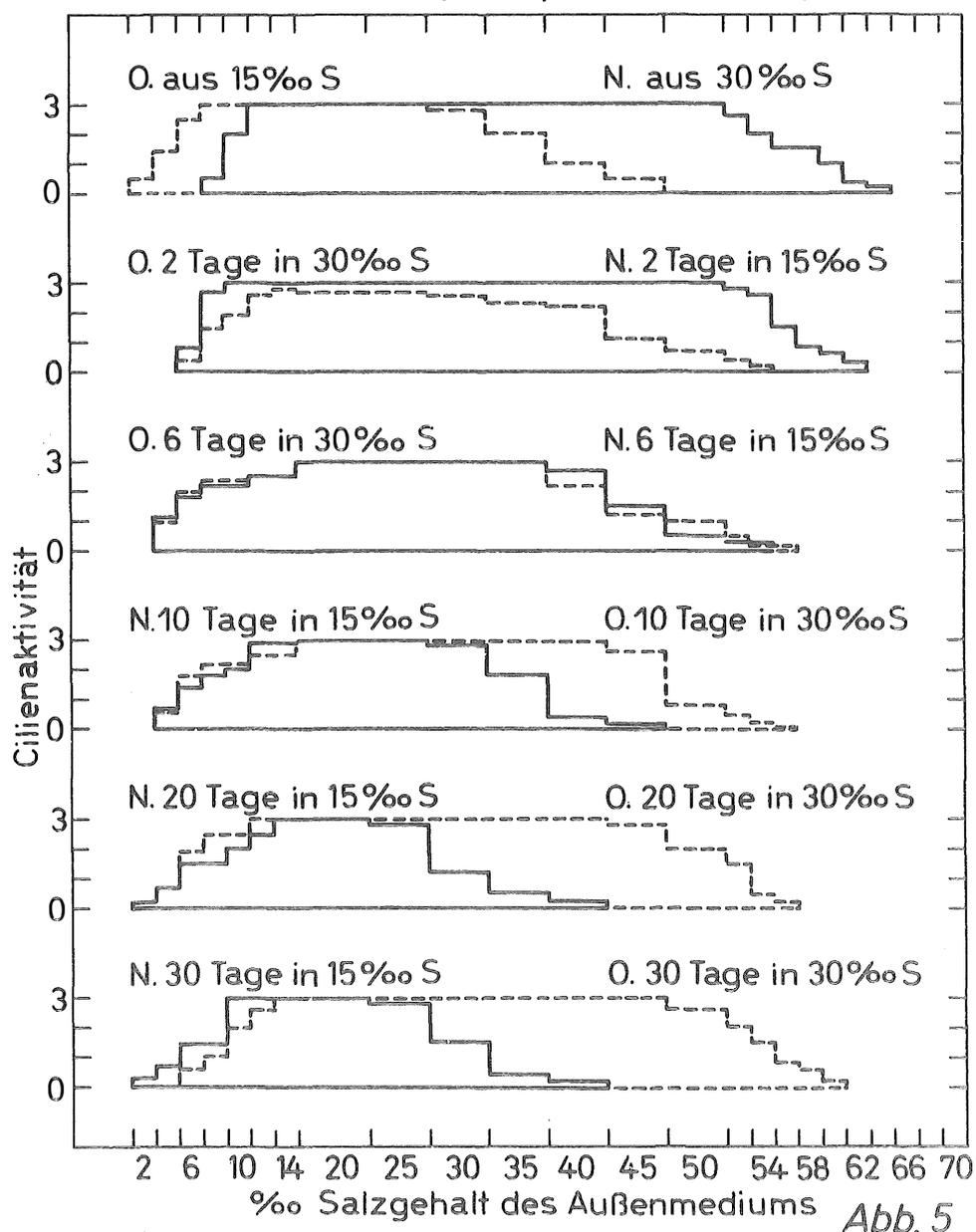
Arten	Cilienaktivität: 50%	Cilienstillstand
	beobachtet nach vorheriger Kälteeinwirkung (Min.)	beobachtet nach vorheriger Kälteeinwirkung (Min.)
a) Nordseewasser 30 ⁰ / ₀₀ S		
<i>Mytilus edulis</i>	120	330
<i>Cardium edule</i>	65	210
<i>Mya arenaria</i>	42	90
<i>Macoma baltica</i>	35	100
<i>Modiolus modiolus</i>	3,5	6
<i>Ostrea edulis</i>	3	5,5
<i>Spisula solida</i>	2	4
b) Ostseewasser 18 ⁰ / ₀₀ S		
<i>Mytilus edulis</i>	5,5	9
<i>Macoma baltica</i>	4,5	9
<i>Scrobicularia plana</i>	3	7
<i>Cardium edule</i>	3,5	5,5
<i>Mya arenaria</i>	2,75	4,5
<i>Macoma calcarea</i>	2,5	3,5
<i>Astarte elliptica</i>	1,25	3
<i>Cyprina islandica</i>	2	2,5
<i>Abra alba</i>	1	2,5

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 3)

Abb. 5: Zelluläre Salzgehaltsresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Nordsee (Salzgehalt etwa 30⁰/₀₀) nach verschiedener Anpassungsdauer der Versuchstiere an Brackwasser von 15⁰/₀₀ S und von *Mytilus edulis* aus der Ostsee (15⁰/₀₀ S) nach entsprechender Anpassung an Wasser von 30⁰/₀₀ S. Temperatur: 10° C. Beobachtung der osmotischen Resistenz 24 Stunden nach Überführung der isolierten Kiemestücke in verschiedene Salzgehaltsstufen. Mittelwerte von jeweils 10 Einzelbeobachtungen, März 1965. (Zur Herstellung der verschiedenen Seewasserkonzentrationen vgl. SCHLIEPER, FLÜGEL und THEEDE 1966).

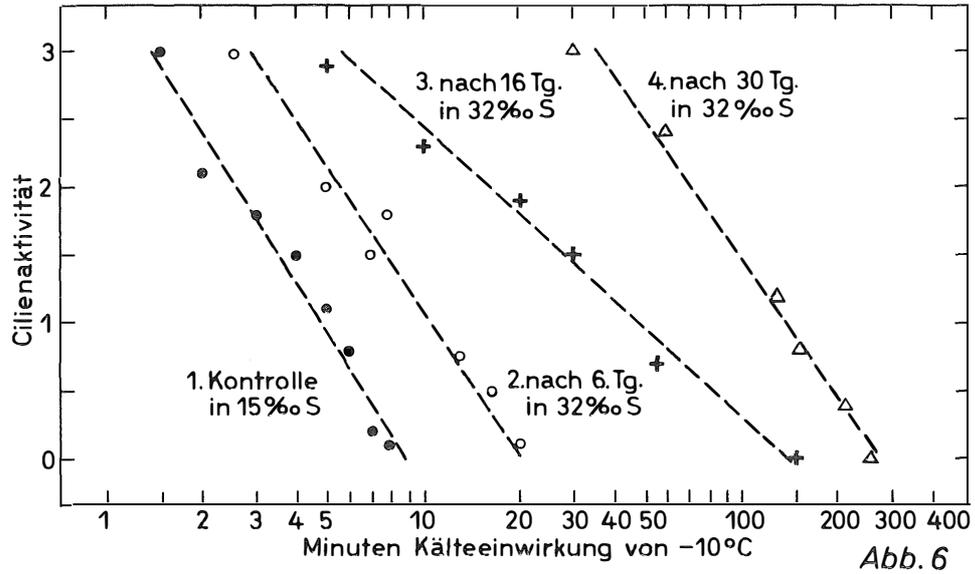
Zelluläre Salzgehaltsresistenz

O.=Ostsee-Mytilus, N.=Nordsee-Mytilus

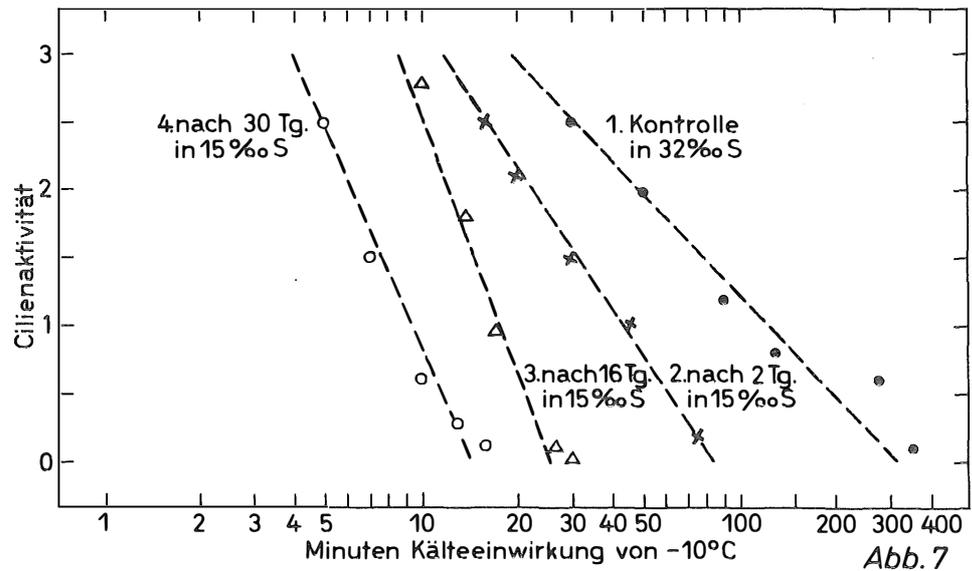


Tafel 3 (zu H. Theede)

Zelluläre Gefrierresistenz von *Mytilus edulis* (Ostsee, 15‰S)
nach Anpassung an 32‰S



Zelluläre Gefrierresistenz von *Mytilus edulis* (Nordsee, 30‰S)
nach Anpassung an 15‰S



Tafel 4 (zu H. Theede)

Auch die Gefrierresistenz der aus dem Limfjord stammenden boreal-mediterranen Auster *Ostrea edulis*, die als allgemein wärmeliebender als die anderen bisher untersuchten Arten angesehen werden kann, ist ähnlich gering. Sie kommt auch stets unterhalb der Gezeitenzone vor. Bei dem Kiemengewebe der Auster treten sichtbare Schädigungen dementsprechend schon auf, wenn die Kälteexposition bei -10°C länger als eine Minute dauert. Kein Cilienschlag wurde mehr beobachtet nach 5,5 Minuten.

Noch etwas geringer ist die Gefrierresistenz der im tiefen groben Sandboden der Nordsee lebenden *Spisula solida*. Irreversible Zellschäden mit Stillstand der Cilien traten schon nach 4 Minuten Kälteexposition auf.

Bei einigen Arten wurde die zelluläre Gefrierresistenz zum Vergleich mit den bisher nur im Winter ermittelten Werten auch im Sommer gemessen (s. Abb. 2). Zu dieser Jahreszeit ist sie bei allen untersuchten Arten eindeutig geringer.

Tabelle 5

Zelluläre Gefrierresistenz in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Außenmediums

Untersuchung isolierter Kiemestücke von 10 Individuen von *Mytilus edulis* (Ostsee, 21‰ S) nach je 15 Std. Vorbehandlung des Gewebes in Meerwasser verschiedenen Salzgehaltes.

Dauer des Gefrierens bei -10°C (Minuten)	Mittlere zelluläre Aktivität		
	nach Vorbehandlung mit 15‰ S	nach Vorbehandlung mit 21‰ S	nach Vorbehandlung mit 32‰ S
1	3	3	3
2	2,8	3	3
3	0,75	2,1	3
4	—	1	3
6	—	0,4	2,5
8	—	—	1,75
10	—	—	1
15	—	—	0,7
20	—	—	0,4
30	—	—	0,1

Legenden zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 4)

Abb. 6: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Ostsee (etwa 15‰ S) nach verschiedener Anpassungsdauer an Nordseewasser von 32‰ S bei 5°C . (Versuchszeitraum: März/April 1965).

Abb. 7: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Nordsee nach verschiedener Anpassungsdauer an Ostseewasser von 15‰ S bei 5°C . (März/April 1965).

b) Muscheln aus Brackwasser (Salzgehalt im Jahresmittel etwa 15⁰/₀₀ S)

Viele marine Evertebraten mit einem großen ökologischen Potential, die in der Gezeitenregion der Nordsee leben, kommen auch im Brackwasser der Ostsee vor. Von diesen wurden zum Vergleich verschiedene Arten aus der Kieler Förde untersucht (s. Abb. 3 und 4), wo sie an einen mittleren Salzgehalt von etwa 15⁰/₀₀ S angepaßt sind.

Zu den zellulär resistentesten Arten gehören auch hier *Mytilus edulis* und *Macoma baltica* (Überlebenszeiten bis etwa 9 Minuten). Am empfindlichsten gegenüber Gefrieren reagierte *Abra alba* (Überlebenszeit bis etwa 2,5 Minuten). Dazwischen liegen die Werte für *Scrobicularia plana*, *Cardium edule*, *Mya arenaria*, *Macoma calcarea*, *Cyprina islandica* und *Astarte elliptica*. Nach KÜHLMORGEN-HILLE 1963 konnte *Abra alba* in der Kieler Bucht in den Jahren vor dem Winter 1962/63 in einer Populationsdichte von etwa 6000 Exemplaren pro m² gefunden werden. Den kalten Winter 1962/63 überlebten weniger als 1 Prozent. Im Gegensatz dazu gehört *Macoma baltica* zu den wenigen Lamellibranchierarten, die den langen Eiswinter ohne oder nur mit geringen Schädigungen überstanden (vgl. für die Nordsee auch ZIEGELMEIER 1964).

2. Zelluläre Gefrierresistenz in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Außenmediums

Auffallend war bei den zuletzt geschilderten Versuchen, daß die zelluläre Gefrierresistenz bei Versuchstieren aus der Kieler Förde wesentlich niedriger ist als bei Exemplaren derselben Arten aus dem Wattenmeer der Nordsee (vergl. Tab. 4).

Wahrscheinlich wird, wenn diese marinen Arten im Brackwasser leben, die Stabilität lebensnotwendiger Protoplasmastrukturen und damit die Resistenz ihrer Zellen verringert. Dafür sprechen sowohl langfristige Anpassungsexperimente (vergl. Abb. 6 u. 7) als auch die Ergebnisse folgender kurzfristiger Versuche (Tab. 5): Von Miesmuscheln aus der Ostsee, die aus einem Fundortwasser von 21⁰/₀₀ Salzgehalt kamen, wurde isoliertes Kiemenepithel nach einem 15-stündigen Aufenthalt in verschiedenen Seewasserkonzentrationen (15⁰/₀₀, 21⁰/₀₀, 32⁰/₀₀ S) untersucht. Während die Gefrierresistenz bei dem verringerten Salzgehalt etwas abnahm, nahm sie in Wasser von 32⁰/₀₀ S innerhalb dieser Zeit wesentlich zu. Diese Zunahme ist aber geringer als nach langfristiger Anpassung ganzer Tiere an den gleichen Salzgehalt.

Da während des Gefriervorganges die osmotische Konzentration der verbleibenden Restflüssigkeit im Gewebe mit zunehmender Dauer stark zunimmt, könnte für das Überleben des Gewebes auch die Resistenz gegenüber Wasserentzug bzw. gegenüber einer Anreicherung von Elektrolyten mit von Bedeutung sein (vergl. LOVELOCK 1954). Wie nun aus den Versuchen von SCHLIEPER et al. (1956) und aus Abb. 5 (oben) hervorgeht, liegen bei den aus dem Brackwasser stammenden Muscheln die Resistenzgrenzen gegenüber Erhöhung des Salzgehaltes im Außenmedium wesentlich niedriger als bei denen aus normalem Meerwasser. Weitere Versuche zeigen nun, daß sowohl die zelluläre Salzgehaltresistenz als auch die Gefrierresistenz von Ostsee-Miesmuscheln durch langfristige 4—5 Wochen dauernde Anpassung fast auf den bei Nordsee-Exemplaren gefundenen Bereich gebracht werden kann (Abb. 6 und 7). Umgekehrt verringern sich der Bereich der Salzgehaltresistenz und die Gefrierresistenz der Nordseetiere nach Überführung in Ostseewasser sehr stark (Abb. 7). Diese Versuche machen wahrscheinlich, daß die bei den Muscheln aus der Nord- und Ostsee vorhandenen Unterschiede der zellulären Gefrierresistenz keineswegs auf genetischen Unterschieden beruhen, sondern durch phänotypische Anpassung an den verschiedenen Salzgehalt bedingt sind. Nach SCHLIEPER (1955) und ERMAN (1961) tritt im Laufe einer ähnlichen Anpassungsdauer auch eine Änderung der Stoffwechselgröße des gleichen Gewebes ein.

Tabelle 6

Zelluläre Salzgehaltsresistenz des isolierten Kiemenepithels verschiedener Lamellibranchierarten. Untersuchung der zellulären Aktivität nach 24 Stunden Aufbewahrung der Gewebestücke in verschieden konzentriertem Meerwasser bei 10° C. Mittelwerte aus je 10 Beobachtungen.

*: Herkunft Nordsee, etwa 30‰ S. **: Herkunft Ostsee, etwa 15‰ S.

Salzgehalt ‰ S	Zelluläre Aktivität							
	<i>Mytilus edulis</i> *	<i>Cardium edule</i> *	<i>Mya arenaria</i> *	<i>Spisula solida</i> *	<i>Mytilus edulis</i> **	<i>Scrobicularia plana</i> **	<i>Astarte borealis</i> **	<i>Abra alba</i> **
0	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	0,3	—	0,5	—	—	—
4	—	—	1	—	1,5	—	—	—
6	—	—	2	—	2,6	1,4	0,4	0,4
8	0,5	—	2,6	—	3	2	1,5	1
10	2	0,5	3	—	3	3	2,3	2
12	3	1,1	3	—	3	3	3	2,5
14	3	2,2	3	0,8	3	3	3	3
20	3	2,5	3	2	3	3	3	3
25	3	3	3	2,5	3	3	3	3
30	3	3	3	3	2,8	2,5	2,6	1,5
35	3	3	2,5	3	2	2	0,5	0,2
40	3	3	2,5	2	1	1,4	—	—
45	3	3	2	2,4	0,5	—	—	—
50	3	3	2,1	1,4	—	—	—	—
52	2,8	3	0,8	0,8	—	—	—	—
54	2	2,8	0,4	—	—	—	—	—
56	2	2	0,2	—	—	—	—	—
58	1,5	1	—	—	—	—	—	—
60	1	0,2	—	—	—	—	—	—
62	0,7	—	—	—	—	—	—	—
64	0,5	—	—	—	—	—	—	—
66	—	—	—	—	—	—	—	—

Zieht man zum Vergleich mit der Gefrierresistenz die Salzgehaltsresistenz des isolierten Kiemengewebes verschiedener Muschelarten heran (s. Tab. 6), so ergeben sich ebenfalls gewisse Beziehungen. Bei einer Reihe von Arten mit großer osmotischer Resistenzbreite ist parallel zur höheren artspezifischen Konzentrationsresistenz auch die zelluläre

Gefrierresistenz größer. Es handelt sich dabei um relativ euryöke Arten. Anders liegen die Verhältnisse bei der mehr stenöken Muschel *Spisula solida*. Sie hat eine relativ engere osmotische Resistenzbreite. Ihre zelluläre Resistenz gegenüber konzentriertem Seewasser ist aber relativ größer, als man auf Grund der geringen Gefrierresistenz erwarten würde. Dieses Ergebnis läßt erkennen, daß es sich bei den Beziehungen zwischen der zellulären Gefrierresistenz und der Resistenz gegenüber erhöhten Salzgehalten bei verschiedenen Arten nicht um eine starre Beziehung handelt. Das ist unter Berücksichtigung der neueren Auffassungen über die schädigenden Stresswirkungen des Gefrierens (vergl. LEVITT 1960, MERYMAN 1960) durchaus verständlich, da hier zusätzlich verschiedene Vorgänge beteiligt sind, die bei der Elektrolytresistenz keine Rolle spielen.

3. Veränderungen der zellulären Gefrierresistenz durch Vorbehandlung mit „Gefrierschutzmitteln“

Neben besonderen Methoden des Einfrierens und der Gefriertrocknung eröffnete auch die Anwendung sogenannter Gefrierschutzsubstanzen neue Möglichkeiten der Untersuchung der Lebenserscheinungen bei tiefen Temperaturen. Wie die folgenden Untersuchungen zeigen, lassen sich einige dieser Stoffe auch bei Geweben von marinen Wirbellosen erfolgreich anwenden.

Läßt man eine Glycerin-Konzentration von 0,7 Mol/l in Ostseewasser bei etwa 15° C 30 Minuten lang auf isoliertes Kiemengewebe von *Mytilus edulis* aus der Ostsee einwirken, so wird dadurch die Gefrierresistenz, gemessen an der Überlebensdauer bei Frosteinwirkung von -10° C, beträchtlich gesteigert. Sie ist dann fast so groß wie im Winter bei Exemplaren derselben Art aus der Nordsee. Niedrigere Glycerinkonzentrationen haben bei gleicher Einwirkungsdauer geringere Effekte (vergl. Abb. 8). Höhere Glycerinkonzentrationen (z. B. 1 Mol/l) wirken sich unter diesen Bedingungen bereits schädigend aus.

Auch die Gefrierresistenz des Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Nordsee kann durch Zusatz von Glycerin zum Außenmedium (Nordseewasser, 32‰ S) erhöht werden. Zusatz von 0,5 Mol/l Glycerin zu Seewasser von 32‰ S erhöht nach 30 Minuten Vorbehandlungsdauer die Überlebenszeit des Gewebes bei -10° C auf etwa den doppelten Wert (vergl. Abb. 9).

Die Bedeutung der Einwirkungsdauer bei gleicher Konzentration der Gefrierschutzsubstanz im Außenmedium geht aus den in Abb. 10 dargestellten Versuchsergebnissen hervor. Nach 15-stündiger Vorbehandlung bei 15° C mit einer Glucoselösung von 0,5 Mol/l ist das Gewebe von *Mytilus* aus der Ostsee resistenter als nach kurzfristiger Vorbehandlung.

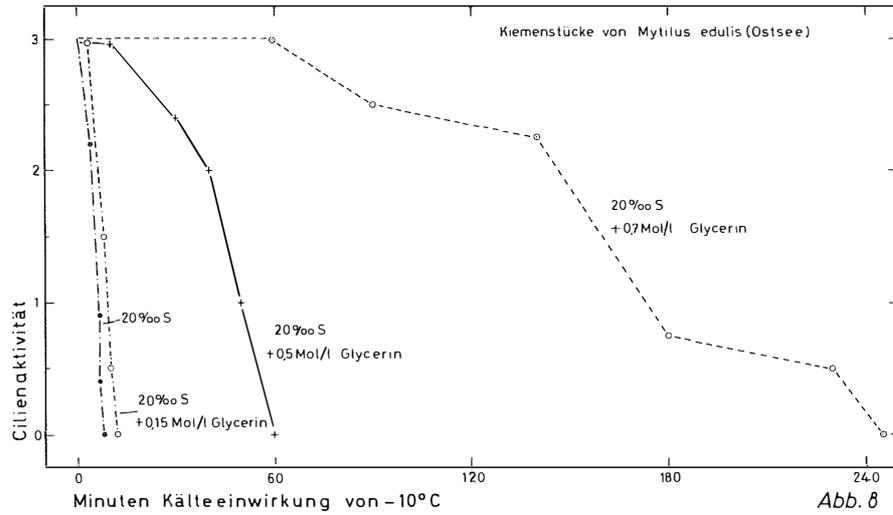
Weiterhin wurde der Einfluß jeweils gleicher Konzentration (0,5 Mol/l) verschiedener Gefrierschutzsubstanzen in Ostseewasser (15‰ S) miteinander verglichen. Die Vorbehandlungsdauer bei den Gefrierversuchen betrug in diesem Fall einheitlich 30 Minuten bei einer Temperatur von 15° C. Die in Abb. 11 dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, daß die Schutzwirkung der relativ großmolekularen Saccharose (Mol. Gew. 342,30) wesentlich geringer ist als z. B. die der kleineren Glucosemoleküle (Mol. Gew. 180,16) und daß diese wiederum geringer ist als die des Glycerins (Mol. Gew. 92,10)

Legenden zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 5)

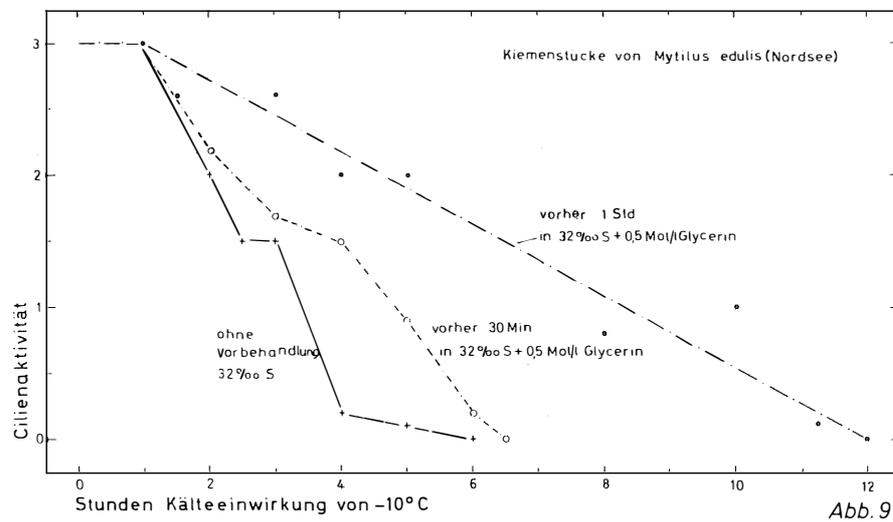
Abb. 8: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Ostsee (20‰ S) nach 30 Min. Vorbehandlung der Gewebestücke mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen in Seewasser.

Abb. 9: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Nordsee (32‰ S) nach 30 Minuten oder 1 Stunde Vorbehandlung mit 0,5 Mol/l Glycerin in Nordseewasser.

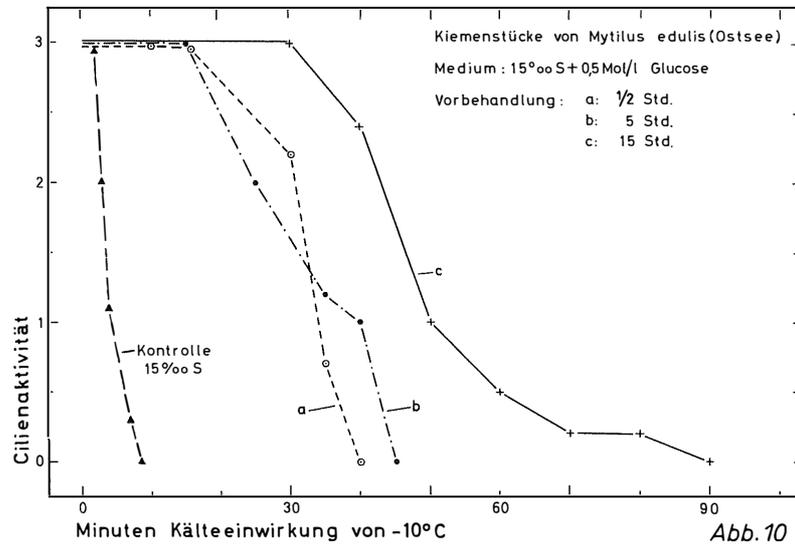
Zelluläre Gefrierresistenz in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration im Außenmedium



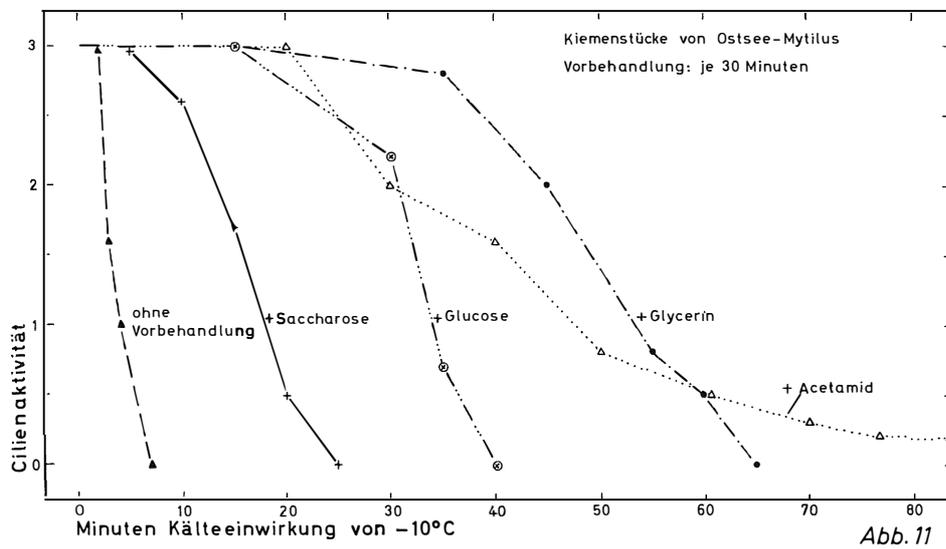
Zelluläre Gefrierresistenz in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbehandlung mit Glycerin



Zelluläre Gefrierresistenz bei Glucosezusatz zum Außenmedium
in Abhängigkeit von der Dauer der Vorbehandlung



Zelluläre Gefrierresistenz nach Zusatz gleicher Konzentration (0,5 Mol/l)
Gefrierschutzsubstanz zum Außenmedium (15‰ S)



Tafel 6 (zu H. Theede)

bzw. Acetamids (Mol. Gew. 59,07). Vergleicht man die Wirkung des Glycerins und Acetamids, aufgrund des Verlaufes des Schädigungsgrades des Gewebes nach zunehmender Dauer der Kälteeinwirkung genauer miteinander, so ergibt sich, daß Acetamid sich ungünstiger auf den Aktivitätszustand des Gewebes auswirkt, wenn auch das Gewebe etwas länger mit stark verringerter Aktivität überlebt als nach entsprechender Vorbehandlung mit Glycerin. Diese Erscheinung ist wahrscheinlich ein Ausdruck für die geringere Verträglichkeit des Acetamids.

V. Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit stellen einen ersten Versuch dar, die zelluläre Resistenz mariner Lamellibranchier gegenüber Temperaturen unter dem Nullpunkt experimentell zu messen. Die Beobachtungen der Gefrierresistenz isolierter Kiemengewebe verschiedener Arten bei -10°C ergeben gut reproduzierbare Werte. Sie lassen charakteristische Beziehungen zum ökologischen Potential der untersuchten Arten erkennen und können deshalb neben anderen Merkmalen, z. B. der zellulären Hitzeresistenz, mit zur ökologisch-physiologischen Charakterisierung der Arten herangezogen werden. So zeigen die untersuchten Arten aus dem Wattengebiet der Nordsee eine umso größere zelluläre Gefrierresistenz, je stärker sie im Litoral exponiert vorkommen. Dagegen haben Arten, die auf größere Wassertiefen beschränkt sind, und im Sediment geschützt lebende Formen, eine wesentlich geringere Gefrierresistenz.

Bei seinen Freilandbeobachtungen in der Gezeitenregion Südenglands nach dem Winter 1962/63 stellte CRISP (1964) fest, daß die Vernichtung durch die Einwirkung des Eises bei *Mytilus edulis* etwa 0—30%, bei *Cardium edule* 50—60% und bei *Ostrea edulis* etwa 50—100% betrug. Unterhalb der Gezeitenregion, wo kein Eis auftrat, konnten die resistenteren der erwähnten Arten wesentlich besser überleben. Empfindlichere Arten, deren Verbreitungsgebiet sich einerseits mehr auf südlichere Gewässer oder andererseits mehr auf tiefere Wasserschichten mit gleichmäßigeren Wassertemperaturen erstreckt, zeigten auch hier hohe Absterberaten. Dieses Ergebnis läßt sich nun auf Grund der von mir gemessenen verschiedenen artspezifischen zellulären Gefrierresistenzen deuten.

Bei einem Vergleich der zellulären Gefrierresistenz von Arten aus der Nord- und Ostsee fällt auf, daß bei den Exemplaren aus der Ostsee in allen bisher untersuchten Fällen die zelluläre Gefrierresistenz wesentlich geringer ist. Auch Analysen anderer physiologischer Eigenschaften von Exemplaren jeweils derselben Art aus Meer- und Brackwasser ergaben, daß bei Versuchstieren aus dem Brackwasser die zellulären Resistenzgrenzen gegenüber verschiedenen abiotischen Umweltfaktoren wesentlich enger sind. So ist der Bereich der zellulären Salzgehaltsresistenz bei Exemplaren aus dem Brackwasser einerseits in den Bereich niedriger Salzgehalte verschoben (vergl. SCHLIEPER et al. 1956, RESHÖFT 1961), andererseits ist die gesamte Resistenzbreite geringer als bei Exemplaren aus normalem Meerwasser. Auch die zelluläre Resistenz gegenüber Hitze (SCHLIEPER 1956) und hohem hydrostatischen Druck (PONAT, unveröffentlichte Ergebnisse) ist,

Legenden zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 6)

- Abb. 10: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Ostsee nach verschiedener Vorbehandlungsdauer der Gewebestücke mit einem Gemisch aus Seewasser von 15‰ S + 0,5 Mol/l Glucose.
- Abb. 11: Zelluläre Gefrierresistenz des isolierten Kiemengewebes von *Mytilus edulis* aus der Ostsee nach gleicher Vorbehandlungsdauer (30 Min.) bei 15°C mit jeweils einer Mischung aus Seewasser von 15‰ S und 0,5 Mol/l verschiedener „Gefrierschutzsubstanzen“: Saccharose, Glucose, Glycerin, Acetamid.

abgesehen von einigen jahreszeitlichen Schwankungen, insbesondere während der Reproduktionsphasen, bei Brackwassertieren erniedrigt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Erniedrigung der zellulären Gefrierresistenz im Brackwasser zusammenhängt mit einer allgemeinen unspezifischen Resistenzerniedrigung. Es ist wahrscheinlich, daß durch Veränderung des Salzgehaltes die zwischenmolekularen Kräfte im makromolekularen Bereich, die für die strukturelle Stabilität des Protoplasmas verantwortlich sind, verändert werden. Diese zellulären Umstellungen können auch bei adulten Tieren im Experiment im Laufe eines mehrere Wochen dauernden Anpassungsprozesses nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen müssen noch zeigen, welche Komponenten des Seewassers wirksam sind.

Ordnet man die bisher untersuchten Arten aus dem Nordseewatt nach der Größe ihrer Gefrierresistenz, so ergibt sich: *Mytilus* > *Cardium* > *Mya* \approx *Macoma*, während sich zur gleichen Jahreszeit für die Exemplare aus der Kieler Förde die Reihenfolge *Mytilus* \approx *Macoma* > *Cardium* > *Mya* ergibt. Die Erklärung dafür, daß sich bei den Muscheln aus der Ostsee die Reihenfolge in der Größe der Gefrierresistenz ändert, ist vielleicht in dem verschiedenen Grad der Euryhalinität der Tiere zu sehen. *Macoma baltica* geht am weitesten ins Brackwasser hinein (nach VÄLIKANGAS 1933: im Finnischen Meerbusen bis etwa 3‰ S). Die anderen Arten finden schon in höheren Salzgehalten ihre Verbreitungsgrenze (nach VÄLIKANGAS: *Mytilus* bei 4‰ S, *Mya* bei 5‰ S; nach JÄCKEL 1950: *Mya* in der Schlei bei 3,7–4‰ S). Auch neuere Untersuchungen von LASSIG (1965) weisen in diese Richtung. Wahrscheinlich wird also deshalb die Stabilität des Gewebes von *Macoma* bei dem mittleren Salzgehalt, wie er in der Kieler Förde herrscht, etwas weniger herabgesetzt als die von *Mytilus*. Im gleichen Sinne wäre dann auch wohl die Verminderung des Unterschiedes in der Gefrierresistenz von *Cardium* und *Mya* zu verstehen, denn *Mya arenaria* erweist sich auch im Experiment als wesentlich euryhaliner als *Cardium edule* (vergl. Tab. 6).

Schon seit langem (vergl. LUYET and GEHENIO 1938) ist bekannt, daß man mit verschiedenen organischen Substanzen, insbesondere mit Glycerin, die Überlebensfähigkeit von Spermien und Eizellen verschiedener Wirbeltiere bei tiefen Temperaturen beträchtlich erhöhen kann. Der Mechanismus der Schutzwirkung ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Vorstellungen darüber befinden sich noch in der Diskussion. Nach älteren Ansichten von LUYET und GEHENIO (1940) könnte die schützende Wirkung des Glycerins darin bestehen, daß es einen Teil des freien Gewebewassers bindet, so daß intrazellulär weniger Eis gebildet werden kann. LOVELOCK (1953, 1954) versucht, den Wirkungsmechanismus der Gefrierschutzsubstanzen dadurch zu erklären, daß die Anwesenheit dieser Stoffe in den Zellen die während der Eisbildung eintretende Erhöhung der intrazellulären Elektrolytkonzentration verringert. Der geringere Anstieg des Gehaltes an Elektrolyten reicht nach LOVELOCK (1954) aus, um die durch Glycerinzusatz bei roten Blutkörperchen des Menschen erreichte Schutzwirkung zu erklären. Wahrscheinlich wird auch die intrazelluläre Eisbildung verzögert (TAYLOR and GERSTNER 1955) und die Form der Eiskristalle beeinflußt (LUYET 1960). SHERMAN (1963) möchte die Schutzwirkung des Glycerins bei Spermatozoen von Bullen und bei unbefruchteten Mäuseeiern in erster Linie durch eine gewisse Dehydrierung der Zellen deuten, die bei extrazellulärer Gegenwart von Glycerin auftritt.

Unter den poikilothermen Tieren, die Frostperioden lebend überdauern können, ist das natürliche Vorhandensein von „Frostschutzsubstanzen“ bei einigen Insekten (WYATT and KALF 1956, SALT 1957) und einigen arktischen Fischen (SCHOLANDER, VAN DAM, KANWISHER, HAMMEL and GORDON 1957; GORDON, AMDUR and SCHOLANDER 1962) nachgewiesen worden. Bei wirbellosen Meerestieren ist derartige bisher nicht untersucht worden. Im Experiment wirkt sich aber auch bei Geweben von Muscheln die Vor-

behandlung mit „Gefrierschutzsubstanzen“ erhöhend auf die zelluläre Gefrierresistenz aus. Bei kurzer Einwirkungsdauer vor dem Gefrieren (30 Minuten bei 15° C) nimmt dabei die schützende Wirkung in der Reihe Saccharose, Glucose, Glycerin, Acetamid mit abnehmendem Molekulargewicht der zugefügten Substanz zu, wobei zu berücksichtigen ist, daß durch Acetamid das relativ lange Überleben der Gewebestücke nur auf einem geringen Aktivitätsniveau erreicht wird. Diese Erscheinung und die Beobachtung, daß neben der Konzentration der Substanzen auch deren Einwirkungs- dauer die Überlebensfähigkeit des untersuchten Gewebes beeinflußt, sprechen dafür, daß eine gewisse Menge der Gefrierschutzsubstanz zur Entfaltung der Schutzwirkung in das Gewebe eindringen muß. Andererseits spielt für die Wirksamkeit der Substanzen auch eine Rolle, wie resistent das jeweilige Gewebe gegenüber höheren Konzentrationen dieser Stoffe ist. So ist zu erwarten, daß sich hinsichtlich der optimalen Dosis einer Gefrierschutzsubstanz als auch bezüglich der optimalen Einwirkungsdauer für Gewebe von verschiedenen Arten Unterschiede ergeben.

Literaturverzeichnis

- ALEXANDROV, V. Y. (1964): Cytophysiological and cytoecological investigations of resistance of plant cells toward the action of high and low temperature. *Quart. Rev. Biol.* 39, No 1, 35—77. — BÄHR, K. (1950): Das Verhalten der Miesmuschel (*Mytilus edulis* L.) bei Frosteinwirkung und Wasserentzug. *Arch. Fisch. Wiss.* 2, 135—144. — BLEGVAD, H. (1929): Mortality among animals of the littoral region in ice winters. *Rep. Dan. Biol. Stat.* 35, 49—62. — BRONGERSMA-SANDERS, M. (1957): Mass mortality in the sea. *Geol. Soc. Am. Mem.* 67, 941—1010. — CRISP, D. J. (1964): The effects of the winter of 1962/63 on the British marine fauna. — ERMAN, P. (1961): Atmungsmessungen an Geweben und Gewebekomponenten der Miesmuschel (*Mytilus edulis* L.) aus Brack- und Meerwasser. *Kieler Meeresf.* 17, 176—189. — GORDON, M. S., AMDUR, B. H. and SCHOLANDER, P. F. (1962): Freezing resistance in some northern fishes. *Biol. Bull. Vol.* 122, 52—62. — JÄCKEL, S. jun. (1950): Die Molluskenfauna der Schlei. *Arch. Hydrobiol.* 44, 214—270. — KANWISHER, J. W. (1955): Freezing in inter-tidal animals. *Biol. Bull. Woods Hole*, 109, 56—63. — KANWISHER, J. W. (1959): Histology and metabolism of frozen inter-tidal animals. *Biol. Bull.* 116, 258—264. — KINNE, O. (1963): The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. I. Temperature. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 1, 301—340. — KÜHLMORGEN-HILLE, G. (1963): The effect of the severe winter 1962/63 on the bottom fauna of the Kiel Bay. *Annales Biologiques*, 20, S. 98. — LASSIG, J. (1965): The distribution of marine and brackishwater lamellibranchs in the northern Baltic area. *Commentationes Biologicae*. (Im Druck). — LEVITT, J. (1958): Frost, drought and heat resistance. *Protoplasmatologia* 8, Heft 6, 87 S., Springer-Verlag, Wien. — LEVITT, J. (1960): Freezing injury of plant tissue. *Ann. New York Acad. Sci.* 85, 570—575. — LOVELOCK, J. E. (1954): The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem. Journ.* 56, 265—270. — LUYET, B. J. and GEHENIO, P. M. (1938): The lower limit of vital temperatures. *Biodynamica* 33, 1—92. — LUYET, B. J. and GEHENIO, P. M. (1940): Life and death at low temperatures. *Biodynamica*, 341 S., Normandy, Miss., USA. — LUYET, B. (1960): On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures. *Ann. New York Acad. Sci.* 85, 549—569. — MERYMAN, H. T. (1956): Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science* 124, 515—521. — MERYMAN, H. T. (1960): General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. *Ann. New York Acad. Sci.* 85, 503—509. — RĚSHÖFT, K. (1961): Untersuchungen zur zellulären osmotischen und thermischen Resistenz verschiedener Lamellibranchier der deutschen Küstengewässer. *Kieler Meeresf.* 17, 65—84. — SALT, R. W. (1957): Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. *Can. Entomologist*, 89, 491—494. — SCHLIEPER, C. (1955): Über die physiologischen Wirkungen des Brackwassers. (Nach Versuchen an der Miesmuschel *Mytilus edulis*). *Kieler Meeresf.* 11, 22—33. — SCHLIEPER, C. und KOWALSKI, R. (1956): Über den Einfluß des Mediums auf die thermische und osmotische Resistenz des Kiemengewebes der Miesmuschel *Mytilus edulis*. *Kieler Meeresf.* 12, 37—45. — SCHLIEPER, C. (1964): Cellular ecological adaptations and reactions demonstrated at surviving gill tissues of bivalves. *Proceeding of the Internat. Symposium Cytoecology*, Leningrad 1963, pp. 129—135. (In Russian). — SCHLIEPER, C. (1965): Untersuchungen zur ökologischen Zellphysiologie mariner Bodenevertebraten. *Verhandl. Deutsch. Zoolog. Gesellschaft im Juni 1965 in Jena*. Im Druck. — SCHLIEPER, C., FLÜGEL, H. and RUDOLF, J. (1960): Temperature

and salinity relationships in marine bottom invertebrates. *Experientia* **16**, 470—477. — SCHLIEPER, C., FLÜGEL, H. und THEEDE, H. (1966): Comparative investigations on ecological cellphysiology of marine temperate and tropical bottom invertebrates. *Limnology and Oceanography*. (In Vorbereitung). — SHERMAN, J. K. (1963): Questionable protection by intracellular glycerol during freezing and thawing. *J. cell. comp. Physiol.* **61**, 67—83. — SCHOLANDER, P. F., VAN DAM, L., KANWISHER, J., HAMMEL, T., and GORDON, M. S. (1957): Supercooling and osmoregulation in arctic fish. *J. Cell. Comp. Physiol.* **49**, 5—24. — SMITH, A. U. (1958): The resistance of animals to cooling and freezing. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* **33**, 197—253. — TAYLOR, A. C. and GERSTNER, R. (1955): Tissue survival after exposure to low temperatures and the effectiveness of protective pretreatments. *J. Cell. Comp. Physiol.* **46**. — TAYLOR, A. C. (1960): The physical state transition in the freezing of living cells. *Ann. New York Acad. Sci.* **85**, 595—609. — TIEDTKE, B. (1964): Über die ökologische Bedeutung eines extrem kalten Winters für die eulitorale Hartbodenfauna der Kieler Förde. *Schr. Naturw. Ver. Schlesw.-Holst.* **35**, 33—60. — USHAKOV, B. (1964): Thermostability of cells and proteins of poikilotherms and its significance in speciation. *Physiol. Rev.* **44**. — VÄLIKANGAS, I. (1933): Über die Biologie der Ostsee als Brackwassergebiet. *Verh. int. Ver. Limnol.* **6**, 62—112. — WOOD, T. H. (1956): Lethal effects of high and low temperatures on unicellular organisms. *Adv. biol. med. Physics*, **4**, 119—165. — WYATT, G. R. and KALF, G. F. (1956): Organic components of insect hemolymph. *Proc. Entomol. Congr., Montreal*. — ZIEGELMEIER, E. (1964): Einwirkungen des kalten Winters 1962/63 auf das Makrobenthos im Ostteil der Deutschen Bucht. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* **10**, 276—282.