

# Copyright ©

---

Es gilt deutsches Urheberrecht.

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

German copyright law applies.

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

## Zur Gefrierresistenz litoraler Mollusken von der deutschen Nordseeküste\*

Von JENS IBING und HANS THEEDE

**Zusammenfassung:** Bei marinen Mollusken, die in der Gezeitenregion der gemäßigten Breiten überwintern, nimmt die Gefrierresistenz in der Reihenfolge *Littorina saxatilis*, *L. littorea*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria* und *Macoma baltica* ab. Die *Littorina*-Arten ertragen noch mehrstündige Exposition bei  $-15^{\circ}\text{C}$  zu einem hohen Prozentsatz. Primärschäden durch Gefrieren bei  $-10^{\circ}$  und  $-15^{\circ}\text{C}$  werden im Laufe längerer Hälterung nach der Kälteexposition verstärkt. Im Sommer ist die Gefrierresistenz stark verringert. Tiergröße sowie die Außenbedingungen am Fundort (Salzgehalt etc.) modifizieren die Überlebensfähigkeit bei Frosteinwirkung.

**About freezing resistance of littoral mollusks from the german coast of the North Sea (Summary):** Marine mollusks overwintering in the tidal zone of the temperate latitudes show decreasing freezing resistance in the following order: *Littorina saxatilis*, *L. littorea*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria* and *Macoma baltica*. The *Littorina* species even resist some hours exposure at  $-15^{\circ}\text{C}$  with a high degree of survival. Primary injuries caused by freezing at  $-10^{\circ}$  and  $-15^{\circ}\text{C}$  are enhanced during longer keeping subsequent to freezing exposure. From spring to autumn freezing resistance is strongly reduced. Size of the animals and environmental factors of the habitat (salinity etc.) modify survivability during exposure to frost.

### Einleitung

Unter den marinen Wirbellosen ist die Ausbildung einer nennenswerten Gefrierresistenz mit ökologischer Bedeutung auf solche Arten beschränkt, die im Supra- und Eulitoral der temperierten und kälteren Regionen überwindern können. Hierunter fallen u. a. Seepocken, Strandschnecken und einige Muschelarten. Die resistenten Formen unter ihnen überleben z. B. etliche Tage bei  $-10^{\circ}\text{C}$  an der Luft. Diese Gefrierresistenz ist im Winter ein wesentlicher Faktor für die obere Ausbreitungsgrenze der Arten in der Gezeitenregion (Literaturüberblick: THEEDE, 1973). Die Selektionswirkung, die der Frost hier ausübt, wird besonders deutlich an den großen Schäden, die in strengen Wintern hervorgerufen werden. Außerdem verarmt die temperierte Gezeitenfauna mit zunehmender geographischer Breite. Die nördlichsten Vertreter mariner Makrobenthos-Arten, die dauernd in der Gezeitenregion überleben können, sind die Seepocke *Balanus balanoides* und die Strandschnecke *Littorina saxatilis* (vgl.: GERLACH, 1965). Verschiedene Autoren berichten, daß einige marine Wirbellose langfristig im kompakten Eis eingeschlossen überleben können (vgl.: KANWISHER, 1966). Bei der Beurteilung dieses Phänomens darf man aber das Mikroklima nicht außer acht lassen. Dieses wird z. B. durch die freiwerdende Wärme beim Ausfrieren von Wasser, die guten wärmeisolierenden Eigenschaften und den „Treibhauseffekt“ von Eis und Schnee beeinflusst. Hierdurch können die Temperaturen in den eingefrorenen Organismen selbst bei starker Abkühlung der Luft oft lange in der Nähe des Gefrierpunktes gehalten werden. Ein großer Teil der Körperflüssigkeit vieler Tiere geht allerdings während langer Kälteexposition in Eis über (vgl.: KANWISHER, 1966). Nach KANWISHER (1955) und WILLIAMS (1970) überlebt die Miesmuschel unter solchen Bedingungen noch bei  $-10^{\circ}\text{C}$ ; *Littorina littorea* und *L. saxatilis* (SÖMME, 1966) sowie *Balanus balanoides* (CRISP and RITZ, 1967) sind noch resistenter. Die einzelnen Autoren haben die Frostresistenz der Versuchstiere aber nur

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

jeweils kurze Zeit nach der Kälteexposition ermittelt. Es ist nicht bekannt, ob die durch Eisbildung hervorgerufenen Primärschäden nach dem Auftauen möglicherweise verstärkt werden und ob Regenerationserscheinungen von Gefrierschäden bei marinen Wirbellosen eine Rolle spielen.

Bei unseren Untersuchungen über die Überlebensfähigkeit exponiert vorkommender mariner Gezeitenformen bei Frosteinwirkung soll vor allem berücksichtigt werden, wie sich die Tiere über längere Zeit nach extremer Kälteeinwirkung verhalten.

## Material und Methode

### Versuchstiere

Zur Untersuchung gelangten unter den marinen Gastropoden die Strandschnecken *Littorina littorea* und *L. saxatilis*, unter den Lamellibranchiern die Miesmuschel *Mytilus edulis*, die Klaffmuschel *Mya arenaria*, die Plattmuschel *Macoma baltica* und die Herzmuschel *Cardium edule*. Die Tiere konnten im Watt bei Büsum gegraben bzw. gesammelt werden. An den Fangtagen im Januar/Februar lagen die Wassertemperaturen zwischen 0,5 und 2°C. Der Salzgehalt schwankte zwischen 27 und 30‰. Im Spätsommer wiesen die Priele Wassertemperaturen zwischen 13 und 16,5°C zur Ebbezeit auf.

Im Sommer und Herbst haben wir die Tiere bis zur Ausführung der Experimente im Versuchsaquarium des Institutes bei 14 bis 16°C und 30‰ S gehalten. Das Wasser wurde über Eheimfilter gesäubert und alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die Hälterung der im Winter gesammelten Tiere erfolgte in temperaturkonstanten Räumen bei 0 bis 1°C.

### Resistenzuntersuchungen

Die zu untersuchenden Tiere wurden zum Einfrieren bei geschlossenen Schalen oder Gehäusen tropfnaß in Plastikbecher von 4 cm Durchmesser und 7 cm Höhe eingeschlossen. Die Expositionstemperatur von  $-10^{\circ}\text{C}$  konnte mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  im Kühlbad eines COLORA-Flüssigkeitskühlers gehalten werden. Zur laufenden Kontrolle des Temperaturverlaufs während der Versuche verwendeten wir einen Thermistor, der jeweils in ein Versuchstier eingeführt wurde, in Verbindung mit einem KNAUER-Temperaturmeßgerät. Nach dem Auftauen der in geeigneten Zeitabständen entnommenen Proben wurden die Tiere zur Ermittlung der Überlebensrate etliche Tage beobachtet.

## Ergebnisse

Registrierungen des Abkühlungsverlaufs während des Einfrierens lassen erkennen, daß die Temperaturerniedrigung im Inneren der Tiere der einzelnen Versuchsgruppen bei äußerer Kälteeinwirkung von  $-10^{\circ}\text{C}$  unterschiedlich schnell erfolgt. Bei *Cardium edule* (Länge 20 bis 25 mm) wird der niedrigste Temperaturwert in 40 bis 50 min erreicht, bei *Mytilus edulis* (Länge zwischen 25 bis 40 mm) in 70 bis 100 min, bei *Mya arenaria* (Länge 40 bis 60 mm) innerhalb von  $3\frac{1}{2}$  Stunden.

Einzelne Formen (z. B. *Littorina littorea*) zeigen im Winter nach Einfrieren bei  $-10^{\circ}\text{C}$  eine Überlebensfähigkeit bis zu vielen Tagen (vgl. Abb. 1). Interessant erscheint aber der Befund, daß die Anzahl der überlebenden Individuen nach einer solchen Kälteexposition im Laufe einer anschließenden längeren Hälterung stark abnimmt. Die Schäden durch Eisbildung führen also in diesen Fällen erst viele Tage nach dem Auftauen zur Mortalität. Die Ermittlung der Überlebensrate direkt oder kurze Zeit nach dem Auftauen, wie sie bei vergleichenden Untersuchungen unter physiologischen Gesichts-

punkten nützlich sein kann, reicht dementsprechend für ökologische Betrachtungen über Frostauswirkungen am Standort nicht aus. Hierfür ist es außerdem wichtig zu wissen, in welchem Maße die Tiere die Einwirkung relativ kurzfristiger Stresssituationen wirklich langfristig überdauern.

Die Werte in Abb. 1 geben an, nach welcher Expositionsdauer bei  $-10^{\circ}\text{C}$  50% Mortalität eintritt. Wird *Littorina littorea* bis zu 10 Tagen bei  $-10^{\circ}$  eingefroren, so kann man zunächst nach dem Auftauen noch eine nahezu vollständige Überlebensfähigkeit der Exemplare feststellen. Erst nach längerer Hälterung setzt dann zunehmende Mortalität ein. So wird der Wert von 50% Mortalität nach 10 Tagen Kälteexposition bei  $-10^{\circ}\text{C}$  erst nach weiteren 10 Tagen Hälterung (bei etwa  $0-1^{\circ}\text{C}$ ) erreicht. Nach 14 Tagen Kälteexposition wird allerdings schon 1 Tag später eine Sterberate von 50% festgestellt.

*Mytilus edulis* erweist sich als wesentlich empfindlicher. Exemplare dieser Art zeigen nach 10 Tagen Exposition bei  $-10^{\circ}\text{C}$  schon direkt nach dem Auftauen über 50 Prozent Mortalität; und nach 14 Tagen entsprechender Kälteeinwirkung sind nur noch wenige Überlebende festzustellen. Zweitägiges Einfrieren bei  $-10^{\circ}\text{C}$  führt allerdings erst nach über 2 Wochen Hälterung zu einer Sterberate von 50%. Die Muscheln *Mya arenaria*, *Cardium edule* und *Macoma baltica* sind wiederum empfindlicher als *Mytilus edulis*. — Im Prinzip ähnliche artspezifische Unterschiede lassen frühere Arbeiten (z. B. THEEDE, 1965 und 1972) anhand der zellulären Gefrierresistenz erkennen. Dabei wurden aber bei entsprechender Kälteexposition nur Überlebenszeiten im Bereich weniger Stunden beobachtet.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (SÖMME, 1966; KANWISHER, 1955; CRISP and RITZ, 1967; THEEDE, 1972) ist die hohe winterliche Gefrierresistenz einiger Formen im Sommer stark reduziert. Dies tritt in den Versuchen dieser Arbeit besonders deutlich bei *Littorina littorea* in Erscheinung (vgl. Abb. 1). Diese Tiere ertragen im Sommer nur sehr kurze Kälteeinwirkung von  $-10^{\circ}\text{C}$ . Schon wenige Stunden einer solchen Kälteexposition führen, wenn auch erst nach vielen Tagen, zu einem Absterben der Individuen.

Die Gefrierresistenz der Miesmuschel und der Herzmuschel ist im Sommer im Vergleich zu den Winterwerten ebenfalls stark reduziert (vgl. Abb. 2). Bei der Miesmuschel lösen im Sommer schon einige Stunden Kälteeinwirkung von  $-10^{\circ}\text{C}$  starke Gefrierschäden aus, die im Laufe weniger Tage immer deutlicher in Erscheinung treten. Dies drückt sich dementsprechend in einer steigenden Mortalität aus. Die Herzmuschel ist wesentlich empfindlicher und zeigt entsprechende Schäden schon nach 1 bis 2 Stunden Kälteexposition.

Auch der Salzgehalt des Mediums übt einen erheblichen Einfluß auf die Gefrierresistenz aus. Dies wurde auf zellulärer Ebene bereits von THEEDE (1965 und 1972), THEEDE und LASSIG (1967) und WILLIAMS (1970) nachgewiesen. In dieser Arbeit werden die Auswirkungen an ganzen Tieren am Beispiel *Cardium edule* untersucht (vgl. Abb. 3). Vor den Versuchen wurden die Individuen 14 Tage lang an unterschiedliche Salzgehalte (15, 30, 40 und  $45\text{‰}$ ) bei Temperaturen von 0 bis  $1^{\circ}\text{C}$  angepaßt. Wurden die Exemplare nach der Gefrierbehandlung noch längere Zeit gehalten, so nahm in allen Fällen die Mortalität erheblich zu.

Exposition bei stärkerer Kälte ( $-15^{\circ}\text{C}$ ) kann von vielen Individuen der vergleichsweise sehr resistenten und im Litoral deshalb sehr exponiert lebenden marinen Arten (z. B. *Littorina saxatilis* und *L. littorea*) nicht mehr ertragen werden. Eine  $2\frac{1}{2}$ -stündige

Tafel 1 (zu J. IBING, H. THEEDE)

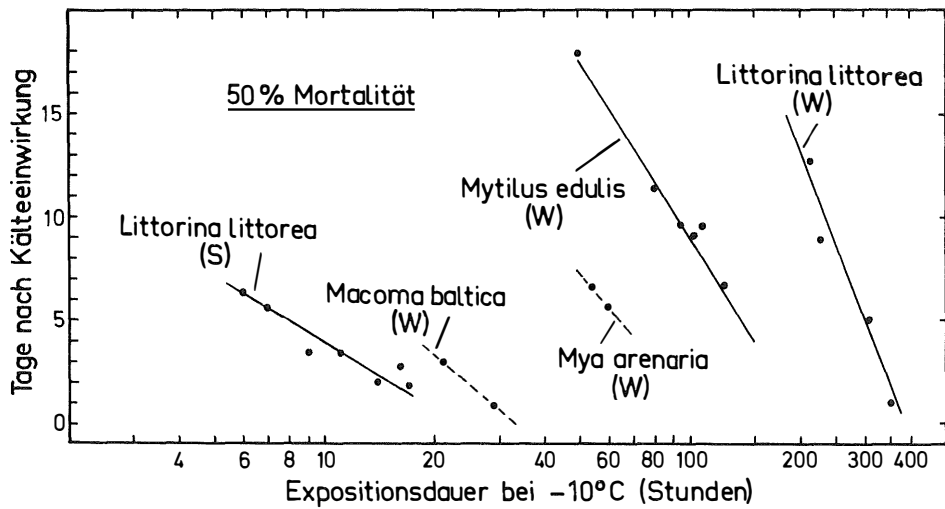


Abb. 1: Gefrierresistenz einiger Mollusken von der deutschen Nordseeküste (Büsum) bei Kälteeinwirkung ( $-10^{\circ}\text{C}$ ). Die Tiere wurden vor den Versuchen im Winter bei 0 bis  $1^{\circ}\text{C}$  und  $30^{\text{‰}}\text{S}$  mehrere Wochen lang gehältert. Zur Ermittlung der Mortalitätsrate wurden die Versuchstiere nach der Frosteinwirkung noch viele Tage gehalten.

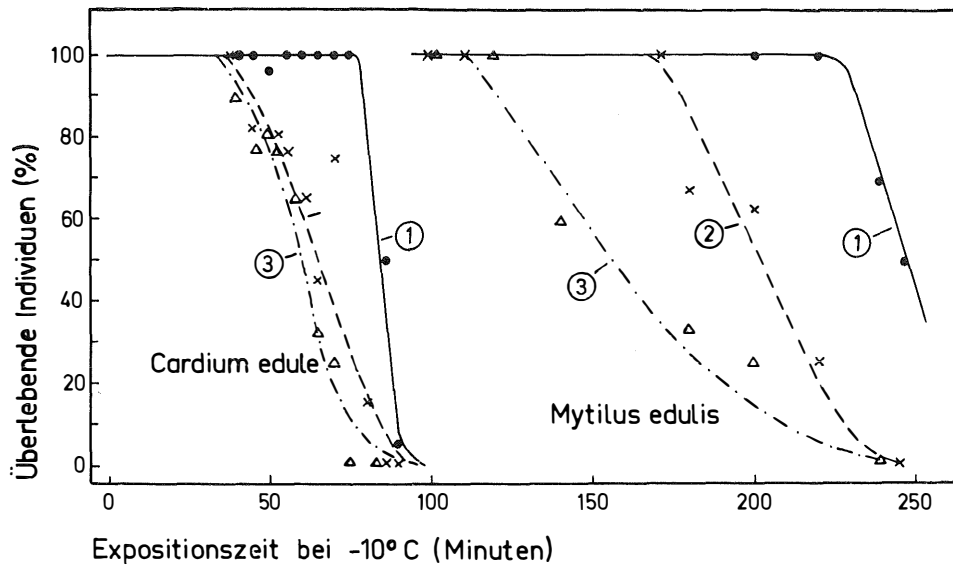


Abb. 2: *Mytilus edulis* und *Cardium edule* (Sommertiere). Gefrierresistenz bei  $-10^{\circ}\text{C}$ . Angegeben ist die Anzahl der überlebenden Individuen 1 bis 3 Tage nach unterschiedlich langer Kälteeinwirkungsdauer bei  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Tafel 2 (zu J. IBING, H. THEEDE)

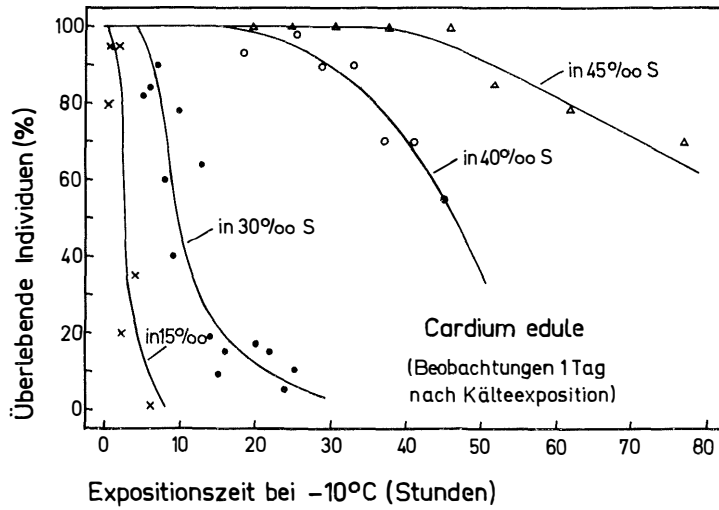


Abb. 3: *Cardium edule* (Nordsee). Gefrierresistenz ganzer Tiere bei  $-10^{\circ}\text{C}$  nach 2 Wochen Anpassung an unterschiedliche Salzgehalte. Ermittlung der Mortalitätsrate einen Tag nach der Kälteexposition. Versuchszeitraum: März 1973.

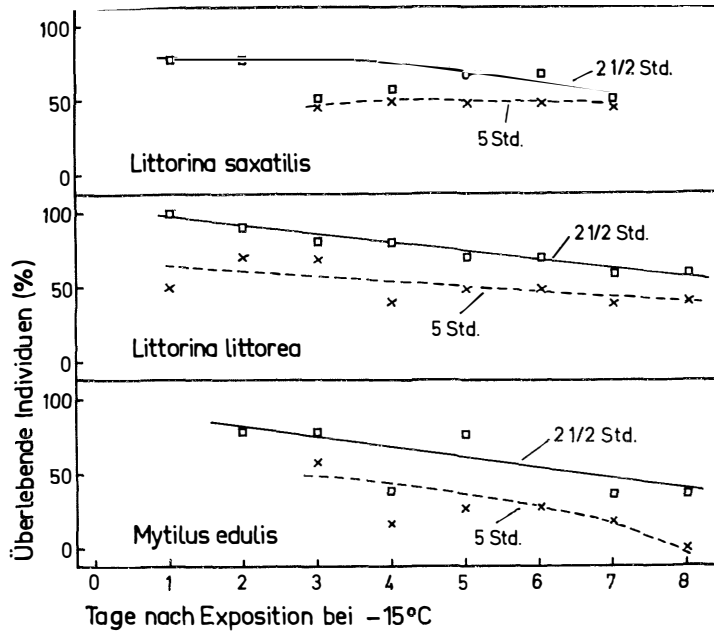


Abb. 4: *Littorina saxatilis*, *L. littorea* und *Mytilus edulis*. Gefrierresistenz bei  $-15^{\circ}\text{C}$ . Kälteeinwirkung von  $2\frac{1}{2}$  und 5 Stunden. Untersuchung der Anzahl der überlebenden Tiere über viele Tage nach der Kälteexposition. Versuchszeitraum: Januar/März 1973.

Exposition bei dieser Kälte läßt anschließend nach einem Tag zwar noch ein annähernd vollständiges Überleben der Tiere erkennen, die Mortalität nimmt aber innerhalb von einer Woche stark zu. Nach 5 Stunden Kälteeinwirkung bei  $-15^{\circ}\text{C}$  sterben dementsprechend viele Individuen innerhalb noch kürzerer Zeit ab (Abb. 4).

#### Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit an ganzen Organismen aus dem Nordsee-Watt bestätigen und ergänzen entsprechende frühere Beobachtungen zur zellulären Gefrierresistenz (THEEDE, 1965, 1972). Ein wesentlicher neuer Befund ist aber, daß Gefrierschäden bei marinen Wirbellosen noch längere Zeit nach dem Auftauen erheblich zunehmen können, so daß dann die Mortalitätsraten anhalten bzw. sogar ansteigen. Die Irreversibilität von Frostschäden tritt in solchen Fällen bei den ganzen Individuen noch nicht kurzfristig nach Abschluß der Frosteinwirkung in Erscheinung. Die langfristige Zunahme der Schädigung nach dem Auftauen dürfte auf Veränderungen der Membranen und Zellorganellen zurückzuführen sein. Der deutlich verstärkte Austritt von Enzymen aus dem Cytosol und aus Zellorganellen schon nach kurzfristiger Gefrierbehandlung von Muschelgeweben läßt auf erhebliche Membranschäden schließen (THEEDE, 1972). Auch die Ergebnisse anderer Autoren weisen in diese Richtung (Literatur u. a. bei MERYMAN, 1966; SMITH, 1970). Nach stärkerer Frosteinwirkung können bereits bei einfacher mikroskopischer Betrachtung — z. B. isolierte Kiemen von Muscheln — Gewebeschäden erkannt werden, die von einer Verringerung der Cilienaktivität über Cilienstillstand bis zu deutlichem Gewebeerfall reichen. In welchem Maße Autolysevorgänge, bedingt durch das Freiwerden proteolytischer Enzyme aus den Lysosomen, für die zunehmenden Frostschäden nach Gefrierbehandlung verantwortlich sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Ordnet man die in dieser Arbeit untersuchten Mollusken nach abnehmender Gefrierresistenz an, so ergibt sich die Reihe: *Littorina saxatilis*, *L. littorea*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*, *Cardium edule*, *Macoma baltica*. Anhand der zellulären Gefrierresistenz isolierter Muschelkiemen (vgl. THEEDE 1965 und 1972) wurde eine ähnliche Reihenfolge ermittelt (*Mytilus*, *Cardium*, *Mya*, *Macoma*). Daß beide Reihen nicht absolut übereinstimmen und daß die ganzen Tiere wesentlich länger bei Frosteinwirkung überleben als ihre isolierten Gewebe, dürfte auf eine langsame und durch die Tiergröße beeinflusste Temperaturniedrigung während des Einfrierens zurückzuführen sein. Das Absinken der Temperatur im Innern größerer Individuen mit größerem eingeschlossenen Wasservolumen erfolgt langsamer als bei kleinen Exemplaren. Dadurch wird offensichtlich die Überlebenszeit der Versuchstiere beeinflusst (vgl. THEEDE, 1965).

Formen, die im Winter eine hohe Gefrierresistenz ausbilden, reduzieren diese Eigenschaft im Sommer sehr stark. Bei Arten dagegen, die nur eine geringe Frostresistenz aufweisen, sind solche Unterschiede zwischen Winter- und Sommer-Individuen prozentual wesentlich geringer.

#### Literaturverzeichnis

- CRISP, D. J., RITZ, D. A. (1967): Changes in temperature tolerance of *Balanus balanoides* during its life-cycle. Helgoländer Wiss. Meeresuntersuch. 15, 98—115.
- GERLACH, S. A. (1965): Über die Fauna der Gezeitenzone von Spitzbergen. Proc. 5th Marine Biol. Botanica Gothoburgensia 3, 81—92.

- KANWISHER, J. W. (1955): Freezing in intertidal animals. Biol Bull. Marine Biol. Lab., Woods Hole 109, 56—63.
- KANWISHER, J. W. (1966): Freezing in intertidal animals. In: Cryobiology, p. 477—494. Ed. by H. T. Meryman. London: Academic Press.
- MERYMAN, H. T. (Ed.) (1966): Cryobiology, p. 775. London: Academic Press.
- SMITH, A. U. (1958): The resistance of animals to cooling and freezing. Biol. Rev. 33, 197—253.
- SÖMME, L. (1966): Seasonal changes in the freezing-tolerance of some intertidal animals. Nytt. Mag. Zool. 13, 52—55.
- THEEDE, H. (1965): Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die zelluläre Gefrierresistenz mariner Muscheln. Kieler Meeresforsch. 21, 153—166.
- THEEDE, H. (1972): Vergleichende ökologisch-physiologische Untersuchungen zur zellulären Kälteresistenz mariner Evertebraten. Marine Biol. 15, 160—191.
- THEEDE, H. (1973): Resistance adaptations of marine invertebrates and fish to cold. In: Effects of Temperature on Ectothermic Organisms, p. 249—269. Ed. by W. Wieser.
- THEEDE, H., LASSIG, J. (1967): Comparative studies on cellular resistance of bivalves from marine and brackish waters. Helgoländer Wiss. Meeresuntersuch. 16, 119—129.
- WILLIAMS, R. J. (1970): Freezing tolerance in *Mytilus edulis*. Comp. Biochem. Physiol. 35, 145—161.