Beiträge zur Toxikologie der Fische

V.

Die Giftigkeit von Phenol für verschiedene Fischarten

Von K. WUHRMANN und H. WOKER

Mitteilung aus der Eidg. Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung
und Gewässerschutz an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

Eingegangen am 15. Februar 1950

Phenolhaltige Abwässer stellen eine häufige Ursache von Fischvergiftungen dar. Trotzdem sind die Kenntnisse über die Wirkung dieser Verbindung bei verschiedenen Konzentrationen und Fischarten wenig zuverlässig, wie dies aus der nachfolgenden Übersicht der Literatur hervorgeht. Es erschien deshalb angezeigt, die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Phenol genauer zu ermitteln, um sowohl über die Minimaldosen für *akute* Vergiftungen als auch über die Manifestationszeiten bei höheren Konzentrationen Aufschluß zu erhalten. Die Frage der Bedeutung subtoxischer Dosierungen in ökologischer Hinsicht soll in einer späteren Arbeit behandelt werden.

1. Literatur

Die älteste uns bekannte Mitteilung über die Einwirkung von Phenol auf Fische stammt von LIEBIG, der erwähnt, daß Blutegel und Fische in einer Phenollösung nach wenigen Minuten ohne Krämpfe sterben. Seither ist eine große Zahl weiterer Arbeiten erschienen, von denen nachfolgend lediglich zusammenfassende Darstellungen zitiert werden. WEIGELT (1885) fand, daß die Grenze schädlicher Phenolkonzentrationen für Forellen zwischen 0,5 und 1 mg/l, für Schleien zwischen 1 und 5 mg/l liege. Nach STEINMANN (1927) ist die «letale Konzentration» für Salmoniden bei 10 mg/l, für Cypriniden etwas tiefer, und die «Schädlichkeitsgrenze» bei zirka 5 mg/l anzusetzen. HELFER (1936) gibt als untere Grenze schädlicher

Konzentrationen 0,1 mg/l an. Er erwähnt u. a. eine Arbeit von HOLZINGER (1927), der fand, daß 0,5 mg/l für Hechte noch tödlich seien. Von KALABINA (1935) stammt die Angabe, daß in Laboratoriumsversuchen «Fische» Phenolkonzentrationen von 4–15 mg/l ertrugen, aber «in durch phenolhaltiges Wasser verunreinigten Gewässern nur bei einem sehr geringen Phenolgehalt (nicht über 0,2 mg/l) leben». Er erwähnt ferner, daß, «wolle man nicht die angegriffene Gesundheit des Fisches, sondern die Geschmacksbeeinflussung als maßgebend ansehen, 0,1 mg/l (bei Anwesenheit von freiem Chlor und des daraus entstehenden Chlorphenols) als untere Grenze der nachteiligen Beeinflussung angesehen werden müßte». Nach CZENSNY (1929, 1934) wirkt Phenol von 5 mg/l an akut giftig, doch schade es auch noch in viel geringeren Konzentrationen. SIERP (1940) setzt 5–10 mg/l als schädliche bzw. tödliche Konzentrationen für Forellen, Hechte und Karpfen an. Eine gewisse Klärung in die widerspruchsvollen Angaben über die Giftigkeit phenolhaltiger Industrieabwässer brachte endlich EBELING (1939/40), der darauf hinwies, daß oft nicht der Phenolgehalt der Abgänge, sondern andere Verbindungen (Naphthalin, Zyanide, Kresole usw.) entscheidend für die Wirkung auf Fische anzusehen sind. Er fand experimentell, daß 10–15 mg/l tödlich auf Aale, Schleien und Karpfen wirkten, 5 mg/l jedoch wirkungslos waren. Geschmacksbeeinträchtigungen mittels reinen Phenols traten in Konzentrationen unter 25 mg/l nicht ein. Die in der Arbeit von SOUTHGATE, PENTELOW und BASSINDALE (1933) postulierte hohe Giftigkeit von Phenol (Forellen wurden mit 0,4 bis 0,6 mg/l in 8 h 20 min letal geschädigt) ist zweifellos auf Begleitsubstanzen in den geprüften Wässern zurückzuführen. Auch die von HART (1946) genannten Konzentrationsgrenzen von 1–10 mg/l für schädliche Wirkungen sind vermutlich nicht auf reines Phenol zu beziehen. ELLIS (1937) fand, daß 10 mg/l Goldfische töten, und DEMYANENKO (1933) gibt 16,6–20 mg/l als tödliche Dosen an; einzelne Fische sollen jedoch in 15 mg/l überleben. COLE (1942) faßt das neuere amerikanische Schrifttum zusammen, wobei besonders die Angabe von SHELFORD (1917) auffällt, der beobachtete, daß Sonnenbarsche (*Lepomis humilis*) von 0,7 mg/l in einer Stunde getötet wurden. COLE gibt im weiteren eine reichhaltige Skala von toxischen Konzentrationen wieder, die sich zwischen 5 und 20 mg/l bewegen.

Nicht minder unklar sind auch die wenigen Angaben über die Wirkungsweise des Phenols. Wir sind zum Schlusse gekommen, daß hierüber eine gesonderte Untersuchung durchgeführt werden muß und verzichten deshalb auf eine Würdigung der einschlägigen Literatur an dieser Stelle.

2. Untersuchungsmethoden und Beurteilungsgrundsätze

Gemäß einer früheren Arbeit (WUHRMANN und WOKER, 1948) betrachten wir die sogenannte *Manifestationszeit* als wichtigste Maßzahl für die Wirksamkeit eines Fischgiftes. Sie ist definiert als diejenige Zeit, während welcher ein Gift auf die Tiere einwirken muß, bis sie zu selbständigen, koordinierten Bewegungen unfähig werden. Nach Ablauf der Manifestationszeit, deren Dauer von der Konzentration und den spezifischen Eigenschaften der Gifte bestimmt ist, sind die Fische nicht mehr in der Lage, sich zum Beispiel aus einem vergifteten Wasser zu flüchten. In einem Fluß werden sie dann von einer «Giftwelle» mitgetragen und verbleiben somit in der giftigen Lösung, bis diese durch Verdünnung oder wegen chemischer Umsetzungen unwirksam wird. Ist die Länge einer Giftwelle in einem Gewässer so groß, daß ihre Fließzeit in einem bestimmten Punkte die Manifestationszeit für das von der Welle mitgetragene Gift gegebener Konzentration übersteigt, muß praktisch mit dem Tode der von ihr erfaßten Fische gerechnet werden. Für das Ausmaß der Vergiftung ist dabei allerdings die große individuelle Verschiedenheit in der Empfindlichkeit scheinbar gleichartiger Fische zu berücksichtigen (WUHRMANN und WOKER, 1950).

Die nachstehend beschriebenen Experimente erfolgten bei den geprüften *Bachforellen* (*Trutta fario* L.), *Alet* (*Squalius cephalus* Heck) und *Egli* (*Perca fluviatilis* L.) mit der früher beschriebenen Methodik in einem Bade, das hinsichtlich seines Sauerstoffgehaltes, der Temperatur, des p_H , der Wasserhärte und der Giftkonzentration innert engster Grenzen während eines Versuches konstant gehalten wurde. Dank einer lebhaften Strömung im Versuchsbehälter konnten die Manifestationszeiten der Versuchstiere genau festgelegt werden. Weitere Experimente wurden mit *Elritzen* (*Phoxinus laevis* Ag.) in Glasaquarien von rund 6 l Inhalt durchgeführt. Die Durchlüftung der Behälter mittels Druckluft sorgte auch hier für eine geeignete Wasserbewegung, um den Moment des «Passivwerdens» der Fische zu beobachten. Die Elritzen wurden vor allem deswegen untersucht, um ihre Empfindlichkeit im Verhältnis zu den anderen Arten zu prüfen, da aus methodischen Gründen eine Beschränkung späterer Experimente auf eine einzige Kleinfischart erwünscht war.

Neben der Messung der Manifestationszeit erfolgte gelegentlich auch die Bestimmung der Todeszeit bei Verbleiben der Tiere in der Giftlösung bzw. die Prüfung der Erholungsfähigkeit nach Umsetzen in Frischwasser.

Die Versuche wurden mit *reinem, synthetischem Phenol* ausgeführt. Während bei den Experimenten mit relativ hohen und entsprechend rasch wirkenden Phenolkonzentrationen keine besonderen Schwierigkeiten auftraten, häuften sie sich dagegen bei Versuchen in verdünnten Lösungen mit einer Dauer von über 24 Stunden, da dann die Phenolkonzentrationen trotz mannigfacher Hilfsmittel nicht sehr genau aufrechterhalten werden konnten. Die leichte Oxydierbarkeit der Verbindung, ein gewisser biologischer Abbau und die Absorption durch die Versuchsfische bewirkten ein mehr oder weniger rasches Absinken der Konzentration. Wir vermuten, daß ein Teil der widerspruchsvollen Literaturangaben über die Giftigkeit der Substanz einer ungenügenden Kontrolle der Phenolkonzentration in älteren Experimenten zuzuschreiben ist.

3. Chemische Grundlagen

Phenol ist eine schwache Säure und entsprechend seiner Dissoziation ist je nach p_H -Wert der wäßrigen Lösung mit unterschiedlichen Verhältnissen von undissoziiertem Phenol bzw. Phenolationen als Giftkomponenten zu rechnen. Für die Dissoziationskonstante K_s

finden sich in der Literatur verschiedene Werte. Einige davon sowie Angaben über ihre Temperaturabhängigkeit sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die hälftige Neutralisation des Phenols in Wasser liegt somit bei einem p_H von ca. 10. Die bei Vernachlässigung des Temperatureinflusses entstehenden Fehler in der Berechnung der Phenol- bzw. Phenolatkonzentra-

Tabelle 1

Dissoziationsgrad von Phenol

Autor	Temperatur in °C	K_s	p_K
KOLTHOFF (1927)		$1,30 \cdot 10^{-10}$	9,81
MICHAELIS und RONA (1909)	17	$0,6 \cdot 10^{-10}$	10,22
KENDALL (1917)	25	$1,1 \cdot 10^{-10}$	9,96
LUNDÉN (1910)	10	$0,56 \cdot 10^{-10}$	10,22
	15	$0,66 \cdot 10^{-10}$	10,15
	20	$0,97 \cdot 10^{-10}$	10,0

tion einer Lösung sind ebenfalls bei ca. p_H 10 am größten, können jedoch bei p_H 8,5 vernachlässigt werden. Die Experimente wurden stets bei p_H -Werten der Versuchslösungen zwischen 7 und 8 durchgeführt, d. h. im Bereich des *undissoziierten* Phenols. Einige Versuche zur Abklärung der Wirkung des Phenolations (Untersuchungen in Lösungen konstanten Phenolgehaltes aber bei steigenden p_H -Werten) ergaben innerhalb des experimentell zugänglichen Bereiches (etwa bis p_H 9,5) keine besonderen Ergebnisse.

Tabelle 2

Summarische Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Allgemeine Bedingungen: Temperatur 14°C; p_H 7,5–8; Karbonathärte 15–16 französische Härtegrade; O₂ 90–100% Sättigung

Bachforellen, <i>Trutta fario</i> L.					Alet, <i>Squalius cephalus</i> Heck				
Phenol mg/l	$\bar{t}_M$ min	s^4 $\pm$ min	Fische		Phenol mg/l	$\bar{t}_M$ min	s $\pm$ min	Fische	
			♂	♀				♂	♀
5,3	∞	0	1	2	0,2	∞	0	2	2
6,3	∞	0	1	2	6,8	∞	0	2	2
9,3	2h bis ∞^1)	∞	3	2	9,3	∞	0	1	2
9,6	216	106	3	3	9,6	9h bis ∞^2)	∞	2	1
10,2	51	19,3	4		10,9	6h bis ∞^3)	∞	3	2
10,9	45	10,1	2	2	12,2	46	10	3	1
13,1	11	2,7	2	1	13,1	51	9,9	1	3
14,2	8	2,2	3	1	16,0	26	18,9	1	3
20,4	8	2,4	3	1	16,1	37	4,3	2	2
22,2	8	2,4	3	1	16,2	31	15,6	2	2
40,2	3,5	0,6	4		20,0	19	3,2	2	2
41,7	3	0,6	3	1	20,4	16	1,5	3	1
97,0	2,6	0,8	5		21,1	10	6,3	1	3
197,4	2,0	0,8	3		22,2	15	1,6	4	
					26,1	7	1,4		4
					33,0	6	1,6	1	2
					41,7	5	1,0	2	3
					70,8	3	0,7	2	3
					97,0	2,2	0,8	2	3
					153,4	2,2	0,4	2	3
					197,4	1,8	0,8	1	4
Mittleres Gewicht in g			199	233				206	185
Mittlere Länge in cm			29,6	27,9				24,9	25,3

¹⁾ 2 Stück nicht manifest, Reaktion unscharf.

²⁾ 3 Stück nicht manifest, Reaktion unscharf.

³⁾ 3 Stück nicht manifest, Reaktion unscharf.

⁴⁾ Streuung $s^2 = \frac{1}{N-1} (t_M - \bar{t}_M)^2$, worin: N = Zahl der Fische, t_M = einzelne Manifestationszeiten, $\bar{t}_M$ = arithmetisches Mittel der t_M .

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Summarische Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Egli, <i>Perca fluviatilis</i> L.				Elritzen, <i>Phoxinus laevis</i> Ag.			
Phenol mg/l	$\bar{t}_M$ min	s ± min	Fische ♂ + ♀	Phenol mg/l	$\bar{t}_M$ min	s ± min	Fische ♂ + ♀
9,14	∞	0	5	7,4	∞	0	10
15,2	96	96	5	11,3	∞	0	10
16,8	49	14	5	18,0	355	71	10
20,25	34	6	5	28,3	29	21	10
26,5	16	3,6	5	34,5	14,2	8,2	10
41,0	8,2	1,5	5	45,6	9,7	5,3	10
70,2	6,2	1,3	5	54,8	8,4	4,0	10
103	4,2	0,9	5	79,5	6,1	2,5	10
222	4	0,9	5	111	4,0	0,8	10
				248	2,5	1,1	10
Mittleres Gewicht in g			30,9				1,8
Mittlere Länge in cm			14,6				6,0

Phenolbestimmung

Den Anforderungen an eine quantitative, rasche Bestimmungsmethode entsprach am besten die kolorimetrische Messung mit dem von FOLIN (1920) angegebenen und von CIOCALTEU (1927) verbesserten Reagens. Es ist allerdings für Phenol nicht spezifisch, sondern wird in alkalischer Lösung noch von einer Reihe anderer Verbindungen reduziert. Es konnte aber mit guten Gründen angenommen werden, daß unter unseren Versuchsbedingungen die mit der mangelnden Spezifität verbundene Ungenauigkeit vernachlässigbar klein blieb. Unsere Vorschrift für die Analyse lautete:

Sofort nach Entnahme einer Wasserprobe werden 25 cm³ in einen 100-cm³-Erlenmeyerkolben abpipettiert und mit 10 cm³ 15prozentiger Sodalösung versetzt. Unter kräftigem Umschwenken werden 0,5 cm³ Folin-Ciocalteu-Reagens tropfenweise zugesetzt, worauf das Kölbchen mit einem Schliffstopfen verschlossen wird. Die höchste Farbintensität wird nach zirka 1¼ Stunden erreicht. Messungen, die stets nach genau 60 Minuten vorgenommen werden, ergeben aber ebenfalls bereits gute, reproduzierbare Resultate. Die kolorimetrische Bestimmung wird bei $\lambda = 515 \text{ m}\mu$ durchgeführt. Für Lösungen mit rund 5 mg/l Phenol beträgt die Streuung bei Verwendung eines lichtelektrischen Kolorimeters z. B. $\pm 0,038 \text{ mg/l}$.

4. Versuchsergebnisse

Gemäß der Zusammenstellung in Tabelle 2, Abb. 1 und Abb. 2, besitzt die Konzentrations-Wirkungs-Funktion für alle drei Fischarten grundsätzlich gleichartigen Charakter.

Abb. 1. Berechnete Konzentrations-Wirkungs-Kurven von *Trutta* und *Perca* (kräftige Linien). Dünne Kurven: Begrenzung des wahrscheinlichsten Streuungsbereiches für 95 von 100 Mittelwerten bei Versuchen mit derselben Konzentration. Abszisse: Phenolkonzentration in Milligramm pro Liter. Ordinate: Manifestationszeit in Minuten. ○, △ = Experimentelle Mittelwerte.

Innerhalb eines sehr geringen Konzentrationsbereiches nimmt die Giftigkeit des Phenols sprunghaft zu, um sodann bei weiteren Konzentrationssteigerungen nurmehr eine unwesentliche Verkürzung der Manifestationszeiten hervorzurufen. Die für *akute* Vergiftungen (vgl. die Definition in unserer 2. Mitteilung, 1948) gerade noch wirksamen Konzentrationen

(Schwellenwerte) sind für unsere Versuchsbedingungen ($t = 14^{\circ} \text{C}$, $p_{\text{H}} = 7-8$, $\text{O}_2 = 9-10 \text{ mg/l}$) folgendermaßen zu veranschlagen:

Bachforellen	9-10 mg/l
Alet	9-10 mg/l
Elritzen	ca. 17 mg/l
Egli	ca. 12 mg/l

Abb. 2. Berechnete Konzentrations-Wirkungs-Kurven von *Squalius* und *Phoxinus* (kräftige Linien). Dünne Kurven: Begrenzung des wahrscheinlichsten Streuungsbereiches für 95 von 100 Mittelwerten bei Versuchen mit derselben Konzentration. Abszisse: Phenolkonzentration in Milligramm pro Liter. Ordinate: Manifestationszeit in Minuten. ○, Δ = Experimentelle Mittelwerte.

Die vorstehenden Schwellenwerte sind allerdings mit den Vorbehalten über die Genauigkeit der Messungen gemäß Abschnitt 5 zu beurteilen. Die für die Praxis bedeutsamste Beobachtung bei Phenolvergiftungen besteht wohl darin, daß innerhalb eines Konzentrationsbereiches von wenigen Milligramm pro Liter die Vergiftungszeit von mehreren Stunden auf

wenige Minuten sinkt. Die widerspruchsvollen Literaturangaben über die Giftigkeit von Phenol finden damit eine gewisse Erklärung, denn es ist einleuchtend, daß unter diesen Umständen nur mittels definierter *Konzentrationsreihen* ein zutreffendes Bild über die Giftwirkung einer Substanz erhalten werden kann.

5. Quantitative Auswertung der Messungen

a) Die Konzentrations-Wirkungs-Funktion

SHAKELL (1923) fand bei Vergiftungsversuchen an *Limnoria* (kleiner mariner Bohrkrebs in Holz) mit verschiedenen Phenolen, daß die Zeit bis

Abb. 3. Erklärung im Text.

zum Eintritt von (reversiblen) Lähmungen der Tiere gemäß einer Exponentialfunktion von der Giftkonzentration abhängig war. Ferner zeigt Phenol gegenüber Bakterien eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die mit unseren vorliegenden Beziehungen große Ähnlichkeit zeigt. Die bakteri-zide Wirkung von Phenol folgt einer hyperbolischen Funktion der allgemeinen Form

$$t c^n = K, \quad (1)$$

worin: c = Konzentration

t = Zeit bis zur Tötung aller Keime bei der Konzentration c des Desinfektionsmittels

n und K = Konstanten

In dieser einfachen Form wird die Beziehung unseren Beobachtungen bei der Vergiftung von Fischen mittels Phenol nicht gerecht, da die Gifte einen Schwellenwert besitzen, unterhalb dessen keine Wirkung mehr eintritt, und ferner eine minimale Vergiftungszeit auch bei sehr hohen Phenolkonzentrationen nicht unterschritten wird. Die Funktion $c^n t = K$, die eine Hyperbel mit rechtwinkligen Asymptoten (mit den Koordinatenachsen zusammenfallend) darstellt, erfährt damit eine Translation um den Betrag der «unwirksamen» Konzentration c_s (Schwellenwert) und der «minimalen» Reaktionszeit t_s (vgl. Abb. 3). Die Funktion lautet somit

$$(t_M - t_s) (c - c_s)^n = K. \quad (2)$$

Logarithmierung und Umstellung führt zu

$$\log (t_M - t_s) = h - n \log (c - c_s), \quad (3)$$

d. h. der Gleichung einer Geraden.

Es zeigt sich nun, daß die Meßergebnisse in Tabelle 2 sich in befriedigender Weise durch die vorstehende Funktion zusammenfassen lassen. Die lineare Regression der den Logarithmen der einzelnen Giftkonzentrationen (vermindert um den Schwellenwert) zugehörigen Logarithmen der Manifestationszeiten (vermindert um die minimale Reaktionszeit) ist bei allen

Tabelle 3

Konzentrations-Wirkungs-Funktionen für Elritzen, Alet, Egli und Bachforellen

	Elritzen	Alet
Funktion $t_M = f(c)$. .	$(t_M - 1) (c - 17)^{1,158} = 438$	$(t_M - 9) (c - 9,5)^{1,003} = 142$
Regressionsgerade . . .	$\log (t_M - 1) =$ $2,642 - 1,158 \cdot \log (c - 17)$	$\log (t_M - 1) =$ $2,162 - 1,003 \cdot \log (c - 9,5)$
Bestimmtheit B	0,989	0,956
Korrelationskoeffizient $r = \sqrt{B}$	0,994	0,978
	Egli	Bachforellen
Funktion $t_M = f(c)$. .	$(t_M - 3) (c - 12)^{1,202} = 344$	$(t_M - 2) (c - 9)^{1,128} = 70,2$
Regressionsgerade . . .	$\log (t_M - 3) =$ $2,536 - 1,202 \cdot \log (c - 12)$	$\log (t_M - 2) =$ $1,846 - 1,128 \cdot \log (c - 9)$
Bestimmtheit B	0,990	0,958
Korrelationskoeffizient $r = \sqrt{B}$	0,995	0,979

vier untersuchten Fischarten recht genau, wie die Zusammenfassung der Regressionskoeffizienten n , ihrer Bestimmtheiten B und Korrelationskoeffizienten r in Tabelle 3 zeigt.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Abb. 1 und 2 sind entsprechend den in Tabelle 3 berechneten theoretischen Funktionen gezeichnet. Sie schmiegen sich in guter Annäherung den experimentell ermittelten Meßwerten aus Tabelle 2 an. Eine bessere Übereinstimmung ist in Anbetracht der großen Streuungen bei Vergiftungsversuchen nicht zu erwarten, wie dies in unseren früheren Arbeit nachgewiesen wurde (WUHRMANN und WOKER, 1950).

Wir lehnen es ab, die gefundenen Funktionen in physiologischer Hinsicht zu deuten. Die Fischvergiftung ist ein komplexer Vorgang, oder, mit anderen Worten, der Zusammenhang zwischen Giftkonzentration und Wirkungszeit ist der Ausdruck des Zusammenwirkens so verschiedenartiger chemisch-physikalischer, stoffwechselchemischer und evtl. auch sinnesphysiologischer Teilreaktionen, daß es wenig sinnvoll wäre, den Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Funktion in mechanistischer Weise dafür zu benützen, eine physikalisch-chemische «Erklärung» der Giftwirkung daraus abzuleiten. Zu dieser Folgerung wird man auch gezwungen, wenn man die große Zahl von gleichartigen Konzentrations-Wirkungs-Funktionen unterschiedlichster Pharmaka berücksichtigt, wie sie zum Beispiel bei CLARK (1937) zusammengestellt sind. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß dieser Analogie der Wirkungsfunktionen entsprechend gleichartige Wirkungsmechanismen zugrunde liegen.

Die einfache lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Giftkonzentration und dem Logarithmus der Manifestationszeit erleichtert jedoch die Auswertung der Messungen erheblich, indem

1. ein quantitativer Vergleich zwischen den Reaktionen verschiedener Fischarten gegenüber dem Gifte möglich wird;
2. die Interpolation von Manifestationszeiten für Giftkonzentrationen, die experimentell nicht geprüft wurden, mit großer Annäherung erfolgen kann;
3. reelle Unterschiede in der Reaktionsweise verschiedener Fischarten mittels einfacher statistischer Methoden ermittelt werden können, auch wenn wegen der großen Streuungen der Einzelmessungen das Versuchsmaterial unübersichtlich ist.

Die Resultate in Tabelle 2 sollen im Hinblick auf die vorstehenden Punkte 1 und 3 nun noch genauer untersucht werden.

b) Beurteilung der quantitativen Unterschiede in der Reaktion der einzelnen Fischarten

Man kann zunächst auf Grund der Streuungen in den einzelnen Experimenten berechnen, in welchem Maße die Manifestationszeiten für jede Giftkonzentration um die Regressionslinie streuen müßten, wenn man eine sehr große Zahl von Versuchen ausführen würde. Der sich daraus er-

Tabelle 4

Statistische Prüfung der Versuchsergebnisse

	Alet	Bachforellen	Elritzen	Egli
Streuung der Werte $\log(t_M - t_s)$ um die Re- gressionsgerade, $P = 0,05$	$\pm 0,246$	$\pm 0,357$	$\pm 0,190$	$\pm 0,164$
Verschiedenheit der Regres- sionskoeffizienten oder «Wirkungsgradienten» n :				
«Wirkungsgradient» n .	- 1,003	- 1,128	- 1,158	- 1,202
Streuung der Differenz $n_{For} - n_{Alet}$ bzw. $n_{Elr} - n_{For}$	$s_{d1}^2 = 0,00945$	$s_{d2}^2 = 0,01386$		
Freiheitsgrade	$N = 22$	$N = 13$		
$t_1 = \frac{n_{For} - n_{Alet}}{s_{d1}}$ bzw.				
$t_2 = \frac{n_{Elr} - n_{For}}{s_{d2}}$	$t_1 = 13,227$	$t_2 = 2,164$		
$t_{0,05}$ } (Tabellenwerte) {	$t = 2,074$	$t = 2,160$		
$t_{0,01}$ }	$t = 2,819$	$t = 3,012$		
Unterschied zwischen Wirkungsgradienten	$n_{Alet} < n_{For}$: gesichert $n_{For} < n_{Elr}$: nicht gesichert			$n_{Alet, For, Elr}$ $< n_{Egli}$: gesichert

gebende Bereich, in welchem wir beispielsweise 95% ($P = 0,05$) aller Mittelwerte zu erwarten hätten, ist in Abb. 1 und 2 für jede Fischart eingezeichnet. Die numerischen Werte der wahrscheinlichen Streuungen von $\log(t_M - t_s)$ für die Voraussetzung eines $P = 0,05$ finden sich in Tabelle 4.

Aus Abb. 1 ergibt sich sofort, daß gleiche Manifestationszeiten bei den Bachforellen in einem wesentlich niedrigeren Konzentrationsbereich erhalten werden als bei den Egli. Bei Phenolkonzentrationen im unmittelbaren Bereich der Schwellenwerte ist die Differenz allerdings gering, sie

nimmt mit steigender Giftkonzentration aber progressiv zu. Der Vergleich zwischen Alet und Elritzen (Abb. 2) zeigt insofern das umgekehrte Bild, als diese beiden Arten in sehr hohen Konzentrationen annähernd gleichartig reagieren. Die Elritzen zeigen aber unterhalb 40–50 mg Phenol pro Liter eindeutig wesentlich längere Manifestationszeiten als die Alet. In Tabelle 5 sind für einzelne Giftkonzentrationen die Manifestationszeiten, wie sie sich rechnerisch ergeben, nochmals zusammengestellt.

Tabelle 5

Vergleich der wahrscheinlichsten Manifestationszeiten (aufgerundet) von Bachforellen, Alet, Egli und Elritzen bei einigen Phenolkonzentrationen ($t = 14^{\circ}\text{C}$)

Phenol- konzentrationen	Manifestationszeiten t_M (Minuten) bei			
	Bachforellen	Alet	Egli	Elritzen
9 mg/l	∞	∞	∞	∞
9,5 mg/l	156	∞	∞	∞
10 mg/l	72	147	∞	∞
15 mg/l	11	30	95	∞
20 mg/l	7	15	38	124
40 mg/l	3	6	9	12

Von Interesse sind im weiteren die Verschiedenheiten bei den *Exponenten* der Konzentrations-Wirkungs-Funktionen der einzelnen Fischarten. Dieser Exponent gibt die Konzentrationsstufe an, welche durchschritten werden muß, um eine bestimmte Verlängerung (oder Verkürzung) der Manifestationszeit zu erreichen. Er entspricht dem Tangens der linearen (bi-logarithmischen) Wirkungsfunktion (Tabelle 3). Je größer dieser Exponent n ausfällt, um so größer ist der Einfluß einer bestimmten Konzentrationserhöhung bzw. Erniedrigung auf den Wert der Manifestationszeit. Wir bezeichnen den Exponenten unserer Hyperbelfunktionen der Kürze halber vorläufig mit «Wirkungsgradient».

Die Bedeutung dieser Größe wird anschaulicher, wenn man folgende Frage untersucht: bei der Giftkonzentration $c - c_s$ sei die Manifestationszeit $t_M - t_s$. Wenn man nun die Konzentration auf das p -fache erhöht, in welchem Verhältnis steht dann die neue Manifestationszeit $(t_M - t_s)'$ zu $t_M - t_s$? Die Berechnung aus Gleichung (2) ergibt sofort:

$$\frac{(t_M - t_s)'}{t_M - t_s} = p^{-n}.$$

Von MIESCHER (1940) wurde vorgeschlagen, den *Konzentrationsverdopplungskoeffizienten* D_c einzuführen, d. h. $p = 2$ zu setzen. Führt man die Rechnung durch, so findet man folgende Werte:

D_c für Alet	0,49
Bachforellen	0,45
Elritzen	0,44
Egli	0,43

Bei den geprüften Arten sinkt die Manifestationszeit (abzüglich Schwellenwert) auf das rund 0,4–0,5fache ab, wenn man die Phenolkonzentration (abzüglich Schwellenwert) verdoppelt. Die Differenzen zwischen den verschiedenen Fischarten sind gering. Immerhin zeigt die statistische Prüfung gemäß Tabelle 4, daß der Unterschied in der Größe der Wirkungsgradienten n bei Alet und Bachforellen als gesichert betrachtet werden muß, die Alet somit auf eine Erhöhung der Giftkonzentration stets etwas weniger empfindlich reagieren als Bachforellen. Zwischen Forellen und Elritzen ist die Differenz im Werte von n ungenügend gesichert, dagegen erweist sich der Wirkungsgradient der Egli in statistisch gesicherter Weise größer als bei den drei anderen Arten.

Es ist sowohl von praktischem wie auch experimentellem Interesse, noch die *Streuungen der Manifestationszeiten* der drei Fischarten zu vergleichen. Aus den Spalten s in Tabelle 2 ergibt sich ohne weitere Rechnung, daß Alet, Forellen und Egli individuelle Verschiedenheiten von ungefähr gleicher Größenordnung aufweisen. Elritzen reagieren dagegen bedeutend ungleichmäßiger, was wir auch schon bei anderen Giften beobachten konnten. Es ist deshalb angezeigt, von dieser Art mindestens 10 Fische pro Versuch zu verwenden, wie dies bereits in unserer 4. Mitteilung festgestellt wurde. Welche physiologischen Ursachen im übrigen die Inhomogenität unseres Elritzenmaterials bedingen, ist unabgeklärt.

6. Verhalten der Versuchsfische bei der Vergiftung

Sämtliche in Phenollösungen beobachteten Fischarten reagieren ungefähr gleichartig auf das Gift (neben Forellen, Alet, Egli und Elritzen wurden gelegentlich auch Rotaugen, Hasel, Barben usw. in einzelnen Exemplaren geprüft). Unmittelbar nach Einsatz in die Versuchslösung verhalten sie sich zunächst ruhig. Die Atemfrequenz erscheint aber vom ersten Augenblicke der Giftberührung an wesentlich beschleunigt und die Atemzüge vertieft. Die Eintrittszeit äußerlich wahrnehmbarer Vergiftungserscheinungen ist somit praktisch gleich null (analog wie z. B. bei Blau-

säure). Je nach der angewendeten Konzentration des Phenols beginnt mehr oder weniger bald (bei über 40 mg/l schon nach 1 Minute, bei ca. 10–15 mg/l nach ca. 10 Minuten) eine wachsende Unruhe, die sich bis zu wildem Umherschließen im Versuchsbassin steigert. In dieser Erregungsphase springen die Fische jedoch selten über die Wasseroberfläche hinaus (im Gegensatz zur Ammoniakvergiftung). Wir vermeiden es ausdrücklich, diese Reaktion mit «Fluchtversuchen» zu identifizieren, da die Versuchsanordnung nicht gestattet, ein solches Verhalten zu beweisen, und wir aus anderen Experimenten im Gegenteil den bestimmten Eindruck erhielten, daß *sowohl bei Phenoleinwirkung wie auch in anderen Giftbädern die Bewegungen der hochgradig vom Gifte erregten Fische nicht gerichteten Charakter besitzen*. Speziell angelegte Versuche zur Abklärung dieser praktisch wichtigen Frage sind noch im Gange. Enthält die Lösung mindestens 15 mg/l Phenol (bei Alet und Forellen) bzw. ca. 20 mg/l (Elritzen), so kommen die Tiere, nachdem die Erregung einmal eingesetzt hat, nicht mehr zur Ruhe, sondern beginnen nach einiger Zeit zu torkeln. Sehr häufig (nicht immer) nehmen sie eine senkrechte Haltung ein und schnappen krampfhaft nach Luft, wobei der Kopf oft über die Wasseroberfläche hinausragt. Bei zunehmender Ermattung kippen sie schließlich in die Rückenlage um. Aus diesem Stadium schrecken sie fast immer noch ein bis mehrere Male auf, um schließlich manifest geschädigt auf dem Rücken zu treiben. Die Atmung bleibt fortwährend stark intensiviert. Auch im manifesten Zustande hält vorerst ihre krampfhaft Beschleunigung noch an, wird dann aber schwächer, bis die Tiere endlich (abgesehen von gelegentlichen leisen Zuckungen) unbeweglich daliegen. Sie zeigen dann im allgemeinen typische «Erstickungsmerkmale», wie tief heruntergedrückter Mundboden, abstehende Operkel und oft weit aufgerissenes Maul. In verdünnten Lösungen folgen auf die ersten Erregungsstadien immer wieder ruhigere Phasen, in denen sich die Fische fast unbeweglich, aber krampfhaft atmend, an Boden oder Wänden der Versuchsbehälter anlehnen. Doch auch in diesem Zustande sind sie äußerst schreckhaft, und der geringste Anlaß, wie etwa leichte Erschütterungen oder dergleichen, bringen sie sofort wieder in höchste Erregung. Die Empfindlichkeit gegenüber Phenol hält auch bei Konzentrationen an, die unter 10 mg/l liegen. Mit zunehmender Verdünnung des Giftes vermindern sich jedoch Häufigkeit und Intensität der aufeinanderfolgenden Erregungsphasen.

Eine spezielle Prüfung über die *Erholungsfähigkeit* der Fische nach längerem Phenolkontakt wurde nicht vorgenommen. Die gelegentlichen Beobachtungen zeigten, daß, ähnlich wie bei den Versuchen von SHAKELL an

Limnoria, auch bei den Fischen die Letalphase erst längere Zeit nach bereits eingetretener Manifestation beginnt. Die Erholung der Tiere scheint zum mindesten nach Vergiftung in den niedrigeren Phenolkonzentrationen ziemlich leicht möglich zu sein (Verhältnisse somit ähnlich wie bei Blausäure).

Die tödlich geschädigten Fische verfallen in einen eigenartigen Krampfzustand, der die Starre, wie sie bei Ammoniakvergiftungen regelmäßig eintritt, noch übertrifft. Ferner sind die Tiere nach dem Tode, vor allem wenn sie in der Phenollösung liegenbleiben, auffallend hell gefärbt. Beide Beobachtungen stimmen mit früheren Angaben STEINMANN'S (1927) überein. In den hohen Phenolkonzentrationen sezernieren Forellen und Alet oft große Mengen von Schleim, und die Kiemen toter Fische waren gelegentlich in eine so dicke Schleimschicht eingehüllt, daß sie unter dem Kiemendeckel hervorquoll. HEFFTER (1936) machte ebenfalls auf die vermehrte Hautsekretion bei Phenolvergiftungen aufmerksam. Wir hofften, diese verstärkte Tätigkeit der Schleimdrüsen zur postmortalen Diagnose von Phenolvergiftungen verwenden zu können. Eine eingehende histologische Nachprüfung an zahlreichen Fischen ergab leider, daß die erhöhte Schleimsekretion keineswegs regelmäßig eintritt und sich im allgemeinen die Drüsenzellen der Epidermis und Kiemen gegenüber unbehandelten Fischen nicht eindeutig als verändert erwiesen.

Angesichts der noch herrschenden Unklarheiten über die physiologische Wirkung des Phenols im Fischkörper verzichteten wir auf eine weitergehende Diskussion der Ergebnisse. Vertiefte Kenntnisse in dieser Richtung sind vermutlich erst nach eingehenden vergleichenden Experimenten mit anderen Benzolderivaten und mehrwertigen Phenolen möglich, für welche in den Arbeiten von SHAKELL (1923), HUBAULT (1937), GERSDORFF und SMITH (1941), CORTI (1949) und anderen erste Anhaltspunkte zu finden sind.

SUMMARY

The toxicity of phenol for different fish species

(1) The relation between concentration and reaction time in solutions of pure, synthetic phenol was established for adult *Trutta fario* L., *Squalius cephalus* Heck, *Perca fluviatilis* L., and *Phoxinus phoxinus* Ag. (Minnows), the experimental conditions being kept as constant as possible (Table 2).

(2) The action of phenol (scale: manifestation time in minutes) follows a hyperbolic function and may be expressed by a linear relation, provided that threshold

concentrations and minimum reaction times are subtracted from the experimental values (Table 3, Fig. 1 and 2).

(3) The relative «sensitivity» of the different species in phenol is discussed on the base of a statistical analysis of the experimental results.

LITERATURVERZEICHNIS

- CIOCALTEU, V., J. Biol. Chem. 73, 227 (1927).
COLE, A. E., *Symposium on Hydrobiology* (Madison, Wisc., 1941).
CORTI, U. A., C. r. XXII^e Congrès int. Chim. ind. (1949) (im Druck).
CZENSNY, R., Jb. Vom Wasser 3, 206 (1929); 8, 108 (1934).
DEMYANENKO, V., zitiert nach Chem. Abstr. 27, 2 (1933).
EBELING, G., Jb. Vom Wasser 14, 81 (1939/40).
ELLIS, M. M., U. S. Dept. Commerce, Bull. Bur. Fisheries 48, 22 (1937).
FOLIN, O., und WU, H., J. Biol. Chem. 43, 189 (1920).
GERSDORFF, W. A., und SMITH, L. E., Am. J. Pharm. 112, 4, 8, 10 (1941).
HART, W. B., Nat. Pet. News Techn. Sect. 38, 32 (1946).
HEFFTER, A., *Handbuch der experimentellen Pharmakologie* (Berlin 1923).
HELFER, H., Kl. Mitt. Ver. f. Wasser-, Boden- u. Lufthygiene 12, 32 (1936).
HOLZINGER, K., Z. Fischerei 25, Heft 1 (1927).
HUBAULT, E., Extr. Ann. Physiol. 13, 2 (1937).
KALABINA, M. M., Z. Fischerei 33, 295 (1935).
KENDALL, J., J. Am. Chem. Soc. 39, 7 (1917).
KOLTHOFF, J. M., *Die Maßanalyse* (Berlin 1927).
LIEBIG, J., zitiert nach DECLAT, *Traité de l'acide phénique* (Paris 1874).
LUNDÉN, H., Z. Phys. Chem. 70, 251 (1910).
MICHAELIS, L., und RONA, P., Biochem. Z. 23 (1909).
MIESCHER, K., Helv. Med. Acta 7, Suppl. Bd. IV (1940/41).
SHAKELL, L. F., J. Gen. Physiol. 5, 783 (1923).
SHELFORD, V. E., Ill. State Lab. Nat. Hist. Bull. 11, 381 (1917).
SIERP, F., *Handbuch der Lebensmittelchemie* (Berlin 1940).
SOUTHGATE, B. A., PENTELow, F. T. K., und BASSINDALE, R., Biochem. J. 27, 983 (1933).
STEINMANN, P., *Toxikologie der Fische*, in: *Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas*, Bd. 4 (Stuttgart 1927).
WEIGELT, C., Arch. Hygiene 3, 39 (1885).
WUHRMANN, K., und WOKER, H., Schweiz. Z. Hydrol. 11, 210 (1948).
WUHRMANN, K., und WOKER, H., Schweiz. Z. Hydrol. 12 (1950).