

BERICHTE
aus dem
INSTITUT FÜR MEERESKUNDE
an der
CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

**ÖKOPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN
MACOMA BALTHICA (BIVALVIA) UND *CYPRIDEIS TOROSA*
(OSTRACODA) ÜBER ANPASSUNGEN AN DEN
UMWELTFAKTOR SCHWEFELWASSERSTOFF**

Nr. 289
1997

Andreas Jahn

DOI 10.329/IFM_BER_289



Kopien dieses Berichtes können bezogen werden durch:

Dr. Andreas Jahn
Institut für Meereskunde
an der Universität Kiel
Abt. Meereszoologie
Düsternbrooker Weg 20
D-24105 Kiel

ISSN 0341-8561

Die vorliegende Arbeit wurde 1996 im Rahmen einer Dissertation am Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen angefertigt.

Danksagung

Die experimentelle Arbeit wurde in dem Arbeitskreis Meereszoologie der Universität Bremen in Bremerhaven begonnen und im Institut für Meereskunde an der Universität Kiel vollendet.

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Theede (vormals Universität Bremen, jetzt IfM Kiel), für die Betreuung dieser Arbeit. Durch seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie sein Interesse und die Unterstützung förderte er diese Arbeit wesentlich.

Herr Prof. Dr. H.-O. Pörtner (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven) erklärte sich freundlicherweise bereit, ein Gutachten zu erstellen. Ihm und Dr. Doris Abele-Oeschger möchte ich auch für die Ermöglichung von HPLC-Messungen danken.

Ohne die Mitwirkung anderer Personen, vor allem aus dem DYSMON-Projekt, wäre die praktische Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. So erfolgten die Experimente mit dem Ostracoden *Cyprideis torosa* in Zusammenarbeit mit Inez Gamenick (Universität Hamburg). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen fertigte Dr. Reinhard Windoffer (Universität Hamburg) an. Aber auch den anderen "DYSMONiden" danke ich für die Zusammenarbeit, vor allem bei den vielen Probenahmen auf Hiddensee und in Boiensdorf. Die Experimente mit den Plattmuschelpopulationen aus Danzig wurden zusammen mit Urszula Janas (Universität Danzig) durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei ihr und Frau Prof. Dr. A. Szaniawska auch für ihre Gastfreundschaft in Danzig bedanken. Wichtige Hinweise zur Schwefelanalytik erhielt ich von Dorte Nielsen (Universität Kopenhagen). Für die Übersetzung der wesentlichen Passagen ihrer Diplomarbeit aus dem Dänischen danke ich Torsten Reincke.

Die gute Atmosphäre im ehemaligen Arbeitskreis Meereszoologie in Bremerhaven hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt hier Petra Wencke für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft. Mein Wechsel nach Kiel wurde mir durch die freundliche Aufnahme in der Abteilung Meereszoologie erleichtert. Insbesondere Ulrich Fiedler und Stefan Zimmermann halfen mir, die ersten organisatorischen Schwierigkeiten zu überwinden. Durch die Arbeit an zwei verschiedenen Städten war ich auf Übernachtungsmöglichkeiten angewiesen. Für ihre ständige Gastfreundschaft danke ich daher Ulrike Junghans, Regina Müller und Claudia Oeschger in Kiel sowie Tanja Buchner und Katja Tschischka in Bremerhaven.

Herrn Kapitän Ohl und der Besatzung des Forschungskutters "Littorina" danke ich für die gute Zusammenarbeit während der zahlreichen Ausfahrten. Für die vielen helfenden Hände an Bord seien hier nur genannt Andreas Antonijević, Claudia Bittkau, Ulrich Fiedler, Renate Gründling, Ulrike Junghans, Christoph Suppes, Katja Tschischka, Petra Wencke, Fritz Winterberg und vor allem Regina Müller, die fast bei jeder Ausfahrt dabei war.

Besonderen Dank schulde ich auch Dr. Rolf Oeschger, Katja Tschischka und Stefan Zimmermann für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen, die mir wichtige Denkanstöße gaben.

Finanziell wurde die vorliegende Arbeit im Rahmen der BMBF-Verbundprojekte DYSMON I und II ("Dynamik in Sulfid- und Methanbiotopen der Ost- und Nordsee"; Förderkennzeichen 03F0045A und 03F0123D) sowie der Deutsch-Polnischen Zusammenarbeit in Wissenschaft und Technik (WTZ-Projekt X087.1) gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Einleitung	9
Material und Methoden	17
1 Versuchstiere	17
2 Abiotische Faktoren der Habitate	22
3 Experimentelle Inkubationen	24
3.1 Hypoxische Inkubationen	24
3.2 Oxische Inkubationen	25
3.3 Abiotische Parameter der Inkubationen	27
3.3.1 pH-Wert	27
3.3.2 Sulfid	27
3.3.3 Sauerstoff	29
4 Toleranzversuche	31
5 Chemische Analysen im Gewebe der Versuchstiere	31
5.1 Reduzierte Schwefelkomponenten	31
5.2 Elementarer Schwefel	35
5.3 Succinat	37
5.4 Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	38
5.5 Katalase	39
5.6 Malatdehydrogenase	42
5.7 Glutamatdehydrogenase	43
5.8 Protein	43
6 Apparenter Diffusionskoeffizient und apparente Entgiftungskonstante für Schwefelwasserstoff	43
6.1 Apparenter Diffusionskoeffizient	43
6.2 Apparente Entgiftungskonstante	48
7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	50
8 Statistische Auswertung	50

Ergebnisse	51
1 <i>Macoma balthica</i>	51
1.1 Abiotische Faktoren der Habitate	51
1.2 Toleranzversuche	53
1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	57
1.4 Schwefelkomponenten	62
1.5 Apparenter Diffusionskoeffizient und apparente Entgiftungskonstante für Schwefelwasserstoff	69
1.6 Größenabhängigkeit der Schwefelwasserstoffentgiftung	71
1.7 Cytochrom-c-Oxidase	73
1.8 Katalase	76
1.9 Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase	77
1.10 Anaerober Stoffwechsel	77
2 <i>Cyprideis torosa</i>	81
2.1 Toleranzversuche	81
2.2 Schwefelkomponenten	82
2.3 Beeinflussung durch Bakterienbesiedlung	84
2.4 Erholungsversuche	86
2.5 Schalenmasse und Wassergehalt	87
2.6 Apparenter Diffusionskoeffizient für Schwefelwasserstoff	88
2.7 Anaerober Stoffwechsel	88
Diskussion	91
1 Sulfidbelastung der untersuchten Habitate	91
2 Sulfidtoleranz	92
3 Sulfidoxidation	96
4 Geschwindigkeit von Sulfiddiffusion und -entgiftung	98
5 Sulfidfällung	102
6 Inhibition von Enzymen	105
7 Anaerober Stoffwechsel	107
8 Besonderheiten bei <i>Cyprideis torosa</i>	110
9 Ausblick	111
Literatur	113
Summary	125
List of figures and tables	127

Zusammenfassung

Marine Benthosarten aus sulfidischen Habitaten weisen eine artspezifisch unterschiedliche Toleranz gegenüber Schwefelwasserstoff auf. Bei Verfügbarkeit von Sauerstoff sind sie in unterschiedlichem Maße in der Lage, eingedrungenen Schwefelwasserstoff zu Thiosulfat zu oxidieren und damit zu entgiften. Die Bildung von Sulfit und Elementarschwefel spielt eine untergeordnete Rolle.

Die Toleranz gegenüber Schwefelwasserstoff ist nicht nur artspezifisch verschieden, sondern kann sich auch auf Populationsebene unterscheiden. Individuen der Baltischen Plattmuschel *Macoma balthica* von sulfidischen Habitaten sind gegenüber Schwefelwasserstoffbelastung unter oxischen Bedingungen deutlich toleranter als solche von kaum belasteten Standorten. Bei hypoxischen Sulfidinkubationen unterscheidet sich die Toleranz von Vertretern der verschiedenen Populationen jedoch nicht. Die unterschiedliche Schwefelwasserstofftoleranz kann nicht auf die Ausbildung von sulfidinsensitiven Enzymen des oxidativen Stoffwechsels zurückgeführt werden. Cytochrom-*c*-Oxidase und Katalase sind bei den untersuchten Populationen ähnlich sulfidempfindlich wie bei anderen marinen Arten. Enzyme des (anaeroben) Energiestoffwechsels, wie Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase, werden jedoch von Schwefelwasserstoff nicht beeinflusst.

Wichtig für die Höhe der Sulfidtoleranz ist die Menge des Schwefelwasserstoffs, der pro Zeiteinheit in die Gewebe der Tiere eindringt. Die Sulfiddiffusion in die Gewebe kann durch Schalenschluß oder durch Fällungsreaktionen in der Epidermis zumindest vorübergehend verringert werden.

Die Geschwindigkeit der Sulfiddiffusion läßt sich durch den apparenten Diffusionskoeffizienten für Gesamtsulfid D beschreiben. Dieser berechnet sich aus dem effektiven Radius des Tieres r_e und der Sulfidsättigungshalbwertszeit τ wie folgt:

$$D = \frac{r_e^2}{3\tau}$$

Sulfidempfindliche Exemplare der Plattmuschel *Macoma balthica* von sulfidarmen Standorten weisen einen etwa doppelt so hohen Sulfiddiffusionskoeffizienten wie Exemplare der sulfidtoleranten Populationen auf. Die höhere Eindringgeschwindigkeit des Sulfids führt zu einer stärkeren Belastung des Stoffwechsels, verbunden mit einem länger wirksamen Rückgang der Cytochrom-*c*-Oxidase-Aktivität und dem Ergebnis einer höheren Letalität.

Die im Gewebe vorliegende Sulfidkonzentration hängt vom Verhältnis der Geschwindigkeiten der Sulfiddiffusion und Sulfidentgiftung ab. Die sich bei gegebener Sulfidaußenkonzentration c_0 einstellende interne Sulfidgleichgewichtskonzentration c_i läßt sich durch folgende Gleichung angeben:

$$c_i = c_0 e^{-k r_c^2 / 3D}$$

Hierbei beschreibt k als apparente Entgiftungskonstante die Geschwindigkeit der Sulfidentgiftung.

Bei gegebenem Diffusionskoeffizienten und gegebener Entgiftungskonstante hängt die interne Sulfidkonzentration vom Radius und damit von der Größe des Tieres ab. Bei *Macoma balthica* konnte eine derartige Größenabhängigkeit der Sulfidentgiftung experimentell nachgewiesen werden. Während bei großen Plattmuscheln die interne Sulfidkonzentration nach H_2S -Inkubation gering bleibt, erhöht sich bei kleinen Tieren unter gleichen Bedingungen der Sulfidgehalt im Gewebe stärker. Bei Unterschreiten einer bestimmten Minimalgröße (Grenzbereich Meiofauna/Makrofauna) ist daher eine effektive Sulfidentgiftung auf Dauer nicht mehr möglich.

Der Ostracode *Cyprideis torosa* zeichnet sich durch eine außerordentlich hohe Sulfid- und Sauerstoffmangeltoleranz aus. Obwohl der Sulfiddiffusionskoeffizient wie bei *Macoma balthica* durch zeitweiligen Schalenschluß verringert werden kann und die Tiere eine hohe Sulfidoxidationsleistung aufweisen, dringt Schwefelwasserstoff aufgrund der geringen Körpergröße (ca. 1 mm Länge) sehr schnell in das Gewebe ein. Die Tiere sind also nicht zu einer effektiven Sulfidentgiftung in der Lage.

Bei Verbesserung der Umweltbedingungen kann *Cyprideis torosa* jedoch eingedrungenes Sulfid wieder eliminieren. Bei der Beseitigung des Oxidationsproduktes Thiosulfat sind wahrscheinlich kommensalische Bakterien auf der Carapaxinnenseite des Ostracoden beteiligt.

Wie *Macoma balthica* schaltet *Cyprideis torosa* bei zu hoher Sulfidbelastung auch unter oxidischen Bedingungen auf Anaerobiose um. Aufgrund seiner hohen Sauerstoffmangeltoleranz kann der Ostracode auch bei Blockierung des oxidativen Stoffwechsels extrem lange überleben. Diese Fähigkeit zur Langzeit-Anaerobiose ist demnach eine der wichtigsten Voraussetzungen für das Besiedeln sulfidischer Habitate.

Einleitung

Marine Weichbodensedimente lassen sich nach Fenchel & Riedl (1970) aufgrund des Redoxpotentials in eine obere, oxidierte und eine untere, reduzierte Zone unterteilen, die durch eine Redoxsprungschicht voneinander getrennt sind. Ging man zunächst davon aus, daß in der gesamten oxidierten Zone freier Sauerstoff zur Verfügung steht, so zeigten Untersuchungen mit O_2 -Mikroelektroden, daß in küstennahen Sedimenten mit entsprechend hohem organischem Eintrag Sauerstoff nur wenige Millimeter eindringt (Revsbech *et al.* 1980, Meyers *et al.* 1987, Giere 1992). Die oxidierte Schicht entspricht also nicht, wie fälschlicherweise oft angenommen wurde, der oxischen Zone. Sauerstoff steht daher als Elektronenakzeptor für den Abbau von organischem Kohlenstoff bereits in geringer Sedimenttiefe nicht mehr zur Verfügung. Einge-tragenes organisches Material wird dann unter Verbrauch von sekundären Elektronenakzeptoren wie Mn^{4+} , NO_3^- , Fe^{3+} und SO_4^{2-} bakteriell remineralisiert. Da Sulfat im Meerwasser in Konzentrationen von bis zu 29 mM vorliegt (Tardent 1993), gehört die Sulfatatmung, bei der SO_4^{2-} sulfatreduzierenden Bakterien als terminaler Elektronenakzeptor dient, zu den dominierenden Prozessen im Sediment. Hauptprodukt dieser dissimilatorischen Sulfatreduktion ist Schwefelwasserstoff (Jørgensen & Fenchel 1974, Jørgensen 1977, 1990, Huxtable 1986, Widdel 1988, Köster 1993). Schätzungen gehen davon aus, daß in anoxischen marinen Sedimenten etwa die Hälfte des Abbaus von organischem Material über die dissimilatorische Sulfatreduktion abläuft (Meyer-Reil 1996). In tieferen Sedimentschichten lassen sich daher fast immer hohe Konzentrationen an Schwefelwasserstoff nachweisen.

Bei hohem organischem Eintrag kann es auch unmittelbar auf der Sedimentoberfläche sowie in dem darüberstehenden Wasserkörper zu Sauerstoffmangel mit Schwefelwasserstoffbildung kommen. Insbesondere die Ostsee hat durch die thermohaline Schichtung des Wasserkörpers saisonal häufiger darunter zu leiden (Weigelt 1990, Babenerd 1991, Weigelt 1991), so daß Schwefelwasserstoff hier als wichtiger ökologischer Faktor angesehen werden muß. Wurden bisher anoxische Verhältnisse meist nur für die tieferen Zonen der Ostsee beschrieben, so kann jedoch auch in den Sedimenten von ansonsten sauerstoffreichen Flachwassergebieten durch angetriebene Algen- und Cyanobakterienmatten, die das Sediment bedecken, Sauerstoffmangel entstehen (Norkko & Bonsdorff 1996). Insbesondere in den austauscharmen Förden und Bodden der Ostsee kommt es durch zunehmende, anthropogen bedingte Eutrophierung häufiger zu Sauerstoffmangelerscheinungen mit Schwefelwasserstoffbildung (Nehring 1996). Auch im Wattenmeer der Nordsee können anoxische Zonen mit hohem Gehalt an Schwefelwasserstoff als sogenannte "schwarze Flecken" unmittelbar an der Wattoberfläche auftauchen (Höpner & Michaelis 1994, Höpner 1996). Da es hierbei zu einem massenhaften Absterben der hier siedelnden Tiere kommt, erregte dieses Phänomen selbst in der Presse Aufsehen (SPIEGEL 1996, ZEIT 1996).

Schwefelwasserstoff (H_2S) dissoziiert in Abhängigkeit vom pH-Wert zu HS^- und S^{2-} (Millero 1986). In der vorliegenden Arbeit werden, sofern nicht ausdrücklich anders erwähnt, die Begriffe "Schwefelwasserstoff", "Sulfid" und " H_2S " synonym für die Gesamtheit von S^{2-} , HS^- und undissoziiertem H_2S verwendet. Das pH-abhängige Verhältnis der drei Sulfidspezies kann mit Hilfe der pK -Werte berechnet werden. Die Literaturangaben hierzu, insbesondere zum pK_2 -Wert, schwanken jedoch beträchtlich. Millero (1986) nennt aus der Literatur Durchschnittswerte von $\text{pK}_1 = 7.01 \pm 0.02$ und $\text{pK}_2 = 13.78 \pm 0.74$. Im schwach alkalischen Milieu des Meerwassers liegt somit der Hauptanteil des Schwefelwasserstoffs als HS^- -Ion vor. In tieferen Sedimenthorizonten kommt es zu einem pH-Rückgang, so daß der Anteil an undissoziiertem H_2S ansteigt.

Das undissoziierte H_2S kann im Gegensatz zum Sulfid- (S^{2-}) und zum Hydrogensulfidion (HS^-) als ungeladene Form leicht biologische Membranen passieren (Powell 1989, Bagarinao & Vetter 1990) und so bis in Zellorganellen vordringen. In den Mitochondrien inhibiert Schwefelwasserstoff wie Cyanid das letzte Glied der Atmungskette, den Enzymkomplex IV, die Cytochrom-*c*-Oxidase (National Research Council 1979, Bagarinao 1992). Dieser Komplex enthält zwei Häm-Moleküle (a , a_3) und zwei Kupferionen als prosthetische Gruppen. Er katalysiert den Elektronentransport vom Cytochrom *c* zum Sauerstoff, wobei die Elektronen durch das Häm a und das assoziierte Cu_A übernommen und schrittweise über Häm a_3/Cu_B auf O_2 übertragen werden (Urich 1990). H_2S bindet reversibel, aber mit hoher Affinität an die Häm- a_3/Cu_B -Gruppe und reduziert Cu^{2+} zu Cu^+ . Der resultierende stabile Komplex vermag Sauerstoff nicht mehr zu reduzieren, so daß damit die gesamte Atmungskette zum Erliegen kommt (Nicholls 1975, Nicholls & Kim 1981, 1982). Die wirksame Form des Schwefelwasserstoffs scheint hierbei das undissoziierte H_2S zu sein, denn Nicholls & Kim (1982) fanden eine Zunahme der Inhibition von Cytochrom-*c*-Oxidase mit sinkendem pH-Wert. Zusätzlich wiesen die Autoren die Bildung von SH^\cdot -Radikalen nach, die Sauerstoff abfangen, so daß er nicht mehr als Elektronenakzeptor der Atmungskette zur Verfügung steht.

Auch andere Metall enthaltende Enzyme des oxidativen Stoffwechsels, wie Katalase und Oxidasen, können durch Sulfid inhibiert werden (Bagarinao 1992). Sulfid bindet mit hoher Affinität auch an respiratorische Pigmente, wie Hämoglobin. Durch Veränderung des Porphyrinring-Systems ist das entstehende Sulfmethämoglobin nicht mehr in der Lage, Sauerstoff und CO_2 zu binden und zu transportieren (Somero *et al.* 1989, Abele-Oeschger & Oeschger 1995). Außerdem bewirkt Schwefelwasserstoff in cysteinhaltigen Proteinen die Spaltung von Disulfidbrücken unter Bildung von Persulfidgruppen (R-SSH), so daß die Tertiärstruktur und damit die Funktionsfähigkeit der Proteine verändert wird. Dabei ist ein hoher pH-Wert Voraussetzung; die wirksamen Spezies sind hier die HS^- - und S^{2-} -Ionen (Cavallini *et al.* 1970). Da die Disulfidbrücken von Membranproteinen ebenfalls betroffen sind, kann Sulfid durch die Veränderung von Ionenkanälen auch als Neurotoxin wirken (Bagarinao 1992).

Schwefelwasserstoff ist also ein hoch wirksames Gift. Das in sulfidischen Sedimenten lebende Zoobenthos muß demnach Strategien zur Sulfidvermeidung und -entgiftung bzw. zur Sulfidtoleranz entwickelt haben. Es ist schon lange bekannt, daß ein Überleben bestimmter Arten in sulfidischen Biotopen möglich ist. Insbesondere Weichbodenbewohner mit ausgeprägten Fähigkeiten zur Langzeit-Anaerobiose können auch bei Gegenwart von Schwefelwasserstoff lange überleben (Theede *et al.* 1969, Theede 1973). Fenchel & Riedl beschrieben 1970 erstmalig die Lebensgemeinschaft im reduzierten Milieu des Sedimentes. Für die hier lebende Meiofauna, die als "Thiobios" bezeichnet wurde (Boaden & Platt 1971), postulierte man sogar eine ökologische Notwendigkeit von Schwefelwasserstoff, was zu hoch kontroversen Diskussionen in der Literatur führte (Reise & Ax 1979, 1980, Boaden 1980, Powell 1989, Giere 1992). Die Entdeckung der Hydrothermalquellen in der Tiefsee im Jahre 1977 zeigte tatsächlich eine ökologische Notwendigkeit von Schwefelwasserstoff, der hier durch geochemische Prozesse entsteht (Edmond *et al.* 1982, Schmaljohann 1993). Hier ist ein Leben bei hohen Konzentrationen dieses Zellgiftes nicht nur möglich, sondern Schwefelwasserstoff dient sogar als energetische Grundlage für eine reichhaltige Fauna (Grassle 1985, Childress *et al.* 1987). Er wird von chemolithoautotrophen Bakterien zur Energiegewinnung mit Hilfe des in der Tiefsee reichlich vorhandenen Sauerstoffs oxidiert. Diese Schwefelbakterien, die mitunter als Endosymbionten in anderen Organismen wie dem Röhrenwurm *Riftia pachyptila* leben, stehen als primäre Nahrungsproduzenten am Anfang der Nahrungskette (Felbeck *et al.* 1981, Schmaljohann 1993). Die Lebensgemeinschaft der Hydrothermalquellen gehört demnach zu den wenigen Biozönosen der Erde, die nicht von der Sonnenenergie, sondern letztendlich von geochemischen Prozessen gespeist wird.

Sulfidoxidation durch ekto- und endosymbiotische Bakterien ist auch für einige Arten der Meiofauna aus Flachwasserbereichen beschrieben worden (Ott & Novak 1989, Ott *et al.* 1991, Giere 1992, Ott 1995). Auch bei einigen Muscheln aus küstennahen Gewässern, wie *Thyasira flexuosa*, *Lucinoma borealis* und *Solemya reidi*, sowie beim Herzseeigel *Echinocardium cordatum* konnten symbiotische Beziehungen nachgewiesen werden (Kraus *et al.* 1992, Temara *et al.* 1993, Dando *et al.* 1994). Im Makrozoobenthos der Ostsee sind solche Symbiosen bisher nicht bekannt, so daß die in Sulfidbiotopen lebenden Arten dem Schwefelwasserstoff unmittelbar ausgesetzt sind. Die hier lebenden Organismen müssen demnach selbst Entgiftungsmechanismen entwickelt haben.

Zur Vermeidung einer zu hohen Schwefelwasserstoffbelastung kann das im Sediment lebende Makrozoobenthos, dessen Bauten z.T. tief in den reduzierten Bereich hinunterragen, zunächst versuchen, durch Bioturbation und den damit verbundenen Irrigationsströmen die Sulfidkonzentration im unmittelbaren Umfeld gering zu halten. So pumpt beispielsweise der Wattwurm *Arenicola marina* ständig frisches, sauerstoffreiches Wasser durch seine Wohnröhre, mit der Folge, daß die Schwefelwasserstoffkonzentration in seinem nahen Umfeld in der

Regel niedrig bleibt. Bioturbationsleistungen der Makrofauna führen somit zu Mikronischen im Sediment, die nicht nur durch chemische Parameter, sondern auch durch die hier lebende Meiofauna erkennbar sind (Wetzel *et al.* 1995). In Tidengewässern fallen jedoch die Wohnbauten bei Niedrigwasser trocken. Durch die dann ausbleibende Irrigation können die Schwefelwasserstoffkonzentrationen in den Wohnröhren von 0 auf 15 μM ansteigen (Völkel *et al.* 1995). Tiere, wie *A. marina*, können dann den in den Körper eingedrungenen Schwefelwasserstoff erst während des darauffolgenden Hochwassers entgiften (Völkel & Grieshaber 1994, Grieshaber *et al.* 1995, Völkel *et al.* 1995).

Ist der Schwefelwasserstoffgehalt des äußeren Mediums trotz Bioturbation zu hoch, so können schalentragende Tiere versuchen, durch Schalenschluß ein Eindringen von H_2S in den Körper zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Auch die Immobilisierung durch Fällung zu Metallsulfiden auf der Körperoberfläche wird als Sulfidausflußmechanismus in der Literatur diskutiert. So zeigt der sulfidresistente Priapulide *Halicryptus spinulosus* nach Sulfidinkubation eine Schwarzfärbung der äußeren Kutikula, wobei es sich um ausgefälltes Eisensulfid handelt. Da die Schwarzfärbung wieder verschwindet, sobald die Tiere mit Sauerstoff in Berührung kommen, wurde dieser Mechanismus mit einer "Batterie, die wieder regenerierbar ist", verglichen (Oeschger & Janssen 1991, Janssen & Oeschger 1992, Oeschger & Vetter 1992). Die Wirksamkeit dieses Vorganges ist jedoch umstritten (Dubilier *et al.* 1995).

Über die Absenkung des internen pH-Wertes kann ebenfalls das Eindringen von H_2S in das Gewebe vermindert werden. So liegt der pH-Wert bei marinen Evertebraten niedriger als der des umgebenden Meerwassers und kann unter hypoxischen wie auch unter sulfidischen Bedingungen aufgrund der Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte noch weiter absinken (Groenendaal 1981, Pörtner *et al.* 1984a, Völkel & Grieshaber 1992, Zimmermann & Jahn 1996). Bei einer pH-Wert-Absenkung steigt der Anteil an undissoziiertem H_2S an. Da hauptsächlich das ungeladene H_2S -Molekül durch Membranen diffundiert (Powell 1989), ist ein Gleichgewicht erreicht, wenn innen und außen die gleiche Konzentration an undissoziiertem H_2S herrscht. Bei einem herabgesetzten inneren pH-Wert liegt dann aber eine geringere Gesamtsulfidkonzentration vor. Anaerobiose muß jedoch nicht zwangsläufig zu einer pH-Wert-Absenkung führen, vielmehr hängt der interne pH-Wert von der Bilanz aus protonenliefernden und -verbrauchenden Reaktionen ab (Pörtner 1987). Entscheidend für die Wirksamkeit der genannten Sulfidausflußmechanismen ist letztendlich die Geschwindigkeit mit der Schwefelwasserstoff in das Gewebe hineindiffundiert. Außer der theoretischen Arbeit von Powell (1989), die sich mit Sulfiddiffusion bei Meiofauna beschäftigt, gibt es hierzu jedoch nur wenige Daten.

Ist ein Ausschluß von Sulfid nicht mehr möglich, so daß es in das Körperinnere eindringt, kann es von vielen Organismen zur Entgiftung oxidiert werden. (Vismann 1991a, Jahn *et al.* 1992, Oeschger & Vetter 1992, Völkel & Grieshaber 1992, Hagerman & Vismann

1993). Ein Teil dieser Oxidation läuft in den Mitochondrien ab, wobei einige Arten sogar in der Lage sind, hieraus einen energetischen Nutzen zu ziehen (Oeschger & Vismann 1994, Völkel & Grieshaber 1994, 1996, Oeschger & Tschischka 1995, Tschischka & Oeschger 1995). Wird die Oxidationskapazität überschritten, dann inhibiert H_2S die Cytochrom-*c*-Oxidase, und der oxidative Stoffwechsel kommt zum Erliegen. Ein Überleben ist dann nur noch durch Anaerobiose möglich (Jahn *et al.* 1992, Oeschger & Vetter 1992, Völkel & Grieshaber 1992, 1994, Dubilier *et al.* 1994).

Es ist bereits bekannt, daß die hier geschilderten Anpassungsstrategien an Schwefelwasserstoff bei den verschiedenen Arten unterschiedlich ausgeprägt sind und somit zu unterschiedlichen Einnischungen in Sulfidbiotopen führen. So zeigten physiologische Voruntersuchungen zu der vorliegenden Arbeit bei drei verschiedenen Polychaeten unterschiedliche Anpassungen an Schwefelwasserstoff. Der Seeringelwurm *Hediste (Nereis) diversicolor* hat eine hohe Entgiftungskapazität für eingedrungenes Sulfid. Diese Fähigkeit ist beim Wattwurm *Arenicola marina* etwas geringer. Der Polychaet *Pherusa plumosa* reagiert dagegen äußerst empfindlich auf Schwefelwasserstoff und ist daher nur in gut durchlüfteten Böden zu finden, während *A. marina* und *H. diversicolor* auch sulfidische Bereiche besiedeln können (Jahn *et al.* 1992).

Auch bei nah verwandten Arten treten Unterschiede in der Sulfidtoleranz auf. Vismann (1990) verglich die nereiden Polychaeten *Hediste (Nereis) diversicolor* und *Neanthes (Nereis) virens* und fand bei *H. diversicolor* eine deutlich höhere Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel und Sulfid als bei *N. virens*. Beide Arten haben ähnliche ökologische Ansprüche und konkurrieren daher miteinander im Biotop. In der Regel sind sie aber nicht am gleichen Habitat zu finden. Offensichtlich stellt die höhere Sulfidtoleranz von *H. diversicolor* einen Selektionsvorteil an sulfidischen Habitaten für die sonst gegenüber *N. virens* unterlegene Art dar. Auch Miron & Kristensen (1993a, b) weisen auf den wichtigen ökologischen Faktor Schwefelwasserstoff bei der Verteilung nereider Polychaeten hin. Hierbei könnte eine unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit zur Sulfidoxidation, die auch in den Mitochondrien abläuft, eine wichtige Rolle bei der Besiedelung sulfidischer Biotope spielen. Isolierte Mitochondrien der sulfidtoleranten Arten *Hediste (Nereis) diversicolor* und *Neanthes (Nereis) succinea* zeigen höhere Sulfidoxidationsraten als die sulfidempfindlichen Arten *Neanthes (Nereis) virens* und *Nereis pelagica* (Oeschger & Tschischka 1995, Tschischka & Oeschger 1995).

Bei den nah verwandten Plattmuschelarten *Macoma secta* und *Macoma nasuta* wurden ebenfalls unterschiedliche Sulfidtoleranzen gefunden, die zu unterschiedlichen Besiedlungen der Habitate führen (Levitt & Arp 1991). Weitgehend unbekannt ist jedoch, ob auch Populationen derselben Art sich in ihrer Sulfidtoleranz unterscheiden. Hinweise hierauf gibt es bisher nur bei dem Echiuriden *Urechis caupo* (Arp *et al.* 1992). Bei dem Polychaeten *Capitella capitata* konnten Gamenick & Giere (1994) zwei morphologische Varianten mit verschiedener Ver-

teilung im Sediment des Sylter Watts unterscheiden. Die in tieferen Sedimentschichten lebende größere Form zeigt eine höhere Toleranz gegenüber Sulfid als die kleinere in den oberen Schichten. Die Autoren schließen hieraus, daß es sich nicht um verschiedene Populationen, sondern um zwei Geschwisterarten handelt, die sich in ihrer Ökologie und Ökophysiologie voneinander unterscheiden. Neue genetische Untersuchungen, die noch eine dritte Population aus dem Mittelmeer mit einbezogen, bestätigten diese Vermutung (Gamenick & Giere 1996).

Eine Reihe von Arten tritt sowohl an sulfidischen als auch an nicht sulfidischen Standorten auf, so daß sich die Populationen hinsichtlich ihrer Sulfidtoleranz durchaus unterscheiden könnten. Hierzu gehört die Baltische Plattmuschel *Macoma balthica*, die zu den häufigsten Muschelarten der Nord- und Ostsee zählt (Beukema & Meehan 1985, Günther 1991, Bonsdorff *et al.* 1995).

Spielt die Größe des Individuums eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Schwefelwasserstoff? Powell (1989) wies auf den Faktor Größe hinsichtlich der Sulfidentgiftung bei der Meiofauna hin. Es gibt bisher jedoch keine Untersuchungen, inwieweit die Tiergröße auch beim Makrozoobenthos die Sulfidentgiftung beeinflusst.

In den letzten Jahren ist das Wissen über die ökophysiologischen Anpassungen des Makrozoobenthos an Schwefelwasserstoff wesentlich erweitert worden, doch liegen für das Meiobenthos bisher nur wenige Erkenntnisse vor, obwohl gerade Arten des Meiobenthos in hoch sulfidischen Habitaten siedeln (vgl. die "Thiobios-Problematik"). Ein häufiger Vertreter des Meiobenthos in Flachwasserhabitaten der Ostsee ist der Ostracode *Cyprideis torosa* (Heip 1976, Herman & Heip 1982). Er tritt besonders an hochsulfidischen Standorten auf (Gamenick *et al.* 1996). Es liegen jedoch keine ökophysiologischen Untersuchungen an dieser Art vor.

Die vorliegende Arbeit will dazu beitragen, die Kenntnisse der Anpassungsstrategien an den Umweltfaktor Schwefelwasserstoff zu vertiefen. Hierzu wurden Untersuchungen an zwei verschiedenen Arten des Zoobenthos, der Baltischen Plattmuschel *Macoma balthica* als Vertreter des Makrobenthos und dem Ostracoden *Cyprideis torosa* als Vertreter des Meiobenthos, durchgeführt. Dabei soll insbesondere auf folgende Fragen eingegangen werden:

Worauf beruht die Toleranz der genannten Arten gegenüber Schwefelwasserstoff? Welche Entgiftungsmechanismen spielen für das Überleben in Sulfidhabitaten eine entscheidende Rolle und welche sind von untergeordneter Bedeutung?

Wie festgelegt sind die Mechanismen der Sulfidentgiftung auf Art-Ebene? Gibt es Unterschiede auch bei verschiedenen Populationen derselben Art?

Wie schnell dringt Schwefelwasserstoff in das Gewebe ein und wie wirkungsvoll wird er im Organismus entgiftet?

Lassen sich diese Größen quantifizieren?

Hängt die Sulfidentgiftung mit der Größe des Organismus zusammen?

Gibt es grundsätzliche Unterschiede bezüglich der Sulfidentgiftung beim Meiobenthos und Makrobenthos?

Die erzielten Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Bedeutung von Schwefelwasserstoff als ökologischen Faktor und die daraus resultierenden Einnischungen der Arten in Sulfidbiotopen besser zu verstehen.

Material und Methoden

1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an der Baltischen Plattmuschel *Macoma balthica* (L.) (Mollusca, Bivalvia, Eulamellibranchiata, Tellinidae; Abb. 1) sowie an dem Muschelkrebs *Cyprideis torosa* Jones (Arthropoda, Crustacea, Ostracoda; Abb. 2) durchgeführt.

Die Plattmuschel *Macoma balthica* wurde aus einem Nordsee- und drei unterschiedlichen Ostseehabitaten entnommen, deren Lage aus Abb. 3a (Standort 1-4; Abb. 3b, c) ersichtlich ist:

- 1) Nordseewatt bei Dorum-Neufeld, Weser-Ästuar, Sand (Abb. 3b).
- 2) Sublitoralstation in der Kieler Bucht (Gabelsflach), Westliche Ostsee, 54° 32,1'N, 010° 20,9'E, ca. 12 m Tiefe, Sand.
- 3) Flaches Sublitoral Fährinsel, Insel Hiddensee, Südliche Ostsee, ca. 0,3 bis 1 m Tiefe, schlickiger Sand (Abb. 3c).
- 4) Sublitoralstationen im Putziger Wiek der Danziger Bucht, Zentrale Ostsee:
 - a) 54° 34,2'N, 018° 48,6'E, ca. 62 m Tiefe, Schlick;
 - b) 54° 35,0'N, 018° 44,0'E, ca. 51 m Tiefe, Schlick;
 - c) 54° 35,0'N, 018° 40,0'E, ca. 37 m Tiefe, Schlick.

In der Kieler und der Danziger Bucht erfolgte die Probennahme von Bord der Forschungskutter "Littorina" und "Oceanograf 2". Mit einem van-Veen-Backengreifer bzw. mit einer Kastendredge wurde Sediment gesammelt, aus dem sich die Versuchstiere durch Sieben (Maschenweite 0,5 cm) gewinnen ließen. An den ufernahen Standorten wurden die Tiere von Hand gesammelt.

Cyprideis torosa entstammte aus dem Eulitoral bei Boiensdorf (Wismarbucht, Westliche Ostsee, ca. 0 bis 0,3 m Tiefe, schlickiger Sand; Abb. 3a, Standort 5; Abb. 3d), wobei ein 250- μ m-Sieb zum Sammeln verwendet wurde.

Macoma balthica wurde in temperaturkonstanten Räumen bei 5°C und 22‰S (Dorum-Neufeld und Kieler Bucht) bzw. 9‰S (Hiddensee und Danziger Bucht) mit Sediment vom jeweiligen Standort in belüfteten Aquarien gehalten. Die Hälterung von *Cyprideis torosa* erfolgte bei 16°C und 14‰S.



Abb. 1. *Macoma balthica* (Dorum-Neufeld)

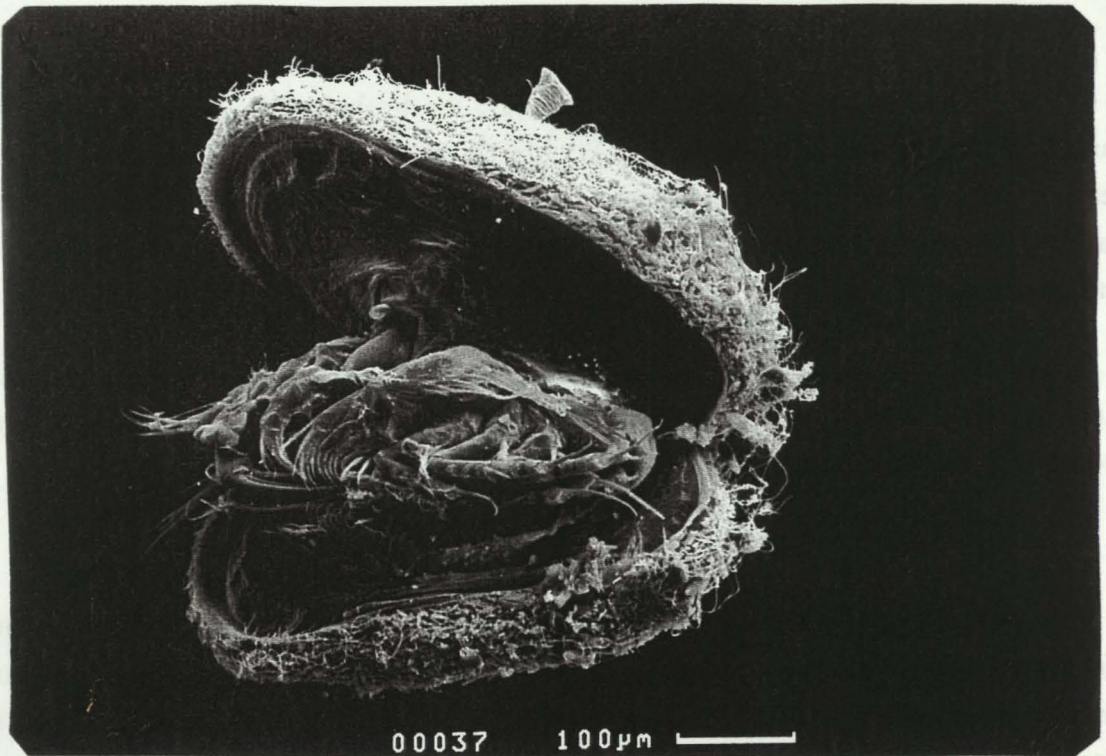
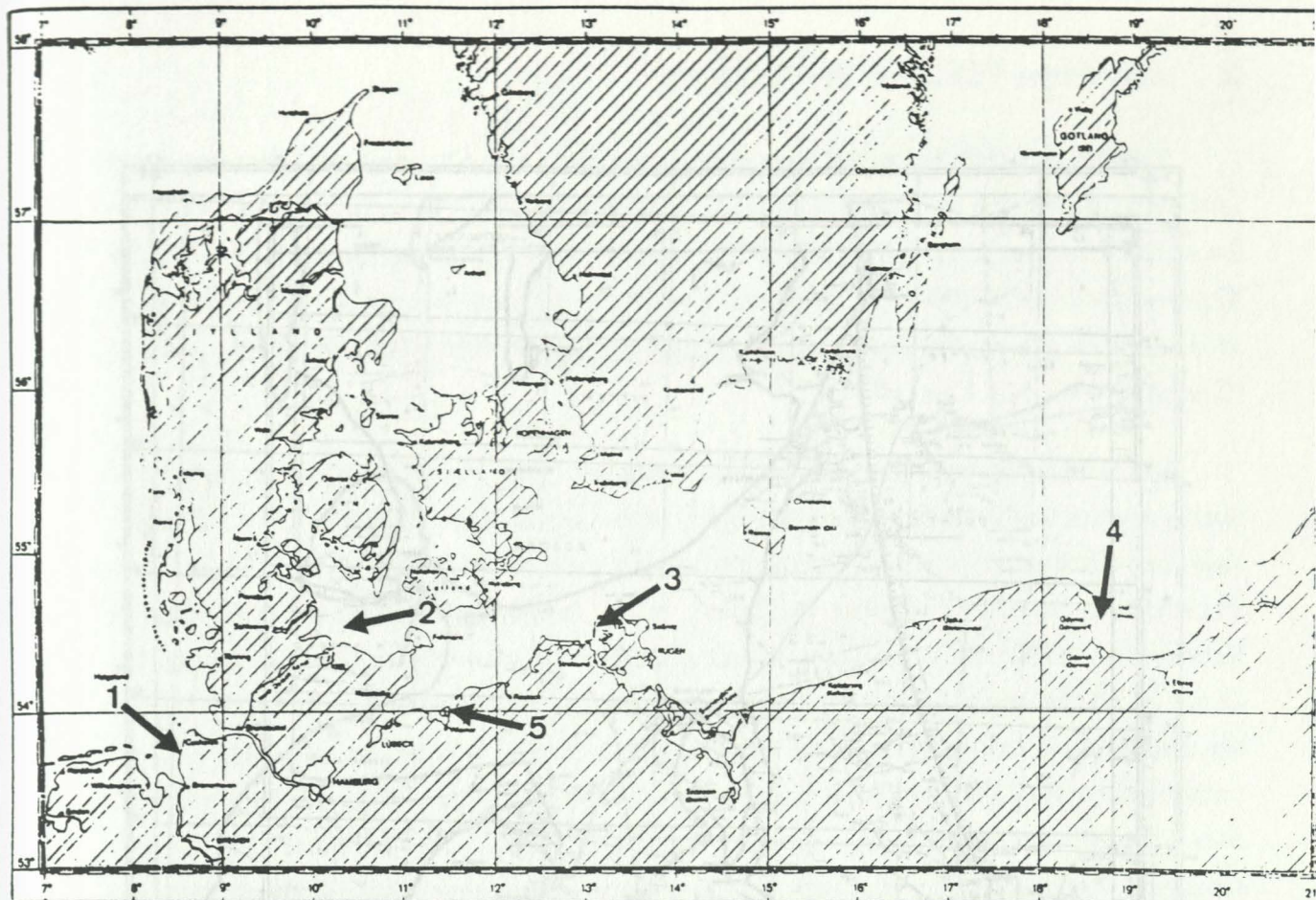
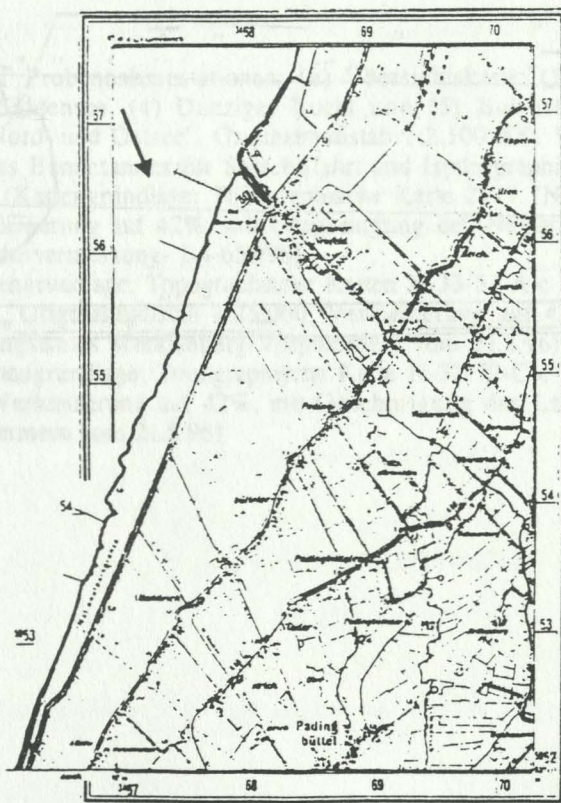


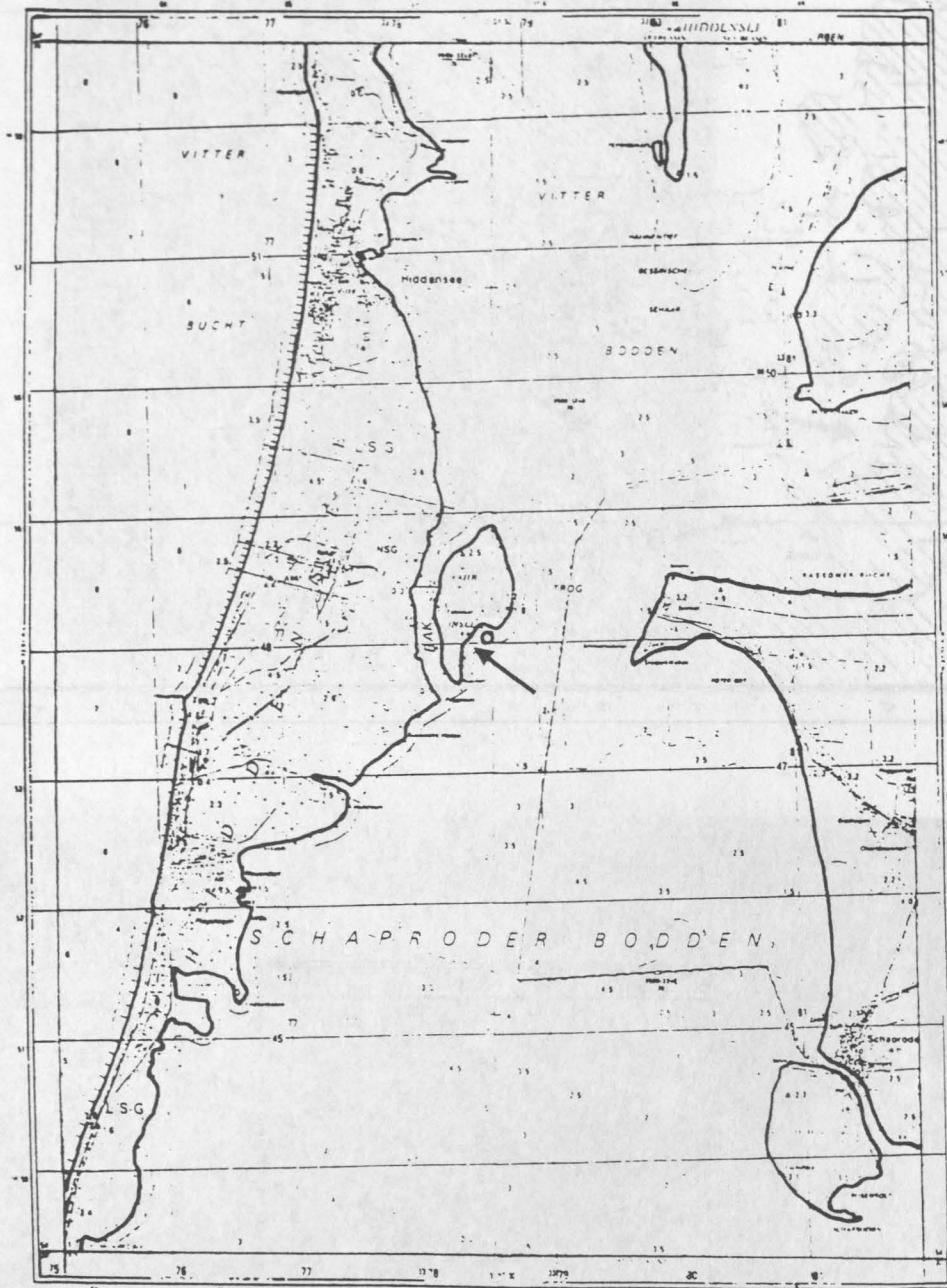
Abb. 2. *Cyprideis torosa*, rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, Maßstab 100 µm (Foto: R. Windoffer)



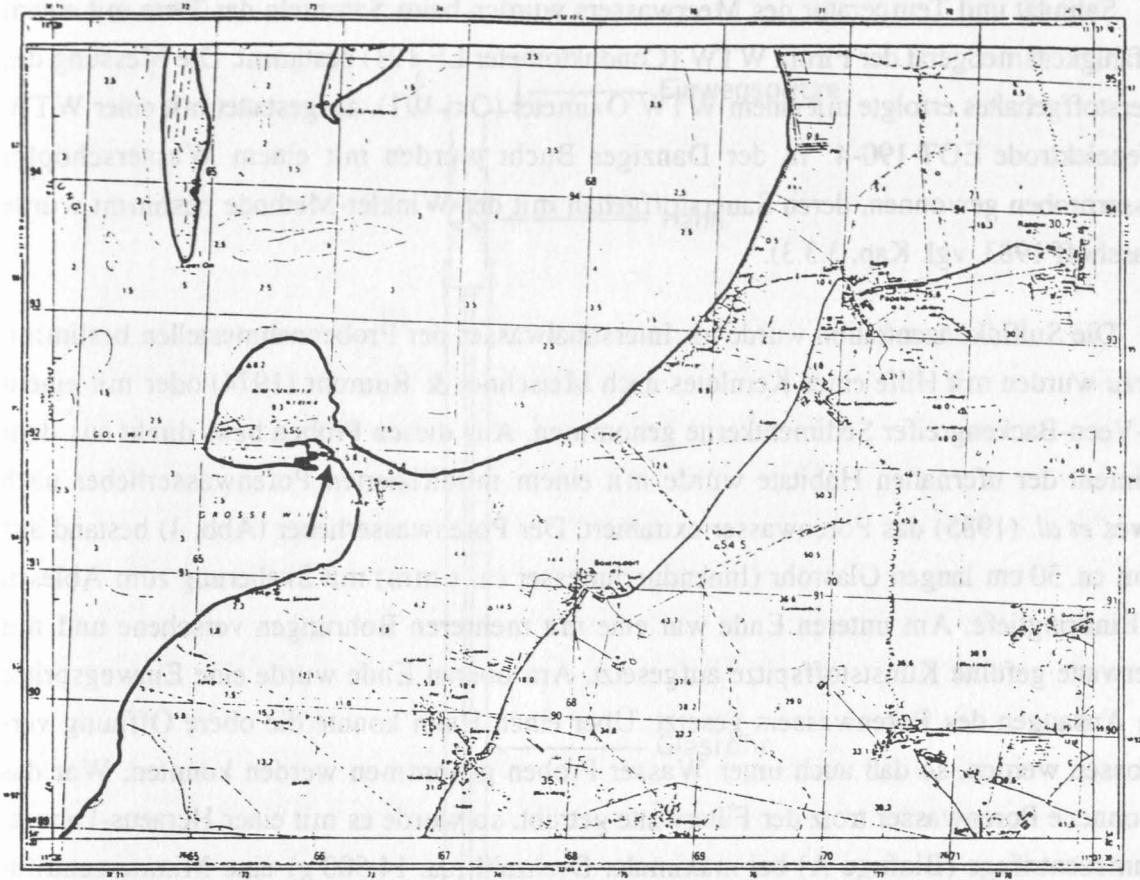
a



b



C



d

Abb. 3. Karten der Probennahmestationen: (a) Übersichtskarte: (1) Dorum-Neufeld, (2) Kieler Bucht, (3) Hiddensee, (4) Danziger Bucht und (5) Boiensdorf (Kartengrundlage: Seekarte Nr. 2613 "Nord- und Ostsee", Originalmaßstab 1:2.100.000, Verkleinerung auf 42%, mit Genehmigung des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie - 8095.01/96 Z1102) (b) Dorum-Neufeld (Kartengrundlage: Topographische Karte 2217 "Nordholz", Originalmaßstab 1:25.000, Verkleinerung auf 42%, mit Genehmigung des Niedersächsischen Landesverwaltungsamtes - Landesvermessung- B4-659/96) (c) Hiddensee (Kartengrundlage: Topographische Karten N-33-51-A-c "Hiddensee" und N-33-51-A-d "Schapode", Originalmaßstab 1:25.000, Verkleinerung auf 42%, mit Genehmigung des Landesvermessungsamtes Mecklenburg-Vorpommern vom 21.8.96) (d) Boiensdorf (Kartengrundlage: Topographische Karte N-32-72-C-c "Boiensdorf", Originalmaßstab 1:25.000, Verkleinerung auf 42%, mit Genehmigung des Landesvermessungsamtes Mecklenburg-Vorpommern vom 21.8.96)

2 Abiotische Faktoren der Habitate

Salinität und Temperatur des Meerwassers wurden beim Sammeln der Tiere mit einem Leitfähigkeitsmeßgerät der Firma WTW (Conduktometer LF 191) bestimmt. Die Messung des Sauerstoffgehaltes erfolgte mit einem WTW Oximeter (Oxi 191), ausgestattet mit einer WTW Tiefenelektrode EOT 190-4. In der Danziger Bucht wurden mit einem Wasserschöpfer Wasserproben gewonnen, deren Sauerstoffgehalt mit der Winkler-Methode bestimmt wurde (Grasshoff 1983, vgl. Kap. 3.3.3).

Die Sulfidkonzentration wurde im Interstitialwasser der Probennahmestellen bestimmt. Hierzu wurden mit Hilfe eines Kernlotes nach Meischner & Rumohr (1974) oder mit einem van-Veen-Backengreifer Sedimentkerne genommen. Aus diesen Proben bzw. direkt aus dem Sediment der ufernahen Habitate wurde mit einem modifizierten Porenwasserheber nach Howes *et al.* (1985) das Porenwasser extrahiert. Der Porenwasserheber (Abb. 4) bestand aus einem ca. 30 cm langen Glasrohr (Innendurchmesser ca. 1 mm) mit Skalierung zum Ablesen der Eindringtiefe. Am unteren Ende war eine mit mehreren Bohrungen versehene und mit Filterwatte gefüllte Kunststoffspitze aufgesetzt. Am oberen Ende wurde eine Einwegspritze zum Ansaugen des Porenwassers gesetzt. Über einen Hahn konnte die obere Öffnung verschlossen werden, so daß auch unter Wasser Proben genommen werden konnten. War das gewonnene Porenwasser trotz der Filterwatte getrübt, so wurde es mit einer Heraeus-Laboratoriumszentrifuge (Biofuge A) bei maximaler Drehzahl (ca. 14.500 g) eine Minute zentrifugiert. Die Fixierung des Sulfids mit Methylenblau (s.u.) war innerhalb von fünf Minuten gewährleistet.

Der Sulfidgehalt des Porenwassers wurde photometrisch nach der Methylenblau-Methode bestimmt (Cline 1969, vgl. Kap. 3.3.2). Im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen des Verbundprojektes zeigten sich am gleichen Habitat z.T. deutliche Unterschiede in der Sulfidkonzentration im Sediment. Ein Methodenabgleich, der zwischen allen beteiligten Arbeitsgruppen des Verbundprojektes im Januar 1993 in Oldenburg durchgeführt wurde, bewies jedoch, daß diese Differenzen nicht auf Unterschiede in der Meßmethodik, sondern auf die fleckenhafte Verteilung des Sulfids im Sediment zurückzuführen waren.

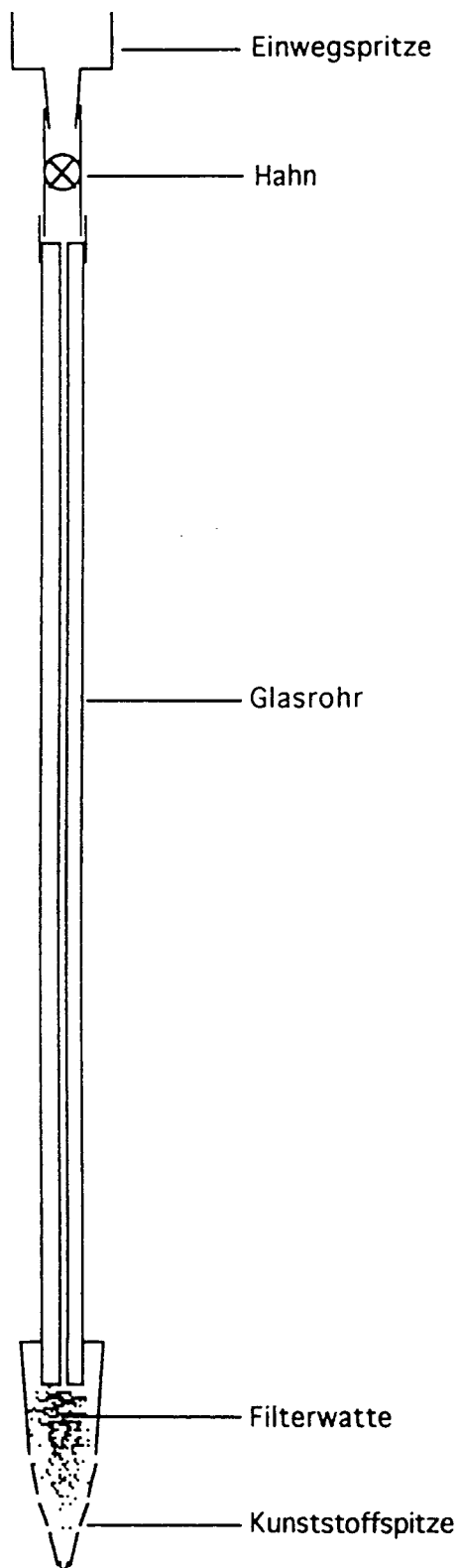


Abb. 4. Schema des verwendeten Porenwasserhebbers. Weitere Erläuterung im Text

3 Experimentelle Inkubationen

3.1 Hypoxische Inkubationen

Unter "Hypoxie" wird in dieser Arbeit ein Sauerstoffgehalt von unter 10% Luftsättigung verstanden. Hypoxische Inkubationen mit und ohne Zugabe von Schwefelwasserstoff wurden in geschlossenen Erlenmeyerkolben (300 ml) durchgeführt. Hierzu wurde Meerwasser der entsprechenden Salinität (9 bzw. 22‰) mit Stickstoff mindestens eine Stunde begast. Anschließend wurden die Gefäße mit Argon überschichtet, um eine Kontamination mit Luftsauerstoff zu verhindern. Die gewünschte Sulfidkonzentration (100 oder 200 µM) wurde durch Zugabe von Na₂S·9H₂O-Kristallen hergestellt, die zuvor zur Entfernung von Oxidationsprodukten mit entgastem, destilliertem Wasser gewaschen und anschließend trockengetupft worden waren. Der pH-Wert des Inkubationsmediums wurde mit HCl auf 8.0 eingestellt. Vor dem Einsetzen waren die Plattmuscheln einen Tag an die Versuchstemperatur (10°C) adaptiert worden. Sulfid- und Sauerstoffkonzentration sowie pH-Wert des Mediums wurden während des gesamten Inkubationszeitraumes regelmäßig kontrolliert (vgl. Kap. 3.3). Zu Beginn der sulfidischen Inkubationen sank der Sulfidgehalt schnell ab, so daß er stündlich durch Zugabe von Na₂S korrigiert werden mußte. Hierbei wurde auch der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls neu eingestellt. In der Regel war nach zwei bis drei Tagen der Restsauerstoff vollständig aufgebraucht, so daß auch der Sulfidgehalt dann mehr oder weniger konstant blieb. Um eine Vergiftung der Versuchstiere durch bakteriell entstehendes Sulfid zu verhindern (Levitt & Arp 1991), wurde auch bei hypoxischen Inkubationen ohne Sulfid der H₂S-Gehalt kontrolliert und das Inkubationsmedium mindestens alle drei Tage gewechselt.

Bei dem Ostracoden *Cyprideis torosa* mußten die Inkubationsbedingungen wegen der geringen Tiergröße (Körperlänge ca. 1 mm) und der außerordentlich hohen Sulfidresistenz abgewandelt werden. Hypoxisch-sulfidische Experimente erfolgten hier in mit Argon überschichteten Schnappdeckelgläschen (ca. 60 ml) mit künstlichem Meerwasser (16°C; 14‰, gepuffert mit 10 mM HEPES, pH 7,8) bei 1 mM H₂S (990±75 µM; O₂<1 µM).

Die Carapaxinnenseite von *Cyprideis torosa* ist durch Bakterien besiedelt (Giere & Windoffer 1994). Um den Einfluß dieser Bakterien auf die Sulfidakkumulation und -oxidation im Gewebe der Ostracoden zu untersuchen, wurden die Tiere zunächst einen Tag in normoxischem Meerwasser mit einem Antibiotikagemisch aus Chloramphenicol, Gentamycin und Streptomycin (jeweils 10 mg·ml⁻¹) vorinkubiert und dann unter hypoxisch-sulfidischen Bedingungen zusammen mit Antibiotika weiter inkubiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten nach dieser Behandlung lysierte Bakterien (Giere *et al.* 1995).

3.2 Oxische Inkubationen

Als "oxische" Bedingungen wird hier ein Sauerstoffgehalt von über 50% Luftsättigung verstanden. Da Schwefelwasserstoff durch Sauerstoff oxidiert wird, mußten die oxisch-sulfidischen Inkubationen in einem Durchflußsystem durchgeführt werden (Abb. 5). Exemplare von *Macoma balthica* wurden, nachdem sie an die Versuchstemperatur (10°C) adaptiert waren, in eine Durchflußkammer (ca. 0.5 l) gesetzt, durch die belüftetes Meerwasser (9 bzw. 22‰) mit einer regelbaren Peristaltikpumpe (Ismatec) geleitet wurde (Durchflußgeschwindigkeit ca. 0.5 l·h⁻¹). Über eine zweite regelbare Peristaltikpumpe wurde eine Sulfidstammlösung (5 mM; pH 8,0; hergestellt aus gewaschenen Na₂S·9H₂O-Kristallen und durch Stickstoff entgastem Meerwasser entsprechender Salinität) kurz vor der Kammer dazugemischt, so daß die gewünschte Sulfidkonzentration (100 oder 200 µM) in der Kammer eingestellt werden konnte. Die Flasche der Stammlösung war durch einen mit Argon gefüllten Gasballon verschlossen. Die gesamte Anlage befand sich in einem temperaturkonstanten Raum (10°C), wobei die Durchflußkammer zur Erhaltung der Temperaturkonstanz zusätzlich in einem Wasserbad lag. Sulfid- und Sauerstoffkonzentration sowie pH-Wert des Inkubationsmediums wurden regelmäßig kontrolliert (vgl. Kap. 3.3). Durch Oxidation des Schwefelwasserstoffs und durch den Sauerstoffverbrauch der Versuchstiere sank die Sauerstoffkonzentration in der Kammer ab, lag aber selbst bei Inkubationen mit 200 µM H₂S noch deutlich über 50% Luftsättigung.

Oxisch-sulfidische Inkubationen mit *Cyprideis torosa* wurden in einem ähnlichen Durchflußsystem (Kammervolumen 1 ml) bei 1 mM H₂S (1046±131 µM; 198±7 µM O₂ bzw. 70,2±2,6% Luftsättigung) mit künstlichem, belüfteten Meerwasser (14‰, gepuffert mit 10 mM HEPES, pH 7,8) und einer 100 mM H₂S-Stammlösung bei einer Gesamtdurchflußgeschwindigkeit von 83 ml·h⁻¹ durchgeführt. Das Durchflußsystem befand sich in einem temperaturkonstanten Wasserbad (16°C).

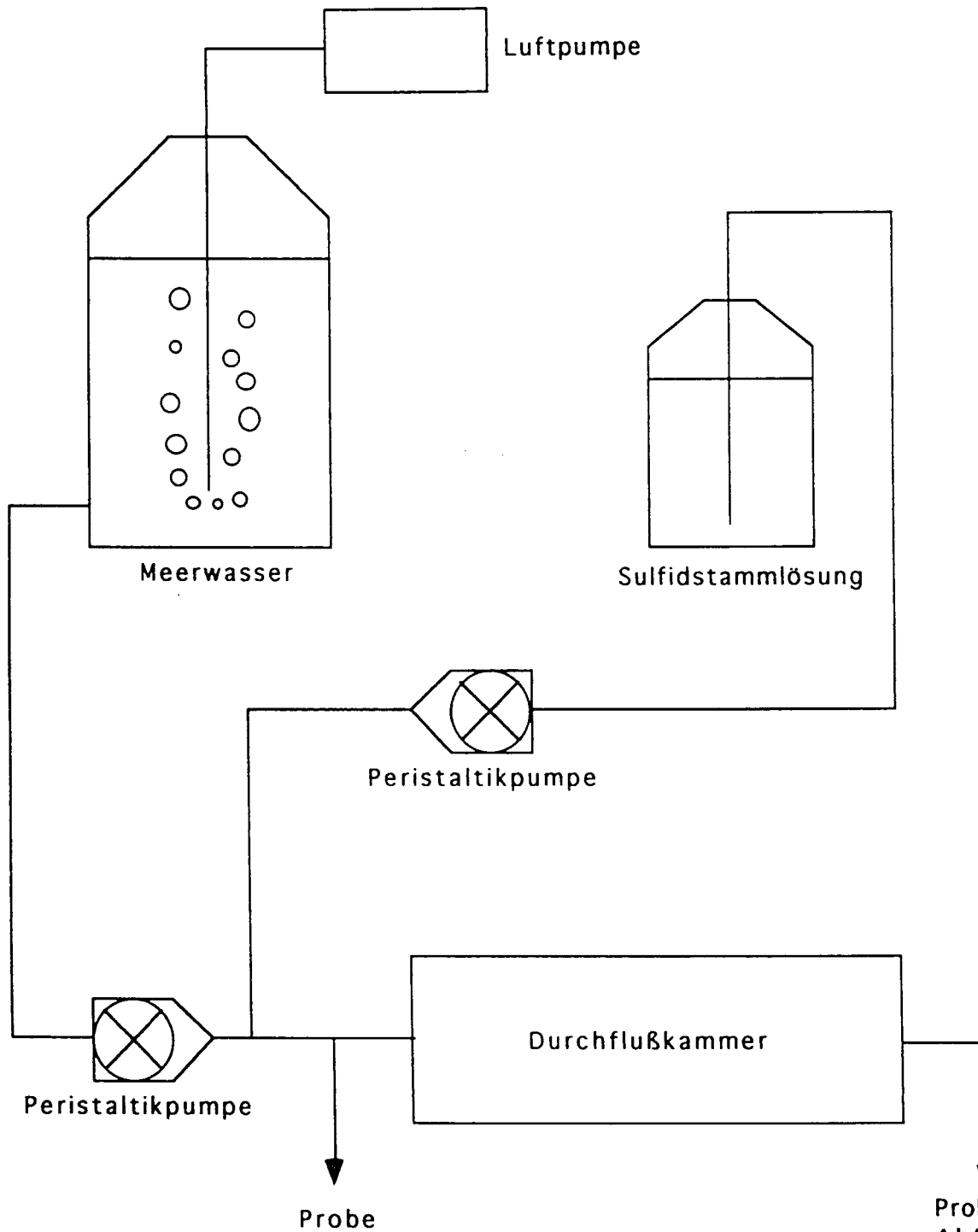


Abb. 5. Versuchsanlage für oxisch-sulfidische Inkubationen. Die Versuchstiere befanden sich in der Durchflußkammer, durch die über zwei Peristaltikpumpen gleichzeitig belüftetes Meerwasser und eine Sulfidstammmlösung geleitet wurde. Vor und hinter der Kammer konnten Proben zur Bestimmung des Sulfid- und Sauerstoffgehaltes entnommen werden.

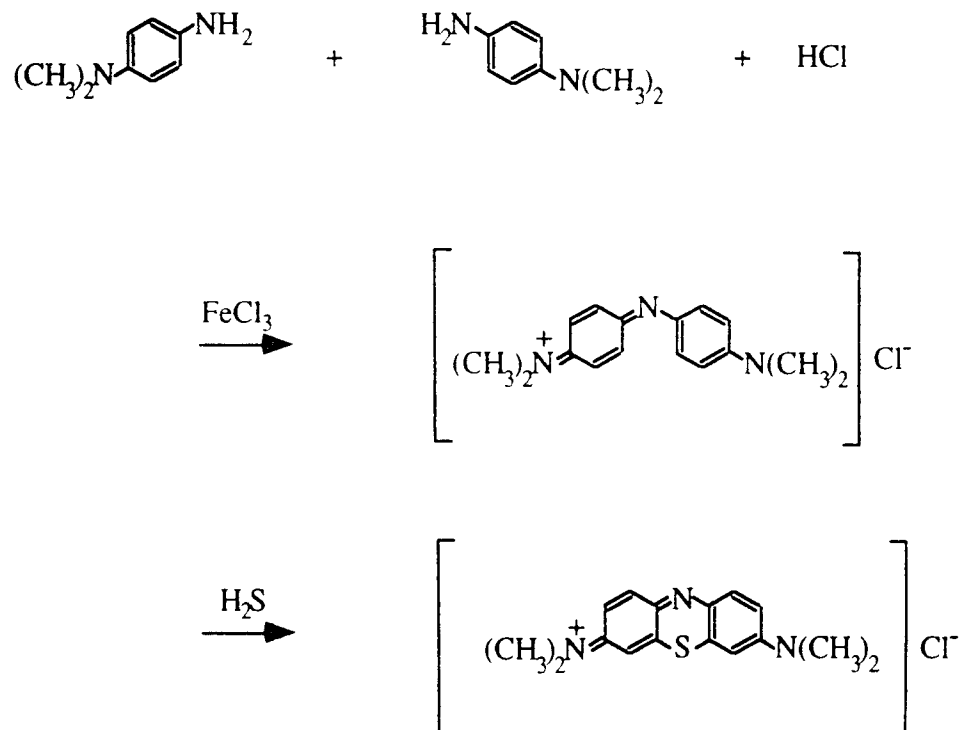
3.3 Abiotische Parameter der Inkubationen

3.3.1 pH-Wert

Der pH-Wert wurde mit einer Mikro-pH-Einstabmeßkette der Firma Ingold (Typ LoT-406-M6-DXK-S7) und einem WTW-pH-Meter (pH 196) gemessen.

3.3.2 Sulfid

Die Bestimmung der Sulfidkonzentration erfolgte mit der Methyleneblau-Methode (Cline 1969, Gilboa-Garber 1971, APHA 1976, Fonselius 1983, Howarth *et al.* 1983, van Handel 1987). Hierzu wurden 10 µl Diamin-Reagenz (2 g N,N-Dimethyl-p-phenylen-diamin-dihydrochlorid/500 ml 6 M HCl) mit 1000 µl Probe (nach Bedarf mit sauerstofffreien Wasser verdünnt) und 10 µl Eisen-3-chlorid-Lösung (8 g FeCl₃·6H₂O/500 ml 6 M HCl) versetzt und ca. zehn Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Es entsteht im sauren Milieu, durch Eisenchlorid katalysiert, Methyleneblau (Fonselius 1983):





 Probe +

 Abfluß

Die Extinktion des Methylenblaus wurde mit einem Photometer (UV-1202, Shimadzu) bei 670 nm gemessen. Von jeder Probe wurden drei Parallelen genommen. Eine Meßreihe ergab, daß das Produkt über eine Woche stabil bleibt. Es war daher möglich, Sulfid aus Porenwasseranalysen (vgl. Kap. 2) sofort mit Diamin zu fixieren und erst später zu messen, falls kein Photometer unmittelbar zur Verfügung stand.

Die Kalibrierung erfolgte im Bereich von 5 bis 40 μM H_2S . Hierzu wurde eine etwa 10 mM H_2S -Stammlösung durch Lösen von gewaschenen $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ -Kristallen in mit Stickstoff begasten destillierten Wasser hergestellt, mit Argon überschichtet und für die Eichkurve entsprechend verdünnt. Aufgrund des wechselnden Anteils an Kristallwasser des Natriumsulfids läßt sich eine exakte H_2S -Konzentration nicht gravimetrisch einstellen. Die genaue Konzentration der Stammlösung mußte daher durch jodometrische Titration ermittelt werden (APHA 1976, Jander & Jahr 1986). Etwa 50 ml Wasser wurden mit genau 10 ml 10 mM Jodlösung (ca. 20 g KI + 2,5381 g I_2 /l), 2 ml 6 M HCl und genau 5 ml der H_2S -Stammlösung versetzt. Es entsteht I_3^- , das mit H_2S weiter reagiert:



Das überschüssige, gelb gefärbte I_3^- wurde mit 20 mM Natriumthiosulfatlösung mit Stärke als Indikator (1 g/100 ml) bis zum Farbumschlag titriert:



Die H_2S -Konzentration c_S berechnet sich dann aus:

$$c_S = \frac{c_I V_I - \frac{1}{2} c_T V_T}{V_S} \quad (1)$$

Hierbei ist c_I die Konzentration der Jodlösung (10 mM), V_I das Volumen der Jodlösung (10 ml), c_T die Konzentration der Thiosulfatlösung (20 mM), V_T das verbrauchte Volumen an Thiosulfat und V_S das eingesetzte Volumen des Sulfidstandards (5 ml).

Da Thiosulfat mit der Zeit durch den Luftsauerstoff oxidiert wird, mußte die exakte Konzentration der Thiosulfatlösung vor der Titration bestimmt werden. Hierzu wurden ca. 50 ml Wasser mit 1 ml 50%iger H_2SO_4 , 0,5 ml alkalischer Kaliumjodidlösung (60 g KI + 30 g KOH/100 ml), 0,5 ml 1,85 M $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und genau 10 ml $1,6 \text{ mM}$ Kaliumjodatlösung (356,67 mg KIO_3/l) versetzt. Auch hier entsteht I_3^- , das mit Thiosulfat titriert werden kann:



6 mol verbrauchtes Thiosulfat entsprechen 1 mol KIO_3 . Für die Konzentration der verbrauchten Thiosulfatlösung c_T gilt dann

$$c_T = \frac{6 c_{\text{IO}_3} V_{\text{IO}_3}}{V_T} \quad (2)$$

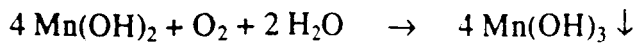
mit der Konzentration c_{IO_3} ($1,6 \text{ mM}$) und dem Volumen V_{IO_3} (10 ml) der Jodatlösung. Bei einer 20 mM Thiosulfatlösung sollten genau 5 ml Thiosulfat verbraucht werden. Es läßt sich daher für die exakte Konzentration der Thiosulfatlösung ein Korrekturfaktor f bestimmen, der in Gl. (1) eingesetzt wird (Grasshoff 1983):

$$f = \frac{5 \text{ ml}}{V_T} \quad (3)$$

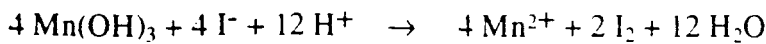
3.3.3 Sauerstoff

Der Sauerstoffgehalt des Inkubationsmediums wurde nach Winkler (Grasshoff 1983) bestimmt. Da Sulfid die Winkler-Bestimmung stört, mußte bei sulfidischen Lösungen eine modifizierte Sauerstoffbestimmung nach Ingvorsen & Jørgensen (1979) durchgeführt werden. Hierzu wurde das Medium zunächst in Winklerflaschen (ca. 100 ml) luftblasenfrei mit einem Schlauch überführt und das Sulfid durch Zugabe von 0,5 ml 1 M ZnSO_4 und 1 ml 1 M NaOH gefällt. Nachdem sich das gefällte Zinksulfid bei Dunkelheit für mindestens eine Stunde absetzen konnte, wurde der Überstand über einen Schlauch luftblasenfrei in eine kleinere Winklerflaschen (ca. 30 ml) überführt und mit 0,5 ml 1,85 M $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und 0,5 ml alka-

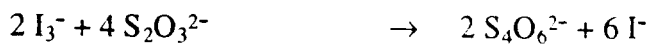
lischer Kaliumjodidlösung (60 g KI + 30 g KOH/100 ml) versetzt. Hierbei wird Sauerstoff als Manganhydroxid gefällt:



Nach Absetzung des Niederschlags wurde er mit 1 ml 50%iger H_2SO_4 gelöst:



Das entstehende I_3^- wurde wie bei der Sulfidbestimmung (Kap. 3.3.2) mit Natriumthiosulfat titriert:



Da 1 mol Sauerstoff 4 mol verbrauchtem Thiosulfat entspricht, berechnet sich die Sauerstoffkonzentration c_{O_2} durch:

$$c_{\text{O}_2} = \frac{\frac{1}{4} c_{\text{T}} V_{\text{T}}}{V_{\text{F}} - V_{\text{R}}} \quad (4)$$

Hierbei ist c_{T} die Konzentration der Thiosulfatlösung (20 mM). V_{T} das verbrauchte Volumen an Thiosulfat, V_{F} das Volumen der Winklerflasche und V_{R} das Volumen der zugesetzten Reagenzien (1 ml). Die exakte Konzentration der Thiosulfatlösung wurde mit Hilfe von Kaliumjodat wie oben beschrieben (Kap. 3.3.2) ermittelt. Einsetzen der Thiosulfatkonzentration und des Korrekturfaktors f liefert:

$$c_{\text{O}_2} = \frac{5000 f V_{\text{T}}}{V_{\text{F}} - V_{\text{R}}} \quad [\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}] \quad (5)$$

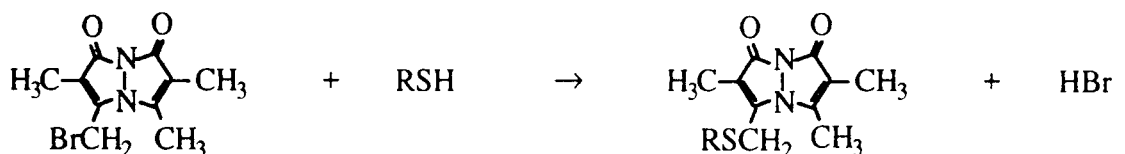
4 Toleranzversuche

Zur Ermittlung der Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel und/oder Schwefelwasserstoff wurden die Versuchstiere unter hypoxischen, hypoxisch-sulfidischen und oxisch-sulfidischen Bedingungen, wie in Kap. 3 beschrieben, inkubiert und die Zahl der überlebenden Tiere täglich gezählt. Als Überlebenskriterium diente die Bewegungsfähigkeit bzw. die Schließmuskelaktivität nach mechanischem Reiz. Abgestorbene Tiere wurden aus den Inkubationskammern entfernt. Der Zeitpunkt, nach dem die Hälfte der Tiere gestorben waren, wurde als LT_{50} ("lethal time") bezeichnet (Clark 1992).

5 Chemische Analysen im Gewebe der Versuchstiere

5.1 Reduzierte Schwefelkomponenten

Die Bestimmung der Gewebkonzentrationen an Sulfid, Thiosulfat, Sulfit und reduziertem Glutathion erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High-performance liquid chromatography = HPLC) über Derivatisierung mit Monobrombiman (Fahey *et al.* 1980, 1981, Newton *et al.* 1981, Imai *et al.* 1984, Vetter *et al.* 1989). Biman ($C_{10}H_{11}BrN_2O_2$) bildet im neutralen Milieu mit reduzierten Schwefelkomponenten (Thiole) fluoreszierende Derivate, die stabil, aber lichtempfindlich sind (Newton *et al.* 1981):



Es wurden einzelne Exemplare von *Macoma balthica* ohne Schale und ohne Kristallkegel homogenisiert. Bei *Cyprideis torosa* wurden für eine Probe etwa 100 Tiere (einschließlich Carapax) zusammen genommen und homogenisiert. Um die Masse der hierbei mit einge-

gangenen Schalen zu bestimmen, wurden Exemplare gewogen, einen Tag bei 60°C getrocknet und erneut gewogen (Trockenmasse mit Schalen) und anschließend zwei Stunden bei 550°C erhitzt und wieder gewogen (Aschenmasse mit Schalen). Da die Asche der Weichteile im Vergleich zu den Schalen vernachlässigbar ist, konnte die Aschenmasse mit Schalen der Schalenmasse gleichgesetzt werden.

Zur Analyse wurde das Gewebe der Versuchstiere (ca. 20 - 200 mg) trockengetupft, kleingeschnitten und in einem vorgewogenen Glashomogenisator (2 ml; Schütt) gewogen. Anschließend wurde es mit 20 µl 30 mM Bisan (0,8 mg/100 µl Acetonitril; Calbiochem) und 200 µl HEPES-Puffer (Fluka; 200 mM; pH 8.0) mit einem Glaspistill (Schütt) homogenisiert und in einem Eppendorfgefäß zehn Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Das Gewebe wurde mit einer Heraeus-Laboratoriumszentrifuge (Biofuge A) bei maximaler Drehzahl (ca. 14.500 g) kurz abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 110 µl mit 100 µl Acetonitril (Fluka) für zehn Minuten bei 56°C zur Proteinfällung inkubiert. Die Erhitzung führte nicht zu einer Zersetzung der Derivate, wie mit Standards ermittelt werden konnte. Anschließend wurden zur Stabilisierung der Derivate 290 µl 25 mM Methansulfonsäure (Fluka) hinzugegeben. Die Proben konnten dann dunkel und kühl mehrere Tage gelagert werden. Unmittelbar vor Aufgabe auf die HPLC-Anlage wurden sie drei Minuten bei ca. 14.500 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl in die Anlage injiziert.

Die Trennung erfolgte durch einen binären Gradienten mit folgenden Laufmitteln:

Laufmittel A: 0,25%ige Essigsäure (Fluka);
aus destilliertem, deionisiertem (Seralpur Pro 90 C) Wasser;
mit Natriumacetat (Sigma) auf pH 4.0 eingestellt

Laufmittel B: Methanol (HPLC-grade; Biomol)

Die Laufmittel wurden unter Vakuum im Ultraschallbad entgast. Zur Vermeidung von Kontamination durch Mikroorganismen, die zur Verstopfung der Kapillaren führt, wurde Laufmittel A vorher steril filtriert. Der Trennungsgradient ist aus Tab. 1 zu ersehen.

Es wurde eine HPLC-Apparatur der Firma Kontron Instruments, ausgestattet mit dem Steuerprogramm Data System 450-MT (Version 3.01), verwendet. Das Programm steuerte über einen Multiport (Kontron PN 99-00290) die Zusammensetzung der Laufmittel und nahm gleichzeitig die Meßwerte auf. Die beiden Laufmittel wurden über zwei Zweikolbenpumpen (Kontron HPLC-Pumpe 420 mit Pumpenkopf 91-00504) in einer Mischkammer (Kontron

HPLC-Mixer 800; 91-00387) vermischt (Flußrate: $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Zur Probenaufgabe wurde ein Rheodyne Injektionsventil mit einer $20\text{-}\mu\text{l}$ -Probenschleife verwendet. Als Trennsäule diente eine 25 cm lange "reversed-Phase"-C18-Säule mit einer Korngröße von $5 \mu\text{m}$ der Firma Latek ($250\times 4 \text{ Spherisorb C18-1 } 5\mu$) mit Vorsäule (Latek Kartuschensystem 3001-K mit ODS-1- 5μ). Die Säule wurde nachts mit einer Flußrate von $0,05 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ mit Laufmittel B (Methanol) gespült. Die Messung der Derivate erfolgte mit einem Spektralfluorimeter (Kontron SFM 25) bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm , einer Emissionswellenlänge von 480 nm und einem Verstärkungsgrad von 400 V .

Tab. 1. Trennungsbedingungen der HPLC-Analyse reduzierter Schwefelkomponenten.

Laufmittel A: 0,25% ige Essigsäure (pH 4,0)
 Laufmittel B: Methanol
 Injektionsvolumen: $20 \mu\text{l}$
 Flußrate: $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
 Säule: $250\times 4 \text{ Spherisorb C18-1 } 5\mu$ mit ODS-1- 5μ Vorsäule
 Anregungswellenlänge: 380 nm
 Emissionswellenlänge: 480 nm

Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0	12
5	12
7,5	18
20	35
29	39
38	100
39	100
49	12
50	12

Zur Kalibrierung wurden Standards aus $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (in entgastem HEPES-Puffer; 200 mM ; pH 8,0), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (in aqua dest.), Na_2SO_3 und Glutathion (in 10 mM Methansulfonsäure) mit einer jeweiligen Konzentration von 10 mM hergestellt. Die exakte Konzentration des Sulfidstandards wurde jodometrisch ermittelt (vgl. Kap. 3.3.2). Von jedem Standard wurden $100 \mu\text{l}$ mit $100 \mu\text{l}$ 30 mM Biman und $300 \mu\text{l}$ HEPES-Puffer (200 mM ; pH 8,0) versetzt und zehn Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach der Derivatisierung wurden $500 \mu\text{l}$ 50 mM Methansulfonsäure hinzugegeben. Die derivatisierten

Einzelstandards (1 mM) konnten bei Dunkelheit und -15°C gelagert werden. Aus jedem Standard wurden $10\ \mu\text{l}$ entnommen und mit destilliertem, deionisiertem Wasser auf $100\ \mu\text{l}$ aufgefüllt, so daß ein Multistandardgemisch mit einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ jedes Thiols entstand. Zu diesem Multistandard wurden $100\ \mu\text{l}$ Acetonitril und $300\ \mu\text{l}$ 25 mM Methansulfonsäure hinzugegeben. Bei einem Injektionsvolumen von $20\ \mu\text{l}$ wurden somit $400\ \text{pmol}$ eines Thiols auf die Trennsäule aufgetragen. Da der letzte Verdünnungsschritt der Aufbereitung der Gewebeprouen gleich (s.o.), brauchte er bei der Kalibrierung nicht berücksichtigt zu werden. Jeder Einzelstandard entsprach, da die Gewebeprouen in $200\ \mu\text{l}$ Puffer homogenisiert waren, einer Absolutmenge von $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \cdot 200\ \mu\text{l} = 20\ \text{nmol}$ im Gewebe. Die berechnete Menge konnte dann auf die Gewebewinwaage bezogen werden. Die Nachweisgrenze lag, je nach Fluoreszenzausbeute, bei etwa $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $0.02\ \text{nmol}$. Bei einer Einwaage von $100\ \text{mg}$ konnten also noch $0.2\ \text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse nachgewiesen werden. Das Chromatogramm eines Multistandards zeigt Abb. 6.

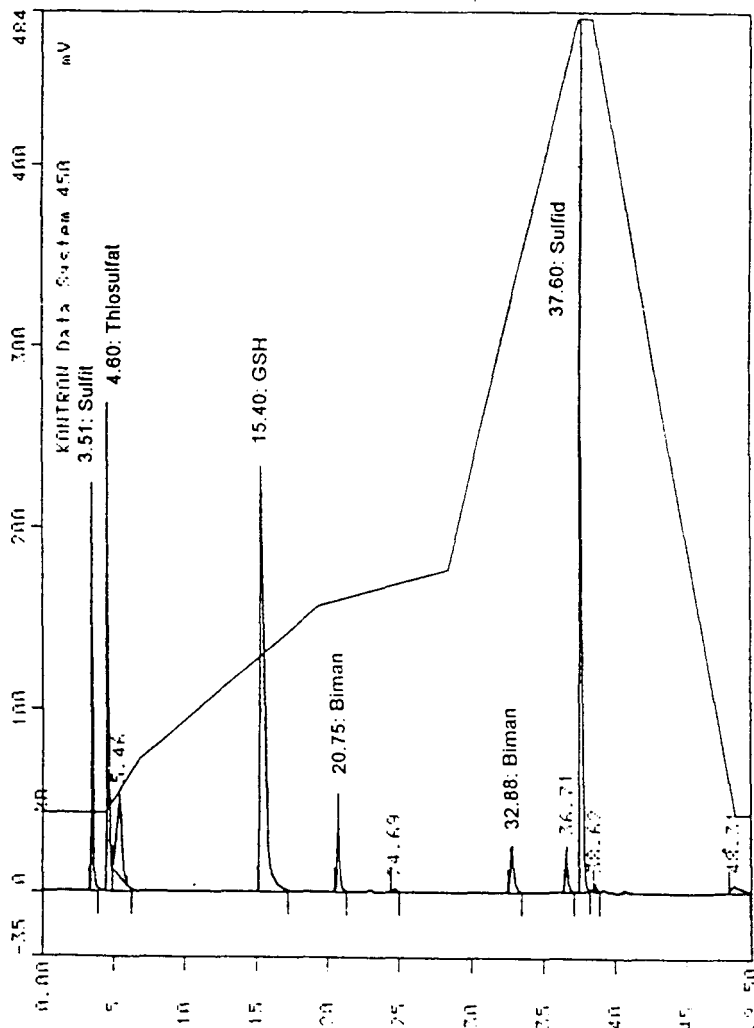


Abb. 6. Chromatographische Trennung eines Multistandardgemisches ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $20\ \text{nmol}$ je Thiol). Der Verlauf des Gradienten ist mit eingezeichnet. Weitere Einzelheiten s. Tab. 1

Falls in einer Probe ein "Peak" nicht eindeutig einem Thiol zugeordnet werden konnte, wurde zur sicheren Identifizierung die Probe zusammen mit einem Einzelstandard noch einmal aufgegeben. Außerdem wurden einige Proben vor der Zugabe von Biman mit 2,2-Dithiodipyridin (2-Pyridyldisulfid; PDS: 50 mM) versetzt. PDS verhindert die Derivatisierung mit Biman (Vetter *et al.* 1989), so daß es sich bei den "Peaks", die auch in den PDS-Kontrollen vorhanden waren, nicht um Thiole handeln konnte.

5.2 Elementarer Schwefel

Mit Monobrombiman werden nur reduzierte Schwefelverbindungen umgesetzt, andere potentielle Sulfidoxidaionsprodukte, wie elementarer Schwefel, können mit dieser Methode nicht erfaßt werden. Um zu untersuchen, inwieweit auch elementarer Schwefel bei der Sulfidoxidation gebildet wird, wurde der Schwefelgehalt von Gewebeproben nach Lauren & Watkinson (1985) und Nielsen (1994) mittels HPLC bestimmt. Elementarschwefel liegt in seiner stabilsten Form als S₈-Ring vor und ist im Wasser praktisch unlöslich (Steudel *et al.* 1987, 1988). Er muß daher mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden.

Das trockengetupfte Gewebe (ca. 20 - 200 mg) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einem Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff gemörsert und in einem vorgekühlten Glashomogenisator (Schütt) gewogen. Das Gewebe wurde unter Eiskühlung mit 500 µl eiskalten Chloroform (HPLC-grade: Biomol) mit einem Glaspistill homogenisiert und quantitativ in ein gekühltes Eppendorfgefäß überführt. Das Gefäß wurde verschlossen und einen Tag unter Eiskühlung geschüttelt. Anschließend wurde es kurz bei etwa 10.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl in die HPLC-Anlage, die in Kap. 5.1 beschrieben ist, injiziert.

Die Trennung erfolgte mit einer PRP-1 Säule (150x4,1mm; Hamilton) mit Vorsäule (ODS-1-5µ; Latek). Als Laufmittel wurde ein Methanol-Chloroform-Gemisch (50:50; HPLC-grade, Biomol) verwendet. Ein Lauf dauerte 5,5 Minuten bei einer Flußrate von 1,5 ml·min⁻¹. Über Nacht wurde die Säule mit 100% Methanol gespült (0,05 ml·min⁻¹). Die Messung erfolgte mit einem LDC UVIII Photometer bei einer Wellenlänge von 254 nm (Empfindlichkeit: 0,002 a.u.f.s.).

Zur Kalibrierung wurden 25.648 mg Schwefel (= 100 µmol S₈) in 100 ml eiskaltes Chloroform gelöst und einen Tag unter Eiskühlung geschüttelt. Hiervon wurden 25 µl

(= 25 nmol S₈) entnommen, mit Chloroform auf das Endvolumen von 500 µl aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 0,1 nmol, so daß bei einer Einwaage von 100 mg noch 1 nmol·g⁻¹ Frischmasse gemessen werden konnten. Das Chromatogramm eines Standards zeigt Abb. 7.

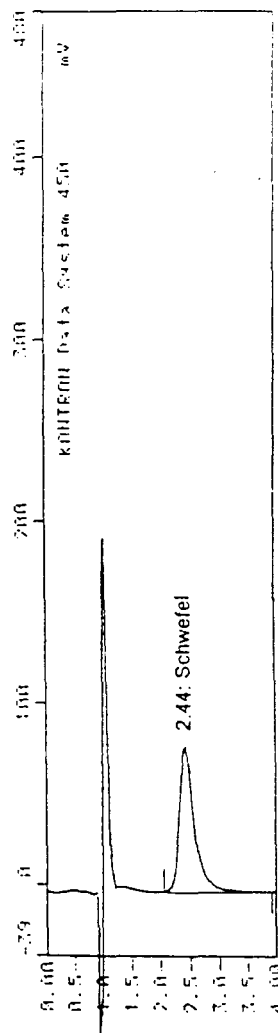


Abb. 7. Chromatographische Trennung von Elementarschwefel (25 nmol S₈). Laufmittel: Methanol-Chloroform (50:50); Injektionsvolumen: 20 µl; Flußrate: 1,5 ml·min⁻¹; Säule: PRP-1 150x4.1mm mit ODS-1-5µ Vorsäule; Wellenlänge: 254 nm

Hierbei ist ΔE die Extinktionsdifferenz, ϵ der millimolare Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm ($6,31 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), d die Schichtdicke der Küvette (1 cm), V_K das Gesamtvolumen in der Küvette und V_P das eingesetzte Probenvolumen in der Küvette.

Für die Analyse wurde ein Puffer aus 0.1 M Triethanolamin (Fluka), 20 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka), 0,5 mM NADH (Biomol), 1,5 mM Inosin-5'-triphosphat (ITP; Boehringer Mannheim), 2,4 mM Phosphoenolpyruvat (PEP; Fluka) und 0.7 mM Coenzym A (CoA; Biomol) hergestellt und mit HCl auf pH 7,6 eingestellt. Hiervon wurden 600 μl mit 100 μl Probe versetzt. Um das bereits in der Probe vorhandene Pyruvat zu entfernen, wurden zuerst 5 μl Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase (PK/LDH; Boehringer Mannheim) hinzugegeben. Nach Ablauf der Vorreaktion wurde die Hauptreaktion durch Zugabe von 5 μl Succinyl-CoA-Synthetase (SCS; Boehringer Mannheim) gestartet. Die Extinktionsabnahme wurde bei 340 nm mit einem Photometer der Firma Kontron (Uvikon 810P) gemessen. Der Testansatz wurde zuvor durch Einsetzen einer 1 mM Succinat-Standardlösung überprüft. Nach Ablauf der Reaktion blieb durch eine Schleichreaktion eine kontinuierliche Extinktionsabnahme erhalten, die bei der Bestimmung von ΔE rechnerisch berücksichtigt werden mußte. Aus dem korrigierten Extinktionswert wurde nach Gl. (6) die Succinatkonzentration im Homogenat ermittelt. Unter Berücksichtigung von Extraktionsvolumen und Einwaage konnte daraus die Succinatkonzentration im Gewebe berechnet werden.

5.4 Cytochrom-c-Oxidase

Die Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase erfolgte nach Hand & Somero (1983). Hierzu wurde das kleingeschnittene Gewebe mehrerer Plattmuscheln (ca. 1 g) in 10 ml Kaliumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,4) mit einem Heidolph-Homogenisator bei 300 rpm homogenisiert und 15 Minuten bei 2000 g und 0°C zentrifugiert (Heraeus Omnifuge). Das Pellet wurde in Puffer resuspendiert und erneut 15 Minuten (2000 g) zentrifugiert. Die Überstände beider Zentrifugationen wurde zusammengegeben, mit 1 M Essigsäure auf pH 5,6 eingestellt (Säure-Präzipitation) und mit einer Ultrazentrifuge (Beckman Spinco L50) 15 Minuten bei 5000 g und 0°C zentrifugiert. Das hierbei entstehende Pellet wurde in 500 μl Homogenisationspuffer resuspendiert.

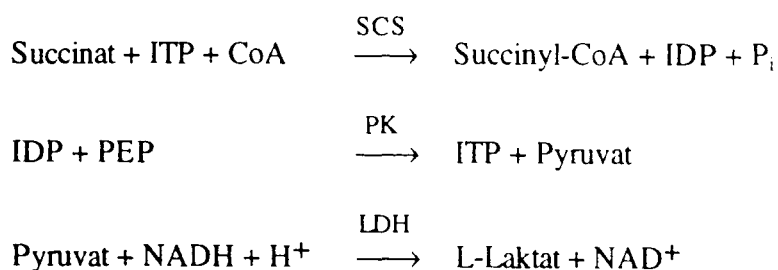
Als Substrat wurde 25 mg Cytochrom c (Fluka) in 2 ml mit N_2 begasten Kaliumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,0; 1 mM EDTA) gelöst und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert. Überschüssiges Dithionit und dessen Reaktionsprodukte mußten durch Gelfiltration

5.3 Succinat

Der Succinatgehalt im Gewebe der Tiere wurde als Indikator für einen anaeroben Stoffwechsel verwendet (Gäde & Grieshaber 1989). Bei *Macoma balthica* wurden dazu ganze Tiere (ohne Schale und Kristallkegel) untersucht. Für die Succinatanalyse von *Cyprideis torosa* wurden etwa 300 Tiere für eine Probe zusammengenommen.

Unmittelbar nach den experimentellen Inkubationen (vgl. Kap. 3) wurde das Gewebe (ca. 100 mg) trockengetupft und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das tiefgefrorene Gewebe wurde in einem vorgekühlten Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und einem vorgewogenen und vorgekühlten Glashomogenisator (Schütt) überführt. Nach der Massebestimmung wurde es mit dem etwa zehnfachen Volumen (m/V) an eisgekühlter 0,33 M Perchlorsäure unter Eiskühlung mit einem Glaspistill homogenisiert und anschließend zehn Minuten bei ca. 10.000 g unter Kühlung zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 M KOH und 3 M KHCO_3 neutralisiert. Das entstandene schwerlösliche Kaliumperchlorat wurde in zwei Minuten bei ca. 10.000 g abzentrifugiert. Bei der Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß erfolgte die Volumenbestimmung. Die Perchlorsäureextrakte konnten dann tiefgefroren gelagert werden.

Die Succinatkonzentration der Extrakte wurde enzymatisch nach Beutler (1985) bestimmt. Das Prinzip der Methode beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Succinat, wobei im stöchiometrischen Verhältnis NADH zu NAD^+ oxidiert wird:



Im Gegensatz zu NAD^+ absorbiert NADH bei 340 nm, so daß es bei dieser Wellenlänge zu einer Extinktionsabnahme kommt. Über das Lambert-Beersche Gesetz kann die Konzentration c an verbrauchten NADH, das der Succinatkonzentration entspricht, berechnet werden:

$$c = \frac{\Delta E V_K}{\epsilon d V_p} \quad (6)$$

entfernt werden. Hierzu wurde Sephadex G-25 in Phosphatpuffer (10 mM; pH 7,0; 1 mM EDTA) äquilibriert und mit Stickstoff begast. Anschließend wurde die Lösung auf Sephadexröhrchen, die jeweils in einem Zentrifugenröhrchen saßen, verteilt und zwei Minuten bei 2000 g und 0°C zentrifugiert. Jeweils 500 µl gereinigte Cytochrom-c-Lösung wurden durch Auftragen auf ein Sephadexröhrchen und Zentrifugation für zwei Minuten bei 2000 g und 0°C gewonnen. Die gereinigten Lösungen wurden gesammelt, mit Argon überschichtet und waren für mehrere Tage bei -15°C haltbar.

Die Aktivitätsmessung erfolgte photometrisch mit einem Kontron-Uvikon-941-Photometer. Hierzu wurden 500 µl Kaliumphosphatpuffer (200 mM; pH 6,0; 1 mM EDTA) mit 50 µl Cytochrom-c-Lösung versetzt. Die Reaktion wurde mit 10 bis 100 µl Probe gestartet, wobei das Gesamtküvettenvolumen mit destilliertem Wasser auf 1000 µl ausgeglichen war. Die zeitliche Extinktionsänderung wurde bei 550 nm gemessen. Da das Substrat im Überschuß vorlag, lief die Reaktion mit konstanter Geschwindigkeit ab. Nach Gl. (6) konnte die zeitliche Konzentrationsänderung (millimolarer Extinktionskoeffizient ϵ für Cytochrom $c = 18,5 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) und hieraus die Enzymaktivität in $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ berechnet werden, wobei 1 U ("unit") definiert ist als ein Substratumsatz von $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Parallel wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt (vgl. Kap. 5.8), so daß die Enzymaktivität auf den Proteingehalt ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein) bezogen werden konnte.

Zur Bestimmung der Inhibitionskonstante K_I für H_2S (50% Hemmung) wurde die Enzymaktivität nach Zugabe verschiedener Sulfidkonzentrationen gemessen. Durch Auftragung der Enzymaktivität gegen die H_2S -Konzentration konnte mittels eines Computerprogramms nach Job *et al.* (1978) die Inhibitionskonstante ermittelt werden.

5.5 Katalase

Katalase katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid:



Zur Bestimmung der Katalase-Aktivität wurde das Gewebe (ca. 100 mg) in flüssigem Stickstoff gemörsert, in vorgekühlte Eppendorfgefäße eingewogen, mit dem etwa zehnfachen Volumen (m/V) an Kaliumphosphatpuffer (50 mM; pH 7,0; 0,1% Triton X-100) versetzt und

mit Hilfe eines hochoberflächigen Zahnarztbohrers 30 Sekunden unter Eiskühlung homogenisiert. Die Homogenate konnten dann bei -80°C gelagert werden. Vor der Messung wurde das Gewebe zehn Minuten bei 14.500 g abzentrifugiert.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte photometrisch (Kontron Uvikon 810P) nach Aebi (1985). Als Substrat wurde eine 0,1%ige H_2O_2 -Lösung aus 35 μl Perhydrol (30% H_2O_2 , Merck) in 10 ml Phosphatpuffer (50 mM; pH 7.0) verwendet. Die Extinktion der Substratlösung bei 240 nm wurde durch Zugabe von Puffer oder H_2O_2 auf etwa 1,35 Extinktionseinheiten eingestellt. Der Nullabgleich der Proben wurde mit einem Volumen von 10 bis 100 μl , mit Phosphatpuffer auf 1000 μl aufgefüllt, durchgeführt. Zur Aktivitätsmessung wurden 350 μl der Substratlösung mit 550 bis 640 μl Phosphatpuffer versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der entsprechenden Probenmenge (10 bis 100 μl), bei einem Gesamtvolumen von 1000 μl , gestartet. Der zeitliche Verlauf der Extinktionsabnahme (Verbrauch von H_2O_2) wurde bei 240 nm gemessen. Der Testansatz wurde zuvor durch Einsetzen von 5 μl eines Katalasestandard (Sigma; 1 mg/2.6 ml Phosphatpuffer = 1 U·ml⁻¹ nach Definition von Sigma, s.u.) überprüft.

Katalase wird durch Substratüberschuß gehemmt (Aebi 1985). Die Messung konnte daher nicht im Substratsättigungsbereich, sondern nur bei geringen H_2O_2 -Konzentrationen durchgeführt werden. Es handelt sich dann nicht um eine Reaktion nullter Ordnung wie bei Cytochrom-c-Oxidase, bei der der Substratumsatz unabhängig ist von der Substratkonzentration, sondern um eine Reaktion erster Ordnung (Bergmeyer 1955). Hier ist der Substratumsatz proportional zur Substratkonzentration und ändert sich somit zeitlich. Es ist daher nicht möglich, nach Gl. (6) die Enzymaktivität in U·ml⁻¹ zu berechnen. Stattdessen läßt sich die Enzymaktivität durch die Reaktionskonstante k ausdrücken.

Für eine Reaktion erster Ordnung gilt:

$$-\frac{dc}{dt} = kc \quad (7)$$

Hierbei ist $-dc/dt$ die zeitliche Abnahme der Substratkonzentration c und k die Reaktionskonstante.

Nach Integration zwischen der Anfangskonzentration c_0 und der Endkonzentration c bzw. zwischen der Zeit $t = 0$ und $t = t$ erhält man:

$$-\int_{c_0}^c \frac{1}{c} dc = k \int_0^t dt$$

$$\Leftrightarrow k = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c} \quad (8)$$

Da über das Lambert-Beersche Gesetz Konzentration und Extinktion proportional sind, ist Gl. (8) äquivalent zu:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{E_0}{E} \quad (9)$$

Die Reaktionskonstante k läßt sich also aus der Anfangsextinktion E_0 und der Extinktion E nach einer gemessenen Zeit t bestimmen.

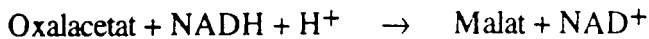
Die Firma Sigma definiert für ihre Katalasestandards eigene "Sigma units". Hier ist 1 U definiert als 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ -Umsatz pro Minute, der bei pH 7.0, 25°C, einer Anfangsextinktion von 0,450 (10,345 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{ml}^{-1}$) und einer Endextinktion von 0,400 (9,195 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{ml}^{-1}$) gemessen worden ist. Es ist dabei zu beachten, daß diese Definition nur für diese Randbedingungen, insbesondere für den gegebenen Extinktionsbereich gültig ist. Da in der Literatur jedoch häufig die Katalase-Aktivität in diesen "Sigma units" angegeben werden, wurde die nach Gl. (9) ermittelte Reaktionskonstante in "units" wie folgt umgerechnet.

Nach den Bedingungen von Sigma (Extinktionsabnahme von 0,450 auf 0,400) werden 1,150 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{ml}^{-1}$ umgesetzt. Bei einer Enzymaktivität von 1 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($= 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = 1 \mu\text{mol} \cdot 60^{-1} \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) werden somit 1,150 $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} / 1 \mu\text{mol} \cdot 60^{-1} \text{s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = 69 \text{ s}$ benötigt. Einsetzen in Gl. (9) ergibt ein k von $1,707 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert liefert reziprok einen Umrechnungsfaktor von 585,82 s. Es konnte so neben den Reaktionskonstanten die Katalase-Aktivitäten in $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ angegeben werden. Die Daten wurden auf den Proteingehalt bezogen (vgl. Kap. 5.8).

Zur Ermittlung der Inhibition wurde die Probe bei unterschiedlichen Sulfidkonzentrationen 15 Minuten inkubiert und dann wie oben beschrieben gemessen. Hieraus wurde die Inhibitionskonstante K_1 für H_2S , wie unter 5.4 beschrieben, berechnet. Zur Kontrolle wurde auch die Inhibition durch Natriumazid bestimmt.

5.6 Malatdehydrogenase

Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert folgende Reaktion:



Das Gewebe (ca. 100 mg) wurde in dem etwa dreifachen Volumen (*m/V*) an Extraktionspuffer (50 mM Imidazol-HCl; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 100 mM NaF; pH 7.0) mit einigen Kristallen von Phenylmethylsulfonylfluorid als Protease-Inhibitor in einem Glashomogenisator (Schütt) homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 14.500 *g* zentrifugiert und der Überstand durch Gelfiltration gereinigt (Sephadex G-25; 1 Minute Zentrifugation bei 1900 *g*).

Die Aktivitätsmessung im Überstand erfolgte photometrisch nach Meinardus-Hager & Gäde (1986). Hierzu wurden 775 μl Triethanolpuffer (50 mM; pH 7.6) mit 15 μl NADH (15 mM) und 10 μl Probe versetzt. Die Reaktion wurde mit 200 μl Oxalacetat (0,5 mM) gestartet. Der NADH-Verbrauch wurde bei 340 nm gemessen. Über Gl. (6) konnte hieraus der zeitliche Substratumsatz berechnet (vgl. Kap. 5.4) und auf den Proteingehalt bezogen werden (vgl. Kap. 5.8). Der Testansatz wurde mit MDH von Boehringer Mannheim überprüft.

5.7 Glutamatdehydrogenase

Glutamatdehydrogenase (GDH) katalysiert folgende Reaktion:



Der Gewebeaufschluß erfolgte wie unter 5.6 beschrieben.

Die Messung erfolgte photometrisch bei 340 nm nach Meinardus-Hager & Gäde (1986). Hierzu wurden 980 μl eines Substratgemisches aus 20 mM 2-Oxoglutarat, 100 mM Ammoniumacetat und 1 mM ADP (pH 7.9) mit 10 μl NADH (15 mM) versetzt. Die Reaktion wurde

mit 10 μl Probe gestartet. Die Aktivitätsberechnung erfolgte wie bei MDH (Kap. 5.6). Der Testansatz wurde mit GDH von Boehringer Mannheim überprüft.

5.8 Protein

Die ermittelten Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt bezogen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976). Hierzu wurden die Proben 1:100 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. 100 μl dieser Verdünnung wurden mit 1000 μl filtriertem Bradford-Reagenz (20 mg Coomassie Brilliant Blue G-250; 10 ml Ethanol; 20 ml 85%ige H_3PO_4 ; mit aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt) versetzt, kurz umgerührt und stehen gelassen. Der entstehende Proteinkomplex absorbiert bei 595 nm, neigt aber zur Präzipitatbildung, wodurch die Absorption langsam wieder absinkt. Deshalb wurde die Extinktion bei 595 nm immer nach genau zehn Minuten gegen den Reagenzienblindwert (100 μl 0,9%ige NaCl + 1000 μl Bradford-Reagenz) gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserumalbumin (BSA; Sigma; 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 0,9%ige NaCl) im Bereich von 0,4 bis 15 μg Protein. Die Eichkurve wurde einem Polynom zweiten Grades angepaßt.

6 Apparenter Diffusionskoeffizient und apparente Entgiftungskonstante für Schwefelwasserstoff

6.1 Apparenter Diffusionskoeffizient

Schwefelwasserstoff dringt durch Diffusion in das Gewebe der Tiere ein. Eine wichtige Kenngröße hierfür ist der Diffusionskoeffizient. Es wurde daher ein Verfahren zur Berechnung des apparenten Diffusionskoeffizienten für Gesamtsulfid entwickelt, das im folgenden beschrieben wird.

Wenn im Körper keine Sulfidentgiftung stattfindet, dann steigt die interne H_2S -Konzentration gemäß der Sättigungskinetik nach Michaelis & Menten (1913) an und erreicht

schließlich die H_2S -Außenkonzentration c_0 . Für die Innenkonzentration c zum Zeitpunkt t gilt daher:

$$c(t) = \frac{c_0 t}{\tau + t} \quad (10)$$

Hierbei ist τ analog zur Michaelis-Menten-Konstante die Zeit, nach der die Hälfte der Sättigungskonzentration c_0 erreicht ist.

Die Geschwindigkeit, mit der Sulfid in den Körper eindringt, wird zu Beginn, wenn kein Sulfid im Körper vorliegt, maximal sein. Mit Hilfe der Fickschen Diffusionsgesetze läßt sich diese Geschwindigkeit beschreiben. Nach dem ersten Fickschen Gesetz ist der Fluß der Stoffmenge n in der Zeit t proportional zum Diffusionskoeffizienten D , zur Oberfläche A und zur Änderung der Konzentration c entlang der Diffusionsstrecke x :

$$\frac{\partial n}{\partial t} = -D A \frac{\partial c}{\partial x} \quad (11)$$

Die Stoffmenge n läßt sich über das Volumen V in Konzentration c umrechnen.

$$\begin{aligned} n &= c V \\ \Rightarrow \frac{\partial c}{\partial t} &= -D \frac{A}{V} \frac{\partial c}{\partial x} \end{aligned} \quad (12)$$

Der Konzentrationsanstieg von Schwefelwasserstoff im Gewebe erfolgt also um so schneller, je höher der Diffusionskoeffizient D , das Oberflächen-Volumen-Verhältnis A/V und der Konzentrationsgradient $\partial c/\partial x$ ist. Um das Eindringen von Schwefelwasserstoff in den Körper bei gegebenen Konzentrationsgradienten zu verzögern, sollten benthische Tiere demnach versuchen, ihr Oberflächen-Volumen-Verhältnis oder den Diffusionskoeffizienten für Sulfid möglichst gering zu halten. Der geometrische Körper mit der kleinsten Oberfläche bei gegebenem Volumen ist die Kugel. Zur Bestimmung eines maximalen Diffusionskoeffizienten ist es also sinnvoll, den Tierkörper als Kugel zu beschreiben.

Das zweite Ficksche Gesetz

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (13)$$

beschreibt die Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Steilheit des Konzentrationsgradienten. Hierfür gibt es eine Formulierung in Kugelkoordinaten (Berg 1993):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (14)$$

Die Diffusionsstrecke x wird dabei durch den Kugelradius r ersetzt.

Ist die H_2S -Innenkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten bekannt, dann läßt sich mit Hilfe der Differentialgleichung (14) ein apparenter Diffusionskoeffizient für Gesamtsulfid, der alle Diffusionsbarrieren im Körper zusammenfaßt, berechnen. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß der korrekte Diffusionskoeffizient nur zu Beginn, wenn die Diffusion maximal ist, bestimmt werden kann. Dann gilt:

$$t \ll \tau$$

Gl. (10) vereinfacht sich dann

$$c(t) \rightarrow \frac{c_0}{\tau} t$$

und läßt sich differenzieren:

$$\Leftrightarrow \frac{\partial c}{\partial t} = \frac{c_0}{\tau} \quad (15)$$

Gl. (15) in Gl. (14) liefert:

$$D \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{c_0}{\tau} \quad (16)$$

Substitution mit

$$u = r^2 \frac{\partial c}{\partial r}$$

liefert:

$$D \frac{d u}{d r} = \frac{c_0}{\tau} r^2$$

Der Diffusionsweg beginnt an der Oberfläche ($r = 0$) und läuft entlang des Radius bis zum Mittelpunkt mit dem effektiven Kugelradius $r = r_e$. Die Gleichung wird daher zwischen 0 und $u(r)$ bzw. zwischen 0 und r_e integriert:

$$\begin{aligned} D \int_0^{u(r)} d u &= \frac{c_0}{\tau} \int_0^{r_e} r^2 d r \\ \Leftrightarrow D r^2 \frac{\partial c}{\partial r} &= \frac{c_0}{\tau} \frac{1}{3} r_e^3 \end{aligned}$$

An der Kugeloberfläche ($r = 0$) herrscht die Außenkonzentration c_0 , im Zentrum ($r = r_e$) die Innenkonzentration c_i , die zu Beginn 0 ist. Dies sind die Grenzen der zweiten Integration:

$$\begin{aligned} \Leftrightarrow D \int_{c_i}^{c_i=0} \partial c &= \frac{1}{3} \frac{c_0}{\tau} r_e^3 \int_0^{r_e} r^{-2} \partial r \\ \Leftrightarrow -D c_0 &= -\frac{1}{3} \frac{c_0}{\tau} r_e^3 \frac{1}{r_e} \\ \Leftrightarrow D &= \frac{r_e^2}{3\tau} \quad (17) \end{aligned}$$

Mit Hilfe von Gl. (17) lässt sich der apparente Diffusionskoeffizient direkt aus meßbaren Größen, dem effektiven Radius r_e und der Sättigungshalbwertszeit τ , bestimmen.

Der effektive Radius r_e kann aus dem Kugelvolumen und damit letztendlich aus der durchschnittlichen Frischmasse der Tiere m mit dem Wassergehalt w und der Dichte des Wassers ρ abgeschätzt werden:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$\Leftrightarrow r = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}}$$

$$V = \frac{wm}{\rho}$$

$$\Rightarrow r_e = \sqrt[3]{\frac{3wm}{4\rho\pi}} \quad (18)$$

Die Sättigungshalbwertszeit τ läßt sich aus der reziproken Form der Gl. (10) bestimmen (Linearisierung nach Lineweaver & Burk 1934):

$$\frac{1}{c} = \frac{\tau}{c_0} \frac{1}{t} + \frac{1}{c_0} \quad (19)$$

Hierbei wurde bei sulfidischen Inkubationen die Gesamtschwefelkonzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, wie in Kap. 3 und 5 beschrieben, im Gewebe gemessen. Diese Gesamtschwefelkonzentration setzt sich zusammen aus den Gewebekonzentrationen von Sulfid ($\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^- + \text{S}^{2-}$), Thiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), Sulfit (SO_3^{2-}) und Elementarschwefel (S_8), abzüglich der Kontrollwerte (für $t = 0$) und unter Berücksichtigung der stöchiometrischen Verhältnisse. Der Kehrwert der Gesamtschwefelkonzentration $1/c$ wird gegen den Kehrwert der Inkubationszeit $1/t$ aufgetragen. Aus der resultierenden Geradengleichung (Gl. 19) läßt sich die Halbwertszeit direkt berechnen.

6.2 Apparente Entgiftungskonstante

Eingedrungener Schwefelwasserstoff wird im Organismus oxidiert und damit entgiftet. Da die Entgiftung im Gewebe unmittelbar nach dem Eindringen einsetzt, muß es sich hierbei um eine Reaktion erster Ordnung handeln (Powell 1989). Die Abnahme der Sulfidkonzentration c mit der Zeit t ist daher proportional zur aktuellen Sulfidkonzentration im Körper. Es gilt:

$$-\frac{\partial c}{\partial t} = k c \quad (20)$$

Hierbei ist die Proportionalitätskonstante k die apparente Entgiftungskonstante, die die Wirksamkeit der Sulfidentgiftung im Körper beschreibt. Wie beim apparenten Diffusionskoeffizienten umfaßt diese Konstante alle entsprechenden Prozesse innerhalb des Organismus.

Im Körper laufen beide Prozesse, Diffusion und Entgiftung, gleichzeitig ab. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei der Diffusion und Entgiftung mit entgegengesetzt gleicher Geschwindigkeit ablaufen, so daß sich die H_2S -Innenkonzentration zeitlich nicht mehr verändert. Die Höhe dieser Gleichgewichtskonzentration entscheidet letztendlich über die Effektivität der Entgiftung. Aus der Kombination von Gl. (14) und (20) erhält man:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c}{\partial t} &= D \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) - k c = 0 \\ \Rightarrow D \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) &= k c \end{aligned} \quad (21)$$

Diese Differentialgleichung läßt sich analog zu Gl. (16) lösen. Durch Substitution mit

$$u = r^2 \frac{\partial c}{\partial r}$$

und Integration zwischen 0 und $u(r)$ bzw. zwischen 0 und r_e erhält man:

$$\begin{aligned} \Rightarrow D \int_0^{u(r)} du &= k c \int_0^{r_e} r^2 dr \\ \Leftrightarrow D r^2 \frac{\partial c}{\partial r} &= k c \frac{1}{3} r_e^3 \end{aligned}$$

Die Grenzen der zweiten Integration sind der Beginn des Diffusionsweges, die Kugeloberfläche ($r = 0$) mit der Außenkonzentration c_0 , und das Ende des Diffusionsweges, der Mittelpunkt der Kugel ($r = r_e$) mit der Gleichgewichtsinnenkonzentration c_i :

$$\Rightarrow D \int_{c_0}^{c_i} \frac{1}{c} \partial c = \frac{1}{3} k r_e^3 \int_0^{r_e} r^{-2} \partial r$$

$$\Leftrightarrow D \ln \frac{c_i}{c_0} = -\frac{1}{3} k r_e^3 \frac{1}{r_e}$$

$$\Leftrightarrow \ln \frac{c_i}{c_0} = -\frac{k r_e^2}{3D} \quad (22)$$

$$\Leftrightarrow k = \frac{3D}{r_e^2} \ln \frac{c_0}{c_i} \quad (23)$$

Mit Gl. (17) liefert Gl. (23):

$$\Rightarrow k = \frac{3 r_e^2}{3 \tau r_e^2} \ln \frac{c_0}{c_i}$$

$$\Leftrightarrow k = \frac{1}{\tau} \ln \frac{c_0}{c_i} \quad (24)$$

Die Entgiftungskonstante läßt sich mit Gl. (24) aus der gemessenen H_2S -Gleichgewichtsinnenkonzentration c_i bei vorgegebener Außenkonzentration c_0 und aus der ermittelten Sättigungshalbwertszeit τ (Gl. 19) berechnen.

Umformung von Gl. (22) liefert:

$$c_i = c_0 e^{-k r_e^2 / 3D} \quad (25)$$

Hieraus läßt sich die H_2S -Gleichgewichtsinnenkonzentration c_i in Abhängigkeit vom effektiven Radius r_e (Gl. 18) und damit von der Größe des Tieres berechnen.

7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

In Zusammenarbeit mit Dr. R. Windoffer (Universität Hamburg) wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an Exemplaren der Plattmuschel *Macoma balthica* vom Standort Hiddensee durchgeführt. Es wurden sowohl frisch gesammelte als auch oxisch und sulfidisch gehälterte Tiere untersucht. Hierzu waren die Tiere zuvor in 20-l-Aquarien mit sulfidfreiem Sand (oxische Bedingungen) bzw. mit Originalsediment aus Hiddensee (oxisch-sulfidische Bedingungen) gehältert worden. In beiden Aquarien wurde das Wasser belüftet. Regelmäßige Sulfidmessungen im Sediment der Aquarien (vgl. Kap. 3.3.2) ergaben bei der oxischen Hälterung kein Sulfid und bei der oxisch-sulfidischen Hälterung Konzentrationen zwischen 100 und 200 μM H_2S .

Neben Strukturuntersuchungen durch konventionelle Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden Elementaranalysen auf ultrastruktureller Ebene (Egerton 1986) mit Hilfe von EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy) und ESI (Electron Spectroscopic Imaging) an einem Zeiss EM902 durchgeführt. Hierbei sind jedoch nur qualitative Aussagen möglich. Quantitative Analysen der Elementarkonzentrationen in verschiedenen Geweben erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. R. Windoffer und Dr. F. Meyberg (Universität Hamburg) mit Hilfe einer ICP-AES (Ion Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy). Das Gewebe wurde unter Druck in HNO_3 aufgeschlossen und danach in einem Perkin Elmer Plasma II analysiert. Nähere Einzelheiten zur Methodik sind in Windoffer *et al.* (in Vorbereitung) beschrieben.

8 Statistische Auswertung

Aus den gemessenen Daten wurden die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet. Aufgrund der teilweise geringen Stichprobenzahl wurde statt des parametrischen *t*-Testes der nichtparametrische *U*-Test von Mann & Whitney zur Signifikanzüberprüfung verwendet (Clauß & Ebner 1982). Durch eine einseitige Fragestellung konnte der Test verschärft werden. Die angesetzte Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei 5%.

Ergebnisse

1 *Macoma balthica*

1.1 Abiotische Faktoren der Habitate

Die Plattmuschel *Macoma balthica* ist in ihren Siedlungsbereichen unterschiedlichen Schwefelwasserstoffkonzentrationen ausgesetzt (Tab. 2). Die Stationen Dorum-Neufeld im Nordseewatt und Gabelsflach in der Kieler Bucht (Westliche Ostsee) zeichnen sich durch ganzjährige niedrige Sulfidkonzentrationen im Porenwasser des Sediments aus. Mit 12 m Wassertiefe befindet sich die Station Gabelsflach in der Regel noch oberhalb der thermohalinen Sprungschicht, wie an der hohen Sauerstoffsättigung und dem niedrigen Salzgehalt erkennbar ist. Die Standorte Hiddensee und Danziger Bucht sind dagegen durch stellenweise hohe Sulfidkonzentrationen gekennzeichnet. Das Sulfid ist jedoch nicht gleichmäßig, sondern unregelmäßig im Sediment verteilt. Deshalb werden in Tab. 2 statt der Durchschnittswerte die Minima und Maxima angegeben, die neben den räumlichen auch die zeitlichen Variabilitäten widerspiegeln. An allen Probennahmestellen werden die niedrigsten Sulfidkonzentrationen im Winter gemessen, während es im Sommer oft zu einem drastischen Anstieg des Sulfidgehaltes kommt (Tab. 3). Auch mit der Sedimenttiefe variieren die Sulfidkonzentrationen. An der Station Hiddensee liegt das Sulfidmaximum meist in etwa 3 cm Sedimenttiefe (mit bis zu 500 μM H_2S) und nimmt dann mit zunehmender Sedimenttiefe langsam ab. In der Danziger Bucht werden Maximalkonzentrationen meist erst ab 7 cm Sedimenttiefe gefunden. Abb. 8 zeigt exemplarisch drei Profile.

Trotz der großen zeitlichen und räumlichen Variabilitäten bleibt deutlich, daß insbesondere der Standort Hiddensee als sulfidisches Habitat gekennzeichnet werden muß. Die hohe Sulfidbelastung dieses und des Standortes Boiensdorf (vgl. Kap. 2) über mehrere Jahre wird auch aus dem Tabellenanhang des Schlußberichtes von DYSMON I (1994) deutlich. Hier findet sich auch umfangreiches Datenmaterial über meteorologisch-hydrologische Faktoren, Sedimenttemperatur, Salinität, pH-Wert, Redoxpotential, mittlere Korngrößen und Sortierungskoeffizienten, organischen Kohlenstoffgehalt, Wassergehalt sowie Sulfat-, Thiosulfat-, Chlorid-, Phosphat-, Nitrat- und Methankonzentrationen des Sedimentes.

Tab. 2. Schwefelwasserstoffkonzentration (Minimum - Maximum) im Porenwasser in 5 cm Sedimenttiefe sowie Sauerstoffgehalt und Salinität des darüberstehenden Wasserkörpers. Zur geographischen Lage der Standorte s. Abb. 3

Standort	H ₂ S [μ M]	O ₂ [% Sätt.]	Salinität [%]
Dorum	4 - 11		22
Kiel	1 - 13	95	15
Hiddensee	1 - 432	84	10
Danzig (62-m-Station)	191 - 193	83	7

Tab. 3. Schwefelwasserstoffkonzentration im Porenwassers des Sediments am Standort Hiddensee von 1992 bis 1995. Einzelwerte in μ mol l⁻¹

Tiefe [cm]	16.6.92	23.8.92	8.12.92	25.4.93	20.6.93	3.11.93	13.7.94	30.9.94	18.5.95
0	0	3		0	0 0 0 0	3	2 10		1
3	54 168 288 305 423 494	175 371	6		5 35 52 60				0 0 2 2 4
5	157 165 213 215 257 432	38 70 70	9	9 15 17	1 4 15 20 21 40 54 60 94 97 113	3 4 4 7 8	60 195 198 232 239 324	1 4 48	2 4 5 5
10		137 164 166	4	13 14	11				
15				9	11				

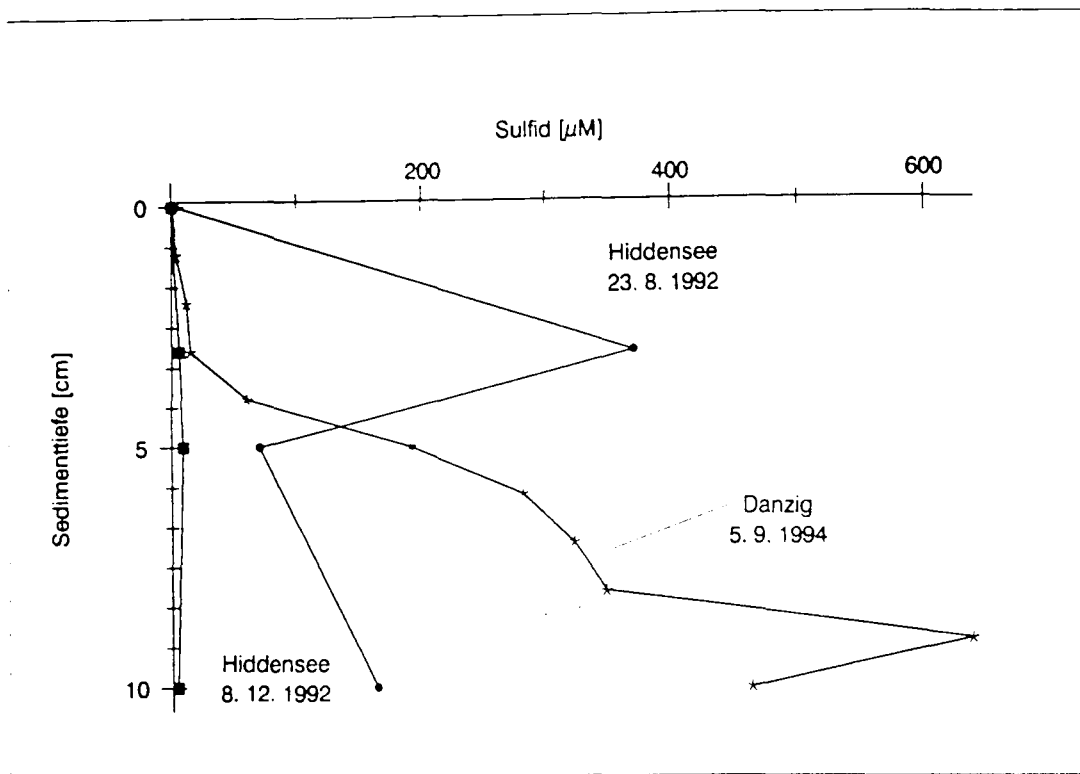
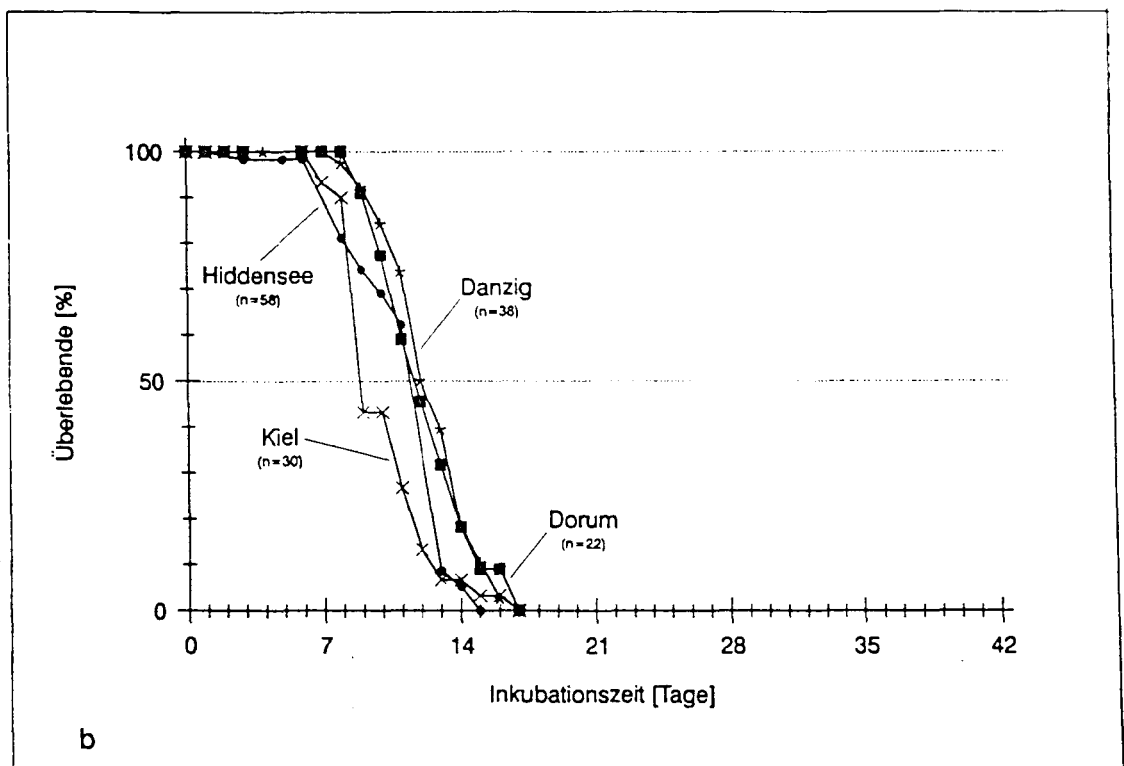
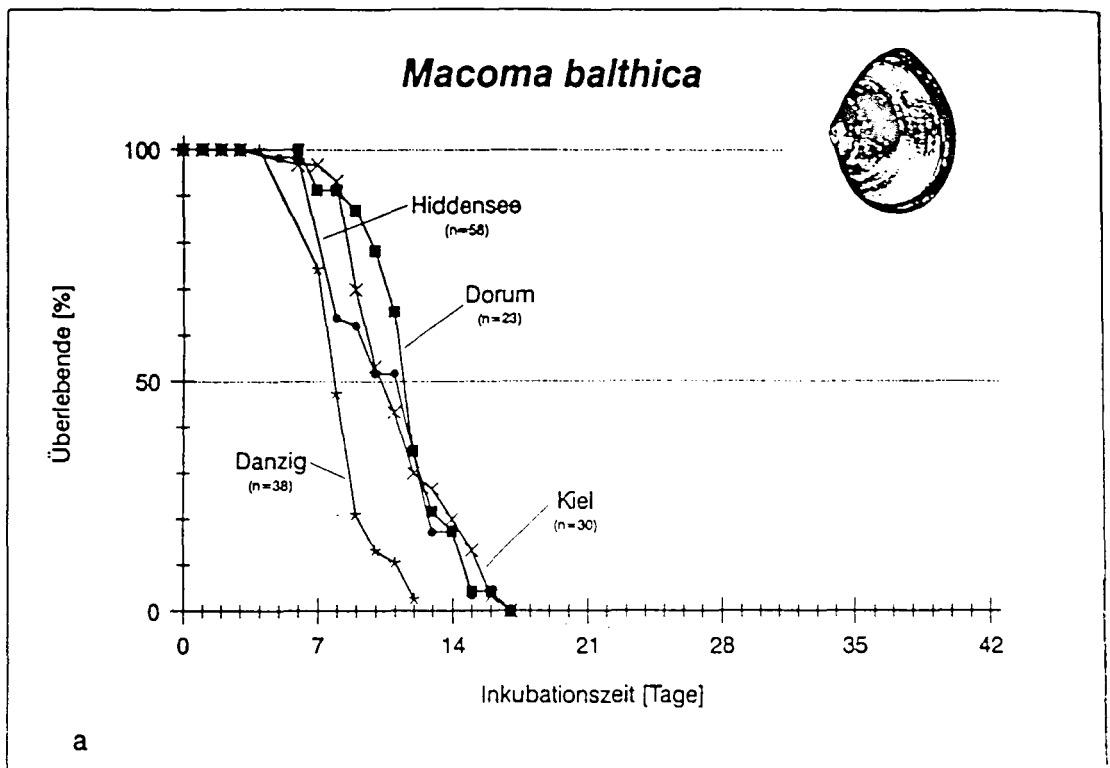


Abb. 8. Schwefelwasserstoffkonzentration im Porenwasser des Sediments der Standorte Hiddensee (23. 8. 1992 und 8. 12. 1992) und Danziger Bucht (62-m-Station; 5. 9. 1994)

1.2 Toleranzversuche

Durch die unterschiedliche Schwefelwasserstoffbelastung in den Habitaten ergab sich die Frage, ob Tiere der verschiedenen Populationen gleich auf Schwefelwasserstoff reagieren. Daher wurden Exemplare der verschiedenen Habitats unter Hypoxie allein (Abb. 9a) sowie hypoxisch mit $100 \mu\text{M H}_2\text{S}$ inkubiert (Abb. 9b). Die untersuchten Populationen zeigen sich hierbei gleichermaßen empfindlich gegenüber Sauerstoffmangel. Unabhängig vom Sulfidgehalt liegen die Letalzeiten für 50% der Tiere (LT_{50}) bei 10°C bei 8 bis 12 Tagen.

Dagegen zeigen sich unter oxischen Bedingungen bei $100 \mu\text{M H}_2\text{S}$ deutlich unterschiedliche Überlebensfähigkeiten (Abb. 9c): Während bei Exemplaren aus der Kieler Bucht und aus Dorem-Neufeld die LT_{50} -Werte ebenfalls bei etwa 9 bis 12 Tagen liegen, überleben unter den gleichen Bedingungen 50% der Danziger Tiere mehr als drei Wochen, der Hiddenseer Tiere sogar mehr als vier Wochen.



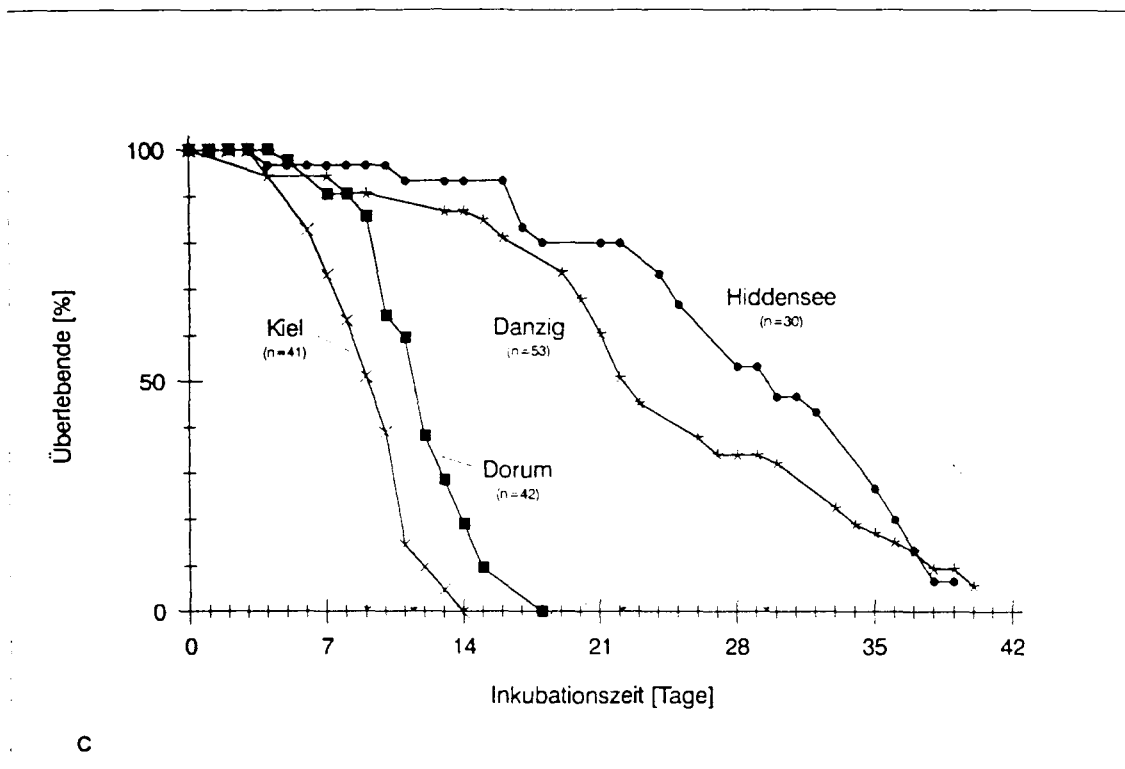


Abb. 9. *Macoma balthica*, Populationen aus der Kieler Bucht (22‰S), Dorum-Neufeld (22‰S), Danziger Bucht (9‰S) und Hiddensee (9‰S). Überlebensfähigkeit nach (a) Hypoxie, (b) hypoxischer Inkubation bei 100 μM H_2S und (c) oxischer Inkubation bei 100 μM H_2S (10°C). (Tierzeichnung dieser und der folgenden Abbildungen aus Stresemann 1992)

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Populationen gegenüber Schwefelwasserstoff um reine Adaptationsphänomene handelt, wurde bei Exemplaren aus der Kieler Bucht und aus Dorum-Neufeld der Sulfidgehalt des Inkubationsmediums innerhalb von 14 Tagen langsam erhöht und dann die H_2S -Resistenz unter oxischen Bedingungen ermittelt.

Nach einer derartigen Anpassung steigt die Überlebensfähigkeit bei Individuen aus der Kieler Bucht deutlich an (Abb. 10). Der LT_{50} -Wert beträgt dann, wie bei frischgesammelten Tieren aus Hiddensee, etwa vier Wochen. Bei Exemplaren aus Dorum-Neufeld ist dagegen kein Anstieg der Überlebensrate zu verzeichnen.

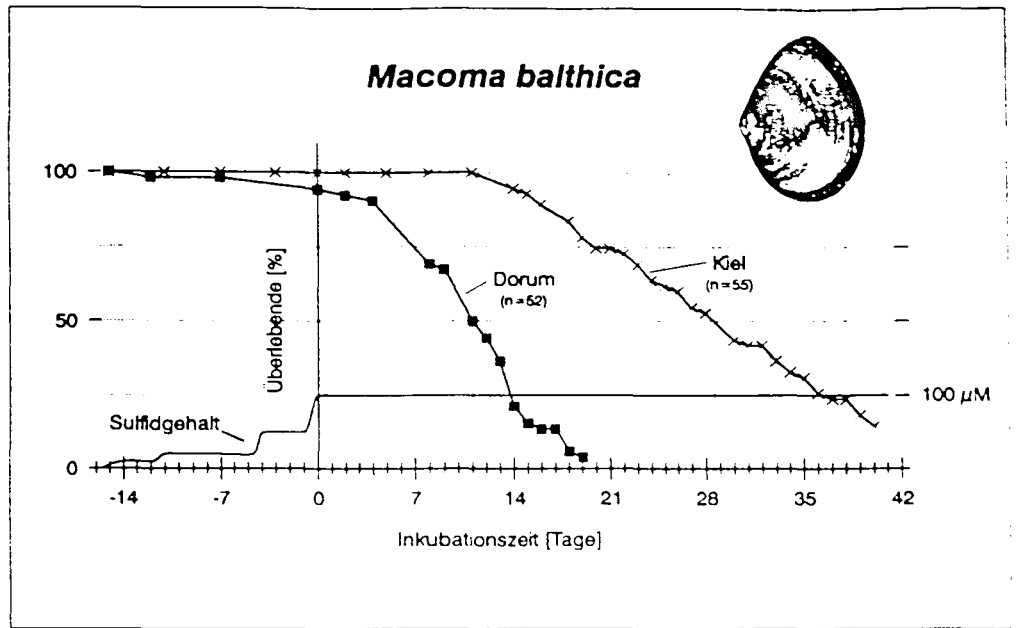


Abb. 10. *Macoma balthica*, Populationen aus der Kieler Bucht und aus Dorum-Neufeld. Überlebensfähigkeit unter oxischen Bedingungen nach Anpassung der Versuchstiere an einen im Verlauf von zwei Wochen stufenweise auf $100 \mu\text{M}$ erhöhten Sulfidgehalt (10°C ; 22‰S)

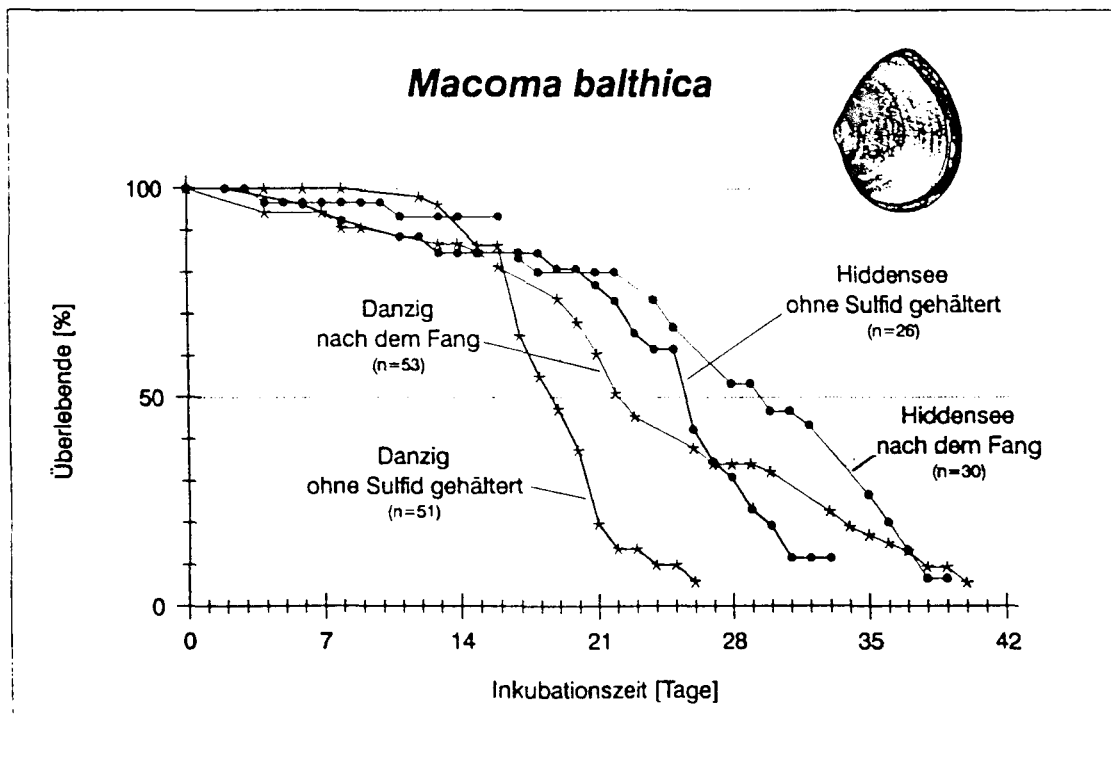


Abb. 11. *Macoma balthica*, Populationen aus der Danziger Bucht und von Hiddensee. Überlebensfähigkeit nach oxischer Inkubation bei $100 \mu\text{M H}_2\text{S}$ (10°C ; 9‰S). Untersucht wurden Exemplare unmittelbar nach dem Fang aus dem sulfidischen Habitat sowie nach einer mindestens dreimonatigen Hälterung im sulfidfreien Medium (aus Theede *et al.* 1995).

Die sulfidresistenten Tiere aus der Danziger Bucht und von Hiddensee zeigen kaum veränderte Reaktionen nach Anpassung an ein sulfidfreies Medium. Selbst nach dreimonatiger Hälterung der Tiere im normoxischen Milieu ohne Gegenwart von Schwefelwasserstoff bleibt die hohe Sulfidtoleranz weitgehend erhalten (Abb. 11). Die Überlebensfähigkeit der Tiere geht nur geringfügig zurück.

1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Nach sulfidischen Inkubationen färbt sich der Mantelrand der Plattmuscheln intensiv schwarz. Die gleiche Färbung kann auch an frisch gesammelten Exemplaren aus sulfidischen Biotopen beobachtet werden. Hier sind auch die Schalen der Tiere zum Teil schwarz gefärbt. Um den Charakter der Schwarzfärbung des Gewebes und eine eventuelle Beteiligung bei der Sulfidentgiftung näher zu analysieren, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Windoffer und Dr. F. Meyberg (Universität Hamburg) elektronenmikroskopische Untersuchungen unter Einbeziehung von Elementaranalysen an Exemplaren vom sulfidischen Standort Hiddensee durchgeführt.

Die Schwarzfärbung tritt nur bei sulfidexponierten Tieren auf und verschwindet nach mehrwöchiger oxischer, sulfidfreier Hälterung wieder. Sie ist im inneren Mantelrand lokalisiert und reicht von der Periostracumgrube bis zu den Sinnespapillen, die ebenfalls noch gefärbt sind (Abb. 12a, b). Sie beruht auf elektronendichten Einschlüssen, die innerhalb der Epidermiszellen des Mantelrandes und in der darunterliegenden basalen Matrix auftreten (Abb. 12b und 13a-d). In der Matrix liegen die Einschlüsse sowohl extrazellulär (Abb. 13b) als auch intrazellulär in Form kondensierter Granula im Cytoplasma von Amöbocyten vor (Abb. 13c), wobei die makroskopisch sichtbare Färbung hauptsächlich auf extrazellulären Einschlüssen beruht. Die Amöbocyten sind durch lange Ausläufer gekennzeichnet, in denen elektronendichte Granula beobachtet werden können (Abb. 13d). Dies legt die Vermutung nah, daß die extrazellulären Präzipitate über Phagocytose von den Amöbocyten aufgenommen werden. Das Auftreten von Granula unterschiedlicher Dichte weist auf eine sukzessive Verdichtung der Präzipitate hin (Abb. 14a-c).



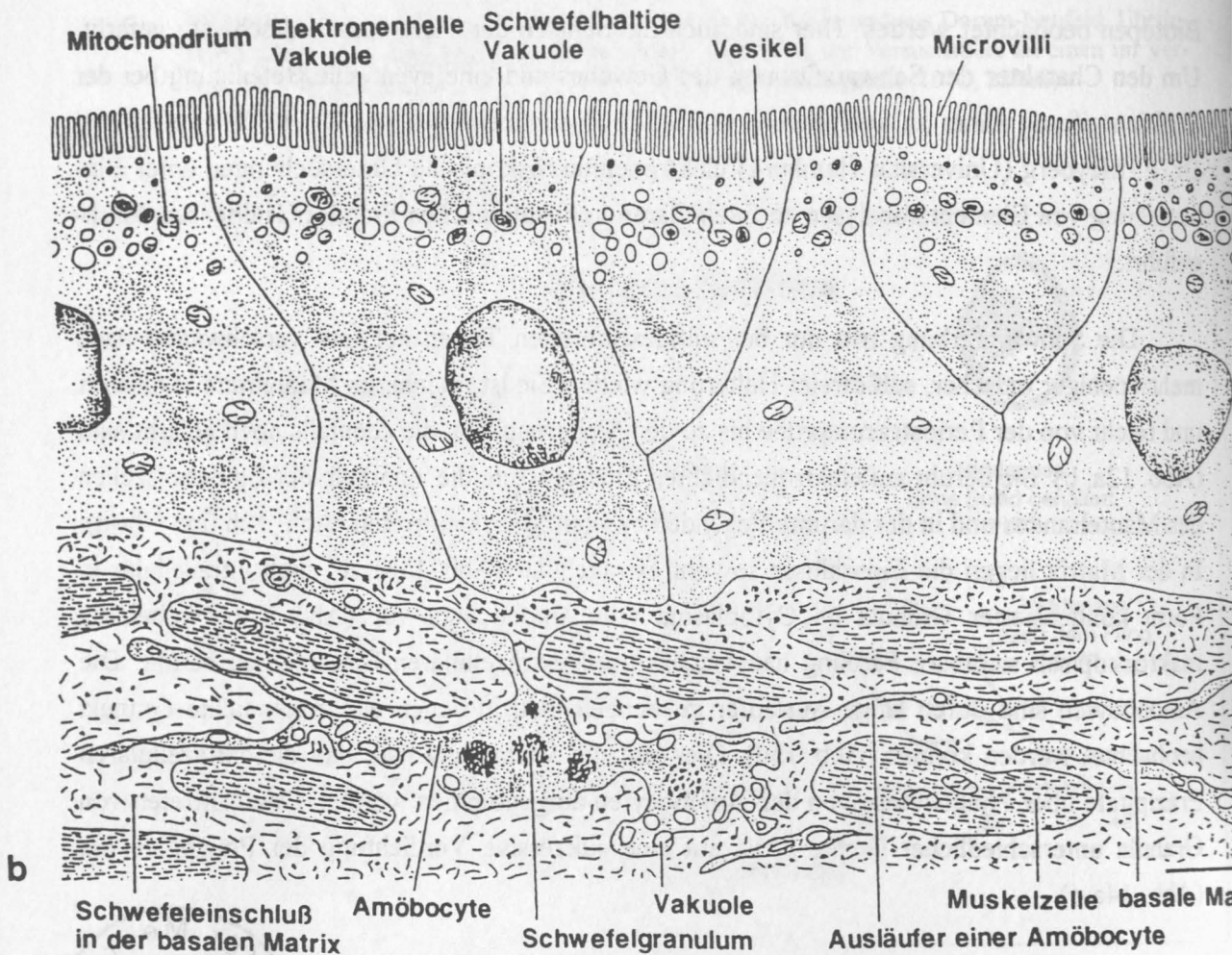
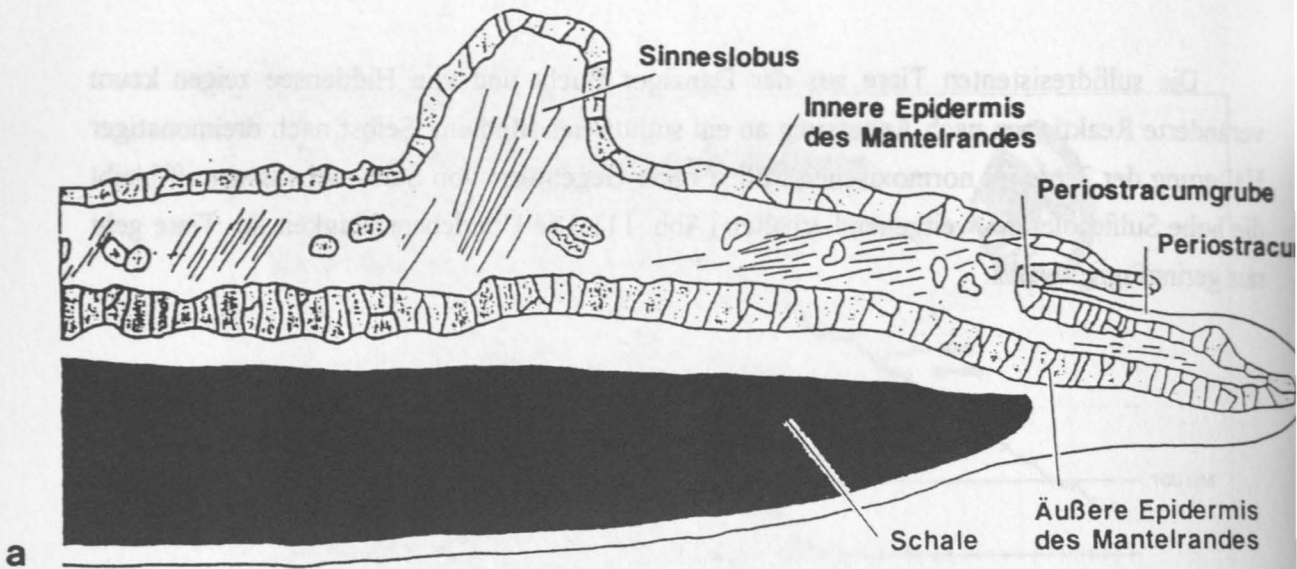


Abb. 12. *Macoma balthica*. (a) Schema des Mantelrandes. (b) Innere Epidermis des Mantelrandes mit elektronendichten Einschlüssen in den Epidermiszellen, der basalen Matrix und den Amöbocyten; Maßstab 2 μ m (aus Windoffer *et al.*, in Vorbereitung)

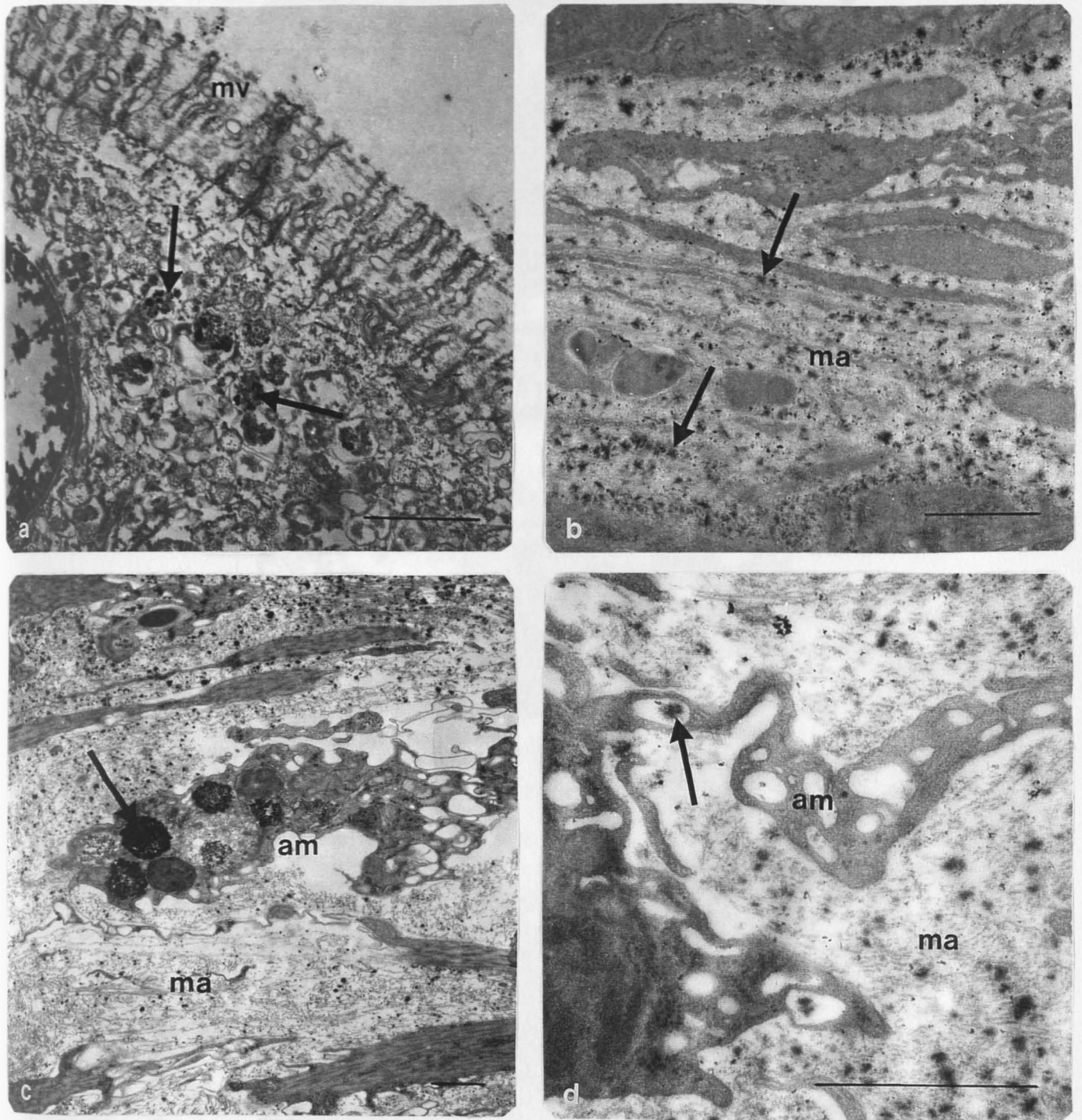


Abb. 13. *Macoma balthica*, Hiddensee. (a) Elektronendichte Einschlüsse (→) innerhalb einer inneren Epidermiszelle; (b) Elektronendichte Einschlüsse (→) in der basalen Matrix; (c) Elektronendichte Einschlüsse (→) innerhalb einer Amöbocyte; (d) Elektronendichte Einschlüsse (→) in einem Ausläufer einer Amöbocyte; Maßstab 1 µm; am: Amöbocyte, ma: basale Matrix, mv: Microvilli (aus Windoffer *et al.*, in Vorbereitung)

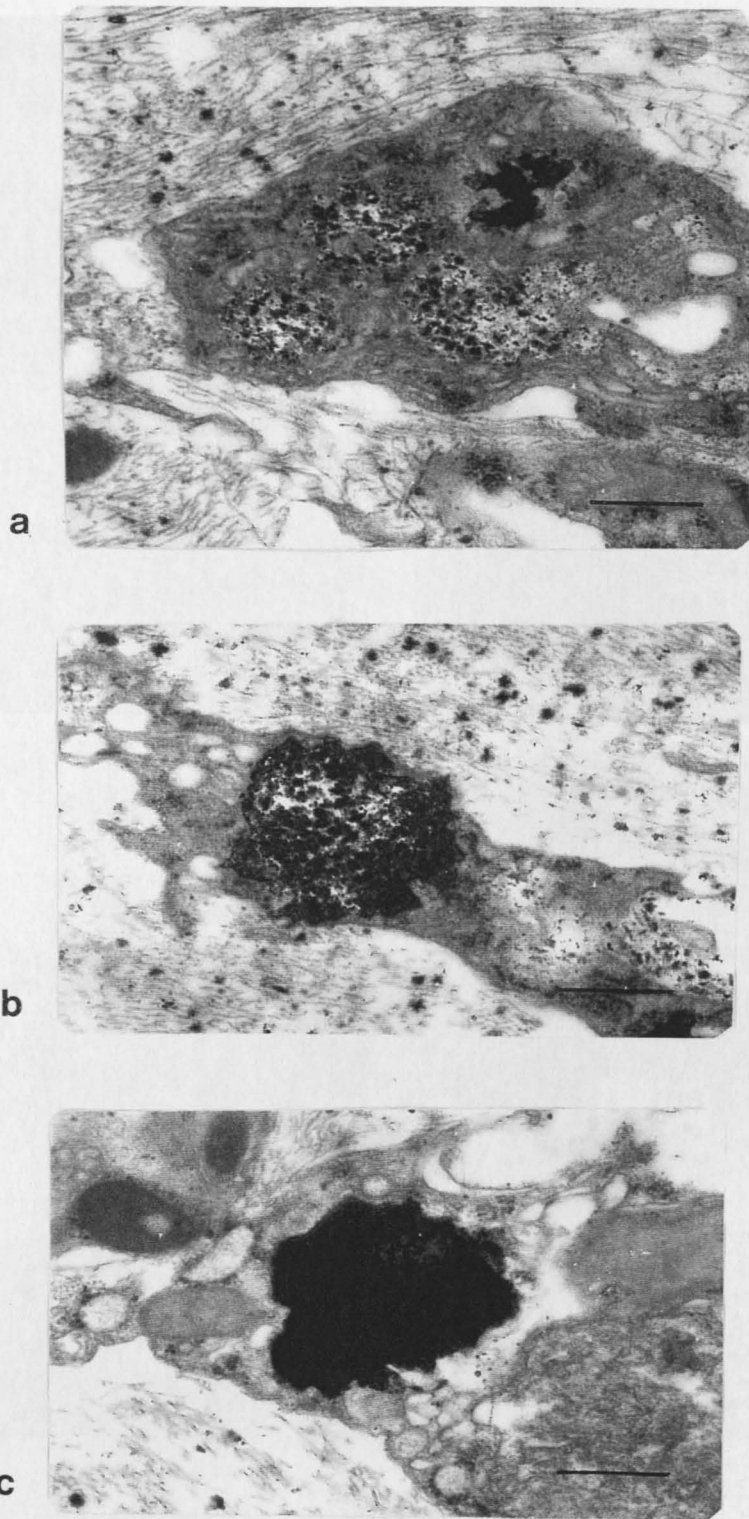


Abb. 14. *Macoma balthica*, Hiddensee. (a-c) Fortschreitende Kondensation der elektronendichten Granula in den Amöbocyten des Mantelrandes; Maßstab 0,5 μm (aus Windoffer *et al.*, in Vorbereitung)

Macoma balthica
Hiddensee

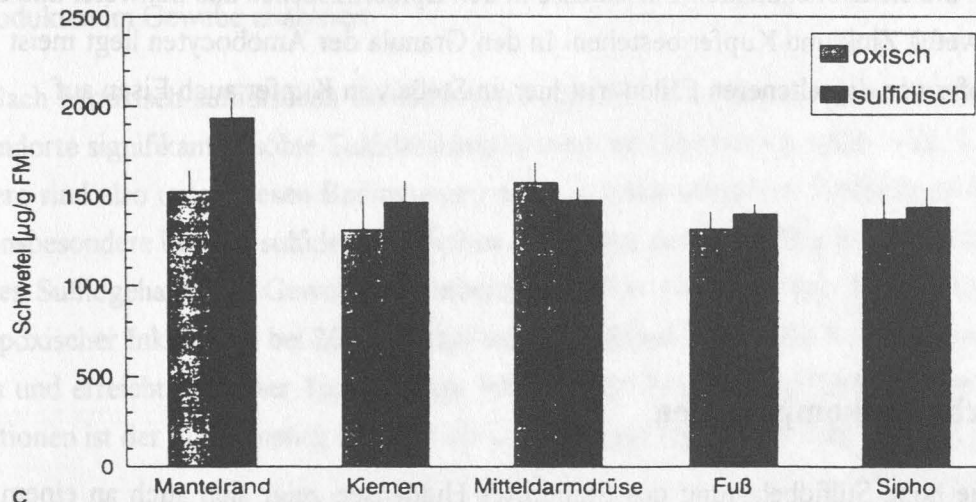
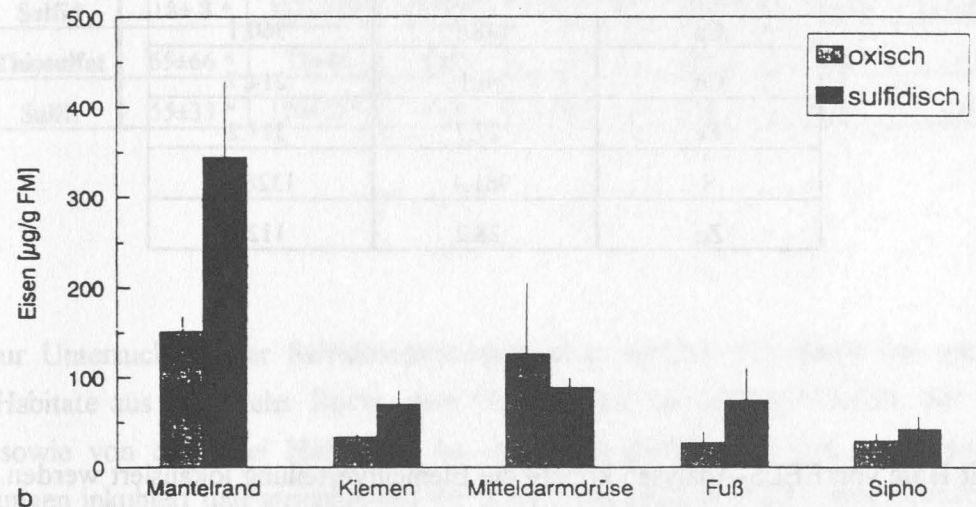
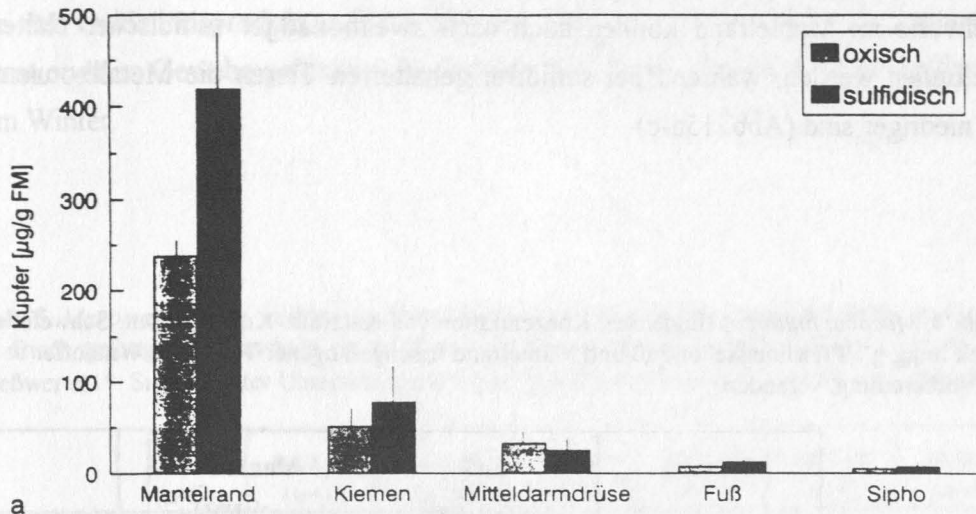


Abb. 15. *Macoma balthica*, Hiddensee. Konzentration von (a) Kupfer, (b) Eisen und (c) Schwefel in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse + Standardabweichung verschiedener Gewebe nach zweimonatiger oxischer und sulfidischer Hälterung ($100 - 200 \mu\text{M H}_2\text{S}$; $n=3$; aus Windoffer *et al.*, in Vorbereitung)

ICP-AES-Multielementanalysen zeigen im Mantelrand frisch gesammelter Muscheln aus dem sulfidischen Sediment von Hiddensee deutlich höhere Konzentrationen an Schwefel, Kupfer, Eisen, Zink und Kalzium als im Fuß der Tiere (Tab. 4). Erhöhte Kupfer-, Eisen- und Schwefelwerte im Mantelrand können auch nach zweimonatiger sulfidischer Hälterung der Tiere gefunden werden, während bei sulfidfrei gehälterten Tieren die Metallkonzentrationen deutlich niedriger sind (Abb. 15a-c).

Tab. 4. *Macoma balthica*, Hiddensee. Konzentration von Kalzium, Kupfer, Eisen, Schwefel und Zink in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse im Fuß und Mantelrand frischgefangener Tiere (aus Windoffer *et al.*, in Vorbereitung, verändert)

Element	Fuß [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Mantel [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]
Ca	148.1	360.1
Cu	6.1	214.7
Fe	27.7	311.2
S	981.4	1328.6
Zn	28.2	112.7

Mit Hilfe von EELS-Analysen konnte die Elementverteilung lokalisiert werden. Es zeigt sich, daß die elektronendichten Einschlüsse in den Epidermiszellen aus Schwefel und Zink oder aus Schwefel, Zink und Kupfer bestehen. In den Granula der Amöbocyten liegt meist Schwefel und Kupfer vor. In selteneren Fällen tritt hier an Stelle von Kupfer auch Eisen auf.

1.4 Schwefelkomponenten

Die hohe Sulfidbelastung des Standortes Hiddensee zeigt sich auch an einem erhöhten Sulfidgehalt im Gewebe frischgefangener Plattmuscheln (Tab. 5). Insbesondere zum Jahresende steigt bei diesen Tieren der Sulfidgehalt des Gewebes stark an. Werden die

Muscheln unter oxischen Bedingungen gehalten, geht die Sulfidkonzentrationen im Gewebe signifikant zurück.

Bei den Oxidationsprodukten Thiosulfat und Sulfit werden vor allem im Sommer höhere Konzentrationen im Gewebe gefunden. Im Sommer tritt demnach eine stärkere Sulfidoxidation auf als im Winter.

Tab. 5. *Macoma balthica*. Hiddensee. Konzentration von Sulfid, Thiosulfat und Sulfit im Gewebe frisch gefangener Muscheln in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse \pm Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte). *: Signifikanter Unterschied zur oxisch gehaltenen Kontrolle ($p \leq 0.05$, vgl. Tab. 6d)

	23.8.92 (n=5)	8.12.92 (n=4)	24.4.93 (n=6)	23.6.93 (n=10)	3.11.93 (n=5)	14.7.94 (n=5)	30.9.94 (n=5)
Sulfid	18 \pm 8 *	322 \pm 239	173 \pm 69 *	78 \pm 42 *	55 \pm 6 *	62 \pm 61	112 \pm 60 *
Thiosulfat	65 \pm 66 *	22 \pm 46	0 \pm 0	4 \pm 9	0 \pm 0	218 \pm 87 *	2 \pm 3
Sulfit	55 \pm 33 *	110 \pm 175	0 \pm 0	3 \pm 8	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Zur Untersuchung der Sulfidoxidationskapazität wurden Exemplare der unterschiedlichen Habitate aus der Kieler Bucht, dem Nordseewatt bei Dorum-Neufeld, der Danziger Bucht sowie von der Insel Hiddensee bei hypoxisch-sulfidischen und oxisch-sulfidischen Bedingungen inkubiert und anschließend die Konzentrationen an Sulfid sowie dessen Oxidationsprodukten im Gewebe analysiert.

Nach hypoxisch-sulfidischen Inkubationen liegen bei den Plattmuscheln aller untersuchten Standorte signifikant erhöhte Sulfidkonzentrationen im Gewebe vor (Abb. 16a, Tab. 6a-d). Die Tiere sind also unter diesen Bedingungen nicht zu einer effektiven Sulfidentgiftung in der Lage. Insbesondere bei den sulfidempfindlichen Tieren aus der Kieler Bucht ist ein starker Anstieg des Sulfidgehaltes im Gewebe zu verzeichnen (Abb. 16a, Tab. 6a). Bereits nach einem Tag hypoxischer Inkubation bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$ steigt bei diesen Tieren die Konzentration signifikant an und erreicht nach vier Tagen knapp $400 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse (FM). Bei den anderen Populationen ist der Sulfidanstieg nicht so stark ausgeprägt (Abb. 16a, Tab. 6b-d).

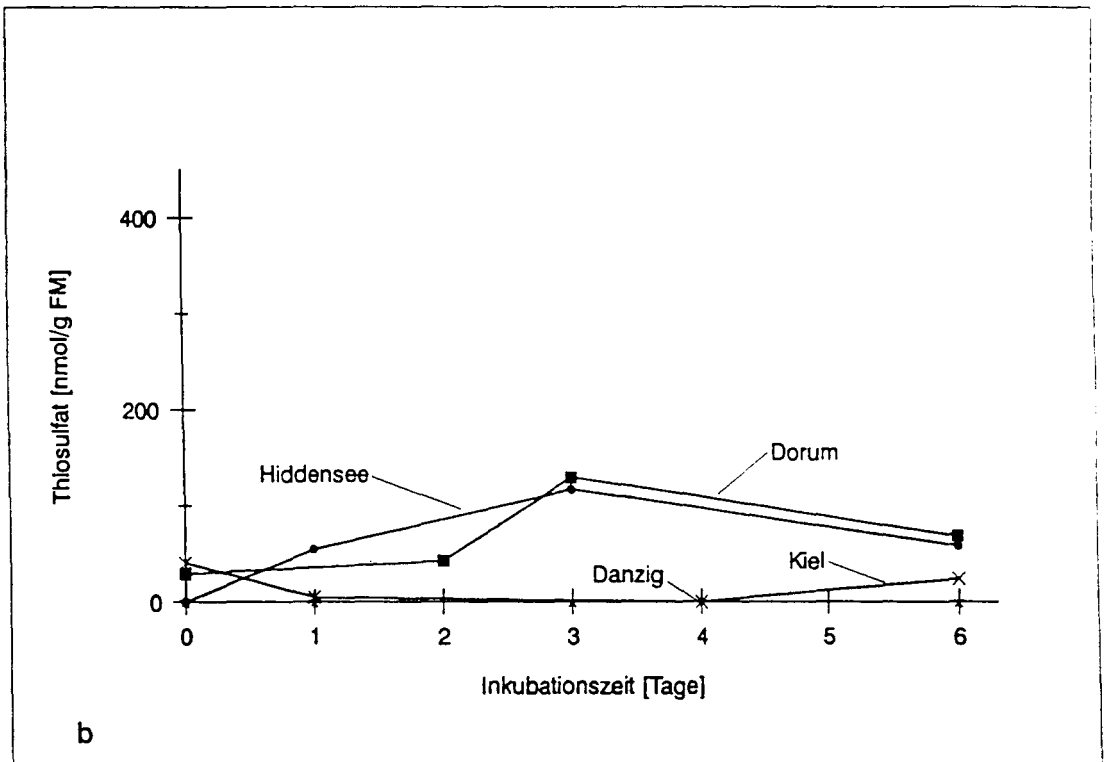
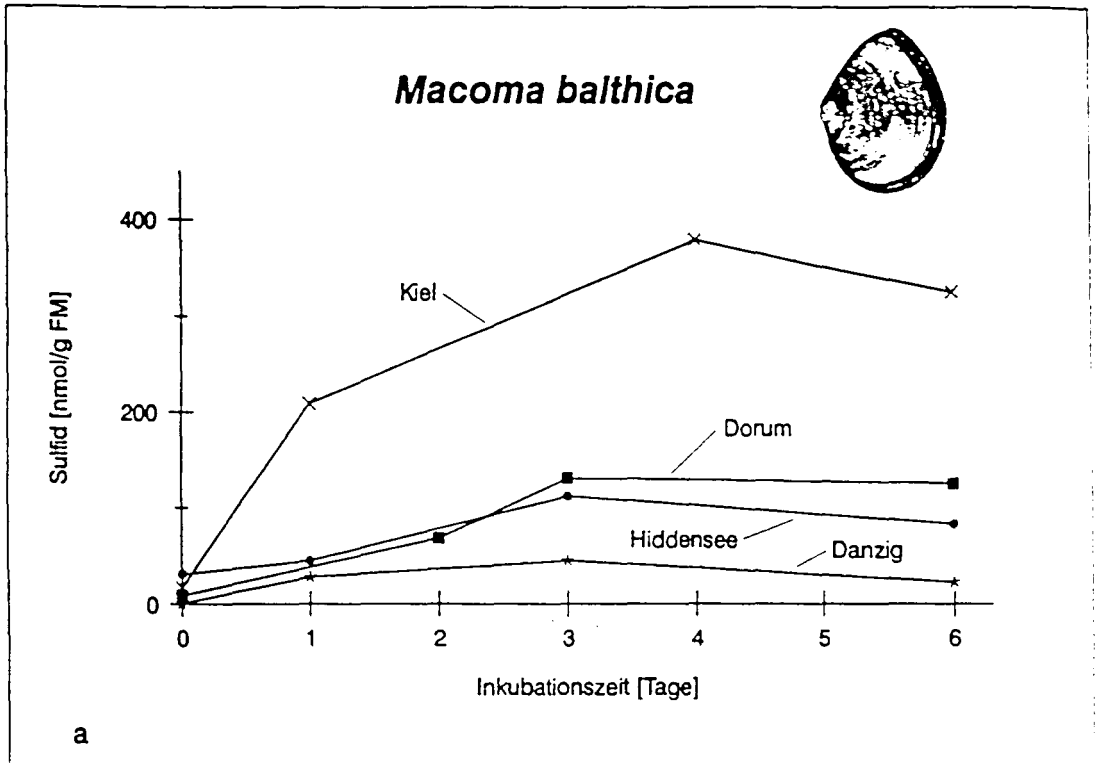


Abb. 16. *Macoma balthica*, Populationen aus der Kieler Bucht, Dorum-Neufeld, Danziger Bucht und Hiddensee. Konzentration von (a) Sulfid und (b) Thiosulfat im Gewebe nach hypoxischer Inkubation bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$. Weitere Angaben wie Standardabweichungen, Anzahl der Meßwerte und signifikante Unterschiede s. Tab. 6

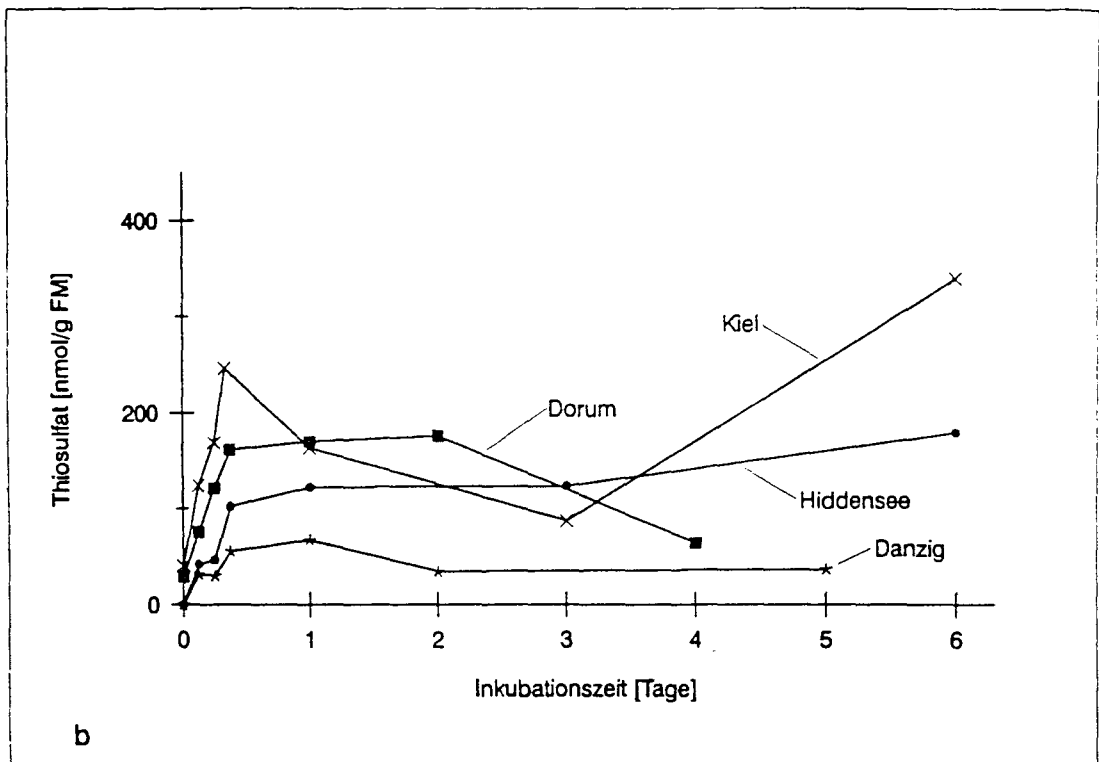
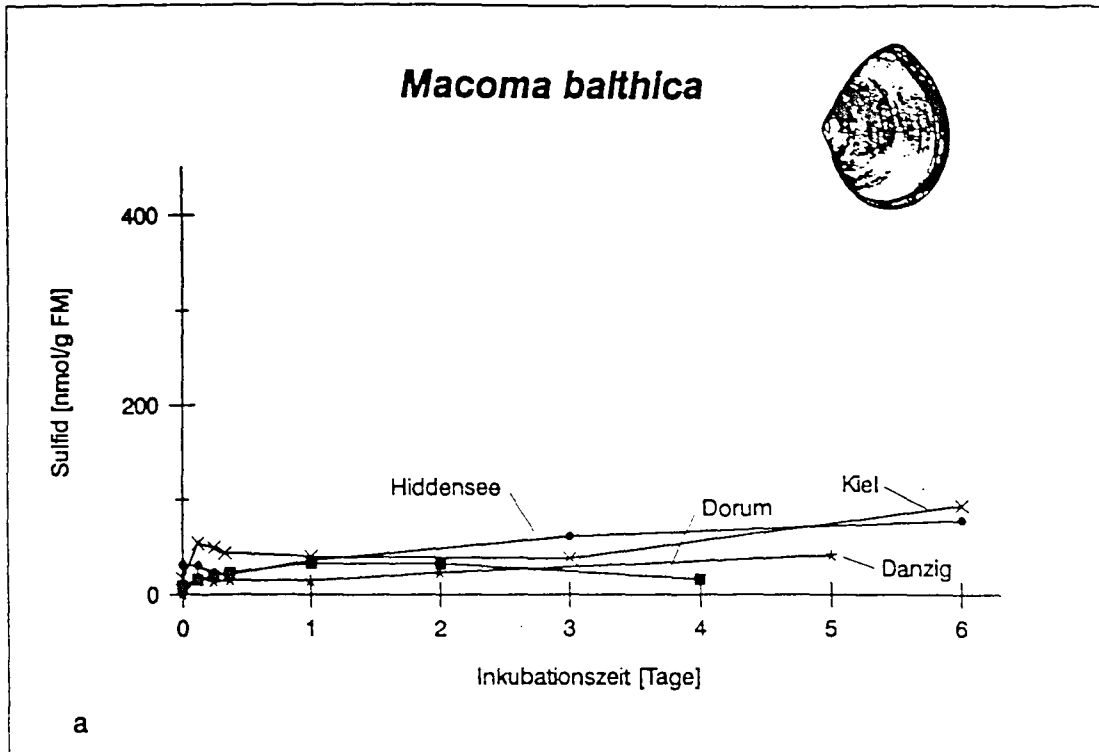


Abb. 17. *Macoma balthica*, Populationen aus der Kieler Bucht, Dorum-Neufeld, Danziger Bucht und Hiddensee. Konzentration von (a) Sulfid und (b) Thiosulfat im Gewebe nach **oxischer** Inkubation bei 200 μM H_2S . Weitere Angaben wie Standardabweichungen, Anzahl der Meßwerte und signifikante Unterschiede s. Tab. 6

Tab. 6a. *Macoma balthica*, Kieler Bucht. Konzentration von Sulfid, Thiosulfat, Sulfit, Glutathion und Elementarschwefel im Gewebe nach hypoxischer und oxischer Inkubation bei 200 μM H_2S (10°C, 22‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse \pm Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte). *: Signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ($p\leq 0.05$)

Inkubation	Sulfid [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Thiosulfat [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Sulfit [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Glutathion [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Schwefel [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]
Kontrolle	17 \pm 6 (5)	41 \pm 4 (5)	0 \pm 0 (5)	759 \pm 160 (5)	10 \pm 7 (10)
1 d hypoxisch	209 \pm 87 (5) *	5 \pm 11 (5)	66 \pm 67 (5)	801 \pm 644 (5)	7 \pm 8 (5)
3 d hypoxisch					65 \pm 83 (5)
4 d hypoxisch	379 \pm 66 (5) *	0 \pm 0 (5)	119 \pm 110 (5) *	1152 \pm 606 (5)	
6 d hypoxisch	325 \pm 53 (4) *	24 \pm 19 (4)	51 \pm 74 (4)	799 \pm 656 (4)	13 \pm 6 (6)
3 h oxisch	54 \pm 27 (5) *	124 \pm 99 (5) *	0 \pm 0 (5)	576 \pm 92 (5) *	17 \pm 8 (4)
6 h oxisch	50 \pm 14 (5) *	169 \pm 107 (5)	0 \pm 0 (5)	349 \pm 98 (5) *	28 \pm 18 (5) *
8 h oxisch	44 \pm 8 (5) *	246 \pm 102 (5) *	0 \pm 0 (5)	397 \pm 140 (5) *	26 \pm 23 (4)
1 d oxisch	40 \pm 15 (9) *	164 \pm 76 (9) *	0 \pm 0 (9)	440 \pm 243 (9) *	19 \pm 4 (5) *
3 d oxisch	38 \pm 19 (5) *	87 \pm 45 (5)	0 \pm 0 (5)	675 \pm 112 (5)	27 \pm 10 (5) *
6 d oxisch	94 \pm 9 (5) *	340 \pm 125 (5) *	0 \pm 0 (5)	669 \pm 79 (5)	38 \pm 17 (6) *

Tab. 6b. *Macoma balthica*, Dorum-Neufeld. Konzentration von Sulfid, Thiosulfat, Sulfit, Glutathion und Elementarschwefel im Gewebe nach hypoxischer und oxischer Inkubation bei 200 μM H_2S (10°C, 22‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse \pm Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte). *: Signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ($p\leq 0.05$)

Inkubation	Sulfid [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Thiosulfat [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Sulfit [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Glutathion [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Schwefel [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]
Kontrolle	9 \pm 10 (8)	29 \pm 30 (8)	0 \pm 0 (8)	366 \pm 141 (8)	19 \pm 19 (5)
1 d hypoxisch					2 \pm 3 (5)
2 d hypoxisch	69 \pm 29 (5) *	43 \pm 21 (5)	238 \pm 236 (5) *	281 \pm 95 (5)	
3 d hypoxisch	131 \pm 52 (5) *	130 \pm 45 (5) *	0 \pm 0 (5)	325 \pm 52 (5)	8 \pm 9 (5)
6 d hypoxisch	125 \pm 91 (4) *	69 \pm 53 (4)	187 \pm 217 (4)	314 \pm 142 (4)	8 \pm 10 (5)
3 h oxisch	16 \pm 7 (4)	75 \pm 28 (4) *	0 \pm 0 (4)	146 \pm 42 (4) *	
6 h oxisch	20 \pm 8 (4)	121 \pm 83 (4) *	0 \pm 0 (4)	250 \pm 53 (4)	
9 h oxisch	23 \pm 16 (5)	161 \pm 106 (5) *	0 \pm 1 (5)	252 \pm 54 (5)	
1 d oxisch	33 \pm 29 (9) *	170 \pm 195 (9) *	4 \pm 6 (9)	512 \pm 285 (9)	
2 d oxisch	33 \pm 37 (5)	176 \pm 132 (5) *	20 \pm 29 (5)	818 \pm 311 (5)	
4 d oxisch	16 \pm 6 (3)	64 \pm 14 (3) *	19 \pm 33 (3)	749 \pm 357 (3) *	

Tab. 6c. *Macoma balthica*, Danziger Bucht. Konzentration von Sulfid, Thiosulfat, Sulfit, Glutathion und Elementarschwefel im Gewebe nach hypoxischer und oxischer Inkubation bei 200 μM H_2S (10°C, 9‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse \pm Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte). *: Signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ($p\leq 0,05$)

Inkubation	Sulfid [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Thiosulfat [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Sulfit [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Glutathion [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Schwefel [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]
Kontrolle	1 \pm 2 (5)	0 \pm 0 (5)	0 \pm 0 (5)	218 \pm 77 (5)	12 \pm 9 (10)
1 d hypoxisch	28 \pm 10 (5) *	0 \pm 0 (5)	0 \pm 0 (5)	206 \pm 58 (5)	21 \pm 37 (5)
3 d hypoxisch	45 \pm 36 (5) *	0 \pm 0 (5)	0 \pm 0 (5)	261 \pm 64 (5)	11 \pm 8 (5)
6 d hypoxisch	23 \pm 14 (4) *	0 \pm 0 (4)	0 \pm 0 (4)	156 \pm 65 (4)	23 \pm 16 (7)
3 h oxisch	19 \pm 16 (5) *	32 \pm 27 (5) *	0 \pm 0 (5)	367 \pm 112 (5) *	
6 h oxisch	14 \pm 11 (5) *	30 \pm 26 (5) *	0 \pm 0 (5)	333 \pm 96 (5) *	
9 h oxisch	15 \pm 6 (5) *	55 \pm 34 (5) *	0 \pm 0 (5)	485 \pm 168 (5) *	
1 d oxisch	15 \pm 12 (10) *	68 \pm 80 (10) *	0 \pm 0 (10)	341 \pm 113 (10) *	15 \pm 8 (5)
2 d oxisch	23 \pm 16 (5) *	34 \pm 25 (5) *	0 \pm 0 (5)	261 \pm 66 (5)	
3 d oxisch					31 \pm 42 (3)
5 d oxisch	41 \pm 23 (5) *	37 \pm 25 (5) *	0 \pm 0 (5)	191 \pm 47 (5)	
6 d oxisch					35 \pm 12 (4) *

Tab. 6d. *Macoma balthica*, Hiddensee. Konzentration von Sulfid, Thiosulfat, Sulfit, Glutathion und Elementarschwefel im Gewebe nach hypoxischer und oxischer Inkubation bei 200 μM H_2S (10°C, 9‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse \pm Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte). *: Signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ($p\leq 0,05$)

Inkubation	Sulfid [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Thiosulfat [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Sulfit [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Glutathion [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]	Schwefel [$\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM]
Kontrolle	31 \pm 10 (5)	0 \pm 0 (5)	0 \pm 0 (5)	408 \pm 78 (5)	10 \pm 6 (10)
1 d hypoxisch	45 \pm 27 (5)	54 \pm 37 (5) *	0 \pm 0 (5)	324 \pm 90 (5)	7 \pm 7 (5)
3 d hypoxisch	112 \pm 46 (5) *	117 \pm 77 (5) *	0 \pm 0 (5)	405 \pm 84 (5)	11 \pm 9 (5)
6 d hypoxisch	83 \pm 13 (5) *	58 \pm 24 (5) *	0 \pm 0 (5)	325 \pm 137 (5)	22 \pm 12 (6) *
3 h oxisch	30 \pm 14 (5)	42 \pm 38 (5) *	0 \pm 0 (5)	334 \pm 30 (5) *	20 \pm 20 (5)
6 h oxisch	23 \pm 8 (5)	46 \pm 30 (5) *	0 \pm 0 (5)	290 \pm 37 (5) *	12 \pm 8 (5)
9 h oxisch	21 \pm 8 (5)	102 \pm 33 (5) *	0 \pm 0 (5)	295 \pm 147 (5)	17 \pm 7 (5)
1 d oxisch	36 \pm 23 (10)	122 \pm 119 (10) *	0 \pm 0 (10)	288 \pm 63 (10) *	21 \pm 4 (5) *
3 d oxisch	61 \pm 24 (5) *	123 \pm 27 (5) *	0 \pm 0 (5)	323 \pm 54 (5) *	18 \pm 13 (4)
6 d oxisch	78 \pm 37 (4) *	179 \pm 50 (4) *	0 \pm 0 (4)	329 \pm 110 (4)	39 \pm 24 (8) *

Als Oxidationsprodukte treten unter hypoxischen Bedingungen Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) meist nur in geringen Konzentrationen (Abb. 16b, Tab. 6a-d) und Sulfit (SO_3^{2-}) unregelmäßig in stark schwankenden Mengen auf (Tab. 6a-d). Es können auch geringe Elementarschwefelkonzentrationen (S_8) nachgewiesen werden (Tab. 6a-d). Der Anstieg ist jedoch in der Regel nicht signifikant.

Steht den Tieren Sauerstoff zur Verfügung, so sind sie in der Lage, einen Teil des eingedrungenen Schwefelwasserstoffs zu oxidieren, so daß dann deutlich geringere Sulfidkonzentrationen im Gewebe vorliegen (Abb. 17a, Tab. 6a-d). Über längere Zeit können die Muscheln jedoch einen Anstieg des Sulfidgehaltes in ihrem Gewebe nicht verhindern. So ist bereits nach drei Stunden oxischer Inkubation bei $200 \mu M H_2S$ bei den sulfidempfindlichen Plattmuscheln aus der Kieler Bucht ein signifikanter Anstieg der Sulfidkonzentration zu verzeichnen. Im Verlauf von sechs Tagen steigt der Gehalt dann nur noch leicht auf fast $100 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ an (Abb. 17a, Tab. 6a). Auch bei geringerer Sulfidkonzentration des Inkubationsmediums können die Kieler Tiere längerfristig einen Anstieg des internen Sulfidgehaltes nicht verhindern. Bei oxischer Inkubation mit nur $100 \mu M H_2S$ liegt der interne Sulfidgehalt in etwa der gleichen Größenordnung wie bei $200 \mu M H_2S$ (maximal $150 \pm 76 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$, $n=5$, nach zehn Tagen).

Bei Exemplaren aus Hiddensee, die die höchste Sulfidresistenz aufweisen, tritt dagegen bei $200 \mu M H_2S$ innerhalb von 24 Stunden noch keine signifikante Sulfidanreicherung im Gewebe auf (Abb. 17a, Tab. 6d). Erst nach drei Tagen steigt der Gehalt signifikant auf ca. $60 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ an.

Bei den Nordseetieren (Dorum-Neufeld) wird nach einem Tag etwa $30 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ erreicht, während bei den toleranteren Tieren aus der Danziger Bucht $40 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ erst nach fünf Tagen zu finden sind (Abb. 17a, Tab. 6b, c). Nach sechstägiger Inkubation mit $60 \mu M H_2S$ liegen im Gewebe der Danziger Tiere sogar nur $12 \pm 9 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FM}$ ($n=4$) vor.

Thiosulfat ist bei *Macoma balthica* ein wichtiges Sulfidoxidationsprodukt (Abb. 17b, Tab. 6a-d). Alle untersuchten Populationen sind bereits innerhalb der ersten Stunden oxisch-sulfidischer Inkubationen in der Lage, einen Teil des eingedrungenen Sulfids zu Thiosulfat zu oxidieren.

Ein signifikanter Anstieg von Sulfit kann bei den Populationen nicht nachgewiesen werden, dagegen tritt als weiteres Oxidationsprodukt elementarer Schwefel auf (Tab. 6a-d). Die Konzentrationen sind jedoch im Vergleich zu Thiosulfat gering und steigen nur langsam an.

Im Glutathiongehalt ergeben sich unter Hypoxie keine und unter oxischen Bedingungen nur kurzfristige signifikante Veränderungen (Tab. 6a-d).

1.5 Apparenter Diffusionskoeffizient und apparente Entgiftungskonstante für Schwefelwasserstoff

Um ein Maß für die Eindringgeschwindigkeit von Schwefelwasserstoff in das Gewebe der Tiere zu finden, wurde über Gl. (17)

$$D = \frac{r_e^2}{3\tau} \quad (17)$$

der apparente Diffusionskoeffizient für Gesamtsulfid D bestimmt. Der effektive Radius r_e konnte über Gl. (18) aus dem Wassergehalt ($w = 0.84$; Bordin *et al.* 1992), der Dichte des Wassers ($\rho \approx 1 \text{ g cm}^{-3}$) und der Frischmasse m der Tiere ohne Schale abgeschätzt werden. Die Sättigungshalbwertszeit τ wurde durch Auftragung des Kehrwertes der Gesamtschwefelkonzentration $1/c$ ($\text{H}_2\text{S} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{SO}_3^{2-} + \text{S}_8$) nach oxischer Inkubation bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$ gegen den Kehrwert der Inkubationszeit $1/t$ gewonnen (Linearisierung von Gl. 10 nach Lineweaver & Burk 1934). In Abb. 18 ist dies beispielhaft für die Population aus der Danziger Bucht dargestellt. Aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse bzw. aus der Geradengleichung (19) kann die Halbwertszeit ermittelt werden. In Tab. 7 sind die Geradengleichungen, die berechneten Halbwertszeiten τ , die durchschnittlichen Frischmassen m , die daraus berechneten effektiven Radien r_e (Gl. 18) sowie die Diffusionskoeffizienten D (Gl. 17) für die untersuchten Populationen zusammengestellt.

Tab. 7. *Macoma balthica*. Populationen aus der Kieler Bucht, Dorum-Neufeld, der Danziger Bucht und Hiddensee. Berechnung der apparenten Diffusionskoeffizienten und Entgiftungskonstanten. Die Daten wurden durch oxische Inkubation bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$ (10°C ; 9 bzw. 22‰S; pH 8,0) gewonnen. Weitere Erläuterung im Text

	Kiel	Dorum	Danzig	Hiddensee
$f(x) =$	$0.0033x+0.0024$	$0.0118x+0.0045$	$0.0274x+0.0050$	$0.0150x+0.0026$
τ [h]	1,4	2,6	5,5	5,7
m [mg]	48	150	188	104
r_e [cm]	0,213	0,311	0,335	0,275
D [$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$]	$3,00\cdot 10^{-6}$	$3,44\cdot 10^{-6}$	$1,89\cdot 10^{-6}$	$1,23\cdot 10^{-6}$
c_{max} [nmol·g ⁻¹ FM]	94	33	41	78
c_j [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	112	39	49	93
k [s^{-1}]	$1,15\cdot 10^{-4}$	$1,75\cdot 10^{-4}$	$7,10\cdot 10^{-5}$	$3,73\cdot 10^{-5}$

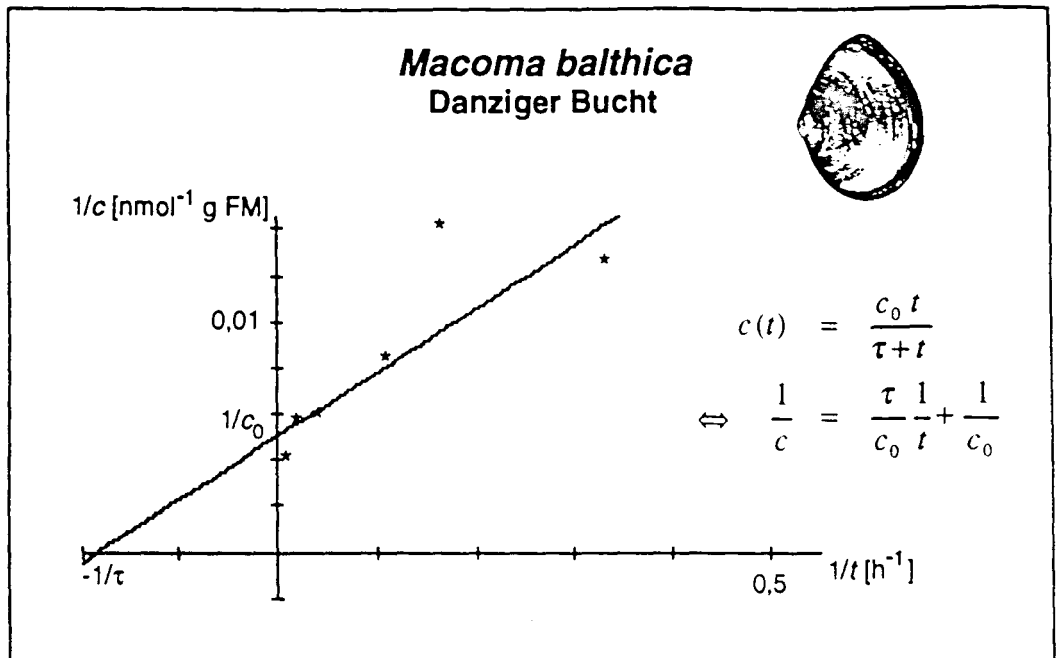


Abb. 18. *Macoma balthica*, Danziger Bucht. Ermittlung der Sättigungshalbwertszeit τ durch Linearisierung nach Lineweaver-Burk. Die Daten wurden durch oxische Inkubation bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$ gewonnen. Weitere Erläuterung im Text

Es zeigt sich, daß die Populationen aus der Kieler Bucht und aus Dorum-Neufeld jeweils einen etwa doppelt so hohen Sulfiddiffusionskoeffizienten wie die Populationen aus der Danziger Bucht und von Hiddensee haben (Tab. 7). Bei den sulfidempfindlicheren Tieren dringt also Schwefelwasserstoff doppelt so schnell in das Gewebe ein.

In Tab. 7 sind zusätzlich die maximal gemessenen Sulfidkonzentrationen des Gewebes c_{max} nach oxischer Inkubation bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$ (vgl. Tab. 6a-d) aufgeführt. Aus diesen Werten wurde unter Berücksichtigung von Wassergehalt (84%) und Dichte des Wassers (ca. $1 \text{ kg}\cdot\text{l}^{-1}$) die H_2S -Gleichgewichtsinnenkonzentrationen c_i bestimmt. Mit Hilfe dieser Größen sowie der H_2S -Außenkonzentration $c_0 = 200 \mu\text{M}$ kann über Gl. (24)

$$k = \frac{1}{\tau} \ln \frac{c_0}{c_i} \quad (24)$$

die Sulfidentgiftungskonstante k berechnet werden. Diese beschreibt die Geschwindigkeit, mit der eingedrungener Schwefelwasserstoff entgiftet wird. Da hierbei sämtliche Entgiftungsmechanismen in die Berechnung mit einfließen, handelt es sich, wie beim Diffusionskoeffi-

zienten, um eine apparente Größe. Die ermittelten Entgiftungskonstanten für die verschiedenen Populationen sind in Tab. 7 ebenfalls angegeben. Hierbei ergeben sich bei den sulfidempfindlichen Plattmuscheln aus der Kieler Bucht und von Dorum-Neufeld gegenüber den sulfidresistenteren Tieren aus der Danziger Bucht und von Hiddensee erhöhte Werte.

1.6 Größenabhängigkeit der Schwefelwasserstoffentgiftung

Die Geschwindigkeit der Sulfiddiffusion wird auch durch die Größe der Tiere beeinflusst. Mit Gl. (25)

$$c_i = c_0 e^{-k r_e^2 / 3D} \quad (25)$$

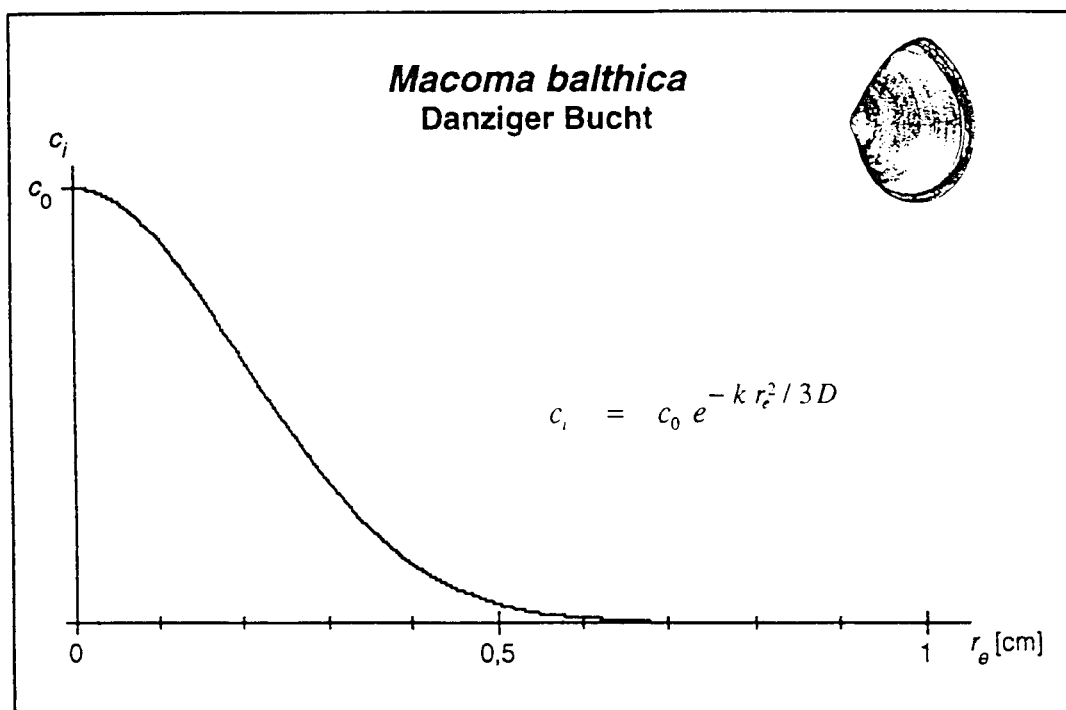


Abb. 19. *Macoma balthica*. Danziger Bucht. Abhängigkeit der H_2S -Gleichgewichtsinnenkonzentration c_i vom effektiven Radius r_e . Die Daten wurden durch oxische Inkubation bei $200 \mu M H_2S$ gewonnen. Weitere Erläuterung im Text

kann die H_2S -Gleichgewichtsinnenkonzentration c_i in Abhängigkeit vom effektiven Radius r_e und damit von der Größe der Tiere berechnet werden. Abb. 19 zeigt den Kurvenverlauf, ermittelt aus den Daten der Danziger Population, aus der eine exponentielle Abhängigkeit der internen Sulfidkonzentration von der Tiergröße deutlich wird. Mit abnehmendem Radius nähert sich die H_2S -Gleichgewichtsinnenkonzentration der Außenkonzentration an. Kleine Tiere sind also unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage, Schwefelwasserstoff effektiv zu entgiften.

Um diese theoretische Abhängigkeit der Sulfidentgiftung von der Tiergröße experimentell zu überprüfen, wurden unterschiedlich große Exemplare von *Macoma balthica* aus der Danziger Bucht bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$ unter oxischen Bedingungen einen Tag inkubiert. Abb. 20 zeigt die Sulfid- und Thiosulfatakkumulation bei drei verschiedenen Größenklassen. Bei großen Muscheln mit einer Schalenlänge von mehr als 16 mm ist nur wenig Sulfid im Gewebe zu finden, und entsprechend niedrig bleibt die Thiosulfatproduktion. Dagegen dringt bei kleinen Tieren mit einer Schalenlänge von unter 12 mm Sulfid schneller in das Gewebe ein, so daß in der gleichen Zeit und unter gleichen Bedingungen wesentlich mehr Thiosulfat produziert wird.

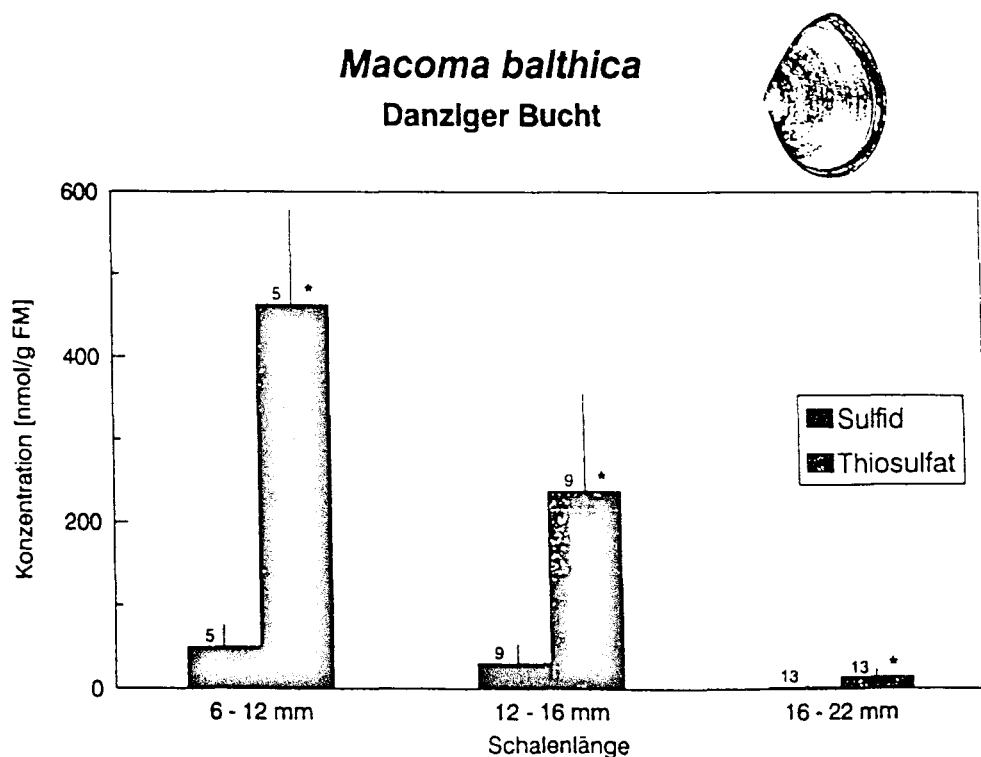


Abb. 20. *Macoma balthica*. Danziger Bucht. Konzentration von Sulfid und Thiosulfat im Gewebe nach einem Tag oxischer Inkubation bei $200 \mu\text{M H}_2\text{S}$ (10°C ; 9‰S) dreier verschiedener Größenklassen in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse + Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte).
*: Signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$)

1.7 Cytochrom-c-Oxidase

In das Gewebe eingedrungener Schwefelwasserstoff blockiert das Atmungsenzym Cytochrom-c-Oxidase (National Research Council 1979). Zur Ermittlung der Sulfidinhibitions-konstante wurde das Enzym aus Plattmuscheln der verschiedenen Habitate isoliert und unterschiedlichen H_2S -Konzentrationen ausgesetzt. Es zeigt sich, daß die Cytochrom-c-Oxidase bei allen untersuchten Populationen von *Macoma balthica* schon durch sehr geringe Sulfidkonzentrationen gehemmt wird (Tab. 8). Die Inhibitionskonstanten liegen alle im nanomolaren Bereich. Eine sulfidunempfindliche Form der Cytochrom-c-Oxidase liegt folglich bei *M. balthica* in keinem Fall vor.

Tab. 8. *Macoma balthica*. Populationen aus der Kieler Bucht, Dorum-Neufeld, der Danziger Bucht und Hiddensee. Inhibitionskonstante K_I der Cytochrom-c-Oxidase für H_2S . Angegeben ist die Sulfidkonzentration in $\mu M H_2S$, bei der das Enzym zu 50% gehemmt ist (n=3 mit jeweils mehreren Messungen zwischen 0,1 und 5 $\mu M H_2S$).

Population	K_I [$\mu M H_2S$]
Kiel	0,65±0,41
Dorum	0,56±0,22
Danzig	0,25±0,02
Hiddensee	0,13±0,01

Um zu untersuchen, ob die Inhibition auch *in vivo* stattfindet, wurden in einer weiteren Versuchsreihe statt isolierter Enzympräparate die lebenden Tiere mit Schwefelwasserstoff unter oxidischen Bedingungen inkubiert. Nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer bei 200 $\mu M H_2S$ wurde die Cytochrom-c-Oxidase isoliert und deren Aktivität gemessen.

Hierbei ergibt sich, daß die spezifische Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase bei Individuen aus der Kieler Bucht und aus Dorum-Neufeld schon nach wenigen Tagen signifikant zurückgeht (Abb. 21a). Bei Exemplaren aus der Danziger Bucht und aus Hiddensee ist dagegen über den gesamten Inkubationszeitraum kein Rückgang der spezifischen Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase zu beobachten (Abb. 21b).

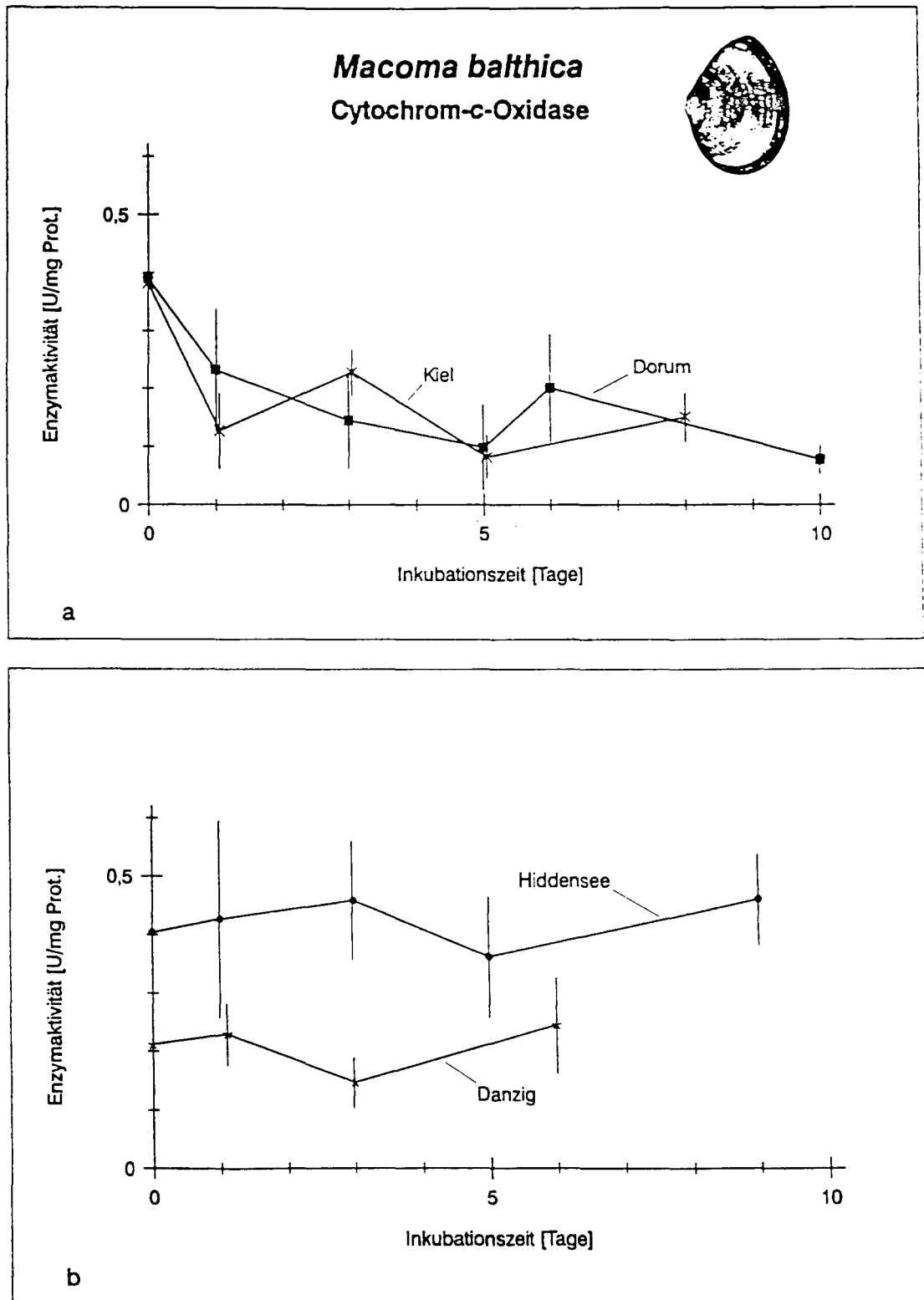


Abb. 21. *Macoma balthica*, Populationen aus (a) der Kieler Bucht und Dorum-Neufeld (22‰S) und (b) der Danziger Bucht und Hiddensee (9‰S). Spezifische Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase nach oxidischer Inkubation bei 200 µM H₂S (10°C). Dargestellt ist die Aktivität in U·mg⁻¹ Protein ± Standardabweichung.

In welchem Zeitraum wird die volle spezifische Aktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase nach Sulfidinkubation wieder hergestellt? Zur Untersuchung dieser Frage wurden Exemplare der sulfidempfindlichen Populationen zunächst fünf Tage in Gegenwart von 200 μM H_2S unter oxidischen Bedingungen inkubiert. Die spezifische Cytochrom-*c*-Oxidase-Aktivität geht hierbei erwartungsgemäß signifikant zurück (Abb. 22). Dann wurde die Sulfidzufuhr unterbrochen, nach unterschiedlicher Dauer im oxidischen Medium ("Erholung") die Cytochrom-*c*-Oxidase aus den Tieren isoliert und deren Aktivität gemessen.

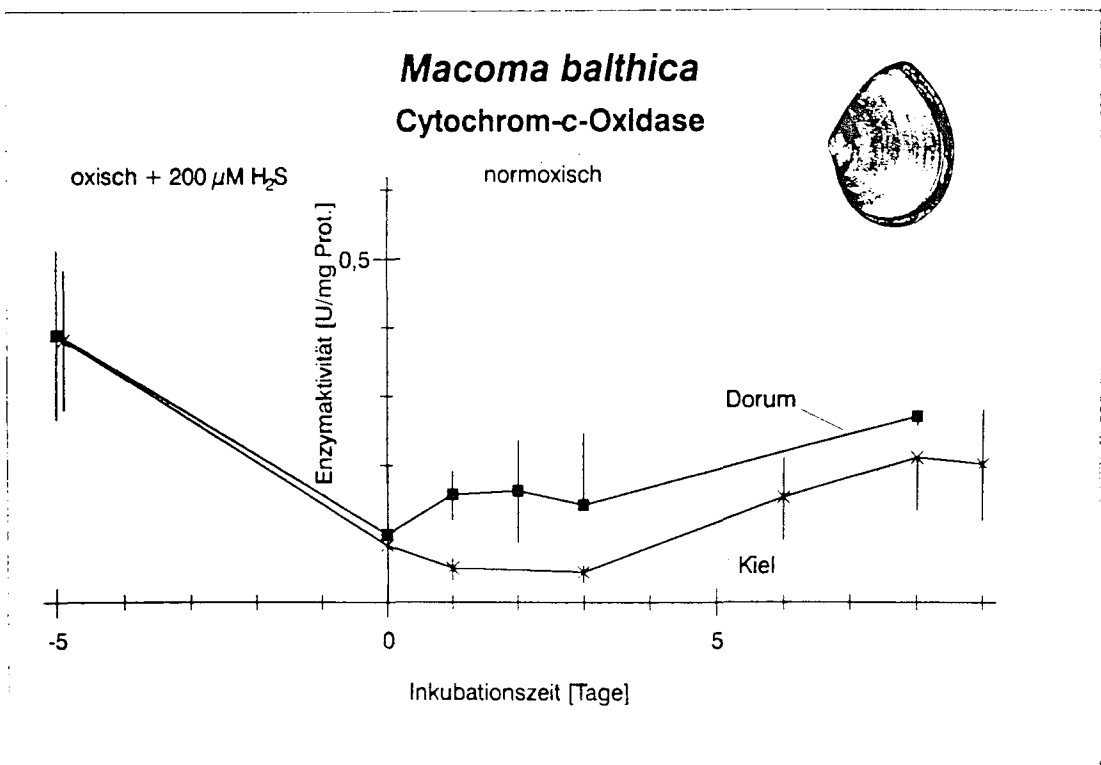


Abb. 22. *Macoma balthica*. Populationen aus der Kieler Bucht und aus Dorum-Neufeld. Erholung der spezifischen Aktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase. Die Tiere wurden fünf Tage bei 200 μM H_2S unter oxidischen Bedingungen inkubiert und dann ohne H_2S weiter gehalten (10°C; 22‰S).

Es zeigt sich, daß sich die spezifische Enzymaktivität in den Tieren beider Populationen nur langsam erholt (Abb. 22). Nach neun Tagen hat die Aktivität ihren Ausgangswert noch nicht wieder vollständig erreicht.

1.8 Katalase

Schwefelwasserstoff inhibiert nicht nur Cytochrom-*c*-Oxidase, sondern auch andere metallhaltige Enzyme, wie das an der Sauerstoffradikalentgiftung beteiligte Enzym Katalase (Bagarinao 1992). Es könnten jedoch bei den Populationen von *Macoma balthica* jeweils unterschiedlich sulfidempfindliche Katalasen vorliegen. Zur Untersuchung dieser Frage wurde die Katalase-Aktivität sowie deren Sulfidinhibitionskonstante in Plattmuscheln aus der Kieler Bucht, Dorum-Neufeld und aus Hiddensee gemessen. Zum Vergleich wurde auch die Katalase-Aktivität und Inhibitionskonstante bei dem sulfidresistenten Priapuliden *Halicryptus spinulosus* sowie bei den Polychaeten *Hediste (Nereis) diversicolor*, *Heteromastus filiformis* und *Pherusa plumosa* bestimmt.

Tab. 9. *Macoma balthica*, *Halicryptus spinulosus*, *Hediste (Nereis) diversicolor*, *Heteromastus filiformis* und *Pherusa plumosa*. Katalase-Aktivität und Sulfidinhibitionskonstante K_I . Angegeben ist die Reaktionskonstante k in $s^{-1} \cdot mg^{-1}$ Protein bzw. die Enzymaktivität in $U \cdot mg^{-1}$ Protein \pm Standardabweichung sowie die Sulfidkonzentration in mM H_2S , bei der Katalase zu 50% gehemmt wird (Anzahl der Meßwerte).

Art	Population	Aktivität	K_I
		[$s^{-1} \cdot mg^{-1}$ Prot./ $U \cdot mg^{-1}$ Prot.]	[mM H_2S]
<i>Macoma balthica</i>	Kiel	0,076 \pm 0,024 / 45 \pm 14 (8)	0,10 (7- 8)
	Dorum	0,046 \pm 0,013 / 27 \pm 8 (13)	0,11 (3- 6)
	Hiddensee	0,105 \pm 0,026 / 61 \pm 15 (5)	0,10 (5)
<i>Halicryptus spinulosus</i> Hautmuskelschlauch		0,075 \pm 0,017 / 33 \pm 10 (6)	0,22 (8-11)
	Hämolymphe	0,104 \pm 0,082 / 61 \pm 48 (5)	0,31 (4-13)
<i>Hediste diversicolor</i>		0,106 \pm 0,094 / 62 \pm 55 (4)	0,68 (6-10)
<i>Heteromastus filiformis</i>		0,059 \pm 0,028 / 34 \pm 16 (8)	0,55 (5- 8)
<i>Pherusa plumosa</i>		0,286 \pm 0,061 / 167 \pm 36 (9)	0,10 (6- 9)

Die Inhibitionskonstanten liegen bei den verschiedenen Populationen von *Macoma balthica* wie auch bei den anderen Arten im mikromolaren Bereich (Tab. 9). Katalase ist damit um drei Größenordnungen weniger empfindlich gegenüber Schwefelwasserstoff als Cytochrom-*c*-Oxidase (vgl. Tab. 8 in Kap. 1.7). Eine spezifisch sulfidunempfindliche Form der Katalase kann jedoch bei keiner Art nachgewiesen werden.

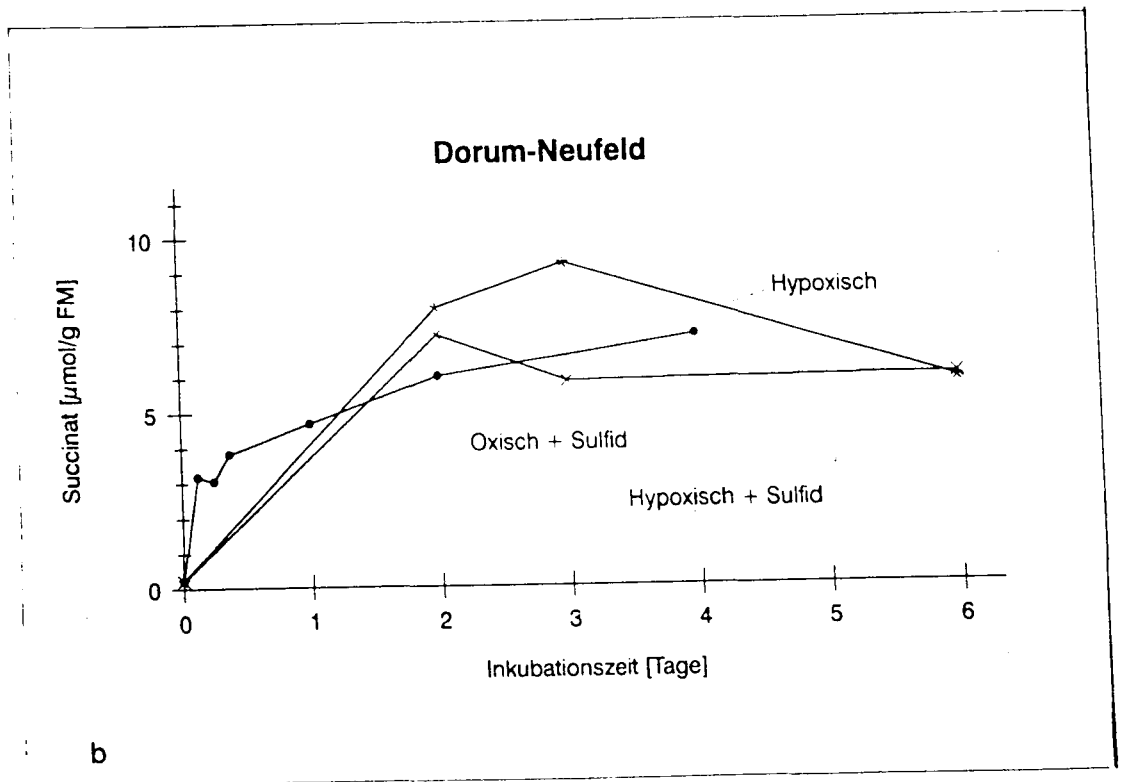
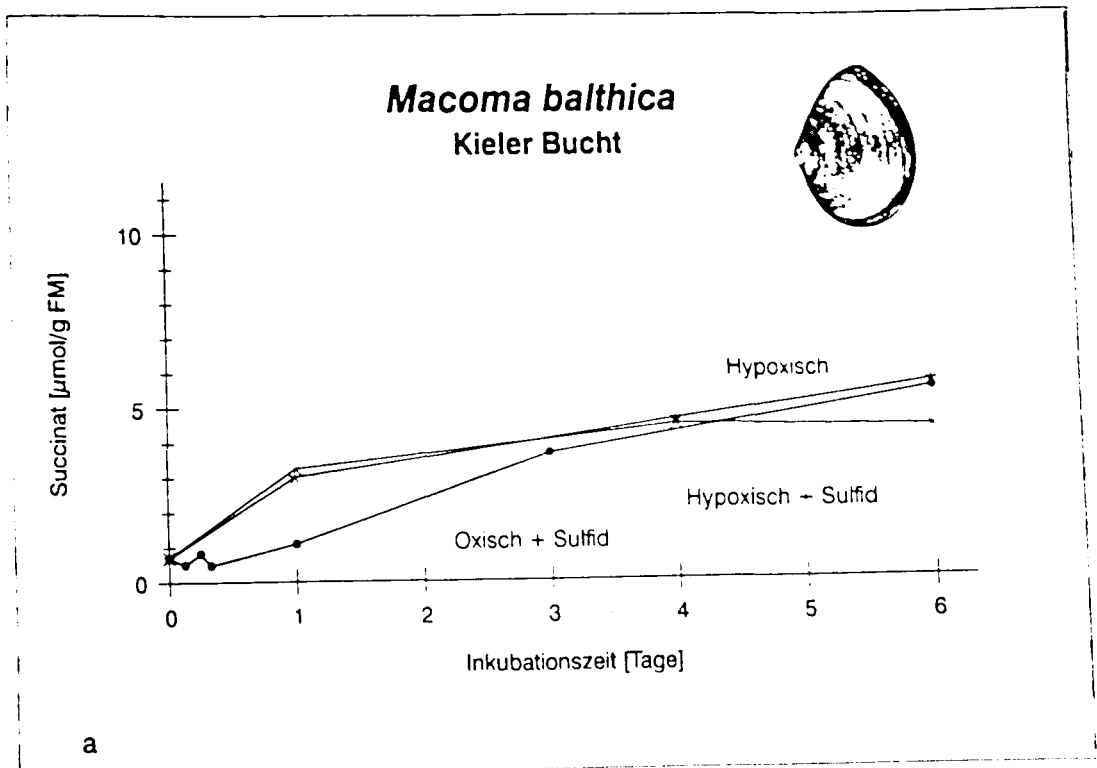
1.9 Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase

In welchem Maße werden auch Enzyme des Energiestoffwechsels durch Schwefelwasserstoff beeinträchtigt? Zur Untersuchung dieser Frage wurden Enzympräparate von Malatdehydrogenase (MDH) und Glutamatdehydrogenase (GDH) von *Macoma balthica* aus der Kieler Bucht *in vitro* 15 Minuten mit 1 mM H₂S inkubiert. Die Enzymaktivität wird hierbei nur unwesentlich beeinflusst; MDH ist noch zu 88,6±10,4% (n=7) und GDH zu 87,1±23,8% (n=5) aktiv. Schwefelwasserstoff hat offensichtlich keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität dieser Enzyme des Energiestoffwechsels.

1.10 Anaerober Stoffwechsel

Über den Metaboliten Succinat kann das Umschalten auf einen anaeroben Stoffwechsel nachgewiesen werden (Gäde & Grieshaber 1989). Zur Untersuchung, wann *Macoma balthica* in Gegenwart von Schwefelwasserstoff zu Anaerobiose übergeht, wurde der Succinatgehalt im Gewebe von Exemplaren nach hypoxischer, hypoxisch-sulfidischer und oxisch-sulfidischer Inkubation gemessen.

Bei allen untersuchten Populationen zeigt sich ein schneller Anstieg der Succinatkonzentration im Gewebe der Tiere (Abb. 23a-d, Tab. 10). In wenigen Tagen werden hohe Succinatwerte sowohl unter Hypoxie ohne Sulfid als auch unter hypoxischen Bedingungen bei 200 µM H₂S erreicht. Auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff und Sulfid liegen die Succinatkonzentrationen in der gleichen Größenordnung. Die Tiere haben offensichtlich trotz oxischer Bedingungen auf einen anaeroben Stoffwechsel umgeschaltet.



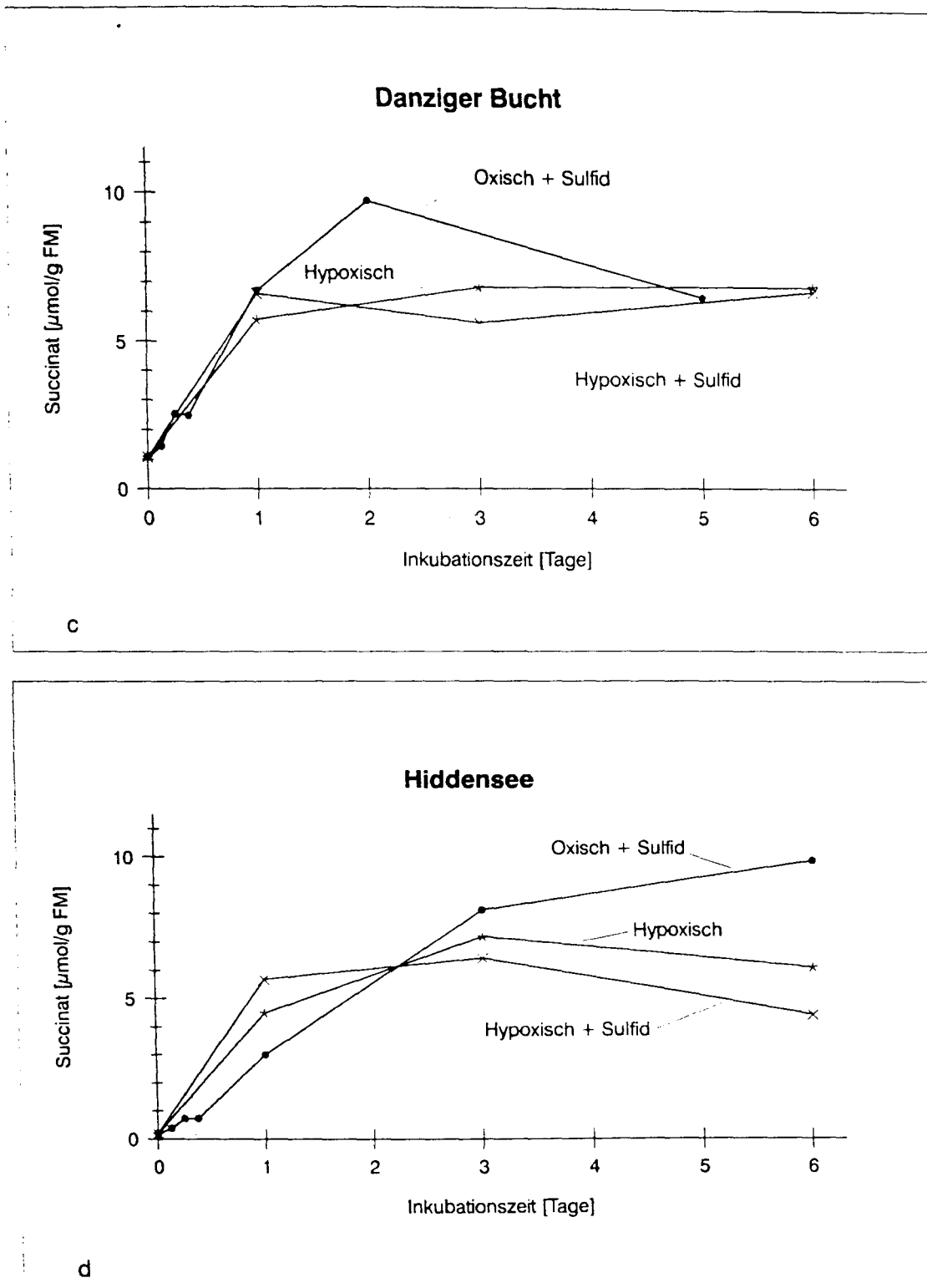


Abb. 23. *Macoma balthica*. Populationen aus (a) der Kieler Bucht, (b) Dorum-Neufeld, (c) der Danziger Bucht und (d) Hiddensee. Konzentration von Succinat im Gewebe nach Hypoxie sowie nach hypoxischer Inkubation bei 200 µM H₂S und oxischer Inkubation bei 200 µM H₂S. Weitere Angaben wie Standardabweichungen, Anzahl der Meßwerte und signifikante Unterschiede s. Tab. 10

Tab. 10. *Macoma balthica*. Populationen aus der Kieler Bucht, Dorum-Neufeld, der Danziger Bucht und Hiddensee. Konzentration von Succinat im Gewebe nach Hypoxie sowie nach hypoxischer Inkubation bei 200 μM H_2S und oxischer Inkubation bei 200 μM H_2S (10°C; 22 bzw. 9‰S) in $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischmasse \pm Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte). *: Signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ($p\leq 0.05$)

Inkubation	Kiel	Dorum	Danzig	Hiddensee
Kontrolle	0,71 \pm 0,20 (2)	0,22 \pm 0,20 (8)	1,07 \pm 0,95(10)	0,19 \pm 0,05 (5)
1 d hypoxisch.	3,01 \pm 0,71 (4)		5,72 \pm 1,65 (5) *	4,47 \pm 0,82 (5) *
2 d hypoxisch		7,98 \pm 2,08 (5) *		
3 d hypoxisch		9,23 \pm 1,85 (5) *	6,81 \pm 1,30 (4) *	7,17 \pm 1,18 (5) *
4 d hypoxisch	4,62 \pm 1,74 (5) *			
6 d hypoxisch	5,65 \pm 3,84 (3)	5,83 \pm 4,48 (4) *	6,87 \pm 2,05 (3) *	6,07 \pm 2,80 (4) *
1 d hypox.-sulf.	3,26 \pm 0,91 (3)		6,58 \pm 2,55 (4) *	5,66 \pm 2,32 (5) *
2 d hypox.-sulf.		7,20 \pm 1,48 (5) *		
3 d hypox.-sulf.		5,64 \pm 2,30 (4) *	5,62 \pm 2,26 (5) *	6,40 \pm 0,95 (5) *
4 d hypox.-sulf.	4,47 \pm 2,21 (5) *			
6 d hypox.-sulf.	4,36 \pm 1,96 (4)	5,96 \pm 3,03 (4) *	6,70 \pm 0,48 (4) *	4,38 \pm 0,73 (4) *
3 h ox.-sulf.	0,50 \pm 0,29 (5)	3,18 \pm 1,67 (5) *	1,44 \pm 0,49 (5)	0,37 \pm 0,21 (4)
6 h ox.-sulf.	0,83 \pm 0,43 (3)	3,05 \pm 0,86 (5) *	2,52 \pm 0,25 (4)	0,72 \pm 0,66 (3) *
9 h ox.-sulf.	0,49 \pm 0,17 (5)	3,83 \pm 0,38 (5) *	2,48 \pm 0,52 (5) *	0,73 \pm 0,55 (5)
1 d ox.-sulf.	1,09 \pm 0,51 (8)	4,68 \pm 2,79 (9) *	6,70 \pm 3,23 (9) *	2,98 \pm 2,14 (10) *
2 d ox.-sulf.		6,02 \pm 2,01 (3) *	9,72 \pm 1,13 (5) *	
3 d ox.-sulf.	3,66 \pm 1,59 (4)			8,10 \pm 2,58 (5) *
4 d ox.-sulf.		7,15 \pm 3,57 *		
5 d ox.-sulf.			6,49 \pm 1,46 (5) *	
6 d ox.-sulf.	5,47 \pm 0,64 (5) *			9,84 \pm 0,37 (4) *

Auch unter geringeren Sulfidkonzentrationen produzieren die Plattmuscheln Succinat. So liegt die Succinatkonzentration nach sechs Tagen oxischer Inkubation bei 100 μM H_2S bei den Kieler Tieren bei 6,27 \pm 0,47 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM (n=3). Bei den Danziger Tieren werden in der gleichen Zeit bei 60 μM H_2S unter oxischen Bedingungen 8,73 \pm 4,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM (n=4) erreicht.

2 *Cyprideis torosa*

2.1 Toleranzversuche

An den Standorten Hiddensee und Boiensdorf konnten regelmäßig hohe Sulfidkonzentrationen im Sediment gemessen werden (DYSMON I 1994). An solchen stark sulfidischen Flachwasserhabitaten der Ostsee tritt der Ostracode *Cyprideis torosa* in hohen Abundanzen auf (Gamenick *et al.* 1996). Daher wurde in Zusammenarbeit mit Inez Gamenick (Universität Hamburg) die Überlebensfähigkeit der Muschelkrebse unter Sauerstoffmangel und Schwefelwasserstoffbelastung im Labor untersucht.

Es zeigt sich hierbei eine außerordentlich hohe Toleranz der Tiere gegenüber Sauerstoffmangel (Abb. 24). Bei Hypoxie überleben 50% der Exemplare etwa vier Wochen. Auch unter extrem hohen Schwefelwasserstoffkonzentrationen liegen hohe Überlebensraten vor. Der LT_{50} -Wert für 1 mM wie auch für 1,8 mM H_2S beträgt etwa drei Wochen.

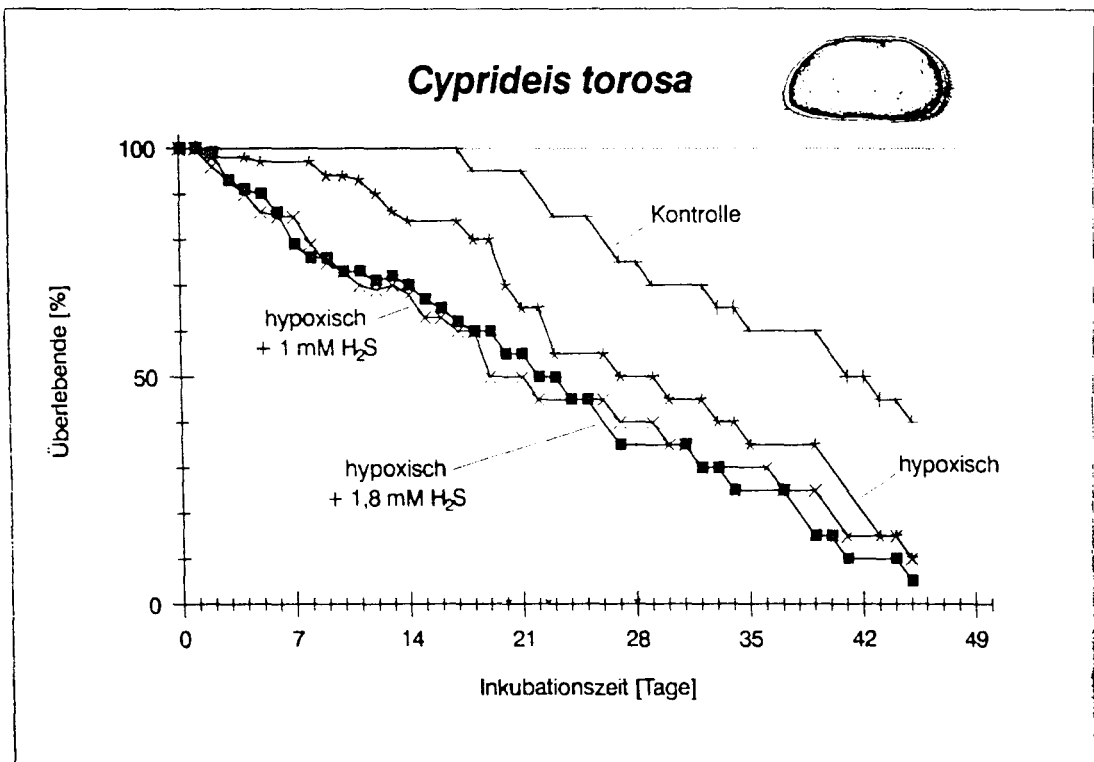


Abb. 24. *Cyprideis torosa*. Überlebensfähigkeit nach Hypoxie sowie nach hypoxischer Inkubation bei 1 mM und 1,8 mM H_2S (16°C; 14‰S; n=5 mit jeweils 20 Tieren; aus Gamenick *et al.* 1996; Tierzeichnung dieser und der folgenden Abbildungen aus Sars 1925)

2.2 Schwefelkomponenten

Zur Untersuchung der physiologischen Grundlagen dieser hohen Sulfidresistenz wurden die Tiere unterschiedlich lange bei 1 mM H_2S unter hypoxischen und oxischen Bedingungen inkubiert. In Zeitreihen wurden die Gehalte an Sulfid und seinen Oxidationsprodukten im Gewebe bestimmt.

Bereits nach einer Stunde hypoxisch-sulfidischer Inkubation steigt der Sulfidgehalt signifikant an und erreicht nach zwei Stunden den Maximalwert von über 600 nmol g^{-1} FM (Abb. 25a, Tab. 11). Im Verlauf von sieben Tagen verändert er sich dann kaum noch

Der Thiosulfatgehalt des Gewebes steigt innerhalb von sechs Stunden leicht auf etwa 200 nmol g^{-1} FM (Abb. 25b, Tab. 11), sinkt aber in den folgenden Tagen wieder ab. Als weiteres Oxidationsprodukt ist Sulfit nur in geringen Konzentrationen nachweisbar (Tab. 11).

Auch wenn den Tieren Sauerstoff zur Verfügung steht, steigt der Sulfidgehalt des Gewebes schnell an und erreicht etwa die gleichen Mengen wie unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 25a, Tab. 11). Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen oxischen und hypoxischen Inkubationen.

Dagegen ist beim Thiosulfat unter oxischen Bedingungen eine wesentlich stärkere Anreicherung im Gewebe im Vergleich zu hypoxischen Inkubationen zu erkennen (Abb. 25b, Tab. 11). Nach einem Tag wird der äußerst hohe Wert von über 2500 nmol g^{-1} FM erreicht. Sulfit ist dagegen wiederum nur in niedrigen Konzentrationen zu finden (Tab. 11). Im Glutathiongehalt ist unter oxischen Bedingungen ein leichter Anstieg nachweisbar, jedoch ohne zeitlich zunehmende Tendenz (Tab. 11).

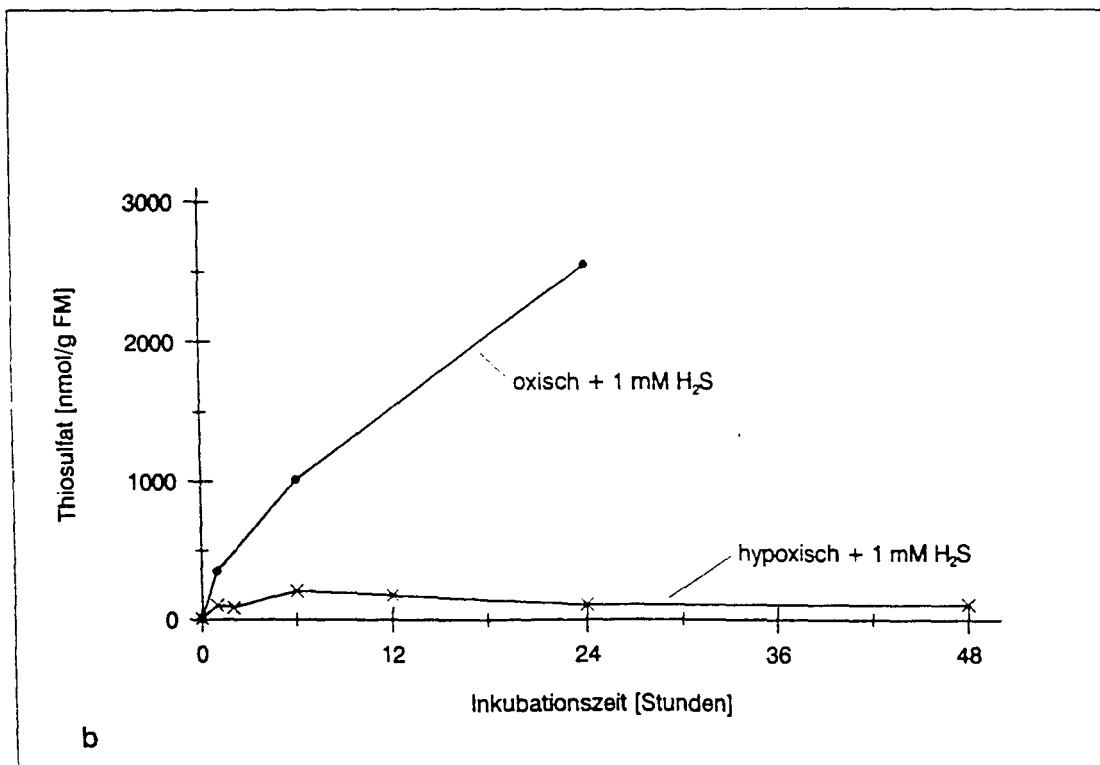
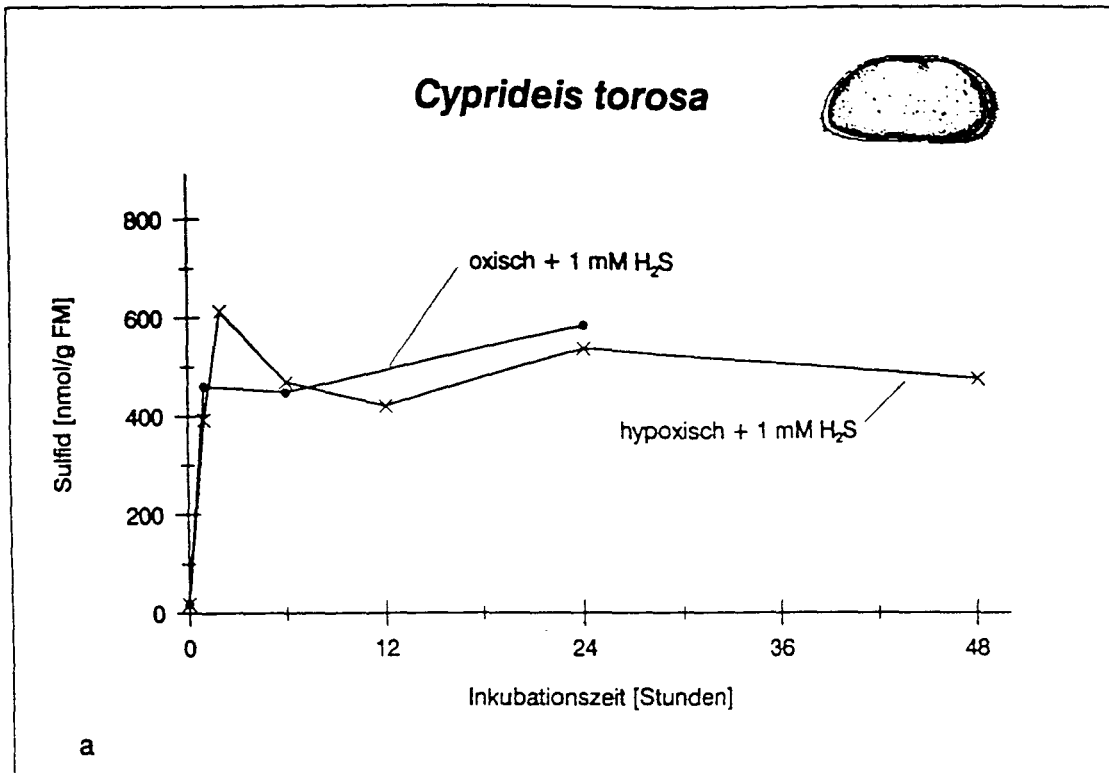


Abb. 25. *Cyprideis torosa*. Konzentration von (a) Sulfid und (b) Thiosulfat im Gewebe nach hypoxischer und oxischer Inkubation bei 1 mM H₂S. Weitere Angaben wie Standardabweichungen, Anzahl der Meßwerte und signifikante Unterschiede s. Tab. 11 (aus Jahn *et al.* 1996)

Tab. 11. *Cyprideis torosa*. Konzentration von Sulfid, Thiosulfat, Sulfit und Glutathion im Gewebe nach hypoxischer und oxischer Inkubation bei 1 mM H₂S (16°C, 14‰S) in nmol·g⁻¹ Frischmasse ± Standardabweichung (Anzahl der Meßwerte mit jeweils 100 Tieren). *: Signifikanter Unterschied zum Kontrollwert; #: signifikanter Unterschied zwischen hypoxischer und oxischer Inkubation (p≤0.05)

Inkubation	Sulfid [nmol·g ⁻¹ FM]	Thiosulfat [nmol·g ⁻¹ FM]	Sulfit [nmol·g ⁻¹ FM]	Glutathion [nmol·g ⁻¹ FM]
Kontrolle	18± 6 (3)	10± 17 (3)	0± 0 (3)	149± 38 (3)
1 h hypoxisch	392± 82 (4) *	103± 45 (4) *	15±10 (4)	319± 56 (4) *
2 h hypoxisch	613±109 (4) *	86± 60 (4) *	10±14 (4)	213± 80 (4)
6 h hypoxisch	469± 38 (3) *	206± 59 (3) *	47±16 (3) *	376± 25 (3) *
12 h hypoxisch	420± 19 (3) *	177± 17 (3) *	40±11 (3) *	288±114 (3)
1 d hypoxisch	537±182 (9) *	108± 69 (9) *	9± 9 (9)	263±118 (9)
2 d hypoxisch	476± 81 (3) *	113± 70 (3) *	39±42 (3)	239± 62 (3)
3 d hypoxisch	426± 96 (3) *	82± 28 (3) *	28±26 (3)	250± 98 (3)
7 d hypoxisch	551± 16 (3) *	52± 22 (3)	0± 0 (3)	86± 35 (3)
1 h oxisch	461±150 (3) *	353± 50 (3) **	27± 3 (3) *	377± 79 (3) *
6 h oxisch	448±139 (3) *	1009±102 (3) **	72±30 (3) *	269± 39 (3) **
1 d oxisch	584± 58 (3) *	2549±321 (3) **	74±15 (3) **	257± 16 (3) *

2.3 Beeinflussung durch Bakterienbesiedlung

Die Carapaxinnenseite der Ostracoden ist von Bakterien dicht besiedelt. Es war daher zu klären, ob diese Bakterien einen Einfluß auf die Sulfid- und Thiosulfatakkumulation der Ostracoden haben. Hierzu wurden die hypoxischen Inkubationen mit Antibiotika zur Abtötung der Bakterien wiederholt. Es ergibt sich hierbei kein Einfluß auf den Sulfid- (Abb. 26a) oder den Thiosulfatgehalt (Abb. 26b). Das gebildete Thiosulfat wird also von den Ostracoden und nicht von den Bakterien produziert.

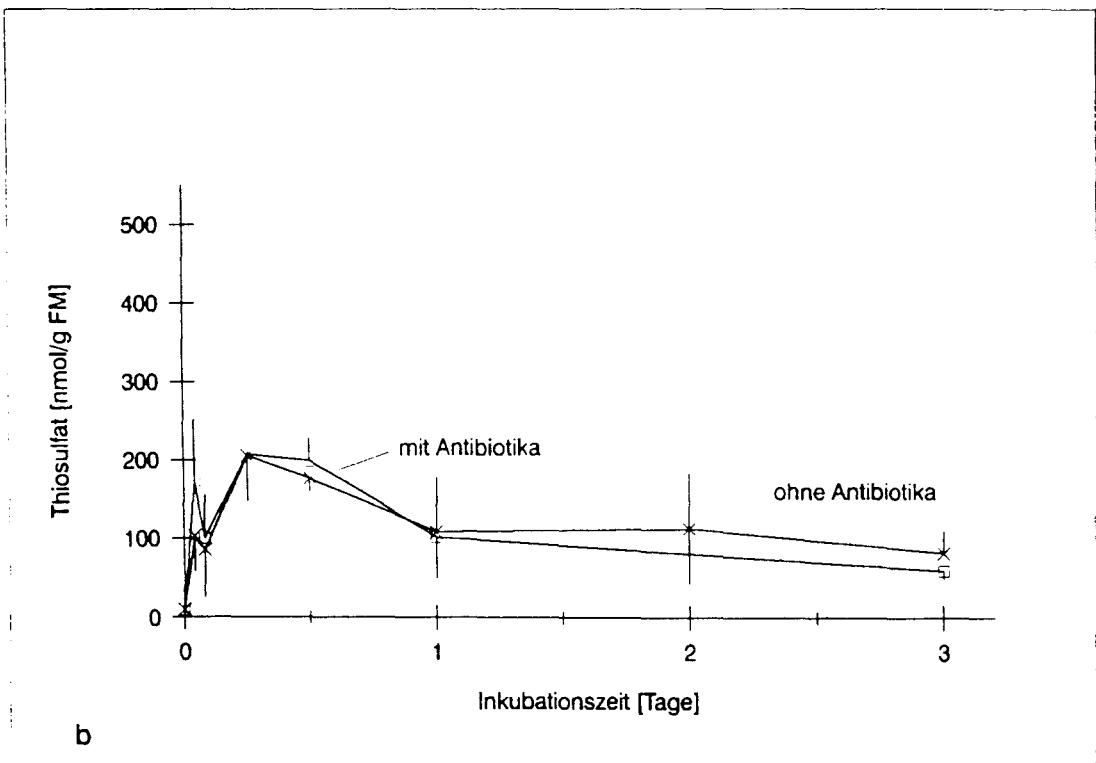
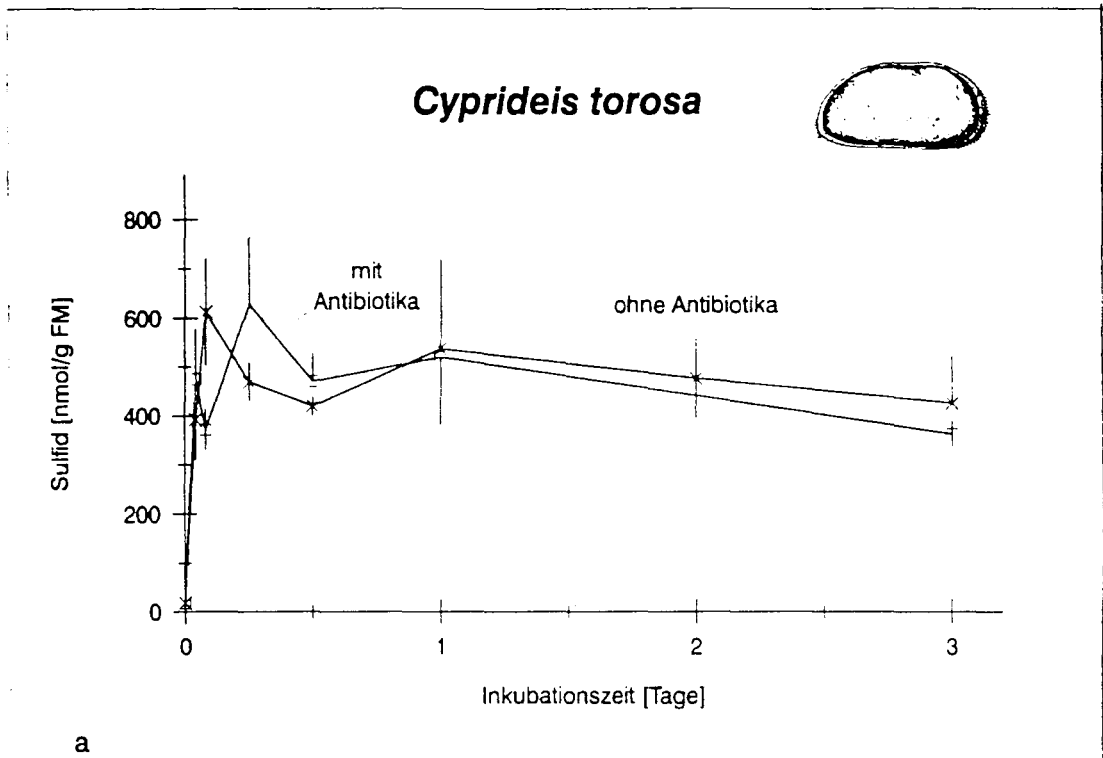


Abb. 26. *Cyprideis torosa*. Konzentration von (a) Sulfid und (b) Thiosulfat im Gewebe nach hypoxischer Inkubation bei 1 mM H₂S (16°C; 14‰S) ohne und mit Antibiotika (Chloramphenicol, Gentamycin, Streptomycin; jeweils 10 mg·ml⁻¹) in nmol·g⁻¹ Frischmasse ± Standardabweichung (aus Jahn *et al.* 1996)

2.4 Erholungsversuche

Cyprideis torosa lebt in einer Umwelt mit starken Fluktuationen der abiotischen Parameter. Wie schnell kann sich der Ostracode an wechselnde Sauerstoff- und Sulfidverhältnisse anpassen? Zur Klärung dieser Frage wurde nach eintägiger hypoxisch-sulfidischer Inkubation das Inkubationsmedium durch normoxisches Meerwasser ohne Sulfid ersetzt. Der Sulfidgehalt im Gewebe der Tiere sinkt dann rasch innerhalb der ersten beiden Stunden ab (Abb. 27).

Auch beim Thiosulfat ist insgesamt ein schneller Rückgang der Gewebskonzentration zu erkennen (Abb. 27). Der Gehalt steigt nur zu Beginn der Erholung kurzfristig an, sinkt dann aber wieder ab, so daß bereits nach zwei Stunden der Ausgangswert fast wieder erreicht ist. Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich auch für Sulfit.

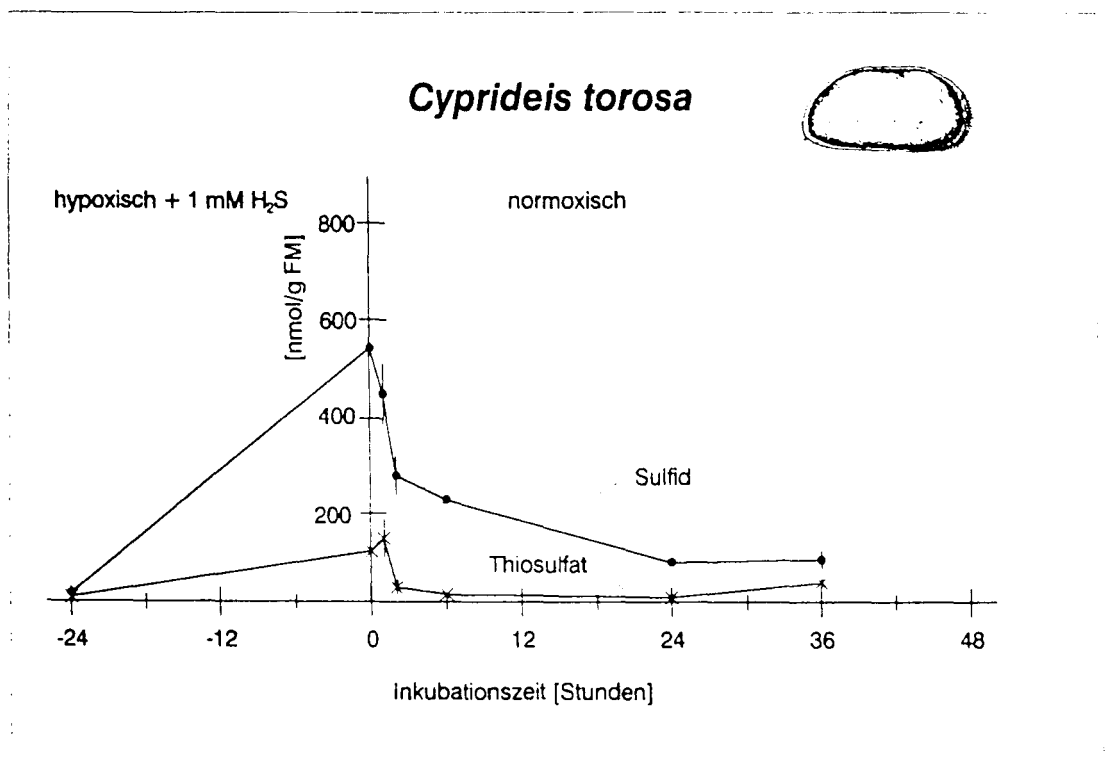


Abb. 27. *Cyprideis torosa*. Konzentration von Sulfid und Thiosulfat im Gewebe nach eintägiger hypoxischer Inkubation bei 1 mM H₂S (16°C; 14‰S) und nachfolgender Inkubation in normoxischem Meerwasser in nmol g⁻¹ Frischmasse ± Standardabweichung (aus Jahn *et al.* 1996)

2.5 Schalenmasse und Wassergehalt

Für die oben beschriebenen Analysen (Kap. 2.2 bis 2.4) wurden die Ostracoden einschließlich ihrer Schalen homogenisiert, so daß in die Konzentrationsberechnungen die Schalenmassen mit eingingen. Um abschätzen zu können, ob die im Gewebe gemessenen Sulfidwerte der Sulfidkonzentration des äußeren Mediums entsprechen, wurden daher die Schalenmassen und der Wassergehalt des Gewebes benötigt.

Aus der Bestimmung von Frisch-, Trocken- und Schalenmassen (Tab. 12) ergibt sich, daß die Schalen 37,8% zur Frischmasse beitragen. Aus dem resultierenden Frischmasseanteil von 62,2% kann abgeschätzt werden, daß eine maximale Sulfidkonzentration von etwa $600 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM im Gewebe einschließlich Schalen (vgl. Kap. 2.2) einer Konzentration von $600 / 0,622 \approx 960 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM ohne Schalen entspricht. Die Trockenmasse ohne Schalen betragen 13,5% der Frischmasse ohne Schalen. Der Wassergehalt des Gewebes liegt also bei 86,5%. Bei einer angenommenen Dichte des Wassers von $1 \text{ kg}\cdot\text{l}^{-1}$ entspricht die Sulfidgewebskonzentration von $960 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM einer Konzentration von $960 / 0,865 \approx 1100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, also der Konzentration des Inkubationsmediums von $1 \text{ mM H}_2\text{S}$. Das bedeutet, die Tiere sind nicht in der Lage, den Sulfidgehalt ihres Gewebes unterhalb der äußeren Sulfidkonzentration zu halten.

Tab. 12. *Cyprideis torosa*. Bestimmung der Frisch-, Trocken- und Schalenmassen. Die Tiere wurden gewogen (a), einen Tag bei 60°C getrocknet und erneut gewogen (b) und dann zwei Stunden bei 550°C erhitzt und wieder gewogen (c). Aus den Differenzen (a-c bzw. b-c) lassen sich Frisch- und Trockenmasse ohne Schalen berechnen.

Anzahl der Tiere	Frischmasse mit Schalen (a) [mg]	Trockenmasse mit Schalen (b)		Schalenmasse (c)		Frischmasse ohne Schalen (a-c)		Trockenmasse ohne Schalen (b-c)	
		[mg]	[%]	[mg]	[%]	[mg]	[mg/n]	[mg]	[%]
54	20,0	7,2	36,0	6,0	30,0	14,0	0,259	1,2	8,6
20	5,3	2,5	47,2	2,1	39,6	3,2	0,160	0,4	12,5
20	5,1	2,6	51,0	2,1	41,2	3,0	0,150	0,5	16,7
20	5,2	2,6	50,0	2,1	40,4	3,1	0,155	0,5	16,1
		46,0±6,9%		37,8±5,2%		0,181±0,052		13,5±3,8%	

2.6 Apparenter Diffusionskoeffizient für Schwefelwasserstoff

Mit Hilfe der Daten der sulfidischen Inkubationen ist es möglich, den apparenten Diffusionskoeffizienten D für Gesamtsulfid mit Gl. (17) zu bestimmen. Hierzu werden der effektive Radius r_e und die Sättigungshalbwertszeit τ benötigt.

Aus den Angaben in Tab. 12 ergibt sich die Frischmasse eines Ostracoden mit $m = 0,181$ mg. Zusammen mit dem Wassergehalt $w = 0,865$ und der Dichte des Wassers $\rho \approx 1$ g·cm⁻³ liefert Gl. (18) einen effektiven Radius von $r_e = 0,033$ cm.

Durch Linearisierung nach Lineweaver & Burk (1934; Gl. 19) läßt sich die Sättigungshalbwertszeit τ berechnen (vgl. auch Kap. 1.5). Aus den Daten der hypoxischen Inkubationen (Kap. 2.2) ergibt sich eine Geradengleichung von

$$f(x) = 1,768 \cdot 10^{-4} x + 1,412 \cdot 10^{-3}$$

Hieraus errechnet sich die Halbwertszeit mit $\tau = 1,768 \cdot 10^{-4} / 1,412 \cdot 10^{-3} = 0,125$ h = 450 s.

Diese Werte, in Gl. (17) eingesetzt, ergeben für *Cyprideis torosa* einen apparenten Diffusionskoeffizienten für Gesamtsulfid bei pH 7,8 von $D = 8,1 \cdot 10^{-7}$ cm²·s⁻¹. Dieser Wert ist somit deutlich niedriger als die bei den Populationen von *Macoma balthica* ermittelten Diffusionskoeffizienten (Tab. 7 in Kap. 1.5).

2.7 Anaerober Stoffwechsel

Als Indikator für einen anaeroben Stoffwechsel wurde der Succinatgehalt im Gewebe der Tiere nach eintägigen Inkubationen unter Normoxie, Hypoxie, 70% Luftsättigung und 70% Luftsättigung mit 1 mM H₂S gemessen. Unter normoxischen Bedingungen wird nur wenig Succinat im Gewebe gefunden (Abb. 28). Auch bei einem erniedrigten Sauerstoffgehalt liegt der Succinatgehalt auf dem gleichen Niveau. Unter Hypoxie steigt der Gehalt jedoch signifikant an. Bei oxisch-sulfidischen Bedingungen ist ebenfalls ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, wenn auch nicht das gleiche Niveau wie unter Hypoxie ohne Anwesenheit von Schwefelwasserstoff erreicht wird. Die Tiere haben also trotz der Anwesenheit von Sauerstoff zumindest teilweise auf Anaerobiose umgeschaltet.

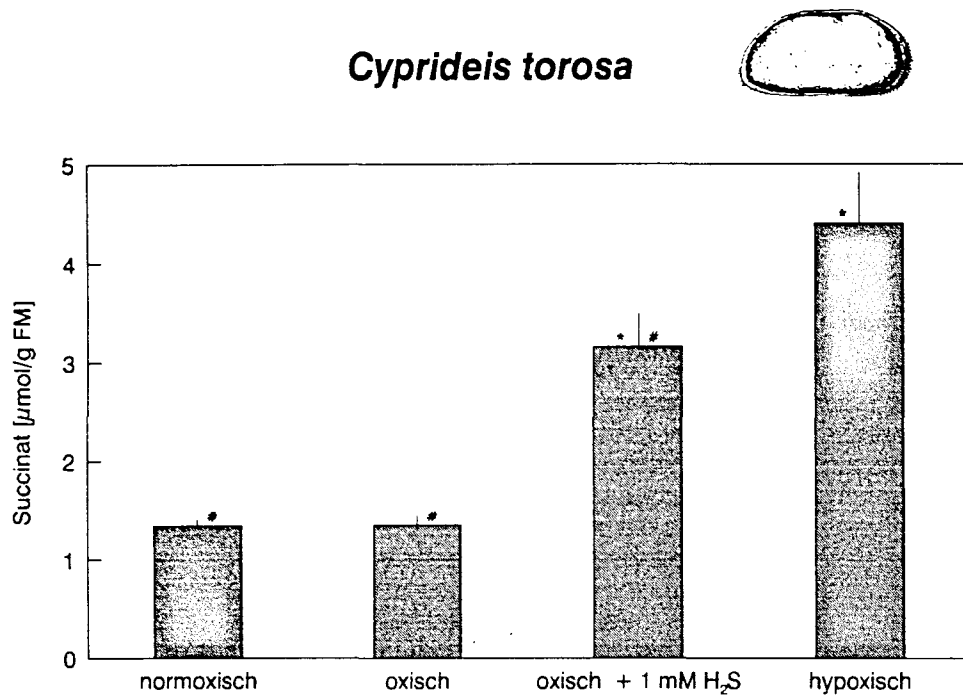


Abb. 28. *Cyprideis torosa*. Konzentration von Succinat im Gewebe nach eintägiger normoxischer (283 µM O₂), oxischer (198 µM O₂), oxisch-sulfidischer (198 µM O₂ + 1 mM H₂S) und hypoxischer (O₂ < 1 µM) Inkubation (16°C; 14‰S) in µmol·g⁻¹ Frischmasse + Standardabweichung (n=3 mit jeweils 300 Tieren). *: Signifikanter Unterschied zur oxischen Inkubation. #: Signifikanter Unterschied zur hypoxischen Inkubation (p≤0,05; aus Jahn *et al.* 1996)



Diskussion

1 Sulfidbelastung der untersuchten Habitate

Schwefelwasserstoff ist ein wichtiger ökologischer Faktor, der in unterschiedlichen, stark variierenden Konzentrationen in marinen Sedimenten auftritt. So wurden im Sylter Watt in 4 cm Sedimenttiefe Konzentrationen bis zu 150 μM H_2S , in 14 cm Sedimenttiefe sogar bis zu 600 μM H_2S gefunden (Thiermann *et al.* 1996). Extremfälle des Wattenmeeres sind die sogenannten "Schwarzen Flecken". Hier können sogar an der Sedimentoberfläche Konzentrationen von 20.000 μM H_2S vorliegen (Höpner & Michaelis 1994). Die Plattmuschel *Macoma balthica* ist jedoch in ihren Siedlungsbereichen im Nordseewatt bei Dorum-Neufeld nur geringen Sulfidkonzentrationen von bis zu 10 μM H_2S ausgesetzt (Tab. 2).

Ebenfalls sehr gering sind die Sulfidkonzentrationen im Sediment der Station "Gabelsflach" in der Kieler Bucht (Tab. 2). Diese Station liegt oberhalb der thermohalinen Sprungschicht und wird daher in der Regel gut mit Sauerstoff versorgt. Die Plattmuscheln werden hier kaum oder nur mit sehr geringen Schwefelwasserstoffkonzentrationen konfrontiert.

Im Gegensatz dazu liegen in den Flachwassersedimenten bei der Insel Hiddensee in den Siedlungsbereichen von *Macoma balthica* hohe Sulfidkonzentrationen bis zu 500 μM vor (Tab. 2, 3, Abb. 8). Nur wenige Meter entfernt wurden auch noch weit höhere Konzentrationen, teilweise bis 10.000 μM H_2S , gefunden (DYSMON I 1994, Rethmeier 1995). Der Standort Hiddensee ist somit wie der Standort Boiensdorf (hier lagen in 3 cm Sedimenttiefe Konzentrationen von 230 μM H_2S vor; DYSMON I 1994), ein typisches Beispiel für die Boddengewässer der Küste von Mecklenburg-Vorpommern, bei denen zeitweilige Algenbedeckung sowie Ablagerung organischer Substanzen zu anoxisch-sulfidischen Verhältnissen führen können (Nehring 1996). Auch wenn die Sulfidkonzentrationen des Sedimentes hohe räumliche und zeitliche Variabilitäten aufweisen (vgl. Tab. 3, Abb. 8), kann davon ausgegangen werden, daß die hier siedelnden Organismen wie *M. balthica* und *Cyprideis torosa* zumindest in den Sommermonaten hohen Sulfidbelastungen ausgesetzt sind.

Auch in der Danziger Bucht muß sich *Macoma balthica* mit Schwefelwasserstoff auseinandersetzen. Die hohen Sulfidkonzentrationen, die hier im Sediment vorliegen (Tab. 2, Abb. 8), sind auf organische Belastungen zurückzuführen, die über die Weichsel eingetragen werden.

2 Sulfidtoleranz

Die in sulfidischen Bereichen siedelnden Arten des Zoobenthos müssen in der Lage sein, Schwefelwasserstoff zu entgiften. Diese Fähigkeit kann bei verschiedenen Arten unterschiedlich ausgeprägt sein und deren Einnischung im Biotop beeinflussen. Die vorliegenden Untersuchungen an der Plattmuschel *Macoma balthica* zeigen nun überraschenderweise, daß unterschiedliche Sulfidtoleranzen nicht nur bei nah verwandten Arten vorliegen, sondern auch bei Populationen derselben Art auftreten können. Unter oxisch-sulfidischen Bedingungen haben Exemplare von nur gering mit Schwefelwasserstoff belasteten Standorten (Kieler Bucht, Dorum-Neufeld) eine deutlich höhere Sulfidsensitivität als Tiere, die in ihrem Habitat mit hohen Sulfidwerten konfrontiert werden (Danziger Bucht, Hiddensee; Abb. 9c). Unter Sauerstoffmangelbedingungen treten diese Unterschiede nicht auf (Abb. 9a, b). Hier liegen die LT_{50} -Werte unabhängig vom Sulfidgehalt bei allen Populationen bei etwa zehn Tagen (Temperatur: 10°C). Es gibt also keine Populationsunterschiede bezüglich der Sauerstoffmangeltoleranz. Diese ist im Vergleich zu anderen Arten (z.B. *Macoma calcarea*) zwar relativ hoch (vgl. auch von Oertzen 1973, Dries & Theede 1974), der Stoffwechsel von *M. balthica* reagiert jedoch empfindlich auf Veränderungen der Sauerstoffkonzentration (Dries & Theede 1976). Daher schalten die Tiere schnell auf Anaerobiose um, wie am Anstieg des Succinatgehaltes erkennbar ist (Abb. 23). Aufgrund der gleichen Sauerstoffmangeltoleranz der Populationen treten auch unter hypoxisch-sulfidischen Bedingungen keine unterschiedliche Überlebensraten auf. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff und Sulfid zeigt sich jedoch, daß die Tiere der resistenteren Populationen offensichtlich bessere Schutzmechanismen gegenüber Sulfid besitzen. Sie sind daher bei ihrem Energiestoffwechsel nicht vollständig auf Anaerobiose angewiesen, so daß sie unter oxisch-sulfidischen Bedingungen länger überleben können. Bei den sulfidsensitiven Plattmuscheln verhindert dagegen die vollständige Inhibition der Cytochrom-*c*-Oxidase jeglichen oxidativen Stoffwechsel, so daß die Tiere in der gleichen Zeit absterben wie unter Sauerstoffmangelbedingungen.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Populationsunterschiede bezüglich der Sulfidtoleranz genetisch fixiert oder durch individuelle Adaptation bedingt sind. *Macoma balthica* zeigt eine große genetische Variabilität (Meehan 1985), und genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Plattmuschelpopulationen aus der Ostsee sind durchaus vorhanden (Väinölä & Varvio 1989). Auch die Tatsache, daß die hohe Sulfidresistenz der toleranten Tiere auch nach dreimonatiger Hälterung im normoxischen Milieu ohne Gegenwart von H_2S nicht verlorengeht (Abb. 11), spricht für eine genetische Fixierung der Sulfidtoleranz. Andererseits ist jedoch zumindest bei den Tieren aus der Kieler Bucht eine Anpassung an Schwefelwasserstoff möglich (Abb. 10). Entsprechendes wurde auch beim Zahnkarpfen *Fundulus parvipinnis* gefunden. Bei dieser Art ging ebenfalls die Sulfidtoleranz nach mehrmonatiger Hälterung im sulfid

freien Medium nicht verloren, konnte aber durch vorherige Akklimatisation an Sulfid gesteigert werden (Bagarinao & Vetter 1993). Ob der Umweltfaktor Schwefelwasserstoff die genetische Variabilität einer Population fördert, können nur direkte genetische Untersuchungen klären.

Bei Voruntersuchungen an der Sandklaffmuschel *Arenomya (Mya) arenaria* zeichneten sich auch bei dieser Art unterschiedliche Sulfidtoleranzen verschiedener Populationen ab. Bei einer Population von Hiddensee überlebten 50% der Tiere 43 Tage oxische Inkubation bei 100 μM H_2S . Bei Exemplaren aus der Danziger Bucht blieben nach 44 Tagen sogar noch mehr als 60% der Tiere am Leben (10°C; eigene unveröffentlichte Daten). Die Art, die im Sediment wesentlich tiefer als die Plattmuschel siedelt und dadurch auch mit höheren Schwefelwasserstoffkonzentrationen konfrontiert wird, ist also deutlich sulfidtoleranter als *Macoma balthica*. Insbesondere die Danziger Population zeichnet sich durch eine hohe Sulfidtoleranz aus. In der Danziger Bucht sind, im Gegensatz zum Standort Hiddensee, hohe Sulfidwerte im Porenwasser erst ab Sedimenttiefen von mehr als 5 cm zu finden, wobei die Konzentrationen dann die von Hiddensee übersteigen können (Abb. 8). Daher erscheint es ökologisch sinnvoll, daß die Danziger Sandklaffmuscheln mit einer höheren Sulfidtoleranz ausgestattet sind als ihre Hiddenseer Artgenossen. Das Phänomen, daß sich Populationen hinsichtlich ihrer Sulfidtoleranz voneinander unterscheiden, ist wahrscheinlich verbreiteter als bisher vermutet.

Im Gegensatz zu *Macoma balthica* weist der Ostracode *Cyprideis torosa* eine extrem hohe Hypoxie- und Sulfidtoleranz auf. Selbst bei Konzentrationen von 1,8 mM H_2S überleben 50% der Tiere drei Wochen (16°C; Abb. 24). Da in den Kontrollexperimenten durch das Hungern der Tiere die Überlebensrate ebenfalls zurückgeht, ist zu vermuten, daß im Habitat unter günstigen Nahrungsbedingungen die Toleranz noch größer ist. Die extrem hohe Hypoxie- und Sulfidtoleranz ist für einen Krebs sehr ungewöhnlich. Viele andere Crustaceen reagieren äußerst empfindlich gegenüber Schwefelwasserstoff. So wurde beispielsweise für die Garnele *Crangon crangon* ein LT_{50} -Wert von nur zwei Stunden unter hypoxischen wie auch unter hypoxisch-sulfidischen Bedingungen (200 μM H_2S ; 10°C) gefunden (Theede *et al.* 1969). Auch Hagerman & Vismann (1995) zeigten die hohe Empfindlichkeit von *C. crangon* gegenüber Sauerstoffmangel und Schwefelwasserstoff. Für den Schlickkreb *Corophium volutator*, der im selben Habitat wie *C. torosa* vorkommt, beträgt die Überlebensrate bei Hypoxie nur vier Stunden und bei hypoxisch-sulfidischen Bedingungen (90 μM H_2S ; 16°C) sogar nur zwei Stunden (Gamenick *et al.* 1996). Diese Art reagiert daher empfindlich gegenüber plötzlich auftretenden Sauerstoffmangelerscheinungen im Biotop und kann nur aufgrund ihrer hohen Mobilität dem Schwefelwasserstoff ausweichen und sulfidfrei gewordene Habitate schnell wiederbesiedeln. *C. torosa* ist dagegen aufgrund ihrer hohen Hypoxie- und Sulfidtoleranz sehr gut an die Flachwasserbiotope der Ostsee mit ihren ständig fluktuierenden abiotischen Faktoren angepaßt und stellt hier die dominierende Benthosart dar (Herman & Heip 1982, Herman *et al.*

1983). Auch Freilandexperimente bestätigen dies. Nach Abdeckung von Teilen des Sedimentes mit PVC-Folien war *C. torosa* die am längsten überlebende Art der Gemeinschaft in dem anoxisch und hochsulfidisch werdenden Milieu (Gamenick *et al.*, in Vorbereitung). Andererseits erschien der Ostracode als erste Art nach Entfernen der Plane (Gamenick & Giere 1995, Gamenick *et al.* 1996). Offensichtlich handelt es sich um eine Pionierart, die kleinräumig und periodisch auftretende anoxische, hochsulfidische Sedimentbereiche sehr schnell besiedeln kann.

Unterschiedliche Sulfidtoleranzen bei verschiedenen Arten und Populationen beruhen auf unterschiedlichen Mechanismen des Sulfidausschlusses und der Sulfidentgiftung. Die wichtigsten bisher bekannten und in der Einleitung beschriebenen Anpassungsmechanismen sind in Abb. 29 schematisch zusammengefaßt (vgl. hierzu auch Reviews: Somero *et al.* 1989, Vismann 1991b, Bagarinao 1992): Die Tiere können zunächst versuchen, beispielsweise durch Schalenschluß, ein Eindringen von zuviel Sulfid zu verhindern oder zumindest zu verzögern (①; Oeschger & Storey 1993). Dringt H_2S in die Epidermis ein, so können einige Arten es in Form ausgefällter Metallsulfide ablagern (②; Oeschger & Janssen 1991, Janssen & Oeschger 1992). Bis zum Innenmedium vorgedrungener Schwefelwasserstoff wird (eventuell unter Beteiligung respiratorischer Pigmente) oxidiert (③; Vismann 1991a, Jahn *et al.* 1992, Oeschger & Vetter 1992, Völkel & Grieshaber 1992). Weitere Sulfidoxidation kann in den Mitochondrien erfolgen. Dabei sind einige Arten auch in der Lage, diese Oxidation energetisch zu nutzen (④; Oeschger & Vismann 1994, Völkel & Grieshaber 1994, 1996, Oeschger & Tschischka 1995, Tschischka & Oeschger 1995). Bei Überforderung der genannten Schutzmechanismen erfolgt ein Umschalten auf anaerobe Stoffwechselwege (⑤; Jahn *et al.* 1992, Oeschger & Vetter 1992, Völkel & Grieshaber 1992, 1994). Im folgenden sollen diese Mechanismen am Beispiel von *Macoma balthica* und *Cyprideis torosa* diskutiert werden.

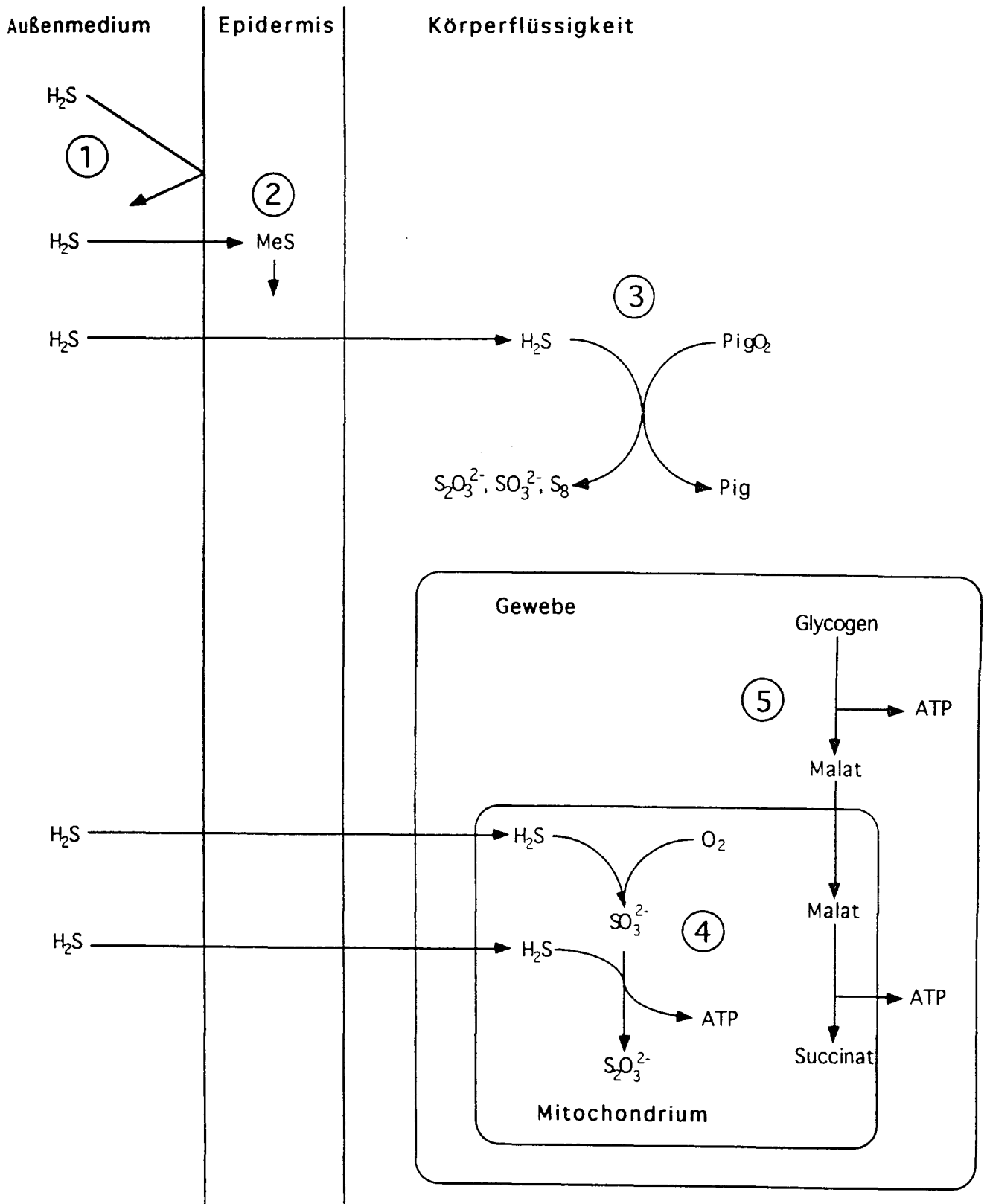


Abb. 29. Anpassungsmechanismen mariner Evertebraten an Schwefelwasserstoff. Erläuterung im Text

3 Sulfidoxidation

Der wichtigste Entgiftungsmechanismus für Schwefelwasserstoff scheint die Oxidation von eingedrungenem Sulfid zu nichttoxischen Verbindungen zu sein. Bei Belastung mit Schwefelwasserstoff konnte sowohl bei der Plattmuschel *Macoma balthica* als auch bei dem Ostracoden *Cyprideis torosa* die Bildung von Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) nachgewiesen werden (Abb. 17b, 25b). Sulfit (SO_3^{2-}) tritt bei beiden Arten nur in Spuren auf (Tab. 6, 11). Auch von anderen marinen Evertebraten ist bekannt, daß Thiosulfat das Hauptoxidationsprodukt der Sulfidentgiftung ist, während Sulfit nur eine untergeordnete Rolle spielt (Vismann 1991a, Jahn *et al.* 1992, Oeschger & Vetter 1992, Völkel & Grieshaber 1992, Hagerman & Vismann 1993). Die Produktion von Sulfit ist im Vergleich zur Thiosulfatbildung stöchiometrisch ungünstiger, da beim Thiosulfat im Vergleich zum Sulfit mehr Schwefelatome pro Sauerstoffatom gebunden werden (Somero *et al.* 1989, Vismann 1991b). Wahrscheinlich ist Sulfit ein Zwischenprodukt, das während der Thiosulfatproduktion entsteht: Eingedrungenes Sulfid wird zunächst zu Sulfit oxidiert, dann wird in einer Komproportionierungsreaktion (Übergang von einer höheren und niederen zu einer mittleren Oxidationsstufe) ein zweites Sulfidmolekül zur Bildung von Thiosulfat angefügt (O'Brien & Vetter 1990).

Bei *Macoma balthica* wurden auch geringe Mengen an elementarem Schwefel (S_8) nachgewiesen (Tab. 6). Elementarschwefel als Sulfidoxidationsprodukt ist bisher nur selten gefunden worden. Neben einigen Arten der Meiofauna (Powell *et al.* 1980, Dr. F. Thiermann, Universität Hamburg, pers. Mitt.) konnte es auch bei der Sandklaffmuschel *Arenomya (Mya) arenaria* nachgewiesen werden (Nielsen 1994). Bei einer weiteren reduzierten Schwefelkomponente, dem Membranbestandteil Glutathion (GSH), treten signifikante Veränderungen nach Sulfidinkubation meist nur unter oxischen Bedingungen und ohne sich deutliche abzeichnende Tendenzen auf (Tab. 6, 11). Die Reaktion von H_2S mit Glutathiondisulfid (GSSG) unter Bildung von GSSH und GSH wird zwar auch als Schutzmechanismus gegenüber Sulfid bei Wirbeltieren diskutiert, da jedoch im Gewebe nur geringe Mengen an GSSG vorliegen und die weitere GSSG-Bildung durch Hypoxie gehemmt wird, spielt Glutathion wahrscheinlich keine wichtige Rolle bei der Sulfidentgiftung (Vismann 1991b).

Die Sulfidoxidation hängt von der Sauerstoffverfügbarkeit ab. Unter hypoxischen Bedingungen werden interne Sauerstoffvorräte schnell verbraucht, so daß nur wenig Thiosulfat und Sulfit gebildet werden. Der Sulfidgehalt des Gewebes steigt daher schnell an (Abb. 16). Die Tiere sind demnach auf die Versorgung mit sauerstoffführendem Wasser durch Irrigationsströme angewiesen. *Macoma balthica* versorgt sich über den Einstromsiphon mit frischem, sauerstoffhaltigen Wasser. Die Sulfidoxidation bleibt somit gewährleistet, auch wenn die Plattmuschel im Sediment dem sulfidhaltigen Porenwasser unmittelbar ausgesetzt ist (Abb. 30).

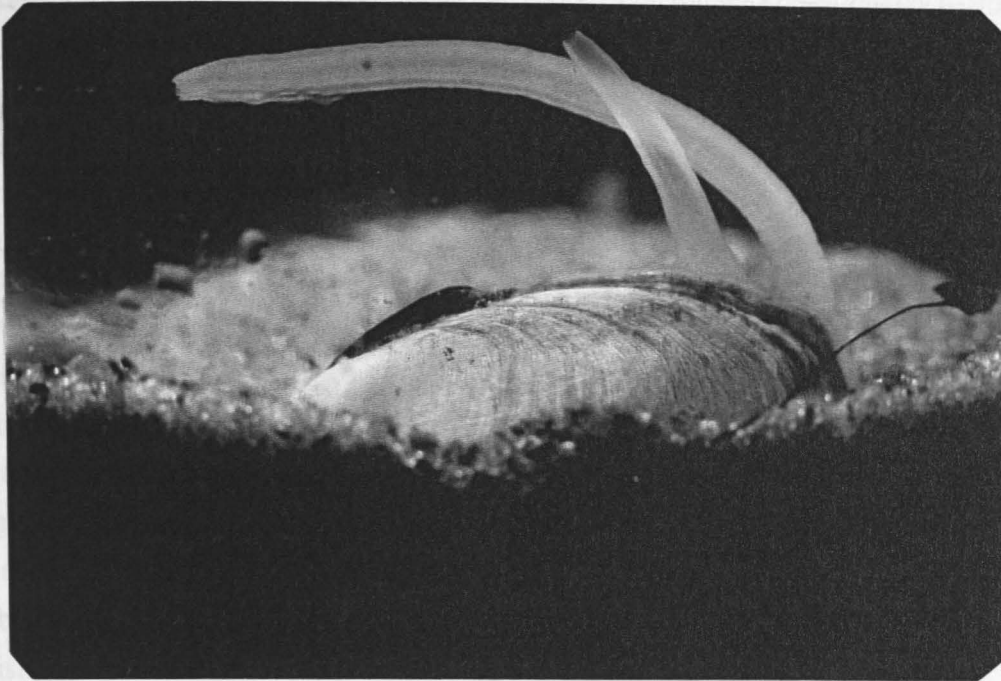


Abb. 30. *Macoma balthica*. Aus dem Sediment ragender Einstrom- (lang) und Ausstromsiphon (kurz). Hierüber ist eine Versorgung mit frischem, sauerstoffhaltigem Wasser auch bei hoher Sulfidbelastung des Sedimentes möglich.

Der Ostracode *Cyprideis torosa* zeichnet sich durch eine besonders hohe Sulfidoxidationsleistung aus. Die Tiere produzieren unter oxischen Bedingungen große Mengen an Thio-sulfat (Abb. 25b), obwohl sie damit einen raschen Sulfidanstieg nicht verhindern können (Abb. 25a). Da sie an der Sedimentoberfläche leben, werden sie jedoch in der Regel nur kurzfristig mit Sulfid konfrontiert, so daß dann eine schnelle Oxidation durchaus sinnvoll sein kann. Eventuell können die Ostracoden die Sulfidoxidation sogar energetisch nutzen. Die vollständige Oxidation des stark reduzierten Moleküls Sulfid zu Sulfat liefert $716 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Huxtable 1986). Diese Energie wird nicht nur von chemolithoautotrophen Schwefelbakterien genutzt (Felbeck *et al.* 1981), sondern auch eukaryote Organismen können einen energetischen Nutzen aus der Oxidation von Sulfid erzielen. Powell & Somero (1986) konnten bei der Muschel *Solemya reidi* erstmalig die Kopplung der Sulfidoxidation an die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien nachweisen. Die Fähigkeit zur mitochondrialen Sulfidoxidation, gekoppelt mit der Bildung von Adenosin-triphosphat (ATP), ist inzwischen auch bei anderen marinen Evertebraten gefunden worden (Oeschger & Vismann 1994, Völkel & Grieshaber 1994, 1996, Oeschger & Tschischka 1995, Tschischka & Oeschger 1995). Hierbei wird die Existenz einer alternativen terminalen Oxidase postuliert, die wie Cytochrom-*c*-Oxidase Elektronen auf Sauerstoff

überträgt, aber nicht sulfidsensitiv ist. Bei freilebenden Nematoden wurde eine alternative Oxidase bereits nachgewiesen (Mendis & Evans 1984). Bei Turbellarien ist ein sulfidinsensitiver oxidativer Stoffwechsel ebenfalls bekannt (Fox & Powell 1987). Es ist daher möglich, daß *C. torosa* ebenfalls über eine sulfidinsensitive Oxidase verfügt und die Sulfidoxidation energetisch nutzen kann. Hierbei bleibt jedoch zu bedenken, daß eine effektive ATP-Bildung nur bei niedrigen Sulfidkonzentrationen abläuft (Oeschger & Vismann 1994, Oeschger & Tschischka 1995). Die Leistungsfähigkeit dieses Prozesses erreicht somit nicht die Kapazität der bakteriellen Chemolithoautotrophie. Die Fähigkeit der Mitochondrien zur Sulfidoxidation ist wahrscheinlich primär ein Erbe ihres bakteriellen Ursprungs (vgl. "Endosymbiontentheorie", de Duve 1996), dem die Adaptation an ein sulfidisches Habitat nachgeordnet ist.

4 Geschwindigkeit von Sulfiddiffusion und -entgiftung

Entscheidend für die Effektivität der Sulfidentgiftung ist das Verhältnis der Geschwindigkeit, mit der Schwefelwasserstoff in das Gewebe eintritt zur Geschwindigkeit der Sulfidoxidation. Um diese Geschwindigkeiten bestimmen zu können, wurde ein neues Verfahren entwickelt, das es erlaubt, den Diffusionskoeffizienten für Gesamtsulfid aus den im Gewebe gemessenen Summen der Schwefelkomponenten zu ermitteln. Der so erhaltene Koeffizient beinhaltet nicht nur die Sulfiddiffusion durch die Epidermis, sondern er faßt alle Diffusionsbarrieren im Körper (einschließlich einer eventuell vorhandenen Schale) zusammen. Es wird daher der Begriff "apparenter Diffusionskoeffizient" vorgeschlagen. Schutzreaktionen, wie zeitweiliger Schalenschluß, führen im Gegensatz zum "echten" Diffusionskoeffizienten zu einem Anstieg des apparenten Koeffizienten. Durch den apparenten Diffusionskoeffizienten können also derartige Schutzmechanismen mit erfaßt werden. Auch Unterschiede im pH-Wert zwischen der Körperflüssigkeit und dem äußeren Medium sind im apparenten Diffusionskoeffizienten mit berücksichtigt, da er aus der Gesamtsulfidkonzentration berechnet wird. Da ein Absinken des inneren pH-Wertes zu einer geringeren Sulfidkonzentration im Körperinneren führt (Groenendaal 1981, Völkel & Grieshaber 1992, Zimmermann & Jahn 1996), vermindert sich auch der apparente Diffusionskoeffizient entsprechend.

Beim Vergleich der Diffusionskoeffizienten der Populationen von *Macoma balthica* zeigt sich, daß die Plattmuscheln aus der Kieler Bucht und von Dorum-Neufeld einen etwa doppelt so hohen apparenten Diffusionskoeffizienten für Gesamtsulfid haben wie die Populationen aus

der Danziger Bucht und von Hiddensee (Tab. 7). Das bedeutet, daß bei den Muscheln aus Kiel und Dorum Schwefelwasserstoff schneller eindringt als bei Exemplaren aus Danzig und Hiddensee. Dies ist auch an den wesentlich kürzeren Sättigungshalbwertszeiten erkennbar. Den niedrigsten Diffusionskoeffizienten haben die Hiddenseer Tiere. Sie können also am effektivsten Sulfid ausschließen, so daß auch die Entgiftung langsamer ablaufen kann.

Die sulfidempfindlicheren Tiere aus Kiel und Dorum versuchen das schnellere Eindringen von H_2S in den Körper durch eine schnellere Entgiftung zu kompensieren. Die Geschwindigkeit dieser Entgiftung kann rechnerisch durch eine Konstante erfaßt werden. Da bei diesem Wert, wie beim apparenten Diffusionskoeffizienten, alle Sulfidentgiftungsmechanismen mit eingehen, wird hierfür parallel zum apparenten Diffusionskoeffizienten der Begriff "apparente Entgiftungskonstante" vorgeschlagen. Es zeigt sich nun, daß die apparenten Entgiftungskonstanten der sulfidsensitiven Populationen höher sind als bei den sulfidresistenten Plattmuscheln (Tab. 7). Das bedeutet, daß der Stoffwechsel der empfindlicheren Tiere bei Sulfidbelastung durch aktive Prozesse stärker belastet wird. Ein Sulfidausschluß ist jedoch langfristig nicht möglich, wie die hohen Sulfidwerte im Gewebe der Kieler Tiere zeigen (Abb. 16a). Die hohe Belastung des Stoffwechsels führt letztendlich zu einer niedrigeren Überlebensrate unter Sulfidstreß (Abb. 9c), während bei den resistenteren Tieren der Stoffwechsel weniger beeinträchtigt ist. Diese Tiere sind somit besser an ihren sulfidischen Standort angepaßt. Hier liegt offensichtlich die Erklärung für die unterschiedlichen Sulfidtoleranzen der Plattmuschelpopulationen.

Im Vergleich zu anderen Arten sind die Diffusionskoeffizienten von *Macoma balthica* (zwischen $1,2$ und $3,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) sowie von dem Ostracoden *Cyprideis torosa* ($8,1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) verhältnismäßig niedrig. Julian & Arp (1992) geben für den Echiuriden *Urechis caupo* eine Permeabilität von Gesamtsulfid durch den Hautmuskelschlauch von $0,068 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ bei pH 8,0 an. Unter der Annahme einer Diffusionsstrecke von 0,2 cm durch den Hautmuskelschlauch (Völkel & Grieshaber 1992) berechnet sich hieraus ein Diffusionskoeffizient von $3,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Völkel & Grieshaber (1992) nennen für den Hautmuskelschlauch des Sipunculiden *Sipunculus nudus* einen Diffusionskoeffizienten für undissoziiertes H_2S von $4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, wobei sie allerdings für die Berechnung eine nicht-differentielle Form des ersten Fick'schen Gesetzes verwendeten. Der von den Autoren angegebene Wert ist sogar höher als der theoretische Wert von Powell (1989), der den Diffusionskoeffizienten von H_2S dem von Sauerstoff in Wasser gleichsetzt ($D_{H_2S} \approx D_{O_2} \approx 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Beim Vergleich der in der vorliegenden Arbeit bestimmten apparenten Diffusionskoeffizienten mit Literaturdaten ist zu bedenken, daß sich die Autoren auf unterschiedliche Diffusionsstrecken (meist nur den Hautmuskelschlauch) und unterschiedliche Sulfidspezies beziehen. Powell (1989) und Völkel & Grieshaber (1992) betrachten nur undissoziiertes H_2S , das aufgrund seiner Ladungsneutralität einen

höheren Diffusionskoeffizienten als Gesamtsulfid hat. Dennoch wird deutlich, daß die Sulfiddiffusion bei *M. balthica* und *C. torosa* langsamer erfolgt als bei *U. caupo* und *S. nudus*.

Dies könnte auf zeitweiligen Schalenschluß der Tiere zurückzuführen sein. Längerfristig kann jedoch auch das Schließen der Schale ein Eindringen von H_2S nicht verhindern, wie der Anstieg des Sulfidgehaltes bei *Macoma balthica* und *Cyprideis torosa* zeigt. Auch bei der Islandmuschel *Arctica islandica* kommt es trotz zeitweiligen Schalenschlusses zu einem Anstieg des Sulfidgehaltes im Gewebe (Oeschger & Storey 1993). Während der experimentellen Inkubationen waren die Schalen von *M. balthica* sogar meist geöffnet. Der Siphon war weit ausgestreckt; die Tiere suchten offenbar nach besseren Bedingungen. Schutz vor Schwefelwasserstoff durch Schalenschluß kann also nur kurzfristig erfolgt sein. Auch bei dem Muschelkrebs *C. torosa* schützt der Carapax nicht vor Schwefelwasserstoff. Die Tiere behalten unter Sulfidexposition ihre Bewegungsfähigkeit bei, so daß die Schalen zumindest zeitweilig geöffnet sein müssen. So wird selbst unter oxischen Bedingungen nach einer Stunde die Sulfidkonzentration des äußeren Mediums erreicht (Abb. 25a).

Trotz des sehr niedrigen apparenten Diffusionskoeffizienten ist der Ostracode *Cyprideis torosa* im Gegensatz zu *Macoma balthica* nicht in der Lage, den Sulfidgehalt im Gewebe unterhalb der Sulfidkonzentration des äußeren Mediums zu halten, wenn die Belastung länger als eine Stunde dauert. Nach dieser Zeit war unter den gegebenen Bedingungen ein Gleichgewicht der Sulfidkonzentration zwischen innen und außen erreicht (Abb. 25a). Die Sättigungshalbwertszeit liegt sogar nur bei acht Minuten. Dies ist eine Konsequenz aus der geringen Größe der Tiere. Mit einer durchschnittlichen Länge von nur etwa 1 mm wird *C. torosa* bereits zur Meiofauna gezählt (Herman *et al.* 1983). Solch kleine Organismen haben im Vergleich zum Volumen eine sehr große Oberfläche. Da die Diffusion nach dem ersten Fickschen Gesetz (Gl. 12) vom Oberflächen-Volumen-Verhältnis abhängt, muß dies zu einer hohen Sulfiddiffusion führen, selbst bei einem niedrigen Diffusionskoeffizienten. Aus der Berechnung des apparenten Koeffizienten D

$$D = \frac{r_e^2}{3\tau} \quad (17)$$

wird unmittelbar deutlich, daß die Sättigungshalbwertszeit τ direkt proportional zum Quadrat des effektiven Radius r_e ist. Verzehnfacht sich beispielsweise die Tiergröße, so daß die Größenordnung von Makrofauna wie beispielsweise *M. balthica* vorliegt, dann wird es bei gleichem Diffusionskoeffizienten 100mal so lange dauern, also statt acht Minuten mehr als zwölf Stunden, bis die halbe Sättigungskonzentration erreicht ist. Die Sulfiddiffusionskoeffi-

zienten von *M. balthica* sind jedoch gegenüber *C. torosa* deutlich größer, so daß sich die Sättigungshalbwertszeiten um den Faktor 10 bis 50 statt 100 unterscheiden.

Die Abhängigkeit der Sulfiddiffusion von der Tiergröße gilt jedoch nicht nur für Meiofauna sondern generell für alle Arten des Zoobenthos. Dies konnte bei *Macoma balthica* exemplarisch nachgewiesen werden. Unter der Annahme, daß sich ein Gleichgewicht zwischen Sulfiddiffusion und -entgiftung einstellt, bei der sich die Sulfidinnenkonzentration zeitlich nicht mehr ändert, läßt sich die sich einstellende Sulfidgleichgewichtsinnenkonzentration c_i in Abhängigkeit vom effektiven Radius r_e und damit von der Tiergröße berechnen:

$$c_i = c_0 e^{-k r_e^2 / 3D} \quad (25)$$

Aus der Funktion (Gl. 25) und aus dem Kurvenverlauf (Abb. 19) wird deutlich, daß der Term der e -Funktion bei einem großen Radius gegen 0 geht, so daß auch die Gleichgewichtsinnenkonzentration gegen 0 geht. Das bedeutet, daß große Tiere, bei gegebener Diffusion und Entgiftung, Sulfid wirkungsvoll detoxifizieren können. Bei kleiner werdendem Radius steigt jedoch die Innenkonzentration exponentiell an und erreicht schließlich die Sulfidaußenkonzentration c_0 . Unterschreitet r_e beispielsweise den Wert 0.235 cm, dann ist c_i bei der Population aus der Danziger Bucht größer als $c_0/2$ (mit $k = 7.1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $D = 1.89 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; Tab. 7). Das Verhältnis zwischen dem effektiven Radius und der Schalenlänge beträgt etwa 1:4,5. Das bedeutet, die Muscheln müssen unter den gegebenen Bedingungen mehr als 1 cm lang sein, um die innere Gleichgewichtskonzentration im Vergleich zur Außenkonzentration wenigstens halbieren zu können. Bei Größenordnungen im Millimeterbereich sind Innen- und Außenkonzentration des Sulfids praktisch gleich. Es zeigt sich somit, daß bereits bei derartigen Größenordnungen eine unter normalen physiologischen Bedingungen ablaufende Sulfidentgiftung mit dem schnellen Eindringen von Schwefelwasserstoff nicht mehr Schritt halten kann, wie auch von Powell (1989) für Meiofauna postuliert.

Diese Größenabhängigkeit konnte experimentell bestätigt werden. Während bei Plattmuscheln mit einer Schalenlänge von 16 bis 22 mm die interne Sulfidkonzentration nach H_2S -Inkubation nur gering ist, erhöht sich bei kleinen Muscheln mit einer Schalenlänge von 6 bis 12 mm der Sulfidgehalt in ihrem Gewebe deutlich (Abb. 20). Noch offensichtlicher wird diese Größenabhängigkeit beim Sulfidoxidationsprodukt Thiosulfat. Die kleineren Muscheln versuchen offensichtlich, das schnellere Eindringen von Sulfid durch eine erhöhte Oxidationsleistung zu kompensieren. Diese Kompensation reicht aber auf Dauer nicht aus. Felduntersuchungen an Muscheln aus der Danziger Bucht zeigen, daß die kleineren Größenklassen an besonders hoch mit Sulfid belasteten Standorten deutlich zurückgehen (U. Janas, Universität Danzig, pers. Mitt.). Hohe Sulfidbelastungen im Habitat können also zu einer Überalterung der Population führen. Es zeigt sich somit sowohl theoretisch als auch experimentell, daß bei Unterschreitung einer bestimmten Minimalgröße im Grenzbereich zwischen Meio- und Makro-

fauna eine effektive Sulfidentgiftung aufgrund der Diffusionsgesetze nicht mehr möglich ist. Dies gilt auch für die Larvenstadien der sulfidtoleranten Makrofauna, die daher deutlich empfindlicher auf Schwefelwasserstoff als ihre Adulttiere reagieren (Bittkau *et al.* 1994, Schneider 1995). Interessanterweise deuten sich jedoch auch bereits bei Larvenstadien von *Macoma balthica* aus unterschiedlich mit Sulfid belasteten Standorten unterschiedliche Sulfidtoleranzen an (Bittkau *et al.* 1996).

5 Sulfidfällung

Durch Fällung und Eliminierung von eingedrungenem Sulfid an der Körperoberfläche könnte der apparente Diffusionskoeffizient gesenkt und dadurch die Sulfidtoleranz gesteigert werden. So färbt sich der Mantelrand von *Macoma balthica* nach Sulfidexposition schwarz. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei dem Nematoden *Tobrilus gracilis* (Nuß 1984), der Plattmuschel *Macoma nasuta* (Levitt & Arp 1991), dem Priapuliden *Halicryptus spinulosus* (Oeschger & Janssen 1991, Janssen & Oeschger 1992), dem Polychaeten *Pherusa plumosa* (Jahn *et al.* 1992), der Pfeffermuschel *Scrobicularia plana* (Oeschger & Pedersen 1994) und dem Oligochaeten *Tubificoides benedii* (Dubilier *et al.* 1995) gemacht werden. Bei *P. plumosa* und *H. spinulosus* beruht die Schwarzfärbung auf ausgefälltem Eisensulfid auf der äußeren Kutikula. Da die Färbung wieder verschwindet, wenn die Tiere mit Sauerstoff in Berührung kommen, wurde vermutet, daß es sich hier um einen Schutzmechanismus handelt, der, "vergleichbar mit einer Batterie", wieder regenerierbar ist (Oeschger & Vetter 1992).

Bei *Macoma balthica* ist die Schwarzfärbung hauptsächlich auf extrazelluläre Kupfer-Schwefel-Präzipitate in der basalen Matrix des Mantelrandes zurückzuführen (Abb. 12-15, Tab. 4). Es könnte hier eine "Sulfid-Falle" vorliegen, wie sie auch für *Scrobicularia plana* postuliert wurde (Oeschger & Pedersen 1994). Das erste Ficksche Gesetz (Gl. 11) ermöglicht eine Abschätzung der Effektivität einer solchen Sulfidfällung im Mantelrand. Die Annahme, daß der Mantelrand etwa 0,1 cm breit ist und sich über eine Länge von 1,5 cm erstreckt, liefert eine Eintrittsfläche A von $0,15 \text{ cm}^2$. Bei einer Mantelranddicke von etwa $20 \mu\text{m}$ (Dr. R. Windoffer, Universität Hamburg, pers. Mitt.), einer äußeren Sulfidkonzentration von $100 \mu\text{M}$ ($=10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) und einem apparenten Diffusionskoeffizienten von $1,23\cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (s. Tab. 7, Hiddenseer Population) werden demnach $9,23\cdot 10^{-12} \text{ mol H}_2\text{S s}^{-1}$ bzw. $33,2 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}$ durchtreten.

Nach Sulfidinkubation liegen etwa $200 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ FM mehr im Mantel vor als nach rein oxischer Inkubation (Abb. 15a). Bei einer Masse des Mantels von ca. 10 mg entspricht diese Konzentration einer Absolutmenge von etwa $2 \mu\text{g}$ bzw. 32 nmol Cu . Es kann also angenommen werden, daß dies die Menge ist, die der Organismus zur Fällung von Sulfid bereitstellen kann. Wenn das eindringende Sulfid zu CuS gefällt wird, werden somit $32 \text{ nmol H}_2\text{S}$ immobilisiert. Das bedeutet, daß bei einer Außenkonzentration von $100 \mu\text{M H}_2\text{S}$ nach spätestens einer Stunde die Kapazität des Kupfers erschöpft ist.

Da der apparente Diffusionskoeffizient auch zeitweiligen Schalenschluß bereits mit berücksichtigt (s.o.), handelt es sich hierbei um eine untere Abschätzung. Nach Powell (1989) beträgt der Koeffizient für undissoziiertes H_2S bei ungehinderter Diffusion etwa $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Hierbei muß jedoch auch noch die Dissoziation des H_2S mit berücksichtigt werden. Unter Abwandlung von Gl. (11) lautet dann das erste Ficksche Gesetz:

$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = -\frac{A}{\Delta x} (D_{\text{H}_2\text{S}} \Delta c_{\text{H}_2\text{S}} + D_{\text{HS}^-} \Delta c_{\text{HS}^-} + D_{\text{S}^{2-}} \Delta c_{\text{S}^{2-}}) \quad (26)$$

Unbekannt sind die Diffusionskoeffizienten für HS^- (D_{HS^-}) und S^{2-} ($D_{\text{S}^{2-}}$). Julian & Arp (1992) geben jedoch Permeabilitätskoeffizienten für H_2S ($P_{\text{H}_2\text{S}}$) und HS^- (P_{HS^-}) an, aus denen der Diffusionskoeffizient D_{HS^-} abgeschätzt werden kann:

$$\frac{D_{\text{H}_2\text{S}}}{D_{\text{HS}^-}} = \frac{P_{\text{H}_2\text{S}}}{P_{\text{HS}^-}} \quad (27)$$

$$= \frac{0.17 \text{ cm h}^{-1}}{0.063 \text{ cm h}^{-1}}$$

$$\Rightarrow D_{\text{HS}^-} = 0.371 D_{\text{H}_2\text{S}} \quad (28)$$

Weiterhin werden die Konzentrationen der Sulfidspezies H_2S , HS^- und S^{2-} benötigt. Die Konzentration des vollständig dissoziierten S^{2-} -Ions kann bei einem pH-Wert kleiner als 12 vernachlässigt werden ($c_{\text{S}^{2-}} \rightarrow 0$). Da auch $D_{\text{S}^{2-}}$ wesentlich kleiner als $D_{\text{H}_2\text{S}}$ und D_{HS^-} ist, entfällt der letzte Term der Gl. (26).

Die Konzentration des undissoziierten H_2S $c_{\text{H}_2\text{S}}$ läßt sich aus der Definition der ersten Dissoziationskonstante K_1 für H_2S in Abhängigkeit von der Protonenkonzentration c_{H^+} berechnen (Goldhaber & Kaplan 1975):

$$K_1 = \frac{c_{H^+} \cdot c_{HS^-}}{c_{H_2S}} \quad (29)$$

Die Konzentration des HS⁻-Ions c_{HS^-} ergibt sich aus der Gesamtsulfidkonzentration c_T :

$$c_{HS^-} = c_T - c_{H_2S} \quad (30)$$

$$\Rightarrow K_1 = \frac{c_{H^+} (c_T - c_{H_2S})}{c_{H_2S}}$$

$$\Leftrightarrow c_{H_2S} = \frac{c_{H^+} \cdot c_T}{K_1 + c_{H^+}} \quad (31)$$

Mit $c_T = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $c_{H^+} = 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $K_1 = 9.77 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (aus $\text{p}K_1 = 7.01$: Millero 1986) ergibt sich $c_{H_2S} = 9.3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $c_{HS^-} = 90.7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Zur Berechnung der Flußrate können also folgende Daten in Gl. (26) eingesetzt werden: $A = 0,15 \text{ cm}^2$, $\Delta x = 2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$, $D_{H_2S} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Powell 1989), $\Delta c_{H_2S} = 9,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-3}$, $D_{HS^-} = 1,86 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und $\Delta c_{HS^-} = 9,07 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-3}$. Es ergibt sich somit eine Flußrate von $1,61 \cdot 10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$ bzw. $58 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}$. Bei ungehinderter Diffusion ist das Kupfer (32 nmol, s.o.) also bereits nach 34 Minuten verbraucht. Hierbei wurde jedoch von einem pH-Wert von 8,0 ausgegangen. Im Sediment liegt aber ein niedrigerer pH-Wert vor, der zu einer höheren Sulfiddiffusion führt. Für pH 7,0 berechnet sich aus den Gl. (26 - 31) eine Flußrate von $2,58 \cdot 10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$ bzw. $93 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}$. In diesem Fall ist bereits nach 21 Minuten die Kapazität des Kupfers erschöpft.

Diese Abschätzung ist natürlich sehr grob und berücksichtigt nicht die Fällung mit anderen Metallen wie Eisen und Zink, die wahrscheinlich ebenfalls stattfindet. Unbekannt ist auch, inwieweit der Körper zusätzlich Metalle zum Mantelrand nachliefern kann. Die langsame Bildungs- (innerhalb von Tagen) und Abbaurate der Präzipitate (innerhalb von Wochen) sprechen für einen langsamen Prozeß. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß die Metallfällung ein rein chemischer Vorgang ist, der sogar einen zusätzlichen Streßfaktor für das Tier darstellt. Es bleibt deutlich, daß die Fällung zu Metallsulfiden bei höherer Sulfidbelastung nur einen kurzfristigen Schutz des Organismus darstellen kann, wie dies auch schon von anderen Autoren vermutet wurde (Dubilier *et al.* 1995). Andererseits wird der Sulfidgehalt im Habitat normalerweise nicht plötzlich, sondern nur langsam ansteigen. Bei einer Außenkonzentration von $10 \mu\text{M H}_2\text{S}$ dauert es unter den obigen Annahmen immerhin bis zu zehn Stunden, bis das Kupfer im Mantelrand für die Sulfidfällung verbraucht ist. Das kann bedeuten, daß bei einer langsam ansteigenden Sulfidbelastung die Tiere durch Fällungsreaktionen Zeit gewinnen,

um ihren Stoffwechsel umzustellen. Während dieser Zeit könnten die Präzipitate von Amöbocyten phagocytiert und über die Mitteldarmdrüse exportiert werden. Ein ähnlicher Mechanismus ist bei der Auster *Ostrea edulis* bekannt (George *et al.* 1978). Da normalerweise nur der Mantelrand dem sulfidhaltigen Porenwasser unmittelbar ausgesetzt ist, während die Muscheln sich über ihren Siphon mit sauerstoffhaltigem Wasser versorgen, bleibt eine Sulfidoxidation auch bei Sulfidbelastung im Sediment gewährleistet (Abb. 30). Eine Sulfidfällung im Mantelrand und der Abtransport der gebildeten Metallsulfide über Amöbocyten könnte daher zumindest zu Beginn der Sulfidbelastung ein sinnvoller Entgiftungsweg sein.

6 Inhibition von Enzymen

Wenn ein Ausschluß von Sulfid nicht mehr möglich ist und die Sulfidoxidationskapazitäten erschöpft sind, dann blockiert eingedrungener Schwefelwasserstoff die Cytochrom-*c*-Oxidase. Sulfidinkubationen von Enzympräparaten zeigen, daß die Cytochrom-*c*-Oxidase von *Macoma balthica* bereits durch sehr geringe Sulfidkonzentrationen gehemmt wird. Auch bei anderen marinen Arten aus sulfidischen Biotopen liegen die Inhibitionskonstanten meist im nanomolaren Bereich und unterscheiden sich nicht wesentlich von denen nichtmariner Spezies (Tab. 13). Es ist bisher bei keiner Art eine sulfidunempfindliche Form der Cytochrom-*c*-Oxidase gefunden worden (Hand & Somero 1983).

Die unterschiedlichen Sulfidtoleranzen der Plattmuschelpopulationen beruhen demnach nicht auf einer unterschiedlichen Sulfidsensitivität der Cytochrom-*c*-Oxidase. Populationsunterschiede spiegeln sich jedoch wider, wenn die ganzen Tiere und nicht das isolierte Enzym Schwefelwasserstoff ausgesetzt werden. Dann geht bei Individuen aus der Kieler Bucht und aus Dorum-Neufeld die spezifische Aktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase schon nach wenigen Tagen zurück (Abb. 21a). Im Gegensatz dazu ist bei Plattmuscheln aus der Danziger Bucht und aus Hiddensee kein Rückgang zu erkennen (Abb. 21b).

Der Rückgang der spezifischen Aktivität muß nicht unbedingt auf einen unmittelbaren Aktivitätsrückgang der Cytochrom-*c*-Oxidase zurückgeführt werden, sondern kann auch auf eine verminderte Konzentration des Enzyms beruhen. Eventuell wird bei den empfindlichen Populationen die Neusynthese des Enzyms gehemmt. So ist bekannt, daß das Schlüsselenzym der Hämsynthese, δ -Aminolävulinsäuredehydratase, durch Schwermetalle wie Blei inhibiert

wird (Kondo *et al.* 1983). Es ist daher denkbar, daß Sulfid die Neusynthese der Cytochrom-*c*-Oxidase bei den Plattmuscheln aus Dorum und der Kieler Bucht hemmt. Im Gegensatz dazu verhindern die Hiddenseer und Danziger Tiere durch Verminderung des apparenten Diffusionskoeffizienten eine derartige Hemmung, so daß die Konzentration der Cytochrom-*c*-Oxidase aufrechterhalten bleibt und nach Entfernung des Sulfids der normale oxische Stoffwechsel sofort wieder einsetzen kann.

Die Erholungsversuche untermauern diese Hypothese. Es zeigt sich hierbei, daß die spezifische Ausgangsaktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase bei den sulfidempfindlichen Plattmuscheln auch neun Tage nach Unterbrechung der Sulfidzufuhr noch nicht wieder vollständig erreicht ist (Abb. 22). Es kann daher angenommen werden, daß die Tiere diese Zeit für eine Neusynthese benötigen.

Tab. 13. Inhibitionskonstanten K_I der Cytochrom-*c*-Oxidase für H_2S verschiedener Arten (Zusammenstellung nach Theede *et al.* 1995)

Art	K_I [$\mu M H_2S$]	Autoren
Marine Fische, versch. Arten	0,028 - 0,463	Bagarinao & Vetter 1990
Katzenwels	1	
Echiuride	0,5	
Rind	0,02 - 0,24	
<i>Bythogrea therydron</i>	0,002	Hand & Somero 1983
<i>Riftia pachyptila</i>	14	
<i>Halicryptus spinulosus</i>	1,05	Oeschger & Vetter 1992
<i>Heteromastus filiformis</i>	0,31	Oeschger & Vismann 1994
<i>Macoma balthica</i> : Kiel	0,65	diese Arbeit
Dorum	0,56	
Danzig	0,25	
Hiddensee	0,13	

Auch das bei Sauerstoffradikalentgiftung beteiligte Enzym Katalase wird durch Schwefelwasserstoff inhibiert. Die Empfindlichkeit ist jedoch bei weitem nicht so hoch wie bei Cytochrom-*c*-Oxidase. Während dieses Enzym bereits bei nanomolaren Sulfidkonzentrationen gehemmt wird (vgl. Tab. 13), liegen die Sulfidinhibitionskonstanten der Katalase bei den untersuchten Arten *Macoma balthica*, *Halicryptus spinulosus*, *Hediste diversicolor*, *Heteromastus filiformis* und *Pherusa plumosa* im mikromolaren Bereich (Tab. 9). Dennoch liegt selbst bei dem äußerst sulfidresistenten Priapuliden *H. spinulosus* keine sulfidinsensitive Form der Katalase vor, wie dies bei "thiobiotischer" Meiofauna nachgewiesen werden konnte (Morrill *et al.* 1988).

Hypoxische und hypoxisch-sulfidische Inkubationen bewirken bei den Muscheln *Macoma balthica* und *Arenomya (Mya) arenaria* einen Rückgang der Katalase-Aktivität (eigene unveröffentlichte Daten). Da bei den Aktivitätsänderungen keine Unterschiede zwischen hypoxischen und hypoxisch-sulfidischen Bedingungen vorliegen, scheint Sauerstoffmangel und weniger der Sulfidgehalt des äußeren Mediums zu einer Veränderung der Enzymaktivität zu führen. Abele-Oeschger & Oeschger (1995) konnten den gleichen Effekt bei *Astarte borealis* und *Arenicola marina* nachweisen. Bei *Hediste (Nereis) diversicolor* nimmt die Katalase-Aktivität nach anoxisch-sulfidischen Bedingungen wie auch nach Anoxie ohne Sulfid zu (Abele-Oeschger *et al.* 1994).

Ein Einfluß von Schwefelwasserstoff auf die Enzyme des Energiestoffwechsels Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase wurde bei *Macoma balthica* nicht gefunden. Das bedeutet, daß Sulfid zwar den oxidativen Stoffwechsel zum Erliegen bringt, eine Energiebereitstellung durch Anaerobiose wahrscheinlich aber noch möglich ist.

7 Anaerober Stoffwechsel

Erhöhte Succinatgehalte im Gewebe der Tiere weisen auf einen anaeroben Stoffwechsel hin (Gäde & Grieshaber 1989). Die Succinatanreicherungen bei *Macoma balthica* und *Cyprideis torosa* unter hypoxischen wie auch unter sulfidischen Bedingungen zeigen, daß die Tiere unter diesen Bedingungen auf anaerobe Stoffwechselwege umschalten (Abb. 23, 28).

Erkenntnisse über den anaeroben Stoffwechsel sind zunächst an parasitischen Nematoden, wie dem Spulwurm *Ascaris lumbricoides*, dessen Adultstadium im Darm von Wirbeltieren ohne Sauerstoff lebt, gewonnen worden (Bueding & Saz 1968, Saz & Lescure 1969, Fairbain 1970, Saz 1971, Hochachka & Mustafa 1972, Hochachka *et al.* 1973). Beim anaeroben Metabolismus ist ein wichtiger Schritt die Reduktion von Fumarat zu Succinat, die vom Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette katalysiert wird. Hierbei ist also Fumarat und nicht Sauerstoff der terminale Elektronenakzeptor. Cytochrom-c-Oxidase wird nicht benötigt, so daß der Stoffwechsel auch unter Sulfidbelastung ungehindert ablaufen kann. Die entsprechenden Stoffwechselwege liegen auch bei marinen Evertebraten vor, wenn auch andere Stoffwechselendprodukte, wie beispielsweise Opine, nachgewiesen wurden (Gäde & Zebe 1973, Gäde 1980, Schöttler 1980, Grieshaber *et al.* 1994). Aufgrund dieser Endprodukte ist es sogar möglich, zwischen funktionsbedingter (bei erhöhter Muskelaktivität) und biotopbedingter (bei Sauerstoffmangel im Habitat) Anaerobiose zu unterscheiden (Zebe *et al.* 1981, Gäde 1983, Pörtner *et al.* 1984b, Meinardus-Hager & Gäde 1986).

Die Succinatproduktion des Ostracoden *Cyprideis torosa* ist für einen Krebs durchaus ungewöhnlich. Normalerweise ist bei Crustaceen Lactat das Hauptprodukt der Anaerobiose (Zebe 1982, Gäde 1983, Hagerman & Szaniawska 1990, Grieshaber *et al.* 1994, Hagerman & Vismann 1995). Allerdings reagieren viele Crustaceen relativ empfindlich auf Sauerstoffmangel (Theede *et al.* 1969, Theede 1973), so daß die meisten Arten wahrscheinlich nur zur funktionsbedingten Anaerobiose fähig sind, dessen typisches Endprodukt Lactat ist. Auch die resistenteren Arten *Upogebia pugettensis* und *Callinassa californiensis* (Zebe 1982) sowie *Saduria entomon* (Hagerman & Szaniawska 1990) haben bei weitem nicht die extrem hohe Sauerstoffmangeltoleranz von *C. torosa* (Abb. 24). Der Abbau zu Succinat liefert mehr ATP als die Lactatproduktion (Fields 1983, Grieshaber *et al.* 1994), so daß dieser Stoffwechselweg eine bessere Anpassung an längeren Sauerstoffmangel darstellt.

Hohe Succinatwerte im Gewebe finden sich nicht nur nach hypoxischen Inkubationen, sondern auch, wenn die Versuchstiere gleichzeitig mit Sulfid und Sauerstoff inkubiert werden (Abb. 23, 28). Die Tiere schalten also trotz oxischer Bedingungen auf Anaerobiose um. Diese Beobachtung konnte auch bei anderen marinen Invertebraten gemacht werden (Jahn *et al.* 1992, Oeschger & Vetter 1992, Völkel & Grieshaber 1992, 1994, Dubilier *et al.* 1994). Grieshaber *et al.* (1992) und Oeschger & Vetter (1992) prägten für dieses Phänomen den Begriff "sulfidbedingte Anaerobiose" und stellten diese neben die funktionsbedingte und biotopbedingte Anaerobiose als eine weitere Form des Energiestoffwechsels ohne Beteiligung von molekularem Sauerstoff. Da Schwefelwasserstoff jedoch den oxidativen Stoffwechsel blockiert, kann ein aerober Stoffwechsel unter Sulfidbedingungen auch bei Anwesenheit von Sauerstoff nicht ablaufen. Es sind bisher auch keine "typischen" Stoffwechselendprodukte der "sulfidbedingten Anaerobiose", die eine Differenzierung rechtfertigen würde, nachgewiesen worden. Insofern

stellt "sulfidbedingte Anaerobiose" wahrscheinlich biochemisch nichts anderes als biotopbedingte Anaerobiose dar.

Hierbei ist auch zu bedenken, daß Schwefelwasserstoff im Biotop meist gleichzeitig mit Sauerstoffmangel auftritt. Die in Sulfidbiotopen lebenden Arten sind jedoch zur Anaerobiose befähigt und können so überdauern, bis sich die Umweltverhältnisse wieder bessern. Die Energieausbeute ist gegenüber dem oxidativen Stoffwechsel zwar deutlich herabgesetzt, ein Überleben ist jedoch auch durch die starke Drosselung des Energieverbrauchs, z.B. bei *Halicryptus spinulosus* auf unter 2% des aeroben Verbrauchs (Oeschger *et al.* 1992), lange gesichert. Unter Sauerstoffmangelbedingungen spielt die Toxizität des Schwefelwasserstoffs nur eine untergeordnete Rolle. Sulfid inhibiert neben Cytochrom-*c*-Oxidase zwar auch andere Enzyme, es handelt sich jedoch hierbei vor allem um Enzyme der Sauerstoffradikalentgiftung, wie Superoxiddismutase und Katalase sowie Oxidasen (Bagarinao 1992). Wichtige Wege des Energiestoffwechsels sind aber offensichtlich nicht betroffen. Zumindest bei den Enzymen Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase konnte bei *Macoma balthica* kein negativer Effekt von Schwefelwasserstoff nachgewiesen werden (vgl. Ergebnisse Kap. 1.9). Offensichtlich stellt die Fähigkeit zur Langzeit-Anaerobiose und der damit verbundenen Stoffwechselreduktion die wesentliche Voraussetzung für ein Überleben in sulfidischen Biotopen dar. Daher zeigen Arten mit einer hohen Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel auch eine hohe Sulfidtoleranz (Theede *et al.* 1969).

Für "thiobiotische" Meiofauna aus hochsulfidischen Sedimenthorizonten wurde von Powell (1989) ein sulfidinsensitiver aerober Stoffwechsel postuliert. Der Lebensraum ist jedoch frei von Sauerstoff, so daß ein aerober Stoffwechsel gar nicht ablaufen kann. Es ist daher anzunehmen, daß die Arten durch permanente Anaerobiose überleben können, wie dies bereits für frei lebende Protozoen nachgewiesen werden konnte (Fenchel *et al.* 1977). Da der anaerobe Stoffwechsel von Sulfid nicht oder nicht wesentlich beeinträchtigt wird, entfällt die Notwendigkeit der Sulfidentgiftung, die aufgrund der Kleinheit der Organismen sowieso nicht möglich ist. Ökophysiologisch entscheidend ist also nicht die Anwesenheit von Schwefelwasserstoff, sondern die Abwesenheit von Sauerstoff (vgl. auch Zimmermann *et al.*, in Vorbereitung). Insofern sollte der Begriff "Thiobios" besser durch "Anoxybios" ersetzt werden. Auch eine Energiekonservierung durch Sulfidoxidation, die den Begriff "Thiobios" rechtfertigen würde, kann von "thiobiotischer" Meiofauna (im Gegensatz zu "sulfidtoleranten, oxiphilen" Spezies, s.u.) nicht durchgeführt werden, da auch hierfür der nötige freie Sauerstoff fehlt.

8 Besonderheiten bei *Cyprideis torosa*

Der Ostracode *Cyprideis torosa* lebt auf der Sedimentoberfläche und kommt daher normalerweise mit Sauerstoff in Berührung, so daß er nicht zur "thiobiotischen" Meiofauna gezählt werden kann, sondern nach der Klassifizierung von Giere (1992) als "sulfidtolerante, oxiphile" Art einzustufen ist. Der Ostracode kann jedoch keine effektive Sulfidentgiftung betreiben. Bereits nach einer Stunde ist im Gewebe auch unter oxischen Bedingungen trotz intensiver Oxidationsleistung die Sulfidkonzentration des äußeren Mediums erreicht (Abb. 25a). Dies steht im krassen Gegensatz zu *Macoma balthica*, die zumindest bei Anwesenheit von Sauerstoff die interne Sulfidkonzentration unter der externen halten kann. Die extrem hohe Sulfidtoleranz beruht bei Arten der Meiofauna nicht auf Sulfidentgiftung, da sie wegen der geringen Tiergröße wirkungslos bleiben muß. Insofern könnte die Unterscheidung zwischen Makro- und Meiofauna, die im Grunde nur auf das quantitative Merkmal der Größe zurückgeführt wird, zumindest in dieser Hinsicht auch qualitativ begründet sein. *C. torosa* zeichnet sich durch eine außerordentlich hohe Anaerobiosekapazität aus, bei der der Muschelkrebs seine Bewegungsfähigkeit beibehält. Er kann daher überleben, auch wenn die Cytochrom-*c*-Oxidase und damit der oxidative Stoffwechsel durch Schwefelwasserstoff blockiert ist. Auch hier zeigt sich also, daß in der Fähigkeit zur Langzeit-Anaerobiose, zumindest bei Meiofauna, der Schlüssel für das Überleben in sulfidischen Biotopen liegt.

Ein weiteres Beispiel für eine "sulfidtolerante, oxiphile" Art der Meiofauna ist der Copepode *Cletocamptus confluens*, der im gleichen Habitat wie *Cyprideis torosa* vorkommt. Vopel *et al.* (1996) fanden bei *C. confluens* ebenfalls eine hohe Sulfidtoleranz, die auch nicht durch das Absenken des äußeren pH-Wertes vermindert wurde, obwohl dann der Anteil an undissoziiertem, leicht diffundierbarem H_2S wesentlich größer wird. Wahrscheinlich kann auch diese Art aufgrund ihrer Kleinheit das rasche Eindringen von H_2S nicht verhindern, sondern nur durch Anaerobiose überleben.

Cyprideis torosa kann zwar ein schnelles Eindringen von Sulfid in das Gewebe nicht verhindern, dennoch zeichnet die Art sich durch eine hohe Sulfidoxidationsleistung aus, wenn Sauerstoff vorhanden ist (Abb. 25b). Dies ermöglicht dem Ostracoden bei Verbesserung der äußeren Bedingungen, eingedrungenes Sulfid wieder zu eliminieren. Die Erholungsversuche zeigen nach Austausch des sulfidischen Mediums mit normoxischem Meerwasser einen Rückgang des internen Sulfidgehaltes (Abb. 27), bedingt einerseits durch Diffusion, andererseits durch Oxidation zu Thiosulfat. Der Thiosulfatgehalt nimmt daher in der ersten Stunde der Erholung etwas zu, bevor auch er abfällt. Die Fähigkeit zur schnellen Eliminierung von Sulfid und seinen Oxidationsprodukten ist offensichtlich eine besondere Anpassung des Ostracoden an sein Habitat mit starken Fluktuationen der abiotischen Faktoren.

Bei der Eliminierung der Oxidationsprodukte könnten Bakterien, die auf der Carapaxinnenseite des Ostracoden siedeln, eine Rolle spielen. Die Dichte dieser Bakterienkolonien ist sulfidabhängig, d.h. je höher die Sulfidkonzentration des Mediums ist, desto höher ist die Besiedlungsdichte (Giere & Windoffer 1994), vergleichbar mit ektosymbiotischen Bakterien auf Nematoden und Oligochaeten aus Sulfidhabitaten (Ott & Novak 1989, Ott *et al.* 1991, Giere 1992, Ott 1995). Es handelt sich hier jedoch nicht um eine obligate Bakteriensymbiose, denn nach Antibiotikabehandlung zur Bakterienabtötung ergibt sich keine herabgesetzte Sulfidtoleranz der Ostracoden (Giere *et al.* 1995) wie auch kein Einfluß auf die Sulfidoxidationsleistung (Abb. 26a). Die Bakterien haben aber unter normoxischen Bedingungen die Fähigkeit, Thiosulfat zu Sulfat, und unter hypoxischen Bedingungen zu Elementarschwefel, Tetrathionat und anderen (noch zu identifizierende) Schwefelkomponenten zu oxidieren, wobei sie Nitrat zu Nitrit reduzieren (Imhoff *et al.* 1995). Da die Bakterien nur langsam wachsen und dabei sehr viel Thiosulfat verbrauchen, handelt es sich wahrscheinlich um Kommensalen, die innerhalb des Carapaxes von *Cyprideis torosa* eine Nische gefunden haben, in der sie nicht dem starken Konkurrenzdruck anderer freilebender Thiosulfatoxidierer ausgesetzt sind. Hier können sie direkt das vom Ostracoden produzierte Thiosulfat als Energiequelle nutzen. Auch bei sulfatreduzierenden Bakterien auf den Schalen von *Arctica islandica* wird eine Nutzung des von den Muscheln produzierten Succinats vermutet (Bussmann & Reichardt 1991). Aufgrund der langsameren Wachstumsrate unter hypoxischen Bedingungen und der Limitierung durch zu geringe Nitratkonzentrationen als Elektronenakzeptor (A. Schneider, IfM Kiel, pers. Mitt.) konnte kein Effekt auf den Thiosulfatgehalt der Ostracoden unter Hypoxie ohne Bakterien gefunden werden (Abb. 26b). Unter normoxischen Bedingungen werden die Bakterien vermutlich zu einer schnelleren Eliminierung des Thiosulfates beitragen. Es könnte sich somit bei dem System Ostracode-Bakterien um eine in dem geologisch jungen Meer Ostsee noch entstehende Symbiose handeln.

9 Ausblick

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Anpassung an den Umweltfaktor Schwefelwasserstoff bei Arten der Makro- und Meiofauna unterschiedlich ausgeprägt ist. Während beim Makrozoobenthos eine Entgiftung (Oxidation) von eingedrungenem Schwefelwasserstoff noch möglich ist, kann dies beim Meiobenthos aufgrund der schnellen

Diffusion von H_2S in die kleinen Organismen nicht mehr effektiv verlaufen. Hier stellt die gut ausgeprägte Fähigkeit zur Anaerobiose die wichtigste Adaptation an sulfidische Habitate dar.

Die durchgeführten Experimente an der Meiobenthosart *Cyprideis torosa* erreichen jedoch hier ihre methodischen Grenzen. Aufgrund der geringen Größe der Organismen mußten für eine Probe 100 Tiere zusammen homogenisiert werden. Da *C. torosa* bereits an der Grenze zur Makrofauna steht, wird deutlich, daß bei noch kleineren Arten physiologische Untersuchungen an Gewebshomogenaten nicht mehr möglich sind. Differenzierungen zwischen unterschiedlichen Organen sind bereits bei *C. torosa* ausgeschlossen. Für ökophysiologische Untersuchungen an Arten der Meiofauna müssen also neue Methoden entwickelt werden, die die Reaktionen der Organismen möglichst *in vivo* schnell erfassen können. Hierbei scheint die Entwicklung von Mikroelektroden, wie sie bereits für interne pH-Messungen möglich ist (Zimmermann & Jahn 1996), ein vielversprechender Weg zu sein.

Auch bei Arten der Makrofauna könnten mit Hilfe derartiger Methoden neue Erkenntnisse gewonnen werden. So laufen wahrscheinlich in den Körperflüssigkeiten wichtige Entgiftungsprozesse ab, die dazu beitragen, daß nur geringe Sulfidkonzentrationen die Mitochondrien erreichen. Bei Arten, die über ein geschlossenes Blutgefäßsystem verfügen, sind jedoch diese Mechanismen aufgrund der geringen Blutmenge mit herkömmlichen Methoden schwer zu erfassen und daher nahezu unbekannt. Hier könnten beispielsweise mit Hilfe von Mikropipetten kleinste Gewebeproben aus den Tieren entnommen und untersucht werden.

Am Beispiel der Plattmuschel *Macoma balthica* konnte nachgewiesen werden, daß unterschiedliche Anpassungsleistungen an Schwefelwasserstoff nicht nur bei verschiedenen Arten, sondern auch bei verschiedenen Populationen derselben Art auftreten können. Dieses Erkenntnis führt zu der Frage, inwieweit der Umweltfaktor Schwefelwasserstoff die Artbildung und damit die Evolution beeinflusst. Hier sollten genetische Untersuchungen zeigen, in welchem Maße sich die Populationen bereits genetisch voneinander entfernt haben. Weiterhin machen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich, daß Untersuchungen an Exemplaren einer Population nicht unbedingt die artspezifische Reaktionsnorm gegenüber dem untersuchten ökologischen Faktor in ihrer vollen Breite erfassen. Dies muß bei zukünftigen ökophysiologischen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Literatur

- Abele-Oeschger, D., R. Oeschger (1995). Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *J. Exp. Mar. Biol.* **187**: 63-80.
- Abele-Oeschger, D., R. Oeschger, H. Theede (1994). Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **106**: 101-110.
- Aebi, H.E. (1985). Catalase. In: J. Bergmeyer, M. Graßl (eds.). *Methods of enzymatic analysis*. Vol. III. Enzymes 1: Oxidoreductases, transferases. Verlag Chemie, Weinheim, 3rd edition, pp. 273-286.
- American Public Health Association (APHA). American Water Works Association. Water Pollution Control Federation (1976). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC. 14th edition.
- Arp, A.J., B.M. Hansen, D. Julian (1992). Burrow environment and coelomic fluid characteristics of the echiuran worm *Urechis caupo* from populations at three sites in northern California. *Mar. Biol.* **113**: 613-623.
- Babenerd, B. (1991). Increasing oxygen deficiency in Kiel Bay (Western Baltic) - A paradigm of progressing coastal eutrophication. *Meeresforsch.* **33**: 121-140.
- Bagarinao, T. (1992). Sulfide as an environmental factor and toxicant: tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* **24**: 21-62.
- Bagarinao, T., R.D. Vetter (1990). Oxidative detoxification of sulfide by mitochondria of the California killifish *Fundulus parvipennis* and the speckled sanddab *Citharichthys stigmaeus*. *J. Comp. Physiol. B* **160**: 519-527.
- Bagarinao, T., R.D. Vetter (1993). Sulphide tolerance and adaptation in the California killifish, *Fundulus parvipennis*, a salt marsh resident. *J. Fish Biol.* **42**: 729-748.
- Berg, H.C. (1993). *Random walks in biology*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Bergmeyer, H.-U. (1955). Zur Messung von Katalase-Aktivitäten. *Biochem. Zeitschr.* **327**: 255-258.
- Beukema, J.J., B.W. Meehan (1985). Latitudinal variation in linear growth and other shell characteristics of *Macoma balthica*. *Mar. Biol.* **90**: 27-33.
- Beutler, H.-O. (1985). Succinate. In: J. Bergmeyer, M. Graßl (eds.). *Methods of enzymatic analysis*. Vol. VII. Metabolites 2: Tri- and dicarbonic acids, purine and pyrimidine derivatives, coenzymes, inorganic compounds. Verlag Chemie, Weinheim, 3rd edition, pp. 25-33.
- Bitkau, C., H. Hummel, H. Theede (1996). Sulfidtoleranz von *Macoma balthica*-Larven. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **89.1**: 302.
- Bitkau, C., M. Seaman, H. Theede (1994). Auswirkungen von Schwefelwasserstoff-Exposition auf Larven ausgewählter mariner Wirbelloser. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **87.1**: 322.
- Boaden, P.J.S. (1980). Meiofaunal thiebios and "the *Arenicola* negation": case not proven. *Mar. Biol.* **58**: 25-29.
- Boaden, P.J.S., H.M. Platt (1971). Daily migration patterns in an intertidal meiobenthic community. *Thalassia Jugosl.* **7**(1): 1-12.

- Bonsdorff, E., A. Norkko, C. Boström (1995). Recruitment and population maintenance of the bivalve *Macoma balthica* (L.) - factors affecting settling success and early survival on shallow sandy bottoms. In: A. Eleftheriou, A.D. Ansell, C.J. Smith (eds.). Biology and ecology of shallow coastal waters. Proceedings of the 28th European Marine Biology Symposium. Iraklio, Crete, 1993. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 253-260.
- Bordin, G., J. McCourt, A. Rodríguez (1992). Trace metals in the marine bivalve *Macoma balthica* in the Westerschelde Estuary (The Netherlands). Part 1: Analysis of total copper, cadmium, zinc and iron concentrations - locational and seasonal variations. *Sci. Tot. Environ.* **127**: 255-280.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bueding, E., H.J. Saz (1968). Pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities of *Ascaris* muscle, *Hymenolepis diminuta* and *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**: 511-518.
- Bussmann, I., W. Reichardt (1991). Sulfate-reducing bacteria in temporarily oxic sediments with bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **78**: 97-102.
- Cavallini, D., G. Federici, E. Barboni (1970). Interaction of proteins with sulfide. *Eur. J. Biochem.* **14**: 169-174.
- Childress, J.J., H. Felbeck, G.N. Somero (1987). Symbiose in der Tiefsee. *Spektrum der Wissenschaft* **7**: 94-100.
- Clark, R.B. (1992). *Kranke Meere? Verschmutzung und ihre Folgen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- Clauß, G., H. Ebner (1982). *Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner*. Bd. 1. Grundlagen. Verlag Harri Deutsch, Thun, Frankfurt/Main. 4. Auflage.
- Cline, J.D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**: 454-485.
- Dando, P.R., S.A. Ridgway, B. Spiro (1994). Sulphide "mining" by lucinid bivalve molluscs: demonstrated by stable sulphur isotope measurements and experimental models. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **107**: 169-175.
- Dries, R.-R., H. Theede (1974). Sauerstoffmangelresistenz mariner Bodenevertebraten aus der Westlichen Ostsee. *Mar. Biol.* **25**: 327-333.
- Dries, R.-R., H. Theede (1976). Stoffwechselintensität und Reservestoffabbau einiger mariner Muscheln bei herabgesetzter Sauerstoffsättigung des Mediums. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* **3**: 37-48.
- Dubilier, N., O. Giere, M.K. Grieshaber (1994). Concomitant effects of sulfide and hypoxia on the aerobic metabolism of the marine oligochaet *Tubificoides benedii*. *J. Exp. Zool.* **269**: 287-297.
- Dubilier, N., O. Giere, M.K. Grieshaber (1995). Morphological and ecophysiological adaptations of the marine oligochaet *Tubificoides benedii* to sulfidic sediments. *Amer. Zool.* **35**: 163-173.
- Duve, C. de (1996). Die Herkunft der komplexen Zellen. *Spektrum der Wissenschaft* **6**: 60-68.
- DYSMON I (1994). *Schlußbericht des BMFT-Projektes DYSMON*. Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Bonn.
- Edmond, J.M., K.L. von Damm, R.E. McDuff, C.I. Measures (1982). Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. *Nature* **297**: 187-191.
- Egerton, R.F. (1986). *Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscopy*. Plenum Press, New York.

- Fahey, R.C., G.L. Newton, R. Dorian, E.M. Kosower (1980). Analysis of biological thiols: derivatization with monobromotrimethylammoniumbimane and characterization by electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* **107**: 1-10.
- Fahey, R.C., G.L. Newton, R. Dorian, E.M. Kosower (1981). Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* **111**: 357-365.
- Fairbain, D. (1970). Biochemical adaptation and loss of genetic capacity in helminth parasites. *Biol. Rev.* **45**: 29-72.
- Felbeck, H., J.J. Childress, G.N. Somero (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* **293**: 291-293.
- Fenchel, T.M., T. Perry, A. Thane (1977). Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates. *J. Protozool.* **24**(1): 154-163.
- Fenchel, T.M., R.J. Riedl (1970). The sulfide system: a new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. *Mar. Biol.* **7**: 255-268.
- Fields, J.H.A. (1983). Alternatives to lactic acid: possible advantages. *J. Exp. Zool.* **228**: 445-457.
- Fonselius, S.H. (1983). Determination of hydrogen sulphide. *In*: K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling (eds.). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 2nd edition, pp. 73-80.
- Fox, C.A., E.N. Powell (1987). The effect of oxygen and sulfide on CO₂ production by three acoeel turbellarians. Are thiobiotic meiofauna aerobic? *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**(3): 509-514.
- Gäde, G. (1980). Biological role of octopine formation in marine molluscs. *Mar. Biol. Lett.* **1**: 121-135.
- Gäde, G. (1983). Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J. Exp. Zool.* **228**: 415-429.
- Gäde, G., M.K. Grieshaber (1989). Measurement of anaerobic metabolites. *In*: C.R. Bridges, P.J. Beutler (eds.). *Techniques in comparative respiratory physiology*. Soc. Exp. Biol. Seminar Ser. **37**. University Press, London, Cambridge, pp. 261-278.
- Gäde, G., E. Zebe (1973). Über den Anaerobiosestoffwechsel von Molluskenmuskeln. *J. comp. Physiol.* **85**: 291-301.
- Gamenick, I., O. Giere (1994). Population dynamics and ecophysiology of *Capitella capitata* from North Sea intertidal flats: evidence for two sibling species. *Polychaete Research* **16**: 44-47.
- Gamenick, I., O. Giere (1995). Wiederbesiedlung chemals anoxischer und hochsulfidischer Sedimente durch Makrozoobenthos. *BODDEN* **2**: 87-99.
- Gamenick, I., O. Giere (1996). Differentiation of the *Capitella capitata* (Polychaeta) complex using ecophysiological and electrophoretic methods. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **89**.1: 10.
- Gamenick, I., A. Jahn, K. Vopel, O. Giere (1996). Hypoxia and sulphide as structuring factors in a macrozoobenthic community at the shore of the Baltic Sea: colonisation studies and tolerance experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, im Druck.
- Gamenick, I., J. Rethmeier, A. Rabenstein, U. Fischer, O. Giere. Influence of hypoxia and sulfide conditions on cyanobacteria and macrofauna in shallow coastal sediments of the Southern Baltic Sea. *In* Vorbereitung.
- George, S.G., B.J.S. Pirie, A.R. Cheyne, T.L. Coombs, P.T. Grant (1978). Detoxification of metals by marine bivalves: an ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* **45**: 147-156.
- Giere, O. (1992). Benthic life in sulfidic zones of the sea - ecological and structural adaptations to a toxic environment. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **85**.2: 77-93.

- Giere, O., I. Gamenick, M. Wetzel, R. Windoffer, E. Müller, J. Wolfart (1995). Einfluß von Schwefelwasserstoff auf ausgewählte "Sulfidtiere" und Modalitäten ihrer Anpassung. *In: Dynamik in Sulfid- und Methanbiotopen der Ost- und Nordsee (DYSMON II). Zwischenbericht 1. Nov. 1993 bis 31.12.1994.* Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Bonn.
- Giere, O., R. Windoffer (1994). Anpassungen ausgewählter Arten an anoxisch/sulfidische Bedingungen: Strukturelle Aspekte - elektronenmikroskopische und histochemische Analysen von Meio- und Makrobenthos. *In: Schlußbericht des BMFT-Projektes DYSMON.* Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Bonn.
- Gilboa-Garber, N. (1971). Direct spectrophotometric determination of inorganic sulfide in biological materials and in other complex mixtures. *Anal. Biochem.* **43**: 129-133.
- Goldhaber, M.B., I.R. Kaplan (1975). Apparent dissociation constants of hydrogen sulfide in chloride solutions. *Mar. Chem.* **3**: 83-104.
- Grasshoff, K. (1983). Determination of oxygen. *In: K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling (eds.). Methods of seawater analysis.* Verlag Chemie, Weinheim, 2nd edition, pp. 61-72.
- Grassle, J.F. (1985). Hydrothermal vent animals: distribution and biology. *Science* **229**: 713-717.
- Grieshaber, M.K., I. Hardewig, U. Kreutzer, H.-O. Pörtner (1994). Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **125**: 43-147.
- Grieshaber, M.K., I. Hardewig, U. Kreutzer, A. Schneider, S. Völkel (1992). Hypoxia and sulfide tolerance in some marine invertebrates. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **85.2**: 55-76.
- Grieshaber, M.K., K. Hauschild, A. Sommer, S. Völkel (1995). Anaerobiosis and sulphobiosis in the lugworm, *Arenicola marina* L. *In: A. Eleftheriou, A.D. Ansell, C.J. Smith (eds.). Biology and ecology of shallow coastal waters. Proceedings of the 28th European Marine Biology Symposium.* Iraklio, Crete, 1993. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 131-137.
- Groenendaal, M. (1981). The adaptation of *Arenicola marina* to sulphide solutions. *Neth. J. Sea Res.* **15**(1): 65-77.
- Günther, C.-P. (1991). Settlement of *Macoma balthica* on an intertidal sandflat in the Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **76**: 73-79.
- Hagerman, L., A. Szaniawska (1990). Anaerobic metabolic strategy of the glacial relict isopod *Saduria (Mesidotea) entomon*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **59**: 91-96.
- Hagerman, L., B. Vismann (1993). Anaerobic metabolism, hypoxia and hydrogen sulphide in the brackish water isopod *Saduria entomon* (L.). *Ophelia* **38**: 1-11.
- Hagerman, L., B. Vismann (1995). Anaerobic metabolism in the shrimp *Crangon crangon* exposed to hypoxia, anoxia and hydrogen sulphide. *Mar. Biol.* **123**: 235-240.
- Hand, S.C., G.N. Somero (1983). Energy metabolism pathways of hydrothermal vent animals: adaptations to a food-rich and sulfide-rich deep-sea environment. *Biol. Bull.* **165**: 167-181.
- Handel, E. van (1987). A sulfide detection test for field use. *J. Amer. Mosquito Control Ass.* **3**(6): 644-645.
- Herman, P.M.J., C. Heip (1982). Growth and respiration of *Cyprideis torosa* Jones 1850 (Crustacea Ostracoda). *Oecologia* **54**: 300-303.
- Herman, P.M.J., C. Heip, G. Vranken (1983). The production of *Cyprideis torosa* Jones 1850 (Crustacea, Ostracoda). *Oecologia* **58**: 326-331.
- Hochachka, P.W., J. Fields, T. Mustafa (1973). Animal life without oxygen: basic biochemical mechanisms. *Amer. Zool.* **13**: 543-555.
- Hochachka, P.W., T. Mustafa (1972). Invertebrate facultative anaerobiosis. *Science* **178**: 1056-1060.

- Höpner, T. (1996). Schwarze Tage im Nationalpark Wattenmeer. *Spektrum der Wissenschaft* **8**: 16-22.
- Höpner, T., H. Michaelis (1994). Sogenannte "schwarze Flecken" - ein Eutrophierungssymptom des Wattenmeeres. *In*: J.L. Lozán, E. Rachor, K. Reise, H. von Westernhagen, W. Lenz (eds.). Warnsignale aus dem Wattenmeer. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Oxford, Edinburgh, Boston, London, Melbourne, Paris, Wien, Yokohama, pp. 153-159.
- Howarth, R.W., A. Giblin, J. Gale, B.J. Peterson, G.W. Luther III (1983). Reduced sulfur compounds in the pore waters of a New England salt marsh. *Ecol. Bull.* **35**: 135-152.
- Howes, B.L., J.W.H. Dacey, S.G. Wakeham (1985). Effects of sampling technique on measurements of porewater constituents in salt marsh sediments. *Limnol. Oceanogr.* **30**(1): 221-227.
- Huxtable, R.J. (1986). Biochemistry of sulfur. Plenum Press, New York.
- Imai, K., T. Toyooka, H. Miyano (1984). Fluorogenic reagents for primary and secondary amines and thiols in high-performance liquid chromatography. *Analyst* **109**: 1365-1373.
- Imhoff, J.F., L. Podgorsek, A. Schneider, L. Weinberger, M. Ehmke-Kasch, H. Sell (1995). Der Einfluß von Standortparametern auf die dynamischen Prozesse der Sulfidoxidation und auf das Artenspektrum beteiligter Bakterien. *In*: Dynamik in Sulfid- und Methanbiotopen der Ost- und Nordsee (DYSMON II). Zwischenbericht 1. Nov. 1993 bis 31.12.1994. Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Bonn.
- Ingvorsen, K., B.B. Jørgensen (1979). Combined measurement of oxygen and sulfide in water samples. *Limnol. Oceanogr.* **24**(2): 390-393.
- Jahn, A., I. Gamenick, H. Theede (1996). Physiological adaptations of *Cyprideis torosa* (Crustacea, Ostracoda) to hydrogen sulphide. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **142**: 215-223.
- Jahn, A., R. Oeschger, H. Theede (1992). Auswirkungen von Schwefelwasserstoff auf den Stoffwechsel ausgewählter Polychaeten aus der Nord- und Ostsee. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **85.1**: 22.
- Jander, G., K.F. Jahr (1986). Maßanalyse. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York, 2. Auflage.
- Janssen, H.H., R. Oeschger (1992). The body wall of *Halicryptus spinulosus* (Priapulida) - ultrastructure and changes induced by hydrogen sulfide. *Hydrobiologia* **230**: 219-230.
- Job, D., C. Cochet, A. Dhien, E.M. Chambez (1978). A rapid method for screening inhibitor effects: determination of I_{50} and its standard deviation. *Anal. Biochem.* **84**: 68-77.
- Jørgensen, B.B. (1977). The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnol. Oceanogr.* **22**: 814-832.
- Jørgensen, B.B. (1990). A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* **249**: 152-154.
- Jørgensen, B.B., T. Fenchel (1974). The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Mar. Biol.* **24**: 189-201.
- Julian, D., A.J. Arp (1992). Sulfide permeability in the marine invertebrate *Urechis caupo*. *J. Comp. Physiol. B* **162**: 59-67.
- Kondo, M., M. Kajimoto, G. Urata (1983). Alteration of activities of δ -aminolevulinic acid synthase, δ -aminolevulinic acid dehydratase and δ -aminolevulinic acid dehydratase inhibitor in the bone marrow cells of lead poisoned rats. *Exp. Dermatol.* **11**(4): 324-331.
- Köster, M. (1993). Mikrobielle Aktivitäten an Grenzflächen. *In*: L.-A. Meyer-Reil, M. Köster (eds.). Mikrobiologie des Meereshodens. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York, pp. 82-120.
- Kraus, D.W., J.E. Doeller, J.B. Wittenberg (1992). Hydrogen sulfide reduction of symbiont cytochrome c_{552} in gills of *Solemya reidi* (Mollusca). *Biol. Bull.* **182**: 339-347.

- Lauren, D.R., J.H. Watkinson (1985). Elemental sulphur analysis using high-performance liquid chromatography on 10- μ m rigid polymer particles. *J. Chromatogr.* **348**: 317-320.
- Levitt, J.M., A.J. Arp (1991). The effects of sulfide on the anaerobic metabolism of two congeneric species of mudflat clams. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**: 339-347.
- Lineweaver, H., D. Burk (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
- Meehan, B.W. (1985). Genetic comparison of *Macoma balthica* (Bivalvia, Telinidae) from the eastern and western North Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **22**: 69-76.
- Meinardus-Hager, G., G. Gäde (1986). The pyruvate branchpoint in the anaerobic energy metabolism of the jumping cockle *Cardium tuberculanum* L.: D-lactate formation during environmental anaerobiosis versus octopine formation during exercise. *Exp. Biol.* **45**: 91-110.
- Meischner, D., J. Rumohr (1974). A light-weight, high-momentum gravity corer for subaqueous sediments. *Senckenbergiana marit.* **6**(1): 105-117.
- Mendis, A.H.W., A.A.F. Evans (1984). First evidence for the occurrence of cytochrome-*o* in a free-living nematode. *Comp. Biochem. Physiol.* **78B**(3): 729-735.
- Meyer-Reil, L.-A. (1996). Mikrobiologie des Benthos. *In*: G. Reinheimer (ed.). *Meereskunde der Ostsee*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2. Aufl., pp. 181-188.
- Meyers, M.B., H. Fossing, E.N. Powell (1987). Microdistribution of interstitial meiofauna, oxygen and sulfide gradients, and the tubes of macro-infauna. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **35**: 223-241.
- Michaelis, L., M.L. Menten (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**: 333-369.
- Millero, F.J. (1986). The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Mar. Chem.* **18**: 121-147.
- Miron, G., E. Kristensen (1993a). Behavioural response of three nereid polychaetes to injection of sulfide inside burrows. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **101**: 147-155.
- Miron, G., E. Kristensen (1993b). Factors influencing the distribution of nereid polychaetes: the sulfide aspect. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **93**: 143-153.
- Morrill, A.C., E.N. Powell, R.R. Bidigare, J.M. Shick (1988). Adaptations to life in the sulfide system: a comparison of oxygen detoxifying enzymes in thiobiotic and oxybiotic meiofauna (and freshwater planarians). *J. Comp. Physiol. B* **158**: 335-344.
- National Research Council, Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants, Subcommittee on Hydrogen Sulfide (1979). *Hydrogen sulfide*. University Park Press, Baltimore.
- Nehring, D. (1996). Gase. *In*: G. Reinheimer (ed.). *Meereskunde der Ostsee*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2. Aufl., pp. 91-97.
- Newton, G.L., R. Dorian, R.C. Fahey (1981). Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance chromatography. *Anal. Biochem.* **114**: 383-387.
- Nicholls, P. (1975). The effect of sulphide on cytochrome *aa*₃ isosteric and allosteric shifts of the reduced α -peak. *Biochim. Biophys. Acta* **396**: 24-35.
- Nicholls, P., J.-K. Kim (1982). Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome *c* oxidase system. *Can. J. Biochem.* **60**: 613-623.
- Nicholls, P., J.-K. Kim (1981). Oxidation of sulphide by cytochrome *aa*₃. *Biochim. Biophys. Acta* **637**: 312-320.

- Nielsen, D. (1994). Adfærdsmæssige og metaboliske adaptationer til hypoxi og sulfid hos *Mya arenaria* og *Macoma balthica*. Kan forskellige sulfidtilpasninger påvirke muslingernes overlevelse? (Verhaltensbiologische und metabolische Anpassungen an Hypoxie und Sulfid bei *Mya arenaria* und *Macoma balthica*. Können verschiedene Sulfidanpassungen das Überleben der Muscheln beeinflussen?) Diplomarbeit, Marinbiologisk Laboratorium, Københavns Universitet.
- Norkko, A., E. Bonsdorff (1996). Rapid zoobenthic community responses to accumulations of drifting algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **131**: 143-157.
- Nuß, B. (1984). Ultrastrukturelle und ökophysiologische Untersuchungen an kristalloiden Einschlüssen der Muskeln eines sulfidtoleranten limnischen Nematoden (*Tobrilus gracilis*). *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* **20**: 3-15.
- O'Brien, J., R.D. Vetter (1990). Production of thiosulphate during sulphide oxidation by mitochondria of the symbiont-containing bivalve *Solemya reidi*. *J. exp. Biol.* **149**: 133-148.
- Oertzen, J.-A. von (1973). Abiotic potency and physiological resistance of shallow and deep water bivalves. *OIKOS Suppl.* **15**: 261-266.
- Oeschger, R., H.H. Janssen (1991). Histological studies on *Halicryptus spinulosus* (Priapulida) with regard to environmental hydrogen sulfide resistance. *Hydrobiologia* **222**: 1-12.
- Oeschger, R., T.F. Pedersen (1994). Influence of anoxia and hydrogen sulphide on the energy metabolism of *Scrobicularia plana* (da Costa) (Bivalvia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **184**: 255-268.
- Oeschger, R., H. Peper, G. Graf, H. Theede (1992). Metabolic responses of *Halicryptus spinulosus* (Priapulida) to reduced oxygen levels and anoxia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **162**: 229-241.
- Oeschger, R., K.B. Storey (1993). Impact of anoxia and hydrogen sulphide on the metabolism of *Arctica islandica* L. (Bivalvia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **170**: 213-226.
- Oeschger, R., K. Tschischka (1995). Bedeutung der mitochondrialen Sulfidoxidation bei nereiden Polychaeten. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **88**: 1: 69.
- Oeschger, R., R.D. Vetter (1992). Sulfide detoxification and tolerance in *Halicryptus spinulosus* (Priapulida): a multiple strategy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **86**: 167-179.
- Oeschger, R., B. Vismann (1994). Sulphide tolerance in *Heteromastus filiformis* (Polychaeta): mitochondrial adaptations. *Ophelia* **40**(2): 147-158.
- Ott, J., R. Novak (1989). Living at an interface: Meiofauna at the oxygen/sulfide boundary of marine sediments. *In*: J.S. Ryland, P.A. Tyler (eds.). *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms*. Proceedings of 23rd European Marine Biology Symposium. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 415-422.
- Ott, J., R. Novak, F. Schiemer, U. Hentschel, M. Nebelsick, M. Polz (1991). Tackling the sulfide gradient: A novel strategy involving marine nematodes and chemoautotrophic ectosymbionts. *P.S.Z.N.I: Marine Ecology* **12**(3): 261-279.
- Ott, J.A. (1995). Sulphide symbiosis in shallow sands. *In*: A. Eleftheriou, A.D. Ansell, C.J. Smith (eds.). *Biology and ecology of shallow coastal waters*. Proceedings of the 28th European Marine Biology Symposium. Iraklio, Crete, 1993. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 143-147.
- Pörtner, H.-O. (1987). Contribution of anaerobic metabolism to pH regulation in animal tissues: theory. *J. exp. Biol.* **131**: 69-87.
- Pörtner, H.O., M.K. Grieshaber, N. Heisler (1984a). Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: effect of environmental hypoxia on extracellular and intracellular pH in *Sipunculus nudus* L. *J. Comp. Physiol. B* **155**: 13-20.
- Pörtner, H.-O., U. Kreutzer, B. Siegmund, N. Heisler, M.K. Grieshaber (1984b). Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia. *Mar. Biol.* **79**: 237-247.

- Powell, E. (1989). Oxygen, sulfide and diffusion: Why thiobiotic meiofauna must be sulfide-insensitive first order respirers. *J. Mar. Res.* **47**: 887-932.
- Powell, E.N., M.A. Crenshaw, R.M. Rieger (1980). Adaptations to sulfide in sulfide-system meiofauna. Endproducts of sulfide detoxification in three turbellarians and a gastrotrich. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2**: 169-177.
- Powell, M.A., G.N. Somero (1986). Hydrogen sulfide oxidation is coupled to oxidative phosphorylation in mitochondria of *Solemya reidi*. *Science* **233**: 563-566.
- Reise, K., P. Ax (1979). A meiofaunal "thiobios" limited to the anaerobic sulfide system of marine sand does not exist. *Mar. Biol.* **54**: 225-237.
- Reise, K., P. Ax (1980). Statement on the thiobios-hypothesis. *Mar. Biol.* **58**: 31-32.
- Rethmeier, J. (1995). Untersuchungen zur Ökologie und zum Mechanismus der Sulfidadaptation mariner Cyanobakterien der Ostsee. Dissertation, Universität Bremen.
- Revsbech, N.P., B.B. Jørgensen, T.H. Blackburn (1980). Oxygen in the sea bottom measured with a micro-electrode. *Science* **207**: 1355-1356.
- Sars, G.O. (1925). An account of the crustacea of Norway with short descriptions and figures of all the species. Vol. IX. Ostracoda. Parts IX and X. Cypridae (concluded), Cytheridae (part). Bergen Museum. Alb. Cammermeyers Forlag, Christiania.
- Saz, H.J. (1971). Facultative anaerobiosis in the invertebrates: pathways and control systems. *Amer. Zool.* **11**: 125-133.
- Saz, H.J., O.L. Lescure (1969). The function of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. *Comp. Biochem. Physiol.* **30**: 49-60.
- Schmaljohann, R. (1993). Mikrobiologische Aspekte von Fluid- und Gasaustritten. In: L.-A. Meyer-Reil, M. Köster (eds.). *Mikrobiologie des Meeresbodens*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York, pp. 221-257.
- Schneider, A. (1995). Stoffwechselleistungen von *Marenzelleria viridis* - der Einfluß des Stoffwechselgiftes Schwefelwasserstoff. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **88**: 1: 130.
- Schöttler, U. (1980). Der Energiestoffwechsel bei biotop-bedingter Anaerobiose: Untersuchungen an Anneliden. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **1980**: 228-240.
- Somero, G.N., J.J. Childress, A.E. Anderson (1989). Transport, metabolism, and detoxification of hydrogen sulfide in animals from sulfide-rich marine environments. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* **1**: 591-614.
- SPIEGEL (1996). "Die letzten Warnsignale". *DER SPIEGEL* **25**, 17.6.96: 22-24.
- Studel, R., T. Göbel, G. Holdt (1988). The molecular composition of hydrophilic sulfur sols prepared by acid decomposition of thiosulfate. *Z. Naturforsch.* **43b**: 203-218.
- Studel, R., G. Holdt, T. Göbel, W. Hazeu (1987). Chromatographische Trennung höherer Polythionate $S_nO_6^{2-}$ ($n=3...22$) und deren Nachweis in Kulturen von *Thiobacillus ferrooxidans*; molekulare Zusammensetzung bakterieller Schwefelausscheidungen. *Angew. Chem.* **99**(2): 143-146.
- Stresemann, E. (1992). *Exkursionsfauna von Deutschland*. Band 1. Wirbellose (ohne Insekten). Verlag Volk und Wissen GmbH, Berlin, 8. Auflage.
- Tardent, P. (1993). *Meeresbiologie. Eine Einführung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Temara, A., C. de Ridder, J.G. Kuenen, L.A. Robertson (1993). Sulfide-oxidizing bacteria in the burrowing echinoid, *Echinocardium cordatum* (Echinodermata). *Mar. Biol.* **115**: 179-185.

- Theede, H. (1973). Comparative studies on the influence of oxygen deficiency and hydrogen sulphide on marine bottom invertebrates. *Neth. J. Sea Res.* **7**: 244-252.
- Theede, H., R. Oeschger, A. Jahn (1995). Adaptive responses of marine benthic invertebrates to hydrogen sulphide. *In*: A. Eleftheriou, A.D. Ansell, C.J. Smith (eds.). *Biology and ecology of shallow coastal waters. Proceedings of the 28th European Marine Biology Symposium*. Iraklio, Crete, 1993. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 149-152.
- Theede, H., A. Ponat, K. Hiroki, C. Schlieper (1969). Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen-deficiency and hydrogen sulphide. *Mar. Biol.* **2**: 325-337.
- Thiermann, F., A.-S. Niemeyer, O. Giere (1996). Variations in the sulfide regime and the distribution of macrofauna in an intertidal flat in the North Sea. *Helgoländer Meeresunters.* **50**: 87-104.
- Tschischka, K., R. Oeschger (1995). Mitochondrial sulphide oxidation in selected marine invertebrates. *Proceedings of the 4th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Physiol. Zool.* **68**(4): 135.
- Urich, K. (1990). *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Väinölä, R., S.-L. Varvio (1989). Biosystematics of *Macoma balthica* in northwestern Europe. *In*: J.S. Ryland, P.A. Tyler (eds.). *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms. Proceedings of 23rd European Marine Biology Symposium*. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 309-316.
- Vetter, R.D., P.A. Matrai, B. Javor, J. O'Brien (1989). Reduced sulfur compounds in the marine environment. Analysis by high-performance liquid chromatography. *In*: E.S. Saltzman, W.J. Cooper (eds.). *Biogenic sulfur in the environment. ACS Symposium Series 393*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 243-261.
- Vismann, B. (1990). Sulfide detoxification and tolerance in *Nereis (Hediste) diversicolor* and *Nereis (Neanthes) virens* (Annelida: Polychaeta). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **59**: 229-238.
- Vismann, B. (1991a). Physiology of sulfide detoxification in the isopod *Saduria (Mesidothea) entomon*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **76**: 283-293.
- Vismann, B. (1991b). Sulfide tolerance: physiological mechanisms and ecological implications. *Ophelia* **34**: 1-27.
- Völkel, S., M.K. Grieshaber (1992). Mechanisms of sulphide tolerance in the peanut worm, *Sipunculus nudus* (Sipunculidae) and in the lugworm, *Arenicola marina* (Polychaeta). *J. Comp. Physiol. B* **162**: 469-477.
- Völkel, S., M.K. Grieshaber (1994). Oxygen dependent sulfide detoxification in the lugworm *Arenicola marina*. *Mar. Biol.* **118**: 137-147.
- Völkel, S., M.K. Grieshaber (1996). Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*. Evidence for alternative electron pathways. *Eur. J. Biochem.* **235**: 231-237.
- Völkel, S., K. Hauschild, M.K. Grieshaber (1995). Sulfide stress and tolerance in the lugworm *Arenicola marina* during low tide. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **122**: 205-215.
- Vopel, K., J. Dehmlow, G. Arlt (1996). Vertical distribution of *Cletocamptus confluens* (Copepoda, Harpacticoida) in relation to oxygen and sulphide microprofiles of a brackish water sulphuretum. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **141**: 129-137.
- Weigelt, M. (1990). Oxygen conditions in the deep water of Kiel Bay and the impact of inflowing salt-rich water from the Kattegat. *Meeresforsch.* **33**: 1-22.
- Weigelt, M. (1991). Short- and long-term changes in the benthic community of deeper parts of Kiel Bay (Western Baltic) due to oxygen depletion and eutrophication. *Meeresforsch.* **33**: 197-224.
- Wetzel, M.A., P. Jensen, O. Giere (1995). Oxygen/sulfide regime and nematode fauna associated with *Arenicola marina* burrows: new insights in the thio-bios case. *Mar. Biol.* **124**: 301-312.

- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: A.J.B. Zehnder (ed.). Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, pp. 469-585.
- Windoffer, R., A. Jahn, F. Meyberg, O. Giere. Sulfide induced metal precipitations in the mantle edge of *Macoma balthica*. In Vorbereitung.
- Zebe, E. (1982). Anaerobic metabolism in *Upogebia pugettensis* and *Callianassa californiensis* (Crustacea, Thalassinidea). Comp. Biochem. Physiol. **72B**(4): 613-617.
- Zebe, E., U. Salge, C. Wiemann, H. Wilps (1981). The energy metabolism of the leech *Hirudo medicinalis* in anoxia and muscular work. J. Exp. Zool. **218**: 157-163.
- ZEIT (1996). Faulendes Watt. DIE ZEIT **26**, 21.6.96: 35.
- Zimmermann, S., R.G. Hughes, H.J. Flügel. Vertical distribution patterns of nematode populations. An assessment of the role of oxygen and sulphide as limiting factors. In Vorbereitung.
- Zimmermann, S., A. Jahn (1996). *In vivo* measurements of the internal and intracellular pH-regime in selected marine invertebrates exposed to ambient sulphidic conditions using microelectrodes. In: M.K. Grieshaber, U. Fischer (eds.). Abstracts and program of the workshop on processes and structures in marine methane and sulfide biotopes. Winterscheid, Germany, Sept. 22-26 1996. Shaker Verlag, Aachen, pp. 58-59.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

- Jahn, A., I. Gamenick, H. Theede (1996). Physiological adaptations of *Cyprideis torosa* (Crustacea, Ostracoda) to hydrogen sulphide. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **142**: 215-223.
- Jahn, A., H. Theede, R. Oeschger (1993). Unterschiedliche Fähigkeiten zur Schwefelwasserstoffentgiftung bei Populationen von *Macoma balthica*. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **86.1**: 94.
- Theede, H., A. Jahn, R. Oeschger, K. Tschischka (1996). Adaptation of selected marine invertebrates to hydrogen sulphide. *In*: M.K. Grieshaber, U. Fischer (eds.), Abstracts and program of the workshop on processes and structures in marine methane and sulfide biotopes, Winterscheid, Germany, Sept. 22-26 1996. Shaker Verlag, Aachen, pp. 46-48.
- Theede, H., R. Oeschger, A. Jahn (1995). Adaptive responses of marine benthic invertebrates to hydrogen sulphide. *In*: A. Eleftheriou, A.D. Ansell, C.J. Smith (eds.), Biology and ecology of shallow coastal waters. Proceedings of the 28th European Marine Biology Symposium, Iraklio, Crete, 1993. Olsen & Olsen, Fredensborg, pp. 149-152.
- Windoffer, R., A. Jahn (1994). Morphologische und physiologische Untersuchungen zur H₂S-Toleranz von *Macoma balthica* (Bivalvia, Tellinidae). *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **87.1**: 209.
- Windoffer, R., A. Jahn (1995). Untersuchungen zur Sulfidtoleranz von *Macoma balthica*. *BODDEN* **2**: 235-238.

Im Druck bzw. in Vorbereitung sind folgende Arbeiten:

- Gamenick, I., A. Jahn, K. Vopel, O. Giere (1996). Hypoxia and sulphide as structuring factors in a macrozoobenthic community at the shore of the Baltic Sea: colonisation studies and tolerance experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, im Druck.
- Jahn, A., U. Janas, H. Theede, A. Szaniawska. Influence of hydrogen sulphide on *Macoma balthica* in the Gulf of Gdańsk. In Vorbereitung.
- Jahn, A., H. Theede. Different capacities of hydrogen sulphide tolerance in populations of *Macoma balthica* (Bivalvia). In Vorbereitung.
- Theede, H., R. Oeschger, A. Jahn (1996). Reactions of sublittoral marine invertebrates of the Baltic Sea to hydrogen sulphide and hypoxia. *In*: Proceedings of 13th Baltic Marine Biologists Symposium, Riga 1993; im Druck.
- Windoffer, R., A. Jahn, F. Meyberg, O. Giere. Sulfide induced metal precipitations in the mantle edge of *Macoma balthica*. In Vorbereitung.

Summary

Marine benthic species, living in sulphidic habitats, show species-specific degrees of sulphide tolerance. If oxygen is available, they are able to detoxify penetrated hydrogen sulphide by oxidation to non-toxic thiosulphate in different ways. Production of sulphite and elemental sulphur is of minor importance.

Different degrees of sulphide tolerance exist not only at the species level but can also be found at the population level. Specimens of the Baltic clam *Macoma balthica* from sulphidic habitats show distinct higher survival capacities during sulphide exposure than those from low sulphide contaminated environments. However, at hypoxic-sulphidic incubations, specimens of the populations do not differ in their tolerances. Different sulphide tolerances are not based on production of sulphide insensitive enzymes of the oxidative metabolism. As in other species, cytochrome *c* oxidase and catalase of the studied populations are sulphide sensitive. However, enzymes of (anaerobic) energy metabolism such as malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase are not influenced by hydrogen sulphide.

The rate of sulphide influx is crucial for sulphide tolerance. Sulphide diffusion into the tissues can be reduced, at least temporary, by valve closure or by precipitation reactions within the epidermis.

The rate at which sulphide diffuses can be described by the apparent diffusion coefficient for total sulphide D which is calculated from the effective radius of the animal r_e and the half-saturation time τ :

$$D = \frac{r_e^2}{3 \tau}$$

Sulphide-sensitive specimens of the clam *Macoma balthica* from low sulphidic habitats have sulphide diffusion coefficients which are roughly twice as high as sulphide tolerant specimens. Higher sulphide influx rate will negatively effect the metabolism, combined with a longer inhibition of cytochrome *c* oxidase, resulting in a higher mortality.

Sulphide concentration within the tissues depends on the ratio of the rates of sulphide diffusion and sulphide detoxification. For a given external sulphide concentration c_0 , an equilibrium between diffusion and detoxification will be established at a certain internal sulphide concentration c_i :

$$c_i = c_0 e^{-kr_0^2/3D}$$

In this equation the apparent detoxification constant k describes the velocity of sulphide detoxification.

For an given diffusion coefficient and detoxification constant, internal sulphide concentration depends on the radius, and therefore on the size, of the animal. This size dependence of sulphide detoxification could be demonstrated experimentally with different size classes of *Macoma balthica*. Whereas only low internal sulphide concentration can be found in large clams after specific sulphide incubations, small ones contain much more sulphide in the tissues. Thus, an efficient sulphide detoxification seems impossible if the body size falls below a certain size threshold (about macrofauna/meiofauna).

The ostracod *Cyprideis torosa* shows an extraordinarily high tolerance to hydrogen sulphide and oxygen deficiency. Although the sulphide diffusion coefficient can be reduced by temporary valve closure, as happens in *Macoma balthica*, and a high capacity for sulphide oxidation, sulphide penetrates very quickly into the tissues due to the small body size (about 1 mm length). Thus, the animals are not able to detoxify hydrogen sulphide effectively.

When environmental conditions improve *Cyprideis torosa* is able to eliminate penetrated sulphide. Probably, commensalic bacteria are involved in the elimination of the oxidation product thiosulphate.

During high sulphide contamination *Cyprideis torosa* changes to anaerobiosis, as does *Macoma balthica*, even under oxic conditions. Due to this high tolerance to oxygen deficiency the ostracod can survive for extremely long periods, even if the oxidative metabolism is blocked. This high capacity of long-term anaerobiosis is one of the most important prerequisites for colonisation of sulphidic habitats.

List of figures and tables

Fig. 1. *Macoma balthica*. (Dorum-Neufeld)

Fig. 2. *Cyprideis torosa*. scanning electron microscopic micrograph, scale 100 μm (photograph: R. Windoffer)

Fig. 3. Maps of sampling stations: (a) survey: (1) Dorum-Neufeld, (2) Kiel Bight, (3) Hiddensee, (4) Gulf of Gdańsk, and (5) Boiensdorf (based on sea map No. 2613 "North and Baltic Sea", original scale 1:2,100,000, reduction to 42%, by authorization of Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie - 8095.01/96 Z1102)

(b) Dorum-Neufeld (based on topographical map 2217 "Nordholz", original scale 1:25,000, reduction to 42%, by authorization of Niedersächsisches Landesverwaltungsamt -Landvermessung- B4-659/96)

(c) Hiddensee (based on topographical maps N-33-51-A-c "Hiddensee" and N-33-51-A-d "Schaprode", original scale 1:25,000, reduction to 42%, by authorization of Landesvermessungsamt Mecklenburg-Vorpommern, 21.8.96)

(d) Boiensdorf (based on topographical map N-32-72-C-c "Boiensdorf", original scale 1:25,000, reduction to 42%, by authorization of Landesvermessungsamt Mecklenburg-Vorpommern, 21.8.96)

Fig. 4. Scheme of used pore water sampler. For further explanation see text

Fig. 5. Schematic diagram of experimental set-up for oxic-sulphidic incubations. Animals were set in the flow-through chamber, which was connected via peristaltic pumps to oxygenated seawater and a sulphide stock solution. In order to measure sulphide and oxygen concentration, samples could be taken before and after the chamber.

Fig. 6. Chromatographic separation of multi-standard mixture ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ respectively 20 nmol per thiole) with gradient of solvents. Further details see Tab. 1

Fig. 7. Chromatographic separation of elemental sulphur (25 nmol S_8). Solvent: methanol-chloroform (50:50); injection: 20 μl ; flow rate: $1.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; column: PRP-1 $150\times 4.1 \text{ mm}$ with ODS-1-5 μ precolumn; wavelength: 254 nm

Fig. 8. Concentration of hydrogen sulphide in the pore water of the sediment of the sampling stations Hiddensee (23. 8. 1992 and 8. 12. 1992) and Gulf of Gdańsk (62-m-station; 5. 9. 1994)

Fig. 9. *Macoma balthica*, populations from the Kiel Bight (22‰S), Dorum-Neufeld (22‰S), Gulf of Gdańsk (9‰S), and Hiddensee (9‰S). Survival capacity after (a) hypoxia, (b) hypoxic incubation with $100 \mu\text{M H}_2\text{S}$, and (c) oxic incubation with $100 \mu\text{M H}_2\text{S}$ (10°C). (The scheme of the animal from this and the following figures derived from Stresemann 1992)

Fig. 10. *Macoma balthica*, populations from the Kiel Bight and Dorum-Neufeld. Survival capacity under oxic conditions after adaptation of the animals to a stepwise increasing sulphide content over two weeks (10°C ; 22‰S)

Fig. 11. *Macoma balthica*, populations from the Gulf of Gdańsk and Hiddensee. Survival capacity after oxic incubation with $100 \mu\text{M H}_2\text{S}$ (10°C ; 9‰S). Specimens were studied immediately after capture from their sulphidic habitat as well as after adaptation to a sulphide-free medium for at least three months (from Theede *et al.* 1995).

Fig. 12. *Macoma balthica*. (a) Scheme of mantle edge. (b) Inner epidermis of mantle edge with electron dark inclusions within epidermis cells, basal matrix, and amoebocytes; scale 2 μm (from Windoffer *et al.*, in prep.)

Fig. 13. *Macoma balthica*, Hiddensee. (a) electron dark inclusions (\rightarrow) within inner epidermis cell; (b) electron dark inclusions (\rightarrow) in basal matrix; (c) electron dark inclusions (\rightarrow) within amoebocyte; (d) electron dark inclusions (\rightarrow) in process of amoebocyte; scale 1 μm ; am: amoebocyte; ma: basal matrix; mv: microvilli (from Windoffer *et al.*, in prep.)

Fig. 14. *Macoma balthica*, Hiddensee. (a-c) Proceeding condensation of electron dark granula in amoebocytes of the mantle edge; scale 0.5 μm (from Windoffer *et al.*, in prep.)

Fig. 15. *Macoma balthica*, Hiddensee. Concentration of (a) copper, (b) iron, and (c) sulphur in $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation of different tissues after oxalic and sulphidic incubation (100 - 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$; n=3; from Windoffer *et al.*, in prep.)

Fig. 16. *Macoma balthica*, populations from the Kiel Bight, Dorum-Neufeld, Gulf of Gdańsk, and Hiddensee. Concentration of (a) sulphide and (b) thiosulphate in the tissues after hypoxic incubation with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$. For further details such as standard deviation, number of values, and significant differences see Tab. 6

Fig. 17. *Macoma balthica*, populations from the Kiel Bight, Dorum-Neufeld, Gulf of Gdańsk, and Hiddensee. Concentration of (a) sulphide and (b) thiosulphate in the tissues after oxalic incubation with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$. For further details such as standard deviation, number of values, and significant differences see Tab. 6

Fig. 18. *Macoma balthica*, Gulf of Gdańsk. Determination of half-saturation time τ . Data from oxalic incubations with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$. For further explanation see text

Fig. 19. *Macoma balthica*, Gulf of Gdańsk. Dependence of internal sulphide equilibrium concentration c_i from effective radius r_e . Data from oxalic incubations with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$. For further explanation see text

Fig. 20. *Macoma balthica*, Gulf of Gdańsk. Concentration of sulphide and thiosulphate in the tissues after one day of oxalic incubation with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$ (10°C; 9‰S) of three different size classes in nmol g^{-1} fresh mass + standard deviation (number of values). *: Significant difference to control ($p \leq 0.05$)

Fig. 21. *Macoma balthica*, populations from (a) the Kiel Bight and Dorum-Neufeld (22‰S) and (b) the Gulf of Gdańsk and Hiddensee (9‰S). Specific activity of cytochrome c oxidase after oxalic incubation with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$ (10°C) in U mg^{-1} protein \pm standard deviation

Fig. 22. *Macoma balthica*, populations from the Kiel Bight and Dorum-Neufeld. Recovery of specific activity of cytochrome c oxidase. Animals were incubated with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$ under oxalic conditions and further kept without sulphide (10°C; 22‰S).

Fig. 23. *Macoma balthica*, populations from (a) Kiel Bight, (b) Dorum-Neufeld, (c) Gulf of Gdańsk, and (d) Hiddensee. Concentration of succinate in the tissues after hypoxia as also hypoxic incubation with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$ and oxalic incubation with 200 $\mu\text{M H}_2\text{S}$. For further details such as standard deviation, number of values, and significant differences see Tab. 10

Fig. 24. *Cyprideis torosa*. Survival capacity after hypoxia as well as after hypoxic incubation with 1 mM H₂S and 1.8 mM H₂S (16°C; 14‰S; n=5 with 20 animals each; from Garnenick *et al.* 1996; the scheme of the animal from this and the following figures derived from Sars 1925)

Fig. 25. *Cyprideis torosa*. Concentration of (a) sulphide and (b) thiosulphate in the tissues after hypoxic and oxic incubation with 1 mM H₂S. For further details such as standard deviation, number of values, and significant differences see Tab. 11 (from Jahn *et al.* 1996)

Fig. 26. *Cyprideis torosa*. Concentration of (a) sulphide and (b) thiosulphate in the tissues after hypoxic incubation with 1 mM H₂S (16°C; 14‰S) without and with antibiotics (chloramphenicol, gentamycin, streptomycin; 10 mg·ml⁻¹ each) in nmol·g⁻¹ fresh mass ± standard deviation (from Jahn *et al.* 1996)

Fig. 27. *Cyprideis torosa*. Concentration of sulphide and thiosulphate in the tissues after hypoxic incubation with 1 mM H₂S (16°C; 14‰S) for one day and subsequent incubation with normoxic seawater in nmol·g⁻¹ fresh mass ± standard deviation (from Jahn *et al.* 1996)

Fig. 28. *Cyprideis torosa*. Concentration of succinate in the tissues after normoxic (283 μM O₂), oxic (198 μM O₂), oxic-sulphidic (198 μM O₂ + 1 mM H₂S), and hypoxic (O₂ < 1 μM) incubation for one day (16°C; 14‰S) in μmol·g⁻¹ fresh mass + standard deviation (n=3 with 300 animals each). *: Significant difference to oxic incubation, #: significant difference to hypoxic incubation (p≤0.05; from Jahn *et al.* 1996)

Fig. 29. Adaptation mechanisms of marine invertebrates to hydrogen sulphide. For explanation see text

Fig. 30. *Macoma balthica*. Influx (long) and efflux siphon (short), protruded from sediment. Herewith, the clams can extract fresh, oxygenated water, even at high sulphide contamination of the sediment.

Tab. 1. Separation conditions for HPLC analysis of reduced sulphur compounds.

Solvent A: 0.25% acetic acid (pH 4.0)

Solvent B: methanol

Injection: 20 μl

Flow rate: 0.7 ml·min⁻¹

Column: 250x4 Spherisorb C18-1 5μ with ODS-1-5μ precolumn

Excitation: 380 nm

Emission: 480 nm

Tab. 2. Concentration of hydrogen sulphide (minimum - maximum) in the pore water at 5 cm sediment depth as also oxygen content and salinity of the water column. For geographical position of sampling stations see Fig. 3

Tab. 3. Concentration of hydrogen sulphide in the pore water of sediment at the sampling station Hiddensee in 1992 through 1995, single values in μmol·l⁻¹

Tab. 4. *Macoma balthica*, Hiddensee. Concentration of calcium, copper, iron, sulphur, and zinc in μg·g⁻¹ fresh mass in foot and mantle edge of freshly captured animals (from Windoffer *et al.*, in prep.)

Tab. 5. *Macoma balthica*, Hiddensee. Concentration of sulphide, thiosulphate, and sulphite in the tissues of freshly captured clams in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation (number of values). *: Significant difference to oxic control ($p\leq 0.05$, cp. Tab. 6d)

Tab. 6a. *Macoma balthica*, Kiel Bight. Concentration of sulphide, thiosulphate, sulphite, glutathion, and elemental sulphur in the tissues after hypoxic and oxic incubation with $200\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ (10°C , 22‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation (number of values). *: Significant difference to control ($p\leq 0.05$)

Tab. 6b. *Macoma balthica*, Dorum-Neufeld. Concentration of sulphide, thiosulphate, sulphite, glutathion, and elemental sulphur in the tissues after hypoxic and oxic incubation with $200\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ (10°C , 22‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation (number of values). *: Significant difference to control ($p\leq 0.05$)

Tab. 6c. *Macoma balthica*, Gulf of Gdańsk. Concentration of sulphide, thiosulphate, sulphite, glutathion, and elemental sulphur in the tissues after hypoxic and oxic incubation with $200\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ (10°C , 9‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation (number of values). *: Significant difference to control ($p\leq 0.05$)

Tab. 6d. *Macoma balthica*, Hiddensee. Concentration of sulphide, thiosulphate, sulphite, glutathion, and elemental sulphur in the tissues after hypoxic and oxic incubation with $200\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ (10°C , 9‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation (number of values). *: Significant difference to control ($p\leq 0.05$)

Tab. 7. *Macoma balthica*, populations from the Kiel Bight, Dorum-Neufeld, Gulf of Gdańsk, and Hiddensee. Calculation of the apparent diffusion coefficients and the detoxification constants. Data from oxic incubations with $200\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ (10°C , 9 and 22‰S respectively, pH 8.0). For further explanation see text

Tab. 8. *Macoma balthica*, populations from Kiel Bight, Dorum-Neufeld, Gulf of Gdańsk, and Hiddensee. Sulphide inhibition constant K_1 of cytochrome *c* oxidase. Values are sulphide concentrations in $\mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ which lead to 50% inhibition ($n=3$ with various measurements between 0.1 and $5\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ each).

Tab. 9. *Macoma balthica*, *Halicryptus spinulosus*, *Hediste (Nereis) diversicolor*, *Heteromastus filiformis*, and *Pherusa plumosa*. Activity of catalase and sulphide inhibition constant K_1 . Values represent reaction constant k in $\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein respectively enzyme activity in $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein \pm standard deviation as well as sulphide concentrations in $\text{mM}\ \text{H}_2\text{S}$ which lead to 50% inhibition of catalase (number of values)

Tab. 10. *Macoma balthica*, populations from the Kiel Bight, Dorum-Neufeld, Gulf of Gdańsk, and Hiddensee. Concentration of succinate in the tissues after hypoxia as well as hypoxic incubation with $200\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ and oxic incubation with $200\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{S}$ (10°C ; 22 respectively 9‰S) in $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation (number of values). *: Significant difference to control ($p\leq 0.05$)

Tab. 11. *Cyprideis torosa*. Concentration of sulphide, thiosulphate, sulphite, and glutathion in the tissues after hypoxic and oxic incubation with $1\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{S}$ (16°C ; 14‰S) in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh mass \pm standard deviation (number of values with 100 animals each). *: Significant difference to control, #: significant difference between hypoxic and oxic incubation ($p\leq 0.05$)

Tab. 12. *Cyprideis torosa*. Determination of fresh, dry, and valve masses. Animals were weighed (a), dried at 60°C for one day and weighed anew (b), subsequently combusted at 550°C and weighed again (c). Fresh and dry masses without valves can be calculated from the differences (a-c and b-c respectively).