

H. AUGUSTIN, W. FOISSNER und R. BAUER

Institut für Zoologie der Universität Salzburg, Salzburg

Die Zählung von Protozoen und kleinen Metazoen im Belebtschlamm

Summary: A method for the estimation of the abundance of protozoa and small metazoa in activated sludge is described. $5 \times 10 \mu\text{l}$ of activated sludge are counted in vivo microscopically using a Thoma-Counting-Chamber and a magnification of 100:1. The efficiency of this counting method was tested by "recovery" experiments. 46–100 % of the ciliates (mean 85 %, $n=165$ countings) were recovered. A positive correlation between body size and percentage of recovery could be found. Preliminary experiments showed that the method is suitable for nematodes (recovery 95 %, $n=10$), rotators (recovery 84 %, $n=10$) and testate amoebae (recovery 78 %, $n=10$), too. The described method is independent of the sludge-structure, is easy to handle and is an acceptable compromise between time spent and necessary degree of accuracy.

Neben den Bakterien sind die Protozoen die abundanz- und artenmäßig am stärksten vertretene Organismengruppe im Belebtschlamm (CURDS; CURDS and HAWKES). Ihre Häufigkeit wird durch Zählung der in einem bestimmten Volumen enthaltenen Individuen ermittelt. Die auf diese Weise erhobenen Abundanzen sind sicherlich von den Zählbedingungen abhängig, zum Beispiel von der Menge des ausgezählten Belebtschlammes, von der Genauigkeit des Bearbeiters, von der verwendeten mikroskopischen Vergrößerung und nicht zuletzt von den zu zählenden Objekten selbst. Kleine Arten werden erwartungsgemäß öfter übersehen werden als große, und langsam kriechende bleiben wohl eher unbemerkt als rasch bewegliche.

In der Literatur sind nur wenige Abundanzangaben über Protozoen im Belebtschlamm zu finden (BARK; BICK; BUCK; CURDS; KLIMOWICZ 1970, 1972; SCHERB; SYDENHAM). Die Zählungen erfolgten auf unterschiedliche Weise, da verschiedene Zählkammern (z. B. Sedgewick-Rafter-Kammer, Kolkwitz-Kammer, Fuchs-Rosenthal-Modifikation eines Haemocytometers), unterschiedliche Volumina und fixiertes beziehungsweise unfixiertes Material verwendet wurden. Außerdem sind die Zählresultate mit wenigen Ausnahmen (SYDENHAM) offensichtlich Einzelwerte und daher einer statistischen Behandlung nicht zugänglich. In manchen Arbeiten fehlen überhaupt Angaben zur Methodik, keine ist bisher auf ihre Effektivität geprüft worden. Ein Vergleich der Zählresultate ist deshalb nur sehr beschränkt möglich. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode soll diese Mängel beseitigen. Als Kriterium für die Effektivität wurde die Wiederfundrate gewählt, da dies der beste Weg zu sein scheint, die Präzision einer Zählmethode zu testen (FOISSNER 1983, 1987).

Zählmethode

Beschreibung

10 μ l eines frischen, gut aufgeschüttelten Belebtschlammes wird mittels einer Pipette mit weiter Öffnung (Assipette-digital) auf eine Thoma-Zählkammerfläche aufgebracht (Abb. 1). Ein Deckglas (ca. 18 \times 18 mm) wird aufgelegt, wodurch sich der

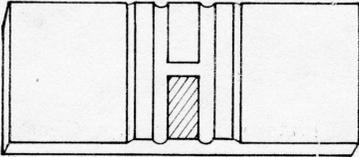


Abb. 1. Thoma-Zählkammer. Das gesamte schraffierte Feld wird ausgezählt. Es faßt bei korrekter Füllung 10 μ l Belebtschlamm.

Fig. 1. Thoma Counting Chamber. The whole hatched area is counted. Filled correctly, it has a capacity of 10 μ l activated sludge.

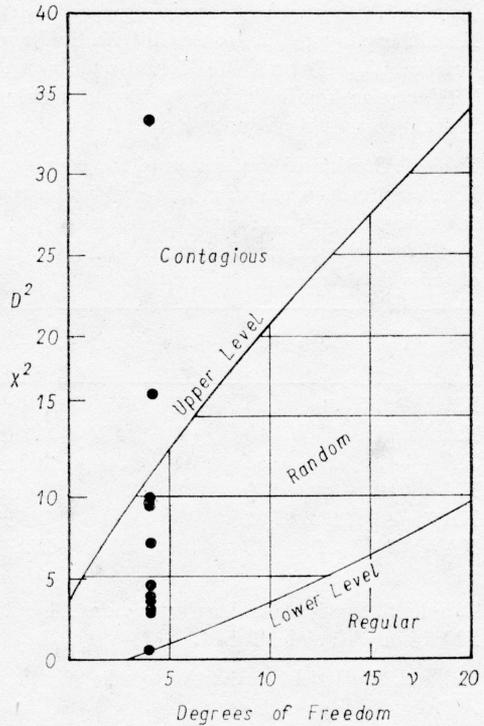
Belebtschlamm gerade über eine gesamte Zählkammerfläche (ca. 14,5 \times 7,0 mm, \approx 1 cm²) ausbreitet. Die Organismen der gesamten Zählkammerfläche werden *in vivo* bei 100facher Vergrößerung im Mikroskop ausgezählt. Die Zählung erfolgt, analog der Zählung von Blutkörperchen, indem man die gesamte Fläche durchrastert. Der ganze Vorgang wird 5mal wiederholt, wobei je 10 μ l Belebtschlamm aus jeweils separat gezogenen Proben verwendet werden, um Pseudoreplikation zu vermeiden. Sehr stark belebter Schlamm kann mit abzentrifugiertem Überstand desselben Schlammes z. B. 1:1 verdünnt werden. Die Zählung einer Probe (5 \times 10 μ l) beansprucht durchschnittlich zwei Stunden. Zusätzlich ist zweckmäßig, die Probe schon vor der Zählung durchzusehen und eine Artenliste zu erstellen, um nicht während des Zählvorgangs schwierige taxonomische Untersuchungen durchführen zu müssen. Der Zeitaufwand hierfür hängt von den taxonomischen Kenntnissen des Bearbeiters ab.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Zählungen folgt im wesentlichen KALBE und RECKNAGEL. Um zu prüfen, ob Varianz und Mittelwert einer Stichprobe aus Zählwerten annähernd gleich sind, wie es für die Poissonverteilung charakteristisch ist, wurde der Dispersionsindex $D^2 = \frac{s^2 (n - 1)}{\bar{x}}$ verwendet. Mittels χ^2 -Test wurde bei einer gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($\alpha = 0,05$) und 4 Freiheitsgraden getestet, ob die Zählungen einer Poissonverteilung entsprechen. Die kritischen χ^2 -Werte sind in diesem Fall $\chi_{0,975;4}^2 = 0,484 < D^2 < \chi_{0,025;4}^2 = 11,143$. Unterschreitet oder überschreitet D^2 die 5 % Signifikanzgrenzen von χ^2 , so deutet dies auf Abweichungen von der Poissonverteilung oder auf äußere Variabilitätsursachen hin (ELLIOTT; KALBE und RECKNAGEL). Gründe für solche Abweichungen können technische Mängel sein, die das Ergebnis unbrauchbar machen (z. B. keine hinreichend zufäl-

Abb. 2. Die 5 % Signifikanzgrenzen von χ^2 (nach ELLIOTT 1983). Wenn die D^2 -Werte zwischen den Signifikanzgrenzen liegen, wird Übereinstimmung mit Poissonverteilung bei 95 % Wahrscheinlichkeitsniveau ($\alpha < 0,05$) angenommen. Die eingetragenen D^2 -Werte (●) sind den Tab. 1 und 2 entnommen.

Fig. 2. The 5 % significance levels of χ^2 (after ELLIOTT 1983). If values of D^2 are between the significance levels agreement with Poisson series is assumed at 95 % probability level ($\alpha < 0.05$). The inserted values of D^2 (●) are taken from Tab. 1 and 2.



lige Verteilung der Zählobjekte) oder andere Verteilungen, nämlich bei hohem D^2 eine geklumpfte, bei niedrigem D^2 eine regelmäßige (Abb. 2). Erhöhte Dispersionsindizes können auch durch eine zu große Organismendichte verursacht sein, da mit ansteigender Partikeldichte eine zunehmende Abweichung von der Poissonverteilung auftritt (KALBE und RECKNAGEL). Mit Hilfe des Dispersionsindex lassen sich zweifelhafte Zählergebnisse aufspüren. Diese müssen, wenn sich keine plausible Erklärung für sie findet, verworfen werden.

Zur Berechnung der 95 %-Konfidenzintervalle für μ (= Mittelwert der Population) verwendeten wir die Formel $\bar{x} \pm t \cdot \sqrt{\frac{\bar{x}}{n}}$, wobei $t \approx 2,0$ als eine für praktische Zwecke ausreichend gute Näherung angesehen wurde (KALBE und RECKNAGEL). Die Summe $k = \sum_{i=1}^5 x_i$ der jeweiligen 5 Teilzählungen hat das 95 %-Konfidenzintervall $k \pm 2 \cdot \sqrt{k}$. Daraus ergeben sich die prozentualen Konfidenzgrenzen $f_{\max} = 2 \cdot \frac{100}{\sqrt{k}}$ (%). Die absoluten Konfidenzintervalle für \bar{x} berechnen sich aus $\bar{x} \cdot f_{\max}$ (%). Zur Berechnung der anderen statistischen Kenngrößen (z. B. Variationskoeffizient) siehe SACHS, LORENZ.

Ergebnisse

Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Gesamtabundanz der Ciliaten und die Abundanz der Art *Vorticella convallaria* (diese Art wurde ausgewählt, weil sie in allen angeführten Kläranlagen vorkam) im Belebtschlamm 6 verschiedener Kläranlagen (KA).

Tabelle 1. Statistische Auswertung der Ciliatenzönosen in 6 Belebtschlämmen. Abkürzungen: KA: Kläranlage; $x_1 \dots x_5$: Gezählte Individuen in je 10 μl ; $\sum k$: Summe der Individuen der 5 Zählungen; f_{max} : Prozentuale Konfidenzgrenzen; \bar{x} : Arithmetisches Mittel; CI: Konfidenzintervall; V: Variationskoeffizient; s : Standardabweichung; D^2 : Dispersionsindex; Ind/ml: Hochgerechnete Individuenzahlen pro ml.

Table 1. Statistical evaluation of the coenoses of ciliates in six activated sludges. Abbreviations: KA: clarification plant; $x_1 \dots x_5$: individuals counted in 10 μl each; $\sum k$: sum of individuals of the five counts; f_{max} : confidence limits (%); \bar{x} : arithmetical mean; CI: confidence interval; V: coefficient of variation; s : standard deviation; D^2 : dispersion index; Ind/ml: calculated numbers of individuals per ml.

	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	$\sum k \pm f_{\text{max}}$	$\bar{x} \pm 95\%$ CI	V %	s	D^2	Ind/ml \pm 95% CI
KA 1	312	350	323	406	373	$1764 \pm 5\%$	353 ± 17	11	38	16,4	$35280 \pm 5\%$
KA 2	71	53	49	43	65	$282 \pm 12\%$	56 ± 7	20	12	9,5	$5620 \pm 12\%$
KA 3	42	29	85	54	50	$260 \pm 12\%$	52 ± 6	40	21	33,2	$5200 \pm 12\%$
KA 4	248	190	219	199	204	$1060 \pm 6\%$	212 ± 13	11	23	9,7	$21200 \pm 6\%$
KA 5	46	26	32	43	38	$185 \pm 15\%$	37 ± 5	22	8	7,1	$3700 \pm 15\%$
KA 6	36	37	33	31	35	$172 \pm 15\%$	34 ± 5	7	2	0,7	$3440 \pm 15\%$

Tabelle 2. Statistische Auswertung der Abundanz von *Vorticella convallaria* in 6 Belebtschlämmen. Abkürzungen: siehe Tab. 1.

Table 2. Statistical evaluation of the abundance of *Vorticella convallaria* in 6 activated sludges. Abbreviations: see Tab. 1.

	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	$\sum k \pm f_{\text{max}}$	$\bar{x} \pm 95\%$ CI	V %	s	D^2	Ind/ml \pm 95% CI
KA 1	2	1	1	3	4	$11 \pm 60\%$	2 ± 1	59	1	3,1	$220 \pm 60\%$
KA 2	22	14	20	11	17	$84 \pm 22\%$	17 ± 4	26	4	4,7	$1680 \pm 22\%$
KA 3	4	4	5	8	9	$30 \pm 36\%$	6 ± 2	39	2	3,7	$600 \pm 36\%$
KA 4	17	6	12	13	5	$53 \pm 27\%$	11 ± 3	47	5	9,5	$1060 \pm 27\%$
KA 5	2	5	2	2	1	$12 \pm 58\%$	2 ± 1	63	2	3,8	$240 \pm 58\%$
KA 6	31	33	27	21	31	$143 \pm 17\%$	29 ± 5	17	5	3,2	$2860 \pm 17\%$

KA 1 und KA 4 waren gut belebt, KA 2, 3, 5 und 6 schwach. Die D^2 -Werte (Dispersionsindizes) lassen erkennen, daß in der Mehrzahl der Fälle Poissonverteilung vorliegt (Abb. 2). Bei der Zählung der Gesamtabundanz treten aber auch höhere D^2 -Werte auf, die sich folgendermaßen erklären: Bei KA 1 ist dafür die sehr hohe Abundanz ($\bar{x} = 353$ Ind/10 μl) auf der Zählfläche verantwortlich. Der hohe Dispersionsindex bei KA 3 hingegen ist darauf zurückzuführen, daß hier eine Klumpung durch koloniebildende peritriche Ciliaten (*Epistylis* sp.) vorliegt.

Belebtschlamm mit hoher Organismendichte sollte – um Poissonverteilung einigermaßen zu erreichen – entsprechend verdünnt werden. Für Proben mit einer stark geklumpten Verteilung (z. B. durch viele Koloniebildner, heterogene Flockenstruktur mit stark differierender Besiedlung) wäre unter Umständen für die exakte Schätzung der Abundanz und Berechnung des entsprechenden Konfidenzintervalls die Zugrundelegung einer negativen Binomialverteilung eher angebracht als Poissonverteilung.

Ein Vergleich der beiden Tabellen zeigt, daß die Konfidenzintervalle bei der Zählung der Gesamtabundanzen mit durchschnittlich $\pm 11\%$ viel enger sind als bei der Zählung einer einzelnen Art mit einem durchschnittlichen Konfidenzintervall von $\pm 37\%$. Der Variationskoeffizient ist bei der Zählung der Gesamtabundanz kleiner ($\bar{V} = 18\%$) als bei der Zählung einer einzelnen Art ($\bar{V} = 42\%$). Demzufolge ist die Genauigkeit der Punktschätzwerte \bar{x} bei der Erfassung der Gesamtabundanz höher als bei der Erfassung der Abundanzen einzelner Arten (LORENZ).

Die kumulierte Darstellung der Zählergebnisse dreier verschieden stark belebter Schlämme ergibt jeweils annähernd eine Gerade (Abb. 3). Dies deutet auf eine relativ homogene Verteilung der Zählobjekte hin. Auch bei Verwendung verschieden großer Teilproben ($5 \times 5 \mu\text{l}$, $5 \times 10 \mu\text{l}$, $5 \times 50 \mu\text{l}$) wird in jedem Fall eine homogene Verteilung angezeigt (Abb. 4). Meist reicht sowohl bei artenreichem als auch bei artenarmem Belebtschlamm die Untersuchung von 20 ... 40 μl Schlamm aus, um ein repräsentatives Artenspektrum zu erfassen (Abb. 5). Bei Verwendung verschieden großer Teilproben zeigt sich nämlich, daß die Erfassung des Artenspektrums mit nur $5 \times 10 \mu\text{l}$ großen Teilproben fast gleich gut gelingt wie mit $5 \times 50 \mu\text{l}$ großen Teilproben (Abb. 6). Hingegen werden bei Zählung von 5 Teilproben à 5 μl seltene Arten nicht mehr erfaßt (Abb. 6). Das Minimalareal wird nicht mehr erreicht.

Wie die Ergebnisse bei der Untersuchung von $10 \times 5 \mu\text{l}$ oder von $10 \times 10 \mu\text{l}$ ausfallen, wurde bisher nicht getestet, da eine derartige Erhöhung der Probenzahl eine für praktische Zwecke unverhältnismäßige Erhöhung des Aufwands darstellen würde. Um Pseudoreplikation zu vermeiden, müßten nämlich dann 10 getrennte Proben gezogen und getrennt ausgezählt werden, was neben dem höheren Zählaufwand eine Verdoppelung des Manipulationsaufwandes bedingen würde.

Überprüfung der Zählmethode mit „Wiederfund-Experimenten“

Experimentelles Design

Das Prinzip dieser Experimente ist, eine bekannte Anzahl von Individuen in eine bestimmte Menge Belebtschlamm zu geben und anschließend zu zählen, wie viele der Organismen wieder gefunden werden. Die Methode erlaubt somit eine Abschätzung des absoluten Fehlers. Dabei ist notwendig, die Zählbedingungen der Praxis möglichst exakt nachzuahmen. Die „Recovery“-Organismen müssen in einen von den zu zählenden Organismen freien, sonst aber unveränderten Schlamm gebracht werden. Dies gewährleistet folgende Vorgangsweise:

- 2 Zentrifugenröhrchen mit einer 4 ml- und einer 8 ml-Marke versehen.
- Je 8 ml gut durchmischten, aufgeschüttelten Belebtschlamm in die beiden Zentrifugenröhrchen füllen.
- Zum Abtöten der Organismen 2 ml Diethylether dazugeben (Verhältnis Schlamm : Äther = 4 : 1).
- Belebtschlamm-Diethylether-Gemisch gut durchschütteln und anschließend zentrifugieren.
- Diethylether und Überstand des Schlammes bis zur 4 ml-Marke abpipettieren. (Falls sich auch an der Oberfläche – am Meniskus – eine Schlammschicht abgesetzt hat, diesen Schlamm nicht abpipettieren, sondern die Pipette knapp unter diese Schlammschicht einführen).
- Restlichen Schlamm (4 ml; dieser ist jetzt doppelt konzentriert!) gut durchschütteln und in ein Gefäß mit weiter Öffnung (Petrischale) gießen, damit verbliebener Diethylether abdampfen kann (1 ... 2 Stunden).

- „Recovery“-Organismen (z. B. 50 Individuen einer bestimmten Art) mit einer Glasmikropipette auf eine Zählfläche der Thoma-Kammer bringen. Dabei wird darauf geachtet, daß die endgültige Größe des Wassertropfens, der sämtliche „Recovery“-Organismen der jeweiligen Zählung enthält, möglichst genau 5 µl beträgt. Als Vergleichsmaß wird zu diesem Zweck ein exakt 5 µl großer Wassertropfen auf einen Objektträger pipettiert.
- 5 µl des mit Diethylether behandelten, doppelt konzentrierten Schlammes mit einer Dosierpipette mit weiter Öffnung (Assipette-digital) auf die Zählfläche der Thoma-Kammer neben den Tropfen mit den „Recovery“-Organismen pipettieren.
- Beide Tropfen mit einer Präpariernadel gut vermischen. (Der Schlamm erreicht damit wieder seine ursprüngliche Konzentration).
- Deckglas (ca. 18 × 18 mm) auflegen. Wenn die Tropfengröße annähernd 2 × 5 µl betragen hat, ist das gesamte etwa 14,5 × 7,0 mm große Feld der Thoma-Zählkammer mit Flüssigkeit gerade ausgefüllt.
- Auszählen der Individuen im gesamten Zählfeld wie beschrieben.

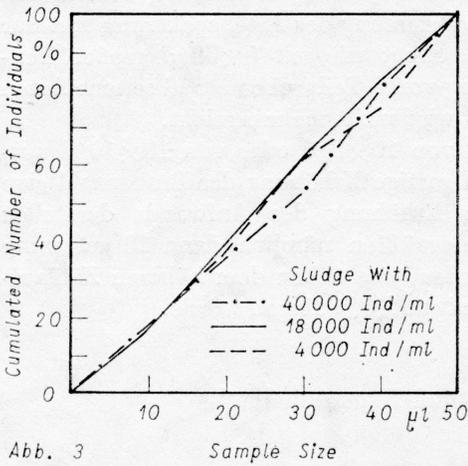


Abb. 3

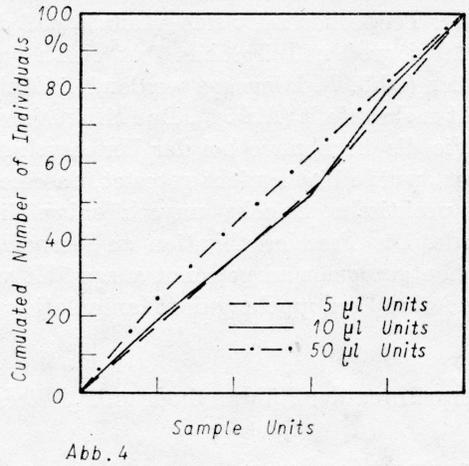


Abb. 4

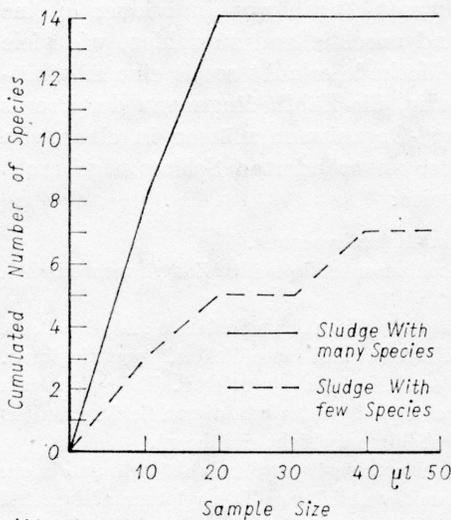


Abb. 5

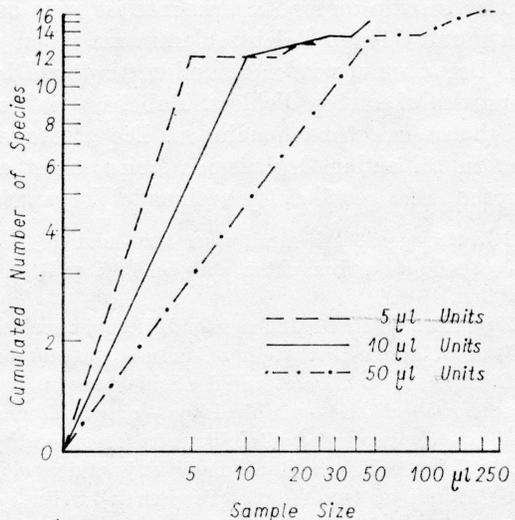


Abb. 6

Der ganze Vorgang von Punkt 7 bis 11 wird je 5mal wiederholt. Um zu prüfen, ob die gleichzeitige Zählung verschiedener Arten das Ergebnis beeinflusst, wurden zwei verschiedene Typen von Experimenten durchgeführt. (1) Einzel-Art-Experimente, bei denen je 50 Individuen nur einer einzigen Art verwendet wurden und (2) Mehr-Arten-Experimente, bei denen unterschiedlich viele Individuen mehrerer Arten dem Belebtschlamm zugefügt und gezählt wurden. Die Zahl der verwendeten Individuen der einzelnen Arten richtete sich hierbei nach deren Abundanzen im jeweils verwendeten Belebtschlamm und betrug mindestens 4 und höchstens 15 Individuen (durchschnittlich 9,5 Individuen) pro Taxon. Es wurden pro Experiment zwischen 3 und 7 Taxa (durchschnittlich 4,7) verwendet.

Verwendete Taxa

Ciliophora: *Acineria uncinata* TUCOLESCO (durchschnittliche Größe 41 μm); *Aspidisca cicada* (O. F. MÜLLER) (33 μm); *Carchesium polypinum* (LINNAEUS) (834 μm); *Cinetochilum margaritaceum* (EHRENBERG) (27 μm); *Dexiostoma* (früher: *Colpidium*) *campyla* (STOKES) (52 μm); *Colpidium colpoda* (LOSANA) (84 μm); *Euplotes aediculatus* PIERSON (126 μm); *Euplotes affinis* (DUJARDIN) (53 μm); *Holosticha* sp.

Abb. 3. Test auf homogene Verteilung der Ciliaten. Aus 3 verschieden stark belebten Schlämmen wurden jeweils 5 Teilproben zu je 10 μl ausgezählt. Die kumulierten Individuenzahlen (5 \times 10 μl) ergeben gerade Linien, was auf eine homogene Verteilung hindeutet.

Fig. 3. Test for homogeneous distribution of the ciliates. Sample units of 10 μl from 3 differently crowded activated sludges were investigated. The cumulated numbers (5 \times 10 μl) give straight lines, indicating a homogeneous distribution.

Abb. 4. Test auf homogene Verteilung der Ciliaten eines Belebtschlammes. Je 5 Teilproben mit 5 μl , 10 μl und 50 μl wurden ausgezählt. Die kumulierten Individuenzahlen ergeben gerade Linien. Dies zeigt eine homogene Verteilung an.

Fig. 4. Test for homogeneous distribution of the ciliates in an activated sludge. Five sample units of 5 μl , 10 μl and 50 μl , respectively, were counted. The cumulated numbers give straight lines, indicating a homogeneous distribution.

Abb. 5. Kumulierte Artenzahl der Ciliaten in 2 unterschiedlich stark besiedelten Belebtschlämmen. Das Diagramm zeigt, daß 2 bis 4 Zählungen von je 10 μl großen Teilproben zum Erreichen des Kurvenplateaus und damit zur Erfassung eines Großteils der im jeweiligen Schlamm vorkommenden Arten genügen.

Fig. 5. Cumulated number of ciliate species in 2 differently colonized activated sludges. The diagram shows that 2 to 4 countings of 10 μl sample units are usually enough to reach the plateau of the curve, and thus to record most of the species present in these sludges.

Abb. 6. Kumulierte Artenzahl der Ciliaten in verschieden großen Schlammengen (5 \times 5 μl , 5 \times 10 μl , 5 \times 50 μl). Die Anzahl der festgestellten Arten hängt von der Probengröße ab. Es genügt jedoch die Zählung von 5 \times 10 μl , um einen Großteil (94 %) der in 250 μl festgestellten Arten zu finden.

Fig. 6. Cumulated number of ciliate species in various volumes (5 \times 5 μl , 5 \times 10 μl , 5 \times 50 μl) of activated sludge. The number of species recorded depends on the sample size. However, counting of 5 \times 10 μl is sufficient to detect most (94 %) of the species found in 250 μl .

(141 μm); *Litonotus crystallinus* (VUXANOVICI) (105 μm); *Microthorax transversus* FOISSNER (29 μm); *Paramecium aurelia*-Komplex (*P. aurelia* O. F. MÜLLER) (114 μm); *Spirostomum minus* (ROUX) (748 μm); *Spirostomum teres* CLAPARÈDE und LACHMANN (359 μm); *Tetrahymena pyriformis*-Komplex [*T. pyriformis* (EHRENBERG)] (29 μm); *Thigmogaster* sp. (28 μm); *Tokophrya quadripartita* (CLAPARÈDE und LACHMANN) (165 μm); *Trochilia minuta* (ROUX) (24 μm); *Vorticella convallaria* (LINNAEUS) (331 μm); *Vorticella* sp. (93 μm). Testacea: *Centropyxis* sp. (81 μm); *Trinema lineare* PENARD (32 μm). Rotatoria: Verschiedene Taxa (188 μm). Nematoda: Verschiedene Taxa (315 μm).

Alle biometrischen Daten basieren auf der Messung von je 10 Individuen. Bei *Carchesium polypinum* bezieht sich die Größenangabe auf die gesamte Kolonie, bei *Tokophrya quadripartita*, *Vorticella convallaria* und *Vorticella* sp. auf das Zooid samt Stiel.

Wiederfundraten

Ciliophora: Die höchsten durchschnittlichen Wiederfundraten wurden bei den großen und sehr mobilen Arten *Euplotes aediculatus* (100 %), *Carchesium polypinum* (100 %) und *Paramecium aurelia* (98 %) festgestellt (Abb. 7, 8, 10). Wiederfundraten von über 100 % können dadurch entstehen, daß insbesondere sehr mobile Arten mehrfach gezählt werden. Offensichtlich aber ist, daß die starke Mobilität der Organismen keinen wesentlichen statistischen Einfluß auf die Zählung nimmt, da sich jeweils etwa gleich viele Organismen in das Gesichtsfeld hinein- und hinausbewegen. Die geringsten mittleren Wiederfundraten lagen um 50 %, und zwar bei den sehr kleinen, wenig beweglichen Arten *Trochilia minuta* (46 %) und *Thigmogaster* sp. (54 %) jeweils im Mehr-Arten-Experiment. Im Einzel-Art-Experiment war *Litonotus crystallinus* mit 72 % die Species mit der geringsten Wiederfundrate (Abb. 10). Sie neigt dazu, sich an Schlammflocken anzuschmiegen. Die durchschnittliche Wiederfundrate der 11 Arten im Einzel-Art-Experiment betrug 91 ± 11 %, das heißt, die Zählwerte liegen bei dieser Verfahrensweise rund 10 % unter den tatsächlichen Abundanzwerten. Beim Mehr-Arten-Experiment war die durchschnittliche Wiederfundrate der 13 verwendeten Arten 77 ± 22 %, was einer etwa 20 %igen Unterschätzung der tatsächlichen Abundanz entspricht. Die durchschnittliche Wiederfundrate aller Wiederfund-Experimente bei Ciliaten (Einzel- und Mehr-Arten-Experimente zusammen, $n = 165$ Zählungen) beträgt 85 ± 18 %.

Andere Taxa: Nematoden wurden sowohl im Einzel-Art-Experiment als auch im Mehr-Arten-Experiment zu einem sehr hohen Prozentsatz (96 ± 5 % bzw. 94 ± 11 %, gesamt: 95 ± 8 %) wiedergefunden. Die Wiederfundrate der Nematoden ist somit höher als die der Ciliaten. Der Grund dafür ist sowohl in der Größe als auch in ihrer starken Lichtbrechung zu sehen. Die Wiederfundrate der Rotatoria ist mit 90 ± 8 % im Einzel-Art-Experiment und mit 78 ± 20 % im Mehr-Arten-Experiment (gesamt: 84 ± 16 %) sehr ähnlich der Recovery-Rate der Ciliaten. Bei den Testaceen (hier wurden nur Einzel-Art-Experimente durchgeführt) sind insgesamt 78 ± 17 % wiedergefunden worden. Während die Wiederfundrate bei der großen Art *Centropyxis* sp. bei 94 ± 5 % lag, betrug sie bei der kleinen *Trinema lineare* bloß 62 ± 5 %.

Insgesamt wurden 95 % ($n = 10$ Zählungen) der Nematoden, 85 % der Ciliaten ($n = 165$), 84 % der Rotatorien ($n = 10$) und 78 % der Testaceen ($n = 10$) im Mittel aller Experimente wiedergefunden (Abb. 9).

Einfluß der Größe der Organismen auf die Wiederfundrate

Zwischen der Größe der Ciliaten und deren prozentualer Wiederfundrate bestehen folgende Korrelationen (parameterfreier Rangkorrelationskoeffizient r_s von SPEARMAN; siehe SACHS).

Einzel- und Mehr-Arten-Experimente:

$$r_s (n = 19, \alpha_{0,001; \text{eins.}} = \alpha_{0,002; \text{zweis.}}) = 0,6965 > 0,6737 = r_s^* \text{ (Abb. 7)}$$

Mehr-Arten-Experimente:

$$r_s (n = 13, \alpha_{0,001; \text{eins.}} = \alpha_{0,002; \text{zweis.}}) = 0,8956 > 0,7912 = r_s^* \text{ (Abb. 8)}$$

Einzel-Art-Experimente:

$$r_s (n = 11, \alpha_{0,05; \text{eins.}} = \alpha_{0,10; \text{zweis.}}) = 0,3818 < 0,5273 = r_s^* \text{ (Abb. 10)}$$

Das heißt, daß in der Belebtschlamm-Biozönose die großen Ciliaten in einem höheren Ausmaß wiedergefunden werden als die kleinen. Dieser Zusammenhang ist sowohl bei den Mehr-Arten-Experimenten (Abb. 8) als auch bei der Kombination der Einzel- und Mehr-Arten-Experimente (Abb. 7) hoch signifikant ($\alpha = 0,002$). Auch zwischen der durchschnittlichen Größe aller verwendeten Großgruppen (Nematoden, Rotatorien, Ciliaten, Testaceen) und deren mittlerer Wiederfundrate weist der Rangkorrelationskoeffizient r_s ($n = 4, \alpha_{0,05; \text{eins.}} = \alpha_{0,10; \text{zweis.}}) = 0,8 \cong 0,8000 = r_s^*$ eine positive Korrelation aus. Hingegen ist die Korrelation bei den Einzel-Art-Experimenten (Abb. 10) nur gering, da bei diesem Versuchsansatz auch kleine Arten zu einem relativ hohen Prozentsatz wiedergefunden werden. Der Rangkorrelationskoeffizient ergibt bei $\alpha = 0,10$ noch keine Signifikanz.

Einfluß der Beschaffenheit des Schlammes auf die Wiederfundrate

Die Wiederfundrate von je 50 Individuen der Arten *Cinetochilum margaritaceum*, *Colpidium colpoda* und *Euplotes aediculatus* wurde in je 3 Belebtschlämmen ermittelt, die sich in ihrem Schlammvolumen (SV) und in ihrer Fädigkeit (F) unterscheiden (Abb. 11). Auf den ersten Blick scheint die Wiederfundrate von *Colpidium colpoda* mit zunehmender Fähigkeit und zunehmendem Schlammvolumen leicht zu steigen, bei *Euplotes aediculatus* hingegen leicht zu sinken. Die Mittelwerte liegen jedoch ebenso wie bei *Cinetochilum margaritaceum* innerhalb des Streubereiches der 3 Arten (Abb. 11). Ein gravierender Einfluß der Schlammeigenschaften auf die Zählergebnisse ist somit nicht gegeben.

Diskussion

Der absolute Zählfehler liegt bei den Einzel-Art-Experimenten durchschnittlich bei 10 %, bei den Mehr-Arten-Experimenten dagegen durchschnittlich bei 20 %. Offensichtlich ist es schwieriger, sich gleichzeitig auf verschieden große und sich unterschiedlich (oder gar nicht) bewegende Arten zu konzentrieren. LÜFTENEGGER et al. fanden dagegen in ihren Mehr-Arten-Experimenten rund 10 % mehr Individuen wieder als in den Einzel-Art-Experimenten. Dies war bei unseren Untersuchungen nur bei *Litonotus crystallinus* und *Euplotes aediculatus* der Fall.

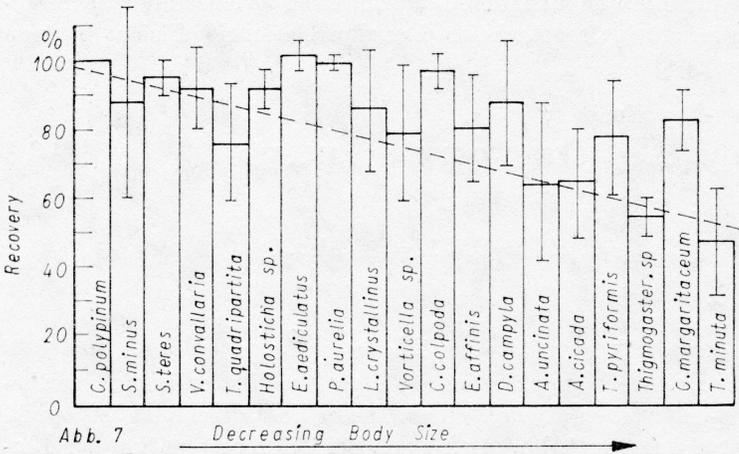


Abb. 7

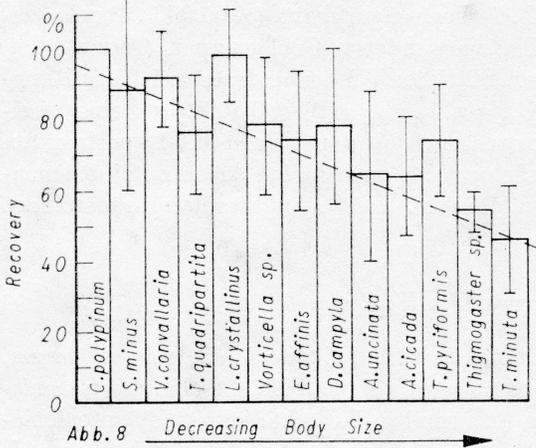


Abb. 8

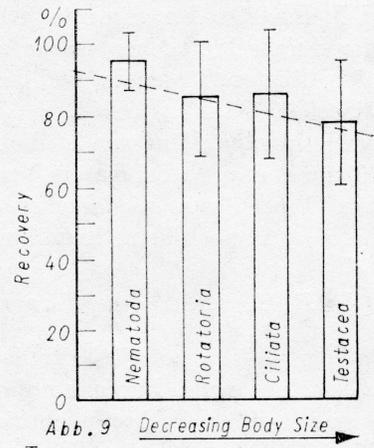


Abb. 9

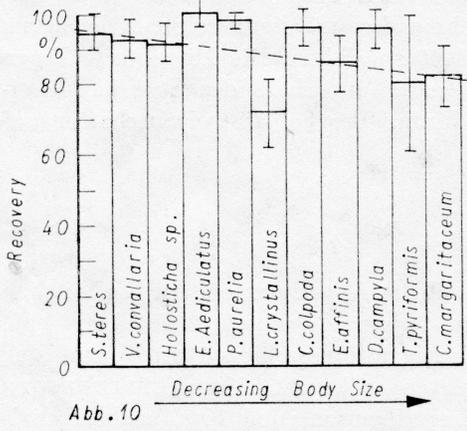


Abb. 10

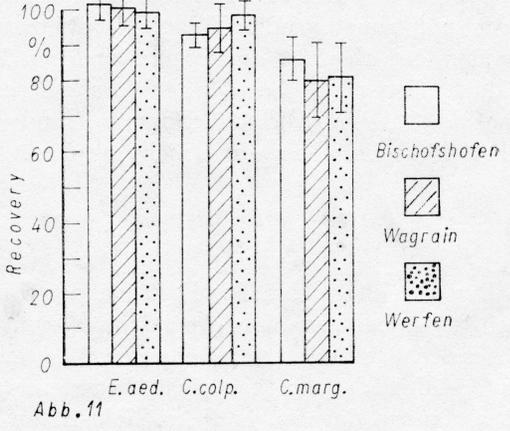


Abb. 11

Insgesamt ist in unseren Experimenten die Wiederfundrate (mit Ausnahme der Testaceen) etwas höher als bei LÜFTENEGGER et al. Vermutlich deshalb, weil bei der vorliegenden Methode die Schichtdicke geringer ist als bei den Zählungen von Bodenproben und weil die Organismen von Bodenpartikeln eher verdeckt werden als von Belebtschlammflocken, die relativ gut durchfokussiert werden können. Ähnlich zu erklären ist wohl auch, daß LÜFTENEGGER et al. einen gewissen Einfluß der Struktur des Zählsubstrats auf die Wiederfundrate der Boden-Protozoen fanden. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Bodentypen (z. B. Streu und Ackerboden) sind sicherlich viel größer als etwa die Unterschiede zwischen verschiedenen Belebtschlämmen.

Die Wiederfundrate ließe sich vermutlich durch Verwendung einer höheren Mikroskopvergrößerung noch verbessern, was jedoch einen sehr erhöhten Zeitaufwand bedeuten würde. Die vorgeschlagene Zählmethode stellt einen für alle praktischen und die meisten wissenschaftlichen Belange akzeptablen Kompromiß zwischen Zeitaufwand und Genauigkeit dar.

Abb. 7, 8, 10. Prozentuale Wiederfundrate mit Standardabweichung für einige Ciliaten-Arten und Korrelation (gestrichelte Linie) zwischen Körpergröße und Wiederfundrate; Anzahl der Zählungen (n). Abb. 7. Einzel- und Mehr-Arten-Experimente kombiniert (*C. colpoda*: $n=20$; *C. margaritaceum*, *E. aediculatus*, *V. convallaria*: $n=15$; *D. campyla*, *E. affinis*, *L. crystallinus*, *T. pyriiformis*, *V. sp.*: $n=10$; andere Arten: $n=5$). Abb. 8. Mehr-Arten-Experimente (*V. convallaria*, *V. sp.*: $n=10$; andere Arten: $n=5$). Abb. 10. Einzel-Art-Experimente (*C. colpoda*: $n=20$; *C. margaritaceum*, *E. aediculatus*: $n=15$; andere Arten: $n=5$).

Figs. 7, 8, 10: Recovery ($\%$) with standard deviation for some ciliate species and correlation (dotted line) between body size and recovery rate: number of countings (n). Fig. 7. Single- and multiple-species experiments combined (*C. colpoda*: $n=20$; *C. margaritaceum*, *E. aediculatus*, *V. convallaria*: $n=15$; *D. campyla*, *E. affinis*, *L. crystallinus*, *T. pyriiformis*, *V. sp.*: $n=10$; other species: $n=5$). Fig. 8. Multiple-species-experiments (*V. convallaria*, *V. sp.*: $n=10$; other species: $n=5$). Fig. 10. Single-species experiments (*C. colpoda*: $n=20$; *C. margaritaceum*, *E. aediculatus*: $n=15$; other species: $n=5$).

Abb. 9. Prozentuale Wiederfundrate mit Standardabweichung und Korrelation (gestrichelte Linie) zwischen Körpergröße und Wiederfundrate für verschiedene Großgruppen (Zusammenfassung aller Experimente). Anzahl der Zählungen (n): Ciliata ($n=165$), Nematoda ($n=10$), Rotatoria ($n=10$), Testacea ($n=10$).

Fig. 9. Recovery ($\%$) with standard deviation and correlation (dotted line) between body size and recovery for different taxa (all experiments pooled); number of countings (n): ciliates ($n=165$), nematodes ($n=10$), rotators ($n=10$), testate amoebae ($n=10$).

Abb. 11. Vergleich der Wiederfundraten der Arten *C. colpoda*, *E. aediculatus* und *C. margaritaceum* in je 3 unterschiedlich beschaffenen Belebtschlämmen. Bischofshofen: Schlammvolumen $SV=310 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, Fädigkeitsstufe nach EIKELBOOM und BUIJSEN (1983) $F=1$; Wagrain: $SV=590 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, $F=2$; Werfen: $SV=690 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, $F=4$. Die Beschaffenheit des Belebtschlammes hat keinen ersichtlichen Einfluß auf die Wiederfundraten.

Fig. 11. Comparison of recovery rates of the ciliate species *C. colpoda*, *E. aediculatus*, and *C. margaritaceum* in 3 differently structured sludges. Bischofshofen: sludge volume $SV=310 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, content of filamentous bacteria according to EIKELBOOM and BUIJSEN (1983) $F=1$; Wagrain: $SV=590 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, $F=2$; Werfen: $SV=690 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, $F=4$. The recovery rates of the 3 species are not visibly influenced by the structure of activated sludge.

Mit dem anhand von Wiederfundexperimenten ermittelten absoluten Fehler läßt sich jedenfalls die tatsächliche Abundanz der Organismen im Belebtschlamm vertrauenswürdig abschätzen.

Herrn S. HILLER und Herrn Dr. W. PETZ danken wir für Hinweise in Zusammenhang mit der statistischen Auswertung, den Herren A. UNTERWEGER und W. WIENER für die Beschaffung von Belebtschlammproben, Herrn B. GANNER dafür, daß er uns *Colpidium* zur Verfügung stellte. Die Arbeit wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Projekt Nr. P 5889 finanziell unterstützt.

Literatur

- BARK, A. W.: A survey of the protozoan population of activated sludge. *Annl. Sta. biol. Besse-en-Chandesse* 6-7 (1971/72), 241-260.
- BICK, H.: Ciliated Protozoa. An illustrated guide to the species used as biological indicators in freshwater biology. Geneva, WHO, 1972.
- BUCK, H.: Die Ciliaten des Belebtschlammes in ihrer Abhängigkeit vom Klärverfahren. *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie* 5 (1968), 206-222.
- CURDS, C. R.: The role of protozoa in the activated-sludge process. *Amer. Zool.* 13 (1973), 161-169 - and H. A. HAWKES (Eds.): *Ecological aspects of used water treatment. Vol. I: The organisms and their ecology.* London, Academic press, 1975.
- EIKELBOOM, D. H. und H. J. J. VAN BUIJSEN: *Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung.* München, F. Hirthammer Verlag, 1983.
- ELLIOTT, J. M.: Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. *Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 25, Second Edition, 1977, reprinted 1983, 1-156.*
- FOISSNER, W.: Estimation of numbers of protista in soil: a test of the "direct method". *J. Protozool.* 30 (1983), 49A (Abstract).
- : Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators and guide to the literature. *Progr. Protistology* 2 (1987), 69-212.
- KALBE, L., und R.-D. RECKNAGEL: Zur statistischen Auswertung von mikroskopischen Plankton- und Partikelzählungen. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 15 (1987) 5, 471-480.
- KLIMOWICZ, H.: Microfauna of activated sludge. Part I. Assemblage of microfauna in laboratory models of activated sludge. *Acta Hydrobiol.* 12 (1970) 4, 357-376.
- : The microfauna of activated sludge. Part II. Assemblages of microfauna in block aeration tanks. *Acta Hydrobiol.* 14 (1972) 1, 19-36.
- LORENZ, R. L.: *Grundbegriffe der Biometrie.* Stuttgart, New York, G. Fischer Verlag, 1984.
- LÜFTENEGGER, G., W. PETZ, W. FOISSNER and H. ADAM: The efficiency of a direct counting method in estimating the numbers of microscopic soil organisms. *Pedobiologia* 31 (1988) 95-101.
- MÜHLENBERG, M.: *Freilandökologie.* UTB 595, Heidelberg, Quelle und Meyer, 1976.
- SACHS, L.: *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden.* Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer Verlag, 1984.
- SCHERB, K.: Zur Biologie des belebten Schlammes. *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie* 5 (1958), 86-140.
- SYDENHAM, D. H. J.: A re-assessment of the relative importance of ciliates, rhizopods and rotatorians in the ecology of activated sludge. *Hydrobiologia* 38 (1971), 553-563.

Manuskripteingang: 11. 7. 1988

Anschrift der Verfasser:

H. AUGUSTIN, Dr. R. BAUER und Univ.-Prof. Dr. W. FOISSNER, Universität Salzburg, Institut für Zoologie, Hellbrunnerstraße 34, A - 5020 Salzburg (Austria).