

Department für Ökologie und Ökosystemmanagement, Fachgebiet
Limnologie an der Limnologischen Station Iffeldorf

und

Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, Heinz Nixdorf-
Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

Technische Universität München

***Entwicklung eines online Gewässermonitoring-
systems mittels Biosensorchips zum Nachweis
ausgewählter Xenobiotika***

Torsten Stadthagen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Wei-
henstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wilfried Huber

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Arnulf Melzer

2. Univ.-Prof. Dr. Bernhard Wolf

Die Dissertation wurde am 25.05.2007 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Wei-
henstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.08.2007 an-
genommen.

Inhalt

1	EINLEITUNG	7
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	ALGENKULTUREN.....	18
2.1.1	Anzucht von Algenmonokulturen aus Freilandisolaten	18
2.1.1.1	Probenahme und Probenaufbereitung.....	18
2.1.1.2	Isolierung der Algenindividuen.....	19
2.1.2	Anzucht von Algenmonokulturen aus gekauften Kulturen.....	20
2.1.3	Methoden zur Züchtung von Algenmonokulturen.....	20
2.1.4	Kontrolle der Algenkulturen.....	23
2.1.4.1	Eichgerade.....	23
2.1.4.2	Vitalitätsparameter	24
2.1.5	Kulturmedien.....	25
2.1.6	Mit Bakterien kontaminierte Algenkulturen.....	32
2.1.6.1	Chloramphenicol	33
2.1.6.2	Cefotaxime	34
2.1.6.3	Filtration	34
2.2	DAS IMOLA-MESSSYSTEM	35
2.2.1	Technischer Aufbau und Funktionsweise des IMOLA-Messsystems	36
2.2.2	Technischer Aufbau und Funktionsweise des Biosensorchips.....	39
2.2.3	Biologischer Testorganismus.....	42
2.2.4	Immobilisierung von <i>Chlorella kessleri</i> auf dem Biosensorchip.....	44
2.2.4.1	Chlorophyll-a-Bestimmung (Doppelfiltermethode).....	46
2.2.4.2	Chlorophyll-a-Bestimmung (Einzelfiltermethode)	48
2.2.4.3	REM-Aufnahmen von immobilisierten <i>Chlorella kessleri</i> -Zellen im Filterpapier	48
2.2.5	IMOLA-Messung.....	49
2.2.5.1	Kalibrierung.....	49
2.2.5.2	Versuchsdesign.....	49
2.2.5.3	Schadstoffe	52
2.2.5.4	Hell-Dunkel-Reaktion	55
2.2.5.5	Langzeitmessungen mit verschiedenen Phosphor-Konzentrationen	56
2.2.5.6	Referenz-Messungen.....	57
2.2.5.7	Vergleich zweier Seen mittels IMOLA-Messungen.....	58
2.2.5.8	Statistische Auswertung der IMOLA-Messdaten	60
2.3	AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)	63
2.3.1	Vorversuch.....	63

2.3.2	AFLP-Analyse zur Monoklonalität der <i>Chlorella kessleri</i> -Kulturen ..	64
2.3.3	Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA	64
2.3.4	Vorgehensweise bei der AFLP	65
2.3.5	Auswertung der AFLP-Daten	67
2.3.5.1	Auswertung der AFLP-Bandenmuster	67
2.3.5.2	Clusteranalyse	69
2.3.5.3	MDS-Analyse (Multidimensionale Skalierung).....	70
2.3.5.4	Untersuchung des Polymorphiegrades.....	71
3	ERGEBNISSE	72
3.1	ALGENKULTUREN.....	72
3.1.1	Eichgerade	74
3.1.2	Vitalitätsparameter	75
3.1.3	Nährmedien	76
3.1.4	Chloramphenicol	77
3.1.4.1	Behandlung einer <i>Monoraphidium griffithii</i> -Kultur mit Chloramphenicol.....	77
3.1.4.2	Behandlung einer <i>Navicula pelliculosa</i> -Kultur mit Chloramphenicol	78
3.1.5	Behandlung einer <i>Monoraphidium griffithii</i> -Kultur mit Cefotaxime...	78
3.1.6	Filtration einer <i>Monoraphidium griffithii</i> -Kultur	79
3.2	ERGEBNISSE ZUR IMMOBILISIERUNG VON <i>CHLORELLA KESSLERI</i>	79
3.2.1	Chlorophyll-a-Bestimmung	80
3.2.2	REM-Aufnahmen	81
3.3	IMOLA-MESSUNGEN.....	82
3.3.1	Diuron	83
3.3.1.1	100 µg/l Diuron.....	83
3.3.1.2	10 µg/l Diuron.....	84
3.3.1.3	5 µg/l Diuron.....	85
3.3.1.4	1 µg/l Diuron.....	86
3.3.1.5	Korrelation zwischen der Diuron-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung	87
3.3.1.6	Korrelation zwischen der Diuron-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung	88
3.3.2	Isoproturon.....	89
3.3.2.1	100 µg/l Isoproturon	89
3.3.2.2	10 µg/l Isoproturon	90
3.3.2.3	5 µg/l Isoproturon	91
3.3.2.4	Korrelation zwischen der Isoproturon-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung	92
3.3.2.5	Korrelation zwischen der Isoproturon-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung	93

3.3.3	Metamitron	93
3.3.3.1	500 µg/l Metamitron	93
3.3.3.2	250 µg/l Metamitron	94
3.3.3.3	100 µg/l Metamitron	96
3.3.3.4	Korrelation zwischen der Metamitron-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung	97
3.3.3.5	Korrelation zwischen der Metamitron-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung	97
3.3.4	Metazachlor	98
3.3.4.1	500 µg/l Metazachlor.....	98
3.3.4.2	250 µg/l Metazachlor.....	99
3.3.4.3	100 µg/l Metazachlor.....	99
3.3.4.4	10 µg/l Metazachlor.....	100
3.3.4.5	Korrelation zwischen der Metazachlor-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung	101
3.3.4.6	Korrelation zwischen der Metazachlor-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung	102
3.3.5	Pirimicarb	103
3.3.5.1	300 µg/l Pirimicarb	103
3.3.5.2	200 µg/l Pirimicarb	104
3.3.5.3	100 µg/l Pirimicarb	104
3.3.5.4	50 µg/l Pirimicarb	105
3.3.5.5	Korrelation zwischen der Pirimicarb-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung	106
3.3.6	17α-EE	106
3.3.6.1	100 µg/l 17α-EE	106
3.3.6.2	10 µg/l 17α-EE	107
3.3.6.3	1 µg/l 17α-EE	107
3.3.6.4	Korrelation zwischen der 17α-EE-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung	108
3.3.7	Hell-Dunkel-Reaktion	108
3.3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der Ein-Weg-ANOVA.....	110
3.3.9	Langzeitmessungen mit verschiedenen Phosphor- Konzentrationen.....	112
3.3.10	Referenz-Messungen: Schadstoffe	114
3.3.11	Referenz-Messung: Phosphor	115
3.3.12	Referenz-Messung: Filterpapier.....	115
3.3.13	Referenz-Messungen: Lösungsmittel.....	115
3.3.13.1	500 µg/l Nullprobe.....	115

3.3.13.2	100 µg/l Nullprobe	116
3.3.13.3	10 µg/l Nullprobe	117
3.3.14	Vergleich zweier Seen mittels IMOLA-Messungen	118
3.3.14.1	Wasserchemische Analyse Waschsee	118
3.3.14.2	Wasserchemische Analyse Lustsee	119
3.3.14.3	Mittlere Sauerstoffsteigung im Jahr 2005 bei Waschsee- und Lustsee- Probenwasser	120
3.3.14.4	Sauerstoffsteigung von April bis November 2005 bei Waschsee- und Lustsee-Probenwasser	121
3.4	AFLP	122
3.4.1	Vorversuch	122
3.4.2	AFLP-Analyse zur Monoklonalität der <i>Chlorella kessleri</i> -Kulturen	123
3.4.3	Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA	125
3.4.4	Polymorphiegrad	127
4	DISKUSSION.....	130
4.1	ALGENKULTUREN.....	130
4.1.1	<i>Chlorella kessleri</i> (Testorganismus)	131
4.1.1.1	Nährmedium und axenische Kulturbedingungen	131
4.1.1.2	Biologischer Testorganismus	131
4.2	IMMOBILISIERUNG VON <i>CHLORELLA KESSLERI</i>	133
4.2.1	Chlorophyll-a-Bestimmung	134
4.3	IMOLA-MESSUNGEN.....	135
4.3.1	Schadstoffe	135
4.3.1.1	Reaktion von <i>Chlorella kessleri</i> auf die getesteten Schadstoffe.....	135
4.3.1.2	Nachweisgrenze.....	139
4.3.1.3	Ansprechzeit	142
4.3.1.4	Reversibilität der Schadstoffwirkung	142
4.3.1.5	Resilienz der Algen gegenüber der Schadstoffwirkung	143
4.3.1.6	Konzentrationsabhängigkeit der Sauerstoff- und pH-Wert-Steigungen.....	144
4.3.1.7	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	146
4.3.2	Hell-Dunkel-Reaktion	149
4.3.3	Langzeitmessungen mit verschiedenen Phosphor- Konzentrationen	150
4.3.3.1	Langzeitmessungen	150
4.3.3.2	Phosphor-Gradient	151
4.3.4	Referenz-Messungen	152
4.3.5	Vergleich zweier Seen mittels IMOLA-Messungen	153
4.3.5.1	Wasserchemische Analysen	153
4.3.5.2	IMOLA-Messungen mit Waschsee- und Lustsee-Probenwasser	153

4.4	AFLP	155
4.4.1	Vorversuch	155
4.4.2	AFLP-Analyse zur Monoklonalität der <i>Chlorella kessleri</i> -Kulturen	156
4.4.3	Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA	156
4.4.4	Polymorphiegrad	158
5	AUSBLICK	160
6	ZUSAMMENFASSUNG	162
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	166
	LITERATURVERZEICHNIS	169
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	187
	FORMELVERZEICHNIS	194
	TABELLENVERZEICHNIS	195
	ANHANG	

1 EINLEITUNG

Wasser ist die Basis allen Lebens auf der Erde. So einfach seine chemische Strukturformel auch ist, desto vielfältiger sind seine chemischen und physikalischen Eigenschaften. Beispielsweise ist Wasser der einzige Stoff auf der Erde, der in seiner natürlichen Umwelt in allen drei Aggregatzuständen vorkommt (CAMPBELL 1997). Wasser erzeugt beim Verdunsten Verdunstungskälte. Diese kühlt die Atmosphäre ab und wirkt einer globalen Erwärmung entgegen. Die ungewöhnlich hohe spezifische Wärmekapazität des Wassers hält die Temperatur der Meere relativ konstant und wirkt sich stark auf die klimatischen Bedingungen an Land aus. Die Dichteanomalie des Wassers verhindert das Durchfrieren der Gewässer. Ohne diese Eigenschaft wäre das Leben auf der Erde in der uns vertrauten Form nicht möglich. 70% der Erdoberfläche ist mit Wasser bedeckt. Davon gelten lediglich 2,6% als Süßwasserreserven und nur 0,6% als verfügbares Trinkwasser, welches sich im Kreislauf von Verdunstung, Niederschlag und Abfluss befindet (KLEE 1991). Wasser spielt in nahezu allen Bereichen des Lebens eine wichtige Rolle und bildet somit auch die Grundlage menschlicher Zivilisation. Landwirtschaft, Energiewirtschaft, industrielle Produktion, Hygiene und die Trinkwasserversorgung wären ohne eine ausreichende Verfügbarkeit von Wasser nicht denkbar. Die anthropogene Nutzung des Wassers führt aber auch zur Verschmutzung der Wasserressourcen mit Schadstoffen. Die Hauptrolle spielen dabei Pestizide (Herbizide, Insektizide und Fungizide) sowie Schwermetalle (SCHWOERBEL 1999). Diese Schadstoffe gelangen in die Gewässer und schädigen dort die Ökosysteme (FAIRCHILD ET AL. 1998, GOMEZ DE BARREDA FERRAZ ET AL. 2004, GEOFFROY ET AL. 2004, OAKS ET AL. 2004). Viele dieser Stoffe haben zudem eine lange Persistenz in den Ökosystemen und reichern sich dort an (FIELD ET AL. 2003, GUZZELLA ET AL. 2006, HEIM ET AL. 2006, LAITINEN ET AL. 2006). Es müssen deshalb Messsysteme entwickelt werden, die zur Überwachung und zum Schutz der Gewässer eingesetzt werden können (LANDESAMT FÜR WASSER UND ABFALL, NORDRHEIN- WESTFALEN (LWA) 1991, ODUM 1999, NAESSENS ET AL. 2000, WIEST ET AL. 2006).

Die Notwendigkeit von Studien über die Wirkung von Schadstoffen auf die Umwelt und die Entwicklung von Messsystemen zur Überwachung der Gewässer wurde insbesondere ab den 70er Jahren des 20sten Jahrhunderts erkannt und

vorangetrieben (BEST & VAN DE WITTENBOER 1978, HANMER 1983, VERMA & TONK 1984, LOWE ET AL. 1985, VAN DER SCHALIE ET AL. 2001). Im Vordergrund standen Tests, welche die Reaktion von Fischen, von Muscheln, von Daphnien oder von Algen auf verschiedene Schadstoffe untersuchten (BENECKE ET AL. 1982, SLOOF ET AL. 1983, HENDRIKS & STOUTEN 1993, VAN DER SCHALIE ET AL. 2001). Allerdings kamen in Amerika nur wenige Überwachungsmesssysteme über das Entwicklungsstadium hinaus. In Europa hingegen gab es einige so genannte automatisierte BEWS (Biological Early Warning Systems), die auch ihre Anwendung im Freiland fanden (VAN DER SCHALIE ET AL. 2001).

Die große Vielfalt und die enormen Mengen an Schadstoffen, die jährlich in die Gewässer gelangen, haben eine steigende Nachfrage an Überwachungs- und Frühwarnsystemen für Gewässer bewirkt. Diese Messsysteme basieren heute auf der neuesten technologischen Entwicklung in Form von chemischen und biochemischen Sensoren (ASHLEY 2003). Im Vordergrund stehen Biosensoren, die in Echtzeit und kontinuierlich über längere Zeiträume hinweg Daten aufzeichnen können. Der Begriff Biosensor wurde von VAN DER SCHALIE ET AL. (2001) folgendermaßen definiert: „ein Biosensor beinhaltet ein analytisches Messgerät, das immobilisiertes biologisches Material enthält (z. B. Gewebe, Mikroorganismen, zelluläre Komponenten) und ein digitales elektronisches Signal produziert, das in einer bestimmten Proportion zu einem oder einer Gruppe von Analyten steht“. Das biologische Material dient somit als Signalwandler, da es auf veränderte Umweltbedingungen wie z. B. Schadstoffe im Wasser reagiert und dadurch beeinträchtigt wird. Diese Veränderung wird durch die Biosensoren gemessen und in ein elektrisches Signal übersetzt (SCHUBNELL ET AL. 1999).

Biosensoren können abhängig von ihrer biologischen Komponente in acht Klassen eingeteilt werden: zum einen werden immuno-chemische, enzymatische und nicht-enzymatische Sensoren sowie Biosensoren mit ganzen lebenden Zellen oder DNA-Sensoren verwendet, zum anderen gibt es elektrochemische, optische, piezoelektrische und thermische Sensoren (RODRIGUEZ-MOZAZ ET AL. 2005). Beispiele hierfür finden sich in zahlreichen Publikationen: MALLAT ET AL. (2001) beschrieben einen Immunosensor für die Bestimmung von Pestiziden. MAZZEI ET AL. (2004) entwickelten einen elektrochemischen Sensor, der die

Hemmung der alkalischen Phosphatase in Abhängigkeit von der Pestizidkonzentration misst. Mittels Impedanz messenden IDES-Strukturen (Interdigitale Elektroden-Strukturen) wurde die Reaktion von Zellen auf Histamine bzw. Schwermetalle gemessen (EHRET ET AL. 1996, BRISCHWEIN ET AL. 2006). AKYILMAZ & DINCKAYA (2005) stellten einen auf Mikroben basierenden Biosensor vor. Ein hochempfindlicher Biosensor, der die Methode der Festphasen Extraktion (SPE) mit einem ToxY-PAM-Zweikanal-Analyser kombiniert, wurde im Jahr 2004 von NASH ET AL. beschrieben. Auf der Fluoreszenzmessung basierende Biosensoren wurden z. B. von RODRIGUEZ ET AL. (2002) und WESTON & ROBINSON (1991) dokumentiert. METFIES ET AL. (2004) entwickelten einen DNA-Biosensor, der Dinoflagellaten detektieren kann, die toxische Stoffe ausscheiden. VÉDRINE ET AL. (2003) publizierten über einen optischen Biosensor, der mit ganzen lebenden Zellen arbeitete und ANDREOU & CLONIS (2002) stellten einen neuen Glasfaser-Optik Biosensor zum Nachweis von Atrazin vor. Ein auf der Piezoelektronik basierender Biosensor zur Detektierung von Atrazin wurde von PRIBYL ET AL. (2003) entwickelt, und thermische Biosensoren wurden in der Publikation RAMANATHAN & DANIELSSON (2001) beschrieben. Biosensoren lassen sich nicht nur für Messungen mit Flüssigkeiten anwenden. Sie eignen sich auch für die Detektion von gasförmigen Lösungsmitteln, wie eine Studie von NAESSENS & TRAN-MINH (1998) zeigte.

Ebenso wichtig wie der technische Aufbau und die technische Funktionsweise der Biosensoren ist der verwendete biologische Organismus. Dabei ist die Auswahl des Organismus von der Kompatibilität mit der technischen Komponente, vom Anwendungsgebiet des Biosensor-Messsystems und von der Sensitivität des Organismus gegenüber den Testsubstanzen (z. B. Herbizide, Pharmazeutika) abhängig. Im Rahmen zahlreicher Studien haben sich einige Organismen für den Einsatz im Bereich des Biomonitoring und der Biosensorik als besonders geeignet erwiesen. LEHELDT ET AL. (2000) und GREEN ET AL. (2003) verwendeten Daphnien, um Toxine im Wasser nachzuweisen. Aber auch Muscheln und Fische gehören zu den wichtigsten Testorganismen in Biomonitoring-Verfahren sowie Makrophyten und Diatomeen, die sich gut für die Bestimmung von Trophiegraden in Gewässern eignen (MELZER 1988, HOFMANN 1993, BORCHERDING & JANTZ 1997, SEELE 2000, VAN DER SCHALIE ET AL. 2001,

MOLDAENKE 2002). Auf dem Gebiet der Biosensoren wurden häufig Bakterien als biologische Komponente verwendet (D'SOUZA 2001, AKYILMAZ & DINCKAYA 2005, LEI ET AL. 2006). Einige Studien benutzten Blaualgen, wie z. B. *Spirulina subsala*, *Nostoc commune* und *Anabaena torulosa* (CAMPANELLA ET AL. 2001, SANDERS ET AL. 2001, CHAY ET AL. 2005). In vielen Untersuchungen wurden jedoch Vertreter aus der Gruppe der Chlorophyta (Grünalgen) verwendet. Dabei wurden *Scenedesmus subspicatus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella spec.* besonders häufig eingesetzt (TWIST ET AL. 1997, FAIRCHILD ET AL. 1998, SCHUBNELL ET AL. 1999, ROJIČKOVÁ-PADRTOVÁ & MARŠÁLEK 1999, NAESSENS ET AL. 2000, DURRIEU & TRAN-MINH 2002, VÉDRINE ET AL. 2003, GOMEZ DE BARREDA FERRAZ ET AL. 2004, CHOUTEAU ET AL. 2005, SHITANDA ET AL. 2005, WIEST ET AL. 2006).

Meist unabhängig von der jeweiligen Methode, bietet das Biomonitoring von Gewässern und Ökosystemen mittels Bioindikatoren oder Biosensoren eine Fülle an Vorteilen gegenüber Messsystemen, die auf rein chemisch-physikalischen Methoden beruhen. Im Gegensatz zu den herkömmlich angewendeten Methoden, wie z. B. die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) oder die Gas-Chromatographie, können Biomonitoring-Messungen in meist zeitlich hoch aufgelösten Abständen durchgeführt werden (VÉDRINE ET AL. 2003). Es ergeben sich also nicht nur Momentaufnahmen, sondern die untersuchten Ökosysteme können über einen langen Zeitraum hinweg kontinuierlich beobachtet werden. Zudem ist die HPLC und die Gas-Chromatographie sehr kostenintensiv, und die Anwendung kann nur von geschultem Fachpersonal durchgeführt werden (NAESSENS ET AL. 2000, VÉDRINE ET AL. 2003). ROGERS (1995) bewertete Biosensoren dagegen als eine preiswerte und äußerst sensitive Methode für den Nachweis von Schadstoffen. Bei rein chemisch-physikalischen Meßmethoden kann meist nur gezielt ein einzelner Analyt oder eine nur sehr begrenzte Anzahl an Schadstoffen nachgewiesen werden. Biosensoren erfassen dagegen eine Vielzahl von Schadstoffen und von Schadstoffgemischen sowie deren Synergieeffekte (ROGERS 1995, VONDER HAAR ET AL. 2003, VÉDRINE ET AL. 2003). Damit kann die Gesamtoxizität der im Wasser enthaltenen Schadstoffe angezeigt werden. Ein weiterer Vorzug ist, dass die Reaktion eines lebenden Organismus auf seine Umwelt gemessen wird. Chemische Analysen können ledig-

lich die Konzentration eines Stoffes, aber nicht dessen Wirkung auf lebende Organismen messen. Zudem können mittels des Biomonitoring Belastungen der Umwelt nachgewiesen werden, ohne die schädlichen Substanzen zu kennen (VONDER HAAR ET AL. 2003). Dies ist bei chemischen Analysen meist nicht möglich, da die Nachweismethoden nicht darauf ausgelegt sind.

Die Vielzahl an Biomonitoring-Messsystemen und die Vorteile des Biomonitoring mittels Bioindikatoren oder Biosensoren ergeben eine ganze Palette an Einsatzmöglichkeiten. Der Einsatz für militärische Zwecke, insbesondere bei der Sabotage- und Terrorismusbekämpfung, wäre denkbar (SANDERS ET AL. 2001). Die Überwachung im Bereich der chemischen Industrie (Abwässer, chemische Prozesse, Sicherheitskontrollen), der Zu- und Abläufe von Kläranlagen und der Lebensmittelindustrie, sind weitere wichtige Anwendungsgebiete des Biomonitoring. Ebenso erschließen sich potentielle Märkte auf dem Gebiet der Humanmedizin und der Veterinärmedizin sowie in der Agrarwirtschaft (WOLF ET AL. 1997, WOLF ET AL. 1998, HENNING ET AL. 2001, VELASCO-GARCIA & MOTTRAM 2003, BRISCHWEIN ET AL. 2003). Eine wichtige Rolle spielen Biosensoren bereits in der Forschung und in der Umweltüberwachung (ROGERS 1995, MOLDAENKE 2002, SHITANA ET AL. 2005).

Am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der Technischen Universität München (TUM) wurde ein Biosensorchip-Messgerät für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik und Therapie entwickelt. In das so genannte „Intelligent Mobile Lab“ Version 0 (Prototyp), welches im Folgenden als IMOLA bezeichnet wird, wurde ein auf Silizium basierender Biosensorchip eingesetzt, der die für den zellphysiologischen Zustand wichtigen Parameter Sauerstoffsättigung, pH-Wert, Impedanz und Temperatur messen konnte (WIEST ET AL. 2005 A, WIEST ET AL. 2006). Auf Grund der genannten Vorteile, der möglichen Einsatzgebiete und der Notwendigkeit von effizienten Biomonitoring-Systemen, wurde die IMOLA-Technologie im Rahmen der vorliegenden Dissertation modifiziert und durch neue Methoden ergänzt, um ein hochsensitives Biomonitoring-System für die Anwendung in den Bereichen des Gewässerschutzes und aquatischer Frühwarnsysteme zu entwickeln. Mittels der mit dem IMOLA-Messgerät gemessenen, Vitalitätsparameter Sauerstoffsättigung und pH-Wert wurden die Reaktionen der einzelligen Grünalge *Chlorella kessleri* auf

ausgewählte Xenobiotika unter Laborbedingungen gemessen. Unter Xenobiotika versteht man Fremdstoffe, die künstlich vom Menschen synthetisiert wurden und nicht im normalen Stoffkreislauf vorkommen (LOOSER 1999). Im Allgemeinen handelt es sich um so genannte Umweltgifte wie Pestizide, Schwermetalle oder andere toxische Substanzen. Um einen Einblick in die ökologische Bedeutung der für die IMOLA-Messungen ausgewählten Schadstoffe zu bekommen, werden im Folgenden der Wirkmechanismus, das Einsatzgebiet und die eingesetzte Menge sowie die Schädigung der jeweiligen Xenobiotikums auf die Umwelt dargestellt.

Herbizide

Aus der Gruppe der Photosystem II-Hemmstoffe wurden die Herbizide Diuron, Isoproturon und Metamitron ausgewählt. Diese Gruppe bietet eine große Vielfalt an chemischen Verbindungsklassen. Diuron und Isoproturon sind Harnstoffderivate, dagegen zählt Metamitron zu den Triazinonen (HOCK & ELSTNER 1988). Die genannten Herbizide greifen an der reduzierenden Seite des Photosystems II die Plastochinone „Q“ und „B“ der Elektronentransportkette an (HOCK & ELSTNER 1988, MOLANDER & BLANCK 1992). Es wird angenommen, dass die Herbizide an einer Proteinstruktur an der Außenseite der Thylakoidmembran gebunden werden. Diese erfährt dadurch eine Konformationsänderung, wodurch das Redoxpotenzial des Akzeptors „B“ negative Werte annimmt. Dadurch wird die Reduktion des Akzeptors „B“ durch den davor liegenden Akzeptor „Q“ verhindert. Das Photosystem I kann deshalb nicht mehr mit Elektronen versorgt werden. Der Prozess der Photosynthese kann folglich gar nicht oder nur eingeschränkt ablaufen, wodurch die Pflanze von ihrer Energieversorgung abgeschnitten wird.

Diuron ist ein Unkrautbekämpfungsmittel und wird zur völligen Beseitigung von Pflanzen (Totalherbizid) verwendet. Es wird vorwiegend im Obst- und Weinanbau, in der Baumwoll- und Zuckerrohrproduktion sowie im Weizenanbau eingesetzt. Es dient aber auch zur Unkrautentfernung an Straßen und Eisenbahnschienen (GIACOMAZZI & COCHET 2004, BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL) 2006). Das BVL gab im Jahr 2005 für den Diuron-Inlandabsatz in Deutschland eine Größenordnung von 25 bis 100 Tonnen

an (BVL 2005). Auf Grund seiner ökologischen Bedenklichkeit wurde Diuron von der Europäischen Kommission als hoch gefährdende Substanz eingestuft (MALATO ET AL. 2002). Das Herbizid lässt sich im Boden, im Wasser und in Sedimenten nachweisen und besitzt eine weit gefächerte, ökotoxikologische Wirkung (GIACOMAZZI & COCHET 2004). Beispielsweise ergab eine Studie des IFEN (INSTITUT FRANÇAIS DE L'ENVIRONNEMENT) aus dem Jahr 1998, dass Diuron in 28% der Proben zu finden war, die bei einer repräsentativen Untersuchung des Flusssystemes in Frankreich genommen wurden. SHAW & MÜLLER (2005) wiesen Diuron am Great Barrier Reef nach. Diuron ist leicht toxisch für Säugetiere, hat allerdings eine erhöhte toxische Wirkung auf aquatische Organismen unterschiedlicher Trophie-Ebenen, wie z. B. Fische, Invertebraten, Algen und Bakterien (HODGES ET AL. 1967, NEBEKER & SCHUYTEMA 1998, PRADO & AIROLDI 2002, RODRIGUEZ ET AL. 2002, OKAMURA ET AL. 2003). Insbesondere ist die toxische Wirkung des Schadstoffes auf Algen (Primärproduzenten) bedenklich, da sie die Basis der meisten aquatischen Ökosysteme bilden.

Isoproturon findet seine Anwendung hauptsächlich als Pflanzenschutzmittel in der Kultivierung von Weizen, Gerste und Roggen (RIOBOO ET AL. 2002). Im Jahr 2005 wurden in Deutschland mehr als 1000 Tonnen Isoproturon verkauft (BVL 2005). Auf Grund der häufigen Anwendung nimmt die ökologische Bedeutung von Isoproturon stetig zu. GUSTAVSON ET AL. (2003) untersuchten z. B. die negative Wirkung von Isoproturon auf Fluss-Periphyton und in einer Studie von QUAGHEBEUR ET AL. (2004) wurde Isoproturon sogar im Regenwasser nachgewiesen.

Metamitron wird als Pflanzenschutzmittel im Feldanbau benutzt und hatte im Jahr 2005 in Deutschland einen geschätzten Inlandsabsatz von 250 bis 1000 Tonnen (BVL 2005, BVL 2006). Wie alle Photosystem II-Inhibitoren hat Metamitron eine starke toxische Wirkung auf aquatische photoautotrophe Organismen und bedroht somit die Algen- und Makrophytengemeinschaften der Gewässer. Metamitron wurde z. B. in mehreren Flüssen des Bundeslandes Rheinland-Pfalz festgestellt (AUGUSTIN ET AL. 2002).

Aus der Gruppe der Chloracetamide wurde Metazachlor ausgewählt. Der geschätzte Inlandsabsatz dieses Herbizids lag im Jahr 2005 für Deutschland zwischen 250 und 1000 Tonnen (BVL 2005). Wie die Studien von BÖGER ET AL.

(2000) und von MATTHES (2000) belegen, ist der Angriffspunkt der Chloracetamide die Fettsäure-Elongation in Pflanzenzellen. Die Stoffgruppe der Chloracetamide unterbindet die Funktion der Enzym-Fettsäure-Elongase. Dadurch ist die Produktion von langkettigen Fettsäuren inhibiert, die eine wichtige Rolle für den Zellmetabolismus spielen. Metazachlor wird vorrangig im Obst-, Gemüse- und Feldanbau eingesetzt (BVL 2006). In Freilandstudien konnte Metazachlor beispielsweise in einigen bayerischen Fließgewässern nachgewiesen werden (VELASCO-SCHÖN 2003).

Die hier vorgestellten und für die Messungen ausgewählten Herbizide gehören zu den zehn in Deutschland am häufigsten verwendeten Herbiziden (PERSÖNLICHE MITTEILUNG DES BUNDESUMWELTAMTES 2006). Eine Studie des LANDESUMWELTAMTES NORDRHEIN-WESTFALEN (NRW) (1997) wies nach, dass diese Herbizide deutsche Gewässer in hohem Maße belasten.

Insektizid

Als Testsubstanz aus der Gruppe der Insektizide wurde Pirimicarb verwendet. Pirimicarb ist ein Carbamat, von dem jährlich bis zu 100 Tonnen in Deutschland ausgebracht werden (BVL 2005). Damit gehört es zu den meist verwendeten Insektiziden in Deutschland. Eingesetzt wird es zur Bekämpfung von Blattläusen im Zuckerrüben- und im Salatanbau, aber auch bei der Kultivierung von Getreide (BVL 2006). Pirimicarb ist ein Cholinesterase-Hemmstoff, der die Abbaugeschwindigkeit des Acetylcholins vermindert. Gehemmt wird die Funktion des Cholinesterase-Moleküls. Bei Invertebraten ist das Acetylcholin eine Überträgersubstanz des Zentralnervensystems (WEHNER & GEHRING 1995). Cholinesterase-Hemmstoffe ähneln dem Acetylcholin in ihrer Struktur und können deshalb mit der Cholinesterase eine Verbindung eingehen. Dadurch erfolgt eine Carbamylierung der Esterase, und das Enzym wird blockiert. Das Acetylcholin kann nicht mehr abgebaut werden und reichert sich im Organismus an. Dadurch kommt es zu einer Dauerinnervierung der cholinergen Synapsen, was zum Tod führt (LÜLLMANN & MOHR 1999). Pirimicarb hat nachweislich auch eine schädliche Wirkung auf Invertebratenarten, die nicht Zielorganismen sind. Dabei werden die Tiere meist schon im Larvalstadium abgetötet, wie es z. B. bei Pflanzenwespen der Fall ist (MOREBY ET AL. 2001). Pirimicarb lässt sich in Nutz-

pflanzen wie Pflaumen, Erbsen, Bohnen, Karotten und Kohlrüben nachweisen (STARTIN ET AL. 2000). Diese Studien zeigen, dass sich Pirimicarb bereits in verschiedenen Nahrungsketten befindet und somit die Ökosysteme beeinflussen kann.

Hormon

SUMPTER (2003) berichtete von ca. 100 000 lizenzierten Pharmaka, die täglich konsumiert werden. Diese gelangen ganzjährig über die Kläranlagen, über oberirdische Abflüsse von Dünger- und Agrarabfällen und als Abfälle aus der Pharmaindustrie in die Gewässer (WILSON ET AL. 2004). Dabei weisen die Konzentrationen von Pharmarückständen in den Gewässern sowohl eine regionale als auch eine temporale Heterogenität auf (HILTON ET AL. 2003 ZIT. IN WILSON 2004). Zahlreiche Studien belegen Konzentrationen von wenigen ng/l bis µg/l in den Oberflächengewässern Europas und Nordamerikas (HALLING-SORENSEN ET AL. 1998, KOPLIN ET AL. 2002 ZIT. IN WILSON 2004, TERNES 1998 ZIT. IN WILSON ET AL. 2004). STUMPF ET AL. (1996) konnten aber auch Pharmarückstände in Konzentrationen von mehreren 100 µg/l nachweisen. Bei den pharmazeutischen Rückständen spielen Östrogene eine wichtige Rolle, da ihre hormonelle Wirkung nachweislich schädlich für aquatische Organismen ist. Einige Untersuchungen dokumentieren das Vorkommen von Östrogenen in Flüssen, Küstengebieten, Ozean- und Flussbetsedimenten sowie in Seen und Estuarien (ADLER ET AL. 2001, ATKINSON ET AL. 2003, SNYDER ET AL. 2004, BRAGA ET AL. 2005). Auf Grund der ubiquitären Verbreitung und seiner Schadwirkung auf die Ökosysteme gibt es mittlerweile viele Studien über die Auswirkungen des synthetischen Östrogens 17α-Ethinylestradiol (17α-EE), das Hauptbestandteil der Antibabypille ist (SUZUKI ET AL. 2003, HENSE ET AL. 2004, MASTRUP ET AL. 2005). Es wird synthetisch aus Estrogen hergestellt, welches wiederum aus dem natürlich im Organismus vorkommenden 17β-Estradiol gewonnen wird. Der 17α-EE-Gehalt der Antibabypille liegt bei 20 bis 50 µg. Davon werden bereits nach 24 Stunden 60% über den Urin ausgeschieden (CARR & GRIFFIN 1998 ZIT. IN WILSON 2002). Schätzungen zur Folge liegt der jährliche Eintrag von 17α-EE in deutsche Gewässer bei 40 - 70 kg (JASER 2003). Obwohl die 17α-EE-Konzentrationen aus den kommunalen Abwässern in den Gewässern stark verdünnt

werden, darf auf Grund des hohen endokrinen Potenzials die Wirkung des 17 α -EE auch bei geringen Konzentrationen nicht unterschätzt werden. Beispielsweise reagieren adulte männliche Regenbogenforellen bereits auf 0,1 ng/l 17 α -EE (ADLER ET AL. 2001). Derartige Konzentrationen sind durchaus im Freiland vorhanden. Bei einer Untersuchung von HINTEMANN ET AL. (2006) wurden im Mittel 0,7 ng/l 17 α -EE im Oberflächenwasser des Rheins gemessen.

Auf Grund der ökologischen Schädigung und des häufigen Vorkommens in verschiedenen Ökosystemen, insbesondere in aquatischen Lebensgemeinschaften, wurden die vorgestellten Schadstoffe für die IMOLA-Messung als exemplarische Testsubstanzen ausgewählt. Zudem wurde bei der Auswahl der Schadstoffe darauf geachtet, dass sie aus verschiedenen Wirkstoffgruppen stammen. Zusätzlich wurde die Anwendung der IMOLA-Messtechnik für das Freiland getestet. Zum einen wurde die Reaktion der Algen auf verschiedene Phosphor-Konzentrationen untersucht. Der Nährstoff Phosphor wurde ausgewählt, da er in Süßgewässer-Systemen als limitierender Nährstofffaktor gilt (ODUM 1999). Zum anderen wurden mit dem IMOLA-Messgerät Wasserproben aus dem eutrophen Waschsee und dem oligotrophen Lustsee gemessen.

Für die IMOLA-Messungen wurden zur Standardisierung der Messungen axenisch, monoklonale Algenkulturen hergestellt und mittels der AFLP-Methode hinsichtlich ihrer Monoklonalität genetisch analysiert.

Es wurde folgenden Zielen und Fragestellungen nachgegangen:

- Erstellung von axenisch monoklonalen Algenkulturen.
- Auswahl eines geeigneten Test-Organismus für die IMOLA-Messungen.
- Ist die IMOLA-Messtechnik durch die Entwicklung neuer und standardisierter Methoden für den Einsatz in limnologischen Anwendungsbereichen übertragbar (proof of principal)?
- Wie reagieren die Algen auf die verschiedenen Schadstoffe?
- Wo liegt die Nachweisgrenze des jeweiligen Schadstoffes, die mit dem IMOLA-Messsystem detektiert werden kann?
- Wie lang ist die Ansprechzeit des IMOLA-Messsystems auf den jeweiligen Schadstoff?

- Ist die toxische Wirkung des jeweiligen Schadstoffes reversibel und in welchem Maße erholen sich die Algen von der Schädigung (Resilienz)?
- Ist die toxische Wirkung des jeweiligen Schadstoffes auf die Algen konzentrationsabhängig?
- Wie gut ist die Reproduzierbarkeit der IMOLA-Messergebnisse?
- Wie reagieren die Algen auf Beleuchtung und wie reagieren die Algen auf Dunkelheit (Hell-Dunkel-Reaktion)?
- Wie reagieren die Algen unter Laborbedingungen auf verschiedene Phosphor-Konzentrationen?
- Sind Langzeitmessungen mit dem IMOLA-Messsystem möglich, und wie verhalten sich die gemessenen Vitalitätsparameter über einen längeren Zeitraum hinweg?
- Können mit dem IMOLA-Messsystem Seen unterschiedlichen Trophiegrades unterschieden werden?
- Kommt es über einen längeren Zeitraum hinweg zu genetischen Veränderungen bei den für die IMOLA-Messungen verwendeten monoklonalen *Chlorella kessleri*-Kulturen?

2 MATERIAL UND METHODEN

Im Material und Methoden Teil werden die verschiedenen Methoden, Materialien und Versuche, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden, erläutert. Unter 2.1 wird auf die verschiedenen Methoden und die verwendeten Materialien zur Gewinnung und Kultivierung von axenischen Algenkulturen eingegangen. Unter 2.2 sind die Methoden, die Materialien und die verschiedenen Versuchsdesigns der IMOLA-Messungen sowie weitere, die IMOLA-Messungen begleitende, Versuche dargestellt. Ferner ist der technische Aufbau des IMOLA-Messgerätes und des Biosensorchips sowie das statistische Analysemodell beschrieben, das für die Auswertung der IMOLA-Messungen angewendet wurde. Unter 2.3 wird die AFLP-Methode erklärt, sowie die dazu durchgeführten Versuche und Analysemethoden abgehandelt.

2.1 Algenkulturen

In der ersten Phase der Dissertation lag der Schwerpunkt auf der Anzucht und der Kultivierung von monoklonalen Algenkulturen, die frei von Bakterien und anderen Mikroorganismen waren. Diese axenischen Kulturen waren die Voraussetzung für standardisierte und reproduzierbare IMOLA-Messungen. Zudem mussten die axenischen, monoklonalen Algenkulturen reproduzierbar in der Anzucht sowie in ausreichender Menge und Zellzahldichte vorhanden sein, damit für die IMOLA-Messungen immer genügend biologisches Material zur Verfügung stand.

2.1.1 Anzucht von Algenmonokulturen aus Freilandisolaten

Zu Beginn der Arbeit wurden einzelne Algenindividuen aus Freilandproben isoliert und in separate Kulturansätze überführt. Da nicht bekannt war, welche Alge sich in Kombination mit dem Biosensorchip am besten eignen würde, wurden verschiedene Algenarten isoliert.

2.1.1.1 Probenahme und Probenaufbereitung

Die Probenahmen fanden an verschiedenen Gewässern statt, um eine möglichst große Bandbreite von Algenarten für die Kultivierung zu erhalten. An der oberbayerischen Osterseengruppe wurden Proben aus den folgenden Seen

entnommen: Eishaussee (47°47'02.52``E; 11°18'57.39``E), Herrensee (47°46'59.34N; 11°19'23.39``E), Lustsee (47°48'35.86``N; 11°17'42.90``E), Sengsee (47°46'32.92``N; 11°18'59.35``E) und Waschsee (47°46'19.88``N; 11°19'07.85``E). Zusätzlich wurden die Isar (48°06'01.10``N; 11°33'01.13``E) in München und der Tiefenbach (47°48'35.98``N; 11°07'52.76``E) in Polling bei Weilheim beprobt. Es wurden jeweils Steine und Pflanzenmaterial aus den Gewässern entnommen und mit etwas See- bzw. Flusswasser in einer 250 ml PE-Weithalsflasche (Firma: Kautex) aufbewahrt. Im Labor wurde der Algenaufwuchs von dem Pflanzenmaterial und den Steinen mit einer Zahnbürste heruntergebürstet und im jeweiligen Probenwasser suspendiert. Für die Isolierung der Algenindividuen am Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) wurden Utermöhl-Kammern (Firma: PhycoTech) mit 2 ml Probenvolumen beschickt. Gegebenenfalls musste die Probe mit Leitungswasser verdünnt werden, da eine zu hohe Zellzahl in den Proben das Isolieren der Algen deutlich erschwerte.

2.1.1.2 Isolierung der Algenindividuen

Das Isolieren von Algenindividuen zur Etablierung von artreinen Algenkulturen ist eine häufig angewendete Methode (FRIES 1963, MOONEY & VAN STADEN 1985, POLNE-FULLER & GIBOR 1987). Die Isolierung der Algenindividuen wurde an einem Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) bei 400-facher Vergrößerung mittels einer dafür eigens entwickelten Mundsaugpumpe durchgeführt. Die Mundsaugpumpe bestand aus zwei PVC-Schläuchen (Firma: Reichelt Chemietechnik, Modell: PVC-Chemieschlauch, \varnothing 6 mm), die über eine woulffsche Flasche verbunden waren. Der eine Schlauch war mit einem Mundstück versehen, durch das Luft mit dem Mund eingesaugt wurde. In das andere Schlauchende mündete eine, unter dem Bunsenbrenner ausgezogene, Glaspipette. Der dadurch verringerte Querschnitt der Einsaugöffnung der Glaspipette eignete sich somit für die Isolation von Zellen im Größenbereich von 2 bis 150 μm . Durch das Einsaugen von Luft wurde ein Unterdruck erzeugt, durch den die zu isolierende Alge mittels der Glaspipette aus der Wasserprobe eingesaugt werden konnte. Die jeweilige Alge wurde nach der Isolierung aus der Wasserprobe mehrmals gewaschen. Bei diesem Vorgang wurde die isolierte Alge in einen Tropfen sterilen Mediums eingebracht, der mit einem Breitband-

antibiotikum (Chloramphenicol) versetzt war, und anschließend unter dem Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) erneut aus diesem Tropfen selektiert. Dieser Waschzyklus wurde insgesamt dreimal hintereinander durchgeführt. Das Waschen der isolierten Zelle stellte sicher, dass nur die eine Alge in die Kultur überführt wurde und Bakterien durch das Breitbandantibiotikum größtenteils abgetötet wurden. Nach dem Waschvorgang wurde jede isolierte Alge zur Kultivierung in eine Kultureinheit einer 24er Microwell-Kulturplatte überführt (Firma: Peske GmbH, Modell: TTP Zellkulturplatten 24, Kulturvolumen: 1 ml). Für die Kultivierung der verschiedenen Algenarten wurden unterschiedliche Kulturmedien verwendet (siehe 2.1.5).

Die beschriebene Methode zur Anzucht von Algenmonokulturen aus Freilandproben war zwar sehr zeitaufwändig und wies nur geringe Anwachsrate auf, doch stellte sie sicher, dass die angezogene Kultur monoklonal war.

2.1.2 Anzucht von Algenmonokulturen aus gekauften Kulturen

Als zweite Möglichkeit zur Anzucht von axenisch monoklonalen Algenkulturen wurden Algenstämme von der Universität Göttingen (SAG = Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen) gekauft.

Diese Kulturen wurden auf Agarböden geliefert und mussten in flüssige Kulturmedien überführt werden. Dazu wurden sie unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse vom Agar abgenommen und in ein Flüssigmedium überführt. Die Menge und die Populationsdichte dieser Algenmonokulturen reichten aber nicht aus, um genügend Material für die IMOLA-Messungen zur Verfügung zu haben. Deshalb mussten die Kulturen auf ein ausreichendes Volumen (ca. 1 l) mit einer genügend großen Zellzahl gezüchtet werden.

2.1.3 Methoden zur Züchtung von Algenmonokulturen

Das Erhöhen der Zellzahldichten und damit des jeweiligen Algenkulturvolumens erfolgte bei den beiden beschriebenen Aufzuchtmöglichkeiten (siehe 2.1.1 und 2.1.2) identisch. Die Alge oder Algen wurden in eine 24er Microwell-Kulturplatte (Firma: Peske GmbH, Modell: TTP Zellkulturplatten 24) überführt. Je nach Verfügbarkeit und Menge der Algen wurden eine oder mehrere Einzelkulturen auf einer Microwell-Kulturplatte angeimpft. Diese Kulturen wurden in der Klima-

kammer unter konstanten Bedingungen kultiviert. Dort herrschten 16 °C bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 Stunden Beleuchtung und acht Stunden Dunkelheit. Die photosynthetisch aktive Photon-Flux-Dichte (PPFD) betrug $200 \pm 1 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ und wurde durch eine OSRAM Tageslicht-Metallhaloid-Lampe (Firma: OSRAM, Modell: Powerstar HQI-BT 400 W/D) erzeugt.

Die Algen wurden zunächst jeweils in einer Kultureinheit in einem Volumen von ca. 1 bis 2 ml kultiviert. Sobald diese Kultureinheit dicht genug bewachsen war, was sich durch eine deutliche Grünfärbung bei den Chlorophyta oder eine Braunfärbung bei den Bacillariophyceae zeigte, wurde diese kleinvolumige Algenkultur in Subkulturen mit ebenfalls geringem Volumen (1 bis 2 ml) aufgeteilt. Dafür wurde ein kleiner Teil (ca. 100 bis 200 μl) der Ausgangskultur in mehrere, mit sterilem Medium befüllte, Kultureinheiten gegeben. Die Anzahl der Kultureinheiten richtete sich nach der Dichte der Ausgangskultur und betrug meistens 6 bis 24 Kultureinheiten/24er Microwell-Kulturplatte. Auf diese Weise entstanden Kulturplatten, in denen sich mehrere Subkulturen desselben Klons befanden. Die Subkulturen wurden nach erfolgreicher Anzucht zu einer großen Algenmonokultur in einem Glaskolben vereinigt. Die Kolben hatten, je nach Kulturgröße, ein Volumen von 100 bis 5000 ml. Je nach Wachstum der Algenmonokultur wurde steriles Nährmedium zugegeben, um das Volumen stetig zu erhöhen. Sobald das gewünschte Volumen erreicht war, wurde die Kultur auf diesem Volumen gehalten. Dazu wurde alle zwei Wochen ein Drittel der Kultur entnommen und das entnommene Volumen durch steriles Nährmedium ersetzt. Es wurden Sicherheitskulturen angelegt, die zum Wiederaufbau der Algenmonokultur dienen sollten, falls eine der großvolumigen Algenmonokulturen absterben oder durch Mikroorganismen verunreinigt werden sollte. Die Kulturkolben wurden keimdicht mit einem Gummistopfen (Firma: D&N, Modell: Stopfen aus Silikon-Kautschuk) verschlossen (Abbildung 2.1). Der Gummistopfen war mit drei Glasröhren durchstoßen, von denen zwei Glasröhren (G1 und G2) bis zum Boden des Gefäßes reichten und die dritte (G3) oberhalb der Algenkultur endete. G1 diente zum Belüften des Kulturkolbens. Über einen PVC-Schlauch wurde Druckluft, die mittels eines Sterilfilters (Firma: Sartorius, Modell: Midisart 2000, Porengröße: 0,2 μm) steril filtriert wurde, in die Algenkultur gepresst. Dadurch wurden die Algen ausreichend mit Kohlendioxid (CO_2) versorgt und der

Gasaustausch zusätzlich verbessert. Die einströmende, sterile Luft bewirkte eine ständige Durchmischung der Algenkultur, so dass eine Sedimentation der Algen verhindert wurde. In nicht belüfteten Kulturkolben führt die Sedimentation zur Bildung von Algenmatten, in welchen es in den unteren Schichten zu Licht und Nährstoffmangel kommt (PETERSON 1996). Dieser unerwünschte Effekt, der die Vitalität der Algen beeinträchtigt, wurde durch die kontinuierliche Belüftung verhindert. Über G3 konnte die Luft über einen weiteren Sterilfilter nach außen entweichen. Über G2 konnte entweder frisches Nährmedium in die Kultur eingebracht oder Algenkultur abgesaugt werden. Das Befüllen der Kultur erfolgte in einer Sterilbank. Über einen sterilen Glastrichter (Firma: Schott, Modell: Duran-Glas-Trichter \varnothing 45 mm) wurde das Nährmedium in die Algenkultur eingebracht. Das Absaugen von Algenkultur erfolgte über das Prinzip der kommunizierenden Röhren (DEMTRÖDER 2001). Der PVC-Schlauch, der an G2 angeschlossen war, wurde unterhalb des Niveaus des Kulturkolbens positioniert und anschließend mit einer sterilen Glasspritze (Firma: Poulten & Graf, Modell: Ganzglas-Spritzen FORTUNA OPTIMA[®], 30 ml) Algenkultur angesaugt. Dadurch ließen sich definierte Volumina aus dem Kulturkolben entnehmen. Wurde der PVC-Schlauch von G2 oberhalb des Niveaus des Kulturkolbens ausgerichtet, stoppte das Ausfließen der Algenkultur. Das offene Ende des PVC-Schlau-ches wurde nach dem Befüllen bzw. Entnehmen der Algenkultur mit einem heißen Spatel verschweißt.

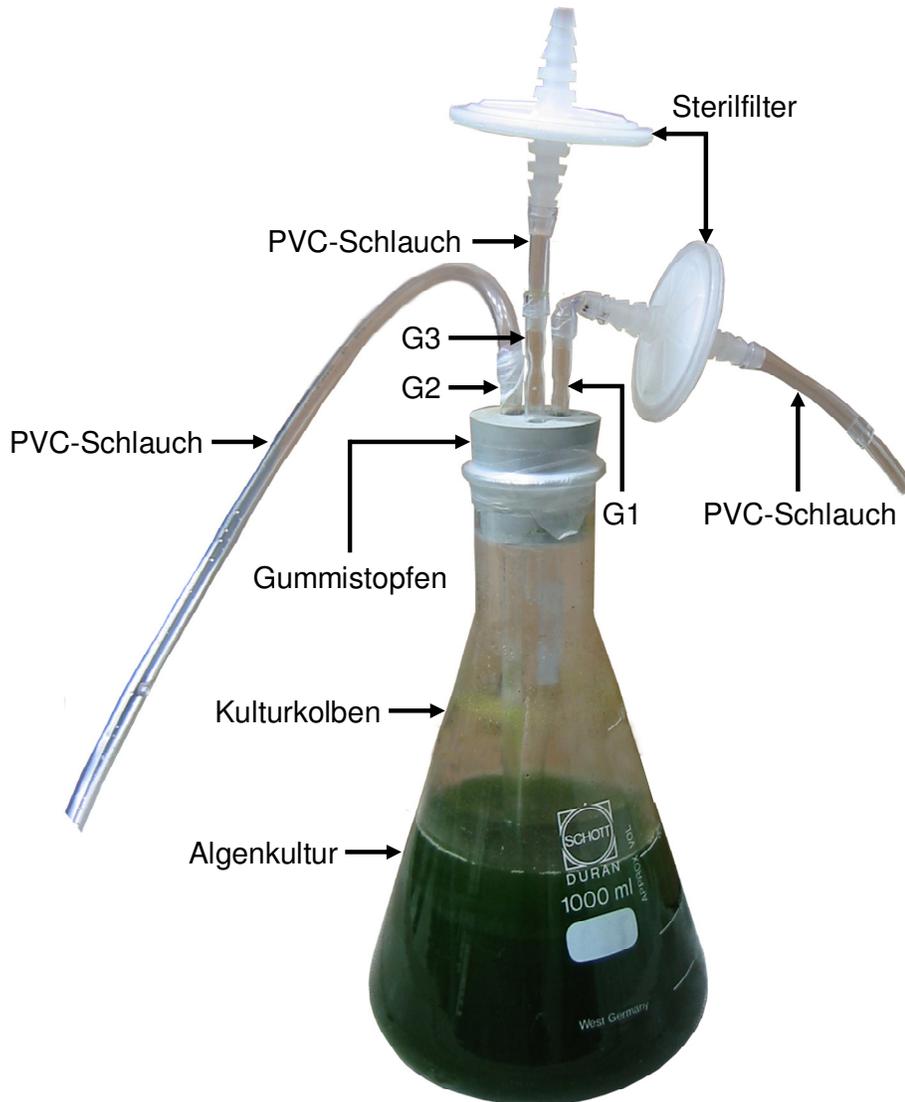


Abbildung 2.1: Kulturkolben. G1 = Glasröhre 1; G2 = Glasröhre 2; G3 = Glasröhre 3.

2.1.4 Kontrolle der Algenkulturen

Die Kulturen wurden regelmäßig mittels eines Umkehrlichtmikroskops (Firma: Leitz, Modell: Labovert) auf Wachstum (Populationsdichte), Vitalität und eventuelle Verunreinigungen, wie z. B. durch Bakterien, überprüft. Im Folgenden sind die dazu erhobenen Untersuchungen aufgeführt.

2.1.4.1 Eichgerade

Zur Kontrolle des Wachstums und zur Bestimmung der Zellzahldichten wurde von einer *Chlorella kessleri*-Kultur eine Eichgerade mit der Korrelation Zell-

zahl/ml und Absorption bei 680 nm erstellt. Die Wellenlänge von 680 nm wurde für die Messung der Absorption ausgewählt, da hier das Absorptionsmaximum der Algenkultur lag. Dies wurde durch eine Analyse des gesamten Wellenlängenbereiches ermittelt. Zudem verwendeten MA ET AL. (2002) diese Wellenlänge zur Erfassung des Algenwachstums von *Chlorella pyrenoidosa* und beschrieben sie als geeignet für die Bestimmung der Zellzahl mittels eines Spektralphotometers. Die Messungen der Absorption wurden an einem Zweistrahlphotometer (Firma: Hitachi, Modell: Hitachi 150-20) durchgeführt. Es wurden von der unverdünnten Ausgangskultur mit einem Absorptionswert von 2,3 folgende Verdünnungen hergestellt: 1; 9:10; 4:5; 7:10; 3:5; 1:2; 2:5; 3:10; 1:5; 1:10. Verdünnt wurde die Algenkultur mit dem für die Kultivierung verwendeten Nährmedium. Für die Auszählung wurden 200 µl der jeweiligen Probe zur Sedimentation in eine 10 ml Utermöhl-Kammer (Firma: PhycoTech) gegeben und mit Lugolscher Lösung fixiert (UTERMÖHL 1958). Zur vollständigen Sedimentation der Algen wurden die Proben für 24 Stunden stehen gelassen. Zur Bestimmung der Zellzahl/ml wurden am Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) bei 400-facher Vergrößerung je zehn Gesichtsfelder (GF) (Fläche/GF = 0,0625 mm²) der jeweiligen Konzentrationsstufe ausgezählt. Die Anzahl der ausgezählten Algenindividuen wurde für die gesamte Fläche des Objektträgers berechnet und auf 1 ml Algenvolumen hochgerechnet. Das Ergebnis entsprach der Algenzellzahl/ml für die jeweilige Verdünnungsstufe, die wiederum einem bestimmten Absorptionswert entsprach.

2.1.4.2 Vitalitätsparameter

Über einen Zeitraum von zehn Monaten hinweg wurden die Vitalitätsparameter Sauerstoffsättigung und pH-Wert der Algenkulturen gemessen. Die Messungen fanden an folgenden Tagen statt: 25.11.2004; 08.12.2004; 22.12.2004; 04.01.2005; 20.01.2005; 21.02.2005; 22.03.2005; 19.04.2005; 09.05.2005 und 01.06.2005. Verwendet wurde dabei eine Sauerstoffsonde und ein pH-Meter der Firma WTW (Modell: Oximeter, Oxi 320; Sauerstoffsensor CellOx 325; Modell: pH-Meter pH 192; WTW, pH-Elektrode SenTix 61). Jeweils 15 ml der Algenkulturen wurden in eine Schnappdeckelflasche (Firma: Fisherbrand, Modell: Schnappdeckelflasche 25 ml Volumen) abgefüllt, um von diesen Proben die Sauerstoffsättigung sowie den pH-Wert zu bestimmen. Die Proben wurden mittels

eines Magnetrührers durchmischt, so dass die Sonden kontinuierlich und gleichmäßig angeströmt wurden. Anschließend wurde bei 680 nm der jeweilige Absorptionswert der Algenkulturen am Zweistrahlphotometer (Firma: Hitachi, Modell: Hitachi 150-20) gemessen (LAI ET AL. 2002, MA ET AL. 2002).

2.1.5 Kulturmedien

Die Algenmonokulturen wurden in künstlichen Kulturmedien gezüchtet, die alle für die Algen wichtigen Nährstoffe enthielten. Welches Medium sich für welche Algenart zur optimalen Anzucht eignete, wurde durch zahlreiche Versuche getestet. Insgesamt wurden neun verschiedene Kulturmedien verwendet. Um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu verhindern, wurden die Nährmedien vor Gebrauch autoklaviert (Firma: Wolf, Modell: Autoklav HA-300PC). Die in der Literatur angegebenen Nährstoffzusammensetzungen der Kulturmedien wurden zum Teil modifiziert, um eine bessere Vitalität und ein gesteigertes Wachstum der Algen zu erreichen, um den pH-Wert zu modifizieren oder die Pufferkapazität des Mediums auf null zu setzen. Letzteres war für die IMOLA-Messungen sehr wichtig, da eine Pufferkapazität des verwendeten Nährmediums die Messung des pH-Wertes stark verändert hätte. Es wurden folgende Nährmedien verwendet:

Nährmedium nach ZEHNDER & GORHAM (1960):

Tabelle 2.1: Nährmedium nach Zehnder & Gorham.

Lösung	Inhalt	Stocklösung	Nährmedium
Lösung 1	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O NaNO ₃	5,9 g/l 46,7 g/l	5 ml
Lösung 2	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	4,1 g/l	5 ml
Lösung 3	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,5 g/l	5 ml
Lösung 4	NaHCO ₃	16,8 g/l	5 ml
FeEDTA-Lösung	NaEDTA FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,145 g/l 0,3 g/l	10 ml
Spurenelemente	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ x 4 H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ZnSO ₄ Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O Cu SO ₄ x 5 H ₂ O	3,1 g/l 1,69 g/l 0,09 g/l 0,29 g/l 0,15 g/l 0,13 g/l	0,08 ml
Bidestilliertes Wasser			969,92 ml

Dieses Medium wird im Folgenden als Grünalgenmedium (GM) bezeichnet, da es in dieser Arbeit vorwiegend für die Kultivierung von Grünalgen verwendet wurde. Das GM hatte keine Pufferkapazität und der pH-Wert lag zwischen pH 9 und pH 10.

GM wurde für die Kultivierung der Arten *Chlorella kessleri* (SAG-Stamm 211-11h), *Closterium ehrenbergii* (SAG-Stamm 134.80), *Cosmarium* spec., *Desmodesmus subspicatus* (SAG-Stamm 86.81), *Macrochloris radiosa* (SAG-Stamm 213-2a), *Monoraphidium griffithii*, *Scenedesmus obliquus* und *Synechocystis* spec. verwendet.

NLL-Medium (SCHWOERBEL 1994)

Tabelle 2.2: NLL-Medium.

Lösung	Inhalt	Stocklösung	Nährmedium
NLL-Nährstoffmix (inklusive Spurenelemente)	KNO ₃	1 g/l	100 ml
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,83 g/l	
	K ₂ HPO ₄	0,52 g/l	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l	
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g/l	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,0063 g/l	
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,099 g/l	
	NiSO ₄	0,0263 g/l	
	CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0028 g/l	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,0018 g/l	
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g/l	
NH ₄ VO ₃	0,0029 g/l		
FeEDTA-Lösung	FeEDTA		10 g
Bidestilliertes Wasser			900 ml

Dieses Medium wurde dahingehend modifiziert, dass der pH-Wert, nicht wie bei SCHWOERBEL (1994) beschrieben, bei pH 6,5 sondern bei pH 7,6 lag. NLL wurde für die Kultivierung von *Chlorella kessleri* (SAG-Stamm 211-11h), *Desmodesmus subspicatus* (SAG-Stamm 86.81) und *Macrochloris radiosa* (SAG-Stamm 213-2a) verwendet.

Basal-Medium (ES-Medium) (SAG 2006)

Tabelle 2.3: ES-Medium.

Lösung	Inhalt	Stocklösung	Nährmedium
Lösung 1	KNO ₃	10 g/l	20 ml
Lösung 2	K ₂ HPO ₄	1 g/l	20 ml
Lösung 3	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g/l	20 ml
Spurenelemente *1	Spurenelemente-Mix		5 ml
Erdextrakt *2	Erdextrakt		30 ml
Bidestilliertes Wasser			905 ml

*1 Spurenelemente	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g/l	1 ml
	MnSO ₄ x 4 H ₂ O	1 g/l	2 ml
	H ₃ BO ₃	2 g/l	5 ml
	Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g/l	5 ml
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,2 g/l	5 ml
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g/l	1 ml
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O		0,7 g
	EDTA (Titriplex III)		0,8 g
Bidestilliertes Wasser			981 ml

*2 Ein sechs Liter-Becherglas wurde zu einem Drittel mit Erde gefüllt und so viel destilliertes Wasser zugegeben, dass die Erde mit ca. 5 cm Wasser überschichtet war. Dieses Gemisch wurde innerhalb von 24 Stunden für jeweils eine Stunde gekocht. Das nun mit Nährstoffen angereicherte Wasser (Erdextrakt) wurde durch Zentrifugieren von der Erde getrennt. Der Erdextrakt wurde zur Sterilisation autoklaviert und anschließend bei +7 °C und Dunkelheit gelagert.

Im ES-Medium wurde *Chlorella kessleri* (SAG-Stamm 211-11g) angezüchtet.

Basal-Medium mit Pepton (ESP-Medium) (SAG 2006)

Das ESP-Medium entspricht der Zusammensetzung des ES-Mediums mit der Ergänzung von 0,1% Proteose-Pepton, das nach dem Autoklavieren zugegeben wurde.

Mit dem ESP-Medium wurden *Chlorella kessleri* (SAG-Stamm 211-11g) und *Closterium ehrenbergii* (SAG-Stamm 134.80) kultiviert.

Spirulina Medium (Spir-Medium) (SAG 2006)

Tabelle 2.4: Spir-Medium.

Lösung	Inhalt	Nährmedium
Lösung 1 * ³	NaHCO ₃ Na ₂ CO ₃ K ₂ HPO ₄	13,61 g 4,03 g 0,5 g
Bidestilliertes Wasser		500 ml
Lösung 2 * ³	NaNO ₃ K ₂ SO ₄ NaCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O CaCl ₂ x 2 H ₂ O FeSO ₄ x 7 H ₂ O EDTA (Titriplex III)	2,5 g 1 g 1 g 0,2 g 0,04 g 0,01 g 0,08 g
(Spurenelemente * ¹ siehe ES-Medium)	Spurenelemente-Mix	5 ml
Bidestilliertes Wasser		500 ml

*³ Lösung 1 und Lösung 2 wurden getrennt von einander autoklaviert und anschließend zu 1 l Nährmedium vereint.

Das Spir-Medium wurde für die Kultivierung von *Asterococcus limneticus* (SAG-Stamm 20.85) verwendet.

Agar-Nährmedium

1 g Agar (Firma: Fluka) wurde in insgesamt 100 ml Gesamtvolumen gelöst (1% Agar). Dazu wurde der Agar zunächst in 50 ml bidestilliertem Wasser bei 100 °C gelöst und anschließend 50 ml GM zugegeben. Jeweils 10 ml des Agars wurde in sterile Petrischalen (Firma: Greiner Labortechnik, Modell: Petrischalen ø 6 cm) überführt, um folgende Algenarten darauf zu kultivieren: *Chlorella kessleri* (SAG-Stamm 211-11h), *Cosmarium spec.* und *Monoraphidium griffithii*. *Chlorella kessleri* (SAG-Stamm 211-11h) und *Monoraphidium griffithii* wurden in einer Verdünnung von 1:20, *Cosmarium spec.* in einer Verdünnung von 1:10 auf den Agar ausgebracht. Zudem wurde eine Petrischale als Kontrollversuch nicht mit Algen beschickt. Dadurch konnte kontrolliert werden, ob der Agar mit Bakterien oder Pilzen verunreinigt war. Durch das Ausplattieren der Algenkulturen auf Agar konnte überprüft werden, ob sich Bakterien oder Pilze in den Al-

genkulturen befanden (Bakterien-Rasenbildung) (KOOISTRA ET AL. 1991). Die beschickten Agarplatten wurden zusätzlich über Nacht bei 30 °C wärmebehandelt, um das Wachstum eventuell vorhandener Bakterien anzuregen. Nach der Wärmebehandlung wurden die Agarkulturen in der Klimakammer bei konstanten Licht- (PPFD = 200 ±1 µmol/m² x s) und Temperaturbedingungen (16 °C) kultiviert.

Bacillariophyceen Medium (BAC-Medium) (SAG 2006)

Tabelle 2.5: BAC-Medium.

Lösung	Inhalt	Stocklösung	Nährmedium
Lösung 1	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	2 g/l	20 ml
Lösung 2	K ₂ HPO ₄	1 g/l	10 ml
Lösung 3	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g/l	25 ml
Lösung 4	Na ₂ CO ₃	1 g/l	20 ml
Lösung 5	Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O	1 g/l	50 ml
Lösung 6	Fe-Zitrat	1 g/l	10 ml
Lösung 7	Zitronensäure	1 g/l	10 ml
Spurenelemente* ¹ (siehe ES-Medium)			5 ml
Erdextrakt* ² (siehe ES-Medium)			30 ml
Bidestilliertes Wasser			820 ml
Vitamin B12			5 x 10 ⁻⁶ g/l * ⁴

*⁴ Zugabe des Vitamin B12 erst nach dem Autoklavieren, da sonst das Vitamin zerstört wird.

Folgende Arten wurden mit BAC-Medium kultiviert: *Cocconeis placentula*, *Fragilaria spec.*, *Gomphonema parvulum* (SAG-Stamm 1032-1), *Navicula pelliculosa* (Stamm 1050-3) *Nitzschia frustulum* und *Nitzschia spec.*

CHU 10-Medium (STEIN 1973)

Tabelle 2.6: CHU 10-Medium.

Lösung	Inhalt	Stocklösung	Nährmedium
CHU 1	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	5,8 g/l	10 ml
CHU 2	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	57,58 g/l	1 ml
CHU 3	K_2HPO_4	10 g/l	1 ml
CHU 4	MgSO_4	25 g/l	1 ml
CHU 5	Fe-Zitrat Zitronensäure	33,5 g/l 33,5 g/l	1 ml
CHU 6	Na_2CO_3	20 g/l	1 ml
Spurenelemente	H_3BO_3 $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	2,86 g/l 1,81 g/l 0,222 g/l 0,390 g/l 0,079 g/l 0,0494 g/l	0,5 ml
Bidestilliertes Wasser			983,5 ml
Vitaminlösung	Thiamin Biotin Cyanocobalamin	0,0001 g/l 0,0005 g/l 0,0005 g/l	1 ml * ⁵

*⁵ Zugabe der Vitaminlösung erst nach dem Autoklavieren, da sonst die Vitamine zerstört werden.

Mit CHU 10-Medium wurden *Achnanthes minutissima*, *Cocconeis placentula*, *Cymbella affinis*, *Diatoma tenuis*, *Gomphonema angustum*, *Navicula spec.* und *Nitzschia palea* kultiviert.

Hartwasser Diatomeen Medium (HWD-Medium) (RENNEBARTH 2007)

Tabelle 2.7: HWD-Medium.

Lösung	Inhalt	Stocklösung	Nährmedium
CHU 1	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	5,8 g/l	10 ml
CHU 2	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	57,58 g/l	1 ml
CHU 3	K_2HPO_4	10 g/l	1 ml
CHU 5	Fe-Zitrat Zitronensäure	33,5 g/l 33,5 g/l	1 ml
Spurenelemente	H_3BO_3 $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ H_2SeO_3	1,43 g/l 0,91 g/l 0,2 g/l 1 g/l 0,01 g/l 0,025 g/l 0,002 g/l	1 ml
Karbonatlösung	Na_2CO_3 Na_2HCO_3	20 g/l 20 g/l	1 ml
Magnesiumlösung	$\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2$ H_2SO_4 KOH	11,9 g/l 26,169 g/l 6,406 g/l	1 ml
Bidestilliertes Wasser			983 ml
Vitaminlösung	Thiamin Biotin Cyanocobalamin	0,0001 g/l 0,0005 g/l 0,0005 g/l	1 ml * ⁶

*⁶ Zugabe der Vitaminlösung erst nach dem Autoklavieren, da sonst die Vitamine zerstört werden.

Das HWD wurde für die Anzucht von *Achnanthes minutissima*, *Cocconeis placentula*, *Cymbella affinis*, *Diatoma tenuis*, *Gomphonema angustum*, *Navicula spec.* und *Nitzschia palea* verwendet.

2.1.6 Mit Bakterien kontaminierte Algenkulturen

Da für die IMOLA-Messungen axenische Algenmonokulturen benötigt wurden, mussten sämtliche Arbeitsprozesse an den Kulturen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Zum einen musste verhindert werden, dass die Algenmonokulturen bei ihrer Handhabung von außen mit Mikroorganismen verunreinigt wurden. Zum anderen befanden sich bereits in vielen Fällen Mikroorganis-

men in den Algenmonokulturen. Insbesondere war dies bei Algenmonokulturen der Fall, die aus Freilandisolaten hervorgingen. Bei der Isolation wurden, trotz des Waschvorganges, häufig Bakterien aus der Freilandprobe in die Kultur mit eingebracht. Des Öfteren waren allerdings auch gekaufte Algenmonokulturen nicht vollkommen frei von Bakterien. Folgende Versuche wurden durchgeführt, um Bakterien aus den Algenmonokulturen zu entfernen:

2.1.6.1 Chloramphenicol

Chloramphenicol (Firma: Fluka) ist ein Breitbandantibiotikum, das die Knüpfung der Peptidbindungen bei der Translation in Prokaryonten blockiert. Chloramphenicol wird, wie z. B. bei einer Studie von HUNT & MANDOLI (1992), häufig für die Eliminierung von Bakterien in Algenkulturen eingesetzt. Für diesen Versuch wurde eine mit Bakterien kontaminierte *Monoraphidium griffithii*-Monokultur verwendet. Es wurden sechs Ansätze mit je drei Parallelen unterschiedlicher Chloramphenicol-Konzentrationen (0 µg/ml (Kontrolle); 2 µg/ml; 5 µg/ml; 7 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml) verwendet. Die Proben wurden fünf Tage nach der Chloramphenicol-Zugabe an einem Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) bei 1000-facher Vergrößerung hinsichtlich ihrer Bakterienanzahl ausgezählt. Es wurde jeweils 1 ml der Kultur in einen Utermöhl-Objekträger (Firma: PhycoTech) eingebracht. Von der Probe wurden jeweils zehn GF ausgezählt (Fläche/GF: 0,01 mm²). Für die Berechnung der mittleren Bakterienzellzahl pro Konzentrationsstufe wurden zunächst die Mittelwerte der Bakterienzellzahlen je Replikat aus den zehn Gesichtsfeldern berechnet. Anschließend wurde aus den drei Mittelwerten der Replikate der Mittelwert der Bakterienzellzahl je Konzentrationsstufe bestimmt.

15 ml einer mit Bakterien verunreinigten *Navicula pelliculosa*-Kultur wurden in einer Schnappdeckelflasche (Firma: Fisherbrand, Modell: Schnappdeckelflasche 25 ml Volumen) mit 15 µg/l Chloramphenicol behandelt. Zusätzlich wurde eine Kontrollkultur mit 0 µg/l Chloramphenicol angesetzt. Die Proben wurden zwei Tage nach der Zugabe des Chloramphenicols hinsichtlich der Bakterienzellzahl am Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) bei 1000-facher Vergrößerung untersucht.

Aus 1 ml je Ansatz wurden 20 GF (Fläche/GF: 0,01 mm²) am Umkehrlichtmikroskop ausgezählt. Aus den Bakterienzellzahlen der 20 GF wurde der Mittelwert bestimmt.

2.1.6.2 Cefotaxime

Cefotaxime ist ein Antibiotikum, das gegen Gram positive und Gram negative Bakterien wirkt. KOOISTRA ET AL. (1991) berichteten in ihrer Studie, dass durch die Zugabe von 100 µg/ml Cefotaxime axenische Algenkulturen hergestellt wurden. Da diese Methode eine Erfolgsquote von 90 bis 100% hatte, wurde sie in der vorliegenden Arbeit angewendet. Eine mit Bakterien verunreinigte *Monoraphidium griffithii*-Monokultur wurde, in jeweils drei Replikaten, mit drei Konzentrationsstufen des Cefotaximes angesetzt (0 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml). In drei Schnappdeckelflaschen (Firma: Fisherbrand, Modell: Schnappdeckelflasche 25 ml Volumen) wurden jeweils 15 ml der Algenkultur gegeben und die entsprechende Cefotaxime-Konzentration hinzupipettiert. Die Bakterienzellzahl wurde acht Tage nach dem Versuchsbeginn am Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) bei 1000-facher Vergrößerung bestimmt. Je Replikat wurden zehn GF ausgezählt (Fläche/GF: 0,01 mm²). Für die Bakterienzellzahlen aus den jeweils zehn GF je Replikat wurden die Mittelwerte bestimmt, welche als Berechnungsgrundlage für die Mittelwerte der Bakterienzellzahl je Konzentrationsstufe herangezogen wurden.

2.1.6.3 Filtration

Für diesen Versuch wurde eine mit Bakterien verunreinigte *Monoraphidium griffithii*-Monokultur verwendet. Der Ansatzpunkt dieses Versuches basierte auf der Annahme, dass auf Grund des Größenunterschiedes zwischen Algen und Bakterien, diese durch einen geeigneten Filter von einander getrennt werden können. Es wurden Cellulose-Acetatfilter (Firma: Sartorius, Modell: AE 98) mit einer Porenweite von 5,0 µm verwendet. Alle Filteraufsätze (Firma: Sartorius, Modell: SM 16510), Cellulose-Acetatfilter, Gefäße, Pipetten und sonstige Arbeitsutensilien wurden zu Beginn des Versuches sterilisiert. Die Arbeiten fanden ausschließlich in einer Sterilbank (Firma: Ceag Schirp Reinraumtechnik) statt. Bei diesem Verfahren wurden die Bakterien durch den Filter hindurchgespült, wohingegen die Algen auf dem Filter verblieben. Die Filtration wurde mit einer

Vakuumpumpe (Firma: Vakuubrand GmbH & Co, Modell: Membran Vakuumpumpe MZ 2C, Saugvolumen 1,7 m³/h) durchgeführt. 30 ml der Zellkultur wurde in den Trichter der Filterapparatur eingebracht. Zu der Zellkultur im Filtertrichter wurde fortwährend steril filtrierte Trinkwasser (Waschwasser) zugegeben, um ein Verstopfen des Filters mit sedimentierten Algen zu verhindern. Zusätzlich wurde dadurch der Bakterientiter weiter verdünnt. Insgesamt wurden 600 ml Waschwasser zum Spülen der Kultur verwendet. Mit einer 1000 µl Pipette wurden absedimentierte Algen stetig mit steril filtriertem Wasser vom Filter aufgewirbelt, so dass die Algen frei in der Lösung schwammen und den Filter nicht verstopften. Zudem wurde der 5 µm Cellulose-Acetatfilter zweimal durch einen neuen Filter ersetzt. Dadurch konnte die Bakterienkontamination durch, an das Filtermaterial anhaftende oder in den Poren steckende, Bakterien noch einmal verringert werden. Am Ende der Filtration wurde das Waschwasser gegen steriles Kulturmedium ausgetauscht. Die filtrierte *Monoraphidium griffithii*-Kultur wurde in sterile Kulturkolben überführt und in der Klimakammer bei konstanten Licht- (PPFD = 200±1 µmol/m² x s) und Temperaturbedingungen (16 °C) kultiviert. Die Kultur wurde nach zehn Tagen bei 1000-facher Vergrößerung unter dem Umkehrlichtmikroskop (Firma: Leitz, Modell: Labovert) hinsichtlich der Bakterienkontamination untersucht. Aus 1 ml Probenvolumen wurden zehn GF (Fläche/GF: 0,01 mm²) ausgezählt, deren Mittelwert für die Auswertung herangezogen wurde.

2.2 Das IMOLA-Messsystem

Für die IMOLA-Messungen wurde der in der Arbeitsgruppe um Prof. Wolf entwickelte Metabolic Chip SC1000 der Firma Bionas eingesetzt (BAUMANN ET AL. 1999) (Abbildung 2.5). Dieser Biosensorchip misst mittels Mikrosensoren die Sauerstoffsättigung, den pH-Wert, die Impedanz und die Temperatur einer Flüssigkeit. Für eine IMOLA-Messung wurden Algen aus einer axenisch, monoklonalen Algenkultur auf einen Biosensorchip appliziert, der den bei der Photosynthese der Algen entstehenden Sauerstoff misst. Die direkt auf den Chipsensoren justierten Algen dienen somit als Signalwandler. Sie reagieren auf veränderte Umweltbedingungen, wie z. B. Herbizide im Wasser, mit einer Veränderung ihrer Photosyntheseleistung (Sauerstoffproduktion). Durch eine Veränderung der Sauerstoffproduktion der Algen, veränderte sich auch der pH-

Wert. Dieser Vitalitätsparameter gab indirekt Auskunft über den Zustand der Algenzellen: durch die Photosynthese der Algen entsteht einerseits aus Wasser und dem im Wasser gelösten CO_2 organisches Material und Sauerstoff (CAMPBELL 1997). Andererseits verbrauchen die Algen durch die Zellatmung Sauerstoff und geben CO_2 in das sie umgebende Milieu ab. Ein Prozent des im Wasser gelösten CO_2 wandelt sich zu Kohlensäure (H_2CO_3) um, die mit Wasser wiederum Hydrogenkarbonat (HCO_3^-) und Hydroniumionen (H_3O^+) bildet. Dieser Prozess führt zu einem Absinken des pH-Wertes. Wird aber dem Wasser durch die Photosynthese der Algen CO_2 entzogen, so wird die Ansäuerung geringer und der pH-Wert steigt (SCHUBNELL ET AL. 1999). Dieser Effekt konnte durch die auf dem Biosensorchip integrierten pH-Sensoren gemessen werden.

2.2.1 Technischer Aufbau und Funktionsweise des IMOLA-Messsystems

Das IMOLA-Messgerät wurde am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der TUM entwickelt und der Limnologischen Station Iffeldorf der TUM als Leihgabe zur Verfügung gestellt. Das Gerät war 41 cm lang, 13 cm hoch und 10,5 cm breit und bestand aus drei austauschbaren Modulen (Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3).



Abbildung 2.2: IMOLA-Messgerät mit PCMCIA-Card zur Datenübertragung auf einen Computer (Quelle: Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der TUM).

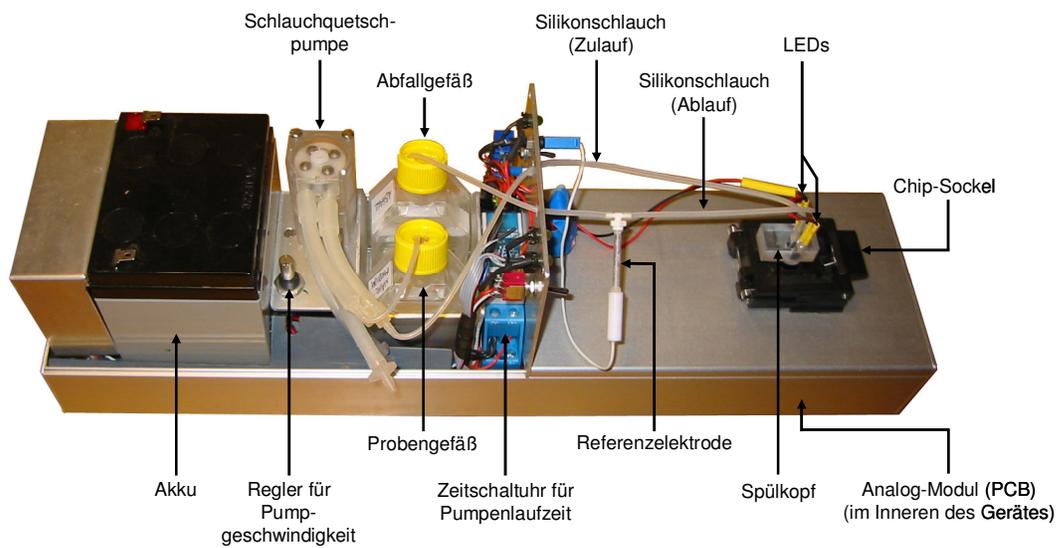


Abbildung 2.3: Aufbau des IMOLA-Messgerätes ohne Abdeckung (Quelle: Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der TUM).

Modul 1

Das Fluidik-Modul sorgte für den Austausch des Mediums in der Messkammer (Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4). Mittels einer Schlauchquetschpumpe wurde das entsprechende Medium aus dem Probengefäß angesaugt und über einen Silikonschlauch zum Spülkopf befördert (Zulauf). Der Spülkopf enthielt zwei durchgehende Bohrungen. Über den einen Kanal gelangte das Medium auf den Biosensorchip, über den anderen Kanal wurde der Überstand aus der Messkammer gedrückt und über einen Silikonschlauch zum Abfallgefäß transportiert (Ablauf). Im Ablauf war eine Ag/AgCl Referenz-Elektrode integriert. Der verwendete Silberdraht wurde nach einer Methode von HUANG ET AL. (2003) chloriert und befand sich in einem, mit 3 M Kaliumchloridlösung (KCl) gefüllten, Elektrolyt-Barrel (Firma: Microelectrodes, inc., Bedford, USA). Zusätzlich enthielt der Spülkopf zwei LEDs (Light Emitting Diode) (Firma: Conrad Elektronik, Model: 489814-62). Sie dienten mit einem PPFD-Wert von $5,629 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ den Algen als Lichtquelle für die Photosynthese. Damit das Licht zu den Algen in der Messkammer vordringen konnte, wurde der Spülkopf aus lichtdurchlässigem Plexiglas gefertigt (WIEST ET AL. 2006).

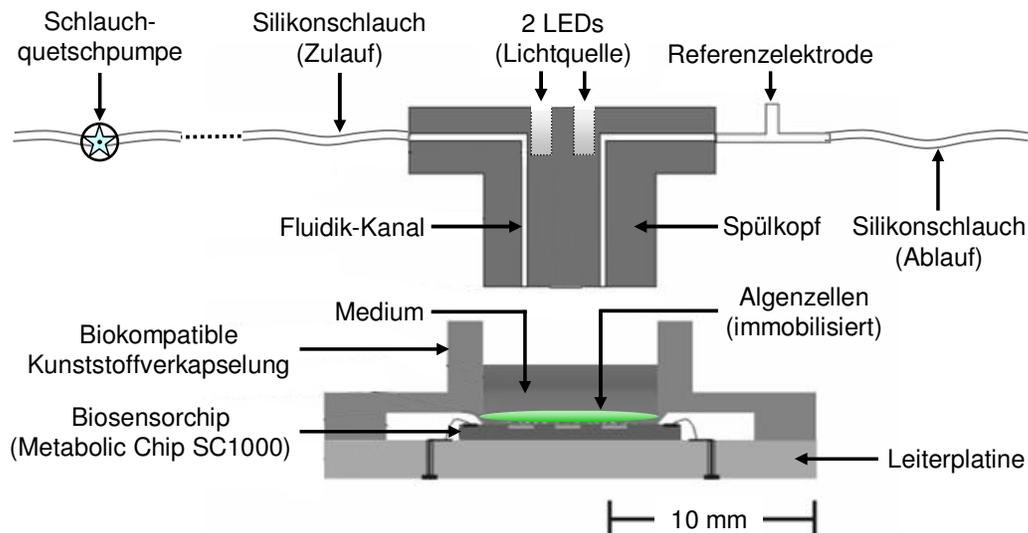


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des Fluidik-Moduls (Quelle: WIEST ET AL. 2005 A, modifiziert).

Modul 2

Das Analog-Modul (PCB = Printed Circuit Board (Leiterplatte)) beinhaltete die Elektronik für die Regelung der Sauerstoff-, pH-Wert- und Temperatur-Sensorik (Abbildung 2.3). Auf diesem Modul waren die Arbeitspunkte für den Sauerstoff- und den Temperatur-Sensor sowie für die vier pH-Sensoren (ISFET = Ionen Sensitiver Feld-Effekt-Transistor) fest eingestellt. Die Elektronik für den Sauerstoffsensor wurde galvanisch isoliert, um Ausgleichsströme zwischen dem Sauerstoffsensor und den vier ISFETs zu verhindern (WIEST ET AL. 2006). Mittels einer PCMCIA-Karte (Personal Computer Memory Card International Association) wurden die Daten digitalisiert und an einen Laptop übertragen. Die Einstellung der Pumpenlaufzeit wurde über eine im IMOLA-Messgerät integrierte Zeitschaltuhr geregelt. Die Pumpgeschwindigkeit konnte direkt an der Schlauchquetschpumpe eingestellt werden. Das Ein- und Ausschalten der Pumpe erfolgte über einen Schalter am IMOLA-Messgerät. Die LEDs wurden über einen digitalen Ausgang der PCMCIA-Karte angesteuert.

Modul 3

Das in C/C++ geschriebene Software-Modul befand sich als Programm auf dem Laptop. Die Anwendersoftware auf dem Laptop beinhaltete unter anderem Eingabefelder für die Ein- und Ausschaltfunktion der LED-Beleuchtung, die Kalibrierung der Sensoren, verschiedene Anzeigoptionen für die grafische Darstellung der Daten sowie die Eintragung schriftlicher Vermerke in eine Textdatei (WIEST ET AL. 2006). Für die Auswertung der Daten wurde die Software Cell-ChipViewer Version 2.0 benutzt (CABALA 2006). Mit diesem Programm konnten die Daten grafisch dargestellt werden. Zudem war es möglich, die linearen Regressionskoeffizienten (Steigungswerte) der einzelnen Messzyklen automatisch berechnen zu lassen.

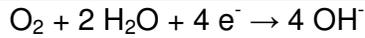
2.2.2 Technischer Aufbau und Funktionsweise des Biosensorchips

Der Biosensorchip hatte eine quadratische Form mit einer Seitenlänge von 24 mm (Abbildung 2.5). Die Fläche, in der sich die Sensoren befanden und auf der die Algen aufgebracht wurden, betrug 0,785 cm². Der Chip war in eine biokompatible Kunststoffverkapselung eingebettet, um Kurzschlüsse auf der Zuleitung

zu vermeiden (Abbildung 2.4 und Abbildung 2.5). Außerdem konnte der Chip durch diese Kunststoffummantelung im Chip-Sockel des IMOLA-Messgerätes auf den Signalabnehmern arretiert werden. In der Mitte des Chips, wo sich die Sensoren und die Zellkulturfläche befanden, wurde eine entsprechend große, kreisrunde Aussparung in der Kunststoffverkapselung frei gelassen. Hier war ein hohler Kunststoffzylinder in die Aussparung eingebracht, in den der Spülkopf bis zu einem Markierungsstrich hineingesteckt wurde. Dadurch entstand zwischen der Chipoberfläche und dem Spülkopf eine definierte Messkammer. Die Messkammer hatte einen Durchmesser von 6 mm und ein Volumen von 7 μL (WIEST ET AL. 2006).

Die Sauerstoffsättigung eines in der Messkammer befindlichen flüssigen Mediums, wurde mit einem amperometrischen Sauerstoffsensor gemessen. Es handelte sich dabei um einen Clark-Sensor ohne Membran (WIEST ET AL. 2006) (Abbildung 2.5). Auf dem Biosensorchip waren insgesamt fünf Clark-Sensoren implementiert, von welchen aber nur einer für die Messungen angesteuert wurde. Das Grundprinzip einer amperometrischen Sauerstoffmessung mittels drei Palladium-Elektroden wurde von WIEST ET AL. (2005 B) beschrieben: zwischen der Referenz-Elektrode und der Arbeitselektrode liegt ein konstantes Potenzial von -600 mV an. Bei dieser Stromstärke kommt es zur Reduktion des im Medium befindlichen Sauerstoffs an der Arbeitselektrode, der dadurch ein Elektron an die Arbeitselektrode abgibt (Formel 1, Formel 2). Der daraus resultierende Strom wird gemessen (MCLAUGHLIN ET AL. 2002). Dabei ist die gemessene Stromstärke proportional zur Sauerstoffsättigung im Medium. Die Spannung U von -600 mV muss jedoch konstant gehalten werden, da nur bei genau dieser Spannung vornehmlich Sauerstoff reduziert wird. Allerdings ist es nicht möglich, das Potenzial der Referenz-Elektrode und damit die Spannung von -600 mV konstant zu halten, wenn über diese ein Strom fließt. Die Ionen aus dem Medium würden ein Störpotenzial verursachen, wodurch sich das Bezugspotenzial an der Referenz-Elektrode ändern würde. Das Resultat wäre eine starke Drift der Messung. Deswegen wird eine dritte Palladium-Elektrode (Gegenelektrode) benutzt, um die Referenz-Elektrode stromlos zu halten (HAMANN & VIELSTICH 2005). Zwischen der Gegenelektrode und der Arbeitselektrode finden die chemischen Reaktionen und der Stromfluss statt. Somit dient die Referenz-

renz-Elektrode nur dazu, die Spannung an der Arbeitselektrode konstant bei -600 mV zu halten.



Formel 1: Sauerstoffreaktion an der Arbeitselektrode in alkalischen Lösungen.



Formel 2: Sauerstoffreaktion an der Arbeitselektrode in sauren Lösungen.

Für die Messung des pH-Wertes wurden sechs ISFETs auf dem Biosensorchip implementiert. Davon wurden aber nur vier vom IMOLA-Messgerät angesteuert. Das Grundprinzip der pH-Wert-Messung mittels ISFET ist wie folgt beschrieben: zwischen einer Stromquelle und dem Stromabfluss befindet sich eine Schicht, die sensitiv gegenüber Wasserstoffionen ist. Je nach der Wasserstoffionen-Konzentration in der umgebenden Lösung werden Ladungsträger in dieser Schicht verdrängt oder angereichert, wodurch sich der elektrische Widerstand ändert. Durch den Bezug zum konstanten Elektrodenpotenzial der Ag/AgCl Referenz-Elektrode kann der pH-Wert der Lösung bestimmt werden. Die Temperatur wurde mit einer in den Chip integrierten PN-Diode gemessen. Diese Messung beruht auf der temperaturabhängigen Veränderung des Widerstands der PN-Diode. Zusätzlich waren IDES-Strukturen zur Messung der Impedanz auf dem Chip aufgebracht. Der IDES-Sensor wurde jedoch nicht benutzt, da dieser nur für Messungen mit adhärennten Zellen verwendet wird.

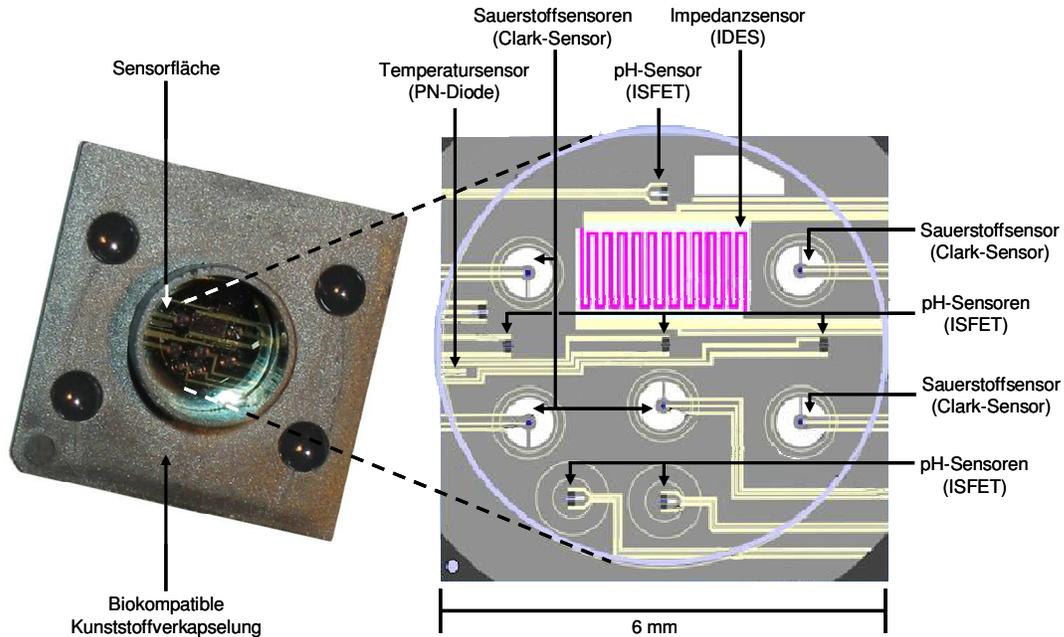


Abbildung 2.5: Links: Biosensorchip in biokompatibler Kunststoffverkapselung. Rechts: Schematischer Aufbau eines (unverkapselten) Biosensorchips (Quelle: Bionas GmbH).

2.2.3 Biologischer Testorganismus

Für die IMOLA-Messungen wurde als lebender Organismus die einzellige Grünalge *Chlorella kessleri* verwendet (Abbildung 2.6). Diese Algenart ist systematisch folgendermaßen einzuordnen:

Abteilung: Chlorophyta

Klasse: Chlorophyceae

Ordnung: Chlorococcales

Familie: Chlorellaceae

Gattung: *Chlorella*

Art: *Chlorella kessleri*

Die Gattung *Chlorella* kommt im Freiland sehr häufig vor und ist trockenresistent. *Chlorella*-Arten gehören zu den ersten, im Labor gezüchteten Algen. Hier lösten sie Pflanzenblätter als Versuchsmaterial ab, da diese zu komplex in ihrer Struktur waren. Als Versuchsobjekt werden *Chlorella*-Arten häufig als Modellorganismen verwendet, da die gesamte Pflanze eine einzellige, kleine Zelle ist und sich deshalb für das Studium des pflanzlichen Metabolismus eignet

(CANTER-LUND & LUND 1995). Photosynthesepigmente sind Chlorophyll-a und -b, aber auch das Carotinoid Lutein.

Die Grünalgenart *Chlorella kessleri* wurde von FOTT & NOVAKOVA (1969) als einzellige, kugelige Alge beschrieben, deren junge Zellen und Autosporen leicht ellipsoidisch oder rhombisch sind. Die Zellwand ist dünn und der Chloroplast ist tropfen- bis mandelförmig. Die Pyrenoide sind breitellipsoidisch bis rundlich und deutlich mit zwei bis vier Stärkescheiden bekleidet, die in der basalen Verdickung der Chloroplasten liegen. Die Vermehrung findet über zwei bis vier oder sogar 16 Autosporen statt, bei deren Freiwerdung die Mutterzellwand zerreißt. Die Mutterzelle teilt sich innerhalb von 16 bis 20 Stunden in vier Tochterzellen auf, welche sich wiederum innerhalb der nächsten 16 bis 20 Stunden vervielfachen können. Die Zellen weisen Größenordnungen von 2,5 bis 8,9 μm auf.

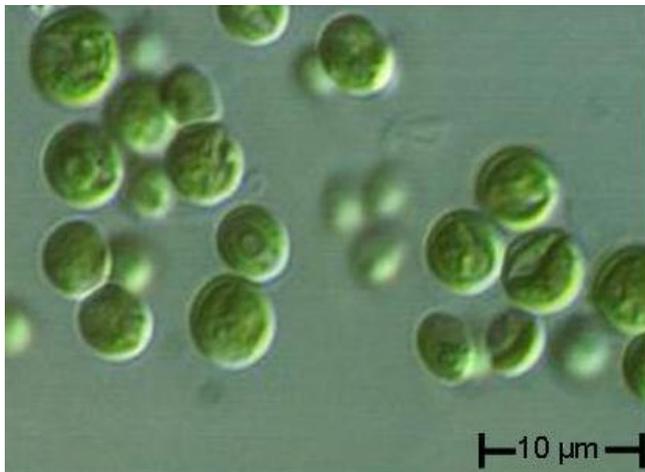


Abbildung 2.6: *Chlorella kessleri* bei 1000-facher Vergrößerung.

Von allen gezüchteten Algenarten wurde *Chlorella kessleri* auf Grund folgender Eigenschaften für die IMOLA-Messungen ausgewählt:

Chlorella kessleri eignete sich auf Grund ihrer geringen Größe und rundlichen Form besonders gut für das Biomonitoring mittels der IMOLA-Technologie. Ihre robuste Bauweise macht sie belastbar gegenüber mechanischen Beanspruchungen, wie sie bei den IMOLA-Messungen auftraten. Zudem ist die Gattung *Chlorella* ubiquitär verbreitet und kommt in vielen unterschiedlichen Süßgewässern mit unterschiedlicher Wasserqualität vor (EL-SHEEK ET AL. 1994, TRAVIESO ET AL. 1996). Diese Eigenschaft war von großem Vorteil im Hinblick auf die Entwicklung eines Gewässerüberwachungssystems, da diese Algenart gegenüber

einer großen Palette an Probenwasser unterschiedlichen Nährstoffgehaltes tolerant ist. Zudem zeichnet sich *Chlorella kessleri* durch eine hohe Sensitivität gegenüber Schadstoffen aus, wie es beispielsweise von ROJIČKOVÁ-PADRTOVÁ & MARŠÁLEK (1999) und von LUKAVSKY (1992) untersucht wurde. Für die IMOLA-Messung bedurfte es Kulturen mit hohen Individuendichten, hohen Wachstumsraten und ausreichendem Volumen an Zellkultur, um den täglichen Bedarf an frischer Algenkultur für die IMOLA-Messungen decken zu können. Auch hierfür eignet sich *Chlorella kessleri* hervorragend, da sie unter definierten Laborbedingungen sehr gut wächst (ROJIČKOVÁ-PADRTOVÁ & MARŠÁLEK 1999).

2.2.4 Immobilisierung von *Chlorella kessleri* auf dem Biosensorchip

Chlorella kessleri wächst nur in geringem Maße auf Substrat auf, weshalb die Algen bei den IMOLA-Messungen, durch den pumpengenerierten Durchfluss im Messsystem, aus der Messkammer herausgespült würden. Die Algenzellen mussten deshalb auf dem Biosensorchip immobilisiert werden. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

NAESSENS ET AL. (2000) und VÉDRINE ET. AL. (2003) immobilisierten Algen für ihre Messungen in einer porösen Matrix. Dazu wurde ein Quarz Mikrofaserfilter (Firma: Whatman® Modell: GF/C bzw. QMA) verwendet. Dieses Grundprinzip wurde für die IMOLA-Messungen aufgegriffen und modifiziert. Die Modifizierung war nötig, um konstante, deutliche und standardisierte Messergebnisse mit dem Biosensorchip zu erreichen. Für die in dieser Arbeit weiter entwickelte und modifizierte Methode zur Immobilisierung der Algen wurde ein 13 mm Filteraufsatz (Firma: Sartorius, Modell: Syringe filter holder 13 mm) verwendet, der mit einem PVC-Membranfilter (Firma: Reichelt, Modell: PVC, Porengröße: 0,9 µm) bestückt wurde. Auf diesen PVC-Membranfilter wurde ein Papierfilter (Firma: Schleicher & Schuell, Modell: 589² Weißband) aufgebracht, dessen Größe der Messkammer des Biosensorchips entsprach. In eine sterile Einwegspritze (Firma: Braun Melsungen AG, OMNIFIX 10 ml DIN 13098-A-10-LN) wurden 5 ml einer axenisch, monoklonalen *Chlorella kessleri* Algenkultur aufgezogen und durch das beschriebene Doppelfiltersystem filtriert (Abbildung 2.7). Die Algenzellen wurden in die Feinstruktur des Papierfilters gepresst und dadurch immobilisiert. Die Algenzellen konnten auf Grund der geringen Porenweite des

Membranfilters den Filter nicht passieren, weshalb ein großer Druck aufgewendet werden musste, um die Algenzellen vom Kulturmedium zu trennen. Der aufgewendete Druck führte zu einer starken Akkumulation der Algenzellen in der Filterstruktur des Papierfilters. Der mit Algen besetzte Papierfilter (Algenfilter) wurde in die Messkammer des IMOLA-Messgerätes eingebracht und direkt auf die Sensoren appliziert (Abbildung 2.4). Die große Algenzellzahl, die eine hohe Photosyntheseleistung erbrachte, führte zu deutlich messbaren Signalen des Sauerstoffsensors und der pH-Sensoren. Der Prozess der Immobilisierung wurde immer mit derselben Algenzellzahl durchgeführt (NAESSENS ET AL. 2000). Damit wurde gewährleistet, dass alle IMOLA-Messungen stets mit derselben Zellzahl reproduzierbar durchgeführt wurden. Dazu wurde die für die Messung verwendete Algenkultur an einem Zweistrahlphotometer (Firma: Hitachi, Modell: Hitachi 150-20) auf einen Absorptionswert von 2,3 bei einer Wellenlänge von 680 nm eingestellt (LAI ET AL. 2002, MA ET AL. 2002). Dieser Wert wurde durch Verdünnung der Algenkultur mit GM erreicht und als Standardwert festgelegt.

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Filter, Materialien und Werkzeuge wurden entweder autoklaviert, oder mit 94%igem Ethyl-Alkohol und/oder im UV-C Licht (Firma: Philips, Modell: 8T03G/ W30 VUT Long Life) sterilisiert.

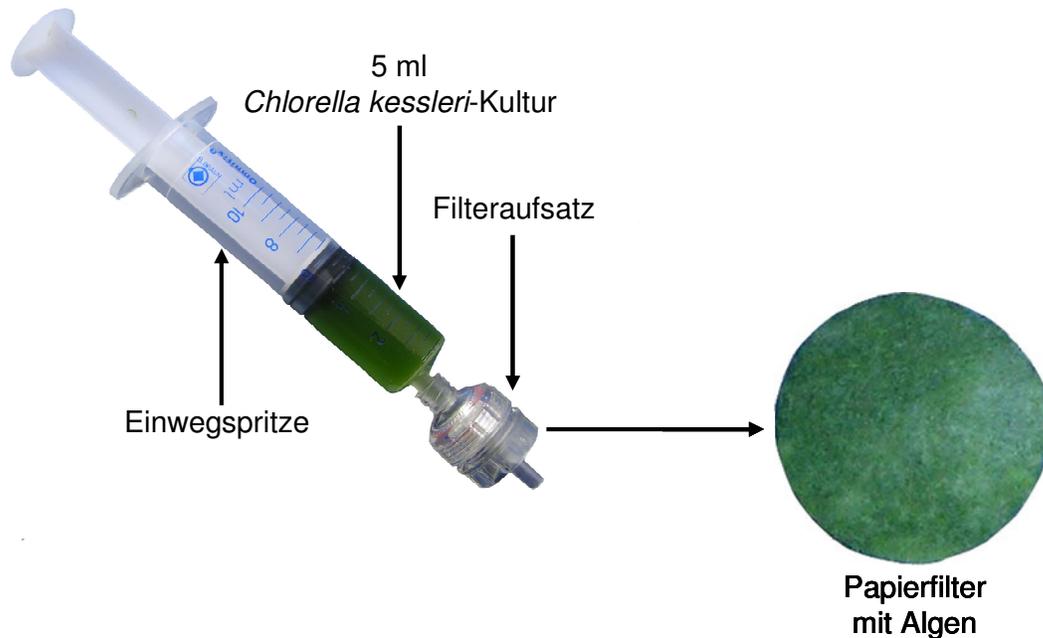


Abbildung 2.7: Herstellung eines Algenfilters mittels der Doppelfiltermethode.

2.2.4.1 Chlorophyll-a-Bestimmung (Doppelfiltermethode)

Der Chlorophyll-a-Gehalt der mit Algen besetzten Papierfilter wurde bestimmt und damit die, für die IMOLA-Messungen wichtige, Reproduzierbarkeit der unter 2.2.4 beschriebenen Methode untersucht. Die Chlorophyll-a-Bestimmung wurde nach der Methode von NUSCH (1980) mit der Änderung nach DIN 38 412-L16 des Deutschen Einheitsverfahrens zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung durchgeführt (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG 2006). Als Stichprobe wurden acht mit Algen besetzte Papierfilter hinsichtlich ihres Chlorophyll-a-Gehaltes folgendermaßen untersucht.

Je Probe wurden 15 ml Ethanol (Firma: Fluka, Produkt: 95%iges Ethanol) in ein lichtgeschütztes, aus Braunglas bestehendes 50 ml Weithalsgefäß pipettiert und bei 76 °C in einem Wasserbad erwärmt. Die mit Algenzellen besetzten Papierfilter wurden jeweils auf einem Biosensorchip appliziert und in das IMOLA-Messgerät eingebracht. Anschließend wurde GM für drei Minuten durch die Messkammer und somit über den Filter gepumpt. Dieses Vorgehen entsprach den Messbedingungen bei einer echten IMOLA-Messung und führte dazu, dass nicht im Filter fest verankerte Algenzellen ausgespült wurden. Damit wurde die realistische Algenzellzahl hergestellt, die tatsächlich bei den IMOLA-Messungen verwendet wurde. Anschließend wurde der Papierfilter entnommen und jeweils

in 15 ml, 76 °C warmes Ethanol überführt. Die Proben wurden für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben, um das Herauslösen des Chlorophylls aus dem Papierfilter zu optimieren. Die Proben wurden über Nacht dunkel und bei 20 °C gelagert, wobei eine Inkubationszeit von weniger als sechs Stunden und mehr als 15 Stunden nie unter- bzw. überschritten wurde. Das Chlorophyll-a der Algenzellen löste sich in dieser Zeit vollständig im Ethanol. Die Inkubation musste bei Dunkelheit stattfinden, da bei Lichteinwirkung das in Ethanol gelöste Chlorophyll-a zerstört wird (v. TÜMPLING & FRIEDRICH 1999). 10 ml dieses Extraktes wurden mit einer sterilen 20 ml-Spritze (Firma: Henke, Sass, Wolf, Modell: DIN/EN/TSO 7886-1) entnommen und durch einen Cellulose-Acetat-Membranfilter (Firma: Sartorius, ø 25 mm, Porenweite 0,45 µm) filtriert. Dieser Vorgang bewirkte, dass Verunreinigungen wie Filterpapierreste, Zellrückstände oder Staub aus dem Extrakt entfernt wurden. An einem Einstrahlphotometer (Firma: Hitachi, Modell: U-1100 Spektrometer) wurde zunächst die Extinktion des Extraktes bei einer Wellenlänge von 665 nm und einer Korrekturmessung von 750 nm durchgeführt. Dieser Messwert ergab die so genannte Roh-Fluoreszenz A, in die der Chlorophyll-a- und der Phaeophytin-Gehalt der Probe eingingen. Unmittelbar nach dieser Roh-Fluoreszenz A-Messung wurde der Küvetteninhalt zurück in das 10 ml Filtrat geschüttet und mit 30 µl 2 M HCl versetzt. Dieser Ansatz wurde jeweils für zehn Minuten bei Dunkelheit inkubiert und darauf erneut bei 665 nm mit einer Korrekturmessung bei 750 nm gemessen. Dieser Roh-Fluoreszenz B-Messwert ergab den reinen Phaeophytin-Gehalt der Probe. Roh-Fluoreszenz A-Wert minus Roh-Fluoreszenz B-Wert ergab den reinen Chlorophyll-a-Messwert. Zuvor wurde von den jeweiligen Messwerten der jeweilige der Wert der Korrekturmessung bei 750 nm abgezogen. Folgende Berechnung ergab den Chlorophyll-a-Gehalt in µg/cm² (Formel 3):

$$\beta c = 29,6 \times (\text{Roh-Fluoreszenz A} - \text{Roh-Fluoreszenz B}) \times [V_{\text{Ext}} / (F_A \times d)]$$

- βc = Massenkonzentration des Chlorophyll a [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
29,6 = Faktor, der sich aus den spezifischen Absorptionskoeffizienten des Chlorophylls und dem Säurequotienten ergibt
 V_{Ext} = Volumen des Extraktes [cm^3]
 F_A = Fläche des Papierfilters [cm^2]
 d = Schichtdicke der Küvette [cm]
Formel 3: Berechnung des Chlorophyll-a-Gehaltes.

2.2.4.2 Chlorophyll-a-Bestimmung (Einzelfiltermethode)

Außerdem wurde der Chlorophyll-a-Gehalt von Filterpapieren untersucht, bei denen kein zusätzlicher PVC-Membranfilter in das Filtersystem eingelegt wurde (Einzelfiltersystem). Mit Ausnahme dieser Modifikation wurde bei der Herstellung dieser Filter genau so verfahren wie unter 2.2.4 dargestellt. Es wurde damit die Optimierung des Chlorophyll-a-Gehaltes und letztendlich die Algenzellzahl auf dem Filterpapier durch die unter 2.2.4 beschriebene Methode des Doppelfiltersystems quantifiziert.

2.2.4.3 REM-Aufnahmen von immobilisierten *Chlorella kessleri*-Zellen im Filterpapier

Mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (Rasterelektronenmikroskop (REM); Firma: Hitachi, Modell: Hitachi S-2300) wurde dokumentiert, wie *Chlorella kessleri* durch die Doppelfiltermethode in der Feinstruktur des Filterpapiers immobilisiert wurde. Mit Algen besetzte Filterpapiere wurden, wie unter 2.2.4 beschrieben, hergestellt und anschließend gefriergetrocknet (Gefriertrockner; Firma: Christ, Modell: 100400). Die Gefriertrocknung wurde für 48 Stunden bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ im Vakuum durchgeführt. Anschließend wurde der Filter in kleine Stücke zerschnitten und diese mittels leitfähiger Haftaufkleber (Firma: Plano GmbH, Modell: Leit-Tabs Cy347, \varnothing 12 mm) auf REM-Probentellern (Firma: Plano GmbH, Modell: G3313) aufgebracht. Um die Proben im REM untersuchen zu können, wurden sie innerhalb von 125 Sekunden mit einer dünnen Goldschicht im Sputtercoater (Firma: Polaron, Modell: SC502) beschichtet. Mit der DIPS-Software (Firma: Point Electronic GmbH) wurden von den Proben am REM digitale Fotos erstellt.

2.2.5 IMOLA-Messung

2.2.5.1 Kalibrierung

Zu Beginn einer IMOLA-Messung musste das Messsystem kalibriert werden, da sonst die Messwerte in der Einheit Volt angezeigt wurden. Dazu wurde eine Zweipunkt-Kalibrierung durchgeführt. Für die Kalibrierung des Sauerstoffsensors wurde GM verwendet, das eine natürliche Luftsauerstoffsättigung von ca. 100% aufwies. Der exakte Sauerstoffgehalt des Mediums wurde vor jeder IMOLA-Messung mit einer vom IMOLA-Messgerät unabhängigen Sauerstoffsonde (Firma: WTW, Modell: Oximeter, Oxi 320; Sauerstoffsensor CelloX 325) gemessen. Der zweite Kalibrierungspunkt wurde in der Anwendersoftware gleich null gesetzt, da 0% Sauerstoffsättigung 0 Volt entsprach. Durch die Kalibrierung wurden die Messwerte in %-Sauerstoffsättigung angegeben. Die Kalibrierung der ISFETs erfolgte für den ersten Messpunkt mit GM, das mit Salzsäure (2 M HCl) künstlich auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt wurde. Der zweite Kalibrierungspunkt wurde durch die Messung von unbehandeltem GM erzielt. Der pH-Wert des unbehandelten GM lag zwischen pH 9 und pH 10. Der exakte pH-Wert des für die Kalibrierung verwendeten GM, wurde vor jeder Kalibrierung mit einer vom IMOLA-Messsystem unabhängigen pH-Sonde (Firma: WTW, Modell: pH-Meter pH 192; WTW, pH Elektrode SenTix 61) bestimmt. Durch die Kalibrierung wurden die Messwerte nicht in Volt, sondern direkt als pH-Wert angegeben.

2.2.5.2 Versuchsdesign

Über die Anwendersoftware des IMOLA-Messgerätes konnten Intervalle für die Pumpenlaufzeit eingestellt werden. Daraus ergaben sich so genannte Messzyklen (Abbildung 2.8). Ein Messzyklus bestand zum einen aus einem 3-minütigen Austausch des Mediums in der Messkammer mittels des eingebauten Fluidik-Moduls. Zum anderen aus der eigentlichen Messung, in der die Sauerstoffproduktion der Algen und die Veränderung des pH-Wertes in der Messkammer für den Zeitraum von zehn Minuten aufgezeichnet wurden. Während dieses 10-minütigen Intervalls gab es keinen Durchfluss in der Messkammer, da die Pumpe ausgeschaltet war. Während der gesamten Messung wurden in einer Taktung von 5 Sekunden Messwerte aufgezeichnet und zeitgleich am Compu-

ter grafisch dargestellt. Durch die Abfolge vom Austausch des Testwassers und der anschließenden Sauerstoffanreicherung durch die Algen ergab sich ein typisches Sägezahnmuster. Analog zur Sauerstoffproduktion ergab sich bei den pH-Wert-Messungen ebenfalls ein Sägezahnmuster.

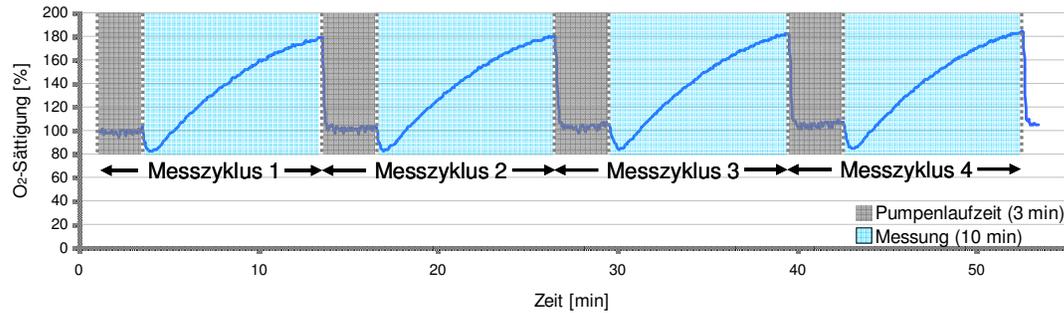


Abbildung 2.8: Sägezahnmuster einer IMOLA-Messung, bedingt durch drei Minuten Pumpenlaufzeit, auf die eine 10-minütige Messung der Sauerstoffproduktion der Algen folgt.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Sauerstoff- und pH-Wert-Daten wurde mit der zum IMOLA-Messgerät gelieferten Software der lineare Regressionskoeffizient aus den Datenpunkten der ersten vier Minuten des 10-minütigen Messintervalls berechnet (Abbildung 2.9). Der lineare Regressionskoeffizient gibt die Steigung (Steigungswert) der Regressionsgeraden an, die für die Datenpunkte errechnet wurde. Diese Berechnung war notwendig, da es bei den Messungen oft zu Fluktuations- und Drifteffekten bei den Sensoren kam.

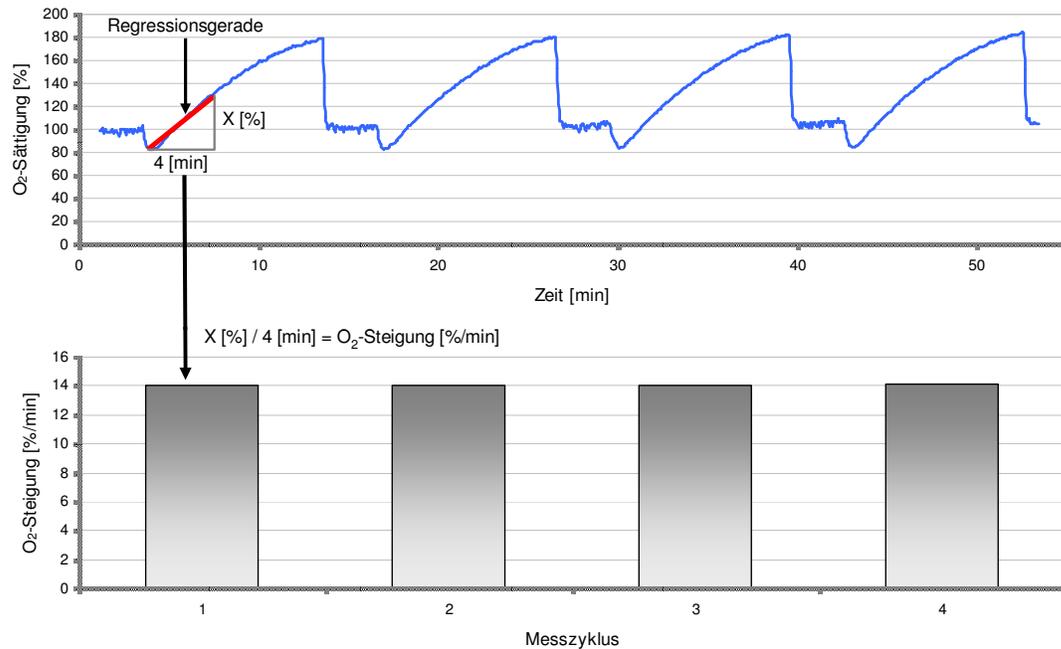


Abbildung 2.9: Berechnung der Steigungswerte.

Jede Messung bestand aus insgesamt 15 Messzyklen. Bei den ersten 5 Messzyklen (Messzyklus 1-5) wurde die Reaktion der Algen auf schadstofffreies GM gemessen. Daran schlossen sich 5 Messzyklen (Messzyklus 6-10) an, in denen GM in die Messkammer gepumpt wurde, das mit dem jeweiligen ausgesuchten Schadstoff versetzt war. Anschließend wurde erneut für 5 weitere Messzyklen (Messzyklus 11-15) schadstofffreies GM in die Messkammer gepumpt. Messzyklus 1-5 ergab die Steigungswerte bei optimalen Bedingungen für die Algen und war einer Vitalität von 100% gleichzusetzen. In den Messzyklen 6-10 war die Reaktion der Algen auf den jeweiligen Schadstoff zu beobachten. Die Messzyklen 11-15 zeigten, in welchem Ausmaß sich die Algen von der Schadstoffeinwirkung erholen konnten. Im Folgenden werden diese drei Behandlungsweisen auch als Exposition I (Messzyklus 1-5), Exposition II (Messzyklus 6-10) und Exposition III (Messzyklus 11-15) bezeichnet. Für die Auswertung der Daten wurden die Steigungswerte normiert. Dazu wurden alle Steigungswerte durch den letzten Steigungswert (Messzyklus 5) vor Schadstoffzugabe geteilt. Durch diese Maßnahme wurden die Messungen auf denselben Bezugspunkt (= 1) abgeglichen.

Eine Messung wurde erst gestartet, wenn sich das Messsystem eingeschwungen hatte und mindestens fünf Steigungswerte hintereinander ähnliche Werte ergaben, die mindestens einer Steigung von 5 entsprachen. Diese Festsetzungen hatten zum einen den Hintergrund, dass konstante Werte erreicht wurden, bevor die Schadstoffzugabe erfolgte. Zum anderen mussten Steigungswerte von mindestens 5 erreicht werden, damit eine Reaktion der Algen auf den jeweiligen Schadstoff noch genügend kleinere Werte annehmen konnte. Diese Festsetzungen wurden als Richtwert behandelt, da eine genaue Abschätzung der beiden Vorgaben während der Messung nur sehr schwer möglich war. Die dabei auftretenden Differenzen zwischen den Einzelmessungen wurden aber durch die angewendete Normierung der Daten wieder aufgehoben, wodurch eine Vergleichbarkeit der Messungen sichergestellt wurde. Für die statistische Auswertung wurde jede Messung dreimal repliziert. Je Versuch gingen der Mittelwert und die Standardabweichung aus den drei Replikaten in die Auswertung ein.

2.2.5.3 Schadstoffe

Für die IMOLA-Messungen wurden die folgenden Xenobiotika verwendet:

Herbizide - Photosystem II-Inhibitoren - Harnstoffderivate

Diuron: [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea]

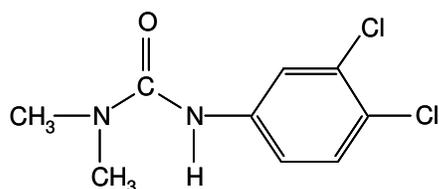


Abbildung 2.10: Chemische Strukturformel Diuron.

Isoproturon: [3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea]

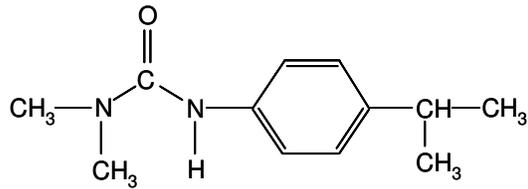


Abbildung 2.11: Chemische Strukturformel Isoproturon.

Herbizid - Photosystem II-Inhibitor - Triazinon

Metamitron: [4-amino-4,5-dihydro-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5-on]

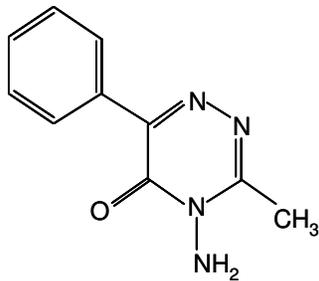


Abbildung 2.12: Chemische Strukturformel Metamitron.

Herbizid - Fettsäure-Elongase-Inhibitor - Chloracetamid

Metazachlor:

[2-chloro-N-(2,6-dimethylphenyl)-N-(1H-pyrazol-1-ylmethyl)-acetamide]

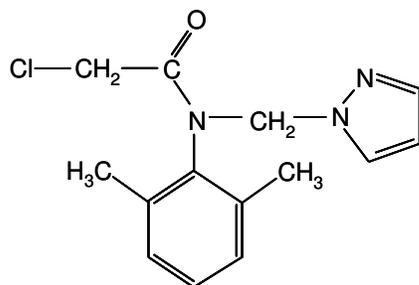


Abbildung 2.13: Chemische Strukturformel Metazachlor.

Insektizid - Cholinesterase-Inhibitor - Carbamat

Pirimicarb: [2-dimethylamino-5,6-dimethylpyrimidin-4-yl dimethylcarbamate]

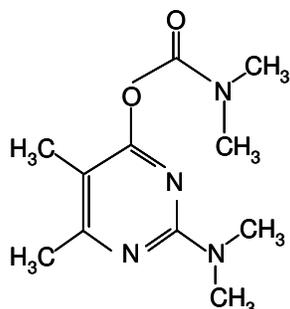


Abbildung 2.14: Chemische Strukturformel Pirimicarb.

Pharmaka - Hormon - Estradiol-Derivat

17 α -EE: 17 α -Ethinylestradiol

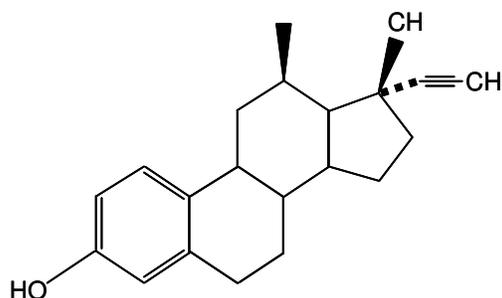


Abbildung 2.15: Chemische Strukturformel 17 α -EE.

Alle Schadstoffe wurden von der Firma Riedel-de-Haen erworben. Die ausgewählten Schadstoffe ließen sich nur in Lösungsmitteln lösen. Die Verwendung von Lösungsmitteln ist bei Toxizitätsmessungen, insbesondere von Pestiziden, häufig unumgänglich, da die Schadstoffe meist eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen (JAY 1996). Als Lösungsmittel wurde Ethanol (Firma: Fluka, Produkt: 99%iges Ethanol (absolut)) benutzt, das häufig für die Lösung von Umweltschadstoffen verwendet wird (STRATTON & SMITH 1988, JAY 1996, SCHUBNELL ET AL. 1999, MATTHES 2000, VÉDRINE ET AL. 2003, SHITANDA ET AL. 2005, PODOLA & MELKONIAN 2005).

Es wurden jeweils zwei Stocklösungen mit den Konzentrationen 500 mg/l (50%ige Ethanollösung) und 1 mg/l (0,1%ige Ethanollösung) Schadstoff hergestellt. Die Stocklösungen wurden bei Dunkelheit und Raumtemperatur gelagert. Für Messkonzentrationen größer oder gleich 50 μ g/l Schadstoff wurde die

Stocklösung mit der Konzentration 500 mg/l verwendet. Für Messungen mit Konzentrationen kleiner als 50 µg/l wurde die Stocklösung mit der Konzentration 1 mg/l verwendet. Dieses hatte zum einen den Hintergrund, dass sich die aus den Stocklösungen entnommenen Volumina exakt pipettieren ließen, da der Pipettierfehler bei kleinen Volumina z. B. < 5 µl stark ansteigt. Zum anderen sollte der Lösungsmittelanteil in der Probe gering gehalten werden, da das Ethanol neben der Wirkung des Schadstoffes einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Algen haben kann (STRATTON & SMITH 1988). Der von der U.S. Environmental Protection Agency (U.S.E.P.A.) vorgeschlagene maximale Lösungsmittelanteil für Testverfahren von 0,05% wurde bei den Biosensorchipmessungen nicht überschritten (JAY 1996).

Konzentrationen

Für die jeweiligen Schadstoffe wurden die im Folgenden aufgelisteten Konzentrationen getestet:

Tabelle 2.8: Schadstoffkonzentrationen.

Herbizide				
Diuron	100 µg/l	10 µg/l	5 µg/l	1 µg/l
Isoproturon	100 µg/l	10 µg/l	5 µg/l	
Metamitron	500 µg/l	250 µg/l	100 µg/l	
Metazachlor	500 µg/l	250 µg/l	100 µg/l	10 µg/l
Insektizid				
Pirimicarb	300 µg/l	200 µg/l	100 µg/l	50 µg/l
Pharmakum				
17α-EE	100 µg/l	10 µg/l	1 µg/l	

2.2.5.4 Hell-Dunkel-Reaktion

Für diese Messungen galt dasselbe Prinzip der Kalibrierung und dasselbe Versuchsdesign der IMOLA-Messungen, wie es unter 2.2.5.1 und 2.2.5.2 beschrieben wurde. Allerdings wurde nicht der Einfluss von verschiedenen Schadstoffen auf die Algen getestet, sondern die Reaktion der Algen auf Licht und Dunkelheit untersucht. In Exposition I wurden die Sauerstoffproduktion und die Veränderung des pH-Wertes bei eingeschalteten LED-Lampen gemessen. In der Dunkelphase (Exposition II) wurde die LED-Lichtquelle des IMOLA-Messgerätes

ausgeschaltet und das gesamte Messsystem mit einem lichtdichten Karton abgedunkelt. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass Restlicht von externen Beleuchtungsquellen über den transparenten Spülkopf oder die Silikon-Schläuche in die Messkammer zu den Algen vordringen konnte. Nach der Dunkelphase wurden in Exposition III die Ausgangsbedingungen von Exposition I wieder hergestellt. Die Hell-Dunkel-Reaktionsmessung wurde dreimal repliziert und mit GM durchgeführt.

2.2.5.5 Langzeitmessungen mit verschiedenen Phosphor-Konzentrationen

Es wurde überprüft, ob das Phosphorangebot im Nährmedium einen Einfluss auf die Sauerstoffproduktion der Algen und auf die damit verbundene pH-Wert-Veränderung in der Messkammer hat. Als Nährstoff wurde Phosphor ausgewählt, da er als limitierender Nährstofffaktor in Süßgewässer-Ökosystemen gilt (ODUM 1999). Die Kalibrierung des Systems fand, wie es unter 2.2.5.1 beschrieben wurde, statt. Jeder Messzyklus wurde mit GM gemessen, das mit der jeweiligen Phosphor-Konzentration versetzt war. Die Messung der Sauerstoffsteigerung lief über einen Zeitraum von 13 Stunden (60 Messzyklen). Die pH-Wert-Steigerung wurde für 14 Stunden und 57 Minuten (69 Messzyklen) aufgezeichnet. Es wurde darauf geachtet, dass alle Flaschen und verwendeten Messkolben frei von Phosphor waren, damit die jeweiligen Phosphor-Konzentrationen für die Messung exakt hergestellt werden konnten. Alle verwendeten Behältnisse wurden deshalb mit einer 2,8%igen Wasch-HCl und bidestilliertem Wasser gereinigt. Es wurden folgende Phosphor-Konzentrationen in jeweils drei Replikaten gemessen:

- 2785 µg/l Phosphor (natürlicher Phosphor-Gehalt des GM)
- 50 µg/l Phosphor
- 10 µg/l Phosphor
- 0 µg/l Phosphor

2.2.5.6 Referenz-Messungen

Es wurden verschiedene Referenz-Messungen (Nullproben) durchgeführt, damit sichergestellt wurde, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf Reaktionen der Algen zurückzuführen waren.

Referenz-Messungen: Schadstoffe

Es wurde getestet, ob das GM, versetzt mit dem jeweiligen Schadstoff, einen Einfluss auf die Sauerstoff- und pH-Werte hatte. Vorrangig dabei war die Fragestellung, ob die in Ethanol gelösten Schadstoffe eventuell die empfindlichen Sensoren beeinflussen. Denkbar wären Korrosionsschäden oder eine Beeinträchtigung der Sensoren durch eine so genannte Vergiftung der Elektroden. Dazu wurden, ohne Algen auf dem Biosensorchip, Messzyklen mit schadstofffreiem GM gemessen und anschließend drei Messzyklen mit GM, das mit dem jeweiligen Schadstoff versetzt war. Als Testkonzentration wurde jeweils 1000 µg/l des Schadstoffes verwendet. Diese hohe Schadstoffkonzentration wurde gewählt, um eventuelle Effekte zu erkennen, die bei niedrigen Konzentrationen in der Messungengenauigkeit untergehen würden.

Referenz-Messung: Phosphor

Da IMOLA-Messungen mit verschiedenen Phosphor-Konzentrationen durchgeführt wurden, wurde überprüft, ob der Nährstoff Phosphor einen Einfluss auf die Sauerstoff- bzw. pH-Wert-Messung hat. Auch hier wäre es möglich, dass die Sensoren des Biosensorchips durch Phosphor beeinträchtigt werden. Deshalb wurden in einer IMOLA-Messung ohne Algen drei Messzyklen mit der Phosphor-Konzentration des GM (2785 µg/l P) gemessen und anschließend drei Messzyklen mit der Phosphor-Konzentration von 0 µg/l durchgeführt. Diese sechs Messzyklen wurden hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes statistisch analysiert.

Referenz-Messung: Filterpapier

Es wurde untersucht, ob das für die Immobilisierung der Algen verwendete Filterpapier einen Effekt auf die Sensoren hatte. Die Sensoren könnten durch das

Filterpapier, z. B. durch mechanische Einwirkung, beeinträchtigt werden. Dazu wurden in einer IMOLA-Messung ohne Algen drei Messzyklen mit schadstofffreiem GM gemessen. Daran schlossen sich drei Messzyklen an, die mit demselben schadstofffreien GM aber zusätzlich mit dem Filterpapier (ohne Algen), in der Messkammer durchgeführt wurden.

Referenz-Messungen: Lösungsmittel

In diesen Versuchen wurde getestet, ob mit Lösungsmittel versetztes GM (ohne Schadstoff), einen Effekt auf die Algen hat (siehe 2.2.5.3). Getestet wurden folgende Konzentrationen mit jeweils drei Replikaten:

- 500 µg/l Nullprobe (= 0,05%ige Ethanol­lösung)
- 100 µg/l Nullprobe (= 0,01%ige Ethanol­lösung)
- 10 µg/l Nullprobe (= 0,001%ige Ethanol­lösung)

Das Versuchsdesign wurde wie unter 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. In Exposition II wurde anstatt eines Schadstoffes GM in die Messkammer gepumpt, das mit der jeweiligen Ethanol-Konzentration versetzt war.

2.2.5.7 Vergleich zweier Seen mittels IMOLA-Messungen

Im Hinblick auf die Anwendung des IMOLA-Messsystems als Frühwarnsystem in Gewässern wurden Messungen mit natürlichem, aus dem Freiland stammendem Probenwasser durchgeführt (TSCHERNE 2006). Mittels der IMOLA-Technologie wurde untersucht, ob *Chlorella kessleri* unterschiedlich auf die variierenden Nährstoff- und Umweltbedingungen in den Probenwassern von Gewässern unterschiedlicher Trophie reagiert.

Probenahme

Die Freilandproben wurden von April bis November 2005 alle vier Wochen aus dem oligotrophen Lustsee und dem eutrophen Waschsee genommen. Diese beiden Seen gehören zu den in Oberbayern gelegenen Osterseen. Die Osterseen eignen sich auf Grund ihrer gemeinsamen Entstehungsgeschichte und ihrer Lage in derselben Klimazone, aber auch auf Grund ihrer großen Unter-

schiede, die sich hinsichtlich ihrer Nährstoffbelastung und Grundwassereinträge ergeben, besonders gut für limnologische Vergleichsstudien (MUNTHER ZIT. IN ROTHPLETZ 1917, ZORELL 1941, MELZER 1976). Die Proben wurden jeweils in der Mitte des Sees mittels eines Ruttnerschöpfers (Firma: Hydro Bios, Apparatebau GmbH) aus 1 m Wassertiefe entnommen und anschließend in phosphorfreie PE-Weithalsplastikflaschen überführt. Dieses Probenwasser wurde mit einem 0,45 µm Membranfilter (Firma: Sartorius, Modell: Cellulose-Acetat, ø 47 mm, Porenweite: 0,45 µm) steril filtriert und somit von sämtlichen Mikroorganismen befreit. Diese Vorbehandlung des Probenwassers war für die IMOLA-Messungen nötig, da die im Wasser enthaltenen Organismen die Reproduzierbarkeit der Biosensorchipmessungen stark beeinträchtigt hätte. Die Proben wurden bei -20 °C eingefroren und für die jeweilige Messung bei Raumtemperatur aufgetaut.

Wasserchemische Analysen

Für die exakte Charakterisierung der Probenwasser wurde jeweils eine wasserchemische Untersuchung der Proben durchgeführt. Dadurch konnten Rückschlüsse auf eventuelle Korrelationen zwischen den gemessenen Steigungswerten der IMOLA-Messungen und den Nährstoffgehalten des jeweiligen Probenwassers gezogen werden. Folgende wasserchemische Parameter wurden bestimmt:

- Ammonium
- Gesamtphosphor
- Löslicher reaktiver Phosphor (SRP)
- Nitrat
- Silizium
- Wasserhärte

Teilweise kann das Gesamtphosphat in wenigen Stunden im See mineralisiert werden (SCHWOERBEL & BRENDELBERGER 2005). Das bedeutet, dass der im organischen Material gebundene Phosphor den Algen als Phosphorquelle zur

Verfügung stehen kann. Durch die Filtration des Probenwassers vor dem Einfrieren, wurde der organisch gebundene Phosphor aus der Probe entfernt. Deshalb wurden die Proben nach dem Auftauen künstlich auf den ursprünglichen Gesamtphosphor-Wert abzüglich des SRP eingestellt. Da sich das SRP auch nach dem Auftauen noch in der Probe befand, musste es vom Gesamtphosphor-Wert subtrahiert werden.

Versuchsdesign

Die Algen wurden zur Akklimatisation an das Seewasser sechs Stunden vor Beginn der IMOLA-Messung in das aufgetaute und künstlich mit Phosphor auf den ursprünglichen Phosphor-Wert eingestellte Probenwasser gegeben. Dazu wurden die Algen aus einer axenisch monoklonalen *Chlorella kessleri*-Algenkultur entnommen und auf einen Cellulose-Acetat-Membranfilter (Firma: Sartorius, Modell: Cellulose-Acetat-Membranfilter, \varnothing 47 mm, Porenweite: 0,45 μm) auffiltriert. Die Algen auf dem Filter wurden anschließend im jeweiligen Seewasser suspendiert und die Lösung auf eine OD von 2,3 bei 680 nm Wellenlänge am Spektralphotometer eingestellt (LAI ET AL. 2002, MA ET AL. 2002). 5 ml dieser Suspension wurden für die Herstellung des Algenfilters verwendet (siehe 2.2.4). Nach der Applikation des Algenfilters auf dem Biosensorchip wurde für 180 Minuten die Reaktion der Algen auf das jeweilige Seewasser gemessen. Wie unter Punkt 2.2.5.2 beschrieben, wurde der Messzyklus von zehn Minuten Messphase und drei Minuten Pumpzyklus eingehalten. Auf Grund technischer Probleme und den daraus resultierenden Verzögerungen konnten die Messungen nicht repliziert werden und sind somit als exemplarisch anzusehen.

2.2.5.8 Statistische Auswertung der IMOLA-Messdaten

Um wissenschaftlich fundierte Aussagen treffen zu können, wurden die verschiedenen Datensätze mit unterschiedlichen statistischen Analyse-Modellen ausgewertet. Im Folgenden ist aufgeführt, mit welchem Modell die jeweiligen Datensätze analysiert wurden.

Ein-Weg-ANOVA

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm SPSS (Version 14.0) durchgeführt. Allen statistischen Analysen von IMOLA-Messungen, mit Ausnahme der IMOLA-Messungen zum Vergleich zweier Seen, lag eine Ein-Weg-ANOVA (ANOVA = Analysis Of Variances) zugrunde. In einer ANOVA wird der Datensatz eines Versuches daraufhin getestet, ob die Varianz zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen (BACKHAUS ET AL. 2003). Mit der ANOVA wurde zunächst festgestellt, ob sich die verschiedenen Expositionsarten unterschieden. Voraussetzung für eine ANOVA-Analyse ist, dass die Varianzen zwischen den miteinander verglichenen Expositionsphasen homogen sind. Um die Homogenität der Varianzen zu überprüfen, wurde zu jeder ANOVA ein Levene's Test (Levene's test of equality of error variances) berechnet. Dieser Test stellt fest, ob sich die Varianzen der betrachteten Datengruppen (z. B. Exposition I, II und III) signifikant voneinander unterscheiden. Ein nicht signifikanter Levene's Test ($p > 0,05$) bedeutete, dass die Varianzen homogen waren und die Voraussetzung der Ein-Weg-ANOVA gewährleistet war. Ein signifikanter Levene's Test dagegen besagte, dass das Ergebnis der Ein-Weg-ANOVA mit Vorbehalt zu betrachten war. Die Ein-Weg-ANOVA zeigte, ob es insgesamt einen signifikanten Unterschied zwischen den Expositionsarten gab. Allerdings traf sie keine Aussage darüber, zwischen welchen Daten-Gruppen-Paaren (z. B. Exposition I und II) sich ein signifikanter Unterschied berechnete. Deshalb mussten für den paarweisen Vergleich der Expositionen so genannte „post hoc“-Tests berechnet werden. Für die Ein-Weg-ANOVA-Analysen wurde, bei Ähnlichkeit zwischen den Datengruppen verteilten Varianzen, der „post-hoc“-Test nach Tukey durchgeführt. Bei einem signifikanten Levene's Test wurde dagegen der Games-Howell-Test verwendet, da dieser einen Korrekturfaktor für nicht-homogene Varianzen enthält. Eine weitere Voraussetzung für die Gültigkeit einer ANOVA-Berechnung ist, dass die Grundgesamtheit der Daten normal verteilt sein muss. Die Grundgesamtheit kann aber naturgemäß nicht erfasst werden, weshalb die Stichproben (Messdaten) hinsichtlich ihrer Normalverteilung getestet wurden. Wenn ein hoher Prozentsatz der Stichproben normal verteilt war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Grundgesamtheit der Daten ebenfalls einer Normalverteilung folgte. Aus diesem Grund wurde die Normalverteilung der je-

weiligen Variablen mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test überprüft. Ergänzend muss festgestellt werden, dass eine Ein-Weg-ANOVA zwar nicht robust gegenüber einer nicht normal verteilten Grundgesamtheit ist, sich aber unempfindlich erweist gegenüber nicht normal verteilten Stichproben.

Wilcoxon-Test

Die Daten der IMOLA-Messungen zum Vergleich zweier Seen wurden mit dem nicht parametrischen Test nach Wilcoxon analysiert. Eine ANOVA-Berechnung konnte hier nicht angewendet werden, da die Messergebnisse nicht in mehreren unabhängigen Messwiederholungen repliziert wurden und deshalb keine Mittelwerte mit Standardabweichungen gebildet werden konnten.

Allen statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zu Grunde gelegt.

„Ausreißer“

Einzelne Datenpunkte der IMOLA-Messungen, die offensichtlich nicht in eine erwartete Messreihe passten, wurden daraufhin untersucht, ob es sich um sogenannte „Ausreißer“-Werte im Datensatz handelte. Für die Identifizierung eines „Ausreißers“ wurden keine mathematischen Regeln zugrunde gelegt, sondern biologische oder messtechnische Gründe definiert. Als Ausreißer erkannte Datenpunkte gingen nicht in die Auswertung mit ein.

„Ausreißer“-Datenpunkte wurden folgendermaßen identifiziert:

- Ein Einzelwert aus einer Expositionsgruppe weicht stark von den anderen Steigungswerten dieser Gruppe ab. Der Steigungswert ist nahe null oder gleich null. Dieser Wert ist wahrscheinlich auf Grund einer Luftblase auf den Sensoren entstanden und geht deshalb nicht in die Auswertung der Daten mit ein. Eine Luftblase über dem Sauerstoffsensor bewirkt, dass kein Strom mehr fließen kann und der gemessene Wert damit 0 beträgt.
- Auf Grund von Unregelmäßigkeiten, wie z. B. ein sehr niedriger Steigungswert oder kleine Luftblasen im System, wurde in die IMOLA-Messung eingegriffen. Beispiele hierfür wären:

- Neue Justierung des Spülkopfes
- Ein- und Ausschalten der Pumpe
- Neue Justierung des Algenfilters
- Reinigung der Chipoberfläche
- Unbeabsichtigte mechanische Einwirkung auf das IMOLA-Messgerätes von außen.
- Berührung der Silikon-Schläuche des IMOLA-Messgerätes. Diese wirken wie Antennen. Eine Berührung führte häufig zu einer Veränderung der Messwerte.
- Die Sauerstoffmesswerte und die pH-Messwerte wurden zur gegenseitigen Kontrolle verwendet.
 - Beispiel: der Steigungswert der Sauerstoffmessung eines Messzyklus war stark abweichend von den vorangegangenen Steigungswerten. Dieser Sauerstoffsteigungswert wurde als Ausreißer eingestuft, wenn die ISFET-Werte für diesen Messzyklus konstant waren und sich in die vorangegangenen Steigungswerte einreihen. Somit war anhand der ISFET-Werte zu erkennen, dass Sauerstoff produziert wurde. Andernfalls würde der pH-Wert nicht steigen. Demnach wurde der produzierte Sauerstoff nicht korrekt vom Sauerstoffsensoren gemessen. Dieses Kriterium wurde analog zur Kontrolle der ISFET-Werte angewendet.

2.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Für die genetischen Analysen zur Monoklonalität der verwendeten Algenkulturen wurde das Verfahren des „Amplified Fragment Length Polymorphism“ (AFLP) angewendet. Im Folgenden sind die verschiedenen, durchgeführten Versuche, die Methode der AFLP sowie unterschiedliche Auswertungsverfahren des gewonnenen Datensatzes dargestellt.

2.3.1 Vorversuch

Für die Untersuchungen wurde eine von MANNSCHECK (2003) optimierte AFLP-Methode angewendet. In einem Vorversuch wurde getestet, ob sich diese opti-

mierte AFLP-Methode eignet, um die verschiedenen *Chlorella kessleri*-Kulturen des Klons 211-11h (SAG) zu vergleichen. Dazu wurden jeweils 1,5 ml aus vier verschiedenen *Chlorella kessleri*-Kulturansätzen entnommen. Aus den Kulturansätzen 1 und 3 wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit jeweils zwei Proben entnommen. Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde ein Dendrogramm nach dem UPGMA-Verfahren (Unweighted Pair Group Method with arithmetic Average) erstellt.

2.3.2 AFLP-Analyse zur Monoklonalität der *Chlorella kessleri*-Kulturen

Für alle IMOLA-Messungen wurden als Testorganismus Algen aus den Kulturansätzen des SAG-Stammes *Chlorella kessleri* 211-11h verwendet. Im Rahmen dieser Dissertation wurde überprüft, ob sich die *Chlorella kessleri*-Kulturen mit der Zeit genetisch verändern. Es könnten sich z. B. durch Mutationen verschiedene Subkulturen (Klon-Subkulturen) innerhalb einer Kultur bilden, die sich genetisch vom ursprünglichen Klon (SAG-Stamm 211-11h) unterscheiden. Die Monoklonalität der für die IMOLA-Messungen verwendeten Algenkulturen ist wichtig, da sie zur Standardisierung der Messungen beiträgt. Über einen Zeitraum von 15 Monaten wurde deshalb der verwendete *Chlorella kessleri*-Stamm mittels der AFLP-Methode insgesamt 4-mal genetisch analysiert. Es wurden stets 1,5 ml von jeder Algenkultur für die Analyse entnommen. Um dieselbe Zellzahl in den Analysen zu verwenden, wurden die Proben auf einen Absorptionwert von 2,3 bei 680 nm eingestellt. Für die Auswertung wurde ein Dendrogramm nach dem UPGMA-Verfahren berechnet.

2.3.3 Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA

Es wurde quantifiziert, wie hoch die Sensitivität der AFLP-Methode für die Untersuchung ist. Dazu wurde eine *Chlorella kessleri*-Kultur mit einer *Desmodesmus subspicatus*-Kultur in den Verhältnissen *Desmodesmus subspicatus* zu *Chlorella kessleri*: 0:100 (Kontrolle), 5:95, 20:80, 50:50 und 100:0 (Kontrolle) vermischt. Diese Mischproben werden im Text als „Desmochlor“ bezeichnet. Für jeden Ansatz wurden 1,5 ml jeder Algenkultur verwendet. Jede Probe wurde, bis auf die Kontrolle 0:100, in zwei Parallelen angesetzt. Von Interesse war, bis zu welchem Mischungsverhältnis es mittels der AFLP-Methode möglich ist, eine Vermischung der *Chlorella kessleri*-Kultur mit *Desmodesmus subspi-*

catus-Individuen festzustellen. Dadurch sollte eine Abschätzung möglich werden, mit welcher Genauigkeit Klon-Subkulturen in einer *Chlorella kessleri*-Kultur festgestellt werden können. Die Daten wurden mittels eines Dendrogramms nach dem UPGMA-Verfahren und mittels einer MDS-Analyse (siehe 2.3.5.3) ausgewertet.

2.3.4 Vorgehensweise bei der AFLP

Die AFLP wurde nach VOS ET AL. (1995) und nach SCHWARZ ET AL. (2000) durchgeführt. In der Dissertation von MANNSCHRECK (2003) wurde diese Methode für die genetische Analyse von Characeen optimiert. Diese Optimierungen wurden bei unseren Analysen berücksichtigt (BASSIOS 2006). Die DNA wurde mittels eines DNeasy Plant Mini Kit (Firma: QUIAGEN) extrahiert. Für die Restriktion wurden die Restriktionsenzyme 1 U MseI und 5 U EcoRI eingesetzt. Bei der Hauptamplifikation wurden folgende Primerkombinationen verwendet: ACA/CGA, ACA/CGC, ACA/CGA und ACG/CGC. ACA wurde mittels Fluorochrommarkierung „blau“ und ACG „grün“ markiert.

Die DNA-Isolierungen fanden an folgenden Tagen statt: 15.02.2005, 13.06.2005, 05.12.2005 und 05.05.2006 (Tabelle 2.8). Die isolierte DNA aller 28 Proben wurde im Kühlschrank bei 6 °C aufbewahrt. Alle Proben wurden gemeinsam mittels der AFLP-Methode analysiert. Als Außengruppe, die eine wichtige Rolle bei der Auswertung der Daten spielt, wurde die DNA der Diatomeenart *Navicula pelliculosa* gewählt. Alle *Chlorella kessleri*-Kulturen stammten von demselben *Chlorella kessleri*-SAG-Stamm 211-11h ab. Für die Kennzeichnung der Proben wurde deshalb in den Kapiteln 2.3, 3.4 und 4.4 lediglich der Begriff *Chlorella* verwendet. Gleiches gilt für *Navicula pelliculosa*-Proben, die lediglich als *Navicula* gekennzeichnet werden und für *Desmodesmus subspicatus*-Proben, welche mit *Desmodesmus* bezeichnet sind.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.9: Für die AFLP-Analyse verwendete Algenkulturen.

Probe	Algenkultur	Datum der DNA-Isolation	Benennung
1	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 1	05.05.2006	<i>Chlorella</i> 1 GM 05.05.2006
2	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 2	05.05.2006	<i>Chlorella</i> 2 GM 05.05.2006
3	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 3	05.05.2006	<i>Chlorella</i> 3 NLL 05.05.2006
4	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 4	05.05.2006	<i>Chlorella</i> 4 NLL 05.05.2006
5	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	<i>Chlorella</i> 5 GM 05.05.2006
6	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	05.05.2006	<i>Desmodesmus</i> 05.05.2006
7	<i>Navicula pelliculosa</i>	05.05.2006	<i>Navicula</i> 05.05.2006
8	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 50:50 A
9	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 50:50 B
10	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 20:80 A
11	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 20:80 B
12	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 10:90 A
13	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 10:90 B
14	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 5:95 A
15	<i>Desmodesmus subspicatus/Chlorella kessleri</i> 211-11h 5	05.05.2006	Desmochlor 5:95 B
16	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	05.12.2005	<i>Desmodesmus</i> 05.12.2005
17	<i>Navicula pelliculosa</i>	05.12.2005	<i>Navicula</i> 05.12.2005
18	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 1	05.12.2005	<i>Chlorella</i> 1 GM 05.12.2005
19	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 2	05.12.2005	<i>Chlorella</i> 2 GM 05.12.2005
20	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 4	05.12.2005	<i>Chlorella</i> 4 NLL 05.12.2005
21	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 3	05.12.2005	<i>Chlorella</i> 3 NLL 05.12.2005
22	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 1	15.02.2005	<i>Chlorella</i> 1 GM 15.02.2005
23	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 2	15.02.2005	<i>Chlorella</i> 2 GM 15.02.2005
24	<i>Navicula pelliculosa</i>	15.02.2005	<i>Navicula</i> 15.02.2005
25	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 1	13.06.2005	<i>Chlorella</i> 1 GM 13.06.2005
26	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 2	13.06.2005	<i>Chlorella</i> 2 GM 13.06.2005
27	<i>Navicula pelliculosa</i>	13.06.2005	<i>Navicula</i> 13.06.2005
28	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h 3	13.06.2005	<i>Chlorella</i> 3 NLL 13.06.2005

2.3.5 Auswertung der AFLP-Daten

Die aus der AFLP erhaltenen Daten wurden mit verschiedenen Analyseverfahren ausgewertet. Diese sind im Folgenden beschrieben.

2.3.5.1 Auswertung der AFLP-Bandenmuster

Die Ergebnisse wurden, wie bei MANN SCHRECK (2003) beschrieben, ausgewertet. Verwendet wurde die Software Genotyper™ DNA-Fragmentanalyse (Version 2.1) (Firma: Applied Biosystems). Dieses Programm erkennt die bei der Gelelektrophorese entstandenen Banden der einzelnen Spuren (Abbildung 2.16). Ein Längenfragment-Standard wurde zur Berechnung der Größen der einzelnen Banden herangezogen. Daraus wurde für jede Probe ein individuelles Elektropherogramm erstellt (Abbildung 2.16). Auf der x-Achse sind dabei die Fragmentlängen und auf der y-Achse die Intensität der Banden aufgetragen. Für die verwendeten Fluoreszenzmarker („grün“ und „blau“) wurden getrennte Elektropherogramme erstellt.

Die Intensität der Banden ist abhängig von der Primerkombination und der Menge an DNA, die in die Analyse eingegangen ist. Um diesen Effekt zu korrigieren, wurde die Peak-Höhe mit einem passenden Faktor skaliert (BÖGLE ET AL. 2007, IM DRUCK). Durch diese Anpassung wurden Unterschiede in der Signalstärke ausgeglichen, wodurch sich eine bessere Vergleichbarkeit der Banden ergab. Die Peak-Höhen der Primerkombinationen wurden durch folgende Skalierungsfaktoren (SF) geteilt:

- ACA/CGA- und ACA/CGC-Signale: SF: 300 000
- ACA/CGA-Signale: SF: 250 000
- ACG/CGC-Signale: SF: 150 000

Es wurden nur Fragmente verwendet, deren Basenpaarlänge (bp) zwischen 100 bp und 500 bp lagen. Mit EcoRI Primer ACA entstandene Fragmente wurden nur bei einer skalierten Höhe von > 150 elektrophoretischen Einheiten (eE) verwendet, wenn ihre Fragmentlänge zwischen 100 bp und 460 bp lag. Fragmente mit der selektiven Base ACG in den EcoRI Primern wurden nur mit einbezogen, wenn sie zwischen 100 bp und 460 bp lagen und eine Peak-Höhe von > 100 eE aufwiesen. Mit einer Höhe von > 50 eE wurden alle Fragmente aufge-

nommen, die zwischen 461 bp und 500 bp lagen. Der Grund dafür war, dass große Fragmente seltener amplifiziert wurden und deshalb ihre Menge und damit auch ihre Peak-Höhe niedriger waren.

Der ausgewählte Fragmentlängenbereich (100 bp bis 500 bp) wurde in 267 Segmente eingeteilt (gerastertes Elektropherogramm) (Abbildung 2.16). Jedes dieser Segmente entsprach 1,5 bp. Ein Peak innerhalb eines Segmentes wurde in einer Tabelle mit „1“ gekennzeichnet. Das Fehlen eines Peaks wurde dagegen mit „0“ markiert (BÖGLE 2003). Diese binäre Datenmatrix wurde in das Programm SPSS (Version 13.0) übertragen (Abbildung 2.16). Diese Datenbank war die Basis für die weiteren Analysen.

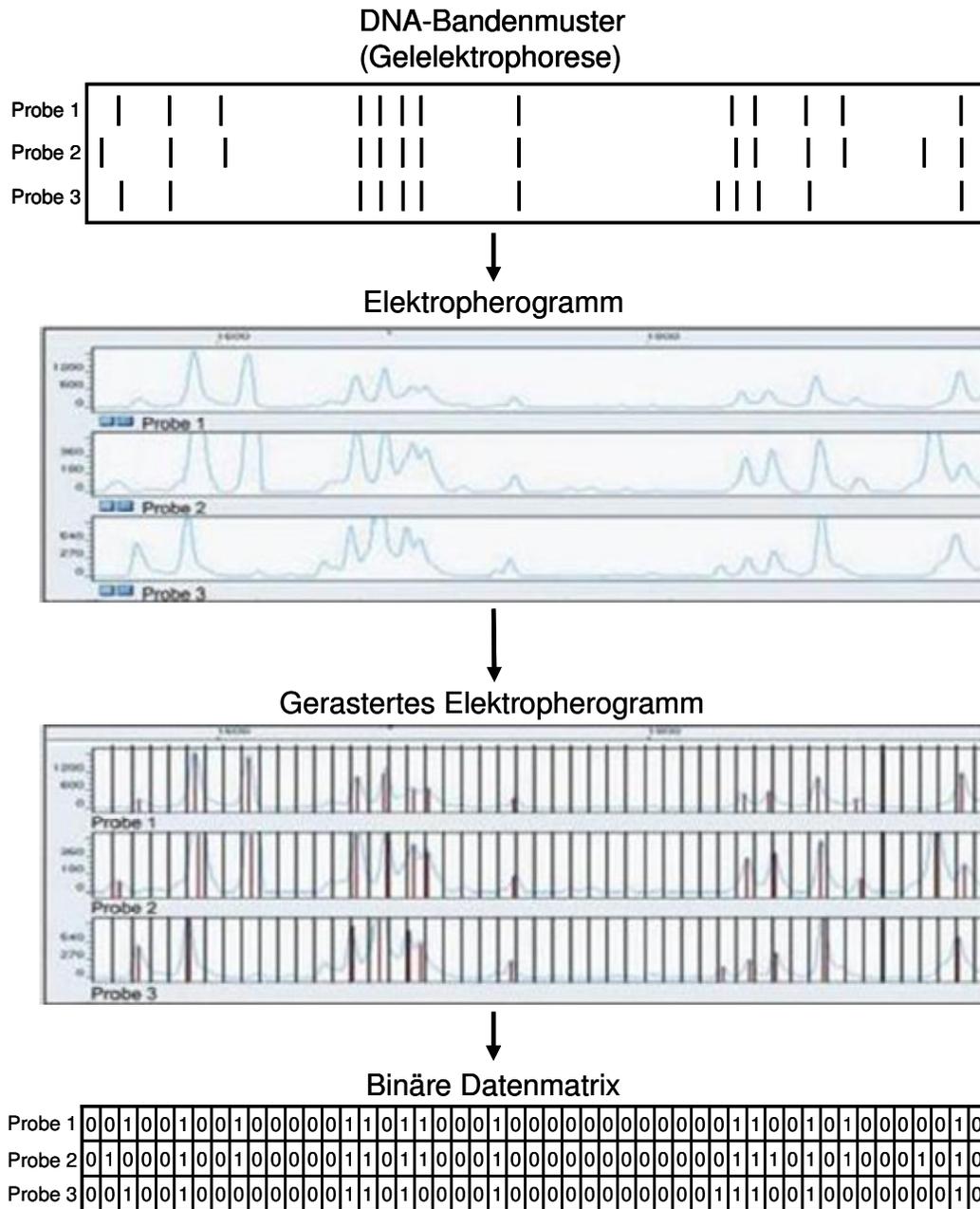


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der AFLP-Arbeitsschritte.

2.3.5.2 Clusteranalyse

Mit der erstellten binären Datenmatrix wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Benutzt wurde das Programm TREECON for Windows (Version 1.3b), mit dessen Hilfe eine Distanzmatrix erstellt wurde (VAN DE PEER & DE WACHTER 1994). Für die Berechnung dieser Distanzmatrix wurde der Algorithmus von LINK ET AL.

(1995) verwendet, der als komplementär zum Jaccard-Algorithmus gilt (Jaccard-1 = Link).

Für die Auswertung der Daten wurde das UPGMA-Verfahren benutzt, das die Ähnlichkeiten der einzelnen Gruppen berechnet. Dazu wurden zuerst die zwei ähnlichsten Kulturen der erstellten Matrix vereinigt, die somit eine eigene Gruppe bildeten. Im Folgenden wurde die Ähnlichkeit dieser zusammengefassten Gruppe zu den anderen Kulturen bestimmt. Anschließend an diese Berechnung wurden wiederum die beiden Ähnlichsten vereinigt, um ihre Ähnlichkeit zu den anderen Kulturen zu bestimmen. Aus diesen Berechnungen wurde mittels des TREECON-Programms ein UPGMA-Baum erstellt und die Validität der Verknüpfungen zwischen den Individuen mit einem Bootstrap-Test überprüft (FELSENSTEIN 1985). Diese Methode beruht auf der Neubildung von Datensätzen, die auf dem ursprünglichen Datensatz basiert. Dazu werden die Spalten des Ausgangsdatensatzes nach dem Zufallsprinzip neu angeordnet. Durch das zufällige Entnehmen von Spalten und dem anschließenden „Zurücklegen“ werden manche Spalten aus dem Datensatz entfernt, andere dafür mehrmals verwendet. Es wird aber immer ein Datensatz mit demselben Umfang generiert. In der vorliegenden Dissertation wurden für die Berechnungen insgesamt 1000 neue Datensätze erstellt und diese mit dem ursprünglichen UPGMA-Baum verglichen. Die Ergebnisse sind prozentuale Wahrscheinlichkeitsangaben. Ein Bootstrap-Wert von 90%, der sich für zwei Kulturen ergeben hat, bedeutet, dass in den 1000 neu gebildeten Datensätzen diese zwei Kulturen 900-mal zusammengeclustert haben. In Anlehnung an die Arbeiten von MANNSCHRECK (2003), BÖGLE (2003) und KERNER (2006) wurde ein Bootstrap-Wert von mehr als 70% als sicher gekennzeichnet. Als Außengruppe, die bei diesem Verfahren als Kontrolle diente, wurde für alle Analysen die Diatomeenart *Navicula pelliculosa* eingesetzt.

2.3.5.3 MDS-Analyse (Multidimensionale Skalierung)

Die Daten wurden mittels des statistischen Verfahrens der MDS-Analyse untersucht (Programm: PRIMER, Version 5.0). Eine MDS-Analyse stellt, basierend auf der Distanzmatrix, die Ähnlichkeit von Individuen räumlich dar (BORG & STAUFENBIEL 1997). Zusätzlich wurde auch der Parameter „stress“ bestimmt. Dieser gibt an, wie weit die räumliche Anordnung von der Ähnlichkeitsmatrix

abweicht. Ein kleiner „stress“-Wert besagt, dass die räumliche Anordnung gut mit der Datenstruktur zusammenpasst.

2.3.5.4 Untersuchung des Polymorphiegrades

Der gesamte Datensatz wurde zur genaueren Untersuchung auch auf der Fragmentebene bzw. auf der Ebene der individuellen Peaks der jeweiligen Kulturen ausgewertet. Alle Berechnungen wurden, basierend auf der binären Datenmatrix, mittels Microsoft Office Excel (MS Office 2003) durchgeführt. Der Polymorphiegrad wurde zur weiteren Untersuchung der Ähnlichkeit der Individuen herangezogen. Er basiert auf den so genannten Loci. Ein Locus ist ein Ort auf einem Chromosom. Dabei ist es unwichtig, ob es sich um eine Stelle in einem Gen handelt oder um eine andere Stelle, die eine Veränderung in der DNA-Sequenz aufweist. Unter polymorphen Loci versteht man die Anzahl der Loci, die innerhalb einer Gruppe gleicher Arten in verschiedenen Varianten vorkommen können. Der untersuchte Polymorphiegrad beschreibt das Verhältnis zwischen den polymorphen Strukturen eines Locus und der Gesamtheit aller vorhandenen Peaks (Loci) innerhalb einer definierten Gruppe (TRAVIS ET AL. 1996). Je niedriger der Grad der Polymorphie desto homogener ist die untersuchte Gruppe. Für die Berechnung des Polymorphiegrades wurde folgende Formel (Formel 4) verwendet:

$$P [\%] = \frac{\sum \text{polymorphe Strukturen eines Locus}}{\sum \text{insgesamt detektierte Loci}} \times 100$$

Formel 4: Berechnung des Polymorphiegrades; P [%] = Polymorphiegrad [%].

Folgendes wurde bei den Untersuchungen der individuellen Loci berücksichtigt: die Individuenanzahl einer Gruppe, die Anzahl der Loci einer Gruppe, die Anzahl der einmal vorhandenen Loci, die Anzahl monomorpher und polymorpher Loci, die Anzahl der unigen Loci und der Polymorphiegrad. Einmal vorhandene Loci sind Loci, die nur in einem Individuum einer artgleichen Gruppe vorhanden sind. Monomorphe Loci sind Loci, die bei allen Individuen einer vorher definierten Gruppe auftreten. Polymorphe Loci errechnen sich aus der Differenz von (\sum Loci – \sum monomorpher Loci). Bei den unigen Loci handelt es sich um für die Art spezifische Loci, die bei allen Individuen einer Gruppe und zwar nur in dieser Gruppe auftreten.

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden in der Reihenfolge wiedergegeben, wie die dazugehörigen Versuche im Material- und Methoden-Teil abgehandelt wurden (siehe 2). In Punkt 3.1 werden die Ergebnisse der Algenanzucht und der Versuche zur Erlangung axenischer Kulturen behandelt. Im folgenden Punkt 3.2 werden die Ergebnisse der Chlorophyll-a-Bestimmungen und der rasterelektronischen Aufnahmen dargelegt. Unter Punkt 3.3 sind die Ergebnisse der IMOLA-Messungen mit Schadstoffen, Referenztests, Hell-Dunkel-Messungen, Phosphor-Nährstoffgradienten und Langzeitmessungen aufgeführt. Zusätzlich werden unter Punkt 3.3.14 die Ergebnisse der IMOLA-Messungen präsentiert, die aus der vergleichenden Studie der Freilandwasserproben aus Waschsee und Lustsee hervorgingen. Unter Punkt 3.4 werden die Ergebnisse der AFLP-Analysen dargelegt.

3.1 Algenkulturen

Aus ca. 3% der aus dem Freiland isolierten Algen gingen Algenkulturen hervor. Die Erfolgsrate bei gekauften Kulturen lagen dagegen bei ca. 90%. Diatomeen wuchsen schlechter als Arten aus den Gruppen der Chlorophyta, Streptophyta und Cyanophyta. Algenkulturen, die aus Freilandisolaten hervorgingen, konnten nur in Einzelfällen von Bakterien und anderen Mikroorganismen befreit werden. Die folgende Tabelle (Tabelle 3.1) zeigt die insgesamt 22 Algenarten, die als Monokulturen angezüchtet wurden.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.1: Monoklonale Algenkulturen.

Heterokontophyta (Diatomeen)	
<i>Cocconeis placentula</i>	Freilandisolat
<i>Cymbella affinis</i>	Freilandisolat
<i>Diatoma tenuis</i>	Freilandisolat
<i>Fragillaria spec.</i>	Freilandisolat
<i>Gomphonema angustum</i>	Freilandisolat
<i>Gomphonema parvulum</i>	SAG-Stamm 1032-1
<i>Navicula pelliculosa</i>	SAG-Stamm 1050-3
<i>Nitzschia frustulum</i>	SAG-Stamm 1052-2
<i>Nitzschia palea</i>	Freilandisolat
<i>Nitzschia palea</i>	SAG-Stamm 1052-3a
<i>Nitzschia spec.</i>	Freilandisolat
Chlorophyta	
<i>Asterococcus limneticus</i>	SAG-Stamm 20.85
<i>Chlorella kessleri</i>	SAG-Stamm 211-11h
<i>Chlorella kessleri</i>	SAG-Stamm 211-11g
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	SAG-Stamm 86.81
<i>Macrochloris radiosa</i>	SAG-Stamm 213-2a
<i>Monoraphidium griffithii</i>	erhalten vom Lehrstuhl für aquatische Ökologie der LMU
<i>Scenedesmus obliquus</i>	erhalten vom Lehrstuhl für aquatische Ökologie der LMU
Streptophyta	
<i>Closterium ehrenbergii</i>	SAG-Stamm 134.80
<i>Cosmarium spec.</i>	Freilandisolat
<i>Staurastrum spec.</i>	Freilandisolat
Cyanophyta	
<i>Synechocystis spec.</i>	erhalten vom Lehrstuhl für aquatische Ökologie der LMU

Monoklonal und axenisch und damit für die IMOLA-Messungen verwendbar waren folgende Arten:

3. Ergebnisse

Tabelle 3.2: Monoklonal axenische Algenkulturen.

Heterokontophyta (Diatomeen)	
<i>Gomphonema parvulum</i>	SAG-Stamm 1032-1
<i>Navicula pelliculosa</i>	SAG-Stamm 1050-3
Chlorophyta	
<i>Chlorella kessleri</i>	SAG-Stamm 211-11h
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	SAG-Stamm 86.81
<i>Macrochloris radiosa</i>	SAG-Stamm 213-2a
<i>Monoraphidium griffithii</i>	erhalten vom Lehrstuhl für aquatische Ökologie der LMU
<i>Scenedesmus obliquus</i>	erhalten vom Lehrstuhl für aquatische Ökologie der LMU
Streptophyta	
<i>Cosmarium spec.</i>	Freilandisolat
<i>Staurastrum spec.</i>	Freilandisolat

Für die IMOLA-Messungen wurden ausschließlich Kulturen des *Chlorella kessleri* SAG-Stammes 211-11h verwendet.

3.1.1 Eichgerade

Von einer *Chlorella kessleri*-Kultur wurden zehn Verdünnungsstufen hergestellt und davon die Zellzahl/ml und der jeweils dazugehörige Absorptionswert bei 680 nm bestimmt (Tabelle 3.3). Aus diesen Daten wurde eine Eichgerade erstellt (Abbildung 3.1).

Tabelle 3.3: Datengrundlage für die Erstellung der Eichgeraden.

Verdünnungsstufe	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Absorption (680 nm)
1:10	3189822,4	0,3
1:5	6073829,6	0,6
3:10	8571320,4	0,9
2:5	11306667,4	1,1
1:2	13838137,6	1,3
3:5	17100166,4	1,6
7:10	22893665,4	1,7
4:5	23836595,6	2,0
9:10	25017382,0	2,1
1:0	25905095,6	2,3

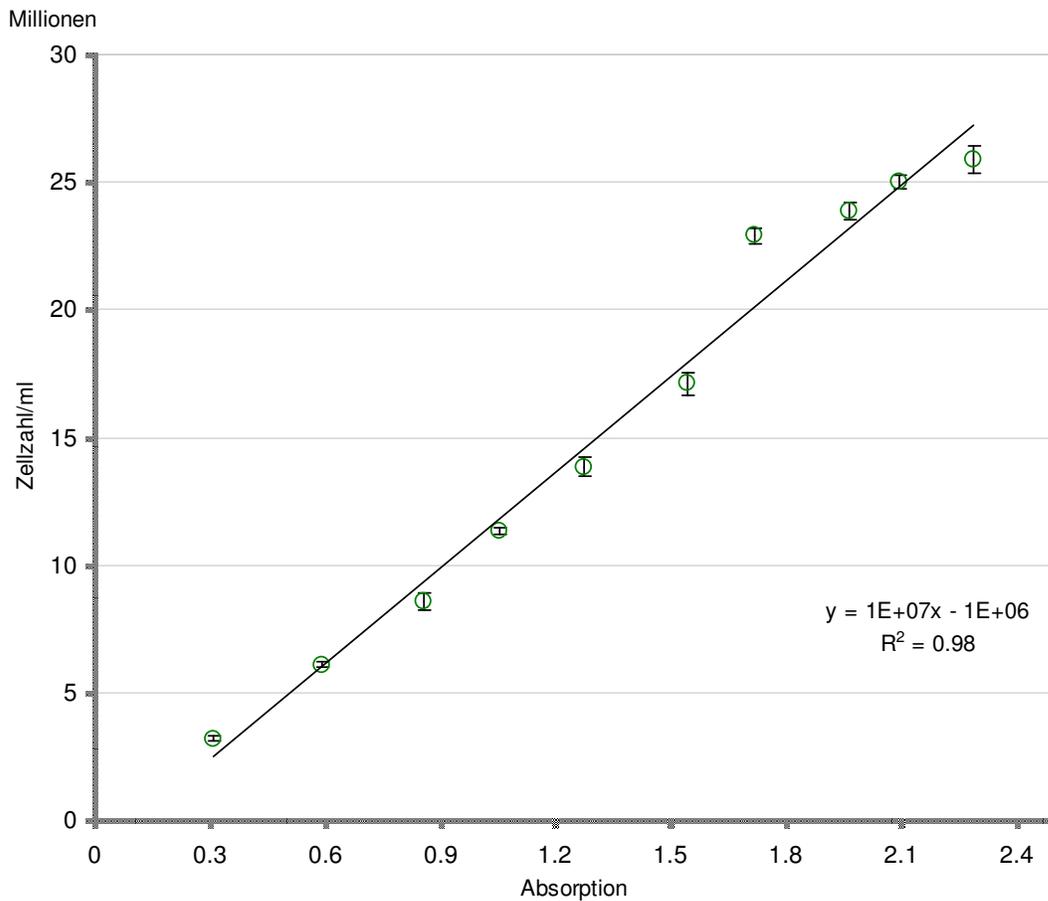


Abbildung 3.1: Eichgerade *Chlorella kessleri*: Korrelation zwischen Zellzahl/ml und Absorption. Die Datenpunkte sind auf die Zellzahl/ml hochgerechnete Mittelwerte aus zehn GF mit Standardabweichung.

Die Korrelation zwischen der Zellzahl/ml und der Absorption zeigte einen linearen Verlauf (Abbildung 3.1). Die Trendlinie wies einen R^2 -Wert (Bestimmtheitsmaß) von 0,98 auf. Ein Absorptionswert von 2,3, der für die IMOLA-Messungen verwendet wurde, entsprach 22×10^6 Zellen/ml.

3.1.2 Vitalitätsparameter

An den angegebenen Probenahmetagen wurden die Vitalitätsparameter und die Absorption aller kultivierten Algenkulturen gemessen (Tabelle 3.4). Da für alle IMOLA-Messungen nur die Algenart *Chlorella kessleri* verwendet wurde, zeigt die Tabelle 3.4 nur die Ergebnisse für dieser Art.

Tabelle 3.4: Vitalitätsparameter- und Absorptions-Messungen für *Chlorella kessleri*.

	Algenkultur	Sauerstoff-sättigung [%]	pH-Wert	Absorption (680 nm)
25.11.2004	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	102	9,27	2,3
08.12.2004	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	108	9,25	2,55
22.12.2004	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	126	9,65	2,76
04.01.2005	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	165	9,34	2,8
20.01.2005	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	104	9,06	2,92
21.02.2005	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	200	9,7	2,48
22.03.2005	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	235	9,2	2,21
19.04.2005	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	228	10,46	2,34
09.05.2005	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	234	9,47	2,0
01.06.2005	<i>Chlorella kessleri</i> 211-11h	220	9,52	2,83
Mittelwert		172	9,49	2,52
Standard-abweichung		58	0,4	0,31

Die Messungen der Sauerstoffsättigung ergaben einen Mittelwert von 172% (Tabelle 3.4). Der Mittelwert der pH-Wert-Messungen lag bei pH 9,49. Der pH-Wert war bei keiner Messung kleiner als 9. Der Maximalwert ergab sich am 19.04.2005 mit einem pH-Wert von 10,46. Die optische Dichte der Kultur hatte im Mittel eine Absorption von 2,52 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,31$.

3.1.3 Nährmedien

Für die Kultivierung der Algen wurden insgesamt neun Nährmedien getestet. Bei Verwendung des GM und des NLL-Mediums zeigten die kultivierten Chlorophyta, Streptophyta und Cyanophyta das beste Wachstum. Für die Anzucht der Diatomeen eignete sich insbesondere das BAC- und das HWD-Medium. Dauerhafte Kultivierungserfolge mit CHU 10 traten nur vereinzelt auf. Medien, die mit Erdextrakt versetzt waren (ES und ESP), konnten nicht verwendet werden, da sie auch nach mehrmaligem Autoklavieren zu Pilz- und Bakterienbildung neigten. Das Spir-Medium brachte keine oder nur unbefriedigende Ergebnisse. Die Kultivierung auf Agar, der mit GM versetzt war, funktionierte einwandfrei. Die auf dem Agar ausgebrachten Algenkulturen *Chlorella kessleri* (SAG-Stamm 211-11h), *Cosmarium spec.* und *Monoraphidium griffithii* zeigten keine Bakterienplaques. Auch die Kontrolle ohne Algen wies keine Bakterien auf.

3.1.4 Chloramphenicol

3.1.4.1 Behandlung einer *Monoraphidium griffithii*-Kultur mit Chloramphenicol

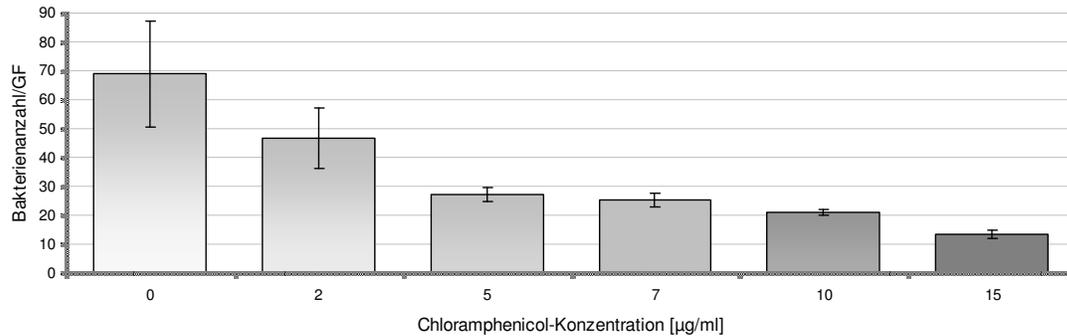


Abbildung 3.2: Korrelation zwischen Chloramphenicol-Konzentration und Bakterienanzahl/GF in einer *Monoraphidium griffithii*-Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils zehn GF mit der jeweiligen Standardabweichung.

Die Behandlung einer *Monoraphidium griffithii*-Kultur mit Chloramphenicol zeigte folgende Wirkung: je höher die Chloramphenicol-Konzentration war, desto niedriger wurde der Bakterientiter (Abbildung 3.2). Bei der höchsten Chloramphenicol-Konzentration (15 µg/ml) zeigte sich, im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle mit 0 µg/ml Chloramphenicol, eine Reduktion der Bakterienanzahl um 80,8%.

3.1.4.2 Behandlung einer *Navicula pelliculosa*-Kultur mit Chloramphenicol

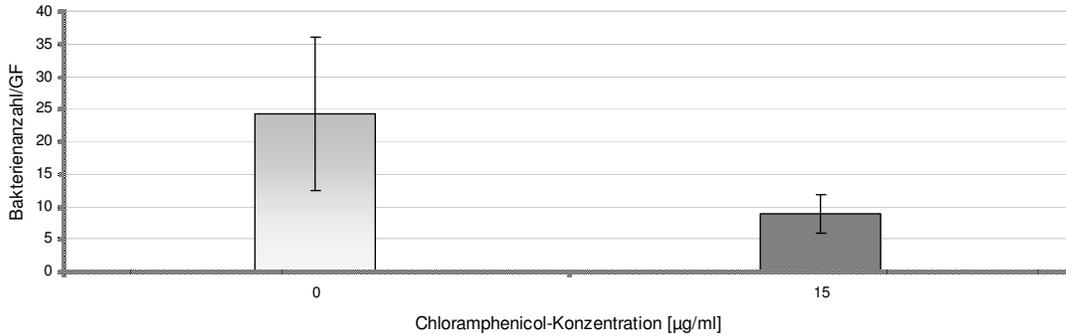


Abbildung 3.3: Korrelation zwischen Chloramphenicol-Konzentration und Bakterienanzahl/GF in einer *Navicula pelliculosa*-Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 20 GF mit der jeweiligen Standardabweichung.

Bei einer mit Chloramphenicol behandelten *Navicula pelliculosa*-Kultur ließ sich folgende Wirkung beobachten: nach zwei Tagen Inkubationszeit mit 15 µg/ml Chloramphenicol wurde die Bakterienanzahl/GF in der *Navicula pelliculosa*-Kultur um 63,7% im Verhältnis zur Kontrollprobe mit 0 µg/ml Chloramphenicol verringert (Abbildung 3.3).

3.1.5 Behandlung einer *Monoraphidium griffithii*-Kultur mit Cefotaxime

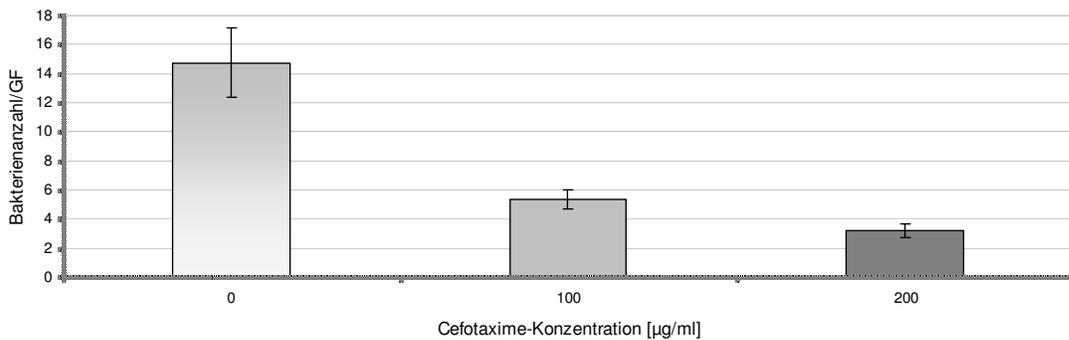


Abbildung 3.4: Korrelation zwischen Cefotaxime-Konzentration und Bakterienanzahl/GF in einer *Monoraphidium griffithii*-Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 20 GF mit der jeweiligen Standardabweichung.

Die Bakterienzahl in der *Monoraphidium griffithii*-Kultur wurde in acht Tagen durch 100 µg/l Cefotaxime um 63,3% und durch 200 µg/l Cefotaxime um 78,2% gesenkt (Abbildung 3.4).

3.1.6 Filtration einer *Monoraphidium griffithii*-Kultur

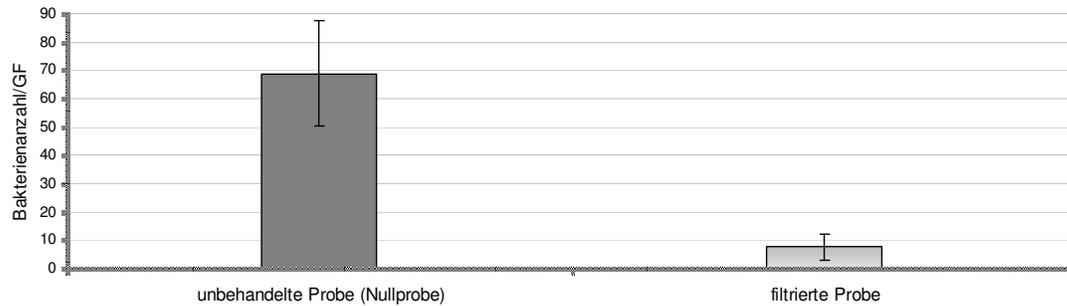


Abbildung 3.5: Filtrationsversuch: Mittlere Bakterienanzahl/GF mit Standardabweichung in einer unbehandelten bzw. mit einem 5 µm Cellulose-Acetatfilter filtrierten *Monoraphidium griffithii*-Kultur.

Durch die Filtration (5 µm Cellulose-Acetatfilter) einer mit Bakterien kontaminierten *Monoraphidium griffithii*-Kultur konnte der Bakterientiter um 89,1% gesenkt werden (Abbildung 3.5).

3.2 Ergebnisse zur Immobilisierung von *Chlorella kessleri*

Zur Quantifizierung und Dokumentation der entwickelten Methode zur Immobilisierung der Algenzellen auf einem Filterpapier wurden Chlorophyll-a-Messungen und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Algenfiltern durchgeführt.

3.2.1 Chlorophyll-a-Bestimmung

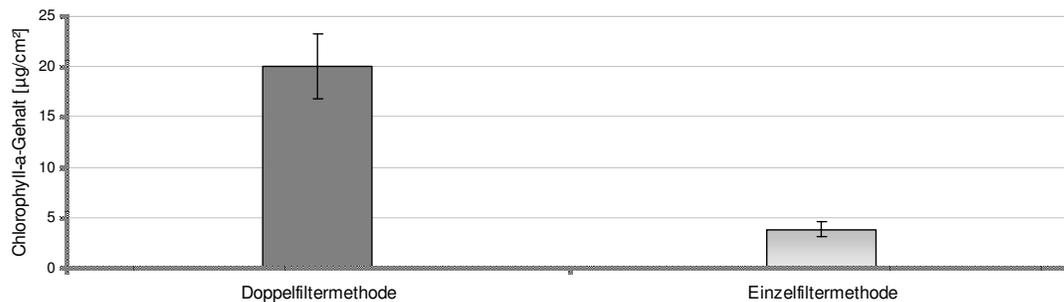


Abbildung 3.6: Chlorophyll-a-Gehalte der Filterpapiere, der Doppel- bzw. Einzelfiltermethode. Angegeben ist der Mittelwert aus acht Replikaten mit Standardabweichung.

Der Chlorophyll-a-Gehalt der Proben, die mit dem Doppelfiltersystem hergestellt wurden, lag im Durchschnitt bei $20,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\pm 3,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Abbildung 3.6). Der Chlorophyll-a-Gehalt der Filterpapiere, die mit dem Einzelfiltersystem produziert wurden, ergab im Mittel $3,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\pm 0,71 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Bei der Doppelfiltermethode befanden sich somit durchschnittlich $2,13 \times 10^7$ Algenzellen ($\pm 3,4 \times 10^6$ Algenzellen) auf dem Filter. Dagegen waren es im Mittel bei der Einzelfiltermethode lediglich $0,4 \times 10^7$ Algenzellen ($\pm 7,5 \times 10^5$ Algenzellen).

3.2.2 REM-Aufnahmen

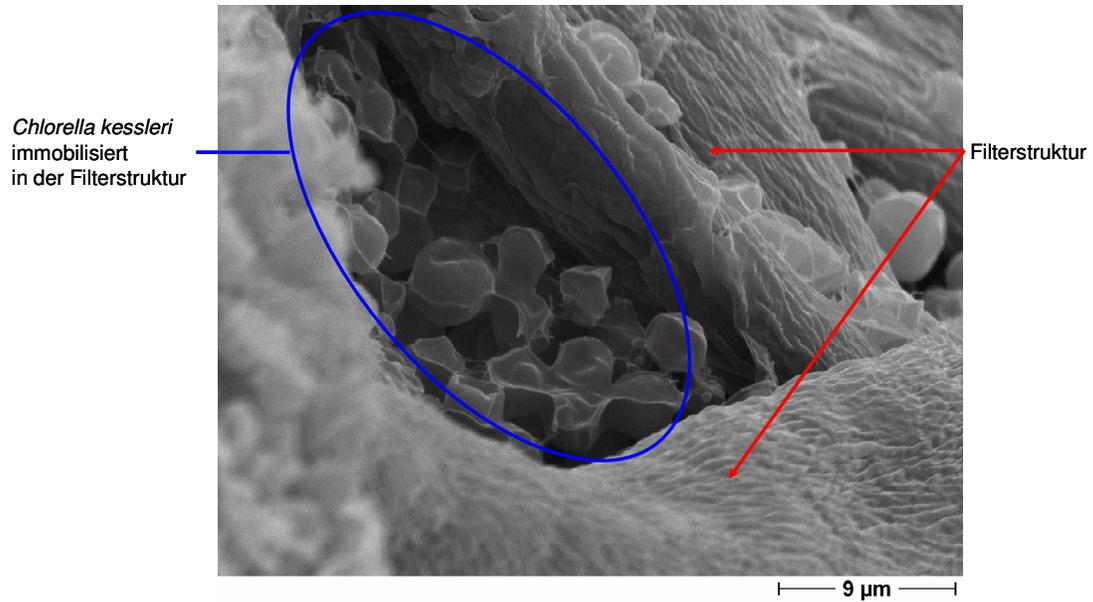


Abbildung 3.7: Querschnitt durch einen Algenfilter. Ansicht des Querschnittes ist um ca. 45° geneigt. Vergrößerung: 3000-fach.

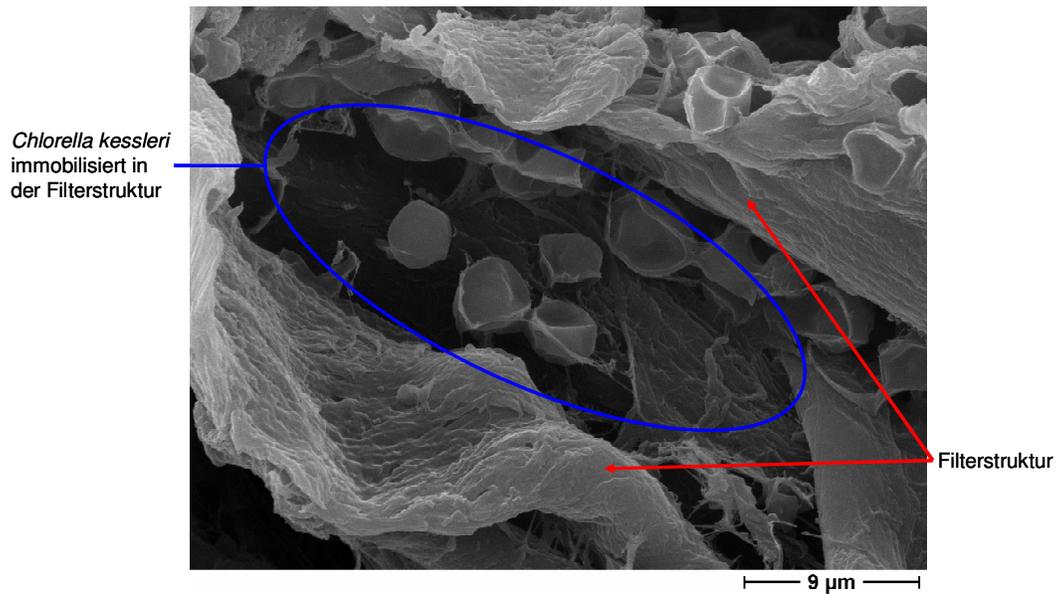


Abbildung 3.8: Querschnitt durch einen Algenfilter. Vergrößerung: 3000-fach.

Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde dokumentiert, dass die *Chlorella kessleri*-Zellen nach der Filtrierung in der Feinstruktur des Filterpapiers immobilisiert waren (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8).

3.3 IMOLA-Messungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der IMOLA-Messungen dargestellt. Die Resultate der statistischen Analysen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Angaben im Text beziehen sich auf diese Übersichtstabelle. Es werden folgende Begriffe verwendet: signifikant = $p < 0,05$, hochsignifikant = $p < 0,01$ und höchstsignifikant = $p < 0,001$.

Für die statistische Analyse der Daten wurde das unter 2.2.5.8 beschriebene Analysemodell verwendet. Für die statistische Analyse der Sauerstoffmessungen wurden jeweils die normierten Sauerstoffsteigerungswerte der drei Replikate verwendet. Da sich vier ISFET-Sensoren auf dem Biosensorchip befanden, ergaben sich für jede IMOLA-Messung vier pH-Wert-Messungen. Aus diesen vier pH-Werten je Messung wurde der Mittelwert gebildet, welcher jeweils in die statistische Analyse einging. Zudem wurde für die grafische Darstellung aus diesen Mittelwerten je Replikat, der Mittelwert aus den drei Replikaten mit der jeweiligen Standardabweichung berechnet. Die Grafiken der Sauerstoffmessungen beruhen jeweils auf dem Mittelwert und der dazugehörigen Standardabweichung aus den drei Replikaten. Grafiken, welche die Korrelationen zwischen der Schadstoffkonzentration und der relativen Sauerstoffsteigerung bzw. relativen pH-Wert-Steigerung darstellen, sind davon ausgenommen. Hier entsprechen die Datenpunkte jeweils dem Mittelwert mit Standardabweichung, der sich aus den relativen Steigerungswerten der Exposition II der jeweiligen Schadstoffkonzentration ergeben hat.

Einzelne Messwerte werden im Text mit der Nummer des jeweiligen Messzyklus genannt (siehe 2.2.5.2). Die Bezeichnung „relative units“ ist mit ru abgekürzt. Der Begriff „Basifizierungsrate“ steht für die Zunahme des pH-Wertes/Minute.

Bei den IMOLA-Messungen wurde jeweils der Temperaturverlauf während der Messungen aufgezeichnet. Die Temperaturbedingungen waren bei den jeweiligen Messungen vergleichbar und schwankten nur in äußerst geringem Maße.

Es wurde davon ausgegangen, dass die geringen Temperaturunterschiede die Messergebnisse nicht beeinflusste.

3.3.1 Diuron

3.3.1.1 100 µg/l Diuron

Relative Sauerstoffsteigerung

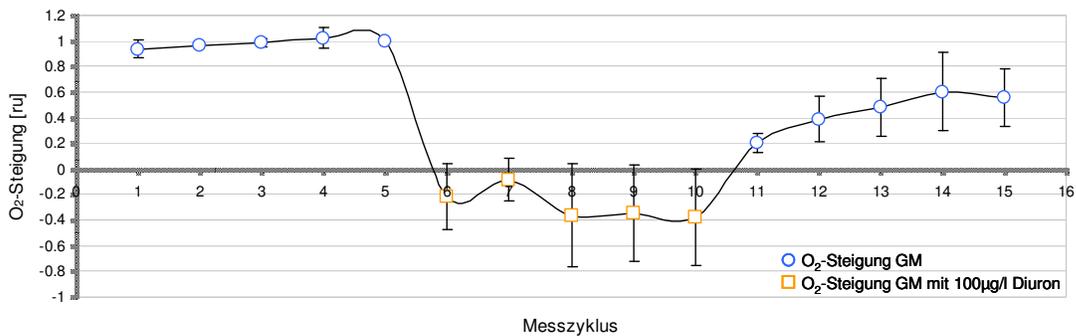


Abbildung 3.9: Relative Sauerstoffsteigerung: Versuch mit 100 µg/l Diuron.

Die fünf Steigungswerte der Exposition I unterschieden sich nur geringfügig (Abbildung 3.9). Nach der Zugabe von GM mit 100 µg/l Diuron war im Mittel ein Rückgang von 128,4% zu Exposition I zu verzeichnen. Dieser Rückgang war mit $p = 0,000$ höchstsignifikant (Tabelle 3.5). Alle Werte der Exposition II waren kleiner als null. Nach der Exposition II stiegen die Werte wieder an. Exposition I und II unterschieden sich höchstsignifikant von Exposition III.

Relative pH-Wert-Steigerung

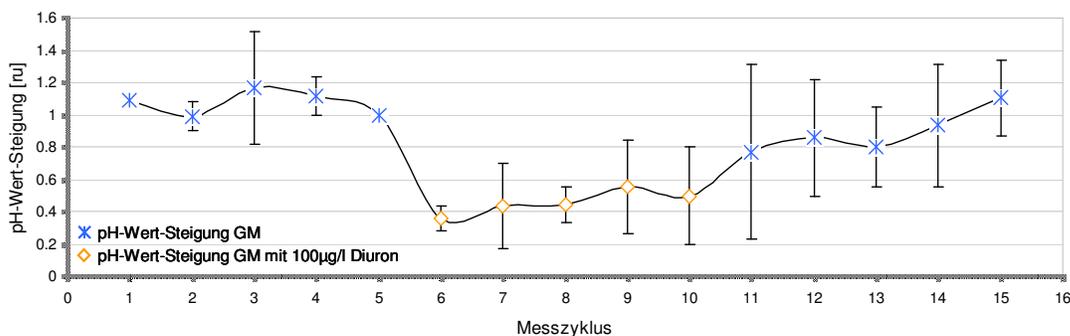


Abbildung 3.10: Relative pH-Wert-Steigerung: Versuch mit 100 µg/l Diuron.

In Abbildung 3.10 ist eine Heterogenität der Datenpunkte in Exposition I zu erkennen. Der Mittelwert lag bei 1,089 ru. In Exposition II lagen die Werte im Mittel bei 0,457 ru, dies entsprach einem Rückgang um 54,8% von Exposition I zu II und war somit höchstsignifikant (Tabelle 3.5). Nach der erneuten Zugabe von Diuron-freiem GM stiegen die Werte wieder an. Der Unterschied zwischen Exposition II und III war mit $p = 0,002$ hochsignifikant. Exposition I und III unterschieden sich dagegen nicht ($p = 0,134$).

3.3.1.2 10 µg/l Diuron

Relative Sauerstoffsteigung

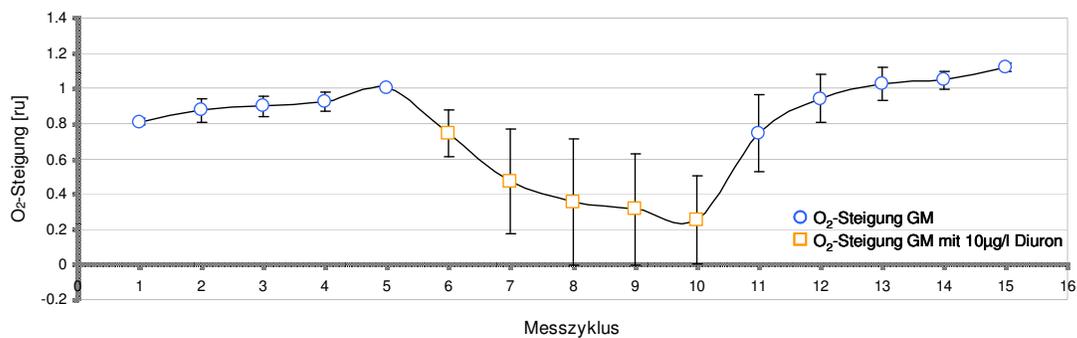


Abbildung 3.11: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Diuron.

Die Sauerstoffproduktion/Minute nahm in Exposition I mit der Zeit leicht zu (Abbildung 3.11). Die Standardabweichung der aufgetragenen Mittelwerte war gering, der höchste Wert lag bei 0,07 ru. In Exposition II wurden mit zunehmender Inkubationszeit die Sauerstoffsteigerungswerte geringer. Wert Nummer 6 hatte eine Sauerstoffsteigerung von 0,745 ru, Wert Nummer 10 wies dagegen 0,253 ru auf. Exposition I und II unterschieden sich höchstsignifikant (Tabelle 3.5). In Exposition III wurde höchstsignifikant mehr Sauerstoff/Minute produziert als in Exposition II. Exposition I und III unterschieden sich mit $p = 0,349$ nicht.

Relative pH-Wert-Steigung

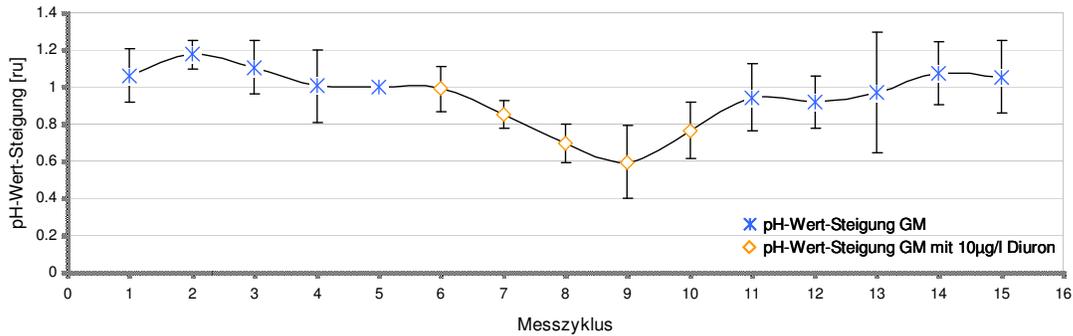


Abbildung 3.12: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Diuron.

Die Basifizierungsrate nahm im Vergleich zur Exposition I in Exposition II höchstsignifikant ab. Diese Abnahme erhöhte sich mit der Inkubationszeit bis zum Wert 9, danach stieg die Basifizierungsrate wieder an (Abbildung 3.12). Diese Beobachtung war nicht analog zu den Steigungswerten der Sauerstoffmessung dieses Versuches (Abbildung 3.11). In Exposition III stieg die Basifizierungsrate wieder an und unterschied sich hochsignifikant von Exposition II (Tabelle 3.5). Es gab keinen statistischen Unterschied zwischen Exposition I und III ($p = 0,345$).

3.3.1.3 5 µg/l Diuron

Relative Sauerstoffsteigung

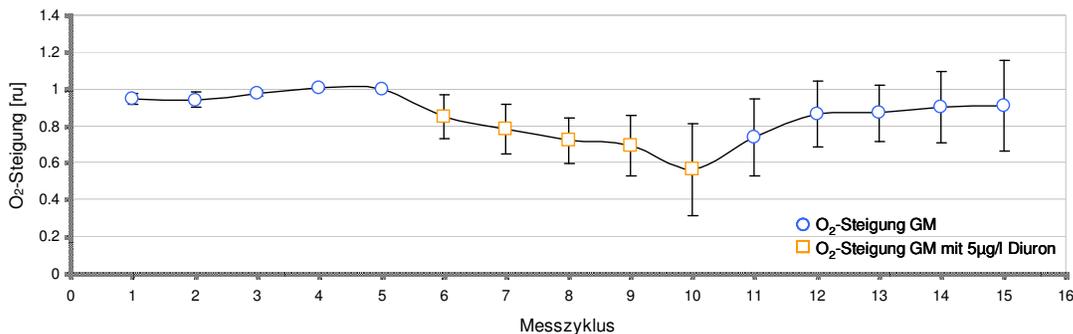


Abbildung 3.13: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 5 µg/l Diuron.

Die Mittelwerte aus Exposition I wichen nur geringfügig voneinander ab (Abbildung 3.13). Die Standardabweichungen waren mit durchschnittlich $\pm 0,023$ ru gering. In Exposition II nahm die Steigung mit zunehmender Inkubationszeit des Diurons ab. Der Games-Howell-Test ergab einen höchstsignifikanten Un-

terschied zwischen Exposition I und II, sowie einen signifikanten Unterschied zwischen Exposition II und III (Tabelle 3.5).

Relative pH-Wert-Steigung

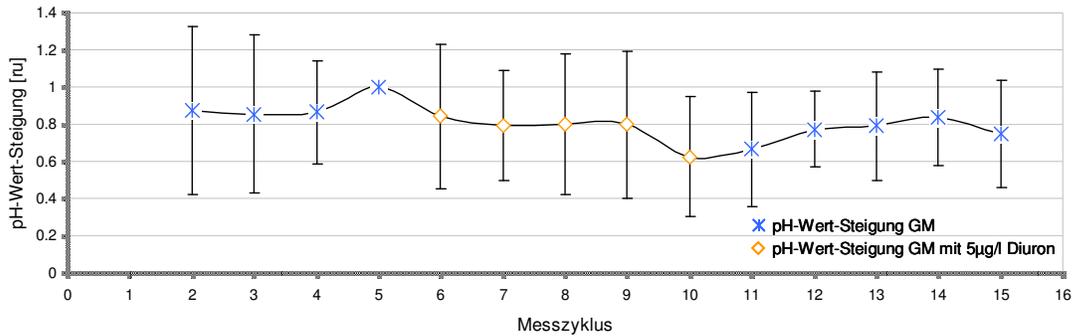


Abbildung 3.14: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 5 µg/l Diuron.

Der Sauerstoffsteigerungswert aus Messzyklus 1 wurde als „Ausreißer“ erkannt und aus dem Datensatz entfernt (Abbildung 3.14) (siehe 2.2.5.8). Alle Werte, ausgenommen den Wert aus Messzyklus 5, der auf Grund der Normierung keine Standardabweichung aufwies, streuten deutlich um ihren Mittelwert. Es ergaben sich keine Signifikanzen zwischen den drei Expositionsphasen (Tabelle 3.5).

3.3.1.4 1 µg/l Diuron

Relative Sauerstoffsteigung

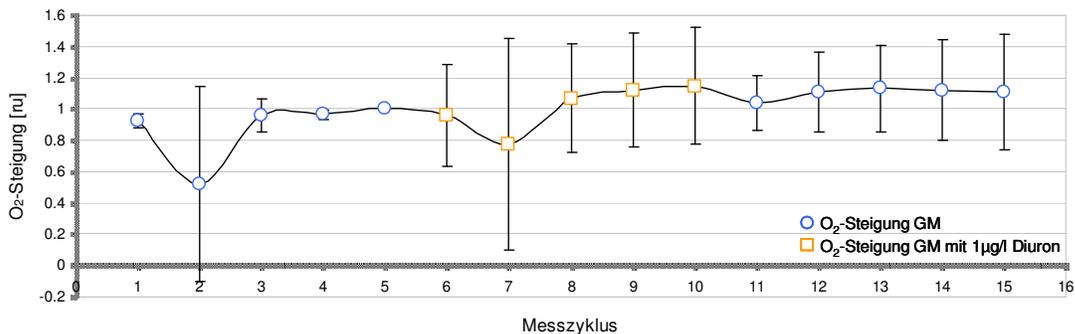


Abbildung 3.15: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 1 µg/l Diuron.

Nach der Zugabe von 1 µg/l Diuron gingen die Steigungswerte leicht zurück, stiegen aber nach Messzyklus 7 an und lagen höher als das Niveau der Werte aus Exposition I (Abbildung 3.15). Dieses Niveau blieb auch in Exposition III

erhalten. Die Statistik lieferte in keinem der analysierten Fälle ein signifikantes Ergebnis (Tabelle 3.5).

Relative pH-Wert-Steigung

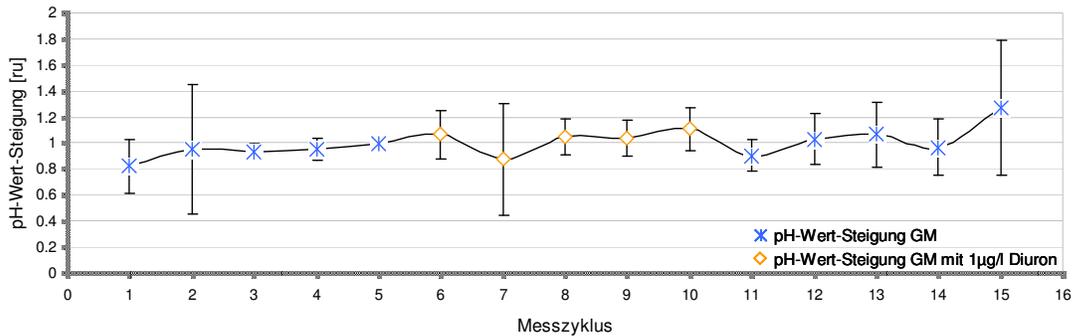


Abbildung 3.16: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 1 µg/l Diuron.

Wie bei dem Kurvenverlauf der Sauerstoffsteigung (Abbildung 3.15) kam es beim Messwert des Messzyklus 7 zu einem Rückgang, der sich aber bei den darauf folgenden Werten 8, 9 und 10 nicht zeigte (Abbildung 3.16). Die Unterschiede in den pH-Wert-Steigungswerten zwischen den drei Expositionen waren nicht signifikant (Tabelle 3.5).

3.3.1.5 Korrelation zwischen der Diuron-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung

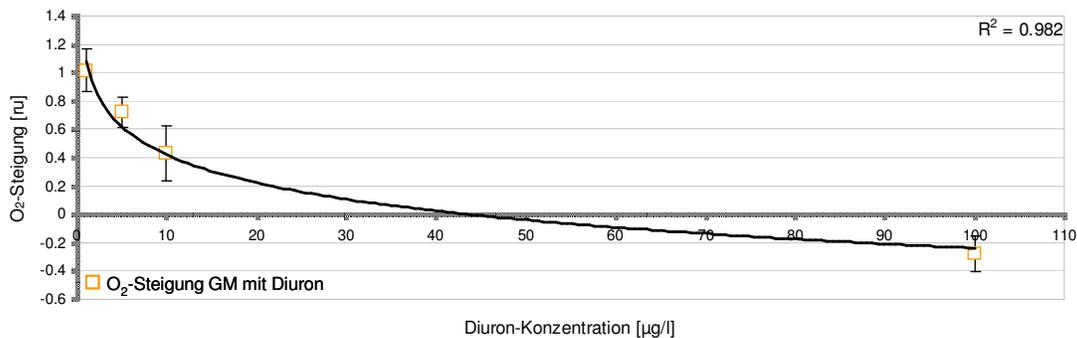


Abbildung 3.17: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Diuron-Konzentration.

In Abbildung 3.17 ist die Korrelation zwischen der Sauerstoffsteigung und der Diuron-Konzentration dargestellt. Die eingefügte Trendlinie zeigte einen exponentiellen Zusammenhang der Korrelation. Mit einem R²-Wert von 0,982 wichen die Werte nur sehr geringfügig von dem exponentiellen Verlauf der Trendlinie

ab. Nur bei der Konzentrationsstufe von 100 µg/l Diuron ergaben sich negative Steigungswerte.

3.3.1.6 Korrelation zwischen der Diuron-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung

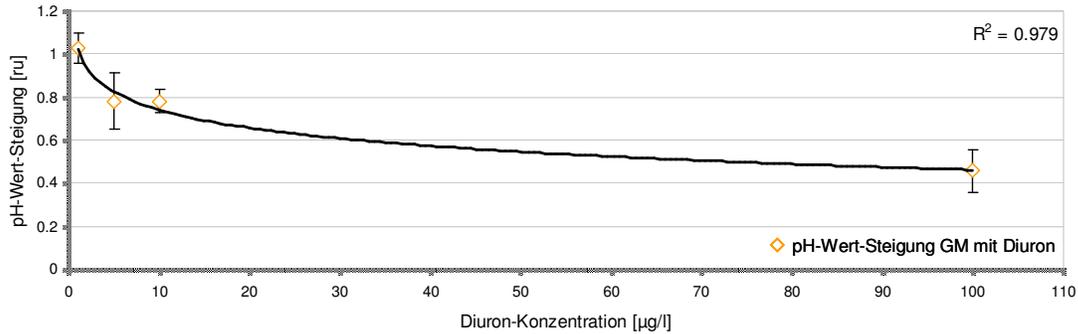


Abbildung 3.18: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Diuron-Konzentration.

Die Basifizierungsrate wurde am stärksten bei 100 µg/l Diuron und am wenigsten bei 1 µg/l Diuron gehemmt (Abbildung 3.18). Als Trendlinie ließ sich, auf Grund des höchsten R^2 -Wertes mit 0,979, am besten ein exponentieller Kurvenverlauf an die Datenpunkte anpassen. Die Steigungswerte bei den Konzentrationen 5 µg/l Diuron und 10 µg/l Diuron unterschieden sich mit einer Differenz von 0.0009 ru nur äußerst geringfügig. Alle pH-Wert-Steigungswerte waren positiv.

3.3.2 Isoproturon

3.3.2.1 100 µg/l Isoproturon

Relative Sauerstoffsteigung

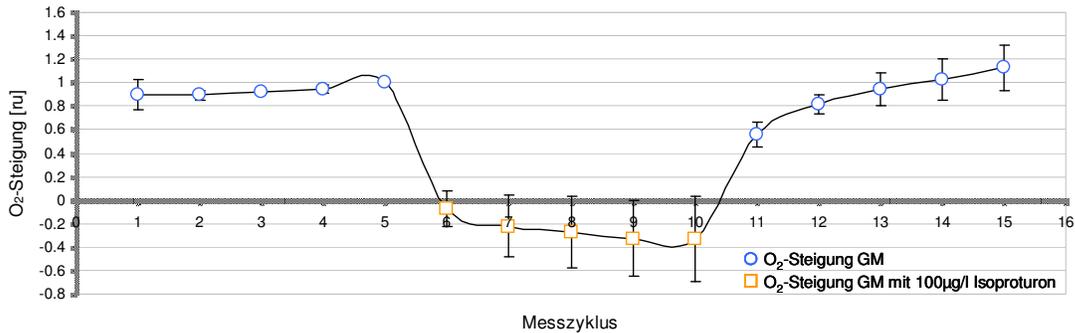


Abbildung 3.19: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Isoproturon.

Die Messwerte 1 bis 5 wiesen eine geringe Standardabweichung auf ($\sigma \pm 0,053$ ru) (Abbildung 3.19). In Exposition II waren alle Werte negativ und unterschieden sich höchstsignifikant von Exposition I sowie von Exposition III (Tabelle 3.5). Die Werte von Exposition III waren alle im positiven Bereich. Zudem wurde kein signifikanter Unterschied zu Exposition I festgestellt.

Relative pH-Wert-Steigung

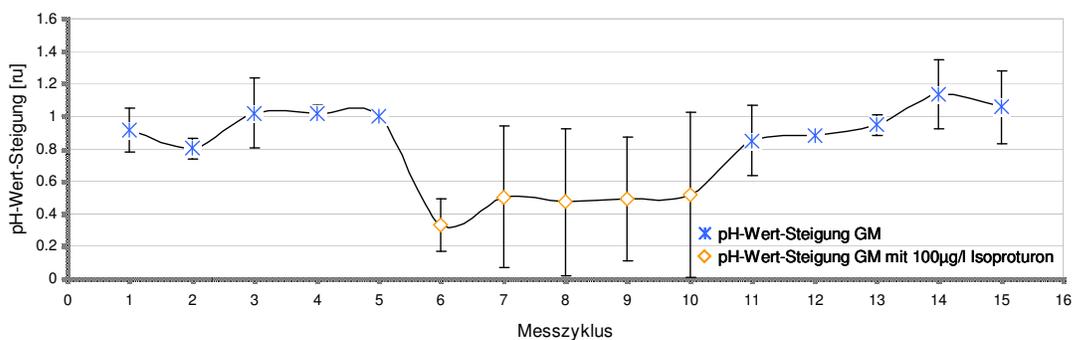


Abbildung 3.20: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Isoproturon.

In Abbildung 3.20 ist ein höchstsignifikanter Rückgang der pH-Wert-Steigung von Exposition I zu II zu erkennen, sowie ein ebenfalls höchstsignifikanter Anstieg der Steigungswerte von Exposition II zu Exposition III (Tabelle 3.5). Der Games-Howell-Test erkannte mit $p = 0,858$ keinen signifikanten Unterschied zwischen Exposition I und III.

3.3.2.2 10 µg/l Isoproturon

Relative Sauerstoffsteigung

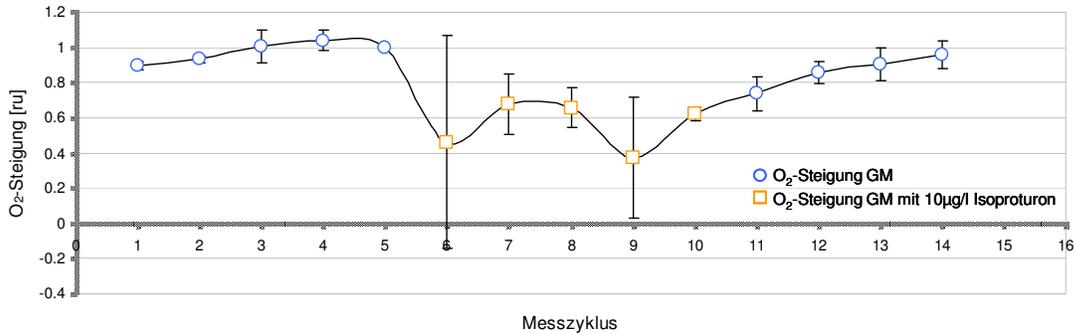


Abbildung 3.21: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Isoproturon.

Im Gegensatz zu den Werten der Exposition I waren die Werte der Exposition II heterogen verteilt (Abbildung 3.21). Bei den Messzyklen 6 und 9 wiesen die Replikate stark abweichende Werte auf, was sich an den großen Standardabweichungen widerspiegelte ($\pm 0,601$ ru bzw. $\pm 0,342$ ru). Trotz der Schwankungen ergab sich mit $p = 0,005$ ein statistischer Unterschied zwischen Exposition I und II und mit $p = 0,006$ ein statistischer Unterschied zwischen Exposition II und III (Tabelle 3.5). Die Werte der Exposition III verzeichneten eine zunehmende Tendenz. Aus technischen Gründen bestand Exposition III nur aus vier Werten und unterschied sich nicht von Exposition I.

Relative pH-Wert-Steigung

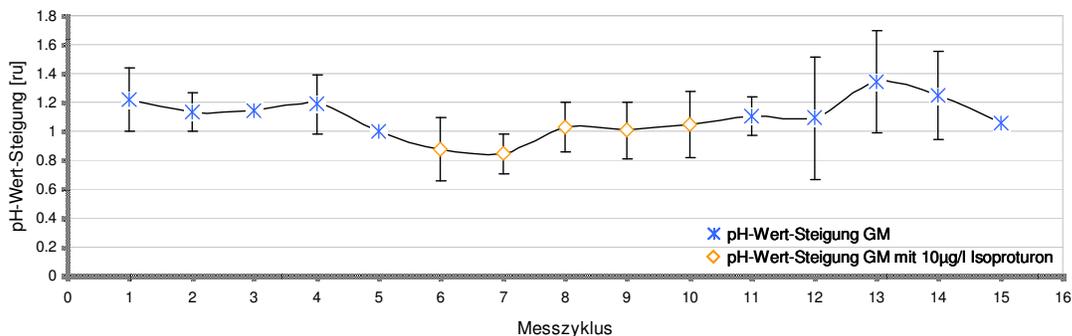


Abbildung 3.22: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Isoproturon.

Die Basifizierungsrate der Messzyklen 1 bis 4 war größer als der Wert von Messzyklus 5 (Abbildung 3.22). Die Statistik erbrachte beim Vergleich der pH-

Wert-Steigungen ein hochsignifikantes Ergebnis zwischen Exposition I und II (Tabelle 3.5). Zwischen Exposition II und III war das Ergebnis mit $p = 0,067$ nicht mehr signifikant. Exposition I und III waren ebenfalls nicht signifikant voneinander zu unterscheiden.

3.3.2.3 5 µg/l Isoproturon

Relative Sauerstoffsteigung

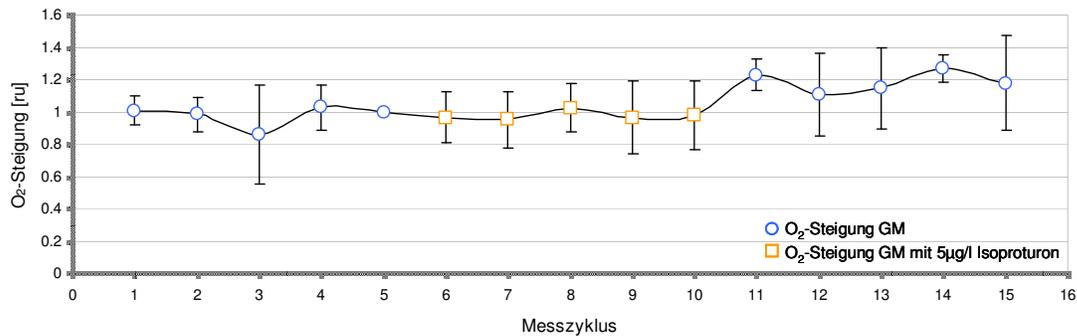


Abbildung 3.23: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 5 µg/l Isoproturon.

Bis auf den Sauerstoffsteigungswert aus Messzyklus 3 schwankten die Werte von Exposition I und II nur gering um den Zahlenwert 1 (Abbildung 3.23). Nach der erneuten Zugabe von schadstofffreiem GM in Exposition III stiegen die Werte deutlich an. Diese Beobachtungen zeigten sich auch in der statistischen Auswertung. Exposition I unterschied sich nicht signifikant von Exposition II (Tabelle 3.5). Der Tukey-Test ergab aber einen jeweils hochsignifikanten Unterschied zwischen Exposition I und III ($p = 0,007$) und Exposition II und III ($p = 0,006$).

Relative pH-Wert-Steigung

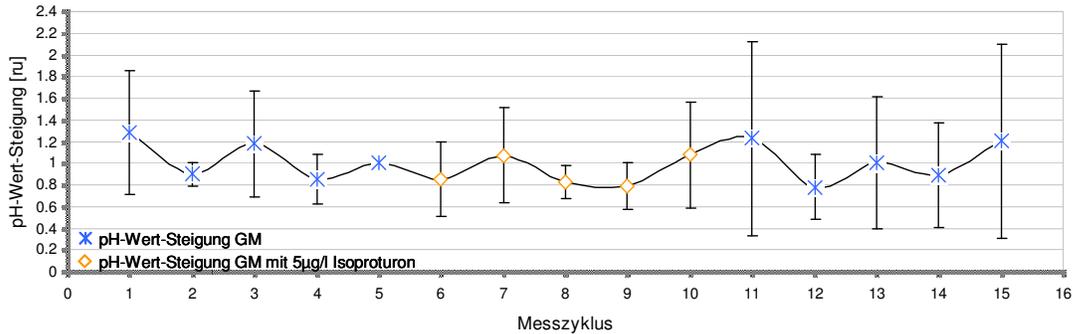


Abbildung 3.24: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 5 µg/l Isoprotruron.

In Abbildung 3.24 sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Werten der drei Expositionsphasen zu erkennen. Die Werte aus Exposition II und III wiesen hohe Schwankungsbreiten auf. Die Statistik erbrachte keinerlei signifikante Ergebnisse (Tabelle 3.5).

3.3.2.4 Korrelation zwischen der Isoprotruron-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung

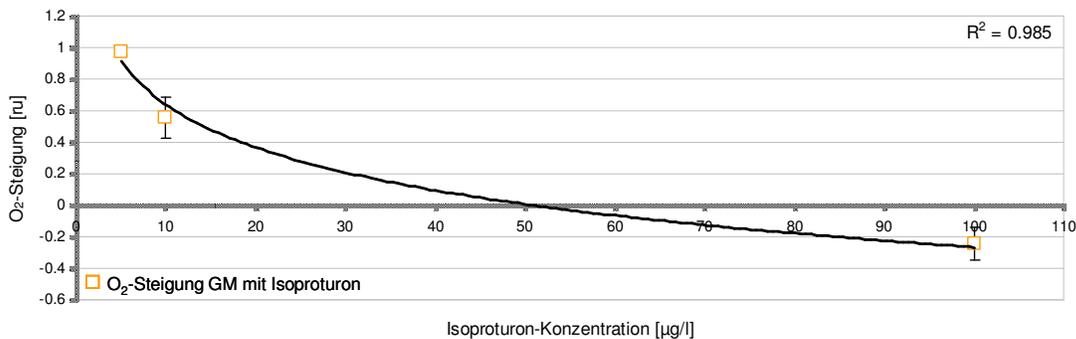


Abbildung 3.25: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Isoprotruron-Konzentration.

In Abbildung 3.25 wurde an die Mittelwerte der Sauerstoffsteigungen der Exposition II der jeweiligen Isoprotruron-Konzentrationen eine Trendlinie angelegt. Mit einem R²-Wert von 0,985 eignete sich eine exponentielle Kurve am besten. Bei 100 µg/l Isoprotruron wurde dabei im Mittel eine Sauerstoffsteigung von -0,246 ru erreicht. Bei 10 µg/l Isoprotruron waren es im Durchschnitt 0,557 ru und bei 5 µg/l wurde ein mittlerer Sauerstoffsteigungswert von 0,976 ru erreicht.

3.3.2.5 Korrelation zwischen der Isoproturon-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung

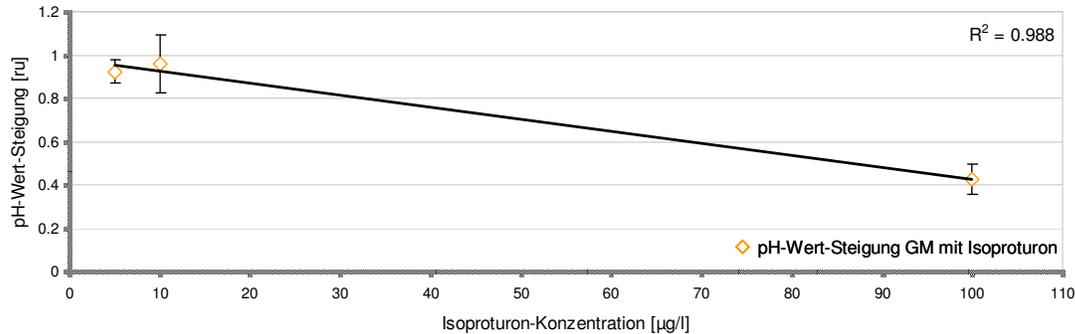


Abbildung 3.26: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Isoproturon-Konzentration.

Für die Korrelation zwischen pH-Wert-Steigung und Isoproturon-Konzentration fügte sich mit einem R^2 -Wert von 0,988 eine lineare Trendlinie am besten an die Datenpunkte an (Abbildung 3.26). Die gemittelten Steigungswerte, die sich bei den Isoproturon-Konzentrationen von 10 und 5 $\mu\text{g/l}$ ergaben, unterschieden sich mit einer Differenz von 0,038 ru.

3.3.3 Metamitron

3.3.3.1 500 $\mu\text{g/l}$ Metamitron

Relative Sauerstoffsteigung

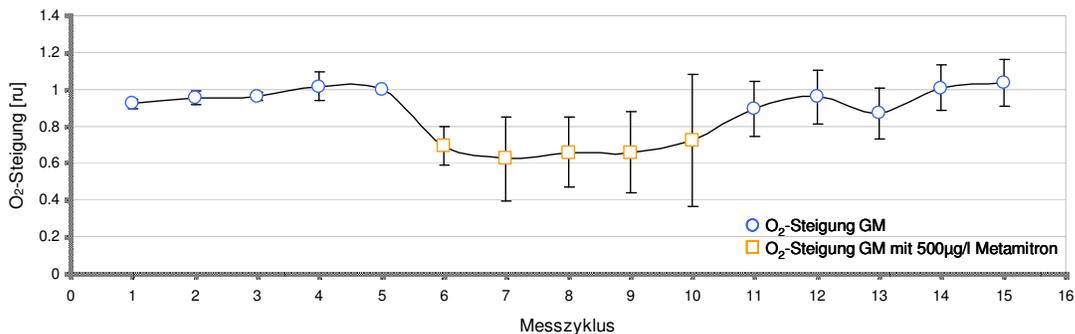


Abbildung 3.27: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 500 $\mu\text{g/l}$ Metamitron.

In Abbildung 3.27 ist zu erkennen, dass alle Werte aus Exposition II kleiner waren als die Werte aus Exposition I und III. Die Standardabweichungen in Exposition I waren niedrig und lagen im Minimum bei $\pm 0,027$ ru und im Maximum bei

$\pm 0,078$ ru. Dagegen nahmen die Standardabweichungen in der Exposition II zu ($\sigma \pm 0,218$ ru). Exposition I und II sowie Exposition II und III unterschieden sich höchstsignifikant (Tabelle 3.5). Zwischen Exposition I und III konnte keine Signifikanz beobachtet werden.

Relative pH-Wert-Steigung

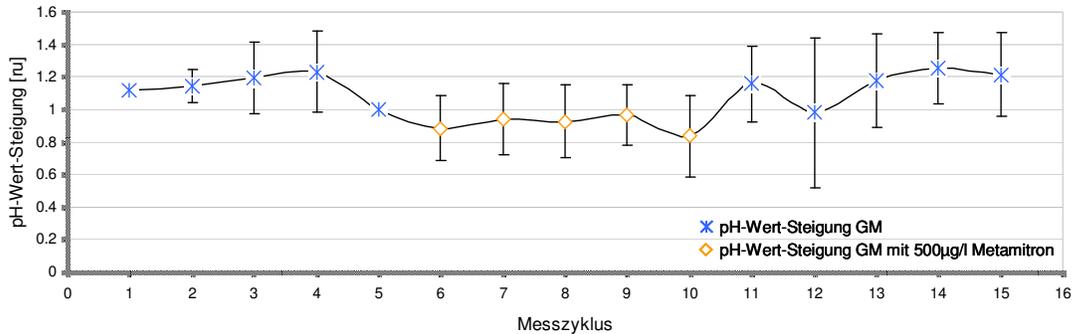


Abbildung 3.28: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 500 µg/l Metamitron.

Die ersten vier Werte der Exposition II verliefen homogen, nur der Messwert aus Messzyklus 10 differierte deutlich von den vorangegangenen Werten (Abbildung 3.28). Der Tukey-Test errechnete jeweils mit $p = 0,011$ einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Exposition I und II, sowie zwischen Exposition II und III (Tabelle 3.5). Die Analyse wies keinen Unterschied zwischen Exposition I und III nach.

3.3.3.2 250 µg/l Metamitron

Relative Sauerstoffsteigung

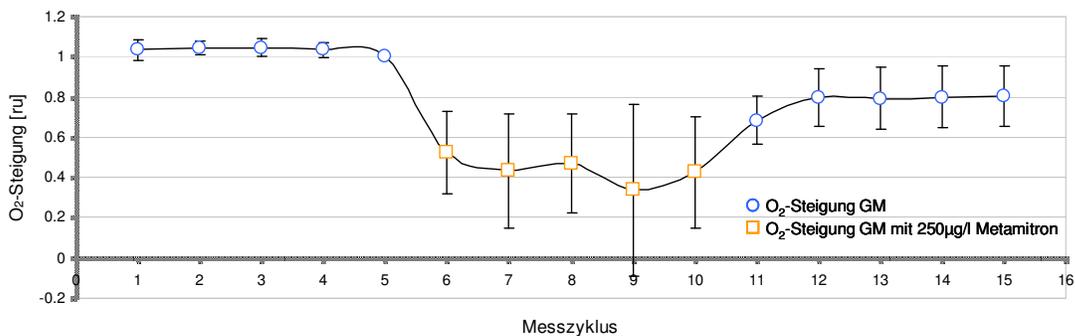


Abbildung 3.29: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 250 µg/l Metamitron.

Die Steigungswerte der Messzyklen 1 bis 5 unterschieden sich nur geringfügig und auch die Standardabweichungen waren mit $\pm 0,041$ ru im Mittel gering (Abbildung 3.29). Die Abnahme der Sauerstoffsteigung von Exposition I zu Exposition II lag im Mittel bei 57,9%. Aus dem paarweisen Vergleich von Exposition I und II, bzw. von Exposition I und III resultierte jeweils ein höchstsignifikantes Ergebnis (Tabelle 3.5). Zwischen der Exposition II und III ergab der Games-Howell-Test mit $p = 0,001$ einen hochsignifikanten Unterschied.

Relative pH-Wert-Steigung

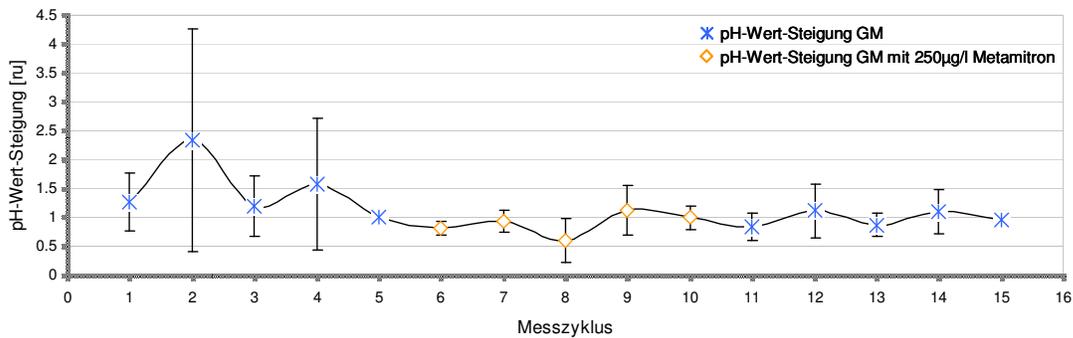


Abbildung 3.30: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 250 µg/l Metamitron.

Die pH-Wert-Steigungswerte der Messzyklen 2 und 4 unterschieden sich deutlich von den übrigen Werten (Abbildung 3.30). Sie wiesen auch die größten Standardabweichungen mit $\pm 1,922$ ru bzw. $\pm 1,136$ ru auf. Die statistische Auswertung der Daten erbrachte in keinem der Fälle einen signifikanten Unterschied (Tabelle 3.5).

3.3.3.3 100 µg/l Metamitron

Relative Sauerstoffsteigung

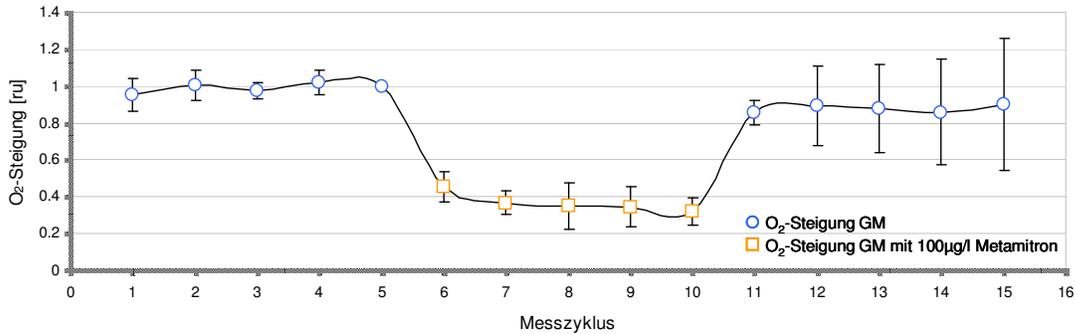


Abbildung 3.31: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Metamitron.

Durch die Zugabe von 100 µg/l Metamitron kam es im Durchschnitt zu einer Abnahme der Sauerstoffsteigung um 62,8% (Abbildung 3.31). Nach der erneuten Zugabe von schadstofffreiem GM stiegen die Werte um 58,1%. Der Unterschied zwischen Exposition I und II war mit $p = 0,000$ höchstsignifikant (Tabelle 3.5). Ebenso war der Vergleich von Exposition II zu III höchstsignifikant. Der Games-Howell-Test lieferte kein signifikantes Ergebnis für die Paarung von Exposition I und III.

Relative pH-Wert-Steigung

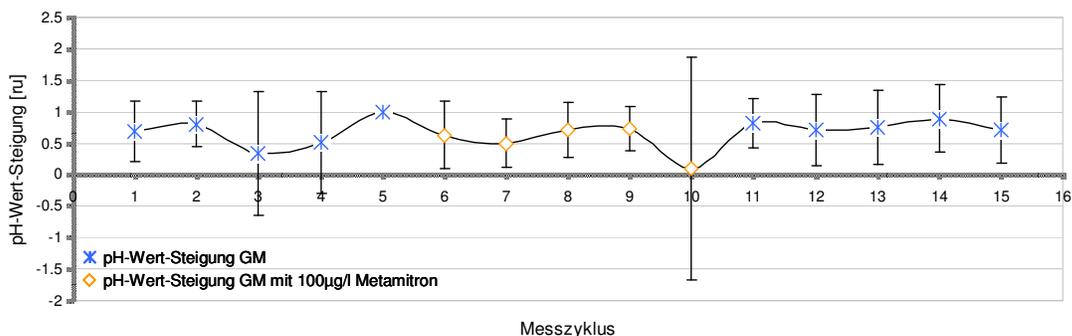


Abbildung 3.32: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Metamitron.

Die Verteilung der Werte in Abbildung 3.32 lässt keine klare Gliederung in die drei Expositionsarten erkennen. Dies bestätigte auch der Tukey-Test, der keine signifikanten Ergebnisse lieferte (Tabelle 3.5).

3.3.3.4 Korrelation zwischen der Metamitron-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung

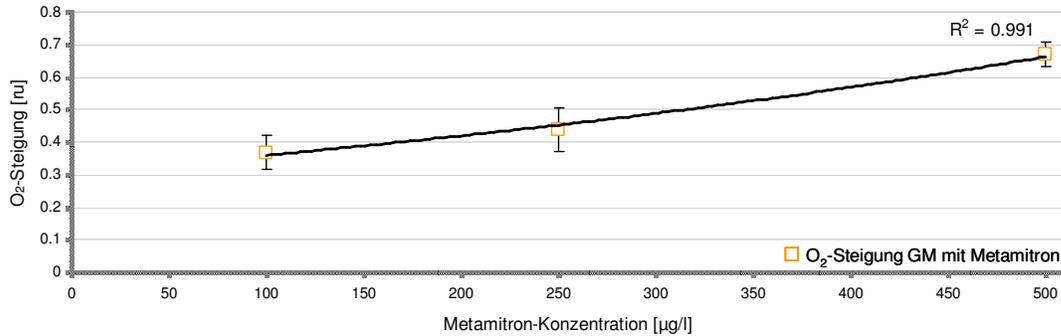


Abbildung 3.33: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Metamitron-Konzentration.

Die niedrigste Metamitron-Konzentration von 100 µg/l verursachte den niedrigsten mittleren Steigungswert von 0,367 ru (Abbildung 3.33). Darauf folgte der Steigungswert 0,437 ru bei einer Metamitron-Konzentration von 250 µg/l. Der höchste Wert wurde mit 0,67 ru bei 500 µg/l Metamitron erzielt. Mit einem R²-Wert von 0,991 standen die Werte in einem exponentiellen Zusammenhang.

3.3.3.5 Korrelation zwischen der Metamitron-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung

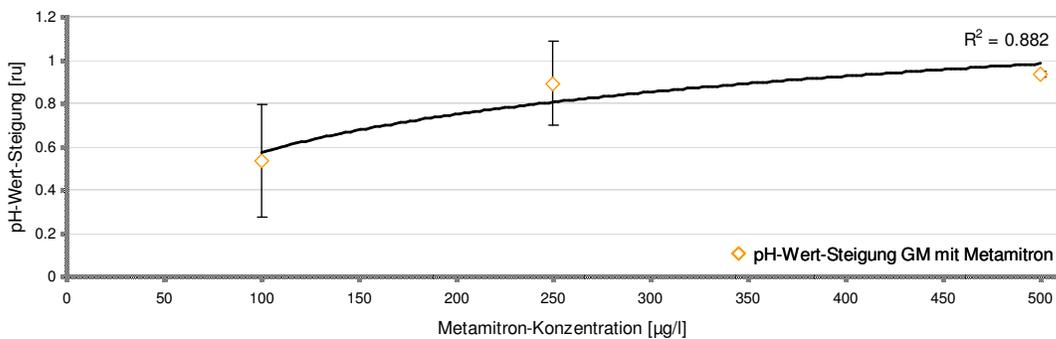


Abbildung 3.34: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Metamitron-Konzentration.

Die Korrelation ergab mit einem R²-Wert von 0,882 einen exponentiellen Zusammenhang der Werte (Abbildung 3.34). Die pH-Wert-Steigungen bei 100 und 250 µg/l Metamitron wiesen mit ±0,262 ru bzw. ±0,195 ru eine große Streuung auf.

3.3.4 Metazachlor

3.3.4.1 500 µg/l Metazachlor

Relative Sauerstoffsteigung

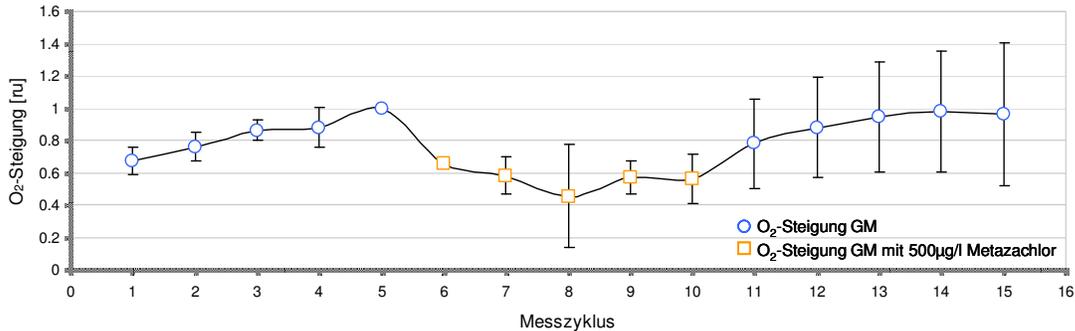


Abbildung 3.35: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 500 µg/l Metazachlor.

Die Zugabe von 500 µg/l Metazachlor bewirkte einen hochsignifikanten Rückgang der Sauerstoffproduktion der Algen von Exposition I zu II. Die Verringerung der ersten drei Steigungswerte in Exposition II nahm mit der Einwirkungs-dauer des Herbizides zu (Abbildung 3.35). In Messzyklus 9 und 10 stiegen die Werte wieder an. Der Games-Howell-Test berechnete einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Exposition II und III ($p = 0,003$) (Tabelle 3.5). Exposition I und III unterschieden sich dagegen nicht signifikant voneinander.

Relative pH-Wert-Steigung

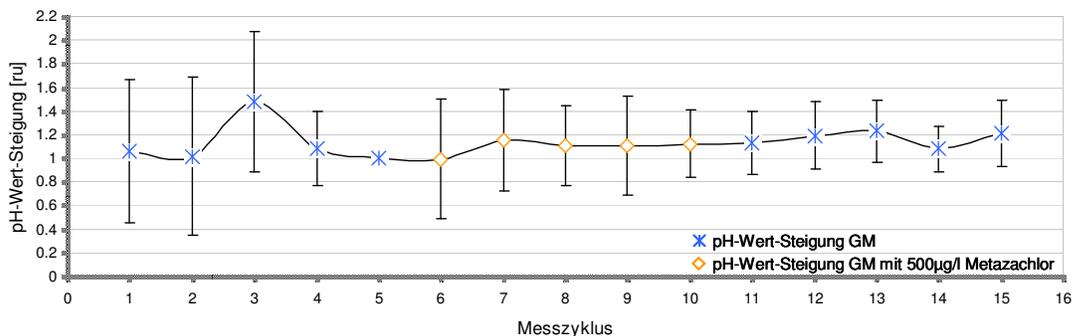


Abbildung 3.36: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 500 µg/l Metazachlor.

In Abbildung 3.36 ist zu erkennen, dass der Kurvenverlauf, bis auf den Steigungswert aus Messzyklus 3, über den gesamten Zeitraum der Messung kaum schwankte. Dagegen zeigten die Replikate untereinander eine hohe Schwan-

kungsbreite. Das Minimum lag dabei bei $\pm 0,633$ ru und das Maximum bei $\pm 0,897$ ru. Die Statistik erbrachte keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 3.5).

3.3.4.2 250 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor

Relative Sauerstoffsteigung

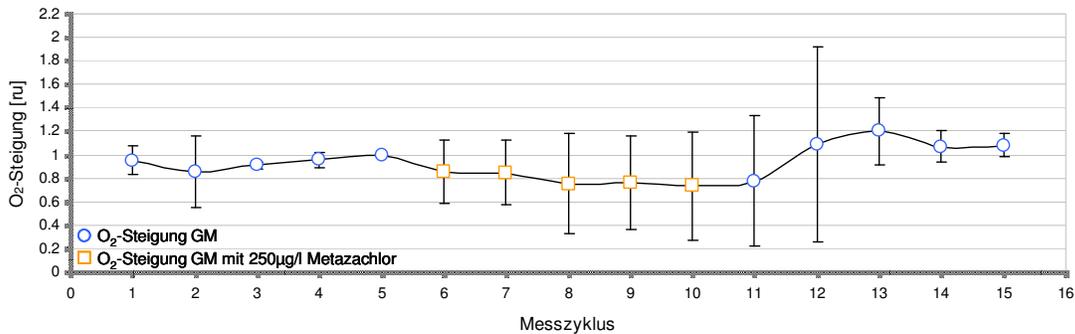


Abbildung 3.37: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 250 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor.

Die Mittelwerte der Steigungswerte von Exposition I und II unterschieden sich um 0,127 ru. Bis auf den Wert aus Messzyklus 2 wiesen die Steigungswerte aus Exposition I eine geringe Streuung auf (Abbildung 3.37). Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Expositionen auf (Tabelle 3.5).

3.3.4.3 100 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor

Relative Sauerstoffsteigung

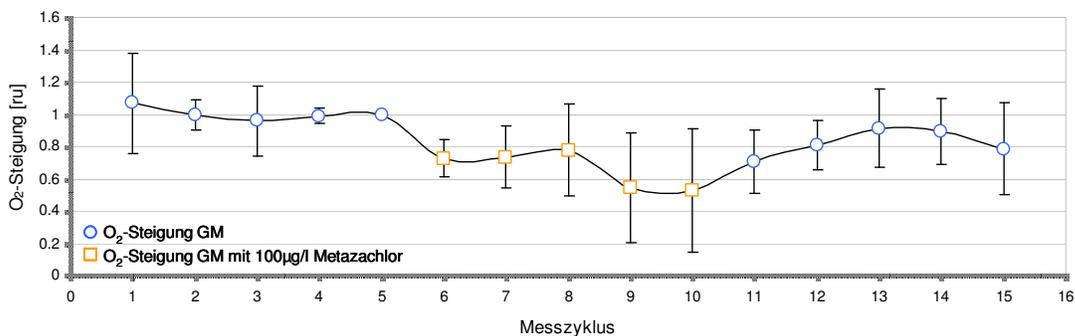


Abbildung 3.38: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor.

3. Ergebnisse

In Exposition II lagen die Werte aus Messzyklus 9 und 10 deutlich unter den drei vorangegangenen Werten (Abbildung 3.38). In Exposition III nahmen die Steigungswerte bis Messzyklus 13 zu. Danach nahmen die Werte wieder ab. Es ergaben sich nur signifikante Unterschiede zwischen Exposition I und II mit $p = 0,000$ und zwischen Exposition I und III mit $p = 0,045$ (Tabelle 3.5).

Relative pH-Wert-Steigung

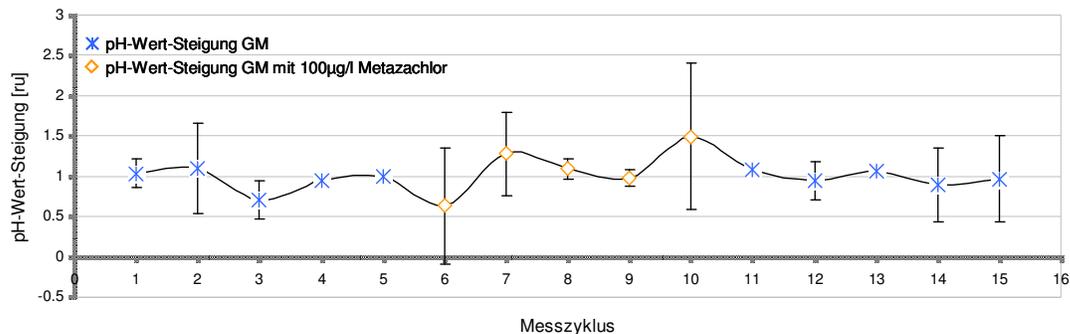


Abbildung 3.39: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Metazachlor.

In Abbildung 3.39 ist zu erkennen, dass die Steigungswerte in Exposition II großen Schwankungen unterlagen. Die Bandbreite der gemittelten Steigungswerte aus Exposition II lag zwischen 0,633 ru und 1,496 ru. Die statistischen Analysen mittels des Tukey-Tests ergaben keine signifikanten Ergebnisse (Tabelle 3.5).

3.3.4.4 10 µg/l Metazachlor

Relative Sauerstoffsteigung

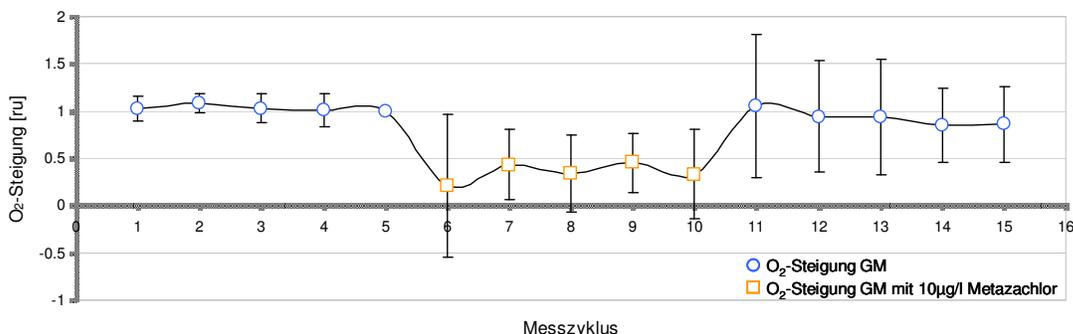


Abbildung 3.40: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Metazachlor.

Die Zugabe von 10 µg/l Metazachlor bewirkte im Mittel einen Rückgang der Sauerstoffsteigung um 65,9%. Dieser Effekt war mit $p = 0,000$ höchstsignifikant

3. Ergebnisse

(Tabelle 3.5). Alle Werte aus Exposition I und III waren größer als die Steigungswerte aus Exposition II (Abbildung 3.40). Die Steigungswerte von Exposition III unterschieden sich mit $p = 0,005$ hochsignifikant von Exposition II und mit $p = 0,705$ nicht signifikant von Exposition I.

Relative pH-Wert-Steigung

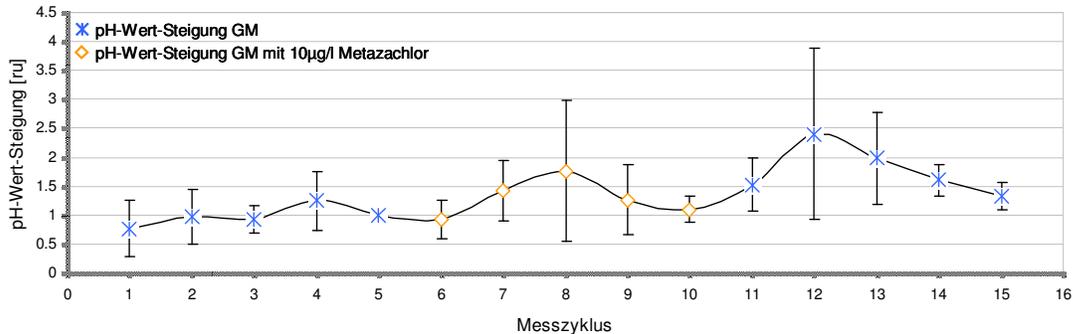


Abbildung 3.41: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Metazachlor.

Der Kurvenverlauf in Exposition I verlief im Gegensatz zu Exposition II und III einheitlich (Abbildung 3.41). Nach der Exposition II nahmen die Werte bis Messzyklus 12 zu. Danach kam es in den Messzyklen 13, 14 und 15 zu einer kontinuierlichen Abnahme der Basifizierungsrate. Die statistische Auswertung erbrachte keine signifikanten Ergebnisse (Tabelle 3.5).

3.3.4.5 Korrelation zwischen der Metazachlor-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung

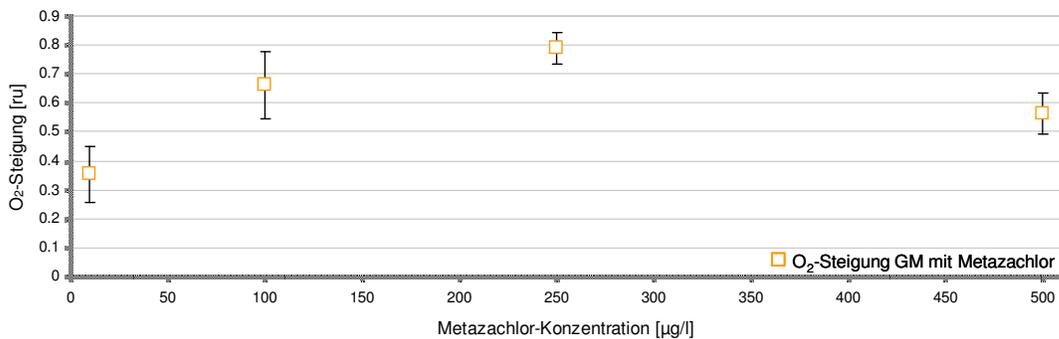


Abbildung 3.42: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Metazachlor-Konzentration.

In Abbildung 3.42 ist zu erkennen, dass eine Metazachlor-Konzentration von 250 $\mu\text{g/l}$ den geringsten Sauerstoffsteigerungsrückgang bewirkte. Die Photosyntheseleistung der Algen wurde am stärksten bei einer Metazachlor-Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ gehemmt. Eine Trendlinie ließ sich nicht eindeutig zuweisen, da die R^2 -Werte aller Trendlinienvarianten deutlich unter 0,8 lagen und damit nicht mehr als vertrauenswürdig angesehen wurden.

3.3.4.6 Korrelation zwischen der Metazachlor-Konzentration und der relativen pH-Wert-Steigung

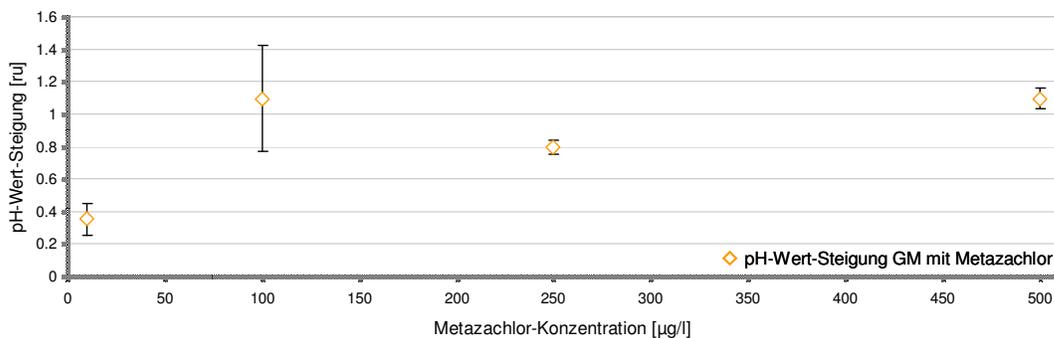


Abbildung 3.43: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Metazachlor-Konzentration.

Den größten Rückgang der Basifizierungsrate bewirkte eine Metazachlor-Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ (Abbildung 3.43). Die pH-Wert-Steigung bei 100 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor hatte mit $\pm 1,093$ ru eine große Schwankungsbreite. Der Steigungswert bei 250 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor fügte sich aus nur zwei Replikaten zusammen und ist deshalb mit Vorbehalt zu betrachten. Der gemittelte Steigungswert, der bei der Konzentration von 500 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor auftrat, unterschied sich um 0,002 ru von dem durchschnittlichen Steigungswert, der bei 100 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor zu beobachten war. Auf Grund der Verteilung der Daten ließ sich keine Trendlinie bestimmen.

3.3.5 Pirimicarb

3.3.5.1 300 µg/l Pirimicarb

Relative Sauerstoffsteigung

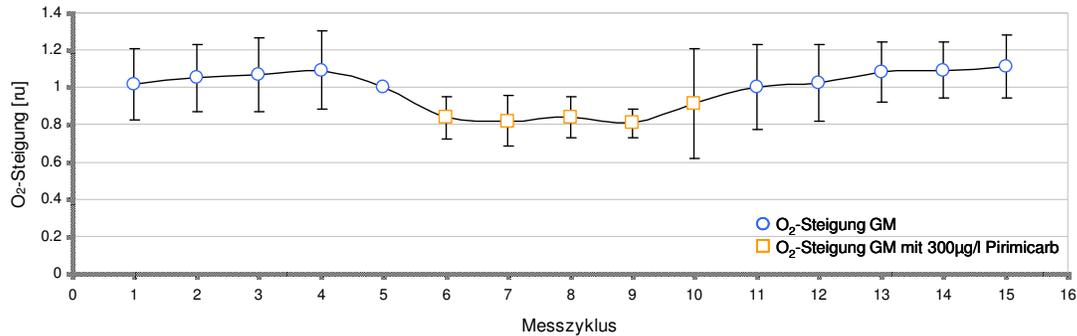


Abbildung 3.44: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 300 µg/l Pirimicarb.

Die Photosyntheseleistung der Algen wurde durch die Zugabe von 300 µg/l Pirimicarb gehemmt (Abbildung 3.44). Die Standardabweichung in Exposition II betrug im Mittel $\pm 0,147$ ru. Messzyklus 10 setzte sich von den vorangegangenen vier Steigungswerten durch einen Anstieg der Sauerstoffsteigerungsrate ab. Dieser Wert unterlag aber auch mit $\pm 0,296$ ru der größten Streuung. Der von der ANOVA festgestellte, hochsignifikante Unterschied ($p = 0,001$) ergab sich mit $p = 0,004$ zwischen Exposition I und II und mit $p = 0,001$ zwischen Exposition II und III (Tabelle 3.5). Exposition I und III unterschieden sich statistisch nicht voneinander.

3.3.5.2 200 µg/l Pirimicarb

Relative Sauerstoffsteigung

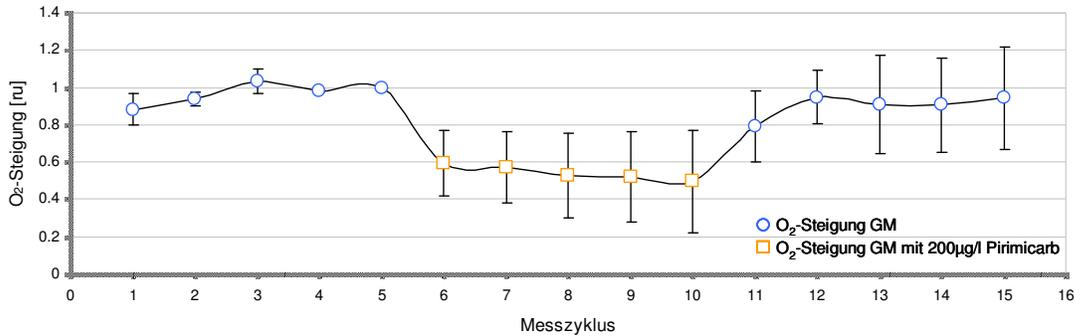


Abbildung 3.45: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 200 µg/l Pirimicarb.

Die Werte der Exposition I zeichneten sich durch geringe Standardabweichungen aus (Abbildung 3.45). Die Schwankungsbreite der Werte aus den Messzyklen 1 bis 4 lag im Maximum bei $\pm 0,082$ ru und im Minimum bei $\pm 0,005$ ru. Die hemmende Wirkung des Insektizids nahm mit der Inkubationszeit nur leicht zu. Die Differenz zwischen den Steigungswerten aus Messzyklus 6 und 10 betrug 0,094 ru. Der Games-Howell-Test berechnete mit jeweils $p = 0,000$ einen höchstsignifikanten Unterschied zwischen Exposition I und II und zwischen Exposition II und III. Exposition I und III unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 3.5).

3.3.5.3 100 µg/l Pirimicarb

Relative Sauerstoffsteigung

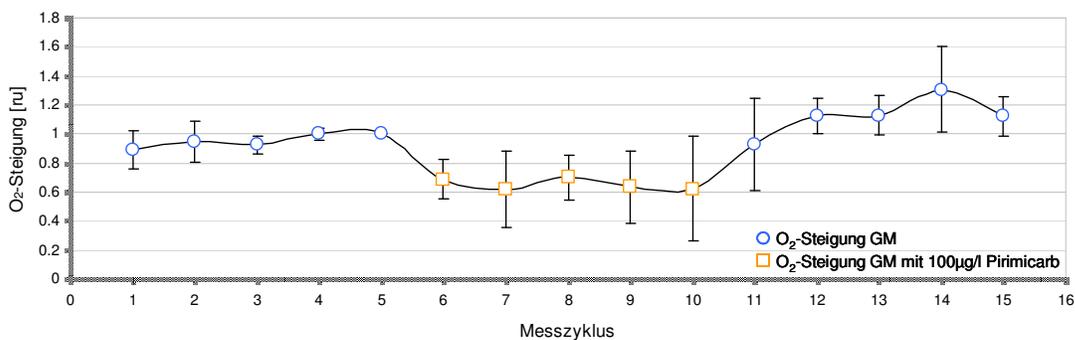


Abbildung 3.46: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Pirimicarb.

In Abbildung 3.46 lässt sich eine klare Gliederung in die drei Expositionsarten erkennen. In Exposition III stiegen die Sauerstoffsteigerungswerte bis zum Messzyklus 14 an, danach kam es zu einem leichten Rückgang. Dem Insektizid konnte mit $p = 0,001$ ein hochsignifikanter Effekt zugeordnet werden (Tabelle 3.5). Außerdem unterschieden sich Exposition II und III höchstsignifikant. Exposition I und III unterschieden sich mit $p = 0,05$ gerade nicht mehr signifikant voneinander.

3.3.5.4 50 µg/l Pirimicarb

Relative Sauerstoffsteigerung

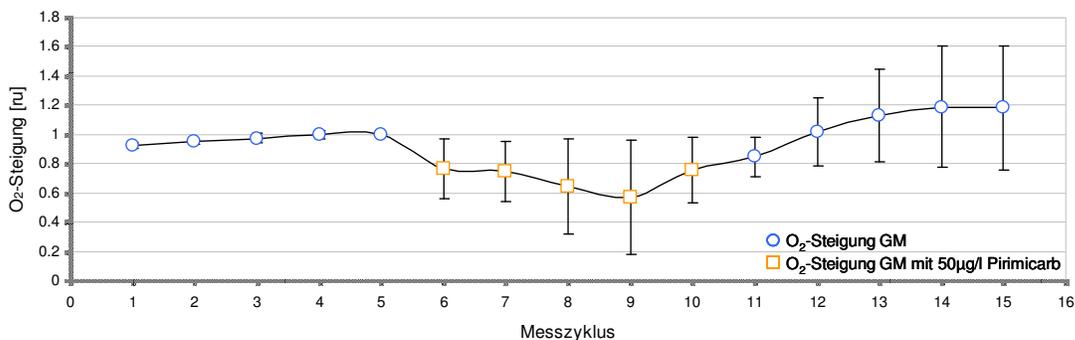


Abbildung 3.47: Relative Sauerstoffsteigerung: Versuch mit 50 µg/l Pirimicarb.

Die Werte der Exposition I verliefen sehr einheitlich und wiesen geringe Standardabweichungen auf (Abbildung 3.47). In Exposition II nahmen zunächst mit zunehmender Dauer der Insektizideinwirkung die Steigerungswerte ab. Jedoch kam es im Messzyklus 10 wieder zu einer Zunahme der Sauerstoffsteigerung. Diese Tendenz erhielt sich auch in Exposition III. Der Games-Howell-Test berechnete mit $p = 0,016$ einen hochsignifikanten Rückgang der Steigung zwischen Exposition I und II und einen höchstsignifikanten Anstieg der Steigungen in Exposition III im Verhältnis zu Exposition II (Tabelle 3.5). Zwischen Exposition I und III ergab sich kein signifikant unterschiedlicher Zusammenhang.

3.3.5.5 Korrelation zwischen der Pirimicarb-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung

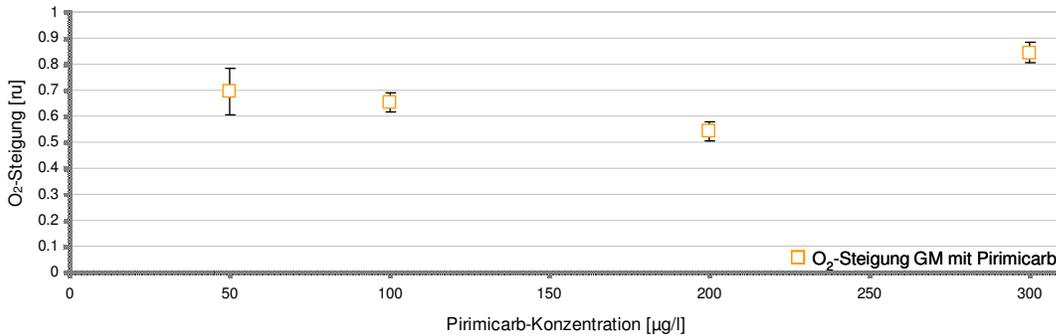


Abbildung 3.48: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Pirimicarb-Konzentration.

Da alle Steigungswerte < 1 waren, hatte das Insektizid Pirimicarb bei jeder getesteten Konzentrationsstufe einen hemmenden Effekt auf die Photosyntheseleistung der Algen (Abbildung 3.48). Es ließ sich keine eindeutige Trendlinie bestimmen.

3.3.6 17α-EE

3.3.6.1 100 µg/l 17α-EE

Relative Sauerstoffsteigung

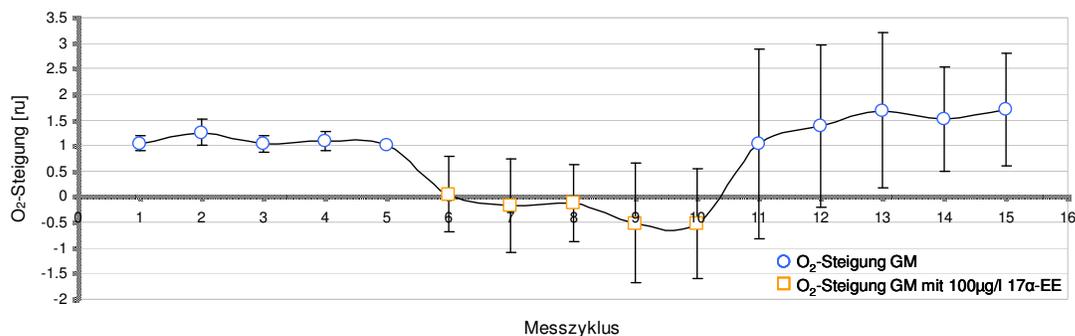


Abbildung 3.49: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l 17α-EE.

Alle Werte der Exposition II waren kleiner als die Steigungswerte aus Exposition I und III (Abbildung 3.49). Die Werte der Messzyklen 7 bis 10 waren alle negativ. Der Games-Howell-Test ergab im paarweisen Vergleich jeweils einen höchstsignifikanten Unterschied zwischen Exposition I und II und Exposition II

und III (Tabelle 3.5). Nicht signifikant war das Ergebnis für den Vergleich zwischen Exposition I und III.

3.3.6.2 10 µg/l 17α-EE

Relative Sauerstoffsteigung

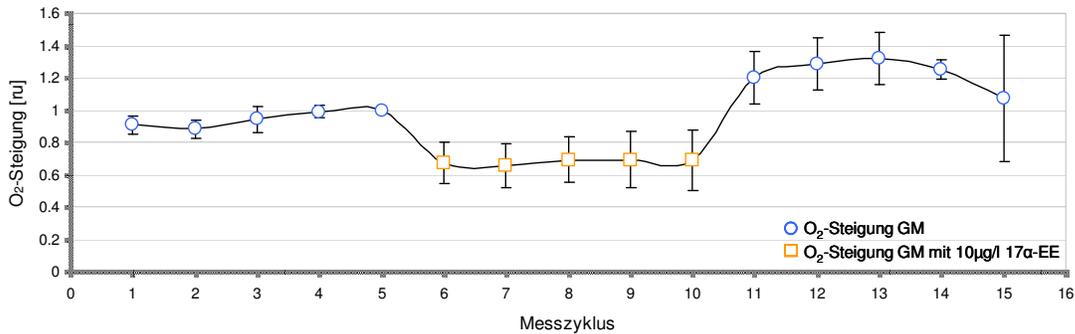


Abbildung 3.50: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l 17α-EE.

Die Werte der Exposition II verliefen annähernd gleichbleibend (Abbildung 3.50). Nach der erneuten Zugabe von 17α-EE-freiem GM in Exposition III, stiegen die Werte bis Messzyklus 13 an. Dagegen gingen die Steigungswerte in Messzyklus 14 und 15 wieder zurück. Alle drei Expositionen unterschieden sich mit $p = 0,000$ höchstsignifikant voneinander (Tabelle 3.5).

3.3.6.3 1 µg/l 17α-EE

Relative Sauerstoffsteigung

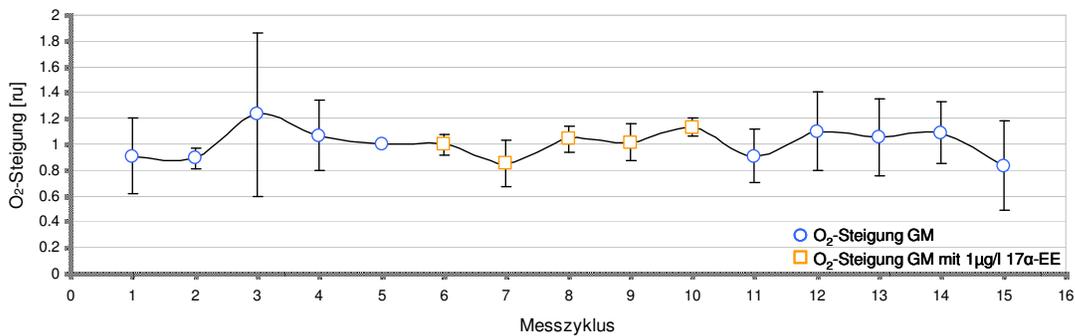


Abbildung 3.51: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 1 µg/l 17α-EE.

Die Verteilung der Werte in den einzelnen Expositionen war heterogen (Abbildung 3.51). Anhand des Grafen ließen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Expositionen erkennen, was die mit dem Tukey-Test ermittelte statistische Analyse bestätigte (Tabelle 3.5).

3.3.6.4 Korrelation zwischen der 17 α -EE-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung

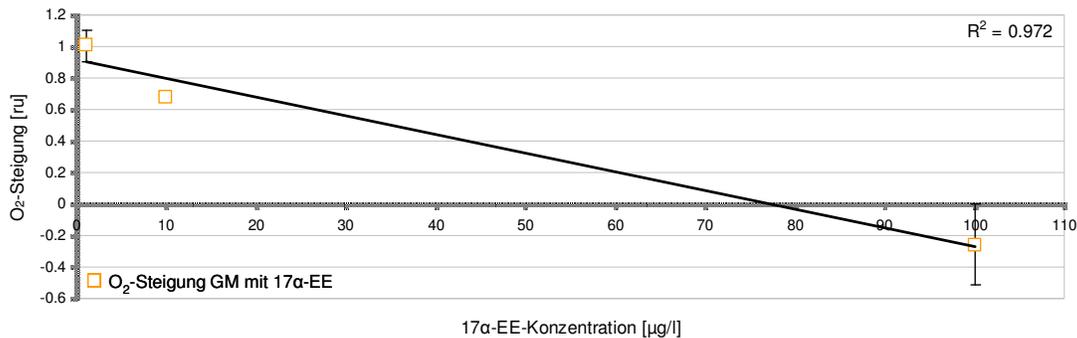


Abbildung 3.52: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der 17 α -EE-Konzentration.

Der Mittelwert der Steigungswerte aus Exposition II lag bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE bei -0,257 ru. Dabei erreichten die Steigungswerte bei den Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE und 1 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE positive Werte, die bei 0,681 ru bzw. 1,01 ru lagen. Als Trendlinie passte sich, mit einem R²-Wert von 0,972, am besten ein linearer Kurvenverlauf an die Datenpunkte an.

3.3.7 Hell-Dunkel-Reaktion

Relative Sauerstoffsteigung

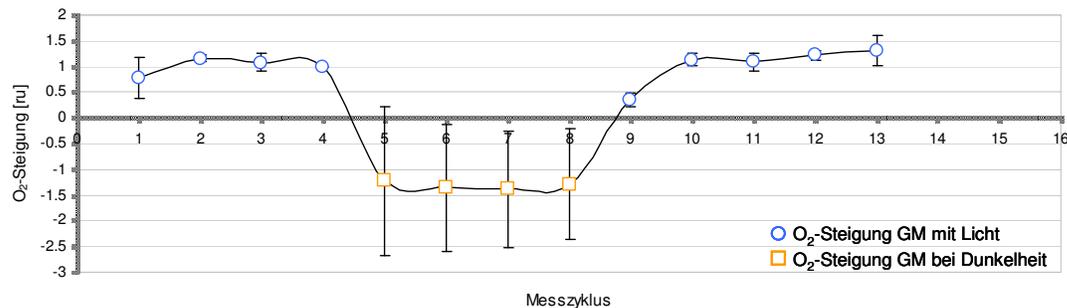


Abbildung 3.53: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch der Hell-Dunkel-Reaktion.

Die gemittelten Messwerte, die bei Dunkelheit erzielt wurden, waren alle negativ und unterschieden sich höchstsignifikant von den Werten der Messzyklen 1 bis 4 (Abbildung 3.53 und Tabelle 3.5). Der Rückgang der Steigungswerte blieb mit einer Standardabweichung von 0,07 ru über den Zeitraum der Dunkelphase relativ konstant. Alle Steigungswerte nach der Dunkelphase (Messzyklen 9 bis 13) waren positiv und unterschieden sich mit $p = 0,000$ höchstsignifikant von den Werten der Dunkelphase. Die Steigungswerte vor der Dunkelphase (Messzyklen 1 bis 4) und die Steigungswerte nach der Dunkelphase (Messzyklen 9 bis 13) unterschieden sich mit $p = 0,986$ nicht signifikant voneinander.

Relative pH-Wert-Steigung

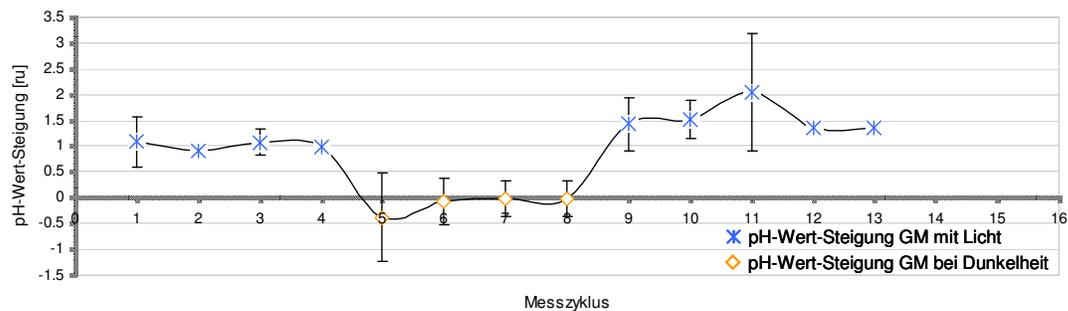


Abbildung 3.54: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch der Hell-Dunkel-Reaktion.

In der Dunkelphase nahm die Basifizierungsrate im Verhältnis zu der vorangegangenen Phase, in welcher die Lichtquelle eingeschaltet war, ab (Abbildung 3.54). Dieser Rückgang war mit $p = 0,000$ höchstsignifikant (Tabelle 3.5). Alle pH-Wert-Steigungswerte in Exposition II waren negativ. Auch die Steigungswerte der Messzyklen 9 bis 13 unterschieden sich mit $p = 0,000$ höchstsignifikant von den Werten, die sich bei Dunkelheit ergaben. Die Messwerte aus den Messzyklen 1 bis 4 und 9 bis 13 unterschieden sich mit $p = 0,047$ signifikant voneinander.

3.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Ein-Weg-ANOVA

Tabelle 3.5: Übersichtstabelle der Ein-Weg-ANOVA-Ergebnisse.

I-II = paarweiser Vergleich zwischen Exposition I und II. I-III = paarweiser Vergleich zwischen Exposition I und III. II-III = paarweiser Vergleich zwischen Exposition II und III. O₂ = Ergebnisse der Sauerstoffmessungen. pH = Ergebnisse der pH-Wert-Messungen.

Versuch	Konzentration [µg/l]	Parameter	Levene's Test	ANOVA	Tukey-Test			Games-Howell-Test		
					I-II	I-III	II-III	I-II	I-III	II-III
Diuron	100	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,000	0,000
		pH	0,040	0,000				0,000	0,134	0,002
	10	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,349	0,000
		pH	0,664	0,000	0,000	0,345	0,006			
	5	O ₂	0,000	0,001				0,000	0,159	0,047
		pH	0,173	0,722	0,783	0,733	0,995			
	1	O ₂	0,332	0,065	0,539	0,054	0,346			
		pH	0,733	0,362	0,486	0,370	0,974			
Isoproturon	100	O ₂	0,003	0,000				0,000	0,946	0,000
		pH	0,010	0,000				0,000	0,858	0,000
	10	O ₂	0,000	0,000				0,005	0,227	0,006
		pH	0,016	0,013				0,008	0,963	0,067
	5	O ₂	0,675	0,002	0,994	0,007	0,006			
		pH	0,047	0,741				0,633	0,985	0,845
Metamitron	500	O ₂	0,001	0,000				0,000	0,943	0,000
		pH	0,397	0,004	0,011	0,966	0,011			
	250	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,000	0,001
		pH	0,000	0,015				0,145	0,223	0,733
	100	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,175	0,000
		pH	0,661	0,564	0,979	0,722	0,564			
Metazachlor	500	O ₂	0,000	0,000				0,001	0,398	0,003
		pH	0,001	0,847				0,927	0,999	0,782
	250	O ₂	0,061	0,119	0,551	0,582	0,099			
		pH	0,050	0,203	0,252	0,255	1,000			
	100	O ₂	0,186	0,000	0,000	0,045	0,105			
		pH	0,604	0,640	0,647	0,973	0,767			
	10	O ₂	0,002	0,000				0,000	0,705	0,005
		pH	0,781	0,155	0,980	0,202	0,239			

3. Ergebnisse

Versuch	Konzentration [µg/l]	Parameter	Levene's Test	ANOVA	Tukey-Test			Games-Howell-Test		
					I-II	I-III	II-III	I-II	I-III	II-III
Pirimicarb	300	O ₂ pH	0,484	0,001	0,004	0,995	0,001			
	200	O ₂ pH	0,000	0,000				0,000	0,572	0,000
	100	O ₂ pH	0,119	0,000	0,001	0,050	0,000			
	50	O ₂ pH	0,000	0,000				0,016	0,460	0,000
17α-EE	100	O ₂ pH	0,000	0,000				0,000	0,530	0,000
	10	O ₂ pH	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000			
	1	O ₂ pH	0,062	0,964	0,982	0,961	0,995			
Hell-Dunkel-Reaktion		O ₂	0,000	0,000				0,000	0,986	0,000
		pH	0,375	0,000	0,000	0,047	0,000			
Nullprobe	500	O ₂	0,049	0,508				0,336	0,879	0,790
		pH	0,373	0,675	0,927	0,887	0,651			
	100	O ₂	0,306	0,321	0,880	0,314	0,549			
		pH	0,723	0,527	0,821	0,496	0,835			
	10	O ₂	0,673	0,299	0,848	0,627	0,273			
		pH	0,000	0,064				0,953	0,141	0,175

Kolmogorov-Smirnov-Test

Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test hinsichtlich ihrer Normalverteilung geprüft. Von insgesamt 129 untersuchten Fällen kam es dreimal vor, dass die Daten innerhalb einer Exposition nicht normal verteilt waren. Konkret kam dies einmal bei Exposition I im Versuch mit 1 µg/l Diuron bei den Messdaten der Sauerstoffsteigerung vor. Ferner waren die Sauerstoffsteigerungswerte im Versuch mit 500 µg/l Metazachlor in Exposition II nicht normal verteilt und im Versuch mit 10 µg/l Nullprobe folgte die Verteilung der pH-Wert-Steigerungen in Exposition III ebenfalls nicht einer Normalverteilung. Die Ergebnisse des Kol-

mogorov-Smirnov-Test zeigten, dass in 97,7% der Fälle die Daten normal verteilt waren. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die Grundgesamtheit der Daten ebenfalls einer Normalverteilung folgte und somit die Voraussetzung für die ANOVA-Berechnung gegeben war.

3.3.9 Langzeitmessungen mit verschiedenen Phosphor-Konzentrationen

Sauerstoffsteigerung

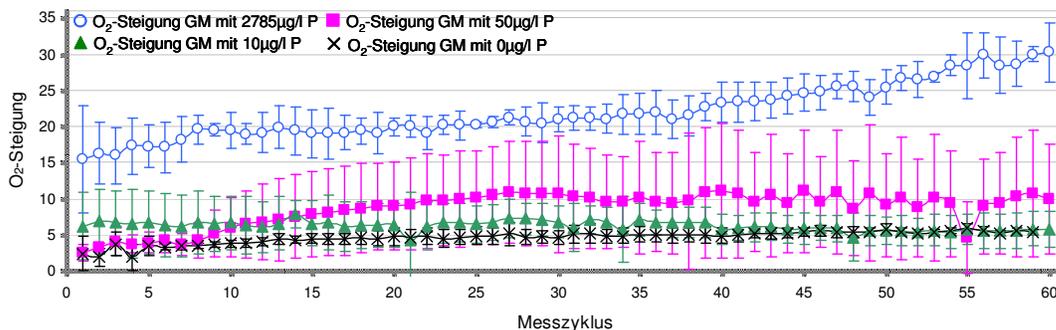


Abbildung 3.55: Relative Sauerstoffsteigerung bei verschiedenen Phosphor-Konzentrationen.

Der Graf, der sich für die Steigungswerte bei der Messung von GM (2785 µg/l Phosphor) ergab, setzte sich deutlich von den drei anderen Konzentrationsstufen ab (Abbildung 3.55). Die Sauerstoffsteigerungswerte zeigten während der gesamten Messzeit von 13 Stunden (60 Messzyklen) eine steigende Tendenz. Die Steigung einer linearen Trendlinie, die mit einem R²-Wert von 0,91 an die Datenpunkte angelegt wurde, betrug 0,204. Die mittlere Standardabweichung der Werte lag bei ±2,5. Die Steigungswerte, die sich bei 50 µg/l Phosphor ergaben, waren ab dem Messzyklus 15, mit Ausnahme des Messzyklus 55, höher als die Messwerte, die sich bei den Konzentrationen 10 µg/l und 0 µg/l Phosphor einstellten. Die Steigungswerte bei 10 µg/l Phosphor waren bis zum Messzyklus 45 stets größer als die Sauerstoffsteigerungswerte der Messung mit 0 µg/l Phosphor. Ab dem 46sten Messzyklus unterschieden sich die Steigungen der beiden Messungen kaum. Die Messwerte, die sich bei den Versuchen mit 0 µg/l Phosphor, 10 µg/l Phosphor und 50 µg/l Phosphor ergaben, nahmen zu Beginn der Messungen tendenziell zu. Daran schloss sich eine Phase an, in der die Werte bis zum Ende der Messung relativ konstant blieben. Die Daten wurden mittels des unter Punkt 2.2.5.8 beschriebenen Analyse-Modells ausgewertet. Die statisti-

sche Analyse der paarweisen Vergleiche ergab, dass sich die Sauerstoffsteigerungen der vier Phosphor-Konzentrationen mit $p = 0,000$ höchstsignifikant voneinander unterschieden.

pH-Wert-Steigung

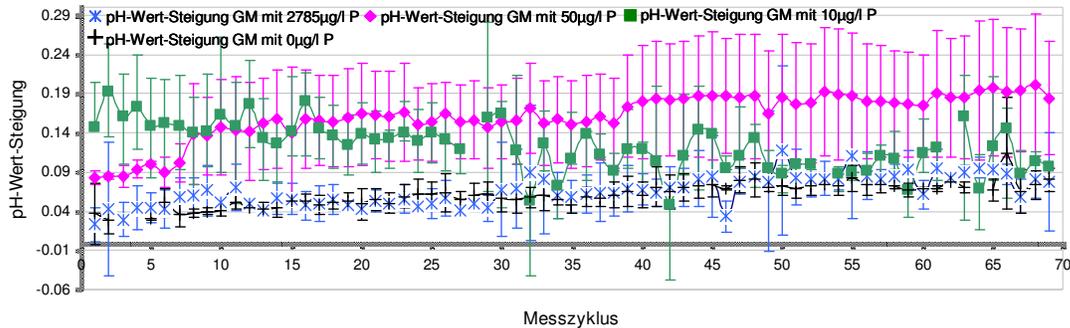


Abbildung 3.56: Relative pH-Wert-Steigung bei verschiedenen Phosphor-Konzentrationen.

Die Werte, die sich bei der Messung von GM (2785 µg/l Phosphor) einstellten, hatten im Mittel eine Standardabweichung von $\pm 0,027$. Die Werte veränderten sich über den gesamten Messzeitraum von 14 Stunden 57 Minuten (69 Messzyklen) kaum (Abbildung 3.56). Die pH-Wert-Steigungswerte bei 2785 µg/l Phosphor lagen in der Größenordnung der Steigungswerte, die sich bei 0 µg/l Phosphor ergaben. Durchschnittlich war die Steigung bei 2785 µg/l Phosphor um 0,005 Steigungseinheiten größer. Der Games-Howell-Test berechnete mit $p = 0,343$ einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den Steigungswerten dieser beiden Phosphor-Konzentrationsmessungen. Die Werte, die sich bei einer Phosphor-Konzentration von 10 µg/l zeigten, differierten ab dem 31sten Messzyklus stark. Im Kurvenverlauf, der sich bei einer Phosphor-Konzentration von 50 µg/l ergab, war ein sprunghafter Anstieg der Werte von Messzyklus 7 auf Messzyklus 8 zu beobachten. Die Werte blieben zunächst konstant und stiegen ab dem 38sten Messzyklus noch einmal sprunghaft an. Die paarweisen Vergleiche nach dem Games-Howell-Test berechneten zwischen den Phosphor-Konzentrationsmessungen mit 0 µg/l, 10 µg/l und 50 µg/l jeweils einen höchstsignifikanten Unterschied ($p = 0,000$).

3.3.10 Referenz-Messungen: Schadstoffe

Mit den Referenz-Messungen wurde getestet, ob die ausgewählten Schadstoffe einen Effekt auf die Sauerstoff- oder pH-Wert-Messungen hatten. Es wurde, wie unter 2.2.5.8 beschrieben, eine Ein-Weg-ANOVA mit den „post-hoc“ Tests nach Tukey und Games-Howell berechnet. Als Basis der Berechnung dienten jeweils drei Messzyklen der jeweiligen Behandlungsweise. Im Folgenden sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung angeführt.

Tabelle 3.6: Referenz-Messungen mit Schadstoffen ohne Algen.

Schadstoffkonzentration	Statistischer Unterschied zu Sauerstoffmessung mit schadstofffreiem GM	Statistischer Unterschied zu pH-Wert-Messung mit schadstofffreiem GM
1000 µg/l Diuron	p = 0,081 (Tukey-Test)	p = 0,387 (Tukey-Test)
1000 µg/l Isoproturon	p = 0,992 (Games-Howell-Test)	p = 0,285 (Tukey-Test)
1000 µg/l Metamitron	p = 0,295 (Tukey-Test)	p = 0,995 (Tukey-Test)
1000 µg/l Metazachlor	p = 0,629 (Tukey-Test)	p = 0,263 (Tukey-Test)
1000 µg/l Pirimicarb	p = 0,091 (Games-Howell-Test)	p = 0,048 (Tukey-Test)
1000 µg/l 17 α -EE	p = 0,925 (Games-Howell-Test)	p = 0,358 (Tukey-Test)

Der Effekt von 1000 µg/l Diuron auf die Sauerstoffmessung war mit $p = 0,081$ nicht signifikant. Ebenso ergab sich mit $p = 0,387$ ein nicht signifikanter Einfluss des Diurons auf die Messung des pH-Wertes (Tabelle 3.6). Isoproturon hatte sowohl auf die Sauerstoffmessung als auch auf die pH-Wert-Messung mit $p = 0,992$ bzw. $p = 0,285$ keinen signifikanten Einfluss. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen Messungen mit schadstofffreiem GM und GM, das mit 1000 µg/l Metamitron versetzt war. 1000 µg/l Metazachlor beeinflussten weder die Sauerstoffmessung ($p = 0,629$) noch die pH-Wert-Messung ($p = 0,263$) signifikant. Der Games-Howell-Test berechnete für den Einfluss von 1000 µg/l Pirimicarb auf die Sauerstoffmessung mit $p = 0,091$ ein nicht signifikantes Ergebnis. Allerdings ergab sich mit $p = 0,048$ ein signifikanter Einfluss von 1000 µg/l Pirimicarb auf die pH-Wert-Messung. 1000 µg/l 17 α -EE hatte auf die Sauerstoffmessung und auf die pH-Wert-Messung mit $p = 0,925$ bzw. $p = 0,358$ einen nicht signifikanten Einfluss.

3.3.11 Referenz-Messung: Phosphor

Es wurde untersucht, ob Phosphor einen Einfluss auf die Biosensorchip-Sensoren hat. Für die Sauerstoffmessung berechnete die ANOVA mit $p = 0,309$ einen nicht signifikanten Unterschied zwischen einer Phosphor-Konzentration von $2785 \mu\text{g/l}$ und $0 \mu\text{g/l}$. Mit $p = 0,137$ ergab sich ebenfalls ein nicht signifikanter Einfluss der getesteten Phosphor-Konzentrationen auf die pH-Wert-Messung.

3.3.12 Referenz-Messung: Filterpapier

Die berechnete Ein-Weg-ANOVA stellte keinen signifikanten Effekt des für die Immobilisierung der Algen verwendeten Filterpapiers auf die Sauerstoffmessung ($p = 0,687$) bzw. pH-Wert-Messung ($p = 0,843$) fest. Als Basis für die Berechnungen dienten die Sauerstoffsteigerungswerte und die gemittelten pH-Wert-Steigerungen aus jeweils drei Messzyklen.

3.3.13 Referenz-Messungen: Lösungsmittel

3.3.13.1 $500 \mu\text{g/l}$ Nullprobe

Relative Sauerstoffsteigerung

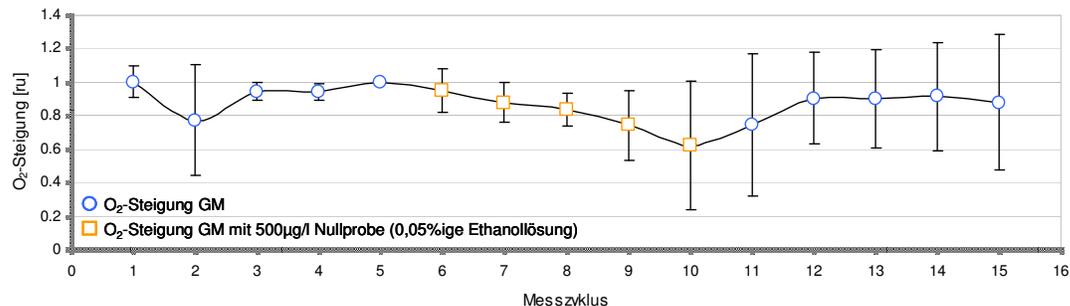


Abbildung 3.57: Relative Sauerstoffsteigerung: Versuch mit $500 \mu\text{g/l}$ Nullprobe (0,05%ige Ethanollösung).

In Exposition II nahmen die Sauerstoffsteigerungswerte mit der Dauer der Inkubationszeit ab (Abbildung 3.57). Trotzdem ergab der paarweise Vergleich mit $p = 0,336$ keinen signifikanten Unterschied zwischen Exposition I und II (Tabelle 3.5). Der Effekt des Lösungsmittels auf die Algen war auch zwischen Exposition II und III mit $p = 0,790$ nicht signifikant. Die Sauerstoffsteigerungen in Exposition III waren mit $p = 0,879$ nicht signifikant niedriger als die Werte in Exposition I.

Relative pH-Wert-Steigung

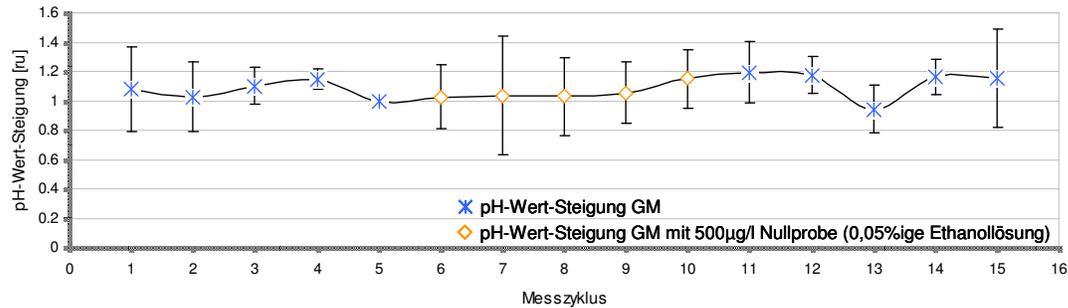


Abbildung 3.58: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 500 µg/l Nullprobe (0,05%ige Ethanol­lösung).

Die pH-Wert-Steigungswerte zeigten keine klaren Gruppeneinteilungen (Abbildung 3.58). Der Effekt des Lösungsmittels auf die Basifizierungsrate der Algen war mit $p = 0,927$ nicht signifikant (Tabelle 3.5). Die Steigungswerte der Exposition III unterschieden sich nicht signifikant von den Werten aus Exposition II. Der Tukey-Test lieferte im paarweisen Vergleich keinen signifikanten Unterschied zwischen Exposition I und III.

3.3.13.2 100 µg/l Nullprobe

Relative Sauerstoffsteigung

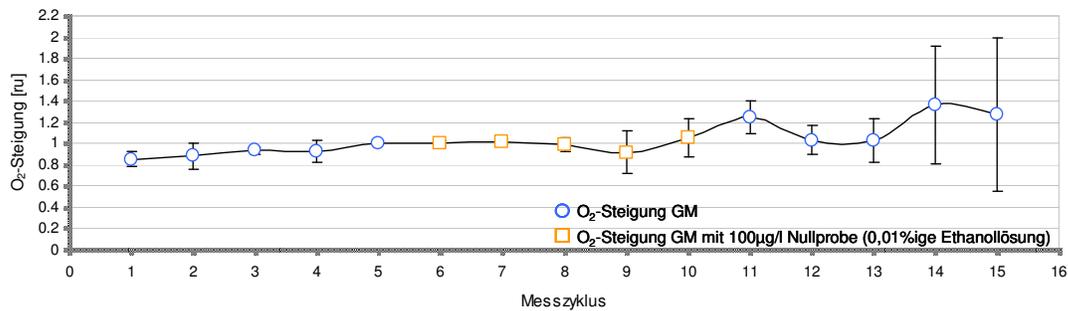


Abbildung 3.59: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Nullprobe (0,01%ige Ethanol­lösung).

Exposition I und II verliefen homogen, dagegen setzten sich die Werte aus Exposition III durch eine heterogene Verteilung der Werte ab (Abbildung 3.59). Der Tukey-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expositionen (Tabelle 3.5).

Relative pH-Wert-Steigung

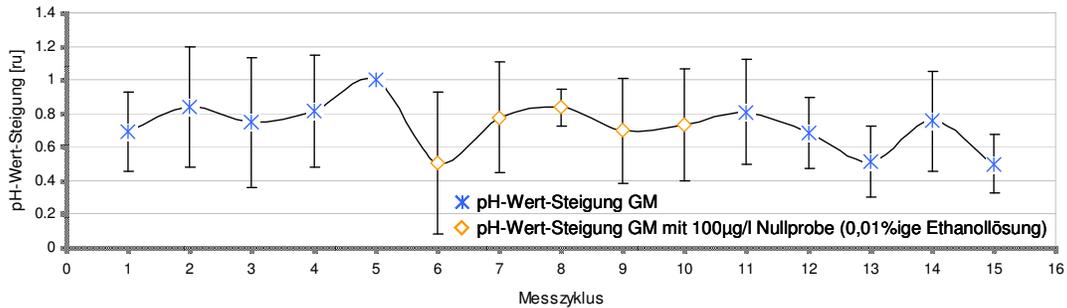


Abbildung 3.60: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Nullprobe (0,01%ige Ethanol­lösung).

Nach der Zugabe des GM mit Lösungsmittel sank die Basifizierungsrate für die Dauer eines Messzyklus (Messzyklus 6) (Abbildung 3.60). Danach stiegen die Werte wieder an. In Exposition III kam es zu einem erneuten Absinken der Steigungsrate in den Zyklen 12 ,13 und 15. Beim paarweisen Vergleich der Expositionen I, II und III mittels des Tukey-Tests ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3.5).

3.3.13.3 10 µg/l Nullprobe

Relative Sauerstoffsteigung

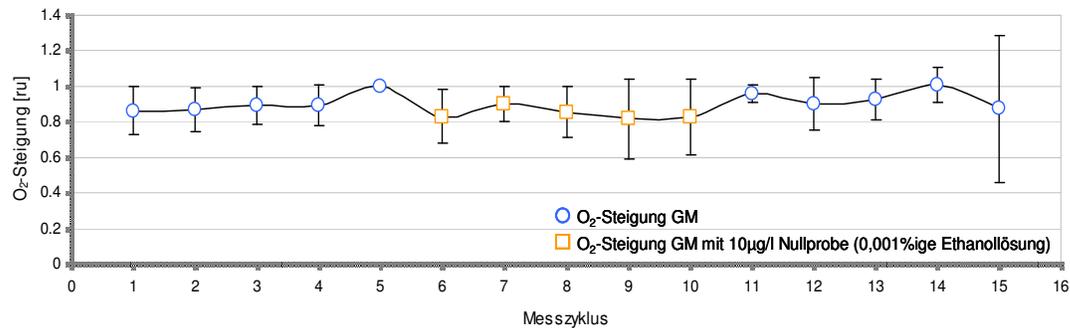


Abbildung 3.61: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Nullprobe (0,001%ige Ethanol­lösung).

Die Werte in Exposition II veränderten sich während der Inkubationszeit kaum (Abbildung 3.61). Die Standardabweichung um den Mittelwert betrug ±0,034 ru. Mit $p = 0,848$ konnte der Wirkung des Lösungsmittels kein signifikanter Effekt zugeordnet werden (Tabelle 3.5). Auch alle anderen paarweisen Vergleiche zwischen den Expositionen lieferten keine signifikanten Ergebnisse.

Relative pH-Wert-Steigung

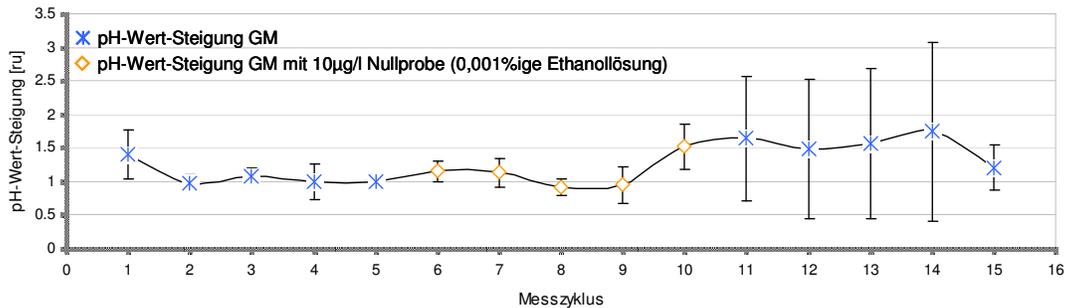


Abbildung 3.62: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Nullprobe (0,001%ige Ethanollösung).

Abbildung 3.62 zeigt eine heterogene Datenstruktur. Nachdem die Algen mit dem mit 0,001%igem Lösungsmittel angereicherten GM in Kontakt kamen, stieg die Basifizierungsrate zunächst an, fiel in den nächsten drei Messzyklen ab und stieg darauf wieder an. Die Basifizierungsraten der drei Expositionen unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 3.5).

3.3.14 Vergleich zweier Seen mittels IMOLA-Messungen

3.3.14.1 Wasserchemische Analyse Waschsee

Tabelle 3.7: Wasserchemische Analyse des Waschsee-Probenwassers.

	<i>April</i>	<i>Mai</i>	<i>Juni</i>	<i>Juli</i>	<i>August</i>	<i>September</i>	<i>Oktober</i>	<i>November</i>
	<i>19.04.2005</i>	<i>17.05.2005</i>	<i>14.06.2005</i>	<i>11.07.2005</i>	<i>09.08.2005</i>	<i>05.09.2005</i>	<i>11.10.2005</i>	<i>23.11.2005</i>
Gesamtphosphor [µg P/l]	27,4	29,1	28,9	59,4	42,3	41,3	144,4	59,4
SRP [µg P/l]	1,9	4,0	4,9	5,0	4,6	32,0	76,4	43,9
Ammonium [µg NH ₄ /l]	2,8	14,0	18,0	7,1	82,6	38,1	47,9	144,0
Silikat [mg Si/l]	1,0	1,9	2,2	0,8	2,3	2,6	2,4	2,4
Wasserhärte [°dH]	18,0	18,8	16,8	14,8	18,2	17,4	17,4	16,5

Im Oktober ergab sich mit 144,4 µg/l Gesamtphosphor ein Phosphor-Maximum. Der niedrigste Gesamtphosphor-Gehalt war dagegen mit 27,4 µg/l Phosphor im April zu beobachten (Tabelle 3.7). Der Jahresmittelwert der Gesamtphosphorkonzentration im Waschsee lag bei 54,0 µg/l Phosphor. Die Werte des SRP

stiegen im Verhältnis zu den vorangegangenen Monaten ab dem Monat September stark an. Der berechnete Mittelwert der SRP-Messungen ergab 21,6 µg/l. Der niedrigste Ammonium-Gehalt wurde mit 7,1 µg/l Ammonium im Juli gemessen. Der höchste Wert zeigte sich im November mit 144,0 µg/l Ammonium. Ebenfalls im Juli war der niedrigste Silikat-Messwert mit 0,8 mg/l zu beobachten. Die Wasserhärte schwankte zwischen 14,8 °dH und 18,8 °dH. Dies ergab einen Jahresmittelwert von 17,2 °dH.

3.3.14.2 Wasserchemische Analyse Lustsee

Tabelle 3.8: Wasserchemische Analyse des Lustsee-Probenwassers.

	<i>April</i>	<i>Mai</i>	<i>Juni</i>	<i>Juli</i>	<i>August</i>	<i>September</i>	<i>Oktober</i>	<i>November</i>
	<i>21.04.2005</i>	<i>19.05.2005</i>	<i>16.06.2005</i>	<i>13.07.2005</i>	<i>11.08.2005</i>	<i>05.09.2005</i>	<i>11.10.2005</i>	<i>23.11.2005</i>
Gesamtphosphor [µg P/l]	2,9	1,6	3,9	11,8	1,7	1,6	2,8	4,2
SRP [µg P/l]	1,0	3,2	1,2	5,3	-0,5	-0,1	2,1	0,3
Ammonium [µg NH ₄ /l]	67,2	47,4	21,7	46,1	49,6	56,3	43,3	99,8
Silikat [mg Si/l]	1,9	1,0	1,8	2,0	2,0	1,79	1,8	2,5
Wasserhärte [°dH]	14,5	14,3	14,3	13,7	11,2	13,7	12,0	14,3

Der höchste Gesamtphosphor-Gehalt von 11,8 µg/l Phosphor im Juli 2005 im Lustsee war deutlich niedriger als der niedrigste Gesamtphosphor-Gehalt von 27,4 µg/l Phosphor im Waschsee (Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8). Der Mittelwert des Gesamtphosphor-Gehaltes im Lustsee lag bei 3,8 µg/l Phosphor. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Nachweisgrenze für Phosphor bei 5 µg/l lag. Das Jahresmaximum für SRP ergab sich im Juli mit 5,3 µg/l gelösten Phosphor. Alle übrigen SRP-Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Mit einem Jahresdurchschnittswert von 53,9 µg/l Ammonium hatte der Lustsee im Mittel mehr Ammonium im Wasser als der Waschsee mit 44,3 µg/l Ammonium (Tabelle 3.7). Der maximale Silikat-Gehalt wurde im November mit 2,5 µg/l Silikat gemessen, das Minimum war dagegen mit 1,0 mg/l Silikat im Mai zu finden. Für die Wasserhärte wurde ein Jahresmittelwert von 13,5 °dH bestimmt.

3.3.14.3 Mittlere Sauerstoffsteigerung im Jahr 2005 bei Waschsee- und Lustsee-Probenwasser

Aus den einmal pro Monat erhobenen IMOLA-Messdaten je See wurde die Sauerstoffsteigerung im Jahresmittel berechnet (Abbildung 3.63).

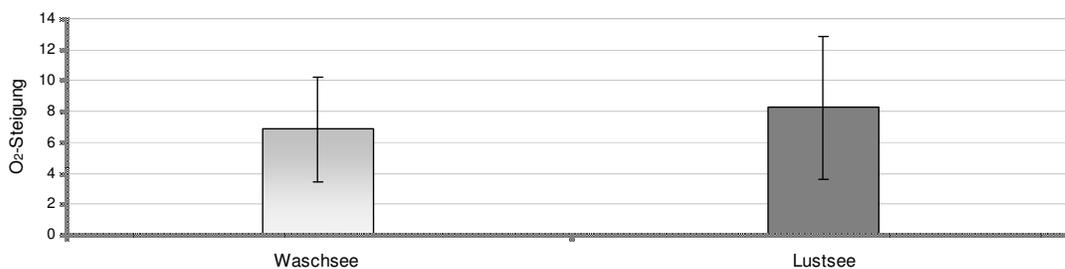


Abbildung 3.63: Sauerstoffsteigerung im Jahresmittelwert bei Waschsee- und Lustsee-Probenwasser.

Die mittlere Sauerstoffsteigerung hatte bei Lustsee-Probenwasser einen Wert von 8,2 und bei Waschsee-Probenwasser einen Wert von 6,8 (Abbildung 3.63). Der prozentuale Unterschied in der über das Jahr gemittelten Sauerstoffsteigerung lag somit bei 17,1%.

3.3.14.4 Sauerstoffsteigerung von April bis November 2005 bei Waschsee- und Lustsee-Probenwasser

Von April bis November 2005 wurde monatlich mit dem IMOLA-Messgerät die Reaktion der Algen auf eutrophes Waschsee-Probenwasser und oligotrophes Lustsee-Probenwasser gemessen. Die präsentierten Messungen sind exemplarisch. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung aus 13 Messzyklen.

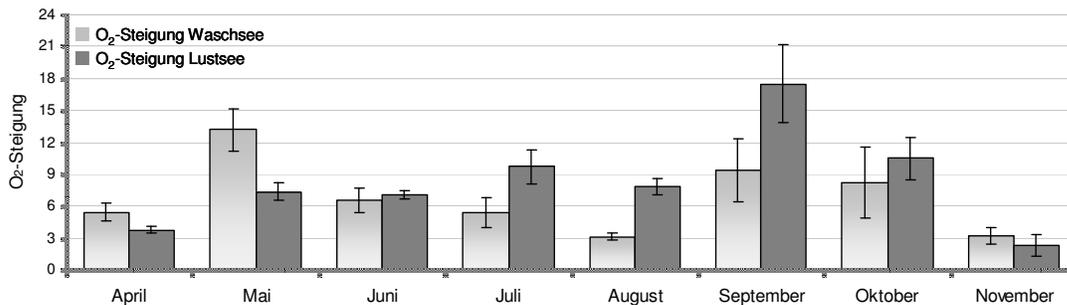


Abbildung 3.64: Sauerstoffsteigerungen von April bis November 2005 bei Waschsee- und Lustsee-Probenwasser.

In Abbildung 3.64 ist zu erkennen, dass im April, Mai und November die Algen mit Waschsee-Probenwasser höhere Photosyntheseraten erzielten als mit Lustsee-Probenwasser. In den übrigen Monaten waren die Steigungswerte bei Lustsee-Probenwasser höher als bei Waschsee-Probenwasser. Der größte Unterschied ergab sich im Mai. Hier lagen die Steigungswerte, die bei Waschsee-Probenwasser erreicht wurden um 44,2% höher als die Steigungswerte, die sich bei der IMOLA-Messung mit Lustsee-Probenwasser einstellten. Im August war dagegen die mittlere Steigung bei Lustsee-Probenwasser um 60,2% größer als bei Waschsee-Probenwasser. Der Vergleich der Sauerstoffsteigerung im Jahresmittelwert ließ keinen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Seen erkennen (Abbildung 3.63). Wurde aber jeder Messwert des einen Sees mit dem analogen Messwert des anderen Sees in einem Wilcoxon Test verglichen, zeigte sich, dass Lustsee-Probenwasser mit $p = 0,008$ hochsignifikant höhere Steigungswerte erzeugte als Waschsee-Probenwasser.

3.4 AFLP

3.4.1 Vorversuch

In einem Versuch wurde überprüft, ob sich die von MANNSCHECK (2003) optimierte AFLP Methode für die genetische Untersuchung von *Chlorella kessleri*-Kulturen eignet.

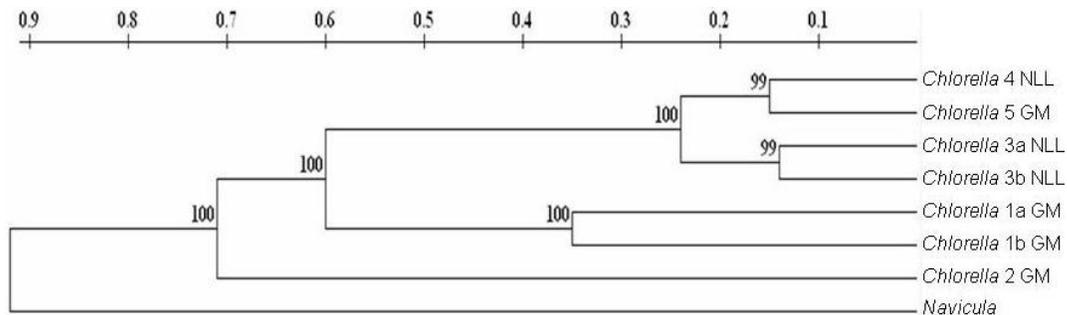


Abbildung 3.65: UPGMA-Dendrogramm für *Chlorella*-Proben. Als Außengruppe wurde *Navicula* verwendet.

In Abbildung 3.65 ist zu erkennen, dass sich die Diatomeenart *Navicula pelliculosa* mit einem Bootstrap-Wert von 100% deutlich von den *Chlorella*-Proben absetzte. Mit einem Bootstrap-Wert von 99% bildeten *Chlorella* 3a NLL und 3b NLL eine Gruppe (cluster) sowie *Chlorella* 4 NLL und *Chlorella* 5 GM. Mit kurzen Ästen und einem Bootstrap-Wert von 100% gruppierten sich *Chlorella* 1a GM und 1b GM zueinander. *Chlorella* 2 GM setzte sich mit 100% von allen anderen *Chlorella*-Proben ab.

Tabelle 3.9: Datum der Kulturanlage der jeweiligen *Chlorella*-Kulturen und deren Peak-Anzahl.

Probenkennzeichnung	Datum der Kulturanlage	Anzahl der Peaks
<i>Chlorella</i> 1 GM (1a/1b)	15.09.2004	111/124
<i>Chlorella</i> 2 GM	15.09.2004	125
<i>Chlorella</i> 3 NLL (3a/3b)	04.05.2005	138/134
<i>Chlorella</i> 4 NLL	15.11.2005	130
<i>Chlorella</i> 5 GM	15.11.2005	134

Tabelle 3.9 zeigt das Datum, an dem die Kulturen jeweils begründet wurden (Datum der Kulturanlage), sowie deren Gesamtanzahl an Peaks an. Die *Chlorella*-Kulturen 1a GM und 1b GM sind die ältesten Kulturen und wurden jeweils am 15.09.2004 angelegt. Darauf folgen *Chlorella* 3a/3b NLL, die am 04.05.2005

angelegt wurden und eine Peak-Anzahl von 138 bzw. 134 aufwiesen. Die jüngsten Kulturen waren *Chlorella* 4 NLL und *Chlorella* 5 GM, die beide am 15.11.2005 initiiert wurden. *Chlorella* 4 NLL hatte eine Peak-Anzahl von 130 und *Chlorella* 5 GM wies 134 Peaks auf. Die Anzahl der Peaks war normal verteilt ($p > 0,05$) und wies eine geringe Standardabweichung von 9,04 um den Mittelwert von 128 Peaks auf.

3.4.2 AFLP-Analyse zur Monoklonalität der *Chlorella kessleri*-Kulturen

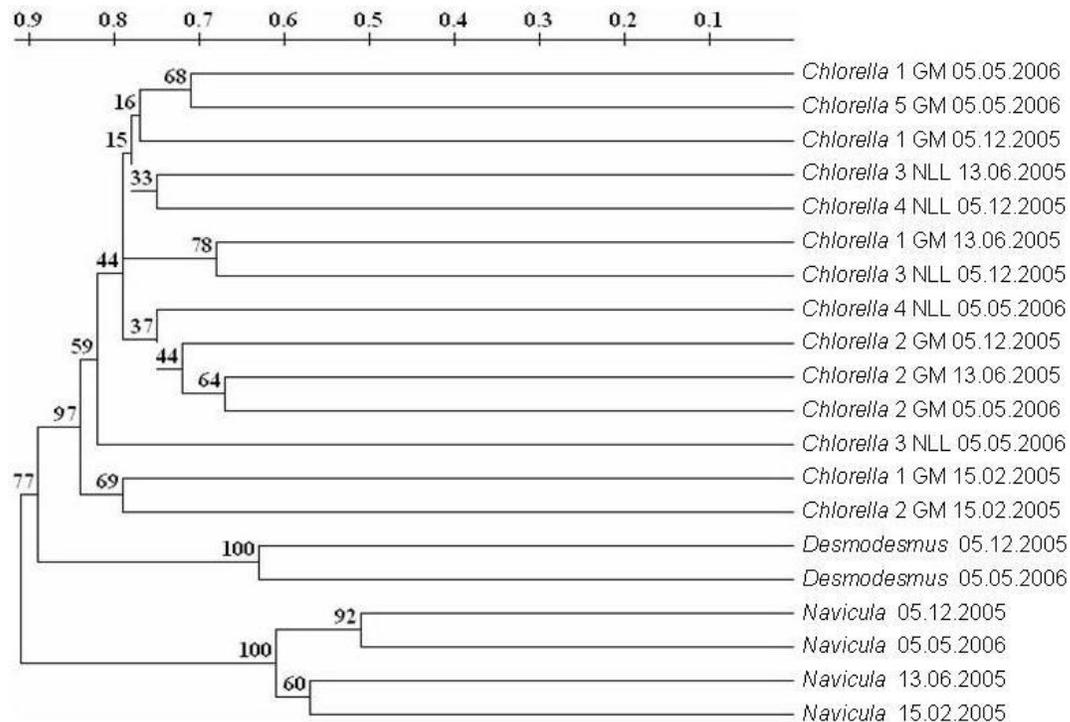


Abbildung 3.66: Dendrogramm nach dem UPGMA-Verfahren zur Monoklonalität der *Chlorella*-Kulturen.

In Abbildung 3.66 zeigt sich, dass alle *Navicula*-Kulturen zu 100% zusammenclusterten und sich damit eindeutig von allen Grünalgenkulturen abgrenzten. Alle Grünalgen wurden mit einem Bootstrap-Wert von 77% zu einer Gruppe zusammengefasst. Innerhalb der Grünalgengruppe wiesen die *Chlorella*-Kulturen unterschiedliche Bootstrap-Werte auf, trennten sich aber mit einem Bootstrap-Wert von 97% deutlich von den *Desmodesmus*-Kulturen ab. Die unterschiedlichen Bootstrap-Werte innerhalb der *Chlorella*-Kulturen lagen bis auf *Chlorella* 1 GM 13.06.2005 und *Chlorella* 3 NLL 05.12.2006 unter 70% und galten somit als unsicher (siehe 2.3.5.2). Eine Gruppenbildung nach Daten oder gleichen *Chlorella*-Kulturen war nicht zu beobachten.

Im Folgenden ist die Peak-Anzahl der jeweiligen Kultur aufgelistet:

Tabelle 3.10: Anzahl der Peaks für die jeweilige Algenkultur.

Probenkennzeichnung	Anzahl der Peaks
<i>Chlorella</i> 1 GM 05.05.2006	109
<i>Chlorella</i> 1 GM 05.12.2005	102
<i>Chlorella</i> 1 GM 13.06.2005	106
<i>Chlorella</i> 1 GM 15.02.2005	118
<i>Chlorella</i> 2 GM 05.05.2006	79
<i>Chlorella</i> 2 GM 05.12.2005	73
<i>Chlorella</i> 2 GM 13.06.2005	82
<i>Chlorella</i> 2 GM 15.02.2005	268
<i>Chlorella</i> 3 NLL 05.05.2006	87
<i>Chlorella</i> 3 NLL 05.12.2005	85
<i>Chlorella</i> 3 NLL 13.06.2005	77
<i>Chlorella</i> 4 NLL 05.05.2006	75
<i>Chlorella</i> 4 NLL 05.12.2005	65
<i>Chlorella</i> 5 GM 05.05.2006	69
<i>Desmodesmus</i> 05.05.2006	126
<i>Desmodesmus</i> 05.12.2005	120
<i>Navicula</i> 05.05.2006	120
<i>Navicula</i> 05.12.2005	99
<i>Navicula</i> 13.06.2005	104
<i>Navicula</i> 15.02.2005	100

Tabelle 3.10 zeigt, dass die Anzahl der Peaks innerhalb der Kulturen ähnlich war. Eine Ausnahme ergab sich bei der Kultur *Chlorella* 2 GM 15.02.2005, die mit einer Peak-Anzahl von 268 mehr als das Zweifache im Vergleich zu den anderen Kulturen aufwies.

3.4.3 Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA

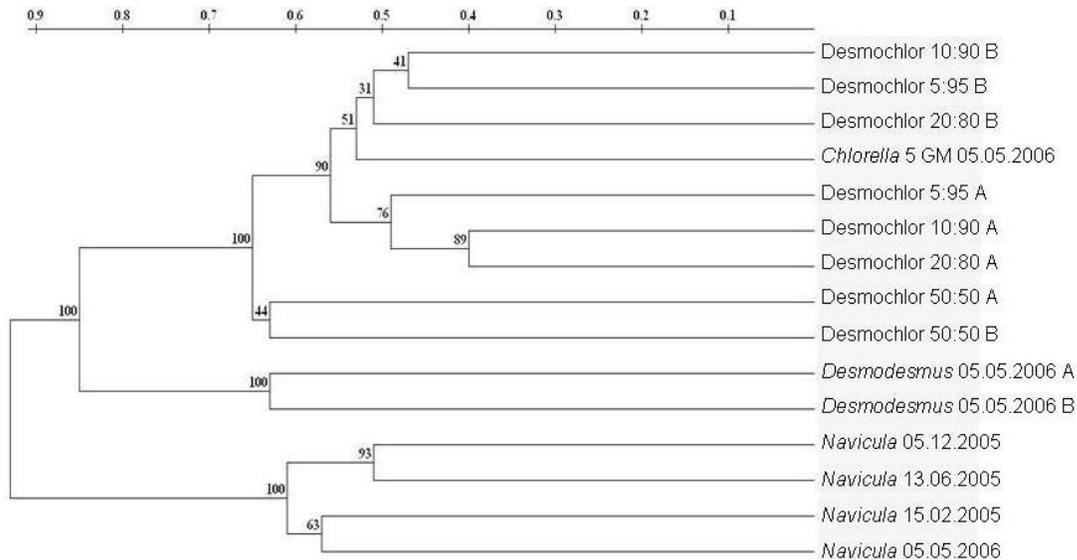


Abbildung 3.67: Dendrogramm nach dem UPGMA-Verfahren zur Überprüfung der Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA. Die Bezeichnungen „A“ und „B“ stehen für die Replikate.

In Abbildung 3.67 zeigt sich mit einem Bootstrap-Wert von 100% eine klare Trennung der Diatomeenart *Navicula pelliculosa* von den Grünalgen. Innerhalb der Grünalgengruppe trennte sich die monoklonale Reinkultur *Desmodesmus subspicatus* (*Desmodesmus* 05.05.2006 A und B) zu 100% von allen Mischkulturen und von der Reinkultur *Chlorella* 5 GM 05.05.2006 ab. Innerhalb der Mischkulturen clusterten nur die beiden Replikate Desmochlor 50:50 A und B zusammen. Diese Verknüpfung war mit einem Bootstrap-Wert von 44% gekennzeichnet.

Alle Desmochlor-Ansätze mit den Mischungsverhältnissen von 5:95, 10:90 und 20:80 sowie die monoklonale Reinkultur *Chlorella* 5 GM 05.05.2006 clusterten mit einem Bootstrap-Wert von 90% zusammen und separierten sich deutlich von den Desmochlor-Ansätzen mit dem Mischungsverhältnis 50:50.

Zusätzlich zu dem UPGMA-Dendrogramm wurde mit der Distanzmatrix eine MDS-Analyse durchgeführt:

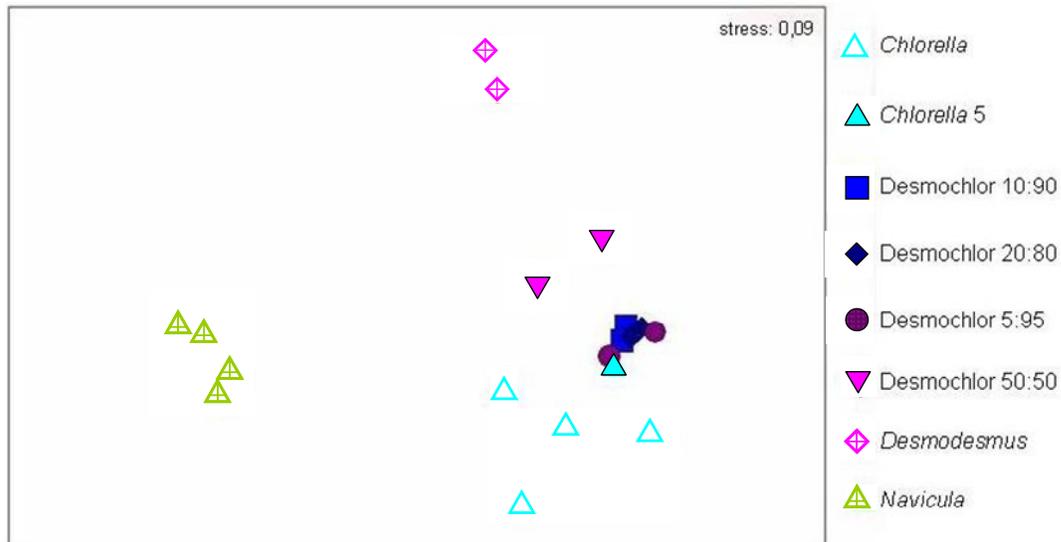


Abbildung 3.68: MDS-Analyse. Datengrundlage: Zusammengefasst als *Chlorella*: *Chlorella* 1 GM 05.05.2006, *Chlorella* 2 GM 05.05.2006, *Chlorella* 3 NLL 05.05.2006 und *Chlorella* 4 NLL 05.05.2006. *Chlorella* 5: *Chlorella* 5 GM 05.05.2006. Zusammengefasst als *Desmodesmus*: *Desmodesmus* 05.05.2006 A, *Desmodesmus* 05.05.2006 B (Replikate). Zusammengefasst als *Navicula*: *Navicula* 05.05.2006, *Navicula* 05.12.2005, *Navicula* 13.06.2005 und *Navicula* 15.02.2005.

Die MDS-Analyse zeigt, wie die UPGMA-Analyse (Abbildung 3.67), eine Trennung der *Navicula*-Kulturen von der Gruppe der Grünalgen (Abbildung 3.68). In der Gruppierung der *Chlorella*-Proben wurde *Chlorella* 5 hervorgehoben, da diese *Chlorella*-Kultur zur Mischung mit *Desmodesmus* verwendet wurde. Es ist zu erkennen, dass sich die Desmochlor-Mischkulturen zwischen den *Desmodesmus*-Reinkulturen und den *Chlorella*-Reinkulturen einordneten. *Chlorella* 5 gruppierte sich allerdings eher zu der Desmochlor-Mischkultur 5:95 als zu den anderen vier *Chlorella*-Reinkulturen. Die Desmochlor-Mischungen 5:95, 10:90 und 20:80 lagen sehr eng zusammen. Deutlich trennten sich aber die Desmochlor 50:50 Proben von den anderen Desmochlor-Mischungsverhältnissen ab.

3.4.4 Polymorphiegrad

Tabelle 3.11: Wichtigste Merkmale der Lociverteilung der Algenkulturen.

	<i>Chlorella</i> - Kulturen	<i>Desmochlor</i> - Kulturen	<i>Desmodesmus</i> - Kulturen	<i>Navicula</i> - Kulturen
Anzahl der Proben einer Gruppe	14	8	2	4
Anzahl der Loci einer Gruppe	560	202	180	205
Anzahl einmal vorhandener Loci* ¹	267	107	114	97
Anzahl monomorpher Loci* ²	12	22	66	44
Anzahl polymorpher Loci* ³	548	180	114	161
Anzahl der unique Loci* ⁴	[4] ⁵	0	16	7
Polymorphiegrad	97,9	89,1	63,3	78,5

¹ Einmal vorhandene Loci: Loci, die nur in einem Individuum innerhalb einer artgleichen Gruppe vorhanden sind.

² Monomorphe Loci: Loci, die bei allen Individuen einer vorab definierten Gruppe vorhanden sind.

³ Polymorphe Loci: entspricht $\sum \text{Loci} - \sum \text{monomorphe Loci}$.

⁴ Unique Loci: artspezifische Loci, die bei allen Individuen einer Gruppe und nur in dieser Gruppe vorkommen.

⁵ Die [4] bei der unique Locianzahl innerhalb der *Chlorella*-Kulturen weist darauf hin, dass diese Loci nur innerhalb der Gruppe der Grünalgen unique sind. Dabei sind auch die *Desmochlor*-Kulturen monomorph, sonst gäbe es im engeren Sinne von unique Loci bei *Chlorella*-Kulturen keine Loci diesen Typs.

Tabelle 3.11 fasst die Anzahl und Typen der in den verschiedenen Kulturen vorkommenden Loci zusammen. Die *Chlorella*-Kulturen hatten 267 „einmal vorhandene“ Loci im Vergleich zu *Desmodesmus*-Kulturen mit 144, *Desmochlor*-Kulturen mit 107 und *Navicula*-Kulturen mit 97. Die *Desmodesmus*-Kulturen hatten mit 66 die meisten monomorphen Loci, gefolgt von 44 bei den *Navicula*-Kulturen, 22 bei den *Desmochlor*-Kulturen und zwölf monomorphen Loci bei den *Chlorella*-Kulturen. Die *Desmochlor*-Kulturen wiesen keinen unique Locus auf, dagegen hatten die *Desmodesmus*-Kulturen mit einer Anzahl von 16 die meisten unique Loci, gefolgt von *Navicula*-Kulturen mit sieben und *Chlorella*-Kulturen mit einer Anzahl von vier. Den höchsten Polymorphiegrad mit einem Wert von 97,9 wiesen die *Chlorella*-Kulturen auf.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.12: Auflistung monomorpher Loci, die innerhalb der Grünalgen-Kulturen nur bei *Chlorella* oder nur bei *Desmodesmus* gleichzeitig unique sind und Loci, die gleichzeitig bei *Chlorella* und *Desmodesmus* vorkommen.

Loci	Chlorella-Kulturen	Desmochlor-Kulturen	Desmodesmus-Kulturen	Navicula-Kulturen
046	14	8	0	3
435	14	8	0	0
465	14	8	0	2
810	14	8	0	1
543	14	8	2	0
620	14	8	2	0
749	14	8	2	0
550	13	8	0	0
604	13	8	0	1
622	13	8	0	1
054	0	0	2	0
345	0	0	2	0
439	0	0	2	0
629	0	0	2	0
640	0	0	2	0
699	0	0	2	0
703	0	0	2	0
732	0	0	2	0
733	0	0	2	0
751	0	0	2	0
933	0	0	2	0
934	0	0	2	0
935	0	0	2	0
967	0	0	2	0
968	0	0	2	0
996	0	0	2	0
348	0	7	2	0
627	0	6	2	0
729	0	5	2	0

Die grau markierten Werte (543 bis 749) in Tabelle 3.12 stehen für alle Loci der Grünalgengruppe. Durch sie konnte *Navicula* eindeutig abgetrennt werden. Alle monomorphen Genorte der *Chlorella*-Kulturen, die auch bei den Desmochlor-Kulturen auftraten, sind grün markiert (046 bis 810 und 550 bis 622). Monomor-

3. Ergebnisse

phe Genorte der *Desmodesmus*-Kulturen sind blau (054 bis 966) und alle *Desmodesmus*-Loci, die sich auch bei den Desmochlor-Kulturen fanden, sind orange gekennzeichnet (348 bis 729).

4 DISKUSSION

4.1 Algenkulturen

Zu Beginn der Untersuchung wurden zum einen verschiedene Algenkulturen aus Freilandisolaten angesetzt und zum anderen Algenkulturen verwendet, die von der SAG erworben wurden. Ziel war es, eine ubiquitär verbreitete Algenart für die IMOLA-Messung zu finden, die den Anforderungen der Kultivierbarkeit in Bezug auf Wachstum, Monoklonalität und axenischen Zustand der Kultur gerecht wurde. Zusätzlich musste diese Algenart eine hohe Sensitivität gegenüber Schadstoffen aufweisen und den mechanischen Belastungen standhalten, die bei den IMOLA-Messungen auftraten. Die Hauptproblematiken ergaben sich in der Produktion axenischer Algenkulturen und in der mechanischen Belastbarkeit der Algen. Große oder längliche Algenarten wie *Cosmarium spec.* bzw. *Monoraphidium griffithii* wurden beim Filtrieren geknickt oder sie zerplatzten. Bei den *Scenedesmus obliquus*-Individuen brachen die Schwebefortsätze ab, und bei *Staurastrum spec.* wurden die spitz zulaufenden Enden durch das Filtrieren abgerissen. Axenische Algenkulturen ließen sich nur in wenigen Fällen herstellen. Insbesondere bei den Kulturen, die aus Freilandisolaten gewonnen wurden, ergaben sich Probleme. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage von POLNE-FULLER (1991), die feststellte, dass der Prozess des Isolierens von Einzelindividuen zur Kultivierung in künstlichen Nährmedien sehr zeitaufwändig ist und eine niedrige Erfolgsquote aufweist. Zudem ist der Wirkungsgrad dieser Methode stark limitiert, da die Bakterien an den Algen anhaften und somit nur sehr schwer entfernt werden können (POLNE-FULLER 1991). Deshalb wurden die unter 2.1.6 beschriebenen Versuche durchgeführt, um axenische Algenkulturen herzustellen. Die Filtrationsversuche mit bakterienkontaminierten *Monoraphidium griffithii*-Kulturen lieferten mit einem Bakterienrückgang von 89,1% gute Ergebnisse. Auch der Einsatz der Antibiotika Chloramphenicol und Cefotaxime führten zu einer starken Dezimierung der Bakterienanzahl in den *Monoraphidium griffithii*-Kulturen (80,8% bzw. 78,2%). Dagegen verringerte Chloramphenicol die Bakterienanzahl in einer *Navicula pelliculosa*-Kultur um lediglich 63,7% (siehe 3.1.4). Möglicherweise hängt dies mit der Gallertbildung der Kieselalge zusammen, da die Gallerte den Bakterien einen Schutz vor dem Antibiotikum bot. Dieser Effekt könnte sich auch negativ auf die Detektierung von Schad-

stoffen bei den IMOLA-Messungen auswirken, da die Gallerte die Algenzellen von den Schadstoffen abschirmen würde. Im Allgemeinen stellte sich heraus, dass sich Diatomeen auf Grund ihres geringen Wachstums nicht für die IMOLA-Messungen eignen.

Weder bei der Grünalge *Monoraphidium griffithii* noch bei der Kieselalge *Navicula pelliculosa* ist es gelungen, die Bakterien vollständig aus den Kulturen zu entfernen. Eine Kombination aus der Filtrationsmethode und den chemischen Wirkstoffen Chloramphenicol und Cefotaxime hätte die Bakterienanzahl stärker vermindern oder vollständig eliminieren können. An diesem Punkt der Untersuchungen wurde von weiteren zeitaufwändigen und vertiefenden Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet abgesehen, da die axenische Kultivierung der Algenstämme, die bei der SAG erworben wurden, einwandfrei und reproduzierbar funktionierte.

4.1.1 *Chlorella kessleri* (Testorganismus)

4.1.1.1 Nährmedium und axenische Kulturbedingungen

Chlorella kessleri wurde in GM kultiviert, dessen pH-Wert nach dem Autoklavieren zwischen pH 9 und pH 10 lag. Der durchschnittliche pH-Wert in der Kultur lag bei pH 9,49 ±0,4. Da pH-Werte über 9 antibakteriell wirken, könnte der hohe pH-Wert des GM dazu beigetragen haben, dass die *Chlorella kessleri*-Kulturen über den gesamten Zeitraum ihrer Kultivierung axenisch blieben (PARHAD & RAO 1972, METCALF 1979, HIRN ET AL. 1980, PEARSON ET AL. 1987 A, B). Das GM hatte keine Pufferkapazität, was für die exakte Bestimmung des pH-Wertes während der IMOLA-Messungen wichtig war.

Die Kultivierung der Algen in den unter 2.1.3 beschriebenen Kulturkolben, die durch die Sterilfilter vor Kontaminationen von außen abgeschottet waren, erwies sich als praktikabel und trug entscheidend zum Erhalt des axenischen Zustandes der Algenkulturen bei.

4.1.1.2 Biologischer Testorganismus

Als Testorganismus wurde *Chlorella kessleri* ausgewählt, da diese Algenart auf Grund ihrer rundlichen Form robust gegenüber den mechanischen Belastungen bei den IMOLA-Messungen war, im axenischen Zustand vorlag und ubiquitär

verbreitet ist. Zudem wurde *Chlorella kessleri* in vielen Untersuchungen eine hohe Sensitivität gegenüber Schadstoffen nachgewiesen (LUKAVSKY 1992, ROJIČKOVÁ-PADRTOVÁ & MARŠÁLEK 1999). Die Sensitivität gegenüber Schadstoffen könnte sich nicht zuletzt aus der geringen Größe (2,5 bis 8,9 μm) dieser Algenart ergeben, da kleine Zellen im Verhältnis zum Volumen eine große Oberfläche besitzen (CAMPBELL 1997, BEGON ET AL. 1998). Schadstoffe hätten somit im Verhältnis zum Zellvolumen eine große Angriffsfläche und könnten leichter in die Zellen gelangen. Nach der Beschreibung von FOTT & NOVAKOVA (1969) besitzen *Chlorella kessleri*-Individuen dünne Zellwände (siehe 2.2.3). Dadurch könnten die Schadstoffe die Zellwand leichter passieren als bei Algenarten mit dickwandigen Zellen. Dünne Zellwände würden eine kurze Ansprechzeit auf Schadstoffe ermöglichen, da die Diffusionswege in die Zelle kurz sind. Diese Vermutung wird durch die in den IMOLA-Messungen beobachteten, schnellen Ansprechzeiten auf alle getesteten Schadstoffe untermauert.

Chlorella kessleri eignet sich für Biomonitoring-Messungen, da sie empfindlich gegenüber unterschiedlichen Wirkstoffgruppen ist. Sie reagiert nicht nur auf Schadstoffe, die den Photosyntheseapparat inhibieren, sondern ist auch sensitiv gegenüber Schwermetallen (ROJIČKOVÁ-PADRTOVÁ & MARŠÁLEK 1999, WIEST ET AL. 2006). Diese inhibieren die Aktivität der alkalischen Phosphatase, wie es bei *Chlorella vulgaris* von DURRIEU & TRAN-MINH (2002) nachgewiesen wurde. Bei den IMOLA-Messungen ergaben sich deutliche Reaktionen auf das Herbizid Metazachlor, das aus der Gruppe der Chloracetamide stammt und die Fettsäure-Elongase in Pflanzenzellen blockiert (BÖGER ET AL. 2000, MATTHES 2000). Ebenso wurde eine Sensitivität der Algen auf das Insektizid Pirimicarb nachgewiesen, das bei Invertebraten die Cholinesterase-Aktivität hemmt (siehe 1). Außerdem wurde *Chlorella kessleri* auch durch das Hormon $17\alpha\text{-EE}$ in ihrem Metabolismus beeinträchtigt. Die große Bandbreite an Schadstoffen, die mit dem IMOLA-Messsystem detektiert werden konnte, ist ein entscheidender Vorteil gegenüber Biosensoren, die auf der Detektion von Schadstoffen durch Enzyme basieren. Bei dieser Art des Biomonitoring ist der Nachweis der toxischen Substanz abhängig vom verwendeten Enzym, da das Schlüssel-Schloss-Prinzip zwischen Enzym und Schadstoff äußerst spezifisch funktioniert und deshalb für beinahe jeden Schadstoff ein spezielles Enzym eingesetzt werden muss

(ANDRES & NARAYANASWAMY 1997, MONTESINOS ET AL. 2001, BUCUR ET AL. 2005, BUCUR ET AL. 2006). Deshalb schlugen CHOUTEAU ET AL. (2004) vor, Mikroorganismen als biologisch aktives System einzusetzen, da lebende Zellen eine große Anzahl an Enzymen bieten. Sie können somit als biologische Multidetektoren fungieren. Zudem sagt die enzymatische Detektierung eines Schadstoffes nur wenig über die tatsächliche biologische Schadwirkung auf den Organismus aus. Ähnliches trifft auch auf Immunosensoren zu (ROGERS 2006).

4.2 Immobilisierung von *Chlorella kessleri*

Die Immobilisierung der Algen ist eine Notwendigkeit bei Biosensorchip-Messungen, die einen Durchfluss im System implementiert haben (PODOLA & MELKONIAN 2005). Die Immobilisierung der Organismen vereinfacht den Umgang mit Flüssigkeiten, da die lebenden Algen in der Messkammer fixiert bleiben und nicht ausgewaschen werden (TRAVIESO ET AL. 1996). Es wurden bereits mehrere Methoden für die Immobilisierung der Algen in Biomonitoring-Systemen entwickelt. SCHUBNELL ET AL. (1999) verwendeten zur Fixierung der Algen eine Polycarbonat-Membran, welche die Messkammer abdeckte und somit ein Auswaschen der Algenzellen aus der Kammer verhinderte. TRAVIESO ET AL. (1996) benutzten Polystyren- und Polyuretanschaum, in welchem die Algen zurückgehalten wurden. Mit der Methode von LUKAVSKY (1986) wurden Algen in Natrium-Alginat immobilisiert, und in einer Studie von LEM & GLICK (1985) wurde die Immobilisierung mittels k-Carragen erreicht. Für das IMOLA-Messsystem wurde der Gedanke von NAESSENS ET AL. (2000) und VÉDRINE ET AL. (2003) aufgegriffen, die Algen in einer porösen Matrix immobilisierten. Allerdings wurde diese Methode, wie unter 2.2.4 beschrieben, modifiziert. FRENSE ET AL. (1998) und AVRAMESCU ET AL. (1999) stellten fest, dass die Immobilisierung von Algen die Sensitivität im Gegensatz zu nicht immobilisierten Algen verringert. Da auf eine Immobilisierung der Algen auf Grund des Durchflusses im IMOLA-Messsystem nicht verzichtet werden konnte, wurde darauf geachtet, eventuelle negative Effekte der Immobilisierung zu minimieren. Nach eingehenden Materialstudien erwies sich das unter 2.2.4 beschriebene Filterpapier in Kombination mit den IMOLA-Messbedingungen als sehr geeignet. Zum einen konnte in der Struktur des Filterpapiers eine große Anzahl von Algenzellen immobilisiert werden, was durch die REM-Aufnahmen und durch die Bestimmung des Chloro-

phyll-a-Gehaltes der mit Algen besetzten Filterpapiere nachgewiesen wurde ($20,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Chlorophyll-a $\cong 2,13 \times 10^7$ immobilisierten Algenzellen). Zum anderen lässt die schnelle Ansprechzeit des IMOLA-Messsystems vermuten, dass die Schad- und Nährstoffe die Filterstruktur leicht durchdrangen und somit schnell zu den Algen gelangten. Da sich der Algenfilter direkt auf den Sensoren befand, ergaben sich kurze Diffusionswege zwischen dem produzierten Sauerstoff und dem amperometrischen Sauerstoffsensor, wodurch die Sensitivität des Messsystems gesteigert wurde. Die Algen mussten in einem weichen Matrixmaterial immobilisiert werden, da die empfindlichen Sensoren sonst mechanisch beschädigt worden wären. Die weiche und flexible Beschaffenheit des verwendeten Filterpapiers erwies sich als ideal, da die Sensoren auch nach vielen Messungen nicht beeinträchtigt wurden. Die entwickelte Immobilisierungsmethode verhinderte das Ausspülen der Algenzellen aus der Messkammer, da sich auch noch nach 13 Stunden (60 Messzyklen) stetig zunehmende Sauerstoffsteigerungswerte bei IMOLA-Messungen mit GM ergaben (siehe 3.3.9). Bei einem ständigen Zellverlust, hervorgerufen durch ein Auswaschen der Algen aus der Messkammer, wäre eine Abnahme der Sauerstoffsteigerungswerte zu erwarten.

4.2.1 Chlorophyll-a-Bestimmung

Es wurde der durchschnittliche Chlorophyll-a-Gehalt von jeweils acht Algenfiltern bestimmt, die mit der Doppelfiltermethode (siehe 2.2.4.1) und mit der Einzelfiltermethode (siehe 2.2.4.2) hergestellt wurden. Damit wurde die Effektivität des Doppelfiltersystems quantifiziert. Der Chlorophyll-a-Gehalt lag bei der Doppelfiltermethode bei $20,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Umgerechnet entspricht das $2,13 \times 10^7$ immobilisierten Algenzellen auf dem Filterpapier. Die Filterpapiere, die mit der Einzelfiltermethode hergestellt wurden, hatten einen durchschnittlichen Chlorophyll-a-Gehalt von $3,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, was $0,4 \times 10^7$ immobilisierten Algenzellen in der Filterstruktur entspricht. Der in der Doppelfiltermethode verwendete zusätzliche Membranfilter steigerte somit die Effizienz der Algenimmobilisierung um den Faktor 5,3. Durch die höhere Algenzellzahl auf dem Filterpapier konnten konstante und deutliche Sauerstoffsteigerungswerte und damit verbunden deutliche pH-Wert-Steigerungen bei den IMOLA-Messungen erreicht werden.

Wie bereits in 2.2.4 und 4.2 erwähnt, basiert die Doppelfiltermethode auf der von VÉDRINE ET AL. (2003) entwickelten Methode, bei der *Chlorella vulgaris* auf einen Quarz-Mikrofaserfilter auffiltrierte wurde. Das Doppelfiltersystem verbesserte den Wirkungsgrad im Vergleich zu der Methode von VÉDRINE ET AL. (2003) um den Faktor 3,6. Auf den Quarz-Mikrofaserfilter konnten im Durchschnitt lediglich 6×10^6 Algenzellen immobilisiert werden, wohingegen es bei der Doppelfiltermethode $2,13 \times 10^7$ Algenzellen waren. VÉDRINE ET AL. (2003) verwendeten in ihrer Studie 20 ml Algenkultur mit einer Zelldichte von 7×10^6 Algenzellen/ml. Insgesamt wurden somit $1,4 \times 10^8$ Algenzellen für die Filtration verwendet. Im Vergleich dazu wurden bei der Doppelfiltermethode mit insgesamt $1,1 \times 10^8$ Algenzellen deutlich weniger Algen bei der Filtration eingesetzt. Folglich wurde bei der Doppelfiltermethode im Vergleich zu der Methode von VÉDRINE ET AL. (2003), mit einer geringeren filtrierte Algenzellzahl eine größere Anzahl an Algen im Filter immobilisiert. Der erhöhte Druck, der für die Filtration auf Grund des zusätzlichen Membranfilters aufgewendet werden musste, und das Material des Filterpapiers könnten dabei Ursache für die gesteigerte Effizienz sein.

4.3 IMOLA-Messungen

Eine der Hauptfragestellungen der vorliegenden Arbeit war, ob sich die IMOLA-Technologie, die ursprünglich für die Applikation im medizinischen Bereich entwickelt wurde, auf die Anwendbarkeit in limnologische Bereiche übertragen lässt (proof of principal). Wie die IMOLA-Messergebnisse zeigen, ist es durch die Entwicklung neuer Methoden und der Auswahl eines geeigneten Testorganismus gelungen, ein hochsensitives Messsystem zu entwickeln, das sich für die Anwendung in Bezug auf limnologische Fragestellungen eignet.

4.3.1 Schadstoffe

4.3.1.1 Reaktion von *Chlorella kessleri* auf die getesteten Schadstoffe

Chlorella kessleri reagierte unterschiedlich auf die getesteten Schadstoffe. Dabei ergaben sich sowohl zwischen, als auch innerhalb der Wirkstoffgruppen Unterschiede. Aus der Gruppe der Photosystem II-Hemmstoffe war z. B. der maximale Rückgang der Sauerstoffsteigerung bei einer Metamitron-Konzentration von 500 µg/l geringer als die maximale Abnahme der Sauerstoffproduktion bei 5

$\mu\text{g/l}$ Diuron. Ähnliches wurde von RIOBOO ET AL. (2002) festgestellt. Die Wachstumsrate von *Chlorella vulgaris* war bei der Behandlung mit den beiden Elektronentransportketten-Inhibitoren Isoproturon und Terbutryn nicht identisch. RIOBOO ET AL. (2002) schlossen daraus, dass der Aufnahmemechanismus der beiden Herbizide in die Zellen und die Wirkungsweise in den Zellen unterschiedlich sein muss. Diese Unterschiede in der Toxizität könnten mit der Fettlöslichkeit der Herbizide zusammenhängen, da fettlösliche Xenobiotika leicht durch die Phospholipid-Struktur der Zellwände diffundieren können (STERLING 1994, TANG ET AL. 1998, RIOBOO ET AL. 2002). Deshalb könnten Schadstoffe, die eine hohe Fettlöslichkeit haben, besser in die Algenzellen gelangen als weniger fettlösliche Substanzen. Ein Maß für die Fett- bzw. Wasserlöslichkeit von Chemikalien ist die Oktanol-Wasser-Verteilungskonstante ($\log K_{OW}$). Je höher der Koeffizient ist, desto lipophiler ist eine Substanz. In der Studie von RIOBOO ET AL. (2002) wirkte das Terbutryn mit einem $\log K_{OW}$ -Wert von 3,65 deutlich toxischer auf *Chlorella vulgaris* als Isoproturon, das einen $\log K_{OW}$ -Wert von 2,5 hat. Der beschriebene Zusammenhang zwischen der Toxizität und dem $\log K_{OW}$ -Wert könnte sich auch in den Ergebnissen der IMOLA-Messungen mit Schadstoffen zeigen. Die Unterschiede in der toxischen Wirkung von Diuron und Metamitron könnte mit der unterschiedlichen Fettlöslichkeit der beiden Substanzen zusammenhängen. Diuron ist mit einem $\log K_{OW}$ -Wert von 2,82 deutlich lipophiler als Metamitron mit einem $\log K_{OW}$ -Wert von 0,83. Diuron konnte deshalb die Zellwände der Algen leichter passieren, wodurch sich die toxische Wirkung erhöhte. Analog gilt dies für die Toxizitätsunterschiede zwischen Isoproturon ($\log K_{OW}$ -Wert = 2,5) und Metamitron ($\log K_{OW}$ -Wert = 0,83). Isoproturon ist weniger lipophil als Diuron. Die Reaktion von *Chlorella kessleri* war bei einer Schadstoffkonzentration von 100 $\mu\text{g/l}$ bei beiden Herbiziden ähnlich. Dieses könnte auf Grund der hohen Schadstoffkonzentration ein Sättigungseffekt sein. Jedoch könnte sich bei den niedrigeren Schadstoffkonzentrationen von 10 $\mu\text{g/l}$ und 5 $\mu\text{g/l}$ die unterschiedliche Fettlöslichkeit der Herbizide bemerkbar gemacht haben. 10 $\mu\text{g/l}$ Diuron verursachte sowohl bei der Sauerstoffmessung als auch bei der pH-Wert-Messung einen stärkeren Rückgang der Steigungswerte als bei 10 $\mu\text{g/l}$ Isoproturon. Der Effekt von 5 $\mu\text{g/l}$ Diuron auf die Sauerstoffproduktion der Algen war höchstsignifikant, wobei 5 $\mu\text{g/l}$ Isoproturon keine signifikante Wirkung auf die Algen hatte. Metazachlor hat einen $\log K_{OW}$ -Wert von 2,13 und ist damit

weniger lipophil als Diuron und Isoproturon, aber deutlich lipophiler als Metamitron. Die beobachteten Toxizitätsunterschiede zwischen Metazachlor und den Herbiziden aus der Gruppe der Photosystem II-Hemmstoffe lassen sich nicht allein aus der unterschiedlichen Fettlöslichkeit erklären. Beispielsweise war bei 10 µg/l Metazachlor der durchschnittliche Rückgang der Sauerstoffsteigerung deutlicher als bei derselben Konzentration von Diuron oder Isoproturon. Andererseits war die Konzentration von 100 µg/l Metazachlor für die Algen nicht so toxisch wie 100 µg/l Diuron, Isoproturon oder Metamitron. Es muss berücksichtigt werden, dass sich Metazachlor, zusätzlich zu der unterschiedlichen Fettlöslichkeit, durch die Wirkungsweise in der Algenzelle von den anderen getesteten Herbiziden unterscheidet. Metazachlor greift nicht direkt am Photosyntheseapparat ein, sondern inhibiert die Funktion der Enzym-Fettsäure-Elongase, wodurch die Bildung von langkettigen Fettsäuren in der Zelle verhindert wird (BÖGER ET AL. 2000, MATTHES 2000). Demnach wird die Sauerstoffproduktion nicht direkt beeinträchtigt, sondern indirekt durch eine Fehlfunktion in der Biosynthese inhibiert. Daraus lässt sich ableiten, dass der Grad der Toxizität des Metazachlors im Verhältnis zu den anderen getesteten Herbiziden nicht nur von der Fettlöslichkeit abhängig war, sondern sich auch aus der unterschiedlichen Wirkungsweise dieses Herbizides ergab.

Pirimicarb gehört zu der Gruppe der Carbamate und ist ein Cholinesterase-Hemmstoff, der bei Insekten die Abbaugeschwindigkeit des Acetylcholins vermindert. Gehemmt wird die Funktion des Cholinesterase-Moleküls. Das Insektizid Pirimicarb hatte bei allen getesteten Konzentrationen einen Einfluss auf den Nichtzielorganismus *Chlorella kessleri*. GUPTA ET AL. (1998) wiesen nach, dass Algen über eine Cholinesterase-Aktivität verfügen. Demnach hemmt Pirimicarb die Cholinesterase-Aktivität in *Chlorella kessleri*, wodurch die Photosyntheseleistung beeinflusst werden könnte. Pirimicarb hat einen logK_{OW}-Wert von 1,7 und ist damit eher hydrophil. Dies bedeutet, ähnlich wie bei Metamitron, dass die Aufnahme des Wirkstoffes in die Zelle erschwert ist. Der niedrige logK_{OW}-Wert und die Tatsache, dass Pirimicarb nicht direkt auf den Photosyntheseapparat wirkt, könnten Gründe dafür sein, dass die toxische Wirkung von Pirimicarb auf die Algen nicht so stark war, wie es bei Diuron oder Isoproturon der Fall war.

Das Hormon 17 α -EE hatte eine starke toxische Wirkung auf *Chlorella kessleri*. 100 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE bewirkten negative Sauerstoffsteigerungswerte, wie es nur bei denselben Konzentrationen von Diuron und Isoproturon zu beobachten war. Ein Grund dafür könnte sein, dass 17 α -EE von allen getesteten Schadstoffen mit 4,15 den höchsten log K_{OW} -Wert hat und deshalb am besten von allen getesteten Substanzen in die Zellen aufgenommen werden kann. Dafür spricht die bei den IMOLA-Messungen festgestellte hohe Toxizität. Allerdings waren die durchschnittlichen Sauerstoffsteigerungswerte bei der Zugabe von 10 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE mit 0,681 ru höher als bei 10 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor (0,353 ru), bei 10 $\mu\text{g/l}$ Diuron (0,426 ru) oder bei 10 $\mu\text{g/l}$ Isoproturon (0,557 ru). Eine Erklärung hierfür könnte im Wirkmechanismus dieses Hormons liegen, der allerdings noch nicht vollständig erforscht ist. In einer Studie von ESCHER ET AL. (2005) über die Wirkungsweise von pharmazeutischen Substanzen auf aquatische Lebewesen, wurde durch einen Chlorophyll-a-Fluoreszenztest festgestellt, dass 17 α -EE nicht direkt auf den Photosyntheseapparat wirkt. Durch einen „Kinspec“-Test, der Substanzen hinsichtlich ihrer nicht spezifischen Toxizität auf Organismen testet, konnte dem Hormon eine unspezifische Wirkungsweise nachgewiesen werden. Der Wirkmechanismus einer unspezifisch wirkenden, toxischen Substanz beruht auf Eigenschaften, wie z. B. H-Donor- oder H-Akzeptor-Interaktionen oder van der Waals-Kräften, wodurch der Wirkstoff an verschiedenen Stellen im Organismus angreifen kann. Der unspezifische Wirkmechanismus des 17 α -EE war möglicherweise der Grund dafür, dass die geringe Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE auf die Algen nicht so toxisch wirkte wie bei den spezifisch wirkenden Herbiziden Metazachlor, Diuron und Isoproturon. Die geringe Menge des Schadstoffes verteilte sich demnach auf verschiedene biologische Prozesse in der Zelle, die dadurch vielleicht nur in geringem Maße beeinträchtigt wurde. Bei der höheren Konzentration von 100 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE könnte ein Sättigungseffekt eingetreten sein. Zahlreiche Prozesse in der Zelle wurden massiv durch die hohe 17 α -EE-Konzentration unspezifisch gestört, was letztendlich zu einer vollständigen Inhibition der Sauerstoffproduktion führte (negative Sauerstoffsteigerungswerte). Das Resultat fiel deshalb ähnlich wie bei den spezifisch wirkenden Photosystem II-Hemmstoffen Diuron und Isoproturon aus.

4.3.1.2 Nachweisgrenze

Für die Effizienz eines Frühwarnsystems ist die Nachweisgrenze der getesteten Schadstoffe von zentraler Wichtigkeit. Deshalb werden im Folgenden die einzelnen Nachweisgrenzen der untersuchten Xenobiotika diskutiert. Die Nachweisgrenze wurde als statistisch signifikanter Unterschied zwischen Exposition I und II definiert.

Sauerstoffsteigerung

5 µg/l Diuron war die niedrigste gemessene Schadstoffkonzentration, die einen statistisch signifikanten Effekt auf die Sauerstoffproduktion der Algen hatte. Bei Isoproturon, Metazachlor und 17α-EE war ein signifikanter Effekt noch bei 10 µg/l des jeweiligen Schadstoffes zu messen. Bei den vier genannten Schadstoffkonzentrationen handelt es sich allerdings nicht um die tatsächliche Nachweisgrenze, sondern um die niedrigste, untersuchte Konzentration, die noch einen signifikanten Unterschied zwischen Exposition I und II verursachte. Bei den Diuron- und 17α-EE-Versuchen wurde jeweils als nächst niedrigere Konzentrationsstufe 1 µg/l des Schadstoffes getestet. Diese Konzentrationsstufe erbrachte bei beiden Schadstoffen keinen signifikanten Effekt. Die tatsächliche Nachweisgrenze liegt demnach für Diuron zwischen 5 µg/l und > 1 µg/l und für 17α-EE zwischen 10 µg/l und > 1 µg/l. Analog gilt dies für Isoproturon. Hier befindet sich die Nachweisgrenze in dem Intervall zwischen 10 µg/l und > 5 µg/l. Für die exakte Bestimmung der Nachweisgrenze wären weitere Messungen nötig gewesen, die aber den zeitlichen Rahmen der Dissertation überschritten hätten. Gleiches gilt für die Messreihen der Schadstoffe Metamitron, Metazachlor und Pirimicarb.

Die Inkubationszeit der jeweiligen Schadstoffe betrug im Versuchsdesign der vorliegenden Dissertation 65 Minuten (5 Messzyklen). Eventuell hätte eine längere Einwirkdauer der Schadstoffe auf die Algen auch bei den Konzentrationen von 1 µg/l Diuron und 17α-EE, bzw. 5 µg/l Isoproturon zu signifikanten Effekten geführt. In weiterführenden Studien wäre dies durch Langzeitmessungen mit Schadstoffen zu überprüfen.

Möglicherweise war die toxische Wirkung der Schadstoffe bei niedrigen Konzentrationen zu gering, um mit drei Replikaten verlässlich von der Statistik erkannt zu werden. Folglich könnte bei diesen Fällen eine Erhöhung der Replikatanzahl zu signifikanten Ergebnissen führen. Allerdings lag im Rahmen der vorliegenden Dissertation der Schwerpunkt darauf, möglichst viele Schadstoffe und Wirkstoffgruppen mit dem IMOLA-Messgerät zu untersuchen, um die Bandbreite der Sensitivität des Messsystems einschätzen zu können. Da nur ein Einzelmessplatz zur Verfügung stand, bedingte dies einen kleineren Stichprobenumfang.

Die Richtlinie der EUROPÄISCHEN UNION (1998) zur Qualität von human genutztem Wasser hat den Grenzwert des Pflanzenschutzmittelgehaltes im Trinkwasser auf 0,1 µg/l für ein einzelnes Pestizid und auf 0,5 µg/l für die Gesamtpestizidbelastung festgesetzt. Die Sensitivität der IMOLA-Messungen reicht momentan für den Nachweis derart niedriger Konzentrationen nicht aus und eignet sich somit noch nicht für die Trinkwasserüberwachung. In Flüssen kann es jedoch zu hohen Gesamtherbizidbelastungen kommen. Beispielsweise detektierten SQUILLACE & THURMAN (1992) im Cedar River in Iowa, USA, eine Gesamtherbizidbelastung von 50 µg/l. Derartige Schadstoffbelastungen liegen im Sensitivitätsbereich des IMOLA-Messsystems. Im Allgemeinen sind aber die Konzentrationen einzelner Herbizide in den Gewässern mit < 0,1 µg/l deutlich niedriger (PODOLA & MELKONIAN 2005). Allerdings gibt es zahlreiche Nachweise für Einzelherbizidbelastungen in deutschen Oberflächengewässern, welche diesen Wert überschreiten. Beispielsweise wurden Maximalwerte von 6,7 µg/l Isoproturon im Pletschbach oder 4,3 µg/l Diuron, 14,5 µg/l Metamitron und 2,3 µg/l Metazachlor in der Nette gemessen (NEUMANN ET AL. 1999). Im Rhein wurden sogar Maximalwerte von bis zu 150 µg/l Metazachlor nachgewiesen (ZULLEI-SEIBERT 1990 ZIT. IN UMWELT BUNDESAMT FÜR MENSCH UND NATUR (HRSG.) 2005). Auch kommunale Abwässer enthalten zum Teil sehr hohe Herbizidkonzentrationen, die meist in saisonal bedingten Schadstoffwellen in die Kläranlagen gelangen. Beispielsweise lag in der Kläranlage des Niers-Einzugsgebietes (NRW, deutsch-niederländische Grenze) im Jahr 2002 der Maximalwert für Isoproturon bei 140 µg/l und für Diuron bei 22 µg/l (MINISTERIUM FÜR UMWELT- UND NATURSCHUTZ, LANDWIRTSCHAFT- UND VERBRAUCHERSCHUTZ NRW

2004). Die Detektierung solcher Maximalwerte wäre mit dem IMOLA-Messgerät möglich.

In landwirtschaftlich stark genutzten Gebieten können sich in den Bächen hohe Maximalwerte von Insektizidkonzentrationen einstellen. In einer Studie von SCHLICHTIG ET AL. (2001) wurde im Riedgraben, dessen Einzugsgebiet landwirtschaftlich geprägt ist, ein Maximalwert von 27,3 µg/l Pirimicarb gemessen. Ob ein Nachweis von Pirimicarb in dieser Größenordnung mittels des IMOLA-Messgerätes möglich ist, muss noch überprüft werden.

Die 17α-EE-Konzentrationen im Oberflächenwasser liegen meist im ng/l Bereich. Beispielsweise stellten HINTEMANN ET AL. (2006) im Rhein eine mittlere Ethinylestradiol-Konzentration von 0,7 ng/l fest. Die Sensitivität des IMOLA-Messgerätes reicht nicht aus, um derart niedrige 17α-EE-Konzentrationen zu detektieren.

Die Detektion von Maximalwerten, die von den normalerweise auftretenden Schadstoffkonzentrationen abweichen, wäre mit dem IMOLA-Messgerät möglich. Dennoch muss die Nachweisgrenze des IMOLA-Messsystems erhöht werden, um das Einsatzgebiet dieser Technologie zu erweitern. Zur Steigerung der Sensitivität und somit der Nachweisgrenze des IMOLA-Messsystems könnte, aus biologischer Sicht, die Verwendung von weiteren Testorganismen dienen, da Schadstoffe auf verschiedene Organismen unterschiedlich wirken (ROJČKOVÁ-PADRTOVÁ & MARŠÁLEK 1999). Die technische Weiterentwicklung des IMOLA-Messsystems könnte ebenfalls zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze von Schadstoffen beitragen.

pH-Wert-Steigung

Die pH-Wert-Änderung in der Messkammer war eine indirekte Folge der Photosyntheseleistung der Algen (siehe 2.2). Deshalb wurde vermutet, dass die Messung der pH-Wert-Steigung nicht so sensitiv ist wie die Messung der Sauerstoffsteigung. Diese Vermutung bestätigte sich in den Versuchen mit Diuron, Metamitron und Metazachlor. Die Nachweisgrenze der pH-Wert-Messungen war bei diesen Schadstoffen niedriger als die Nachweisgrenze der Sauerstoffmessungen. Anders verhielt es sich bei den Versuchen mit Isoproturon. Hier

war die erzielte Nachweisgrenze bei den pH-Wert- und Sauerstoffmessungen vergleichbar.

4.3.1.3 Ansprechzeit

Unter der Ansprechzeit des IMOLA-Messsystems wurde die Zeitdauer verstanden, die benötigt wurde, um eine Veränderung zu detektieren.

ROGERS (2006) bewertete in einem Review über Biosensoren als großen Nachteil gegenüber allen anderen Biosensortypen (z. B. Enzym-Biosensoren) die allgemein lange Ansprechzeit der auf ganzen Zellen basierenden Biosensorsysteme, die teilweise einige Stunden betragen kann. Dieser Nachteil trifft nicht auf das IMOLA-Messsystem zu. Die Ansprechzeit des IMOLA-Messsystems war bei den getesteten Schadstoffen, die einen signifikanten Einfluss auf die Algen hatten, sehr kurz, da in allen Fällen innerhalb eines Messzyklus die getesteten Schadstoffe detektiert werden konnten.

4.3.1.4 Reversibilität der Schadstoffwirkung

Mit Ausnahme von zwei Fällen erholte sich *Chlorella kessleri* in Exposition III bei allen IMOLA-Messungen, in welchen ein Schadstoff einen signifikanten Einfluss auf die Algen hatte, signifikant von der toxischen Wirkung der Schadstoffe. Die Ausnahmen ergaben sich bei der pH-Wert-Messung von 10 µg/l Isoproturon und bei der Sauerstoff-Messung von 100 µg/l Metazachlor. Bei diesen Fällen war der Unterschied zwischen Exposition II und III zwar statistisch nicht signifikant, aber es ist in beiden Fällen anhand der Grafiken eine Zunahme der Steigungswerte zu erkennen. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die Algen sich auch bei diesen beiden Messungen von der Schadstoffwirkung erholten. Auch SCHUBNELL ET AL. (1999) und VÉDRINE ET AL. (2003) beobachteten in ihren Studien mit den Testorganismen *Chlamydomonas reinhardtii* bzw. *Chlorella vulgaris* eine reversible inhibitorische Wirkung der Herbizide Diuron und Isoproturon. Wie bei den IMOLA-Messungen wurde den Algen in diesen Arbeiten nach der Herbizidexposition schadstofffreies Medium zur Verfügung gestellt, woraufhin sich die Algen von der Herbizideinwirkung erholten. In einer Untersuchung von VAN OORSCHOT & VAN LEEUWEIN (1979) war die Reversibilität der Metamitron-Wirkung auf verschiedene Pflanzen unterschiedlich. Nach wenigen Stunden kam es in Zuckerrübenblättern zu einer vollständigen Inaktivierung von

Metamitron. Jedoch war bei Bohnen und Mais die Inaktivierung nicht vollständig bzw. gar nicht vorhanden. Durch die IMOLA-Messungen konnte gezeigt werden, dass *Chlorella kessleri* zu den Organismen gehört, bei welchen die Schadwirkung des Metamitrons reversibel ist. MATTHES (2000) beschrieb die Bindung von Metazachlor an die Fettsäure-Elongase von Lauch und Hefe als irreversible Reaktion. Eine irreversible Inhibition konnte bei den IMOLA-Messungen jedoch nicht beobachtet werden, da die Wirkung von 500 µg/l Metazachlor auf die Sauerstoffproduktion von *Chlorella kessleri* hochsignifikant reversibel war.

4.3.1.5 Resilienz der Algen gegenüber der Schadstoffwirkung

Nach LAKE & BARMUTA (1986) ist die Resilienz ein Maß dafür, wie stark die Fähigkeit einer Lebensgemeinschaft ist, sich von einer Störung zu erholen. In den IMOLA-Messungen wurden die Algen in Exposition II durch die Inkubation mit einem Schadstoff gestört. Von Interesse in Bezug auf die Resilienz war nun, ob die Algen in Exposition III den ursprünglichen (ungestörten) Zustand von Exposition I wieder erlangten.

Die Algen wurden in insgesamt 22 Fällen signifikant von einem Schadstoff beeinträchtigt. Davon unterschieden sich in 18 Fällen die Exposition I nicht von der Exposition III. Das bedeutet, dass sich in 81,8% der Fälle die Werte von Exposition I und Exposition III nicht unterschieden. Somit war ein hohes Maß an Resilienz der Algen gegenüber den toxischen Schadstoffwirkung gegeben, was sich positiv auf die Langlebigkeit des IMOLA-Messsystems auswirkt. Beispielsweise könnte ein schwer zugängliches IMOLA-Messgerät, das in einer Messboje integriert wurde, nach einer einmalig erfolgten Schadstoffeinwirkung ohne Wartungseingriffe für erneute Toxizitätsmessungen weiter verwendet werden. Um eventuelle Effekte, wie z. B. eine Schadstoffresistenz oder Schadstoffsensibilisierung der Algen bei mehrmaliger Inkubation mit Schadstoffen auszuschließen, müssten jedoch weitere Tests durchgeführt werden. Die vier Fälle, in welchen sich Exposition I und III signifikant voneinander unterschieden, waren die Sauerstoffsteigungsmessungen mit 100 µg/l Diuron, 250 µg/l Metamitron, 100 µg/l Metazachlor und 10 µg/l 17α-EE. Bei 10 µg/l 17α-EE waren die Sauerstoffsteigungswerte von Exposition III signifikant höher als die Sauerstoffsteigungswerte von Exposition I. Dagegen scheint in den anderen drei Fällen die

inhibitorische Wirkung nicht vollständig reversibel zu sein, da die Werte von Exposition III signifikant niedriger waren als die Werte von Exposition I. Es wäre möglich, dass das jeweilige Herbizid die Zellen dauerhaft schädigte und deshalb eine 100%ige Vitalität der Zellen nicht mehr erreicht wurde. Dagegen spricht aber, dass zumindest bei den Versuchen mit Metamitron und mit Metazachlor der Unterschied zwischen Exposition I und III bei der höheren Schadstoffkonzentration von 500 µg/l nicht signifikant war. Deshalb wird vermutet, dass dieser Effekt bei einer zeitlichen Verlängerung der Exposition III verschwinden würde.

4.3.1.6 Konzentrationsabhängigkeit der Sauerstoff- und pH-Wert-Steigungen

Eine wichtige Fragestellung war, ob sich die Steigungswerte mit der Konzentration der Schadstoffe verändert. Dadurch würden sich Rückschlüsse auf die Menge eines im Gewässer befindlichen Schadstoffes ziehen lassen. Dieses ist insbesondere bei Frühwarnsystemen von Belang, bei welchen der zu detektierende Schadstoff bekannt ist.

Diuron

Die Korrelation zwischen der Diuron-Konzentration und der relativen Sauerstoffsteigung verlief exponentiell. Gleiches ergab sich bei dem Verlauf der relativen pH-Wert-Steigung in Abhängigkeit von der Diuron-Konzentration. Es wurde ein exponentieller Zusammenhang erwartet, da sich ab einer bestimmten Konzentration ein Sättigungseffekt einstellen sollte. Das bedeutet, dass eine weitere Erhöhung der Konzentration nicht zu einem weiteren Rückgang der Steigungswerte führen würde, da alle Bindungsstellen an der Außenseite der Thylakoidmembranen mit Diuron-Molekülen besetzt sind und dadurch eine vollständige Blockierung der Elektronentransportkette erreicht wird (siehe 1). Bei Diuron-Konzentrationen, die positive Sauerstoffsteigungswerte zuließen, wurden die Bindungsstellen an den Thylakoidmembranen nicht vollständig von Diuron-Molekülen belegt. Dadurch konnte die Photosynthese zumindest teilweise ablaufen.

Isoproturon

Wie beim Diuron ergab sich auch beim Isoproturon der erwartete exponentielle Zusammenhang zwischen der Sauerstoffsteigerung und der Isoproturon-Konzentration. Allerdings war die Korrelation zwischen der pH-Wert-Steigerung und der Isoproturon-Konzentration linear. Da die Trendlinie nur auf drei Datenpunkten basiert, ist es allerdings fraglich, ob sich der lineare Zusammenhang bei einer Erhöhung der Datenpunktanzahl bestätigen würde.

Metamitron

Je niedriger die Metamitron-Konzentration desto größer war der Rückgang der mittleren Sauerstoff- und pH-Wert-Steigerung. Dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da die höchste Metamitron-Konzentration auch die größte toxische Wirkung auf die Algen haben sollte. Im Dialog mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hansjörg Urbach, Fachbereich Chemie, wurden folgende Hypothesen dazu aufgestellt: Das polare Metamitron-Molekül kann eine planare aromatische Betain-Struktur ausbilden. Dadurch könnten sich Molekülaggregate durch elektrostatische Anziehung bilden. Zum anderen können sich über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der NH_2 -Verbindung und dem O-Atom Dimere bilden. Bei niedrigen Metamitron-Konzentrationen liegt die Betain-Struktur in wässrigem Milieu wahrscheinlich solvatisiert vor, so dass eine Aggregatbildung stark eingeschränkt ist. Bei hohen Konzentrationen treffen die Metamitron-Moleküle jedoch häufiger aufeinander als bei niedrigen Konzentrationen, wodurch die Aggregatbildung gesteigert und auch die Dimerbildung begünstigt wird. Die Diffusion der Aggregate und der Dimere durch die hydrophobe Zellwand wäre stark eingeschränkt, was die in den IMOLA-Messungen beobachtete herabgesetzte Toxizität des Metamitrons bei hohen Konzentrationen erklären würde. Eine Aggregat- oder Dimerbildung ist bei allen anderen getesteten Xenobiotika auf Grund ihrer chemischen Struktur nicht möglich. Eine alternative Hypothese wäre, dass bei höheren Konzentrationen des Metamitron-Moleküls in der Zelle ein Transportsystem in der Zellmembran aktiviert wird, das den aktiven Rücktransport des Metamitron-Moleküls aus der Zelle bewirkt, bevor die toxischen Eigenschaften des Metamitrons zum Tragen kommen.

Metazachlor

Sowohl bei der Sauerstoffsteigerung als auch bei der pH-Wert-Steigerung konnte keine eindeutige Korrelation mit der Metazachlor-Konzentration gefunden werden. Vielleicht könnte die Erhöhung der Replikatanzahl zu einem eindeutigen Ergebnis führen.

Pirimicarb

Wie beim Metazachlor konnte den Daten keine Trendlinie zugeordnet werden. Der mittlere Sauerstoffsteigerungswert bei 300 µg/l Pirimicarb fügte sich nicht zum linearen Kurvenverlauf, der sich aus den übrigen drei Sauerstoffsteigerungswerten ergeben hätte. Diese drei Werte für sich gesehen, ergänzen sich gut zu der Annahme, dass die höchste Schadstoffkonzentration den größten Steigungsrückgang hervorruft. Zur Überprüfung müsste das Messergebnis aus dem Versuchen mit 300 µg/l Pirimicarb durch weitere Messungen repliziert werden.

17α-EE

Die Sauerstoffsteigerungswerte folgten dem Konzentrationsgradienten. Die höchste Konzentration von 100 µg/l 17α-EE erzeugte den größten Steigungsrückgang. Aus den aufgetragenen drei Datenpunkten resultierte ein linearer Verlauf der Trendlinie. Es wäre jedoch denkbar, dass sich durch weitere Messungen ein exponentieller Verlauf der Trendlinie ergeben könnte. Ein Indiz dafür könnte der mittlere Steigungswert sein, der bei 10 µg/l 17α-EE gemessen wurde. Er lag unterhalb der linearen Trendlinie. Ein exponentieller Trendlinienverlauf würde sich gut zu dem unter 4.3.1.6 beschriebenen Sättigungseffekt eingliedern.

4.3.1.7 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Reproduzierbarkeit der Messungen ist für die Etablierung eines Messsystems sehr wichtig. Dabei sprechen kleine Standardabweichungen, die sich jeweils aus den Messwerten der drei Replikate errechneten, für eine gute Reproduzierbarkeit der IMOLA-Messungen.

Sauerstoffsteigerung

In Exposition I waren die Messbedingungen optimal, da dem Messsystem ausreichend Zeit gegeben wurde sich einzuschwingen und die Algen mit schadstofffreiem GM optimal versorgt wurden. Diese Bedingungen waren für alle Messungen gleich, so dass die mittlere Standardabweichung aller Schadstoffmessungen für die Exposition I berechnet werden konnte. Daraus ergab sich, dass die Sauerstoffsteigerungswerte aus den drei Replikaten in Exposition I durchschnittlich um 10,6% voneinander abwichen. Beispielsweise entspricht dieses bei einer Sauerstoffsteigerung von 5 ru einer Schwankung der Sauerstoffproduktion von $\pm 3,2$ O₂%/min. Diese geringe Schwankungsbreite spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen.

Bei den Schadstoffversuchen, die im paarweisen Vergleich von Exposition I und II ein signifikantes Ergebnis aufwiesen, ergab sich auch bei 96,5% der Replikate ein durch die toxische Wirkung des Schadstoffes hervorgerufener Rückgang der Sauerstoffsteigerung. Dies bedeutet, dass die Hemmung der Photosyntheserate der Algen durch einen Schadstoff eine hohe Reproduzierbarkeit aufwies. Jedoch unterlag die Intensität der Inhibition einer größeren Schwankungsbreite. Dieses lässt sich, im Verhältnis zur Exposition I, an den relativ großen Standardabweichungen in Exposition II erkennen, wie es z. B. im Versuch mit 100 µg/l Diuron der Fall war. Durch die Zugabe eines Schadstoffes in Exposition II wurde das System gestört, da die Algen massiv in ihrem Metabolismus beeinträchtigt wurden. Diese Störung könnte durch verschiedene Faktoren beeinflusst worden sein, wodurch sich die Abweichungen zwischen den drei Replikaten vergrößern würden. Denkbar wären unterschiedliche Diffusionsverhältnisse oder Abbauprozesse des Schadstoffes in der Algenzelle, die sich auf dessen Toxizität auswirken könnten. MOSTAFA & HELLING (2001) stellten fest, dass *Chlorella kessleri* Isoproturon metabolisieren kann. Derartige Prozesse sind abhängig von der Verfügbarkeit von Enzymen oder von Redoxpartnern. Die Verfügbarkeit dieser Substanzen könnte im unterschiedlichen Maße die Verstoffwechslung eines Schadstoffes beeinträchtigen und zu den beobachteten Abweichungen bei den Messwiederholungen beitragen.

In Exposition III waren die Standardabweichungen in den meisten Fällen größer als in Exposition I, wie es z. B. im Versuch mit 100 µg/l Diuron zu beobachten

war. Die Algen erholten sich in dieser Phase des Versuches von der toxischen Wirkung der Xenobiotika. Auch hier könnte, wie in Exposition II, die Verfügbarkeit von Enzymen und unterschiedliche Diffusionsbedingungen zu einer Erhöhung der Standardabweichung geführt haben. Zudem könnten unterschiedliche ATP- und NADPH-Reserven (ATP = Adenosinriphosphat; NADPH = Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat) in den Zellen zu einem schnelleren bzw. langsameren Anspringen des Metabolismus nach der Schadstoffeinwirkung geführt haben. Daraus könnte die beobachtete Abweichung in der Erholungsphase zwischen den jeweils drei Replikaten resultieren.

Die Biosensorchips unterlagen einem Alterungsprozess. Bei neuen Chips entsprach eine Sauerstoffsättigung des Mediums von 100% etwa -0,5 mV (siehe 2.2.5.1). Mit zunehmender Gebrauchszeit ging dieser Wert gegen null, da der Sauerstoffsensor elektrokorrodierte (BRISCHWEIN ET AL. 2003). Dieser Effekt könnte sich, je nach Alter und Zustand des für die jeweilige IMOLA-Messung verwendeten Biosensorchips, auf die beobachteten Abweichungen zwischen den Replikaten ausgewirkt haben. Es wäre deshalb sinnvoll für jede Messung, stets einen neuen, unverbrauchten Biosensorchip zu verwenden. Darauf wurde allerdings verzichtet, da der Stückpreis der verwendeten Silizium-Biosensorchips bei 150 EUR lag. Mittlerweile gibt es eine kostengünstigere Biosensorchip-Generation, die mittels eines Dünnschichtverfahrens auf Keramikbasis gefertigt wird (WIEST ET AL. 2006). Diese Chips sollen nach Auskunft des Entwicklers nur noch etwa ein Zehntel des bisherigen Stückpreises kosten. Auf Grund der kostengünstigeren Keramik-Chips wäre es denkbar, für jede Messung einen neuen Chip zu verwenden.

pH-Wert-Steigung

Die Standardabweichungen der gemittelten pH-Wert-Steigungen waren meistens größer als die Standardabweichungen, die sich bei den mittleren Sauerstoffsteigungen ergaben. Da sich auf dem Biosensor vier pH-Wert-Sensoren (4 ISFETs) befanden, ging der pH-Wert jedes Replikats als Mittelwert aus diesen vier Messungen hervor. Die Schwankungen zwischen diesen vier pH-Wert-Messungen gingen in die Berechnung des in den Grafiken dargestellten middle-

ren pH-Wertes ein. Dadurch könnte sich die Standardabweichung insgesamt erhöht haben.

4.3.2 Hell-Dunkel-Reaktion

Der Versuch zur Hell-Dunkel-Reaktion wurde durchgeführt, um die Photosyntheseaktivität von *Chlorella kessleri* zu evaluieren (NAESSENS & TRAN-MINH 1998). Damit konnte festgestellt werden, dass die Sauerstoffzunahme bei eingeschalteter Beleuchtung eine direkte Folge der Photosyntheseleistung der Algen war (SHITANDA ET AL. 2005).

Während der Dunkelphase nahm der Sauerstoffgehalt im GM ab. Diese Abnahme war der Zellatmung der Algen zuzuschreiben und erfolgte sofort nachdem die Lichtquelle ausgeschaltet wurde. Die Steigungswerte waren sowohl bei der Sauerstoffmessung als auch bei der pH-Wert-Messung negativ. Das bedeutet, dass während der Dunkelphase weder die Sauerstoff produzierende Lichtreaktion noch die CO₂ verbrauchende Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus) in den Algenzellen ablaufen konnten. Die Zellatmung der Algen entzog dem GM Sauerstoff und gab CO₂ in das GM ab. Wie unter 2.2 beschrieben, hatte dies eine Erniedrigung des pH-Wertes zur Folge. Negative Sauerstoffsteigungen wurden auch bei den Versuchen mit 100 µg/l Diuron und 100 µg/l Isoproturon gemessen. Allerdings kam es bei diesen Messungen nicht zu negativen pH-Wert-Steigungen. Das bedeutet, dass die Algen bei Lichteinwirkung trotz blockierter Photosynthese einen weiteren Mechanismus haben müssen, um Energie (ATP) für den CO₂ verbrauchenden Calvin-Zyklus zu gewinnen (SCHUBNELL ET AL. 1999). Diuron und Isoproturon sind Photosystem II-Inhibitoren und blockieren die Elektronentransportkette zwischen Photosystem II und I. (siehe 1). Deshalb war die ATP-Gewinnung aus der nicht-zyklischen Photophosphorylierung der Elektronentransportkette nicht möglich (CAMPBELL 1997). Die benötigte Energie könnte jedoch aus dem zyklischen Elektronentransport stammen, an dem nur das Photosystem I beteiligt ist (YU ET AL. 1993). Bei dieser zyklischen Photophosphorylierung wird Energie in Form von ATP produziert (CAMPBELL 1997). Es entstehen aber weder Sauerstoff noch NADPH. Da im Calvin-Zyklus mehr ATP als NADPH verbraucht wird, ist ATP der limitierende Faktor der Dunkelreaktion. Die Verfügbarkeit von ATP bedingt somit, wie viel CO₂ dem Wasser

für die Kohlenstoff-Fixierung im Calvin-Zyklus entzogen wird. Es wäre deshalb möglich, dass in den Versuchen mit 100 µg/l Diuron und 100 µg/l Isoproturon der Calvin-Zyklus, mit dem in der zyklischen Photophosphorylierung gebildeten ATP, ablaufen konnte. Dadurch wurde dem GM CO₂ entzogen. Dieser Prozess wirkte einer pH-Wert-Erniedrigung entgegen, die durch die CO₂-Ausscheidung der Zellatmung hervorgerufen wurde. Dies könnte bewirkt haben, dass die pH-Wert-Steigungen zwar zurückgingen, aber nicht negativ wurden. In der Dunkelphase des Versuches zur Hell-Dunkel-Reaktion wurde dem GM kein CO₂ entzogen, da wegen des fehlenden Lichts weder die nicht-zyklische noch die zyklische Photophosphorylierung zur Gewinnung des im Calvin-Zyklus benötigten ATP ablaufen konnte. Somit wurde in das GM das CO₂ der Zellatmung abgegeben, ohne dass CO₂ von den Zellen zur Kohlenstoff-Fixierung aufgenommen wurde. Daraus resultierten negative pH-Wert-Steigungen.

4.3.3 Langzeitmessungen mit verschiedenen Phosphor-Konzentrationen

Mit dem verwendeten Versuchsaufbau wurden zwei Fragestellungen untersucht. Zum einen wurde getestet, ob mit dem IMOLA-Messsystem Langzeitmessungen möglich sind. Zum anderen wurde die Reaktion von *Chlorella kessleri* auf verschiedene Nährstoffkonzentrationen untersucht. Um dieses zu testen, wurde der Nährstoff Phosphor ausgewählt, da er in Süßgewässern als limitierender Nährstofffaktor für Algen gilt (ODUM 1999).

4.3.3.1 Langzeitmessungen

Das BBCM-Messsystem eignete sich sehr gut für Langzeitmessungen. Es konnte gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von 13 Stunden (60 Messzyklen) die Messungen einwandfrei funktionierten. Während der gesamten Messdauer traten keine technisch bedingten Störungen auf. Ebenso waren Eingriffe von außen, wie z. B. das Entfernen von Luftblasen auf dem Biosensorchip, nicht nötig. Die Filterpapiere waren am Ende der Messzeit deutlich grün gefärbt und somit ausreichend mit Algen besetzt. Die Sauerstoffsteigungen waren bei optimalen Bedingungen mit GM (2785 µg/L Phosphor) sehr hoch, was für eine gute Vitalität der Algen trotz der langen Messdauer spricht. Die pH-Wert-Messungen zeigten zum Teil größere Schwankungen oder sprunghafte

Veränderungen. Diese waren aber nicht durch die lange Messdauer bedingt, da derartige Ereignisse schon zu Beginn der Messungen auftraten wie es z. B. im Versuch mit 10 µg/l Phosphor der Fall war.

4.3.3.2 Phosphor-Gradient

Sauerstoffsteigung

Unter Laborbedingungen war es möglich, mit dem IMOLA-Messsystem die getesteten Phosphor-Konzentrationen anhand der Sauerstoffsteigungen zu unterscheiden.

Die organischen Phosphor-Verbindungen nehmen in Form der energiereichen Phosphate, z. B. ATP, eine wichtige Stellung im Energiehaushalt der Pflanzen ein (NULTSCH 1996). Außerdem ist Phosphor ein Bestandteil der Nucleotide bzw. der Nucleinsäuren. Demnach spielt die Verfügbarkeit von Phosphor für Algen eine wichtige Rolle. EL-SHEEK & RADY (1995) fanden heraus, dass eine Verringerung der Sauerstoffproduktion bei *Chlorella kessleri* ein Hauptkennzeichen von Phosphor-Mangel ist. Dieses Ergebnis konnte mittels der IMOLA-Messungen bestätigt werden. Die Sauerstoffsteigungswerte wurden mit abnehmender Phosphor-Konzentration geringer und unterschieden sich jeweils höchstsignifikant voneinander. Im Versuch mit 0 µg/l Phosphor stand den Algen kein Phosphor aus dem Nährmedium zur Verfügung. Dennoch wurde eine durchschnittliche Sauerstoffsteigung von 4,76 erreicht. Da den Algen bei der Kultivierung ausreichend Phosphor zur Verfügung stand, konnten sie Phosphor in Form von Polyphosphaten speichern (KULAEV & VEGABOV 1983, EIXLER ET AL. 2006). Bei Phosphat-Mangel greifen die Zellen auf diese Phosphat-Reserven zurück, um ihren Metabolismus aufrecht zu halten. Dies erklärt, weshalb *Chlorella kessleri* in den IMOLA-Messungen, trotz des Phosphor freien GM, Sauerstoff produzieren konnte.

Die Phosphor-Konzentrationen 0 µg/l (< Nachweisgrenze), 10 µg/l und 50 µg/l entsprechen Phosphor-Konzentrationen, wie sie in natürlichen Gewässern auftreten. Somit zeigen die Ergebnisse, dass das IMOLA-Messsystem das Potenzial zur Überwachung von Nährstoffeinträgen in Gewässern haben könnte.

pH-Wert-Steigung

Die mittleren pH-Wert-Steigungen, die bei den Phosphor-Konzentrationen von 0 µg/l, 10 µg/l und 50 µg/l gemessen wurden, unterschieden sich jeweils höchstsignifikant voneinander. Die pH-Wert-Steigungen nahmen mit der Erhöhung der Phosphor-Konzentration zu. Als Ursache für diese Ergebnisse werden analog die unter 4.3.3.2 bei der Diskussion der Sauerstoffsteigungswerte aufgeführten Gründe gesehen. Allerdings differierte die Reaktion der Algen auf 0 µg/l Phosphor und auf 2785 µg/l Phosphor nicht. Da sich aber die Sauerstoffsteigungen dieser beiden Versuche höchstsignifikant voneinander unterschieden, wird die Richtigkeit der pH-Wert-Messung des Versuches mit 2785 µg/l angezweifelt. In diesem Versuch funktionierte bei zwei der drei Replikate nur einer der vier ISFETs. Dieses weist auf einen fortgeschrittenen Alterungsprozess der verwendeten Biosensorchips hin, der sich auf die Sensitivität der Sensoren auswirkte.

4.3.4 Referenz-Messungen

Mit den Referenz-Messungen wurde sichergestellt, dass die gemessenen Steigungsveränderungen die Folge einer Schadstoffeinwirkung bzw. die Folge einer unterschiedlichen Verfügbarkeit von Phosphor waren und nicht durch andere Faktoren hervorgerufen wurden. Die in Ethanol gelösten Schadstoffe hatten, bis auf die Beeinträchtigung der ISFETs durch 1000 µg/l Pirimicarb, keinen Einfluss auf die Sensoren. In den Versuchen mit Pirimicarb wurden jedoch keine pH-Werte gemessen, so dass die Beeinflussung der pH-Wert-Messung durch 1000 µg/l Pirimicarb die erzielten Ergebnisse nicht tangierte. Ebenfalls hatten der im GM gelöste Phosphor und das Filterpapier ohne Algen keinen Effekt auf die Sensoren. Zudem wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die Algen untersucht, da auch Lösungsmittel einen negativen Effekt auf die Algen haben können (STRATTON & SMITH 1988) (siehe 2.2.5.3). Dazu wurde *Chlorella kessleri* in IMOLA-Messungen repräsentativen Lösungsmittelkonzentrationen ausgesetzt, die bei den Messungen der Schadstoffkonzentrationen von 500 µg/l, 100 µg/l und 10 µg/l verwendet wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass der vorgegebene, maximale Lösungsmittelanteil für Biomonitoring-Testverfahren von 0,05% bei den IMOLA-Messungen nicht überschritten wurde (JAY 1996). Die getesteten Lösungsmittelkonzentrationen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Algen.

4.3.5 Vergleich zweier Seen mittels IMOLA-Messungen

Im Vordergrund dieser Versuche stand die Fragestellung, ob mit dem IMOLA-Messsystem Seen verschiedenen Trophiegrades unterschieden werden können.

4.3.5.1 Wasserchemische Analysen

Die untersuchten Gewässer waren der eutrophe Waschsee und der oligotrophe Lustsee. Das Probenwasser für die IMOLA-Messungen wurde zur genauen Charakterisierung wasserchemisch analysiert. Unter anderem wurde dabei die exakte Phosphor-Konzentration der Proben bestimmt. Beide Seen wiesen eine, für die Region typische, hohe Gesamtwasserhärte auf. Der Lustsee hatte im Jahresmittel mit 13,5 °dH eine geringere Wasserhärte als der Waschsee mit durchschnittlich 17,2 °dH. Ursache dafür ist, dass der Lustsee als einziger See der Seenkette mit dem Grundwasser aus dem angrenzenden Eberfinger Drumlinfeld versorgt wird. Dieses Grundwasser hat keine Verbindung zu dem anthropogen belasteten südlichen Grundwasserzug (WASMUND 1934, TROMBALLA 1998). Diese Situation trägt gleichzeitig zu den oligotrophen Nährstoffverhältnissen im Lustsee bei. Der durchschnittliche Gesamtphosphor-Gehalt des Lustsees von 4 µg/l in Verbindung mit einer mittleren Nitrat-Konzentration von 1 mg/l unterstreicht den natürlichen Zustand des voralpinen Sees, der daher einen idealen Referenzzustand vorgibt (MELZER 1988, DOKULIL ET AL. 2001). Der Waschsee zeichnete sich dagegen, auf Grund des anthropogenen Einflusses, durch einen hohen Nährstoffgehalt aus. Der gemessene durchschnittliche Phosphor-Gehalt von 54,0 µg/l kennzeichnete den eutrophen Charakter des Sees.

4.3.5.2 IMOLA-Messungen mit Waschsee- und Lustsee-Probenwasser

In einem Wilcoxon-Test wurde jeder IMOLA-Messwert eines Sees mit dem dazu gehörigen IMOLA-Messwert des anderen Sees verglichen. Das Ergebnis war hochsignifikant. In 62,5% der Fälle war die Sauerstoffproduktion der Algen in Verbindung mit Lustsee-Probenwasser höher als in Verbindung mit Waschsee-Probenwasser. Jedoch unterschieden sich die Sauerstoffsteigungen der beiden Seen im Jahresmittel nicht voneinander. Deshalb könnte anhand eines Einzel-Steigungswertes keine Aussage darüber getroffen werden, um welchen

See es sich handelte. Die Größe der Sauerstoffsteigerungswerte war damit unabhängig von der Phosphor-Konzentration. Dieses Ergebnis widersprach den Ergebnissen, die in den IMOLA-Messungen mit verschiedenen Phosphor-Konzentrationen auf GM-Basis erzielt wurden (siehe 3.3.9 und 4.3.3.2). Diese Diskrepanz könnte verschiedene Ursachen haben:

- Bei den IMOLA-Messungen mit Waschsee- und Lustsee-Probenwasser handelt es sich um exemplarische Messungen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind deshalb mit Vorbehalt zu betrachten, da zur Absicherung der Ergebnisse weitere Messwiederholungen durchgeführt werden müssten.
- Bei den IMOLA-Messungen mit Freilandprobenwasser stellte sich heraus, dass die Lebensdauer der Biosensorchips stark verringert wurde. Anscheinend befanden sich im Seewasser Substanzen, die den Sauerstoffsensoren zerstörten. Nach einer Messdauer von ca. drei Stunden gingen die Sauerstoffwerte gegen den Messwert null, obwohl die tatsächliche Sauerstoffsättigung des Seewassers bei einer normalen Luftsauerstoffsättigung von ca. 100% lag. Dieser Effekt wurde als eine elektrochemische Abscheidung von Substanzen an den Elektroden des Biosensors verstanden. Daraufhin wurden verschiedene Tests zur Fehlersuche durchgeführt. Beispielsweise konnte durch das Anlegen einer Reinigungsspannung an die Arbeitselektrode des Sauerstoffsensors kurzzeitig die Funktion des Sensors wiederhergestellt werden. Zudem brachten IMOLA-Messungen mit autoklaviertem Seewasser deutlich bessere Ergebnisse als mit unbehandeltem Seewasser. Trotz einer aufwändigen Fehlersuche konnte die Ursache für den beobachteten Effekt in den Versuchen Freilandwasser nicht gefunden werden. Es müssen deshalb in Zukunft technische Verbesserungen vorgenommen werden, damit mittels der IMOLA-Technologie nicht nur ausgewählte standardisierte Nährmedien sondern auch unterschiedliche Probenwässer aus dem Freiland untersucht werden können.
- Außer dem Phosphor-Gehalt im Wasser spielen eine Vielzahl weiterer Faktoren eine wichtige Rolle für aquatische Mikroorganismen. Die Komplexität der Seewassermatrix mit ihren verschiedenen Nährstoffzusammensetzungen kann mit dem künstlich hergestellten GM nur schwer verglichen werden. Dies könnte ein Grund für die unterschiedlichen Messergebnisse

zwischen den Phosphor-Gradientenmessungen auf GM-Basis und den Versuchen mit Waschsee- und Lustsee-Probenwasser sein.

4.4 AFLP

Mittels der AFLP-Analyse wurde untersucht, ob sich über einen Zeitraum von 15 Monaten hinweg der für die IMOLA-Messungen verwendete Testorganismus *Chlorella kessleri* genetisch veränderte (siehe 2.3.2 und 3.4.2). Zudem wurde getestet, wie gut sich die AFLP-Methode zur Detektierung von Subkulturen in einer ursprünglich monoklonalen *Chlorella kessleri*-Kultur eignete (siehe 2.3.3 und 3.4.3). Dazu wurde eine *Chlorella kessleri*-Kultur mit einer *Desmodesmus subspicatus*-Kultur in verschiedenen Verhältnissen gemischt („Desmochlor“). Wichtig dabei war, ab welchem Mischungsverhältnis eine klare Trennung in der AFLP-Analyse zwischen einer *Chlorella kessleri*-Kultur und einer Desmochlor-Kultur auftrat.

4.4.1 Vorversuch

In einem Vorversuch wurde überprüft, ob die von MANNSCHECK (2003) für Characeen optimierte Methode (siehe 2.3.1) zu verlässlichen Ergebnissen bei Untersuchungen mit *Chlorella kessleri* führt. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Methode auch auf die genetische Untersuchung von *Chlorella kessleri* anwenden lässt. Alle fünf getesteten *Chlorella kessleri*-Kulturen trennten sich deutlich von der Kieselalge *Navicula pelliculosa* ab und clusterten in einer Grünalgengruppe zusammen (Abbildung 3.65). Die Proben *Chlorella* 1 a GM und 1 b GM sowie 3 a NLL und 3 b NLL, die jeweils aus demselben Kulturkolben der *Chlorella* 1 GM bzw. *Chlorella* 3 NLL entnommen wurden, gruppieren sich mit den hohen Bootstrap-Werten von 100% bzw. 99% zusammen. *Chlorella* 4 NLL und *Chlorella* 5 GM clusterten mit kurzen Ästen zueinander. Der Grund dafür könnte sein, dass die beiden Kulturen Ableger derselben *Chlorella kessleri*-Stammkultur waren. Die Tatsache, dass die beiden Kulturen in unterschiedlichem Medium (NLL bzw. GM) kultiviert wurden, dokumentiert, dass die Kulturmedien keinen Einfluss auf die Mutationsrate hatten.

Eine Sonderstellung nahm die Probe *Chlorella* 2 GM ein. Sie spaltete sich deutlich von den anderen *Chlorella*-Kulturen ab, obwohl sich ihre Peak-Anzahl nicht von diesen unterschied. Da aber alle anderen *Chlorella*-Kulturen sehr eng mit-

einander gruppiert waren, wäre es möglich, dass bereits geringe Änderungen in der Lage der Loci zu der beobachteten Abgrenzung führten.

4.4.2 AFLP-Analyse zur Monoklonalität der *Chlorella kessleri*-Kulturen

Mit den erzielten Ergebnissen konnte nicht hinreichend geklärt werden, ob sich die *Chlorella kessleri*-Kulturen innerhalb von 15 Monaten genetisch verändert haben. Innerhalb der Grünalgengruppierung setzten sich die *Chlorella*-Kulturen deutlich von den *Desmodesmus*-Kulturen ab. Allerdings gab es keine Sortierung innerhalb der *Chlorella*-Kulturen, da sie weder nach Kultur noch nach Alter der Kultur oder Art des Kulturmediums zusammenclusterten. Daraus ließe sich auf eine hohe genetische Ähnlichkeit der untersuchten *Chlorella*-Kulturen schließen. Für diese Theorie spricht, dass alle untersuchten *Chlorella*-Kulturen aus demselben Stamm (SAG-Stamm 211-11h) gezogen wurden. Auch die niedrigen Bootstrap-Werte weisen auf eine große Ähnlichkeit der Kulturen hin. Eine genaue Aussage über die Ähnlichkeit der Kulturen könnte aber nur gemacht werden, wenn zum Vergleich verschiedene *Chlorella kessleri*-Stämme in die Analyse aufgenommen würden.

Die DNA-Proben der jeweiligen Kultur aller Probenahmetage ließen sich nicht zu einer Gruppe zusammenfassen. Eine mögliche Ursache dafür könnte der Alterungsprozess der Proben sein, die eine unterschiedlich lange Lagerungsdauer im Kühlschrank hatten. Dafür spricht, dass die älteste DNA-Probe von *Chlorella* 1 GM vom 15.02.2005 mit einem Bootstrap-Wert von 69% knapp unterhalb der akzeptablen Grenze von 70% lag (siehe 2.3.5.2). Eine weitere Fehlerquelle wäre eine unterschiedliche Konsistenz des für die Gelelektrophorese verwendeten Gels. Diese ist ausschlaggebend für die Laufgeschwindigkeit der DNA-Banden und kann somit das Ergebnis beeinflussen.

4.4.3 Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA

Wie aus Abbildung 3.67 erkenntlich wurde, führte ein Vermischungsgrad von 50/50 (*Chlorella* 5/*Desmodesmus*) zu einer eindeutigen Abgrenzung von den anderen Desmochlor-Vermischungsstufen sowie von der monoklonalen *Chlorella* 5-Kultur. Dennoch ist es möglich, dass eine eindeutige Abtrennung bereits

bei einer niedrigeren Desmochlor-Vermischungsstufe zwischen < 20:80 und > 50:50 eintritt.

In der Abbildung 3.68 ist die Ähnlichkeit von fünf *Chlorella*-Proben zu den Desmochlor-Vermischungsstufen in einer MDS-Analyse räumlich dargestellt. Die Desmochlor 50:50-Proben setzten sich deutlich von den *Chlorella*-Proben (inklusive *Chlorella* 5) und allen übrigen Desmochlor-Mischungsgraden ab. Allerdings lagen die Desmochlor 50:50-Proben nicht äquidistant zu den *Chlorella*- und *Desmodesmus*-Proben entfernt. Bis zu einem Desmochlor-Mischungsgrad von 20:80 trat keine eindeutige Abtrennung zu den *Chlorella*-Proben auf. Dieses Ergebnis könnte durch den Aufbau der AFLP-Methode beeinträchtigt worden sein. Auf Grund der höheren Ausgangskonzentration der *Chlorella kessleri*-DNA in den Desmochlor-Mischungsgraden 20:80, 10:90 und 5:95 wurde diese in der PCR (Polymerase Chain Reaction) exponentiell häufiger vervielfältigt als die *Desmodesmus*-DNA. In der Analyse der Elektropherogramme spielt die Höhe der Peaks, die durch die verwendete DNA-Menge beeinflusst wird, eine entscheidende Rolle (siehe 2.3.5.1). Dabei wurden kleine Peaks, die für *Desmodesmus* auf Grund der geringen DNA-Menge charakteristisch wären, nicht in die Analyse aufgenommen. Erst ab dem Desmochlor-Mischungsgrad von 50:50 waren die Peaks groß genug, um in der Auswertung berücksichtigt zu werden. Dies führte zu einer eindeutigen Abtrennung der Desmochlor 50:50-Proben von den übrigen Proben. Folglich eignete sich die optimierte AFLP-Methode nach MANNSCHRECK (2003) nur unbefriedigend für den Nachweis von artfremden *Desmodesmus subspicatus*-Subkulturen in einer *Chlorella kessleri*-Kultur. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass mit dieser Methode die grundsätzlich artgleiche DNA von mutierten *Chlorella kessleri*-Klon-Subkulturen in einer *Chlorella kessleri*-Stammkultur nachgewiesen werden kann. Die Validität der verwendeten Methode könnte für diesen Zweck jedoch durch eine Modifizierung der Datenauswertung gesteigert werden. Die Aufnahmegrenze, durch die festgelegt ist, welche Fragmente auf Grund ihrer zu geringen Peak-Höhe nicht ausgewertet werden, müsste herabgesetzt werden. Dadurch würden die niedrigen Peaks von *Desmodesmus*, die wegen der geringen DNA-Menge in den Desmochlor-Mischungsgraden 20:80, 10:90 und 5:95 hervorgerufen wurden, mit in die Analyse eingehen.

4.4.4 Polymorphiegrad

Der Datensatz aus dem Versuch zur Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA wurde zusätzlich auf Fragmentebene bzw. hinsichtlich der individuellen Peak-Höhe untersucht. Die Ergebnisse in Tabelle 3.11 zeigen, dass die Loci 543, 620 und 749 die Grünalgen von der Kieselalge *Navicula pelliculosa* abtrennten. Zudem gab es innerhalb der *Chlorella*-Kulturen zwölf monomorphe Loci, von welchen vier (Loci 046, 435, 465 und 810) sowohl für *Chlorella* als auch für Desmochlor monomorph waren. Innerhalb der *Desmodesmus*-Proben traten diese Loci allerdings nicht auf. Mit Ausnahme von Locus 435 waren die übrigen drei Loci (046, 465 und 810) in einer bis drei Proben ebenfalls bei *Navicula* vorhanden. Somit bestätigte sich in Relation zu den untersuchten Algenarten der Locus 435 als unique für *Chlorella kessleri*. Innerhalb der Gruppe der Grünalgen könnte man die Loci 046, 435, 465 und 810 als unique verstehen, da diese nicht bei *Desmodesmus subspicatus* vorkamen.

Innerhalb der *Chlorella*-Proben gab es drei monomorphe Loci (550, 604 und 622), die aber jeweils bei einer Probe fehlten. Die Loci 550 und 604 fehlten bei der *Chlorella* 3 NLL Probe vom 05.05.2006. Der Grund dafür lag in einer Verschiebung des Rasters um ein Segment. Die fehlenden Loci waren an den Stellen 549 und 603 zu finden. Bei der *Chlorella* 2-Probe 15.02.2005 fehlte der Locus 622. Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, dass es sich um eine Rasterverschiebung bei der Auslesung der Daten handelte.

Die drei monomorphen Loci 550, 604 und 622 traten bei den *Desmodesmus*-Proben nicht auf. Allerdings waren sie bei den Desmochlor-Proben monomorph. Das bedeutet, dass es sich um Loci handelt, die unter den untersuchten Arten nur bei *Chlorella kessleri* vorkamen.

Die *Desmodesmus*-Proben waren mit 66 monomorphen Loci vertreten. Von diesen 66 Loci waren 16 unique Loci, die ausschließlich bei den *Desmodesmus*-Proben zu finden waren. Es gab drei monomorphe *Desmodesmus*-Loci (348, 627 und 729), die bis auf einzelne Proben auch bei Desmochlor auftraten. In einer der beiden Desmochlor 50:50-Proben kam der Locus 348 nicht vor. Es konnte aber gezeigt werden, dass es sich um eine Verschiebung des Peaks in das nächste Nachbarsegment handelte. Der Locus 627 war bei den Desmo-

chlor 5:95-Proben nicht zu finden. In diesem Fall wurden, auf Grund der hohen *Chlorella*-Peaks, die deutlich kleineren *Desmodesmus*-Peaks nicht in die Auswertung aufgenommen. Dasselbe Problem ergab sich für den Locus 729, der nicht in den Desmochlor 5:95-Proben vorkam und nur in einer der Desmochlor 10:90-Proben vorhanden war.

Anhand des Dendrogramms aus Abbildung 3.67 kann die Vermischung einer *Chlorella kessleri*-Kultur mit *Desmodesmus subspicatus*-Individuen nur unbefriedigend festgestellt werden (siehe 4.4.3). Durch die individuelle Auswertung der Peaks konnten für *Desmodesmus subspicatus* artspezifische Loci bestimmt werden. Von diesen Loci war zumindest einer in allen Desmochlor-Proben enthalten. Es handelte sich dabei um den Locus 348. Es wäre möglich, das DNA-Segment dieses Locus zu sequenzieren, um einen passenden Primer für diesen DNA-Abschnitt herzustellen. Eine, mit diesem Primer versehene, PCR-Analyse könnte nachweisen, ob eine *Chlorella kessleri*-Kultur *Desmodesmus subspicatus*-Individuen enthält.

Im Zusammenhang mit dem IMOLA-Messsystem lag der Schwerpunkt jedoch auf der Kontrolle der *Chlorella kessleri*-Kulturen hinsichtlich mutierter Klone, die zwar artgleich sind, aber genetisch veränderte Subkulturen bilden könnten. Wie bereits in 4.4.2 und 4.4.3 erläutert wurde, eignet sich die AFLP-Methode nicht für diesen Nachweis. Es ist jedoch fraglich, ob sich mutierte Subkulturen in ihrem Genom derart vom Genom des ursprünglichen *Chlorella kessleri*-Stamms 211-11h unterscheiden, so dass diese genetische Abweichung eine Auswirkung auf die gemessene Sauerstoffproduktion der Algen hat.

Der Polymorphiegrad war mit 63,7% bei den *Desmodesmus*-Proben sehr niedrig. Diese Tatsache spricht für eine hohe Homologie innerhalb der Kulturen. Das Ergebnis korrelierte gut mit den Dendrogrammen (Abbildung 3.66 und Abbildung 3.67), da die *Desmodesmus*-Proben immer mit einem Bootstrap-Wert von 100% verknüpft waren. Die *Chlorella*-Kulturen hatten einen Polymorphiegrad von 97,6%. Dies korrelierte ebenfalls gut mit den Ergebnissen der Clusteranalysen. Es ist aber zu bedenken, dass der Grad des Polymorphismus von der Anzahl der Mitglieder einer Gruppe abhängt. Je höher die Anzahl desto repräsentativer ist auch der Polymorphiegrad.

5 AUSBLICK

Die Ergebnisse der IMOLA-Messungen haben gezeigt, dass sich dieses Messsystem prinzipiell für das Biomonitoring von Xenobiotika eignet. Anwendung könnte das IMOLA-Messsystem in der Überwachung von Gewässern, Kläranlagen, Mülldeponien und Industrieabwässern finden. Um das Einsatzgebiet zu erweitern, sollten weitere Schadstoffe wie Schwermetalle oder Fungizide getestet werden. Durch die Verwendung zusätzlicher Testorganismen wie Hefezellen oder *Scenedesmus spec.* könnte die Sensitivität des Messgerätes gesteigert werden. Dabei wäre es sinnvoll, parallel laufende Messungen mit mehreren IMOLA-Messgeräten durchzuführen, die mit unterschiedlichen Testorganismen ausgestattet sind. Da die verschiedenen Organismen unterschiedlich sensitiv auf Schadstoffe reagieren, könnte mit diesem Messaufbau eine sehr große Bandbreite an Xenobiotika hochsensitiv detektiert werden (ROJIČKOVÁ-PADRTOVÁ & MARŠÁLEK 1999). Weitere technische Anpassungen könnten die Sensitivität des Messsystems steigern (siehe 4.3.1.2). Diese wurden bereits im Nachfolge-Modell des in der vorliegenden Dissertation verwendeten IMOLA-Messgerätes umgesetzt (WIEST ET AL. 2006). Aber auch die Miniaturisierung der Messeinheit sowie die Betreibung des Gerätes über Batterien wird forciert, damit das Messsystem im Freiland, z. B. in Messbojen, problemlos eingesetzt werden kann. Von großer Wichtigkeit für den Einsatz des IMOLA-Messgerätes im Freiland wird die Lösung technischer Probleme sein, die bei den IMOLA-Messungen mit Freilandprobenwasser auftraten.

VAN DER SCHALIE ET AL. (2001) schlugen vor, das Biomonitoring mittels Biosensoren mit chemischen Analysemethoden zu kombinieren. Die Biosensoren, die in den meisten Fällen keine einzelnen Schadstoffe identifizieren können, würden unspezifisch auf die unterschiedlichen Schadstoffe im Wasser reagieren, die anschließend durch chemische Analysen genau bestimmt werden. Durch diese Messanordnung wäre es möglich, in kürzester Zeit gezielte Maßnahmen zum Schutz der Umwelt zu ergreifen. Interessant wären aber auch Biosensoren, die gezielt einzelne Schadstoffe nachweisen können. Erste Untersuchungen dazu wurden z. B. von PODOLA & MELKONIAN (2005) durchgeführt.

In Zukunft wird die Bedeutung der Biosensoren bei Toxizitätsbestimmungen weiter zunehmen, da nur mittels eines lebenden Organismus die tatsächliche Schadwirkung von Xenobiotika für die Umwelt eingeschätzt werden kann (VAN DER SCHALIE ET AL. 2001). Zu beachten ist auch, dass Ökosysteme durch die Langzeiteinwirkung von sehr niedrigen Schadstoffkonzentrationen geschädigt werden könnten. Aus den erwähnten Gründen wäre es deshalb sinnvoll, in Zukunft bei der Festsetzung von Schadstoffgrenzwerten verstärkt auf Toxizitätsmessungen mittels Biosensoren zurückzugreifen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Biomonitoring-Messgerät „Intelligent Mobile Lab“ (IMOLA) wurde am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der Technischen Universität München zur multiparametrischen Untersuchung der Reaktion biologischer Zellen entworfen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde diese Technologie an der Limnologischen Station der Technischen Universität München verwendet, um ein effizientes und hochsensitives Biomonitoring-Messsystem für den Gewässerschutz zu entwickeln. Mit dem IMOLA-Messgerät wurden die so genannten Vitalitätsparameter Sauerstoffsättigung und pH-Wert gemessen, die Auskunft über den zellphysiologischen Zustand lebender Zellen geben. Als biologischer Testorganismus wurde die einzellige Grünalge *Chlorella kessleri* ausgewählt, da sie sich auf Grund ihrer hohen Sensitivität gegenüber Schadstoffen und ihrer Morphologie für die IMOLA-Messungen eignete. Diese Alge wurde durch wechselnde Umweltbedingungen, wie z. B. Schadstoffe im Wasser, in ihrer Vitalität beeinträchtigt, wodurch sich ihre Sauerstoffproduktion veränderte. Diese Vitalitätsveränderungen wurden mittels eines im IMOLA-Messgerät integrierten Biosensorchips gemessen, auf dessen Sauerstoff- und pH-Wert-Sensoren die Algenzellen appliziert wurden. In der Messkammer des Biosensorchips konnte das zu testende Medium durch eine im IMOLA-Messgerät integrierte Fluidik in regelmäßigen Abständen ausgetauscht werden. Dadurch konnten den Algen verschiedene Medien bzw. Testsubstanzen gezielt zugeführt werden.

Auf Grund des Durchflusses im Messsystem mussten die Algen in der Messkammer immobilisiert werden. Dazu wurde eine neue Methode entwickelt, durch welche die Algen mittels einer speziellen Filtrationstechnik in der Feinstruktur eines Filterpapiers fixiert wurden. Durch Chlorophyll-a-Bestimmungen konnte dieser Methode, im Vergleich zu anderen Immobilisierungsmethoden, eine hohe Effektivität nachgewiesen werden.

Für die Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit der IMOLA-Messungen war es wichtig, *Chlorella kessleri* in einem monoklonalen und axenischen Zustand zu kultivieren. Durch den Einsatz verschiedener Kultivierungsmethoden und unterschiedlicher Nährmedien konnten diese Ziele erreicht werden. Der

axenische Zustand der Algenkulturen wurde im Abstand von zwei Wochen lichtmikroskopisch untersucht. Die Beständigkeit der Monoklonalität der *Chlorella kessleri*-Kulturen wurde innerhalb von 15 Monaten viermal mittels einer AFLP-Methode (Amplified Fragment Length Polymorphism) überprüft, da sich durch Mutationen der Genpool der Algenkulturen verändern könnte. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Sensitivität dieser genetischen Analyse nicht ausreicht, um die Monoklonalität einer *Chlorella kessleri*-Kultur nachzuweisen.

In den IMOLA-Messungen wurde die Reaktion der Algen auf ausgewählte Xenobiotika, auf Hell- und Dunkelphasen, auf Phosphor-Gradienten sowie auf Freilandprobenwasser aus zwei Seen unterschiedlichen Trophiegrades gemessen. Zudem wurden Langzeitmessungen durchgeführt, um die Kontinuität der Messungen zu überprüfen. Bei den verwendeten Xenobiotika handelte es sich um die Herbizide Diuron, Isoproturon, Metamitron und Metazachlor sowie das Insektizid Pirimicarb. Außerdem wurde die Wirkung des Kontrazeptivums 17 α -Ethinylestradiol auf die Algen getestet. Bei allen ausgewählten Xenobiotika handelte es sich um chemische Substanzen, die nachweislich eine schädliche Wirkung auf aquatische Ökosysteme haben.

Die Ergebnisse der IMOLA-Messungen zeigen, dass es durch die Erarbeitung neuer Methoden und die Auswahl eines geeigneten Testorganismus gelungen ist, ein hochsensitives Messsystem zu entwickeln, das sich für die Anwendung in Bezug auf limnologische Fragestellungen eignet.

Die Algen reagierten unterschiedlich auf die ausgewählten Schadstoffe. Möglicherweise war die toxische Wirkung der Xenobiotika von ihrer Fettlöslichkeit abhängig, da sich diese auf die Aufnahme des Schadstoffes in die Zelle auswirkt. Zudem könnten die verschiedenen Wirkmechanismen der Schadstoffe in den Zellen zu einer unterschiedlichen Toxizität geführt haben.

Die niedrigsten untersuchten Effektkonzentrationen lagen bei 5 $\mu\text{g/l}$ Diuron, 10 $\mu\text{g/l}$ Isoproturon, 100 $\mu\text{g/l}$ Metamitron, 10 $\mu\text{g/l}$ Metazachlor, 50 $\mu\text{g/l}$ Pirimicarb und 10 $\mu\text{g/l}$ 17 α -Ethinylestradiol.

Die Ansprechzeit des Messsystems war sehr kurz, da unmittelbar nach der Einleitung der Schadstoffe in die Messkammer eine Reaktion der Algen beobachtet werden konnte.

Den Algen wurde zu Beginn der IMOLA-Messungen schadstofffreies Nährmedium zur Verfügung gestellt (Exposition I). Darauf erfolgte eine 65-minütige Schadstoffinkubation (Exposition II), auf die eine ebenso lange Phase folgte, in der den Algen schadstofffreies Medium zugeführt wurde (Exposition III). Mit wenigen Ausnahmen war die toxische Wirkung der Xenobiotika auf *Chlorella kessleri* reversibel. In 81,8 % der IMOLA-Messungen, in welchen die Schadstoffe einen signifikanten Effekt auf *Chlorella kessleri* hatten, unterschied sich die Sauerstoffproduktionsrate von Exposition III nicht von Exposition I.

Die Wirkung der meisten Xenobiotika war konzentrationsabhängig. In den Versuchen mit Diuron, Isoproturon und 17 α -Ethinylestradiol wurden die Algen mit zunehmender Schadstoffkonzentration auch stärker in ihrer Photosyntheserate beeinträchtigt. Dagegen verhielt sich die Konzentrationsabhängigkeit bei den Metamitron-Versuchen umgekehrt, was sich durch eine Aggregation des polaren Moleküls bei hohen Konzentrationen erklären lässt. Dieser Effekt könnte die Toxizität des Metamitrons herabgesetzt haben, da die Aggregate die Zellwand nicht mehr passieren konnten. In den Versuchen mit Pirimicarb und Metazachlor ließ sich keine eindeutige Korrelation zwischen der Sauerstoffproduktion der Algen und der Schadstoffkonzentration nachweisen.

Weiterhin wurde untersucht, wie die Algen auf Beleuchtung und auf Dunkelheit reagieren. Dadurch konnte die Photosyntheseaktivität von *Chlorella kessleri* evaluiert werden. Außerdem zeigte dieser Versuch, dass die Sauerstoffzunahme bei eingeschalteter Beleuchtung eine direkte Folge der Photosyntheseleistung der Algen war.

Mit dem IMOLA-Messgerät wurden Langzeit-Messungen über 13 Stunden mit unterschiedlichen Phosphor-Konzentrationen durchgeführt. Die Messungen verliefen über den gesamten Messzeitraum einwandfrei und Eingriffe in die laufenden Messungen, wie z. B. die Beseitigung störender Luftblasen im Messsystem, waren nicht nötig. Mit den IMOLA-Messungen konnten die in einem Nährmedium angesetzten Phosphor-Konzentrationen von 0 $\mu\text{g/l}$, 10 $\mu\text{g/l}$, 50 $\mu\text{g/l}$ und 2785 $\mu\text{g/l}$ höchstsignifikant unterschieden werden. Dabei stieg die Sauerstoffproduktion der Algen mit der Zunahme der Phosphor-Konzentration im Nährmedium an. Erklären lässt sich dieser Effekt durch die wichtige Rolle der

organischen Phosphor-Verbindungen im Zellmetabolismus, wie z. B. ATP, da diese essenziell für den Energiehaushalt der Pflanzen sind.

Durch Referenz-Messungen konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf Reaktionen der Algen zurückzuführen waren. Weder das Filterpapier noch die Schadstoffe oder verschiedene Phosphor-Konzentrationen hatten eine Auswirkung auf die empfindlichen Sensoren. Ebenso konnte dem für die Xenobiotica verwendeten Lösungsmittel Ethanol kein signifikanter Einfluss auf die Algen nachgewiesen werden.

Von April bis November 2005 wurde monatlich eine Probe des oligotrophen Lustsees und des eutrophen Waschsees mit dem IMOLA-Messgerät untersucht. Um das Probenwasser genau zu charakterisieren, wurde jede Probe zuvor wasserchemisch analysiert. Obwohl sich die Seen in ihrem mittleren Phosphor-Gehalt deutlich voneinander abgrenzten, konnten sie mittels der IMOLA-Messtechnik nicht unterschieden werden. Dieses Ergebnis widersprach den Resultaten, die in den Versuchen mit unterschiedlichen Phosphor-Konzentrationen auf Nährmediumbasis erzielt wurden. Grund dafür waren wahrscheinlich technische Probleme, die bei den Messungen mit Seewasser auftraten. Nach einer Messdauer von ca. drei Stunden stellten sich fehlerhafte Sauerstoffmesswerte ein, die mit zunehmender Inkubationszeit auf den Wert null absanken. Wahrscheinlich kam es zu elektrochemischen Prozessen an der Messelektrode des Sauerstoffsensors, der dadurch beschädigt wurde.

Die Untersuchungen mit dem IMOLA-Messgerät haben gezeigt, dass diese Technologie in Kombination mit dem Testorganismus *Chlorella kessleri* ein großes Potenzial zur kontinuierlichen Echtzeit-Überwachung von aquatischen Ökosystemen aufweist. In Zukunft wäre z. B. die Kontrolle von industriellen Abwässern oder Kläranlagen denkbar. Außerdem könnte die Schadstoffbelastung von Flüssen und Seen, beispielsweise durch die Integration des IMOLA-Messsystems in Messbojen, kontinuierlich überwacht werden.

Abkürzungsverzeichnis

- °C** Temperatur in Grad Celsius
- °dH** Grad deutscher Härte (Wasserhärte)
- µg** Mikrogramm
- µl** Mikroliter
- µmol** Mikromol
- 17α-EE** 17α-Ethinylestradiol
- AFLP** Amplified Fragment Length Polymorphism
- al.** alteri
- ATP** Adenosintriphosphat
- BAC-Medium** Bacillariophyceen Medium nach SAG (2006)
- BEWS** Biological Early Warning Systems
- bp** Basenpaare
- BVL** Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
- CHU 10-Medium** Nährmedium nach STEIN (1973)
- CO₂** Kohlendioxid
- DEV** Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung
- DNA** Desoxyribonukleinsäure
- eE** elektrophoretischen Einheiten
- ES-Medium** Basal-Medium nach SAG (2006)
- ESP-Medium** Basal-Medium mit Pepton nach SAG (2006)
- g** Gramm
- G1** Glasröhre 1
- G2** Glasröhre 2
- G3** Glasröhre 3
- GF** Gesichtsfeld

- GM** Grünalgenmedium, Nährmedium nach ZEHNDER & GORHAM (1960)
- HCl** Salzsäure
- HPLC** High Performance Liquid Chromatography
- HWD** Hartwasser Diatomeen Medium nach RENNEBARTH (2007)
- IDES** interdigitale Elektroden-Strukturen
- IFEN** Institut français de l' environnement (Französisches Umweltinstitut)
- IMOLA** Intelligent Mobile Lab
- ISFET** Ionen Sensitiver Feld-Effekt-Transistor
- l** Liter
- LED** Light Emitting Diode (Leutdiode)
- LMU** Ludwig-Maximilians-Universität München
- logK_{ow}** Oktanol-Wasser-Verteilungskonstante
- LWA** Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein- Westfalen
- M** Stoffmengen-Konzentration (Molarität) [mol/l]
- m²** Quadratmeter
- MDS** Multidimensionale Skalierung
- mg** Milligramm
- ml** Milliliter
- mm²** Quadratmillimeter
- mV** Millivolt
- NADPH** Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat
- NLL** Nährmedium nach SCHWOERBEL (1994)
- nm** Nanometer (Wellenlänge)
- NRW** Nordrhein-Westfalen
- O₂** Sauerstoff
- OD** optische Dichte
- P [%]** Polymorphiegrad [%]
- P** Phosphor

- PCB** Printed Circuit Board (Leiterplatte)
- PCMCIA** Personal Computer Memory Card International Association
- PCR** Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
- PE** Polyethylen
- pH** Der negative Logarithmus der H^+ (aq)-Ionenkonzentration: $pH = -\log c(H^+)$
- PN-Diode** elektronisches Bauteil zur Messung der Temperatur
- PPFD** Photosynthetisch aktive Photonen Flux Dichte
- PVC** Polyvinylchlorid
- R²-Wert** Bestimmtheitsmaß
- ru** relative units (Relativeinheiten)
 - s** Sekunde
- SAG** Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen
- SF** Skalierungsfaktoren
- SPE** Festphasen Extraktion
- Spir-Medium** Spirulina-Medium nach SAG (2006)
- SRP** Soluble Reactive Phosphorus (Gelöster reaktiver Phosphor)
- TUM** Technische Universität München
- UPGMA** Unweighted pair group method with arithmetic average

Literaturverzeichnis

- ADLER, P., T. STEGER-HARTMANN & W. KALBFUS, 2001.** Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 29: 227-241.
- AKYILMAZ, E. & E. DINCKAYA, 2005.** An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol. *Biosensors & Bioelectronics* 20 (7): 1263-1269.
- ANDREOU, V. G. & Y. D. CLONIS, 2002.** Novel fibre-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine. *Analytica Chimica Acta* 460: 151-161.
- ANDRES, R. T. & R. NARAYANASWAMY, 1997.** Fibre-optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue. *Talanta* 44: 1335-1352.
- ASHLEY, K., 2003.** Developments in electrochemical sensors for occupational and environmental health applications. *Journal of Hazardous Materials* 102: 1-12.
- ATKINSON, S., M. J. ATKINSON & A. M. TARRANT, 2003.** Estrogens from sewage in coastal marine environments. *Environmental Health Perspectives* 111: 531-535.
- AUGUSTIN, B., R. SCHIETINGER & I. ITTEL, 2002.** Occurrence of pesticides in surface water originating from agricultural areas. *Journal of plant diseases and protection* 18: 1045-1052.
- AVRAMESCU, A., R. ROUILLON & R. CARPENTIER, 1999.** Potential for use of a cyanobacterium *Synechocystis* spec. immobilized in poly(vinylalcohol): Application to the detection of pollutants. *Biotechnol. Tech.* 13: 559-562.
- BACKHAUS, K., B. ERICHSON, W. PLINKE & R. WEIBER, 2003.** Multivariate Analysemethoden. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.*
- BASSIOS, I., 2006.** Auswirkungen des Insektizids Pirimicarb auf *Chlorella kessleri* erfasst mittels der Biosensor-Technologie & AFLP-Untersuchungen an *Chlorella kessleri*-Kulturen. *Diplomarbeit, Limnologische Station der Technischen Universität München.*

- BAUMANN, W. H., M. LEHMANN, A. SCHWINDE, R. EHRET, M. BRISCHWEIN & B. WOLF, 1999.** Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors and Actuators* 55: 77-89.
- BEGON, M. E., J. L. HARPER & C. R. TOWNSEND, 1998.** Ökologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.*
- BENECKE, G., W. FALKE & C. SCHMIDT, 1982.** Use of algal fluorescence for an automated biological monitoring system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 385-395.
- BEST, E. P. H. & J. P. VAN DE WITTENBOER, 1978.** Effects of paraquat on growth and photosynthesis of *Ceratophyllum demersum* and *Elodea canadensis*. *5th Symposium on Aquatic Weeds.*
- BÖGER, P., B. MATTHES & J. SCHMALFUSS, 2000.** Towards the primary target of chloroacetamides – new findings pave the way. *Pest Management Science* 56 (6): 497-508.
- BÖGLE, M. G., 2003.** Genetische und morphologische Diversität von *Chara intermedia* und *Chara baltica*. *Diplomarbeit, Limnologische Station der Technischen Universität München.*
- BÖGLE, M. G., S. SCHNEIDER, B. MANNSCHRECK & A. MELZER, 2007.** Differentiation of *Chara intermedia* and *Chara baltica* compared to *Chara hispida* based on morphology and amplified fragment length polymorphism. *Phycologia, im Druck.*
- BORCHERDING, J. & B. JANTZ, 1997.** Valve movement response of mussel *Dreissena polymorpha* – the influence of pH and turbidity on the acute toxicity of pentachlorophenol under laboratory and field conditions. *Ecotoxicology* 6: 153-165.
- BORG, I. & T. STAUFENBIEL, 1997.** Theorien und Methoden der Skalierung. *Huber Verlag, Göttingen, Toronto, Seattle.*
- BRAGA, O., G. A. SMYTHE, A. I. SCHAFFER & A. J. FEITZ, 2005.** Steroid estrogens in ocean sediments. *Chemosphere* 61 (6): 827-833.
- BRISCHWEIN, M., S. HERRMANN, W. VONAU, F. BERTHOLD, H. GROTHE, E. R. MOTRESCU & B. WOLF, 2006.** Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode structures. *Lab on a Chip* 6 (6): 819-822.

BUCUR, B., D. FOURNIER, A. DANET & J.-L. MARTY, 2006. Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection. *Analytica Chimica Acta* 562: 115-121.

BUCUR, B., M. DONDOI, A. DANET & J.-L. MARTY, 2005. Insecticide identification using a flow injection analysis system with biosensors based on various cholinesterases. *Analytica Chimica Acta* 539: 195-201.

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL), 2005. Internetseite:
http://www.bvl.bund.de/nn_597628/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_ZulassungWirkstoffpruefung/01_Aktuelles/meld_par_19_Download,templatelD=raw.property=publicationFile.pdf/meld_par_19_Download.pdf.
Zugriff: 22.02.2007.

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL), 2006. Internetseite:
http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_492012/DE/04_Pflanzenschutzmittel/00_doks_downloads/psm_uebersichtsliste,templatelD=raw.property=publicationFile.pdf/psm_uebersichtsliste.pdf. Zugriff: 06.12.2006.

CABALA, E., 2006. Analyse von Zell-Chip-Signalen. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik.

CAMPANELLA, L., F. CUBADDA, M. P. SAMMARTINO & A. SAONCELLA, 2001. An algal biosensor for monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.* 35: 69-76.

CAMPBELL, 1997. Biologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.*

CANTER-LUND, H. & J. LUND, 1995. Freshwater algae: their microscopic world explored. *Biopress Ltd.*

CHAY, T. C., S. SURIF & L. Y. HENG, 2005. A copper toxicity biosensor using immobilized cyanobacteria, *Anabena torulosa*. *Sensor letters* 3 (1): 49-54.

CHOUTEAU, C., S. DZYADEVYCH, C. DURRIEU & J. M. CHOVELON, 2005. A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 273-281.

- CHOUTEAU, C., S. DZYADEVYCH, J. M. CHOVELON & C. DURRIEU, 2004.** Development of novel conductometric biosensors based on immobilized whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 1089-1096.
- DEMTRÖDER, W., 2001.** Experimentalphysik 1 - Mechanik und Wärme. 2. Auflage. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.*
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 2006.** Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung (DEV). Fachgruppe in der Gesellschaft deutscher Chemiker in Gemeinschaft mit dem Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Band VI, 2006, DIN 38, 412-L16.
- DOKULIL, M., A. HAMM & J.-G. KOHL, 2001.** Ökologie und Schutz von Seen. 1. Auflage. *Facultas Verlags- und Buchhandels AG, Wien.*
- D'SOUZA, S. F., 2001.** Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 337-353.
- DURRIEU, C. & C. TRAN-MINH, 2002.** Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 206-209.
- EHRET, R., W. BAUMANN, M. BRISCHWEIN, A. SCHWINDE, K. STEGBAUER & B. WOLF, 1997.** Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosensors and Bioelectronics* 12 (1): 29-41.
- EIXLER, S., U. KARSTEN & U. SELIG, 2006.** Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Journal of the international phycological science* 45 (1): 44-53.
- EL-SHEEK, M. M. & A. A. RADY, 1995.** Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Phyton (Horn, Australia)* 35 (1): 139-151.
- EL-SHEEK, M. M., H. M. KOTKAT & O. H. E. HAMMOUDA, 1994.** Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29: 349-358.
- ESCHER, B. I., N. BRAMAZ, R. I. L. EGGEN & M. RICHTER, 2005.** In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environmental Science Technology* 29: 3090-3100.

- EUROPÄISCHE UNION, 1998.** On the quality of water intended for human Consumption. *Council Directive 98/83/EC of 03 November 1998.*
- FAIRCHILD, J. F., D. S. RUESSLER & A. R. CARLSON, 1998.** Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (9): 1830-1834.
- FELSENSTEIN, J., 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 738-791.
- FIELD, J. A., R. L. REED, T. E. SAWYER, S. M. GRIFFITH & P. J. WIGINGTON, 2003.** Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *Journal of Environmental Quality* 32 (1): 171-179.
- FOTT, B. & M. NOVAKOVA, 1969.** A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. Studies in Phycology. *Academia, Praha*: 10-74.
- FRENSE, D., A. MÜLLER & D. BECKMANN, 1998.** Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. *Sens. Actuator B-Chem.* 51: 256-260.
- FRIES, L., 1963.** On the cultivation of axenic red algae. *Physiol. Plant.* 16: 695-708.
- GEOFFROY, L., C. FRANKART & P. EULLAFFROY, 2004.** Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environmental Pollution* 131: 233-241.
- GIACOMAZZI, S. & N. COCHET, 2004.** Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56 (11): 1021-1032.
- GOMEZ DE BARREDA FERRAZ, D., C. SABATER & J. M. CARRASCO, 2004.** Effects of propanil, tebufenozide and mefenacet on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Chemosphere* 56: 315-320.
- GREEN, U., J. H. KREMER, M. ZILLMER & C. MOLDAENKE, 2003.** Detection of chemical threat agents in drinking water by an early warning real-time biomonitor. *Environmental Toxicology* 18 (6): 368-374.

- GUPTA, A., M. R. VIJAYARAGHAVAN & R. GUPTA, 1998.** The presence of cholinesterase in marine algae. *Phytochemistry* 49 (7): 1875-1877.
- GUSTAVSON, K., F. MOHLENBERG & L. SCHLUTER, 2003.** Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recover. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45 (1): 48-58.
- GUZZELLA, L., E. CAPRI, A. DI CORCIA, A. B. CARACCILO & G. GIULIANO, 2006.** Fate of diuron and linuron in a field lysimeter experiment. *Journal of Environmental Quality* 35 (1): 312-323.
- HALLING-SORENSEN, B., S. NORS NIELSEN, P. F. LANZKY, F. INGERSLEV, H. C. HOLTEN LÜTZHOFT & S. E. JORGENSEN, 1998.** Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36: 357-393.
- HAMANN, C. H. & W. VIELSTICH, 2005.** Elektrochemie. 4. Auflage. *Wiley-VCH*.
- HANMER, R., 1983.** Biomonitoring – An integrated approach for toxic pollutant control. *Pollution Engineering* 15 (12): 34-35.
- HEIM, S., A. HUCKE, J. SCHWARZBAUER, R. LITKE & A. MANGINI, 2006.** Geochronology of anthropogenic contaminants in a dated sediment core of the Rhine River (Germany): emission sources and risk assessment. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 34 (1-2): 34-52.
- HENDRIKS, A. J. & M. D. A. STOUTEN, 1993.** Monitoring the response of micro-contaminants by dynamic *Daphnia magna* and *Leuciscus idus* assay in the Rhine delta: biological early warning as a useful supplement. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 26: 265-279.
- HENNING, T., M. BRISCHWEIN, W. BAUMANN, R. EHRET, I. FREUD, R. KAMMERER, M. LEHMANN, A. SCHWINDE & B. WOLF, 2001.** Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay. *Anti-Cancer Drugs* 12: 21-32.
- HENSE, B. A., G. F. SEVERIN, G. WELZL & K.-W. SCHRAMM, 2004.** Effects of 17 alpha-ethinylestradiol on zoo- and phytoplankton in lentic microcosms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (3): 716-724.

- HINTEMANN, T., C. SCHNEIDER, H. F. SCHOLER & R. J. SCHNEIDER, 2006.** Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Research* 40 (12): 2287-2294.
- HIRN, J., H. VILJAMAAN & M. RAEVUORSI, 1980.** The effect of physiochemical, phytoplankton and seasonal factors on faecal indicator bacteria in northern brackish water. *Water Research* 14 (3): 279-285.
- HOCK, B. & E. F. ELSTNER, 1988.** Schadwirkung auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie, 2. Auflage. *Wissenschaftsverlag Mannheim (Germany, F. R.)*.
- HODGES, H. C., W. L. DOWNS, B. PANNER, D. SMITH, E. MAYNARD, J. J. CLAYTON & R. RHODES, 1967.** Oral toxicity and metabolism of Diuron in rats and dogs. *Food Cosm. Toxicology* 5: 513.
- HOFMANN, G., 1993.** Aufwuchs-Diatomeen in Seen und ihre Eignung als Indikatoren der Trophie. *Biblioth. Diatomol.* 30: 1-241.
- HUANG, I.-Y., R.-S. HUANG & L.-H. LO, 2003.** Improvement of integrated Ag/AgCl thin-film electrodes by KCl-gel coating for ISFET applications. *Sensors and Actuators* 94: 53-64.
- HUBER-PESTALOZZI, G., J. KOMAREK & B. FOTT, 1983.** Das Phytoplankton des Süßwassers, 7. Teil, 1. Hälfte. *Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Science Publishers, Stuttgart 1983*.
- HUNT, B. E. & D. F. MANDOLI, 1992.** Axenic cultures of *Acetabularia* (*Chlorophyta*): a decontamination protocol with potential application to other algae. *Journal of Phycology* 28: 407-414.
- IFEN (INSTITUT FRANÇAIS DE L'ENVIRONNEMENT), 1998.** Les pesticides dans les eaux: collecte et traitement des données. *Etudes et Travaux N°19*.
- JASER W., 2003.** Effekte von 17 α -Ethinylestradiol und Trenbolon auf das Zooplankton aquatischer Modellökosysteme. *Dissertation, Lehrstuhl für ökologische Chemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München*.
- JAY, A. E., 1996.** Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 191-198.

- KERNER, R. C., 2006.** Genetische Differenzierung ausgewählter Arten der Familie Caraceen. *Diplomarbeit, Limnologische Station der Technischen Universität München.*
- KLEE, O., 1991.** Angewandte Hydrobiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.*
- KOOISTRA, W. H. C. F., S. A. BOELE-BOS & W. T. STAM, 1991.** A method for obtaining axenic algal cultures using the antibiotic cefotaxime with emphasis on *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 27 (5): 656-658.
- KULAEV, I. S. & V. M. VEGABOV, 1983.** Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Advanced in microbial Physiology* 24: 84-171.
- LAI, K. M., M. D. SCRIMSHAW & J. M. LESTER, 2002.** Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 859-864.
- LAITINEN, P, K. SIIMES, L. ERONEN, S. RAMO, L. WELLING, S. OINONEN, L. MATTSOFF & M. RUOHONEN-LEHTO, 2006.** Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils. *Pest Management Science* 62 (6): 473-491.
- LAKE, P. S. & L. A. BARMUTA, 1986.** Stream benthic communities: persistent presumptions and current speculations. *Monographiae biologicae* 61: 263-276.
- LANDESUMWELTAMT NRW, 1997.** *Gewässergütebericht, 1997.*
- LECHELT, M., W. BLOHM, B. KIRSCHNEIT, M. PFEIFFER, E. GRESENS, J. LILEY, R. HOLZ, C. LÜRING & C. MOLDAENKE, 2000.** Monitoring of surface water by ultra-sensitive *Daphnia* toximeter. *Environmental Toxicology, Symposium Issue, ISTA 9, 15* (5): 390-400.
- LEI, Y., W. CHEN & A. MULCHANDANI, 2006.** Microbial biosensors. *Acta Analytica Chimica* 568: 200-210.
- LEM, N. W. & B. R. GLICK, 1985.** Biotechnological uses of cyanobacterias. *Biotechnol. Adv.* 3: 195-209.

- LINK, W., C. DIXKENS, M. SINGH, M. SCHWALL & A. E. MELCHINGER, 1995.** Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RADP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 27-32.
- LOOSER, R., 1999.** Akkumulation und Metabolismus halogener Xenobiotika in Fischen als Indikator einer globalen Belastung. *Dissertation, Wissenschaftliche Fakultät der Universität Ulm.*
- LOWE, T. P., T. W. MAY, W. G. BRUMBAUGH & D. A. KANE, 1985.** National-contaminant biomonitoring-program-concentrations of 7 elements in freshwater fish, 1978-1981. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 14 (3): 363-388.
- LUKAVSKY, J., 1986.** Metabolic activity and cell structure of immobilized algae cells. *Algalogical Studies* 43: 261-279.
- LUKAVSKY, J., 1992.** The evaluation of algal growth potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water Research* 26 (10): 1409-1413.
- LÜLLMANN, H. & K. MOHR, 1999.** Pharmakologie und Toxikologie. 14. Auflage. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart.*
- LWA, 1991, RHEINGÜTEBERICHT NRW 90.** Landesamt für Wasser und Abfall, Nordrhein-Westfalen, *Essen P&W Druck und Verlag GmbH.*
- MA, J., L. XU & S. WANG, 2002.** A quick, simple, and accurate method of screening herbicide activity using green algae cell suspension cultures. *Weed science*, 50: 555-559.
- MALATO, S., J. BLANCO, J. CACERES, A. R. FERNANDEZ-ALBA, A. AGUERA & A. RODRIGUEZ, 2002.** Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-fenton and TiO₂ using solar energy. *Catal. Today* 76: 209-220.
- MALLAT, E., D. BARCELO, C. BARZEN, G. GAUGLITZ & R. ABUKNESHA, 2001.** Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry* 20 (3).
- MANNSCHRECK, B., 2003.** Genetische und morphologische Differenzierung ausgewählter Arten der Gattung *Chara*. *Dissertation, Limnologische Station der Technischen Universität München.*
- MASTRUP, M., A. I. SCHAFFER & S. J. KHAN, 2005.** Predicting fate of the contraceptive pill in wastewater treatment and discharge. *Water Science and Technology* 52 (8): 279-286.

- MATTHES, B., 2000.** Die Wirkungsweise herbizidaler Chloracetamide. *Dissertation, Universität Konstanz.*
- MAZZEI, F., F. BOTRE, S. MONTILL, R. PILLOTON, E. PODESTA & C. BOTRE, 2004.** Alkaline phosphatase inhibition based on electrochemical sensors for the detection of pesticides. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574: 95-100.
- McLAUGHLIN, G. W., K. BRADEN, B. FRANC & G. T. A. KOVACS, 2002.** Microfabricated solid-state dissolved oxygen sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical* 83 (1-3): 138-148.
- MELZER, A., 1976.** Makrophytische Wasserpflanzen als Indikatoren des Gewässerzustandes oberbayerischer Seen. *Dissertationes Botanicae* 34. Cramer Verlag.
- MELZER, A., 1988.** Der Makrophytenindex. Eine biologische Methode zur Ermittlung der Nährstoffbelastung von Seen. *Habilitationsschrift, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München.*
- METCALF, E., 1979.** Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse. *McGray-Hill, New York.*
- METFIES, K., S. HULJIC, M. LANGE & L. K. MEDLIN, 2004.** Electrochemical detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with a DNA-biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* 20 (7): 1349-1357.
- MINISTERIUM FÜR UMWELT- UND NATURSCHUTZ, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ NRW, 2004.** Dokumentation der wasserwirtschaftlichen Grundlagen. Internetseite: http://www.niers.nrw.de/ergebnisse/berichte/berichtstexte_pdf_format/niet1141_punktquellen.pdf. Zugriff: 17.01.2007
- MOLANDER, S. & H. BLANCK, 1992.** Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquatic Toxicology* 22: 129-144.
- MOLDAENKE, C., 2002.** Realtime biomonitoring for environmental control and drinking water protection. *Extract from the presentation at NWQMC National Monitoring Conference, Madison/Wisconsin.*
- MONTESINOS, T., S. PÉREZ-MUNGUÍA, F. VALDEZ & J.-L. MARTY, 2001.** Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic solvents. *Analytica Chimica Acta* 431: 231-237.

- MOONEY, P. A. & J. VAN STADEN, 1985.** In vitro plantlet formation and multiple shoot induction in *Sargassum heterophyllum*. *S. Afr. Journal Bot.* 51: 41-44.
- MOREBY, S. J., S. SOUTHWAY, A. BARKER & J. M. HOLLAND, 2001.** A comparison of the effect of new and established insecticides on nontarget invertebrates of winter wheat fields. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (10): 2243-2254.
- MOSTAFA, F. I. Y. & C. S. HELLING, 2001.** Isoproturon degradation as affected by the growth of two algal species at different concentrations and pH values. *Journal of Environmental Science and Health* 36 (6): 709-727.
- NAESSENS, M. & C. TRAN-MINH, 1998.** Whole-cell biosensor for direct determination of solvent vapours. *Biosensors and Bioelectronics* 13 (4-4): 341-446.
- NAESSENS, M., J. C. LECLERC & C. TRAN-MINH, 2000.** Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46: 181-185.
- NASH, S. M. B., U. SCHREIBER, P. J. RALPH & J. F. MULLER, 2005.** ToxY-PAM phytotoxicity assay; application and appraisal of a novel biomonitoring tool for the aquatic environment. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (7): 1443-1451.
- NEBEKER, A. V. & G. S. SCHUYTEMA, 1998.** Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 441-446.
- NEUMANN, M., R. SCHULZ & M. LIESS, 1999.** Diffuse und punktuelle Eintragspfade für Pflanzenschutzmittel und ihre Bedeutung für zwei kleine Fließgewässer. Tagungsbericht der Jahrestagung der Gesellschaft für Limnologie (DGL). 27.09 bis 01.10.1999. Internetseite: http://www.limnology.uni-jena.de/neumann/pdf/MN_1999_dgl_band_1_503_508.pdf. Zugriff: 16.01.2007.
- NULTSCH, W., 1996.** Allgemeine Botanik. 10. Auflage. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.*
- NUSCH, E. A., 1980.** Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol* 14: 14-36.

- OAKS, J. L., M. GILBERT, M. Z. VIRANI, R. T. WATSON, C. U. METEYER, B. A. RIDEOUT, H. L. SHIVAPRASAD, S. AHMED, M. J. I. CHAUDHRY, M. ARSHAD, S. MAHMOOD, A. ALI & A. A. KHAN, 2004.** Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427 (6975): 630-633.
- ODUM, E. P., 1999.** Ökologie. Grundlagen – Standorte – Anwendungen. 3. Auflage. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York.*
- OKAMURA, H., I. AOYAMA, Y. ONO & T. NISHIDA, 2003.** Antifouling herbicides in coastal waters of western Japan. *Marine Pollution Bulletin* 47(1-6): 59-67.
- PARHAD, N. M. & N. U. RAO, 1972.** The effect of algal growth on the survival of *E. coli* in sewage. *Indian Journal of Environmental Health* 14 (2): 131-139.
- PEARSON, H. W., D. D. MARA, S. W. MILLS & D. J. SMALLMAN, 1987 A.** Factors determining algal populations in waste stabilisation ponds and the influence of algae on pond performance. *Water Science and Technology* 19 (12): 131-140.
- PEARSON, H. W., D. D. MARA, S. W. MILLS & D. J. SMALLMAN, 1987 B.** Physico-chemical parameters influencing faecal bacterial survival in waste stabilisation ponds. *Water Science and Technology* 19 (12): 145-152.
- PETERSON, C. G., 1996.** Response of benthic algal communities to natural physical disturbance. *Algal Ecology. Freshwater Benthic Ecosystems. Academic Press, San Diego*: 375-399.
- PODOLA, B. & M. MELKONIAN, 2005.** Selective real-time herbicide monitoring by an array chip biosensor employing diverse microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17: 261-271.
- POLNE-FULLER, M. & A. GIBOR, 1987.** Calluses and callus-like growth in seaweeds. *Journal of Protozool.* 34: 159-165.
- POLNE-FULLER, M., 1991.** A novel technique for preparation of axenic cultures of *Symbiodinium* (Pyrrophyta) through selective digestion by Amoebae. *Journal of Phycology* 27: 552-554.
- PRADO, A. G. S. & C. AIROLDI, 2002.** The toxic effect on soil microbial activity caused by the free or immobilized pesticide diuron. *Thermochimica Acta* 394: 155-162.

- PRIBYL, J., M. HEPEL, J. HALAMEK & P. SKLADAL, 2003.** Development of piezo-electric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine. *Sensors and Actuators B-Chemical* 91 (1-3): 333-341.
- QUAGHEBEUR, D., B. DE SMET, E. DE WULF & W. STEURBAUT, 2004.** Pesticides in rainwater in Flanders, Belgium: results from the monitoring program 1997-2001. *Journal of Environmental Monitoring* 6 (3): 182-190.
- RAMANATHAN, K. & B. DANIELSSON, 2001.** Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 16 (6): 417-423.
- RENNEBARTH, T., 2007.** Phylogenetische Untersuchungen zum *Nitzschia palea*-Sippenkomplex anhand von Morphologie und molekularbiologischen Methoden. *Dissertation, Limnologische Station der Technischen Universität München.*
- RIOBOO, C., C. GONZÁLEZ, C. HERRERO & A. CID, 2002.** Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquatic Toxicology* 59: 225-235.
- RODRIGUEZ, M. JR., C. A. SANDERS & E. GREENBAUM, 2002.** Biosensors for rapid monitoring of primary-source drinking water using naturally occurring photosynthesis. *Biosensors and Bioelectronics* 17: 843-849.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S., M. J. LOPEZ DE ALDA, M. P. MARCO & D. BARCELO, 2005.** Biosensors for environmental monitoring. A global perspective. *Talanta* 65: 291-297.
- ROGERS, K. R., 1995.** Biosensors for environmental applications. *Biosensors and Bioelectronics* 10: 533-541.
- ROGERS, K. R., 2006.** Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Analytica Chimica* 568 (1-2): 222-231.
- ROJIČKOVÁ-PADRTOVÁ, R. & B. MARŠÁLEK, 1999.** Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity. *Chemosphere* 38 (14): 3329-3338.
- ROTHPLETZ, A., 1917.** Die Osterseen und der Isarvorlandgletscher. *Mitt. Geogr. Gesellschaft München* 12: 99-314.
- SAG, 2006.** Culture Media, Nährmedium: BAC. Internetseite: <http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/culturemedia.html>. Zugriff: 06.12.2006.

SAG, 2006. Culture Media, Nährmedium: ES. Internetseite:
<http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/culturemedia.html>.
Zugriff: 06.12.2006.

SAG, 2006. Culture Media, Nährmedium: ESP. Internetseite:
<http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/culturemedia.html>.
Zugriff: 06.12.2006.

SAG, 2006. Culture Media, Nährmedium: Spir. Internetseite:
<http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/culturemedia.html>.
Zugriff: 06.12.2006.

SANDERS, C. A., M. RODRIGUEZ & E. GREENBAUM, 2001. Stand-off tissue-based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction. *Biosensors and Bioelectronics* 16 (7-8): 439-446.

SARTIN, J. R., M. D. SYKES, J. C. TAYLOR, S. J. HIRD, K. JACKSON, R. J. FUSSELL & A. R. C. HILL, 2000. Determination of residues of pirimicarb and its desmethyl and desmethylformamido metabolites in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 83 (3): 735-741.

SCHLICHTIG, B., E. SCHÜLE & U. ROTT, 2001. Eintrag von Pflanzenschutzmitteln in die Seefelder Aach. *Wasser und Abfall* 3: 20-28.

SCHUBNELL, D., M. LEHMANN, W. BAUMANN, F. G. ROTT, B. WOLF & C. F. BECK, 1999. An ISFET-algal (*Chlamydomonas*) hybrid provides a system for eco-toxicological tests. *Biosensors and Bioelectronics* 14 (5): 465-472.

SCHWARZ, G., M. HERZ, X. Q. HUANG, W. MICHALEK, A. JAHOR, G. WENZEL & V. MOHLER, 2000. Application of fluorescence-based semi-automated AFLP analysis in barley and wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 545-551.

SCHWOERBEL, J. & H. BRENDLBERGER, 2005. Einführung in die Limnologie. 9. Auflage. Elsevier GmbH, München.

SCHWOERBEL, J., 1999. Einführung in die Limnologie. 8. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

SEELE, J., 2000. Ökologische Bewertung voralpiner Kleinseen anhand von Diatomeen, Makrophyten und der Nutzung ihrer Einzugsgebiete. *Dissertation, Institut für Landespflege und Botanik, Technische Universität München*.

- SHAW, M. & J. F. MÜLLER, 2005.** Preliminary evaluation of the occurrence of herbicides and PAHs in the wet tropic region of the Great Barrier Reef, Australia, using passive samplers. *Marine Pollution Bulletin* 51: 876-881.
- SHITANDA, I., K. TAKADA, Y. SAKAI & T. TATSUMA, 2005.** Compact amperometric algal biosensor for the evaluation of water toxicity. *Analytica Chimica Acta* 530: 191-197.
- SLOOF, W., D. ZWART & J. M. MARQUENIE, 1983.** Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30: 400-405.
- SNYDER, E. M., S. A. SNYDER, K. I. KELLY, T. S. GROSS, D. L. VILLENEUVE, S. D. FITZGERALD, S. A. VILLALOBOS & J. P. GIESY, 2004.** Reproductive responses of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed in cages to influent of the Las Vegas Wash in Lake Mead, Nevada, from late winter to early spring. *Environ. Sci. Technol.* 38: 6385-6395.
- SQUILLACE, P. J. & E. M. THURMAN, 1992.** Herbicide transport in rivers: importance of hydrology and geochemistry in Nonpoint-Source contamination. *Environmental Science and Technology* 26 (3): 538-545.
- STEIN, E. D., 1973.** Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press*: 448.
- STERLING, T. M., 1994.** Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant-cells. *Weed Science* 42 (2): 263-276.
- STRATTON, G. W. & T. M. SMITH, 1988.** Interaction of organic solvents with the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 40: 736-742.
- STUMPF, M., T. A. TERNES, K. HABERER & W. BAUMANN, 1996.** Nachweis von natürlichen und synthetischen Oestrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* 87: 251-261.
- SUMPTER, J. R., 2003.** Endocrine disruption in wildlife: The future? *Pure Applied Chemistry* 75 (11-12): 2355-2360.
- SUZUKI, K., H. HIRAI, H. MURATA & T. NISHIDA, 2003.** Removal of estrogenic activities of 17 beta-estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research* 37 (8): 1972-1975.

- TANG, J., K. D. HOAGLAND & B. D. SIEGFRIED, 1998.** Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 1085-1090.
- TRAVIESO, L., F. BENITEZ, P. WEILAND, E. SCHEZ, R. DUPEYRON & A. R. DOMINGUEZ, 1996.** Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresource Technology* 55: 181-186.
- TRAVIS, S. E., J. MASCHINSKI & P. KEIM, 1996.** An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology* 5: 735-745.
- TROMBALLA, C., 1998.** Der Einfluss des Umlandes auf die Nährstoffsituation eines Kleinsees (Lustsee/Osterseeengebiet). *Diplomarbeit, Limnologische Station der Technischen Universität München.*
- TSCHERNE, V., 2006.** Biosensorchips – Eine Möglichkeit für Gewässermonitoring? *Diplomarbeit, Limnologische Station der Technischen Universität München.*
- TÜMPLING, VON, W. & G. FRIEDRICH, 1999.** Biologische Gewässeruntersuchung: Methoden der biologischen Wasseruntersuchung. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.*
- TWIST, H., A. C. EDWARDS & G. A. CODD, 1997.** A novel in-situ biomonitor using alginate immobilized algae (*Scenedesmus subspicatus*) for the assessment of eutrophication in flowing surface waters. *Wat. Res.* 31 (8): 2066-2072.
- UMWELT-BUNDESAMT FÜR MENSCH UND NATUR (HRSG.), 2005.** Fließ- und Stillgewässersimulationsanlage. Untersuchung zur Wirkung und zum Verbleib von Metazachlor. Internetseite:
<http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3023.pdf>.
Zugriff: 22.02.2007.
- UTERMÖHL, H., 1958.** Zur Vervollkommnung der qualitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. der Internationalen Vereinigung für Limnologie* 9: 1-39.
- VAN DE PEER, Y. & R. DE WACHTER, 1994.** TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences* 10: 569-570
- VAN DER SCHALIE, W. H., T. R. SHEDD, P. L. KNECHTGES & M. W. WIDDER, 2001.** Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 457-465.

- VAN OORSCHOT, J. L. P. & P. H. VAN LEEUWEIN, 1979.** Recovery from inhibition of photosynthesis by metamitron in various plant species. *Weed Research* 19 (1): 63-67.
- VÉDRINE, CH., J. C. LECLERC, C. DURRIEU & C. TRAN-MINH, 2003.** Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors and Bioelectronics* 18: 457-463.
- VELASCO-GARCIA, M. N. & T. MOTTRAM, 2003.** Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering* 84 (1): 1-12.
- VELASCO-SCHÖN, C., 2003.** Ökotoxikologische Spurenuntersuchungen mehrerer nordbayrischer Fließgewässer. *Dissertation, Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.*
- VERMA, S. R. & I. P. TONK, 1984.** Biomonitoring of the contamination of water by a sublethal concentration of pesticides – a system-analysis approach. *Acta Hydrochemica et Hydrobiologica* 12 (4): 399-409.
- VONDER HAAR, S. S., D. MACKE, R. SINHA & E. R. KISHNAN, 2003.** Drinking water early warning detection and monitoring technology evaluation and demonstration. *29th Annual Environmental & Energy Symposium & Exhibition.*
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER & M. ZABEAU, 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- WASMUND, E., 1934.** Grundwasserverhältnisse und Seespiegel-schwankungen im oberbayrischen Osterseengebiet. *Mitt. Geogr. Ges. München* 27: 87-125.
- WEHNER, R. & W. GEHRING, 1995.** Zoologie. 23. Auflage. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart.*
- WESTON, L. H. & P. ROBINSON, 1991.** Detection and quantification of triazine herbicides using algal cell fluorescence. *Biotechnology Techniques* 5 (5): 327-330.
- WIEST, J., M. BRISCHWEIN, H. GROTHE, A. M. OTTO & B. WOLF, 2005 B.** Planar microsensors for measurement of cellular respiration. *Sensors Proceedings II*: 249-254.
- WIEST, J., M. BRISCHWEIN, J. RESSLER, A. M. OTTO, H. GROTHE & B. WOLF, 2005 A.** Cellular assays with multiparametric bioelectronic sensor chips. *Chimia* 59: 243-246.

- WIEST, J., T. STADTHAGEN, M. SCHMIDHUBER, M. BRISCHWEIN, J. RESSLER, U. RAEDER, H. GROTHE, A. MELZER & B. WOLF, 2006.** Intelligent Mobile Lab for metabolics in environmental monitoring. *Analytical Letters* 39: 1759-1771.
- WILSON, C. J., R. A. BRAIN, H. SANDERSON, D. J. JOHNSON, K. T. BESTARI, P. K. SIBLEY & K. R. SOLOMON, 2004.** Structural and functional responses of plankton to a mixture of four tetracyclines in aquatic microcosms. *Environmental Science and Technology* 38 (23): 6430-6439.
- WILSON, J.D., D. W. FOSTER, H. M. KRONENBERG & P.R. LARSEN, 2002.** Williams Textbook of Endocrinology. *W.B. Saunders Co, Philadelphia.*
- WOLF, B., M. BRISCHWEIN, W. BAUMANN, R. EHRET, T. HENNING, M. LEHMANN & A. SCHWINDE, 1998.** Microsensor-aided measurements of cellular signaling and metabolism on tumor cells. *Tumor Biology* 19: 374-383.
- WOLF, B., M. KRAUS & U. SIEBEN, 1997.** Potential of microsensor-based feedback bioactuators for biophysical cancer treatment. *Biosensors and Bioelectronics* 12: 301-309.
- YU, L., J. ZHAO, U. MUHLENDORF, D. A. BRYANT & J. H. GOLDBECK, 1993.** PSaE is required for in vivo cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Plant Physiology* 103: 171-180.
- ZEHNDER, A. & P. R. GORHAM, 1960.** Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kutz, emend Elenkin. *Can Journal Microbiol.* 6: 645-660.
- ZORELL, F., 1941.** Beiträge zur Kenntnis der oberbayerischen Osterseen. *Mitt. Geogr. Gesellschaft München* 33: 19-42.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Kulturkolben. G1 = Glasröhre 1; G2 = Glasröhre 2; G3 = Glasröhre 3.....	23
Abbildung 2.2: IMOLA-Messgerät mit PCMCIA-Card zur Datenübertragung auf einen Computer (Quelle: Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der TUM).....	37
Abbildung 2.3: Aufbau des IMOLA-Messgerätes ohne Abdeckung (Quelle: Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der TUM).	37
Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des Fluidik-Moduls (Quelle: WIEST ET AL. 2005 A, modifiziert).	38
Abbildung 2.5: Links: Biosensorchip in biokompatibler Kunststoffverkapselung. Rechts: Schematischer Aufbau eines (unverkapselten) Biosensorchips (Quelle: Bionas GmbH).....	42
Abbildung 2.6: <i>Chlorella kessleri</i> bei 1000-facher Vergrößerung.	43
Abbildung 2.7: Herstellung eines Algenfilters mittels der Doppelfiltermethode.	46
Abbildung 2.8: Sägezahnmuster einer IMOLA-Messung, bedingt durch drei Minuten Pumpenlaufzeit, auf die eine 10-minütige Messung der Sauerstoffproduktion der Algen folgt.	50
Abbildung 2.9: Berechnung der Steigungswerte.	51
Abbildung 2.10: Chemische Strukturformel Diuron.	52
Abbildung 2.11: Chemische Strukturformel Isoproturon.....	53
Abbildung 2.12: Chemische Strukturformel Metamitron.	53
Abbildung 2.13: Chemische Strukturformel Metazachlor.....	53

Abbildung 2.14: Chemische Strukturformel Pirimicarb.	54
Abbildung 2.15: Chemische Strukturformel 17 α -EE.	54
Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der AFLP-Arbeitsschritte.	69
Abbildung 3.1: Eichgerade <i>Chlorella kessleri</i> : Korrelation zwischen Zellzahl/ml und Absorption. Die Datenpunkte sind auf die Zellzahl/ml hochgerechnete Mittelwerte aus zehn GF mit Standardabweichung.	75
Abbildung 3.2: Korrelation zwischen Chloramphenicol-Konzentration und Bakterienanzahl/GF in einer <i>Monoraphidium griffithii</i> -Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils zehn GF mit der jeweiligen Standardabweichung.	77
Abbildung 3.3: Korrelation zwischen Chloramphenicol-Konzentration und Bakterienanzahl/GF in einer <i>Navicula pelliculosa</i> -Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 20 GF mit der jeweiligen Standardabweichung.	78
Abbildung 3.4: Korrelation zwischen Cefotaxime-Konzentration und Bakterienanzahl/GF in einer <i>Monoraphidium griffithii</i> -Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 20 GF mit der jeweiligen Standardabweichung.	78
Abbildung 3.5: Filtrationsversuch: Mittlere Bakterienanzahl/GF mit Standardabweichung in einer unbehandelten bzw. mit einem 5 μ m Cellulose-Acetatfilter filtrierten <i>Monoraphidium griffithii</i> -Kultur.	79
Abbildung 3.6: Chlorophyll-a-Gehalte der Filterpapiere, der Doppel- bzw. Einzelfiltermethode. Angegeben ist der Mittelwert aus acht Replikaten mit Standardabweichung.	80
Abbildung 3.7: Querschnitt durch einen Algenfilter. Ansicht des Querschnittes ist um ca. 45° geneigt. Vergrößerung: 3000-fach.	81

Abbildung 3.8: Querschnitt durch einen Algenfilter. Vergrößerung: 3000-fach.....	81
Abbildung 3.9: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Diuron.	83
Abbildung 3.10: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Diuron.....	83
Abbildung 3.11: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Diuron.	84
Abbildung 3.12: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Diuron.....	85
Abbildung 3.13: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 5 µg/l Diuron.	85
Abbildung 3.14: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 5 µg/l Diuron.....	86
Abbildung 3.15: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 1 µg/l Diuron.	86
Abbildung 3.16: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 1 µg/l Diuron.....	87
Abbildung 3.17: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Diuron-Konzentration.....	87
Abbildung 3.18: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Diuron-Konzentration.....	88
Abbildung 3.19: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Isoproturon.	89
Abbildung 3.20: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Isoproturon.	89
Abbildung 3.21: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Isoproturon.	90
Abbildung 3.22: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Isoproturon.	90
Abbildung 3.23: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 5 µg/l Isoproturon..	91
Abbildung 3.24: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 5 µg/l Isoproturon. ..	92
Abbildung 3.25: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Isoproturon-Konzentration.....	92

Abbildung 3.26: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Isoproturon-Konzentration.	93
Abbildung 3.27: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 500 µg/l Metamitron.	93
Abbildung 3.28: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 500 µg/l Metamitron.	94
Abbildung 3.29: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 250 µg/l Metamitron.	94
Abbildung 3.30: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 250 µg/l Metamitron.	95
Abbildung 3.31: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Metamitron.	96
Abbildung 3.32: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Metamitron.	96
Abbildung 3.33: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Metamitron-Konzentration.	97
Abbildung 3.34: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Metamitron-Konzentration.	97
Abbildung 3.35: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 500 µg/l Metazachlor.	98
Abbildung 3.36: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 500 µg/l Metazachlor.	98
Abbildung 3.37: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 250 µg/l Metazachlor.	99
Abbildung 3.38: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Metazachlor.	99
Abbildung 3.39: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Metazachlor.	100

Abbildung 3.40: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Metazachlor.....	100
Abbildung 3.41: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Metazachlor.....	101
Abbildung 3.42: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Metazachlor-Konzentration.....	101
Abbildung 3.43: Abhängigkeit der relativen pH-Wert-Steigung von der Metazachlor-Konzentration.....	102
Abbildung 3.44: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 300 µg/l Pirimicarb.	103
Abbildung 3.45: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 200 µg/l Pirimicarb.	104
Abbildung 3.46: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Pirimicarb.	104
Abbildung 3.47: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 50 µg/l Pirimicarb.	105
Abbildung 3.48: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der Pirimicarb-Konzentration.	106
Abbildung 3.49: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l 17α-EE..	106
Abbildung 3.50: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l 17α-EE....	107
Abbildung 3.51: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 1 µg/l 17α-EE.....	107
Abbildung 3.52: Abhängigkeit der relativen Sauerstoffsteigung von der 17α- EE-Konzentration.	108
Abbildung 3.53: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch der Hell-Dunkel- Reaktion.	108
Abbildung 3.54: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch der Hell-Dunkel- Reaktion.	109

Abbildung 3.55: Relative Sauerstoffsteigung bei verschiedenen Phosphor-Konzentrationen.	112
Abbildung 3.56: Relative pH-Wert-Steigung bei verschiedenen Phosphor-Konzentrationen.	113
Abbildung 3.57: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 500 µg/l Nullprobe (0,05%ige Ethanollösung).	115
Abbildung 3.58: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 500 µg/l Nullprobe (0,05%ige Ethanollösung).	116
Abbildung 3.59: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 100 µg/l Nullprobe (0,01%ige Ethanollösung).	116
Abbildung 3.60: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 100 µg/l Nullprobe (0,01%ige Ethanollösung).	117
Abbildung 3.61: Relative Sauerstoffsteigung: Versuch mit 10 µg/l Nullprobe (0,001%ige Ethanollösung).	117
Abbildung 3.62: Relative pH-Wert-Steigung: Versuch mit 10 µg/l Nullprobe (0,001%ige Ethanollösung).	118
Abbildung 3.63: Sauerstoffsteigung im Jahresmittelwert bei Waschsee- und Lustsee-Probenwasser.	120
Abbildung 3.64: Sauerstoffsteigungen von April bis November 2005 bei Waschsee- und Lustsee-Probenwasser.	121
Abbildung 3.65: UPGMA-Dendrogramm für <i>Chlorella</i> -Proben. Als Außengruppe wurde <i>Navicula</i> verwendet.	122
Abbildung 3.66: Dendrogramm nach dem UPGMA-Verfahren zur Monoklonalität der <i>Chlorella</i> -Kulturen.	123
Abbildung 3.67: Dendrogramm nach dem UPGMA-Verfahren zur Überprüfung der Sensitivität der AFLP gegenüber artfremder DNA. Die Bezeichnungen „A“ und „B“ stehen für die Replikate.	125

Abbildung 3.68: MDS-Analyse. Datengrundlage: Zusammengefasst als
Chlorella: *Chlorella* 1 GM 05.05.2006, *Chlorella* 2 GM
05.05.2006, *Chlorella* 3 NLL 05.05.2006 und *Chlorella* 4
NLL 05.05.2006. *Chlorella* 5: *Chlorella* 5 GM 05.05.2006.
Zusammengefasst als *Desmodesmus*: *Desmodesmus*
05.05.2006 A, *Desmodesmus* 05.05.2006 B (Replikate).
Zusammengefasst als *Navicula*: *Navicula* 05.05.2006,
Navicula 05.12.2005, *Navicula* 13.06.2005 und *Navicula*
15.02.2005. 126

Formelverzeichnis

Formel 1:	Sauerstoffreaktion an der Arbeitselektrode in alkalischen Lösungen.....	41
Formel 2:	Sauerstoffreaktion an der Arbeitselektrode in sauren Lösungen.....	41
Formel 3:	Berechnung des Chlorophyll-a-Gehaltes.....	48
Formel 4:	Berechnung des Polymorpiegrades; $P [\%] =$ Polymorphiegrad [%].	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Nährmedium nach Zehnder & Gorham.....	26
Tabelle 2.2:	NLL-Medium.....	27
Tabelle 2.3:	ES-Medium.....	28
Tabelle 2.4:	Spir-Medium.....	29
Tabelle 2.5:	BAC-Medium.....	30
Tabelle 2.6:	CHU 10-Medium.....	31
Tabelle 2.7:	HWD-Medium.....	32
Tabelle 2.8:	Schadstoffkonzentrationen.....	55
Tabelle 2.9:	Für die AFLP-Analyse verwendete Algenkulturen.....	66
Tabelle 3.1:	Monoklonale Algenkulturen.....	73
Tabelle 3.2:	Monoklonal axenische Algenkulturen.....	74
Tabelle 3.3:	Datengrundlage für die Erstellung der Eichgeraden.....	74
Tabelle 3.4:	Vitalitätsparameter- und Absorptions-Messungen für <i>Chlorella kessleri</i>	76
Tabelle 3.5:	Übersichtstabelle der Ein-Weg-ANOVA-Ergebnisse. I-II = paarweiser Vergleich zwischen Exposition I und II. I-III = paarweiser Vergleich zwischen Exposition I und III. II-III = paarweiser Vergleich zwischen Exposition II und III. O ₂ = Ergebnisse der Sauerstoff messungen. pH = Ergebnisse der pH-Wert-Messungen.....	110
Tabelle 3.6:	Referenz-Messungen mit Schadstoffen ohne Algen.....	114
Tabelle 3.7:	Wasserchemische Analyse des Waschsee-Probenwassers.....	118
Tabelle 3.8:	Wasserchemische Analyse des Lustsee-Probenwassers. ...	119

Tabelle 3.9:	Datum der Kulturanlage der jeweiligen <i>Chlorella</i> -Kulturen und deren Peak-Anzahl.	122
Tabelle 3.10:	Anzahl der Peaks für die jeweilige Algenkultur.....	124
Tabelle 3.11:	Wichtigste Merkmale der Lociverteilung der Algenkulturen..	127
Tabelle 3.12:	Auflistung monomorpher Loci, die innerhalb der Grünalgen-Kulturen nur bei <i>Chlorella</i> oder nur bei <i>Desmodesmus</i> gleichzeitig unique sind und Loci, die gleichzeitig bei <i>Chlorella</i> und <i>Desmodesmus</i> vorkommen.....	128

Anhang

CHLORAMPHENICOL

Algenkultur	Chloramphenicol [$\mu\text{g/ml}$]	Mittlere Bakterienzahl/GF	Standardabweichung
<i>Monoraphidium griffithii</i>	15	13,2	1,41
	10	20,95	0,78
	7	25,3	2,55
	5	27,23	2,27
	2	46,47	10,44
	0	68,83	18,52
<i>Navicula pelliculosa</i>	15	8,80	3,00
	0	24,25	11,84

CEFOTAXIME

Algenkultur	Cefotaxime [$\mu\text{g/ml}$]	Mittlere Bakterienzahl/GF	Standardabweichung
<i>Monoraphidium griffithii</i>	200	3,2	0,44
	100	5,4	0,65
	0	14,7	2,40

IMOLA-MESSUNGEN MIT SCHADSTOFFEN, HELL-DUNKEL-REAKTION UND LANGZEITMESSUNGEN MIT PHOSPHOR-GRADIENTEN

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
Diuron: 100 $\mu\text{g/l}$ – O ₂	1	0,93391539	0,06779666
	2	0,96716693	0,00833151
	3	0,98592777	0,03188505
	4	1,02075957	0,07992562
	5	1	0
	6	-0,21564242	0,25859077
	7	-0,08501556	0,16423813
	8	-0,36172569	0,39977116
	9	-0,34714587	0,37490043
	10	-0,37781408	0,37266153
	11	0,20064354	0,07668881
	12	0,3884101	0,17362798
	13	0,48067169	0,2291168
	14	0,60380545	0,30680125
	15	0,55114365	0,22553831
Diuron: 100 $\mu\text{g/l}$ – pH	1	1,08609881	0,01759246
	2	0,99077632	0,08649639
	3	1,16288714	0,34969406
	4	1,11627483	0,1168058
	5	1	0
	6	0,35643386	0,0796174
	7	0,43529889	0,2621138
	8	0,44506113	0,11153451
	9	0,55153525	0,29195143
	10	0,4957361	0,30155641
	11	0,76953071	0,53809351
	12	0,85690389	0,35910848
	13	0,79817228	0,24647775
	14	0,93342808	0,37723524
	15	1,10446609	0,23281036
Diuron: 10 $\mu\text{g/l}$ – O ₂	1	0,80994149	0,0207623
	2	0,87345159	0,06980709
	3	0,8981012	0,05805929
	4	0,92295496	0,05184187
	5	1	0
	6	0,74469602	0,131378
	7	0,47134393	0,29881086
	8	0,3508456	0,35885776
	9	0,31123457	0,31351101

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	10	0,25349855	0,24855176
	11	0,74357359	0,22142031
	12	0,94165024	0,13649509
	13	1,0255717	0,09392924
	14	1,04616521	0,05015558
	15	1,11888568	0,02436631
Diuron: 10 µg/l – pH	1	1,06209383	0,1426658
	2	1,17506831	0,08032945
	3	1,10574382	0,14617335
	4	1,00511132	0,19606894
	5	1	0
	6	0,99028642	0,12045038
	7	0,85299752	0,07343485
	8	0,69700188	0,10352192
	9	0,59529559	0,19575477
	10	0,76650991	0,15041528
	11	0,94328894	0,18176228
	12	0,91870069	0,1389989
	13	0,9700513	0,32824011
	14	1,07075129	0,17052537
	15	1,05345143	0,19504224
Diuron: 5 µg/l – O ₂	1	0,94330892	0,03069828
	2	0,94159042	0,04297409
	3	0,97424648	0,01304734
	4	1,00182355	0,00400424
	5	1	0
	6	0,84918224	0,11885045
	7	0,78130172	0,13260416
	8	0,71967468	0,12228753
	9	0,69071696	0,16214279
	10	0,56312566	0,25199416
	11	0,73705143	0,20994592
	12	0,86635128	0,17979218
	13	0,86896875	0,15478519
	14	0,89935971	0,19546761
	15	0,90846076	0,24803516
Diuron: 5 µg/l – pH	1		
	2	0,87709451	0,45240746
	3	0,8552757	0,42372849
	4	0,86377433	0,27723033
	5	1	0
	6	0,84128356	0,38666188
	7	0,79361149	0,29681228
	8	0,80173832	0,37947485
	9	0,79869563	0,39745726
	10	0,62362891	0,32324179
	11	0,66425052	0,30968457
	12	0,77070928	0,20338569
	13	0,78925923	0,29592593
	14	0,83589015	0,25685942
	15	0,74729677	0,28912478
Diuron: 1 µg/l – O ₂	1	0,9263764	0,04425581
	2	0,51914338	0,62462527
	3	0,95793173	0,10433732
	4	0,96485252	0,03098665
	5	1	0
	6	0,96001149	0,32809742
	7	0,77485141	0,67269158
	8	1,06859629	0,34940155
	9	1,11739823	0,36413079
	10	1,14521379	0,37150218
	11	1,03609349	0,17401452
	12	1,11140305	0,25460272
	13	1,13027322	0,27818043
	14	1,12035786	0,32176895
	15	1,10925783	0,36615744

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
Diuron: 1 µg/l – pH	1	0,82420315	0,20528662
	2	0,9530171	0,49939877
	3	0,93256061	0,06231326
	4	0,95282329	0,08478997
	5	1	0
	6	1,06492846	0,18180543
	7	0,87510448	0,42903051
	8	1,04406868	0,13646878
	9	1,0373706	0,14094376
	10	1,11074642	0,16407607
	11	0,90243682	0,12122958
	12	1,0304492	0,19540512
	13	1,06379869	0,24877059
	14	0,96560759	0,2167276
	15	1,26864846	0,5145942
Isoproturon: 100 µg/l – O ₂	1	0,89507098	0,13134931
	2	0,89264785	0,04008141
	3	0,91890227	0,00600009
	4	0,94829236	0,03428179
	5	1	0
	6	-0,07779624	0,1521042
	7	-0,22285663	0,26640724
	8	-0,27384055	0,30789336
	9	-0,32598002	0,32553223
	10	-0,33085785	0,36763288
	11	0,55568196	0,10377955
	12	0,81486157	0,08448292
	13	0,94212533	0,14302927
	14	1,02521869	0,17094433
	15	1,12851864	0,19458858
Isoproturon: 100 µg/l – pH	1	0,91776566	0,13551801
	2	0,80052869	0,05982094
	3	1,01736613	0,21586952
	4	1,01963037	0,04753817
	5	1	0
	6	0,32974678	0,1616496
	7	0,50069133	0,43618828
	8	0,47246307	0,45324591
	9	0,49104837	0,38075011
	10	0,51773648	0,51047326
	11	0,84942481	0,2137545
	12	0,88024129	0,01773489
	13	0,94488084	0,06282726
	14	1,13160304	0,21085146
	15	1,05508467	0,22350148
Isoproturon: 10 µg/l – O ₂	1	0,897416504	0,022857746
	2	0,933627237	0,019046291
	3	1,003909385	0,092422869
	4	1,038767045	0,060358994
	5	1	0
	6	0,462313175	0,601425962
	7	0,674642092	0,172937874
	8	0,655718534	0,114407606
	9	0,370312089	0,342316928
	10	0,62220328	0,037784621
	11	0,736172509	0,100315943
	12	0,854436515	0,063358324
	13	0,901390215	0,092982913
	14	0,959632922	0,079618558
	15		
Isoproturon: 10 µg/l – pH	1	1,22144967	0,21680543
	2	1,13663229	0,13289071
	3	1,13908498	0,0540651
	4	1,18665844	0,2076504
	5	1	0
	6	0,87659066	0,21685721
	7	0,84439241	0,13702132

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	8	1,02738821	0,1703878
	9	1,00655879	0,19660026
	10	1,04875457	0,2300462
	11	1,10170991	0,13435676
	12	1,09407958	0,42484669
	13	1,34155523	0,35489892
	14	1,24683658	0,3035993
	15	1,05346646	0,0164943
Isoproturon: 5 µg/l – O ₂	1	1,00593525	0,08811675
	2	0,98391347	0,10687644
	3	0,86013558	0,30288211
	4	1,02599082	0,13837725
	5	1	0
	6	0,96491805	0,15781494
	7	0,94917815	0,17786711
	8	1,02358365	0,14862492
	9	0,96340018	0,22683783
	10	0,98030742	0,21316957
	11	1,22722358	0,09777104
	12	1,10571854	0,25578277
	13	1,14820611	0,25169826
	14	1,268735	0,08555848
	15	1,17649034	0,29447993
Isoproturon: 5 µg/l – pH	1	1,28239482	0,57099554
	2	0,89702695	0,11158189
	3	1,17841863	0,48904677
	4	0,85110555	0,22699893
	5	1	0
	6	0,85166956	0,34187598
	7	1,07285665	0,43728213
	8	0,82965434	0,15321185
	9	0,78551121	0,21709179
	10	1,07645922	0,49169285
	11	1,23151861	0,89516164
	12	0,78028641	0,30126143
	13	1,00454745	0,6085927
	14	0,88708097	0,48463697
	15	1,20123289	0,89210146
Metamitron: 500 µg/l – O ₂	1	0,92114212	0,02707806
	2	0,9516109	0,03805887
	3	0,95844992	0,02218027
	4	1,01359803	0,07772824
	5	1	0
	6	0,69179554	0,10683617
	7	0,62217806	0,22779469
	8	0,65681344	0,19097354
	9	0,65823482	0,2174041
	10	0,72315596	0,35596362
	11	0,89357523	0,15172283
	12	0,95791761	0,14739997
	13	0,8681848	0,13941754
	14	1,00750941	0,12215228
	15	1,03500456	0,12313695
Metamitron: 500 µg/l – pH	1	1,11890237	0,01877593
	2	1,14253324	0,10306647
	3	1,19750641	0,21990206
	4	1,23164238	0,25318866
	5	1	0
	6	0,88407791	0,20177453
	7	0,94189093	0,22210392
	8	0,92404663	0,22485374
	9	0,96610643	0,18391852
	10	0,83521712	0,25107885
	11	1,15652258	0,23391397
	12	0,97921572	0,46358736
	13	1,17680487	0,28425738
	14	1,25204307	0,21842642

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	15	1,21385528	0,25861128
Metamitron: 250 µg/l – O ₂	1	1,03272928	0,04844746
	2	1,04204928	0,03324654
	3	1,04519125	0,04483693
	4	1,03268517	0,0388296
	5	1	0
	6	0,52399212	0,20386482
	7	0,43184407	0,28309144
	8	0,46692657	0,24496939
	9	0,33819106	0,42605338
	10	0,42547179	0,27674769
	11	0,68333951	0,11842127
	12	0,79793454	0,14207267
	13	0,79326492	0,15219495
	14	0,79763195	0,15336657
	15	0,8064686	0,15096953
Metamitron: 250 µg/l – pH	1	1,26507255	0,50676095
	2	2,33053181	1,922085
	3	1,19330021	0,53216555
	4	1,57167635	1,13619265
	5	1	0
	6	0,81379271	0,1223512
	7	0,92930059	0,17959179
	8	0,60446889	0,38360034
	9	1,12061815	0,42018776
	10	0,98969841	0,20865842
	11	0,83558857	0,24044329
	12	1,11021976	0,46309964
	13	0,86700579	0,20043193
	14	1,09549252	0,3811087
	15	0,9559869	0,13623082
Metamitron: 100 µg/l – O ₂	1	0,95315636	0,08707735
	2	1,0039277	0,08168675
	3	0,97401648	0,04542302
	4	1,02002552	0,06625945
	5	1	0
	6	0,45500007	0,07994465
	7	0,36783209	0,06390085
	8	0,34951601	0,12354716
	9	0,34348184	0,10852118
	10	0,32142179	0,07264523
	11	0,85630557	0,06502399
	12	0,89534947	0,21744512
	13	0,87789585	0,23929081
	14	0,85959897	0,28588182
	15	0,90017585	0,35810462
Metamitron: 100 µg/l – pH	1	0,689232	0,48544652
	2	0,79900315	0,36246142
	3	0,33578508	0,98214636
	4	0,50828181	0,81110374
	5	1	0
	6	0,63154167	0,53045688
	7	0,49706558	0,37951868
	8	0,71777445	0,43852717
	9	0,73041703	0,35619142
	10	0,09649726	1,76571715
	11	0,80935885	0,39265929
	12	0,70625161	0,56879858
	13	0,74682394	0,5864705
	14	0,89371132	0,52862542
	15	0,70835266	0,51908041
Metazachlor: 500 µg/l – O ₂	1	0,67471685	0,08540241
	2	0,75870211	0,08965725
	3	0,86141081	0,06288219
	4	0,88036046	0,12055007
	5	1	0

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	6	0,65477786	0,00778908
	7	0,58194264	0,11635017
	8	0,45464474	0,32164256
	9	0,57215613	0,10433691
	10	0,55956162	0,15503732
	11	0,78131385	0,27493671
	12	0,87875226	0,30868655
	13	0,94349698	0,34068004
	14	0,9764451	0,37567741
	15	0,96126984	0,44024107
Metazachlor: 500 µg/l – pH	1	1,06106322	0,60315203
	2	1,01813437	0,67109929
	3	1,4824079	0,59439412
	4	1,0813895	0,31739019
	5	1	0
	6	0,99464036	0,51147706
	7	1,15492515	0,42766398
	8	1,1037947	0,33830651
	9	1,10748093	0,42050389
	10	1,11828157	0,28594881
	11	1,12862423	0,26325154
	12	1,19276333	0,28789334
	13	1,2287802	0,26370067
	14	1,07818959	0,19297333
	15	1,2094751	0,27832402
Metazachlor: 250 µg/l – O ₂	1	0,95316365	0,11814524
	2	0,85155523	0,30260514
	3	0,90834783	0,03020181
	4	0,95476025	0,06843779
	5	1	0
	6	0,85219692	0,26600572
	7	0,84634371	0,27815078
	8	0,75451732	0,42349931
	9	0,76268387	0,3941525
	10	0,73305017	0,46437591
	11	0,77394455	0,55505463
	12	1,09079985	0,83094145
	13	1,20388295	0,28566189
	14	1,06901421	0,13433253
	15	1,08179265	0,10317133
Metazachlor: 250 µg/l – pH	1	0,95202611	0,19109588
	2	0,8196883	0,13440653
	3	0,95285485	0,01132264
	4	1,05789865	0,09213804
	5	1	0
	6	0,78002241	0,05473451
	7	0,7818712	0,09385049
	8	0,86762615	0,42593144
	9	0,77529468	0,20899876
	10	0,75963102	0,26700353
	11	0,75185844	0,30222368
	12	0,65167842	0,10060714
	13	0,83402116	0,19616976
	14	0,86789905	0,41523365
	15	0,86270402	0,38866629
Metazachlor: 100 µg/l – O ₂	1	1,06830425	0,31303136
	2	0,99680559	0,0940852
	3	0,95760064	0,21668908
	4	0,99110531	0,04365664
	5	1	0
	6	0,72581395	0,11453557
	7	0,73295032	0,19114479
	8	0,77774651	0,28581484
	9	0,54647408	0,33965155
	10	0,52449153	0,38201325
	11	0,70522271	0,19479789
	12	0,80834456	0,15502715

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	13	0,9141023	0,24407251
	14	0,89751706	0,20435579
	15	0,78569932	0,28658772
Metazachlor: 100 µg/l – pH	1	1,03705717	0,17698699
	2	1,09566977	0,55957283
	3	0,71073784	0,23676722
	4	0,94431173	0,03154687
	5	1	0
	6	0,63330027	0,7259816
	7	1,27614374	0,51903404
	8	1,08938686	0,12211279
	9	0,97197363	0,10134708
	10	1,49625983	0,90747826
	11	1,07834728	0,02964102
	12	0,95180506	0,23757673
	13	1,0642132	0,02961859
	14	0,89254632	0,45258534
	15	0,96497487	0,53648072
Metazachlor: 10 µg/l – O ₂	1	1,02106373	0,13265229
	2	1,07877634	0,10353677
	3	1,0254304	0,15400724
	4	1,00902543	0,17994256
	5	1	0
	6	0,21124131	0,75561323
	7	0,4325154	0,36790076
	8	0,34073107	0,40538141
	9	0,44924713	0,3070701
	10	0,33096827	0,46928415
	11	1,05684843	0,7564857
	12	0,93982144	0,59043823
	13	0,93478767	0,61091798
	14	0,85026832	0,39812818
	15	0,85968666	0,40030088
Metazachlor: 10 µg/l – pH	1	0,76551449	0,48075869
	2	0,97330825	0,48143632
	3	0,92195022	0,2348711
	4	1,24478581	0,50394461
	5	1	0
	6	0,91668477	0,33538968
	7	1,41321245	0,51828937
	8	1,7588238	1,22251819
	9	1,26631679	0,59361748
	10	1,0941053	0,22101721
	11	1,52000482	0,46034054
	12	2,40171087	1,47090288
	13	1,97843446	0,79123828
	14	1,60685	0,27470515
	15	1,31711595	0,23843569
Pirimicarb: 300 µg/l – O ₂	1	1,01805744	0,18982794
	2	1,05090345	0,17815114
	3	1,06549675	0,19835689
	4	1,09417622	0,21090791
	5	1	0
	6	0,83804535	0,11441629
	7	0,82019505	0,13538622
	8	0,84123311	0,11199873
	9	0,80833804	0,07875346
	10	0,91563603	0,29591333
	11	1,00162477	0,22839617
	12	1,02575348	0,20567747
	13	1,08322392	0,16170153
	14	1,09358293	0,14921442
	15	1,11190793	0,16794478
Pirimicarb: 200 µg/l – O ₂	1	0,88324449	0,08186987
	2	0,9400378	0,03572229
	3	1,03156565	0,06747733

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	4	0,97970447	0,00489393
	5	1	0
	6	0,59131084	0,17588862
	7	0,57188983	0,18851277
	8	0,52913629	0,22574433
	9	0,5195653	0,24138607
	10	0,49718511	0,27386968
	11	0,79393784	0,18943382
	12	0,94825964	0,14440971
	13	0,91128342	0,2635335
	14	0,90631436	0,25137219
	15	0,94400637	0,2738864
Pirimicarb: 100 µg/l – O ₂	1	0,89228695	0,13303285
	2	0,94552907	0,14392864
	3	0,92614418	0,06090681
	4	1,00040748	0,04274183
	5	1	0
	6	0,68793056	0,13674926
	7	0,62086333	0,26434558
	8	0,69987706	0,15417315
	9	0,63488401	0,24722148
	10	0,62309126	0,35863146
	11	0,92687984	0,32063161
	12	1,12547993	0,11929791
	13	1,12710836	0,13591653
	14	1,30529465	0,29510651
	15	1,12348183	0,13666776
Pirimicarb: 50 µg/l – O ₂	1	0,92589468	0,01735452
	2	0,94754925	0,01652785
	3	0,97231873	0,03106714
	4	0,99877376	0,03052457
	5	1	0
	6	0,76465961	0,20219952
	7	0,74418808	0,20695917
	8	0,64115141	0,32553996
	9	0,56672279	0,38961914
	10	0,75582782	0,22660012
	11	0,8451553	0,1358259
	12	1,01753681	0,22981632
	13	1,1256108	0,31811513
	14	1,18742205	0,41422753
	15	1,1804088	0,42488243
17α-EE: 100 µg/l – O ₂	1	1,03589748	0,14884629
	2	1,25971305	0,25801344
	3	1,02946807	0,16880757
	4	1,08310801	0,1781953
	5	1	0
	6	0,05148937	0,72975173
	7	-0,17638425	0,90298605
	8	-0,11444841	0,7552291
	9	-0,51515627	1,16481061
	10	-0,53017851	1,06706742
	11	1,02897559	1,85890012
	12	1,38419782	1,58994152
	13	1,68789325	1,52275722
	14	1,51481434	1,00981032
	15	1,69785629	1,10546847
17α-EE: 10 µg/l – O ₂	1	0,90686622	0,05214389
	2	0,88290112	0,0565496
	3	0,94066599	0,07721334
	4	0,99063958	0,03549626
	5	1	0
	6	0,67368121	0,12870263
	7	0,65556843	0,13999491
	8	0,69359063	0,13744403
	9	0,69342381	0,17375764
	10	0,68994942	0,18365482

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	11	1,19848001	0,15935772
	12	1,28469626	0,16007444
	13	1,31766548	0,16414501
	14	1,25029763	0,05903418
	15	1,07206667	0,39536997
17 α -EE: 1 μ g/l – O ₂	1	0,90597909	0,29345834
	2	0,89183897	0,08092064
	3	1,23065352	0,63247899
	4	1,06768102	0,27148365
	5	1	0
	6	0,99507411	0,08116349
	7	0,84974987	0,17932347
	8	1,03816807	0,09703855
	9	1,01474522	0,14244421
	10	1,13153359	0,07247319
	11	0,90935668	0,20238488
	12	1,09732993	0,30443895
	13	1,05519057	0,29902162
	14	1,08960488	0,23665846
	15	0,83386951	0,34630102
Hell-Dunkel-Reaktion – O ₂	1	0,76495566	0,39846485
	2	1,15856866	0,07462192
	3	1,07792311	0,17804652
	4	1	0
	5	-1,23027316	1,44687173
	6	-1,36273474	1,23721417
	7	-1,3816262	1,13010366
	8	-1,28956502	1,07653145
	9	0,35591184	0,12508968
	10	1,13117106	0,11886756
	11	1,09092888	0,16983729
	12	1,21548328	0,08252372
	13	1,32012114	0,29329926
	14		
	15		
Hell-Dunkel-Reaktion – pH	1	1,08708176	0,49244177
	2	0,91028331	0,10220748
	3	1,07222297	0,25029256
	4	1	0
	5	-0,37662708	0,85635878
	6	-0,0691808	0,44334719
	7	-0,01933064	0,3508211
	8	-0,02542783	0,34369186
	9	1,43125358	0,51952629
	10	1,52316922	0,36637474
	11	2,04657886	1,1465714
	12	1,3627333	0,07398174
	13	1,35319567	0,06641939
	14		
	15		
Langzeit-Messung: 2785 μ g/l Phosphor – O ₂	1	15,4211833	7,41314611
	2	16,2724	4,29387356
	3	15,9199667	3,93068727
	4	17,2885667	3,88321015
	5	17,2266333	2,99635001
	6	17,0505333	3,56804041
	7	18,1607667	3,15108234
	8	19,5273	2,00854669
	9	19,5025	0,88746775
	10	19,4389	2,48742383
	11	18,9398667	1,4207868
	12	19,1030667	2,73504432
	13	19,8260667	2,96781989
	14	19,3586	3,27645957
	15	19,0109667	3,33083745
	16	18,9854	3,52101165

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	17	19,1018667	2,38542366
	18	19,4199667	1,81669133
	19	19,0350333	2,89450003
	20	19,9049333	1,27913485
	21	20,0054	1,51526212
	22	19,0246333	2,21757843
	23	20,1896	1,39038245
	24	20,1194333	2,06336506
	25	20,1579	0,40915507
	26	20,6118	0,72837902
	27	21,215	0,97653131
	28	20,6318	1,96740523
	29	20,4595	2,70249232
	30	21,0229333	1,71218347
	31	21,2006	1,73707432
	32	21,0673	1,65610839
	33	21,0081333	1,95807845
	34	21,6497333	2,76281783
	35	21,7049667	2,87971461
	36	21,9086667	3,01873984
	37	20,9220333	2,68430964
	38	21,4395333	2,68335995
	39	22,6674667	1,89884348
	40	23,3109333	2,69707916
	41	23,3817	2,71717145
	42	23,4996333	2,65879119
	43	23,6208	2,39983569
	44	24,1861667	2,56263101
	45	24,6471333	2,52495549
	46	24,6685333	2,31645943
	47	25,492	1,67820606
	48	25,4779333	2,14283567
	49	24,0039333	2,46810369
	50	25,4146667	2,32162673
	51	26,6797	1,68186436
	52	26,4441	2,52424153
	53	26,8112667	0,65115682
	54	28,474	1,35669633
	55	28,4111	4,54067033
	56	29,8303	3,19782308
	57	28,4452667	3,95272203
	58	28,5993333	3,1663259
	59	29,9661667	1,10508042
	60	30,2088333	4,15050114
Langzeit-Messung: 2785 µg/l Phosphor – pH	1	0,02304667	0,02207982
	2	0,04244483	0,08490031
	3	0,02941692	0,02191378
	4	0,04424264	0,02797444
	5	0,04422463	0,01867455
	6	0,04297679	0,02432275
	7	0,0589233	0,02389625
	8	0,06015336	0,02198944
	9	0,06631003	0,03159091
	10	0,05090721	0,00387044
	11	0,07047333	0,02874601
	12	0,04917968	0,00861216
	13	0,04156847	0,00713732
	14	0,05672404	0,02059663
	15	0,05557663	0,01981539
	16	0,04724646	0,01882643
	17	0,04974692	0,02323558
	18	0,05489789	0,0184404
	19	0,0486209	0,00379504
	20	0,04187568	0,00194494
	21	0,0528405	0,01431177
	22	0,04908299	0,00752967
	23	0,05556768	0,01806745
	24	0,04664506	0,00069238
	25	0,04924068	0,01911581

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	26	0,05659301	0,02228117
	27	0,04090557	0,00165371
	28	0,05003528	0,0062442
	29	0,04362334	0,01596055
	30	0,06778927	0,06061927
	31	0,06863199	0,05100925
	32	0,08883328	0,08652529
	33	0,08070531	0,06973016
	34	0,06074908	0,02958565
	35	0,05839033	0,02128667
	36	0,06142104	0,02452461
	37	0,06399531	0,03694897
	38	0,06300727	0,02835901
	39	0,06902854	0,02985344
	40	0,06732087	0,02025988
	41	0,06379376	0,01794316
	42	0,07047042	0,02665359
	43	0,07033011	0,02487406
	44	0,08164303	0,03514695
	45	0,0842606	0,05143502
	46	0,03359483	0,0202077
	47	0,07775643	0,01636009
	48	0,0850673	0,0027457
	49	0,07810157	0,08990325
	50	0,11802177	0,10758842
	51	0,08339536	0,03612246
	52	0,08157651	0,02351048
	53	0,08139302	0,02172555
	54	0,0801881	0,01370274
	55	0,1101127	0,07928838
	56	0,08508517	0,02988148
	57	0,08170719	0,01144719
	58	0,08453334	0,01609844
	59	0,09286531	0,02461703
	60	0,06108313	0,01876138
	61	0,09518061	0,02320182
	62	0,08306573	0,00210251
	63	0,09035217	0,00758259
	64	0,09508271	0,01286597
	65	0,09318318	0,00662738
	66	0,08699506	0,01293551
	67	0,05874741	0,02168762
	68	0,0805744	0,02453236
	69	0,077475	0,0633733
Langzeit-Messung: 50 µg/l Phosphor – O ₂	1	2,46542333	1,19771044
	2	3,20064	0,69201274
	3	4,07409333	1,96707201
	4	3,67351333	1,29044588
	5	3,87100333	1,45937353
	6	4,13406	1,56886975
	7	3,58226333	1,47086553
	8	4,25280333	2,44793351
	9	5,10804333	3,28583503
	10	5,94333	4,10131807
	11	6,40964	4,6424124
	12	6,76097667	5,23148336
	13	7,01582333	5,73749338
	14	7,44746	5,82612519
	15	7,81889	5,86088499
	16	8,04458	6,04220037
	17	8,31194	6,15847309
	18	8,66621	6,11986282
	19	8,86374667	5,98606897
	20	8,91641333	6,04802069
	21	9,22173667	6,38408507
	22	9,66933	6,56009357
	23	9,71563333	6,24870259
	24	9,9135	6,58233832
	25	10,0290267	6,48891632

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	26	10,4166	6,81873203
	27	10,81965	7,06211182
	28	10,74224	7,22364649
	29	10,6469333	7,25428892
	30	10,5735	8,17233639
	31	10,2454867	7,26966826
	32	10,0525433	6,94116928
	33	9,51171333	6,50553443
	34	9,47568667	6,33125947
	35	10,0913633	7,74430622
	36	9,54494667	6,88736469
	37	9,33238333	7,10795447
	38	9,65912	9,4205679
	39	10,8221733	9,07945817
	40	11,08323	9,38470065
	41	10,5944567	8,85361554
	42	9,56855	6,90527585
	43	10,4422967	8,46039598
	44	9,24685333	6,85429787
	45	10,99258	8,50613859
	46	9,53741	6,27498251
	47	10,8083733	8,59424809
	48	8,65536667	6,57507939
	49	10,7587867	9,35581615
	50	9,08128667	7,15010074
	51	10,0031433	8,55254455
	52	8,69707333	6,72132344
	53	10,1106933	8,78600116
	54	9,28410333	7,34034259
	55	4,55137333	5,01830897
	56	8,87240667	6,58119506
	57	9,31571333	7,0041536
	58	10,28241	8,28447667
	59	10,6343367	8,72022391
	60	9,89954333	7,56007057
Langzeit-Messung: 50 µg/l Phosphor – pH	1	0,08274278	0,00835146
	2	0,08445259	0,00385895
	3	0,0843419	0,01427946
	4	0,0933751	0,01135974
	5	0,10000555	0,00375643
	6	0,08941636	0,01856033
	7	0,10235603	0,02418372
	8	0,13876433	0,06441031
	9	0,13600494	0,04928315
	10	0,14728896	0,06114032
	11	0,14312199	0,06811727
	12	0,14153103	0,06321062
	13	0,151545	0,0587883
	14	0,15703056	0,06272288
	15	0,140267	0,08341628
	16	0,1574381	0,06244387
	17	0,15600167	0,05761571
	18	0,15443258	0,05857754
	19	0,1590465	0,06233748
	20	0,16398417	0,06492643
	21	0,16254083	0,05495493
	22	0,16055208	0,05728249
	23	0,16620683	0,06270103
	24	0,15078633	0,04584647
	25	0,15308733	0,04960096
	26	0,16453408	0,03918523
	27	0,15370667	0,04707566
	28	0,15606592	0,04996472
	29	0,14623008	0,05073315
	30	0,15372267	0,04735774
	31	0,15480748	0,05525407
	32	0,1713035	0,05658905
	33	0,15196891	0,05383775
	34	0,15679256	0,05486201

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	35	0,15095717	0,05599789
	36	0,15473275	0,05906769
	37	0,16002842	0,05423343
	38	0,15208928	0,05798156
	39	0,17365861	0,06527823
	40	0,17925588	0,07162479
	41	0,18350258	0,07259027
	42	0,18228002	0,07147679
	43	0,18342607	0,07338063
	44	0,18615954	0,07683036
	45	0,18729158	0,08152761
	46	0,18630989	0,07294082
	47	0,18552268	0,07887239
	48	0,1867701	0,07921802
	49	0,1651864	0,07893625
	50	0,185661	0,07868858
	51	0,17705563	0,0768595
	52	0,17741665	0,07623996
	53	0,19184467	0,08223863
	54	0,18799183	0,08335135
	55	0,18706564	0,07968828
	56	0,17995212	0,07264833
	57	0,18075253	0,07137771
	58	0,17755724	0,06644331
	59	0,17599368	0,06678874
	60	0,17433858	0,06497411
	61	0,18970823	0,08075701
	62	0,18451309	0,07532381
	63	0,18512274	0,07764583
	64	0,19441339	0,08905819
	65	0,19750467	0,08694835
	66	0,19132058	0,08259167
	67	0,19439092	0,07839377
	68	0,20053908	0,09068824
	69	0,18405048	0,07243741
Langzeit-Messung: 10 µg/l Phosphor – O ₂	1	6,12433	4,66087657
	2	6,79138	4,47440297
	3	6,61048333	4,48331589
	4	6,43597667	4,76790044
	5	6,72975	4,3517233
	6	6,30804	4,330336
	7	6,15061	4,29872437
	8	6,69269333	4,31594381
	9	6,46560333	3,74998615
	10	6,61382	3,69949766
	11	6,29511	4,02782599
	12	6,01247667	3,57788612
	13	6,54021333	3,76431894
	14	7,75582667	1,87636361
	15	6,53610333	3,19147828
	16	6,67173667	3,7250886
	17	6,11364333	3,39469318
	18	6,35239	3,2481259
	19	6,25244	3,05297538
	20	6,32145667	3,02844295
	21	4,18272	6,69054897
	22	6,15940333	3,35206658
	23	6,5936	2,70710924
	24	6,72554667	2,68806354
	25	6,40935667	2,56478546
	26	6,70327	2,46979468
	27	7,20842333	2,72921009
	28	7,17513333	2,23908315
	29	7,01846	2,28434004
	30	6,74533	2,20060512
	31	5,92240667	3,33476433
	32	7,08528667	1,89451124
	33	6,75172333	2,04072471
	34	5,709875	4,61962456

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	35	7,00379	2,2389363
	36	6,68223333	1,68956772
	37	6,71595333	2,07089882
	38	6,74033333	2,10022814
	39	6,70973667	2,04792112
	40	5,70186667	2,0170438
	41	5,89998333	1,68287876
	42	6,07667333	1,99634908
	43	6,04703667	1,94069468
	44	5,69122	1,93633404
	45	5,83606667	2,21398694
	46	5,96553333	1,74269325
	47	5,88900333	1,79717627
	48	4,66581667	3,27307226
	49	5,56678	2,04805698
	50	5,48752667	1,94902892
	51	5,53151	2,11458545
	52	5,42069333	1,90693888
	53	5,54647333	2,16913852
	54	5,30948	2,27081481
	55	5,76415667	2,07251438
	56	5,44823667	2,47186387
	57	5,42880667	2,35909994
	58	5,57596333	2,44437139
	59	5,77665	2,33542114
	60	5,74437667	2,4331874
Langzeit-Messung: 10 µg/l Phosphor – pH	1	0,147067	
	2	0,192713	0,05810509
	3	0,16060875	0,0608648
	4	0,17252892	0,05416736
	5	0,14849409	0,06673499
	6	0,15257896	0,06094227
	7	0,14815692	0,0552465
	8	0,13945208	0,06472673
	9	0,14158122	0,04560206
	10	0,16176823	0,07305831
	11	0,14901884	0,0995294
	12	0,176987	0,05528903
	13	0,13329493	0,05460198
	14	0,12629845	0,0500036
	15	0,141256	0,0308592
	16	0,17988448	0,06958423
	17	0,14498025	0,037204
	18	0,13629963	0,04079572
	19	0,12509289	0,03894516
	20	0,13786665	0,0380654
	21	0,13062996	0,04061377
	22	0,13328928	0,03764266
	23	0,14011142	0,00988948
	24	0,13022568	0,04009606
	25	0,13994111	0,03904141
	26	0,13084427	0,0388431
	27	0,11991525	0,03143627
	28		
	29	0,1590895	0,09459647
	30	0,16467231	0,12102375
	31	0,11705458	0,01619208
	32	0,05279145	0,09514212
	33	0,12627258	0,03487168
	34	0,07173889	0,04208996
	35	0,10669786	0,00624072
	36	0,13792374	0,05863712
	37	0,11232468	0,00449706
	38	0,09093812	0,02590561
	39	0,11920635	0,0237929
	40	0,11934783	0,04951665
	41	0,10346227	0,00762943
	42	0,04851216	0,09550954
	43	0,111025	0,02491982

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	44	0,14415317	0,07714265
	45	0,13846477	0,05548031
	46	0,09460413	0,00159214
	47	0,1102609	0,0151779
	48	0,13317252	0,06200976
	49	0,09456731	0,01663454
	50	0,0870471	0,02358282
	51	0,09942484	0,01057143
	52	0,09933534	0,00665547
	53		
	54	0,08723211	0,02150525
	55	0,08912267	0,00926552
	56	0,09053977	0,01263385
	57	0,11037892	0,02415502
	58	0,10661613	0,01391023
	59	0,06775987	0,03505255
	60	0,11429093	0,0244175
	61	0,12065496	0,04228075
	62		
	63	0,16162845	0,13297017
	64	0,06859843	0,05151557
	65	0,12212086	0,04301928
	66	0,14591895	0,08895809
	67	0,08864779	0,02590031
	68	0,10298708	0,02800119
	69	0,09605957	0,01254785
Langzeit-Messung: 0 µg/l Phosphor – O ₂	1	2,37789007	2,9685556
	2	1,88375233	2,40390578
	3	3,66150667	1,24654001
	4	1,82753533	1,66091967
	5	3,42236	1,79342474
	6	3,29406	1,27789003
	7	3,36161	0,46381494
	8	3,4491	0,54485463
	9	3,62001	0,39989152
	10	3,76820333	0,34861136
	11	3,78243333	0,48587722
	12	3,98073	0,57577948
	13	4,35302	0,50005306
	14	4,24203333	0,74929483
	15	4,43975667	0,50968093
	16	4,40588	0,68538527
	17	4,40706667	0,75101389
	18	4,51896	0,700689
	19	4,46352333	0,94706973
	20	4,68062667	1,10620107
	21	4,6415	1,1846018
	22	4,72919333	1,10704556
	23	4,46017	1,15862647
	24	4,65513333	1,30213474
	25	4,80789	1,05558634
	26	4,74424333	1,27968583
	27	5,07416333	1,2084402
	28	4,66070667	1,59968512
	29	4,67130333	1,06109406
	30	4,58087	0,90340119
	31	5,09059333	0,93238485
	32	5,15679667	1,2896311
	33	4,72491667	1,35600792
	34	4,79001333	0,99653863
	35	5,02704667	1,04524063
	36	5,00786333	1,03178191
	37	4,87123667	1,02607845
	38	4,92956667	0,97148799
	39	4,90184	0,97037198
	40	4,82557	1,14408974
	41	4,87229333	1,00357674
	42	5,13925333	0,89757888
	43	5,14688333	0,55972786

Anhang

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	44	5,20361	0,76425253
	45	5,3648	0,61771465
	46	5,51702667	0,61231622
	47	5,24645667	0,7583249
	48	5,25048333	0,6708797
	49	5,32474333	0,75310709
	50	5,66933	0,52787599
	51	5,34575	0,80930229
	52	5,22688667	0,5481995
	53	5,2912	0,41926453
	54	5,513	0,39363234
	55	5,82004333	0,3528548
	56	5,57653333	0,74308834
	57	5,17139667	0,53994926
	58	5,45950333	0,35639638
	59	5,29457	0,50537649
	60		0,42693505
Langzeit-Messung: 0 µg/l Phosphor – pH	1	0,03673801	0,0394187
	2	0,02819827	0,01708539
	3		
	4		
	5	0,03118823	0,00221646
	6	0,05059531	0,0184107
	7	0,03478961	0,01547914
	8	0,03774164	0,00470688
	9	0,03959245	0,00462578
	10	0,04134702	0,00734322
	11	0,05149453	0,00855257
	12	0,04447537	0,00118336
	13	0,04184613	0,00955
	14	0,04442684	0,01222227
	15	0,05286942	0,00575582
	16	0,05350958	0,00826039
	17	0,04842353	0,01216973
	18	0,05144496	0,00822678
	19	0,05291954	0,01023497
	20	0,04930918	0,01990033
	21	0,05497101	0,01445589
	22	0,05005928	0,01343068
	23	0,05897191	0,01432898
	24	0,06180354	0,01942403
	25	0,06096371	0,01563193
	26	0,06309563	0,02460422
	27	0,05499223	0,00975301
	28	0,05951801	0,01632604
	29	0,06183587	0,01522669
	30	0,05643776	0,01751675
	31	0,05515292	0,01788054
	32	0,05760902	0,01333068
	33	0,06083911	0,0206445
	34	0,05517013	0,00724578
	35	0,04787147	0,01104378
	36	0,05806596	0,01267865
	37	0,05642861	0,01097137
	38	0,06082578	0,01672643
	39	0,0656314	0,0192848
	40	0,06082428	0,01620041
	41	0,07111786	0,02505429
	42	0,06461688	0,02192306
	43	0,07081632	0,0175743
	44	0,0724799	0,01575996
	45	0,0735444	0,01461308
	46	0,06950562	0,00244275
	47	0,07993553	0,016561
	48	0,08029365	0,02119194
	49	0,07047993	0,00537231
	50	0,07220697	0,01265921
	51	0,06846102	0,01276242
	52	0,07259299	0,01320224

Versuch	Messzyklus	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
	53	0,07342402	0,0037204
	54	0,07228374	0,01172666
	55	0,08212995	0,01668112
	56	0,07459421	0,0153165
	57	0,07357683	0,01047167
	58	0,07202547	0,00341479
	59	0,06613937	0,00871796
	60	0,06894087	0,00190945
	61	0,06890313	0,00376657
	62	0,07786636	0,00378248
	63	0,07029347	0,00640338
	64		
	65	0,06685204	0,0136405
	66	0,1134458	0,07144868
	67	0,06525205	0,02804706
	68	0,07318676	0,01887795
	69	0,08033015	0,01446887

KORRELATION ZWISCHEN DER SCHADSTOFFKONZENTRATION UND DER RELATIVEN SAUERSTOFFSTEIGUNG BZW. DER RELATIVEN PH-WERT-STEIGUNG

Versuch	Mittelwert [ru]	Standardabweichung [ru]
Diuron: 100 µg/l – O ₂	-0,277468723	0,12538345
Diuron: 100 µg/l – pH	0,45681305	0,09688976
Diuron: 10 µg/l – O ₂	0,426323734	0,19506328
Diuron: 10 µg/l – pH	0,78041826	0,05260883
Diuron: 5 µg/l – O ₂	0,720800254	0,72080025
Diuron: 5 µg/l – pH	0,78130172	0,13260416
Diuron: 1 µg/l – O ₂	1,013214242	0,150825
Diuron: 1 µg/l – pH	1,02644373	0,07133372
Isoproturon: 100 µg/l – O ₂	-0,24626626	0,10392367
Isoproturon: 100 µg/l – pH	0,42468512	0,06364989
Isoproturon: 10 µg/l – O ₂	0,55703783	0,13384174
Isoproturon: 10 µg/l – pH	0,96073693	0,09341545
Isoproturon: 5 µg/l – O ₂	0,97627749	0,02865026
Isoproturon: 5 µg/l – pH	0,9232302	0,14027748
Metamitron: 500 µg/l – O ₂	0,67043556	0,03840214
Metamitron: 500 µg/l – pH	0,93249671	0,01251002
Metamitron: 250 µg/l – O ₂	0,43728512	0,06779659
Metamitron: 250 µg/l – pH	0,89157575	0,19493088
Metamitron: 100 µg/l – O ₂	0,36745036	0,0516717
Metamitron: 100 µg/l – pH	0,5346592	0,26202943
Metazachlor: 500 µg/l – O ₂	0,5646166	0,071773
Metazachlor: 500 µg/l – pH	1,09582454	0,06007253
Metazachlor: 250 µg/l – O ₂	0,7897584	0,05543296
Metazachlor: 250 µg/l – pH	0,79288909	0,04268558
Metazachlor: 100 µg/l – O ₂	0,66149528	0,11700103
Metazachlor: 100 µg/l – pH	1,09341286	0,32486287
Metazachlor: 10 µg/l – O ₂	0,35294064	0,09528594
Metazachlor: 10 µg/l – pH	0,35294064	0,09528594
Pirimicarb: 300 µg/l – O ₂	0,84468952	0,04186558
Pirimicarb: 200 µg/l – O ₂	0,54181747	0,03873616
Pirimicarb: 100 µg/l – O ₂	0,65332924	0,03765816
Pirimicarb: 50 µg/l – O ₂	0,69450994	0,08707104
17α-EE: 100 µg/l – O ₂	-0,25693562	0,25654273
17α-EE: 10 µg/l – O ₂	0,6812427	0,01653029
17α-EE: 1 µg/l – O ₂	1,00585417	0,10173902

REFERENZ-MESSUNGEN MIT SCHADSTOFFEN OHNE ALGEN

Versuch	Messzyklus	Mittelwert
GM – O ₂	1	-6,36154
	2	-5,32028
	3	-4,29863
	4	-4,51285
	5	-3,98907
	6	-4,09498
Metamitron: 1000µg/l – O ₂	7	-5,05352
	8	-5,7222
	9	-5,90294
Metazachlor: 1000µg/l – O ₂	10	-5,64231
	11	-5,13996
	12	-5,06609
GM – pH	1	0,19791375
	2	0,166292
	3	0,27207325
	4	0,08383599
	5	0,13294023
	6	0,15068543
Metamitron: 1000 µg/l – pH	7	0,12638178
	8	0,12755803
	9	0,06379087
Metazachlor: 1000 µg/l – pH	10	-0,02438075
	11	-0,017723
	12	0,0631607
GM – O ₂	1	1,37213
	2	1,26088
	3	1,25887
Isoproturon: 1000 µg/l – O ₂	4	1,21845
	5	1,26718
	6	1,47479
Pirimicarb: 1000 µg/l – O ₂	7	0,64772
	8	0,998294
	9	0,865054
17α-EE: 1000 µg/l – O ₂	10	2,27135
	11	1,28137
	12	1,02318
GM – pH	1	0,02013643
	2	0,00462145
	3	0,0031218
Isoproturon: 1000 µg/l – pH	4	0,02819692
	5	0,03315907
	6	0,03025937
Pirimicarb: 1000 µg/l – pH	7	0,03830077
	8	0,02857755
	9	0,06700127
17α-EE: 1000 µg/l – pH	10	0,02558457
	11	0,04473
	12	0,01522061
GM – O ₂	1	1,26145
	2	1,31071
	3	1,31489
	4	1,03856
Diuron: 1000 µg/l – O ₂	5	0,669708
	6	1,28591
	7	0,92301
	8	0,81656
GM – pH	1	1,26145
	2	1,31071
	3	1,31489
	4	1,03856
Diuron: 1000 µg/l – pH	5	0,669708
	6	1,28591
	7	0,92301
	8	0,81656

REFERENZ-MESSUNGEN MIT PHOSPHOR OHNE ALGEN

Versuch	Messzyklus	Mittelwert
GM: 2785 µg/l Phosphor – O ₂	1	-0,229269
	2	0,0605621
	3	0,143294
GM: 0 µg/l Phosphor – O ₂	4	0,427594
	5	0,337815
	6	-0,0989188
GM: 2785 µg/l Phosphor – pH	1	-0,94275
	2	-0,9960355
	3	-0,9603465
GM: 0 µg/l Phosphor – pH	4	-0,995046
	5	-0,998732
	6	-0,9932145

REFERENZ-MESSUNG MIT FILTERPAPIER OHNE ALGEN

Versuch	Messzyklus	Mittelwert
GM ohne Filterpapier – O ₂	1	0,0593588
	2	0,175582
	3	-0,182277
GM mit Filterpapier – O ₂	4	-0,0305039
	5	0,00500468
	6	-0,0612786
GM ohne Filterpapier – pH	1	0,04670523
	2	0,04277512
	3	0,03039624
GM mit Filterpapier – pH	4	0,05639953
	5	0,02570068
	6	0,04423283

REFERENZ-MESSUNGEN MIT LÖSUNGSMITTEL OHNE ALGEN

Versuch	Messzyklus	Mittelwert	Standardabweichung
Nullprobe: 500 µg/l – O ₂	1	0,99973936	0,09472624
	2	0,77210821	0,33366151
	3	0,94494459	0,05642133
	4	0,94210773	0,04616488
	5	1	0
	6	0,95124557	0,13137462
	7	0,87930651	0,11788543
	8	0,83619831	0,09540054
	9	0,74200219	0,20765391
	10	0,62131084	0,38205642
	11	0,74651171	0,42816734
	12	0,90407609	0,27736852
	13	0,9028273	0,29301256
	14	0,91321218	0,32669678
	15	0,87986924	0,40606896
Nullprobe: 500 µg/l – pH	1	1,07787979	0,29096969
	2	1,02754319	0,23362777
	3	1,10067812	0,12673802
	4	1,1479478	0,07325609
	5	1	0
	6	1,02391832	0,21875854
	7	1,03632847	0,40167618
	8	1,02971997	0,26265947
	9	1,05539417	0,20643044
	10	1,15008607	0,1974583
	11	1,19440514	0,20751639
	12	1,17618195	0,12488157
	13	0,9419423	0,1633697
	14	1,16240974	0,12131114
	15	1,15377105	0,33102384
Nullprobe: 100 µg/l – O ₂	1	0,85233937	0,07051512
	2	0,88721869	0,12230133
	3	0,93285251	0,03735417
	4	0,92091513	0,10326869
	5	1	0
	6	0,99997734	0,02604728
	7	1,01920309	0,02347934
	8	0,99302971	0,06186718
	9	0,91523761	0,2001041
	10	1,0550517	0,17906079
	11	1,24902541	0,15557943
	12	1,03029719	0,13529047
	13	1,03032306	0,20849901
	14	1,35984694	0,55282333
	15	1,27694244	0,72292281
Nullprobe: 100 µg/l – pH	1	0,69473585	0,23624807
	2	0,8398227	0,35681299
	3	0,74549986	0,38356363
	4	0,81311683	0,33401764
	5	1	0
	6	0,50691584	0,42496675
	7	0,77397659	0,32894849
	8	0,83492473	0,1107364
	9	0,69814743	0,31270275
	10	0,73198209	0,33035968
	11	0,80852882	0,3109182
	12	0,68317452	0,21366958
	13	0,51327576	0,21322796
	14	0,75324007	0,30049491
	15	0,49826234	0,17539248
Nullprobe: 10 µg/l – O ₂	1	0,86088576	0,13453008
	2	0,86710742	0,12478148
	3	0,8917156	0,10696948
	4	0,89468535	0,11518742
	5	1	0

Versuch	Messzyklus	Mittelwert	Standardabweichung
	6	0,83034838	0,15207387
	7	0,90114379	0,09515044
	8	0,85543923	0,14269401
	9	0,81687525	0,2236671
	10	0,82823303	0,21138706
	11	0,96018106	0,04975032
	12	0,90123535	0,14441613
	13	0,92418303	0,11497391
	14	1,00682729	0,09611112
	15	0,87216226	0,41367646
Nullprobe: 10 µg/l – pH	1	1,39897511	0,37100488
	2	0,98032886	0,11531893
	3	1,08526208	0,12085631
	4	1,00326222	0,2657631
	5	1	0
	6	1,15761488	0,15477652
	7	1,1297149	0,22023144
	8	0,91533892	0,11686044
	9	0,95001782	0,27116989
	10	1,52200231	0,33397026
	11	1,63855261	0,92138731
	12	1,48790381	1,04482778
	13	1,56264153	1,11916307
	14	1,74222634	1,33326665
	15	1,20688815	0,33863633

VERGLEICH ZWEIER SEEN MITTELS IMOLA-MESSUNGEN (APRIL BIS NOVEMBER 2005)

Versuch	Monat (2005)	Mittelwert	Standardabweichung
Waschsee – O ₂	April	5,45398538	0,89484767
	Mai	13,1852815	1,95533886
	Juni	6,53455615	1,19703184
	Juli	5,39448231	1,39055821
	August	3,13451615	0,32107258
	September	9,38441923	2,97521885
	Oktober	8,25715385	3,32048229
	November	3,24936615	0,77347766
Lustsee – O ₂	April	3,74300154	0,34035631
	Mai	7,351555	0,83944101
	Juni	7,03441429	0,38324032
	Juli	9,70778571	1,57029736
	August	7,87872143	0,76836553
	September	17,50395	3,64261917
	Oktober	10,4746714	2,0134055
	November	2,27827186	1,05478412

VERGLEICH ZWEIER SEEN MITTELS IMOLA-MESSUNGEN (APRIL BIS NOVEMBER 2005)

Versuch	Mittelwert	Standardabweichung
Waschsee – O ₂	6,82422010	3,36940257
Lustsee – O ₂	8,24654641	4,64615155

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arnulf Melzer, der mir die einmalige Chance gegeben hat, ein Teil der Limnologischen Station in Iffeldorf zu werden. Darüber hinaus hat er mir meine Promotion mit einem äußerst spannenden und zukunftsweisenden Thema ermöglicht. Vielen Dank für das Vertrauen und die Unterstützung. Die Zeit in Iffeldorf werde ich immer in bester Erinnerung halten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Wolf für die effektive und angenehme Zusammenarbeit sowie für seine Betreuung und Unterstützung. Ich habe mich an seinem Lehrstuhl sehr wohl gefühlt und bedanke mich auch bei ihm für sein Vertrauen in meine Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Uta Raeder für die herzliche und kompetente Betreuung. Mit ihrer Geduld und ihrer angenehmen Art unterstützte und ermutigte sie mich in allen Phasen der Promotion. Ich danke Frau Dr. Raeder auch für die sympathische Arbeitsatmosphäre, die sie in Iffeldorf schafft, für ihren Rückhalt, für ihr einfühlsames Verständnis, wenn es mal nicht so gut lief und für den familiären Umgang.

Ein besonderer Dank geht an Irmtraud und Gerhard Full. Sie waren nicht nur die Sponsoren meiner Dissertation, sondern sind mir durch ihre freundliche und offene Art sehr ans Herz gewachsen. Ich möchte mich für das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben und für die vorbildliche und vor allem nicht selbstverständliche Einstellung bedanken, einen freiwilligen Dienst an der Gesellschaft zu leisten und junge Wissenschaftler zu fördern.

Ich danke Herrn Dipl. Ing. Joachim Wiest für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die nette Integration in das IMOLA-Team. Danke für den technischen Support und die sehr zeitnahen und kompetenten Antworten auf all meine Probleme und Fragen. Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des IMOLA-Teams.

Ein großer Dank geht an Swetlana Gurewitsch, Viktoria Tscherne, Irini Bassios, Emanuel Braig, Sebastian Kaspers und Konstanze Zischka, die in spannenden und umfangreichen Diplom-, Bachelor- und Seminararbeiten volles Engagement gezeigt haben und dadurch zum Gelingen meiner Arbeit beitrugen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Limnologischen Station in Iffeldorf für die Hilfe, die Ratschläge und all die heiteren Stunden in den Pausen. Ich bin froh, dass ich in einem so tollen Team arbeiten durfte.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Dr. Gerhard Welzl danken. Auf freiwilliger Basis unterstützt er seit Jahren die Limnologische Station in Iffeldorf bei Statistikfragen. Er hat mit stets großer Geduld immer eine Antwort auf meine Fragen bei der statistischen Auswertung meiner Daten gehabt.

Meiner Frau danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie mich mit ihrer grenzenlosen Liebe und Warmherzigkeit durch alle Höhen und Tiefen getragen und mich all die Jahre tatkräftig unterstützt hat.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Schwägerin danke ich für den nötigen Rückhalt, den sie mir immer gegeben haben. Es ist schön, eine liebende Familie zu haben, auf die man sich in jeder Lebenslage verlassen kann.

Ferner möchte ich mich bei der gesamten Familie Kiesel bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich täglich in ihr Gebet einschloss.

Herzlich danke ich allen meinen Freunden. Sie gaben mir den nötigen Ausgleich und hatten immer ein offenes Ohr für meine Forscher-Probleme.

Publikationen

Veröffentlichungen

- 2007 **SAILER, G., T. STADTHAGEN, P. B. HERRMANN & C. D. MATTHAEI, 2007.** Local disturbance history and the microdistributions of stream algae and bacteria: an experimental approach. Im Druck.
- 2006 **WIEST, J., T. STADTHAGEN, M. SCHMIDHUBER, M. BRISCHWEIN, J. RESSLER, U. RAEDER, H. GROTHE, A. MELZER & B. WOLF, 2006.** Intelligent Mobile Lab for metabolics in environmental monitoring. *Analytical Letters* 39: 1759-1771.
- 2006 **STADTHAGEN, T., J. WIEST, 2006.** Toxische Stoffe durch Bio-monitoring erkennen. *Die Wasserlinse, Ausgabe 3/2006.*

Vorträge

- 2006 **STADTHAGEN, T., U. RAEDER, J. WIEST, A. MELZER, B. WOLF, 2006.** Intelligent Mobile Lab (IMOLA). Biomonitoring mittels Biosensorchip-Technologie. *Jahrestagung der Gesellschaft für Limnologie e.V. (DGL).*

Posterbeiträge

- 2005 **STADTHAGEN, T., U. RAEDER, B. WOLF, 2005.** Gewässer-Monitoring mittels Biosensorchip-Technologie. *19. Tagung deutschsprachiger Diatomologen (DDT).*
- 2004 **STADTHAGEN, T., U. RAEDER, B. WOLF, 2004.** Biosensor-Chips for Freshwater Monitoring. *18. Tagung deutschsprachiger Diatomologen (DDT).*

Lebenslauf

Name: STADTHAGEN, Torsten Bodo

Geburtsdatum: 21. Juni 1976

Staatsangehörigkeit: Deutsch

2004 – 2007 Promotion im Fach Biologie, Limnologische Station Iffeldorf und Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München.

Thema: „Entwicklung eines online Gewässermonitoring-systems mittels Biosensorchips zum Nachweis ausgewählter Xenobiotika“.

2002 – 2003 Diplomarbeit im Fach Biologie, Lehrstuhl für Aquatische Ökologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Thema: „Die Bedeutung der kleinräumigen Sohlstabilität für benthische Algen während einer experimentellen Hochwasser-Simulation in einem bayerischen Wildbach“.

1997 – 2003 Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Studienschwerpunkte: Ökologie, Humangenetik, Botanik, Zoologie.

1987 – 1996 Neusprachliches Thomas-Mann-Gymnasium, München.

1983 – 1987 Grundschule an der Königswieserstr., München.