

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences
Fakultät Life Sciences

**Klassifizierung der Toxizitäten von
Oberflächensedimenten in der Tideelbe mittels einer
ökotoxikologischen Testkombination**

Bachelorarbeit

vorgelegt von
Anne Schroeder
Hamburg-Bergedorf
am 16.08.2011

Studiengang: Umwelttechnik (*Environmental Engineering*)
Studienschwerpunkt: Umweltbewertung

Erstgutachterin: Prof. Dr. Susanne Heise (HAW Hamburg)
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Gesine Witt (HAW Hamburg)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Einführung in die Thematik	4
1.2	Zielsetzung und Rahmen der Arbeit	7
2	Untersuchungsgebiete, Probenahme und Probenbehandlung.....	9
2.1	Untersuchungsgebiete und Probenahme	9
2.2	Probenbehandlung und -daten	10
3	Material und Methoden der ökotoxikologischen Tests.....	12
3.1	Algenwachstumshemmtest	12
3.1.1	Testorganismus <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	12
3.1.2	Testdurchführung.....	12
3.2	Miniaturisierter Leuchtbakterientest	15
3.2.1	Testorganismus <i>Vibrio fischeri</i>	15
3.2.2	Testdurchführung.....	15
3.3	Süßwasser-Bakterienkontakttest	18
3.3.1	Testorganismus <i>Arthrobacter globiformis</i>	18
3.3.2	Testdurchführung.....	19
4	Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests	24
4.1	Vergleich der statistischen Verteilung der Sedimenttoxizitäten gemessen mit verschiedenen Biotests.....	24
4.2	Vergleich der Ergebnisse der drei Probenahmeorte mittels der Toxizitäten der verschiedenen Biotests.....	27
4.3	Betrachtung des Verlaufs der Toxizitäten über die Verdünnungsstufen bei den verschiedenen Biotests mittels von Clusteranalysen.....	30
4.3.1	Beschreibung der Clusteranalyse und der K-means-Analyse.....	30
4.3.2	Verlauf der Toxizitäten der Verdünnungsstufen des Algenwachstumshemmtests.....	31
4.3.3	Verlauf der Toxizitäten der Verdünnungsstufen des Leuchtbakterientests.....	39
4.3.4	Verlauf der Toxizitäten der Verdünnungsstufen des Süßwasser-Bakterienkontakttests.....	43
4.4	Variation der Toxizität an den Probenahmestationen mit Betrachtung der verschiedenen Biotests.....	47
4.4.1	Variation der Toxizität an den Probenahmestationen - Mittelwert und Standardabweichung	47
4.4.2	Variation der Toxizität an den Probenahmestationen - zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way-Anova).....	50
5	Diskussion der Ergebnisse.....	55

5.1	Vergleich der statistischen Verteilung der Sedimenttoxizitäten gemessen mit verschiedenen Biotests.....	55
5.2	Vergleich der Mittelwerte und Spannweiten der Ergebnisse der drei Probenahmeorte mittels der Toxizitäten der verschiedenen Biotests	55
5.3	Betrachtung des Verlaufs der Toxizitäten über die Verdünnungsstufen bei den verschiedenen Biotests mittels von Clusteranalysen.....	57
5.4	Variation der Toxizität an den Probenahmestationen mit Betrachtung der verschiedenen Biotests – Mittelwerte und Standardabweichungen – Two-way-Anova.....	60
5.5	Sensitivitäten der Testorganismen gegenüber Substanzen	65
6	Klassifizierung der Toxizitäten der Oberflächensedimente aus der Tideelbe	67
6.1	Verfahren der Klassifizierung	67
6.2	Klassifizierungskarte der Probenahmestationen mit Sedimenttoxizitäts-Klassen....	69
7	Diskussion der Methoden	72
8	Zusammenfassung	78
9	Literaturverzeichnis	79
10	Anhang	82
10.1	Hinweise zu der Anlage auf CD.....	82
10.2	Berechnung des Variationskoeffizienten und der Wachstumsrate für die Auswertung der Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests mit <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	82
10.3	Herstellung der Nährmedien für die Durchführung der Biotests.....	83
10.4	Materialien und Testdurchführung des Algenwachstumshemmtests mit <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (anwendungsbezogen).....	86
10.5	Materialien und Testdurchführung des Leuchtbakterientests mit <i>Vibrio fischeri</i> (anwendungsbezogen)	90
10.6	Materialien und Testdurchführung des Süßwasser-Bakterienkontakttests mit <i>Arthrobacter globiformis</i> (anwendungsbezogen)	93

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Sedimente spielen für die Qualität eines Gewässers eine große Rolle, denn sie stellen eine Senke für Schadstoffe dar, die mit dem Wasser transportiert werden. Sie sind zugleich auch eine Schadstoffquelle und können als solche das aquatische Ökosystem gefährden (Ahlf, et al., 2002). Gleichzeitig sind sie ein wichtiger Lebensraum für Kleintierorganismen, die für größere Lebewesen in Gewässern eine wichtige Nahrungsgrundlage darstellen (EG-WRRL-Tideelbe-C, 2004).

Seit den 70er Jahren wurde davon ausgegangen, dass die Gefahr für Gewässer, die von mit Schadstoffen belasteten Sedimenten ausgeht, größtenteils anhand von chemischen Analysen zu erfassen ist. Jedoch hat man Mitte der 90er Jahre erkannt, dass für eine umfassende Bewertung eines Sediments auch die Ökotoxikologie eine wichtige Rolle spielt (Calmano, 1996). Ökotoxikologische Bewertungen und ein Aufzeigen des ökologischen Gefährdungspotenzials (Ahlf, et al., 2002) werden durch die Anwendung von Biotests ermöglicht. Biotests zeigen die biologische Wirkung eines Sediments auf Testorganismen an und bewerten die vom Sediment ausgehenden schädlichen Wirkungen damit unabhängig von der Anzahl und der Konzentration der vorhandenen Schadstoffe. Mit der chemischen Analytik ist es nicht möglich, alle in einer Sedimentprobe enthaltenen Stoffe zu erfassen, da in der Umwelt eine zu große Vielfalt an Stoffen vorherrscht (Liß, 1997). Kombinatorische Wirkungen von Schadstoffen können über die chemische Analytik in der Regel ebenso wenig erkannt werden wie geringe oder chemisch nicht nachweisbare Konzentrationen von Substanzen, die dennoch eine toxikologische Wirkung auf Organismen ausüben können. Andersherum könnten jedoch auch mit der chemischen Analytik gemessene hohe Konzentrationen an Schadstoffen in den Biotests kaum eine Wirkung zeigen, wenn die Bioverfügbarkeit dieser Stoffe in dem Sediment gering ist. Mit den Biotests werden also die Wirkung aller Stoffe und deren Kombinationswirkung erfasst, die für den jeweiligen Organismus eines Tests in dem Sediment bioverfügbar sind. Die Bioverfügbarkeit wird unter anderem durch stoffspezifische Parameter beeinflusst (Neumann-Hensel, et al., 2003).

Die Wahrscheinlichkeit, Toxizitäten von Sedimenten richtig zu erkennen, wird größer, je mehr Biotests in einer Biotestbatterie verwendet werden und je unterschiedlicher die Sensitivitäten der Testorganismen gegenüber Schadstoffen sind. Mit den verschiedenen Biotests und den verschiedenen Organismen werden unterschiedliche Expositionspfade abgedeckt (Arbeitsgruppe-Ökotoxikologie-TU-Hamburg-Harburg, 2004). Ein Expositionspfad kann zum Beispiel der Weg von gelösten Schadstoffen in Wasser über die Körperoberfläche in einen Organismus sein. Ein weiteres Beispiel ist der Weg von partikulär gebundenen Schadstoffen über den Verdauungstrakt des Organismus (Ahlf, Datum unbekannt). Die Exposition wird auch über die unterschiedlichen Organismen und ihre Lebensweisen bestimmt, die Schadstoffe auf unterschiedliche Arten aufnehmen (Ahlf, Datum unbekannt; Liß, 1997). Nur die Kombination aus mehreren Biotests lässt eine aussagekräftige Bewertung von Umweltproben in Bezug auf ihre Toxizität zu. In dieser Arbeit wurden

Oberflächensedimentproben aus der Tideelbe von den drei Probenahmeorten Mühlenberger Loch und Heuckenlock in Hamburg und Neufelder Watt in der Elbemündung genommen, um die Toxizitäten der Sedimente dieser Orte zu ermitteln. Die in dieser Arbeit verwendete Biotestkombination mit dem Algenwachstumshemmtest mit *Pseudokirchneriella subcapitata*, dem Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* und dem Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* wurde von der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der Technischen Universität Hamburg Harburg (TUHH) an vielen Sedimentproben eingesetzt (z.B. in (Hsu, et al., 2007)), wobei teilweise zusätzlich der Nematodentest mit *Caenorhabditis elegans* durchgeführt wurde.

Einen Algentest in eine Biotestbatterie zu integrieren, wurde erstmals von Giesy und Hoke 1990 vorgeschlagen ((Giesy, 1990) zitiert in (Hsu, et al., 2007)). Der Algenwachstumshemmtest mit *Pseudokirchneriella subcapitata* und der Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* wurden als Bestandteile einer Biotestbatterie von W. Ahlf 1995 vorgestellt und von H. Gratzler und W. Ahlf 1998 in einer Biotestbatterie validiert (Ahlf, et al., 1998).

Der Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* nach DIN EN ISO 11348-2 hat eine gute Reproduzierbarkeit (Ahlf, et al., 2005) und wird u. a. als Bestandteil von Biotestkombinationen in verschiedenen Regulatorien vorgeschlagen, wie zum Beispiel in der Handlungsanweisung Baggergut Binnen (HABAB) und der Handlungsanweisung Baggergut Küste (HABAK), in denen in Kombination mit weiteren Biotests eine schnelle Beurteilung der Toxizität von Baggergut ermöglicht werden soll (Manz, et al.).

Mit dem Süßwasser-Bakterienkontakttest mit *A. globiformis* kann im Gegensatz zu den Eluat-Tests die Wirkung von partikelgebundenen Schadstoffen gemessen werden. Es handelt sich dabei um Schadstoffe, die nur schwer mit Wasser herausgewaschen und gelöst werden können (Hsu, et al., 2007; Feiler, et al., 2009). Neben den partikelgebundenen Schadstoffen wird aber auch die Wirkung gelöster Schadstoffe erfasst (Feiler, et al., 2009). Der Bakterienkontakttest mit *A. globiformis* ist aus dem Feststoffkontakttest mit *Bacillus cereus* hervorgegangen, der in "Microbial Bioassays to Assess the Toxicity of Solid-Associated Contaminants" von K. Rönnpagel beschrieben ist (Rönnpagel, et al., 1995) und liegt seit 2002 als Norm DIN 38412-48:2002 vor. Der Bakterienkontakttest mit *A. globiformis* nach DIN 38412-48 wird seit Jahren regelmäßig für die Hamburg Port Authority (HPA) bei der Bundesanstalt für Gewässerkunde zur Bewertung von Baggergut des Hamburger Hafens angewendet (Feiler, et al., 2009).

Im gesamten Gebiet des Elbestromes erfolgt der Schadstoffeintrag größtenteils aus dem oberstromigen Gebiet, in dem insbesondere historisch kontaminierte Sedimente eine wichtige sekundäre Schadstoffquelle sind. Bei erhöhtem Hochwasserabfluss kann es zur Erosion der schadstoffbelasteten Sedimente und deren Transport entlang der Elbe bis ins Ästuar kommen. Die kontaminierten Sedimente vom Oberstrom der Elbe kommen wahrscheinlich hauptsächlich aus der Tschechischen Republik und den Nebenflüssen Mulde und Saale. Die Hamburg Port Authority (HPA) geht davon aus, dass die organischen Schadstoffe wie PCB (Polychlorierte Biphenyle), HCB (Hexachlorbenzol) und DDX

hauptsächlich aus der Tschechischen Republik stammen (Heise, et al., 2005b; Heise, et al., 2007).

Die drei Probenahmeorte liegen in dem Gebiet der Tideelbe, die mit einer Länge von 181,8 km vom Wehr in Geesthacht bis zur Mündung in die Nordsee an die Seegrenze bei Cuxhaven-Kugelbake reicht (EG-WRRL-Tideelbe, 2004). Im Einzugsgebiet der Tideelbe leben 3,77 Mio. Einwohner (2001). Zwischen der Schwinge und der Nordsee bei Cuxhaven liegt das Übergangsgewässer mit steigendem Salzgehalt zur marinen Küste hin, in dem der mesotidale Tidenhub 2 - 4 m beträgt. In Bereichen mit wenig Strömung, die vermehrt ab dem Mühlenberger Loch in Richtung Nordsee zu finden sind (EG-WRRL-Tideelbe-C, 2004), gibt es hohe Sedimentablagerungen und der Anteil an Wattflächen beträgt 48 % (EG-WRRL-Tideelbe, 2004). Im Übergangsgewässer wurden starke Schwankungen der abiotischen Faktoren und damit auch eine sehr hohe Variabilität in der Häufigkeit und der Zusammensetzung der Gewässerfauna und -flora festgestellt. Die zwei bedeutendsten von 6 Kläranlagen, die direkt in die Tideelbe einleiten, sind Köhlbrandhöft/Dradenau im Hamburger Hafen (2,1 Mio. EW) und Hetlingen (0,86 Mio. EW). In die Gewässer des Koordinierungsraumes Tideelbe wurden im Jahr 2001 insgesamt circa 13.300 t CSB, 3.750 t N_{ges} und 190 t P_{ges} eingeleitet. Außerdem gibt es an der Tideelbe viele industrielle Direkteinleiter, besonders aus dem Bereich der chemischen Industrie in den Wirtschaftsräumen Brunsbüttel, Hamburg und Stade. Von der Industrie werden zum Beispiel Cadmium, Quecksilber, Nickel, 1,2-Dichlorethan und Blei mit signifikanten Mengen eingeleitet. Neben den Punktquellen gibt es auch viele diffuse Quellen wie die landwirtschaftlich genutzten Flächen, durch die Nährstoffe und Pflanzenschutzmittel über das Grundwasser oder durch direkte Abschwemmungen in die Elbe eingetragen werden. Aus den Städten werden bei Niederschlägen Nähr- und Schadstoffe in die Gewässer eingetragen. Eine weitere diffuse Quelle stellt die Rücklösung von Schadstoffen aus dem Sediment durch zum Beispiel Baggerarbeiten dar. Außerdem spielen für die Belastung der Tideelbe Schadstoffe aus dem Hafenbereich, die Auswirkungen von Altlasten und Werften als diffuse TBT-Quellen (Tributylzinnhydrid) eine Rolle (EG-WRRL-Tideelbe, 2004).

Durch die Eintragung von Nordseewasser und -sediment in die Elbemündung findet dort, und auch weit in die Tideelbe hinein, eine Vermischung und damit Verdünnung der Toxizität von Wasser und von Sedimenten statt. Die Verdünnung der Toxizität durch marine Sedimente erfolgt ab Seemannshöft zunehmend in Richtung Nordsee (Heise, et al., 2007).

Eine wichtige Bedeutung für die Schadstoffverteilung in Gewässern haben die feinen Sedimente. Sedimente mit einem hohen Anteil an kleinen Korngrößen (< 60 µm) können aufgrund ihrer großen spezifischen Oberfläche und des hohen Anteils an organischem Material der kleinen Tonpartikel vermehrt Schadstoffe aufnehmen (Sonnen, 1993; Liechti, et al., 1995). Feine Sedimente werden generell vor allem bei laminaren Strömungen weiter getragen als größere Partikel, wegen der höheren Sinkgeschwindigkeit von größeren Partikeln gegenüber den kleinen. Bei turbulenten Strömungen werden besonders die feinen Partikel vorrangig in Schwebe versetzt und dort gehalten, wodurch ein Transport von Sedimenten stattfinden kann. Eine höhere Sedimentation findet in Bereichen mit großem Tidenhub und bei Zirkulationsströmungen statt (Malcherek).

Für den Schutz der Wattflächen an den drei Probenahmeorten ist es wichtig, dass sie unter besonderer Beobachtung hinsichtlich der Sediment- und Wasserqualität stehen. In dem Probenahmeort Neufelder Watt an der Elbemündung befindet sich ein großes Vogelschutzgebiet und die Naturschutzgebiete Heuckenlock sowie Mühlenberger Loch sind seltene tidebeeinflusste Süßwasserwatten. Das Naturschutzgebiet Mühlenberger Loch, das in Richtung der Nordsee nahe hinter dem Hamburger Hafen liegt, ist ein wichtiger Lebensraum, u. a. für Fische, wie die am häufigsten vorkommenden Arten Stint, Dreistachliger Stichling, Kaulbarsch und Flunder (EG-WRRL-Tideelbe-C, 2004).

1.2 Zielsetzung und Rahmen der Arbeit

Die Bachelorarbeit „Klassifizierung der Toxizitäten von Oberflächensedimenten in der Tideelbe mittels einer ökotoxikologischen Testkombination“ beinhaltet unter anderem die Probenahme von Oberflächensedimenten im Watt der Tideelbe sowie die Durchführung von drei verschiedenen ökotoxikologischen Tests an diesen Proben. Die Proben werden an den Orten Mühlenberger Loch und Heuckenlock in Hamburg und im Neufelder Watt in der Tideelbemündung genommen, wobei an jedem Ort zwei Stationen beprobt werden. Die Ergebnisse der Biotests, die als prozentuale Hemmwirkungen vorliegen, werden ausgewertet, graphisch dargestellt und statistisch analysiert. Die Biotestkombination dieser Arbeit besteht aus dem Algenwachstumshemmtest mit *Pseudokirchneriella subcapitata*, dem miniaturisierten Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* und dem Süßwasser-Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*. Auf die Ergebnisse, die mit diesen drei Biotests ermittelt wurden, wird eine Clusteranalyse angewandt, um die Proben in Gruppen mit ähnlichen Toxizitäten einzuordnen. Anschließend wird anhand der Gruppen aus der Clusteranalyse ein Klassifizierungssystem erarbeitet, um für jede Probe eine Gesamtaussage der ökotoxikologischen Risiken, die von der jeweiligen Sedimentprobe ausgehen könnten, machen zu können. Nach dem Klassifizierungssystem wird die Klassifizierung der Toxizitäten der 22 Sedimentproben dieser Arbeit in Sediment-Toxizitätsklassen vorgenommen und eine Toxizitätskarte der Probenahmestationen erstellt. Eine Klassifizierung von Toxizitäten mit der Zusammenfassung der Ergebnisse aus mehreren Biotests erleichtert den Vergleich von Standorten, Ereignissen oder verschiedenen Probenahme-Zeitpunkten. In dieser Arbeit werden Hintergrundtoxizitäten in einer Zeit nahe dem Zeitpunkt von Niedrigwasser gemessen. Toxizitäten unter Nicht-Hochwasserbedingungen zu ermitteln ist wichtig, um vergleichen zu können, in welchem Maß sich die Toxizität von frisch sedimentiertem Material mit einem Hochwasserereignis ändert. Die Untersuchung von Toxizitäten bei Hochwasserereignissen ist jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit. Die Klassifikation von Sedimenten aus Gewässern anhand von Toxizitätsdaten aus Biotests wurden schon in mehreren Arbeiten durchgeführt oder diskutiert (Ahlf, et al., 2002; Ahlf, et al., 2005; Liß, 1997).

Ein Ziel dieser Arbeit ist anhand der Ergebnisse aufzuzeigen, ob und wie sich die Toxizitäten an den einzelnen Probenahmeorten und -stationen in den verschiedenen Biotests

unterscheiden und zu diskutieren, von welchen Faktoren diese Unterschiede verursacht sein könnten. Ein weiteres Ziel ist zu ermitteln, wie stark die jeweils 3 - 4 Toxizitäten von einem Standort zeitgleich genommener Proben variieren und diese Ergebnisse zu diskutieren. Außerdem werden in einer Methodendiskussion unter Anderem einige mögliche Faktoren, die Einfluss auf die Ergebnisse der Biotests haben können aufgezeigt.

Die Bachelorarbeit findet im Rahmen des Forschungsprojektes KLIMZUG NORD (Klimawandel in Regionen zukunftsfähig gestalten) in der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. S. Heise statt. Das Projekt, das innovative Ansätze zur Anpassung an den Klimawandel in der Metropolregion Hamburg entwickelt, wird durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Die Arbeitsgruppe der HAW Hamburg arbeitet für das Teilprojekt von KLIMZUG NORD „Ökologische Folgen morphodynamischer Veränderungen im Elbeästuar“ und untersucht die Auswirkungen des Klimawandels, die sich in Form von erhöhten Temperaturen, Salinitäten und Häufungen von Hochwasserereignissen bemerkbar machen. Die Auswirkungen dieser Einflüsse auf die Mobilität und Bioverfügbarkeit von Schadstoffen in Sedimenten werden erforscht.

2 Untersuchungsgebiete, Probenahme und Probenbehandlung

2.1 Untersuchungsgebiete und Probenahme

Insgesamt wurden 22 Oberflächensedimentproben von den Probenahmeorten Mühlenberger Loch am 24.3.2011, Heuckenlock am 29.3.2011 und Neufelder Watt am 9.5.2011 genommen. Die Probenahmeorte Mühlenberger Loch und Heuckenlock liegen in Hamburg und das Neufelder Watt liegt in der Elbemündung zur Nordsee.



Abbildung 1 Tideelbe und Stadt Hamburg mit den drei Probenahmeorten Mühlenberger Loch, Heuckenlock und Neufelder Watt (Hintergrundbild: Google Earth, modifiziert von Hsu, Pei-Chi)

Aus dem Mühlenberger Loch und von Heuckenlock wurden je vier Proben von jeweils Ober- und Unterstrom und im Neufelder Watt wurden jeweils drei Proben am Wegpunkt 20 und am Wegpunkt 24 genommen. Die Koordinaten der sechs Probenahmestationen stehen in Tabelle 1. Im Mühlenberger Loch und in Heuckenlock wurden die jeweils vier Proben von einer Station in ungefähr zwei Meter Abstand an den Ecken eines Rechtecks mit einem Spatel aus dem oberen Zentimeter des Sediments in 50-ml-Röhrchen genommen. Im Neufelder Watt wurden die drei Proben von einer Station jeweils in zwei Meter Abstand zueinander an den Ecken eines Dreiecks genommen.

Tabelle 1 Koordinaten der sechs Probenahmestationen

Probenahmestation	Koordinaten	
Mühlenberger Loch Oberstrom	53.530978°	9.806671°
Mühlenberger Loch Unterstrom	53.531156°	9.805664°
Heuckenlock Oberstrom	53.473797°	10.040174°
Heuckenlock Unterstrom	53.474451°	10.037298°
Neufelder Watt WP 20	53.886583°	8.998517°
Neufelder Watt WP 24	53.869533°	8.974867°

Die Bucht „Mühlenberger Loch“ liegt in Fließrichtung der Elbe hinter dem Hamburger Hafen an dem Hamburger Stadtteil Cranz. Direkt am Mühlenberger Loch liegt das Obstanbaugebiet „Altes Land“, aus dem als diffuse Quelle Nährstoffe und Pflanzenschutzmittel wahrscheinlich in die Elbe eingetragen werden (diffuse Quellen siehe (EG-WRRL-Tideelbe, 2004)). Die Probenahmestation „Oberstrom“ des Mühlenberger Lochs liegt nahe an einem Deichsiel, durch den das angrenzende Land be- und entwässert wird und die Probenahmestation „Unterstrom“ liegt ca. 80 m weiter stromabwärts.

In dem Priel namens „Heuckenlock“, der von der Süderelbe abzweigt, befinden sich zwei Probenahmestationen, wobei die Probenahmestation „Unterstrom“ näher an der Süderelbe liegt (Entfernung ca. 100 m) und die Station „Oberstrom“ liegt ca. 150 m weiter oberhalb in dem Nebenfluss. Bei Flut läuft die Süderelbe in den Priel auf und bei Ebbe fallen Teile des Priels trocken.

An dem Probenahmeort Neufelder Watt an der Elbemündung liegt die Probenahmestation „Wegpunkt 24“ weiter vom Festland weg als die Probenahmestation „Wegpunkt 20“ (Koordinaten siehe Tabelle 1). Die Station „Wegpunkt 24“ liegt etwas nördlich von der Mitte der Breite der Elbe und die Station „Wegpunkt 20“ liegt noch weiter nördlich nahe dem Festland.

2.2 Probenbehandlung und -daten

So bald wie möglich nach den Probenahmen wurden der pH-Wert und der Redox-Wert der Proben im Labor gemessen (Ergebnisse in Dateien der Trockengewichte in der Anlage auf CD). Außerdem wurde von jeder Probe das Trockengewicht in % bestimmt (siehe 3.3.2 und Dateien der Trockengewichte in der Anlage auf CD). Die Daten zu den Probenahmen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Daten zu den Probenahmen im Mühlenberger Loch, in Heuckenlock und dem Neufelder Watt

	Mühlenberger Loch		Heuckenlock		Neufelder Watt	
	Oberstrom	Unterstrom	Oberstrom	Unterstrom	WP20	WP24
Probenahmedatum	24.3.2011		29.3.2011		9.5.2011	
Anzahl Proben	4	4	4	4	3	3
Niedrigwasser	ca. 14:00 Uhr		ca. 8:00 Uhr		ca. 14:00 Uhr	
Uhrzeit	12:15	12:45	8:15	7:45	13:50	12:20
Wetterverhältnisse	sonnig		sonnig		sonnig	sonnig
Windrichtung	West		West		Süd-West	Süd-West
Windstärke (Bft)	-		-		ca. 3-4	ca. 2-3
Temperatur (Luft)	-		-1° C bis 8° C		24,5 °C	22 °C
Temperatur (Sediment)	-	-	-	-	21,9 °C	17,5 °C
Sedimentbeschaffenheit	sehr schlammig	sehr schlammig	schlammig	schlammig	sehr trocken	schlammig
Bemerkung	auffällig viele Algen	-	-	-	-	Algen an Stelle 1
pH-Wert	Ø 7,7 (nach 2,5 h)		Ø 7,3 (nach 2,5 h)		Ø 7,5 (nach 4,5 h)	
Redox-Wert	Ø -218 mV (nach 4,5 h)		Ø 63 mV (nach 2,5 h)		Ø 113 mV (nach 4,5 h)	
Trockengewicht in %	18	26	63	45	67	55

Den Proben wurden sowohl externe Proben-Bezeichnungen als auch interne Labor-Nummern zugeordnet. Eine externe Proben-Bezeichnung „x-y-z“ stellt gleichzeitig die Beschreibung der Probenahmestelle dar und setzt sich aus dem Probenahmeort an 1. Stelle (x), der Spezifizierung des Standorts an 2. Stelle (y) und der Nummer der Probe an diesem Standort an 3. Stelle (z) zusammen (x: ML = Mühlenberger Loch, HL = Heuckenlock, NF = Neufelder Watt; y: Os = Oberstrom, Us = Unterstrom, WP20 = Wegpunkt 20; WP24 = Wegpunkt 24; z: 1,2,3,4 = Nummer der Probe des Standortes). In den Auswertungen der Biotests (Anlage auf CD) ist zusätzlich das Probenahme-Datum in die Proben-Standort-Bezeichnung eingefügt. Die internen Nummern gehen fortlaufend von H26-11 bis H47-11, wobei das H und die 11 immer gleich bleiben.

Die Proben wurden nach der Probenahme in den 50-ml Röhrchen aus inertem Material bei ca. 8 °C bis zur Testdurchführung gelagert. In der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg werden die Proben während der Lagerungszeit vor den Tests nicht eingefroren oder gefriergetrocknet, sondern lediglich gekühlt. Üblicherweise sollen die Proben an der HAW Hamburg spätestens nach vier Wochen mit den Tests gemessen worden sein. Die Proben dieser Arbeit wurden mit dem Algenwachstumshemmtest nach 5 - 21 Tagen, mit dem Leuchtbakterientest nach 2 - 13 Tagen und mit dem Süßwasser-Kontakttest nach 4 - 22 Tagen gemessen.

3 Material und Methoden der ökotoxikologischen Tests

3.1 Algenwachstumshemmtest

3.1.1 Testorganismus *Pseudokirchneriella subcapitata*

Für den Algenwachstumshemmtest wird als Testorganismus die einzellige Süßwasser-Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* eingesetzt, welche früher *Selenastrum capricornutum* genannt wurde. *P. subcapitata* ist ein Stellvertreterorganismus für die Trophieebene der Produzenten (Ahlf, et al., 1998). Die Algen mit der Stammnummer SAG 61.81 wurden aus dem Department „Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen“ der Universität Göttingen (EPSAG) bezogen. Aus diesen werden die Algen-Stammkulturen im ökotoxikologischen Labor der Fakultät Life Sciences der HAW Hamburg in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben in 50 ml KL-Medium (Kuhl-Lorenzen-Medium, Herstellung siehe Anhang 10.3) selbst hergestellt (Abbildung 2). Jeden Monat werden 500 µl der Stammkultur vom vorherigen Monat neu in 50 ml KL-Medium an geimpft. Für den Test werden ca. drei Monate alte dichtgewachsene Algen-Stammkulturen verwendet.



Abbildung 2 Algen-Stammkultur in KL-Medium mit *Pseudokirchneriella subcapitata* (Foto: M. Kottwitz)

3.1.2 Testdurchführung

Der Algenwachstumshemmtest mit dem Testorganismus *Pseudokirchneriella subcapitata* wird in Anlehnung an DIN EN ISO 8692:2004 angewandt, um die Toxizität von in Wasser löslichen Stoffen festzustellen. Durch die Anwesenheit von Schadstoffen in der Wasserphase kann die Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* in ihrem Wachstum gehemmt werden. Der Endpunkt des Algenwachstumshemmtests ist also die prozentuale Hemmung nach 72 Stunden Inkubation bzw. die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate und wird auf der Grundlage der Fluoreszenzmessung bestimmt. Über die bei der Photosynthese entstehende Fluoreszenz kann indirekt auf die Chlorophyll-Konzentration und somit die Menge der Algen geschlossen werden. Die Fluoreszenz der Testansätze aus Algen und Eluaten aus belasteten Oberflächensedimenten wird im Vergleich zu einer unter Kulturbedingungen gewachsenen Kontrolle an drei aufeinander folgenden Tagen gemessen. Anders als in DIN EN ISO 8692:2004 wird der Test miniaturisiert in flachen, transparenten 24-Well-Mikrotiterplatten

von costar® durchgeführt. Auf der 24-Well-Mikrotiterplatte sind 24 runde Vertiefungen (Wells) in sechs Spalten und vier Reihen angeordnet.

Für den Test wird eine Algenvorkultur aus der Algen-Stammkultur und einem 1-fach-Nährmedium (Herstellung siehe Anhang 10.3) hergestellt. Diese wird 3 bis 4 Tage bei 20 °C auf dem Magnetrührer unter Dauerbeleuchtung mit einer Beleuchtungsstärke zwischen 6000 lx und 10.000 lx inkubiert. Aus dem Eluat einer Probe werden durch Verdünnung mit Reinstwasser und 10-fach-Nährmedium (Herstellung siehe Anhang 10.3) folgende fünf Verdünnungsstufen mit drei Parallelen 24-Well-Mikrotiterplatte (Belegungungsschema siehe Abbildung 3) hergestellt: G1 (Eluat = 80 Vol%), G2 (50 Vol%), G4 (25 Vol%), G8 (12,5 Vol%) und G16 (6,25 Vol%). Zu den Eluat-Verdünnungen und einer Kontrolle aus Reinstwasser mit drei Parallelen wird die mit 1-fach-Medium verdünnte Algenvorkultur gegeben. Für die Kontrolle und für jede Verdünnungsstufe wird ein zugehöriger Blindwert mit 1-fach-Medium statt Algen (Abbildung 3) hergestellt.

	Kontrolle	G1	G2	G4	G8	G16
Algen →						
Algen →						
Algen →						
1-fach-Med. →	BW	BW	BW	BW	BW	BW

Abbildung 3 Belegungsschema der 24-Well-Mikrotiterplatten, Probenplatte und DCP-Kontrollplatte (BW = Blindwert)

Neben den Proben-Platten werden eine Kontrollplatte mit Reinstwasser statt Proben-Eluat und eine Positiv-Kontrollplatte mit 3,5-Dichlorphenol (DCP) statt Proben-Eluat belegt.

Kurz vor der ersten Fluoreszenz-Messung zum Zeitpunkt t0 wird die Algenvorkultur zunächst mit 1-fach-Nährmedium bis zu einer Fluoreszenz von 12400 ± 200 und dann nochmals 1:5 verdünnt, um eine exponentiell wachsende Algenpopulation für die Testansätze zu erreichen. Alle Ansätze werden zwischen den Messungen bei 20°C auf dem Schüttler bei ca. 250 rpm und Dauerbeleuchtung inkubiert. Vor jeder Messung werden die Ansätze mit einer Pipette homogenisiert.

Gültigkeitskriterien für den Algenwachstumshemmtest (DIN EN ISO 8692:2004):

- die pH-Abweichung der Kontrolle mit Algen zwischen Testbeginn (t0) und Testende (t3) darf nicht größer als 1,5 sein
- der Variationskoeffizient VarK der Kontrollen muss kleiner 5 % sein
- die mittlere Wachstumsrate WR der Kontrolle muss größer 1,4 pro Tag sein

Der Variationskoeffizient VarK in % (Berechnung siehe Anhang 10.2) wird jeweils für die Parallelwerte der Kontrollen, Proben-Verdünnungen und Positiv-Kontrollen berechnet.

Die Wachstumsraten der Kontrollen, der Verdünnungen der Proben und der Positiv-Kontrollen werden nach Gleichung 1 als Faktor berechnet. Die Wachstumsrate (WR) beschreibt die durchschnittliche relative Zunahme der Algenzellen aufgrund von Vermehrung pro Tag. Die Wachstumsrate entspricht der Steigung der Regressionsgeraden,

die aus dem natürlichen Logarithmus der Fluoreszenz-Werte der Kontrollen und der Zeit in Tagen von t1 bis t3 erstellt wird.

$$WR = \frac{\sum_{x=t1}^{t3} (t_x - t_{MW}) (\ln F_x - \ln F_{MW})}{\sum_{x=t1}^{t3} (t_x - t_{MW})^2}$$

Gleichung 1 Wachstumsrate WR

Mit:

WR Wachstumsrate als Faktor

t_x Zeit in Bezug auf t0 bei der Messung x (t1, t2 oder t3) in Tagen

F_x Fluoreszenz nach Abzug des Blindwerts bei der Messung x (t1, t2 oder t3) in relativen Fluoreszenzeinheiten

t_{MW} Mittelwert der Zeit über t1 bis t3 in Tagen

F_{MW} Mittelwert der Fluoreszenz-Werte nach Abzug der Blindwerte von t1 bis t3 in relativen Fluoreszenzeinheiten

Die prozentuale Wachstumshemmung der Verdünnungen des Proben-Eluats und der Positiv-Kontrollen gegenüber der Kontrolle wird nach

Gleichung 2 berechnet. Eine ausführlichere Beschreibung zur Berechnung der Wachstumsrate steht im Anhang unter 10.2.

$$H_{WR} (in \%) = 100 - \frac{WR_{Probe}}{WR_K} \times 100$$

Gleichung 2 Hemmung des Algenwachstums berechnet aus den Wachstumsraten in %

Mit:

H_{WR} Hemmung des Algenwachstums berechnet aus den Wachstumsraten in %

WR_{Probe} Wachstumsrate der Verdünnungen des Proben-Eluats oder der Positiv-Kontrollen als Faktor pro Tag

WR_K Wachstumsrate der Kontrollen als Faktor pro Tag

Die Wachstumshemmung der Algen in % kann auch direkt aus den Fluoreszenz-Werten nach Abzug des Blindwerts berechnet werden Gleichung 3.

$$H_F (in \%) = 100 - \frac{F_{Probe}}{F_K} \times 100$$

Gleichung 3 Hemmung des Algenwachstums berechnet aus der Fluoreszenz in %

Mit:

H_F Hemmung des Algenwachstums berechnet aus der Fluoreszenz in %

F_{Probe}	Fluoreszenz der Verdünnungen des Proben-Eluats oder der Positiv-Kontrollen nach Abzug des Blindwerts in relativen Fluoreszenzeinheiten
F_{K}	Fluoreszenz der Kontrollen nach Abzug des Blindwerts in relativen Fluoreszenzeinheiten

Die Berechnungen werden in der Excel-Vorlage für den Algenwachstumshemmtest der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg durchgeführt. In dieser Datei werden auch die prozentualen Hemmungen sowohl der Fluoreszenzen als auch der Wachstumsraten der Proben-Verdünnungsstufen als Säulendiagramme dargestellt (siehe Anlage auf CD). Die statistische Auswertung und die Darstellung der Ergebnisse wurden mit den Programmen Microsoft Office Excel 2007, GraphPad Prism 5.04 und Statistica 6.0 durchgeführt.

3.2 Miniaturisierter Leuchtbakterientest

3.2.1 Testorganismus *Vibrio fischeri*

Der Testorganismus *Vibrio fischeri* (Abbildung 4) ist ein marines, halophiles, gramnegatives, fakultativ anaerobes Bakterium und trägt die Synonymnamen *Aliivibrio fischeri* und *Photobacterium fischeri*. *V. fischeri* hat polare Flagellen zur Fortbewegung und ist außerdem biolumineszent, weshalb es ein blau-grünes Licht einer Wellenlänge von 490 nm erzeugt. Das Bakterium *V. fischeri* ist ein Stellvertreterorganismus für die Trophieebene der Destruenten (Ahlf, et al., 1998). Die Leuchtbakterien für den Test werden bei der HACH Lange GmbH (Art: 30189) flüssiggetrocknet bezogen und kurz vor dem Test rekonstituiert. Die Biolumineszenz entsteht durch die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, welche durch das Enzym Luciferase katalysiert wird.



Abbildung 4 Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* (Manz, et al.)

3.2.2 Testdurchführung

Der miniaturisierte Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* wird in Anlehnung an die DIN EN ISO 11348-2:2009-05 durchgeführt. Die Testmethode beruht auf dem Prinzip der Intensitätsabnahme der Biolumineszenz bei Leuchtbakterien nach 30 min Dauer, verursacht durch die Störung des Stoffwechsels durch Zugabe von Schadstoffen bzw. belasteten Sedimentproben. Der Stoffwechsel von *V. fischeri* funktioniert hingegen gut, wenn das

Bakterium eine über die Zeit gleichmäßige Intensität an Biolumineszenz abstrahlt. Die Schwächung der Biolumineszenz durch eine Sedimentprobe gibt Hinweise auf Schadstoffe, die metabolische Prozesse von Organismen negativ beeinflussen können (Ahlf, Datum unbekannt).

Anders als in DIN EN ISO 11348-2:2009-05 wird der Test miniaturisiert in flachen, transparenten und weißen 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Auf der 96-Well-Mikrotiterplatte sind 96 runde Vertiefungen (Wells) in 12 Spalten und 8 Reihen angeordnet. Für den Test werden fünf Verdünnungsstufen (Tabelle 3) aus Eluaten von Oberflächensedimenten und künstlichem Meerwasser (Artificial Seawater = ASW) mit jeweils zwei Parallelen in einer 96-Well-Mikrotiterplatte hergestellt. Zunächst wird die Intensität der Ausgangsbiolumineszenz der rekonstituierten Leuchtbakterien mit einem Luminometer, das in einen Multimodereader integriert ist, gemessen. Direkt danach werden die Verdünnungen zu den Leuchtbakterien gegeben und nach einer Kontaktzeit von exakt 30 min wird erneut die Intensität der Biolumineszenz gemessen. Aus der Abnahme der Leuchtintensität kann unter Berücksichtigung der Leuchtintensitätsabnahme der Kontrollansätze die prozentuale Hemmwirkung der Verdünnungsstufen der Eluate berechnet werden.

Tabelle 3 Anteil des Eluats in % in den Verdünnungsstufen des Leuchtbakterientests

Verdünnungen (G-Stufen)	% Eluat
G1	90,9
G2	56,8
G3	37,9
G4	28,4
G16	18,9

Den Test durchlaufen außerdem Negativ-Kontrollansätze mit Artificial Seawater und eine Positiv-Kontrolle G1 (90,9 % DCP im Testansatz) mit einer 3,5-Dichlorphenol-Stammlösung (10 mg/100 ml) sowie die Verdünnungsstufe G2 (56,8 % DCP im Testansatz) als Positivkontrolle. Positivkontrollen werden durchgeführt, um Veränderungen in der Sensitivität des Testorganismus zu erfassen.

Die Salinität der Eluate muss vor dem Test mit Natriumchlorid (NaCl) auf einen Wert zwischen 2 und 2,2 ‰ und der pH-Wert mit verdünnter Salzsäure (HCl) und/oder verdünnter Natronlauge (NaOH) auf einen Wert zwischen 6,8 bis 7,2 eingestellt werden. Ein pH-Wert außerhalb dieses Bereiches bzw. eine zu hohe oder zu niedrige Salinität kann möglicherweise eine toxische Wirkung auf die Leuchtbakterien haben. Die genannten Bereiche wurden im Vergleich zur Norm DIN EN ISO 11348-2:2009-05 ein wenig modifiziert.

In dieser Arbeit wird der Test nach den folgenden vier Gültigkeitskriterien bewertet, die in ähnlicher Weise auch in der DIN EN ISO 11348 erwähnt werden:

- Ausgangsleuchten: > 500

- Korrekturfaktor f_{k30} (Mittelwert der f_{k30} -Werte der ASW-Kontrollen): 0,6 - 1,3
- Hemmwirkung von 3,5 Dichlorphenol der Verdünnungsstufe G2(DCP): 20 - 80%
- Abweichung der Negativ-Kontrollen vom Mittelwert: < 3 %

Der Korrekturfaktor f_{k30} wird mit Gleichung 4 berechnet:

$$f_{k30} = \frac{I_{k30}}{I_0}$$

Gleichung 4 Korrekturfaktor f_{k30} (DIN EN ISO 11348-2:2009-05)

Mit:

- f_{k30} Korrekturfaktor für die Kontaktzeit von 30 min
- I_0 Leuchtintensität der Leuchtbakteriensuspension unmittelbar vor Zugabe der ASW-Kontrollen in relativen Leuchteinheiten
- I_{k30} Leuchtintensität der ASW-Bakteriensuspension nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 min in relativen Leuchteinheiten

Der f_{k30} -Wert ist ein Maß für die Leuchtintensitätsveränderung während des 30-minütigen Kontakts der ASW-Kontrollen mit den Leuchtbakterien. Die Leuchtintensität der Bakterien in den ASW-Kontrollen nimmt auch ohne den Einfluss von Schadstoffen im Laufe der Zeit ab. Deshalb muss diese Abnahme auch bei den Testansätzen durch den Korrekturfaktor f_{k30} berücksichtigt werden.

Von der ASW-Kontrolle werden vier Doppelbestimmungen mit Berechnung des f_{k30} -Wertes gemacht und aus jeweils einer Doppelbestimmung wird ein f_{k30} -Mittelwert berechnet. Von dem Mittelwert wird die Abweichung zu den Einzelwerten in Prozent berechnet. Die Abweichung der Kontrollen vom Mittelwert einer Doppelbestimmung muss kleiner 3 % sein (s.o. in Gültigkeitskriterien). Es wird aus den vier f_{k30} -Mittelwerten der ASW-Kontrollen ein f_{k30} -Mittelwert gebildet. Mit dem f_{k30} -Mittelwert der ASW-Kontrollen wird die Leuchtintensität I_0 der Verdünnungen und der DCP-Kontrollen korrigiert, sodass sich der korrigierte Wert I_{c30} ergibt (Gleichung 5).

$$I_{c30} = I_0 \times \overline{f_{k30}}$$

Gleichung 5 Leuchtintensität I_{c30} der Leuchtbakterien (DIN EN ISO 11348-2:2009-05)

Mit:

- I_{c30} der korrigierte Wert für I_0 von Verdünnungen und DCP-Kontrollen unmittelbar vor Zugabe derselbigen in relativen Leuchteinheiten
- I_0 Leuchtintensität der Leuchtbakteriensuspension unmittelbar vor Zugabe von Verdünnungen und DCP-Kontrollen in relativen Leuchteinheiten
- f_{k30} Mittelwert der f_{k30} -Werte der ASW-Kontrollen

Die Hemmwirkung in % eines Testansatzes wird nach Gleichung 6 berechnet.

$$H_{30} = \left[\frac{(I_{c30} - I_{30})}{I_{c0}} \right] \times 100$$

Gleichung 6 Hemmwirkung H_{30} (DIN EN ISO 11348-2:2009-05)

Mit:

H_{30} Hemmwirkung des Testansatzes nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 min in %

I_{c30} siehe Gleichung 5

I_{30} Leuchtintensität des Testansatzes nach Ablauf der Kontaktzeit von 30 min in relativen Leuchteinheiten

Aus je einer Doppelbestimmung der Hemmung der Verdünnungsstufen und der Kontrollen wird der Mittelwert berechnet und die Abweichungen der Einzelmessungen vom Mittelwert in Prozent gebildet.

Die Berechnungen werden in der Excel-Vorlage für den Leuchtbakterientest der ökotoxikologischen Arbeitsgruppe der HAW Hamburg durchgeführt. In dieser Datei werden auch die prozentualen Hemmungen der Biolumineszenz-Intensität als Säulendiagramme dargestellt (siehe Anlage auf CD). Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung der Ergebnisse wurden mit den Programmen Microsoft Office Excel 2007, GraphPad Prism 5.04 und Statistica 6.0 durchgeführt.

3.3 Süßwasser-Bakterienkontakttest

3.3.1 Testorganismus *Arthrobacter globiformis*

Als Testorganismus im Süßwasser-Bakterienkontakttest wird *Arthrobacter globiformis* (DSM, Stammmnummer 20124 DSMZ) eingesetzt. Im ökotoxikologischen Labor der Fakultät Life Sciences der HAW Hamburg werden aus *A. globiformis* von der DSMZ GmbH Stammkulturen für die Verwendung im Test selbst hergestellt und tiefgefroren in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -70 °C gelagert.

Die Gattung *Arthrobacter* gehört zu den bekannten und nach neuen 16 S rRNA-Analysen zu den häufigeren Bodenbakterien (Janssen, 2006). Die optimale Temperatur für die Inkubation von *A. globiformis* beträgt 30 °C (Ahlf, et al., 1998).

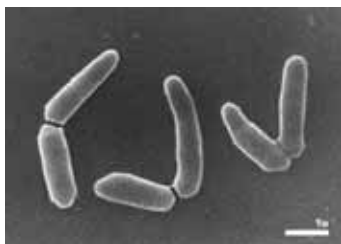


Abbildung 5 *Arthrobacter globiformis* IFO 12137 (Tamura, et al.)

Die Gestalt von *A. globiformis* verändert sich während des Wachstumszyklus (Pleomorphie). In der logarithmischen Phase liegen die Bakterien als verzweigte Stäbchen ($0,5\ \mu\text{m} - 0,8\ \mu\text{m} \times 1 - 4\ \mu\text{m}$) und am Ende der Wachstumsphase als Kokken mit einem Kugeldurchmesser von $0,6\ \mu\text{m} - 0,8\ \mu\text{m}$ vor. Eine weitere Eigenschaft der Bakterien ist, dass sie in der exponentiellen Phase grampositiv und in der stationären Phase gramvariabel sind ((Ahlf, et al., 1998) und DIN 38412-48:2002-09).

3.3.2 Testdurchführung

Der Süßwasser-Bakterienkontakttest nach „DIN 38412-48:2002-09 *Arthrobacter globiformis* für kontaminierte Feststoffe“ ermittelt die Hemmwirkung eines belasteten Sediments auf die Dehydrogenaseaktivität des Bakteriums *Arthrobacter globiformis*. Anders als in der Norm DIN 38412-48:2002-09 wird der Test miniaturisiert in flachen, transparenten 96-Well-Mikrotiterplatten von costar® durchgeführt. Die Sedimentprobe wird mit dem blauen Farbstoff Resazurin in Kontakt gebracht und nach 45 min wird mittels eines Fluorometers bestimmt, wie viel des rosafarbenen Stoffs Resorufin die Dehydrogenasen aus Resazurin erzeugt haben. Die Farbstoffe Resazurin und Resorufin wurden bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen. Eine weitere Modifikation im Vergleich zur Norm ist die fluorometrische Messung von Resorufin (Zunahme der Fluoreszenz) anstelle der photometrischen Messung von Resazurin (Extinktionsabnahme).

Dehydrogenasen sind Enzyme, die Resazurin in Zellen zu Resorufin reduzieren (Abbildung 6, (Harbeck, 2003; Feiler, et al., 2009)) und dabei NADH zu NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) oxidieren. Zwei Wasserstoff-Ionen (H^+) und zwei Elektronen werden von NADH abgespalten und bilden mit dem Sauerstoffatom von Resazurin Wasser (H_2O). In einem zweiten Reaktionsschritt wird Resorufin reversibel zu Dihydroresorufin reduziert (Abbildung 6). Allerdings tritt diese 2. Reduktion nicht auf, wenn Resazurin ausreichend bioverfügbar ist, wovon bei diesem Versuch ausgegangen wird (Feiler, et al., 2009). Wenn durch Absterben der Bakterienzellen oder verminderter Stoffwechselaktivität der Zellen wenig NADH vorhanden ist, wird auch weniger Resorufin gebildet.

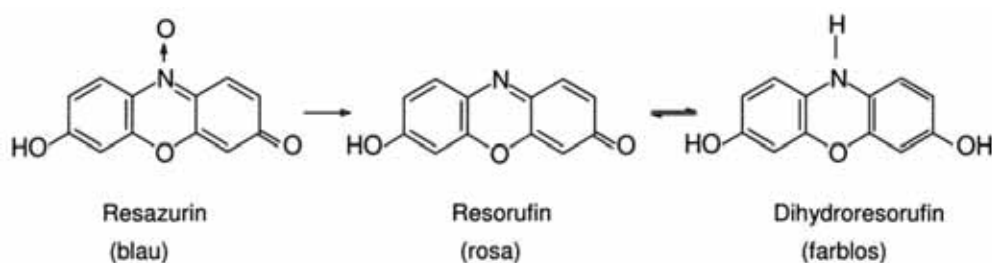


Abbildung 6 Umwandlung von Resazurin in Resorufin durch die Dehydrogenase und Redoxreaktion des Resorufins (Harbeck, 2003; Feiler, et al., 2009)

Die homogenisierten Sedimentproben werden mit Reinstwasser 1:1 verdünnt und zwei Tage im Überkopfschüttler durchmischt. Die Proben werden danach 10 min in einem Wasserbad

bei 80 °C pasteurisiert. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur werden der pH-Wert und das Redox-Potential gemessen. Das Redox-Potential muss positiv sein, weil die Testorganismen aerobe Bedingungen benötigen und der Redoxindikator Resazurin mit reduktiven Substanzen reagiert (Feiler, et al., 2009). Der pH-Wert muss zwischen 6 und 9 liegen, da es sonst während des Tests einen Farbumschlag geben kann, der nicht durch die Dehydrogenaseaktivität erzeugt wurde (DIN 38412-48:2002-09). Aus der vorverdünnten Sedimentprobe (Verdünnungsstufe G0) und einer Verdünnungssuspension werden die Verdünnungsstufen G2, G4 und G8 bzw. nach der alten internen Vorschrift der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg die Stufen G1, G2 und G4 hergestellt (prozentualer Anteil der Sedimentprobe siehe Tabelle 4). Als Verdünnungssuspension wird für jede Probe eine spezifische Suspension aus Reinstwasser und dem Kontrollfeststoff Quarzmehl (Quarzmehl-SMH, MILLISIL W 4, Quarzwerke) verwendet, sodass sich in allen Verdünnungen die gleiche Feststoffmenge befindet. Hierdurch wird eine Vergleichbarkeit der Dehydrogenaseaktivität der Testorganismen in den Testansätzen hergestellt.

Tabelle 4 Prozentualer Anteil der vorverdünnten Sedimentprobe an der Verdünnungsstufe

Verdünnungsstufe	% Sediment
G0	100
G1	50
G2	25
G4	12,5
G8	6,25

Es wird außerdem eine Negativ-Kontrolle (K) aus Quarzmehl und Reinstwasser hergestellt und für die Sensitivitätsprüfung der Bakterien die Positiv-Kontrolle „BAC G0“ (10 mg/l) aus Reinstwasser, Quarzmehl und Benzalkoniumchlorid (Alkylbenzoldimethylammoniumchlorid, C₉H₁₃ClNR). Aus der Positiv-Kontrolle „BAC G0“ werden die zwei Verdünnungsstufen „BAC G1“ (5 mg/l) und „BAC G2“ (2,5 mg/l) hergestellt.

Für die Herstellung der Bakteriensuspension mit der optischen Dichte von 0,3 wird zunächst eine Vorkultur aus einer *A. globiformis*-Stammkultur und 1/3-DSM-Medium (Herstellung siehe Anhang 10.3) hergestellt und 14 bis 16 Stunden bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Die Vorkultur wird dann neu in 1/3-DSM-Medium geimpft, sodass eine optische Dichte von 0,05 entsteht. Diese Suspension soll bei 30 °C und 240 rpm ca. vier Stunden auf eine optische Dichte von 0,3 heranwachsen.

Die Sedimentprobe (G0), die Proben-Verdünnungen (G2, G4 und G8) und die Kontrollen (K, BAC G0, BAC G1, BAC G2) werden mit der Bakteriensuspension in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in Kontakt gebracht. Von jeder Probe, jeder Verdünnungsstufe und jeder Kontrolle werden drei Parallelen und ein Blindansatz mit 1/3-DSM-Medium statt Bakterien hergestellt. Wird die Hemmung fluorometrisch bestimmt, müssen außerdem Kalibrierungsplatten mit Proben, Verdünnungen, Kontrollen und 1/3-DSM-Medium befüllt werden (Belegungsschema siehe Anhang 10.6).

Die Kalibrierung wird benötigt, da jedes Sediment aufgrund seiner individuellen Eigenschaften, wie z.B. die Korngrößenverteilung und dem organischen Anteil, Resorufin in unterschiedlicher Weise bindet, was auch den Quenching-Effekt durch Resazurin beeinflusst. Daher wird bei gleicher Resazurin-/Resorufinkonzentration eine unterschiedliche Resorufinkonzentration entstehen und auch mit dem Fluorometer gemessen werden, weshalb eine Kontrolle für jedes Sediment und jede Verdünnungsstufe notwendig ist (Heise, et al., 2005a; Ahlf, 2007; Feiler, et al., 2009). Mit der Kalibrierung werden also mögliche Störungen des geochemischen Einflusses der Proben-Matrix verhindert (Feiler, et al., 2009). Nach einer Inkubationszeit der Proben- und Kalibrierungsplatten von 2 Stunden bei 30°C und anschließender Zugabe des blauen Farbstoffs Resazurin zu allen Ansätzen der Probenplatten, wird die vom Resorufin emittierte Fluoreszenz in allen Wells zum Zeitpunkt t₀ gemessen. Nach 15 min (t₁₅), 30 min (t₃₀) und 45 min (t₄₅) wird erneut die Fluoreszenz der Probenplatten gemessen. Die Testansätze werden bei der Messung mit einer Wellenlänge von 530 nm bestrahlt. Die Moleküle des Resorufins werden dadurch angeregt und fallen unter Emission von Fluoreszenz einer Wellenlänge von 590 nm in den Grundzustand zurück. Zu jedem Well der Kalibrierungsplatten werden nach der Inkubationszeit verschiedene Verhältnisse aus Resorufin und Resazurin (Tabelle 5) gegeben.

Tabelle 5 Volumen in µl an Resazurin und Resorufin und Anteil Resorufin in % für die Kalibrierung

Resazurin in µl	Resorufin in µl	Anteil an Resorufin in % am Gesamtvolumen der Farblösungen
80	0	0
60	20	25
40	40	50
20	60	75

Aus den unterschiedlichen Konzentrationen von Resorufin und der gemessenen Fluoreszenz kann für jede Probe, Verdünnung und Kontrolle eine Kalibriergerade (Beispiele siehe Abbildung 7) erstellt werden. Die Berechnung der Steigung und des Achsenabschnitts der Kalibriergeraden mit Hilfe der linearen Regression dient der Bestimmung des prozentualen Anteils des erzeugten Resorufins aus Resazurin der Proben und Negativ-Kontrollen.

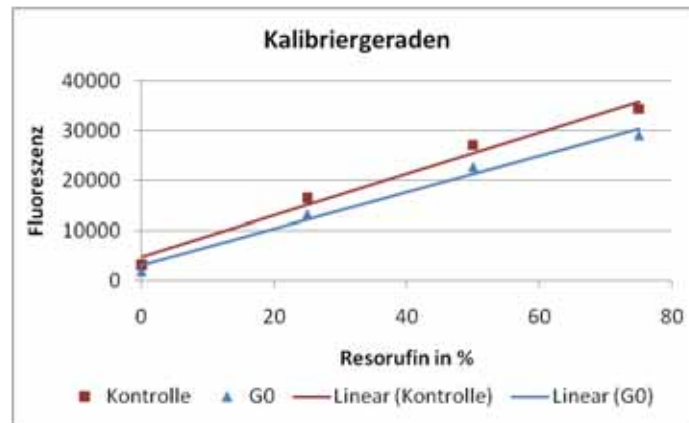


Abbildung 7 Kalibrierpunkte (Fluoreszenz über Resorufin in %) der Kontrolle und der Probe HL-29.3.-Os-1 (G0) mit linearen Regressionsgeraden

Jeder gemessene Fluoreszenz-Wert F_{Probe} der Proben, der Verdünnungen und der Kontrollen wird nach Subtraktion des jeweiligen Blindwerts F_{BW} durch die Steigung der Kalibrierkurve S_K geteilt, um die Menge an zugehörigem gebildeten Resorufin in % zu berechnen (Gleichung 7).

$$\text{Resorufin in \%} = \frac{F_{\text{Probe}} - b}{S_K} - \frac{F_{\text{BW}} - b}{S_K} = \frac{F_{\text{Probe}} - F_{\text{BW}}}{S_K}$$

Gleichung 7 Prozentualer Anteil des Resorufins

Mit:

F_{Probe} Fluoreszenz der Probe, der Verdünnung oder der Positiv-Kontrolle in relativen Fluoreszenzeinheiten

F_{BW} Fluoreszenz des Blindwerts in relativen Fluoreszenzeinheiten

b Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

S_K Steigung der Kalibriergeraden

Aus dem gebildeten Resorufin in % über die Zeit von 0 bis 45 Minuten wird eine Steigung berechnet. Die Berechnung der Hemmwirkung in % der Dehydrogenaseaktivität bezieht sich auf die Steigung des gebildeten Resorufins in % der Kontrolle (Gleichung 8).

$$H \text{ in \%} = 100 - \left(\frac{S_{\text{Probe/Positiv-Kontrolle}}}{S_{\text{Kontrolle}}} \times 100 \right)$$

Gleichung 8 Hemmung H in % der Dehydrogenaseaktivität (DIN 38412-48:2002-09)

Mit:

H Hemmung der Dehydrogenaseaktivität der Proben, Verdünnungen und Negativ-Kontrollen in Prozent

$S_{\text{Probe/Positiv-Kontrolle}}$ Steigung des gebildeten Resorufins der Proben bzw. Positiv-Kontrollen über die Zeit von 0 bis 45 min

S_{Kontrolle}

Steigung des gebildeten Resorufins der Kontrollen über die Zeit von 0 bis 45 min

Die Berechnungen werden in der Excel-Vorlage für den Süßwasser-Bakterienkontakttest der ökotoxikologischen Arbeitsgruppe der HAW Hamburg durchgeführt. In dieser Datei werden auch die prozentualen Hemmungen der Dehydrogenaseaktivität als Säulendiagramme dargestellt (siehe Anlage auf CD). Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung der Ergebnisse wurden mit den Programmen Microsoft Office Excel 2007, GraphPad Prism 5.04 und Statistica 6.0 durchgeführt.

4 Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests

4.1 Vergleich der statistischen Verteilung der Sedimenttoxizitäten gemessen mit verschiedenen Biotests

Mit dem Algenwachstumshemmtest, dem Leuchtbakterientest und dem Süßwasser-Bakterienkontakttest wurden die Toxizitäten von jeweils insgesamt 22 Oberflächen-Sedimentproben aus dem Mühlenberger Loch (Probenahme: 24.3.2011), aus Heuckenlock (Probenahme: 29.3.2011) und aus dem Neufelder Watt (Probenahme: 9.5.2011) gemessen. Die Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests aller Proben mit allen Verdünnungsstufen sind in der Anlage auf CD zu finden. Die statistischen Verteilungen der Toxizitäten als Hemmung in % der geringsten Proben-Verdünnungen des Algenwachstumshemmtests (AT), des Leuchtbakterientests (LBT) und des Süßwasser-Bakterienkontakttests (SKT) sind in Abbildung 9 als Box-Whiskers Plots und in Abbildung 10 als Streudiagramm (Punkt-Wolken) mit Median und Spannweite dargestellt. Für den Algenwachstumshemmtest werden sowohl die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate (WR), die aus der Messung der Fluoreszenz über drei Tage ermittelt wurde, als auch die prozentuale Hemmung, die aus der Fluoreszenz-Messung nach drei Tagen (T3) berechnet wurde, dargestellt. Negative Werte der Hemmung werden als Stimulationen bezeichnet.

Bei einem Box-Whiskers Plot (Beispiel in Abbildung 8) zeigt der Kasten (engl.: box) an, in welchem Bereich die mittleren 50 % der Ergebnisse eines Biotests (Datensatz x) liegen, wobei die obere Grenze 75 Perzentil und die untere Grenze 25 Perzentil entspricht. Die Länge des Kastens heißt „Interquartilsabstand“ (engl.: interquartile range = IQR). Ein Perzentil-Wert gibt an, dass 25 % bzw. 75 % aller Werte unterhalb dieses Wertes liegt. Ober- und unterhalb des Medians, der durch den waagerechten Strich innerhalb des Kastens dargestellt wird, liegen jeweils 50 % der Messwerte eines Tests. Die von dem Kasten ausgehenden Linien werden „Whiskers“ (Schnurrbarthaare) genannt und reichen vom Minimum bis zum Maximum der Werte.

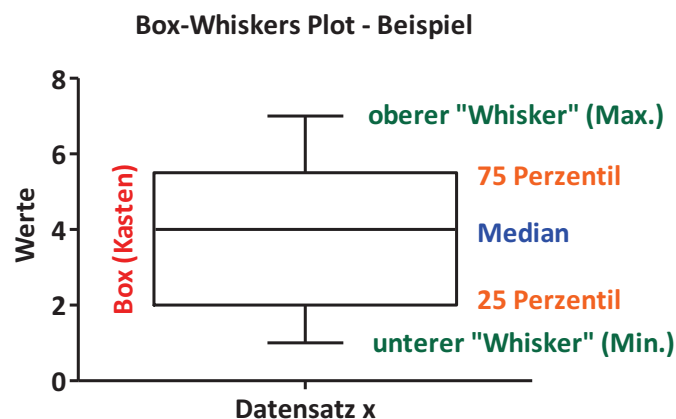


Abbildung 8 Box-Whiskers Plot – Beispiel

Tabelle 6 Ergebnisse der Berechnungen zu Abbildung 9 und Abbildung 10; AT WR (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Algenwachstumshemmtests (WR= Wachstumsrate), AT Flu (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Algenwachstumshemmtests (Flu = Fluoreszenz nach 3 Tagen (T3)), LBT (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Leuchtbakterientests, SKT (G0) = 1. Verdünnungsstufe G0 des Süßwasser-Kontakttests

	AT WR (G1) Hemmung in %	AT Flu (G1) Hemmung in %	LBT (G1) Hemmung in %	SKT (G0) Hemmung in %
Anzahl der Werte	22	22	22	22
Median	3	-6	18	55
Minimum	-124	-88	6	16
Maximum	73	92	67	82
Spannweite	197	180	61	66
25 % Perzentil	-15	-53	11	47
75 % Perzentil	19	43	22	67
Interquartilsabstand (IQR)	34	96	11	19

Verteilung der Toxizitäten als Box-Whiskers Plots

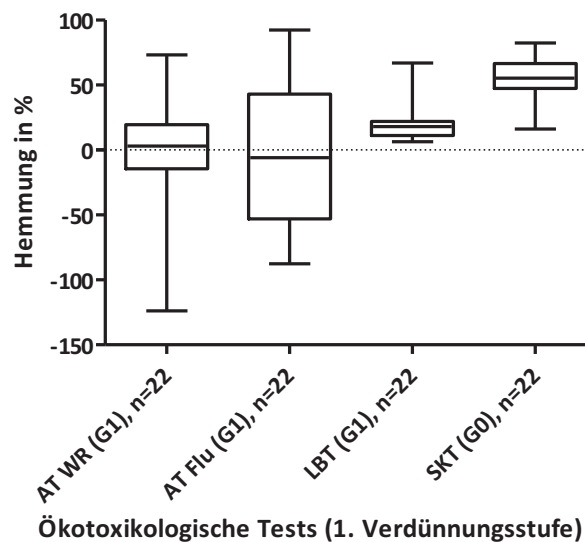


Abbildung 9 Verteilung der Ergebnisse als Box-Whiskers Plots; Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests als Hemmungen in % der 1. Verdünnungsstufe der insgesamt 22 Oberflächen-Sedimentproben aus dem Mühlenberger Loch (Probenahme: 24.3.2011), aus Heuckenlock (Probenahme: 29.3.2011) und aus dem Neufelder Watt (Probenahme: 9.5.2011); AT WR (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Algenwachstumshemmtests (WR = Wachstumsrate), AT Flu (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Algenwachstumshemmtests (Flu = Fluoreszenz nach 3 Tagen (T3)), LBT (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Leuchtbakterientests, SKT (G0) = 1. Verdünnungsstufe G0 des Süßwasser-Kontakttests; n = Anzahl der Proben

Verteilung der Toxizitäten als Streudiagramm

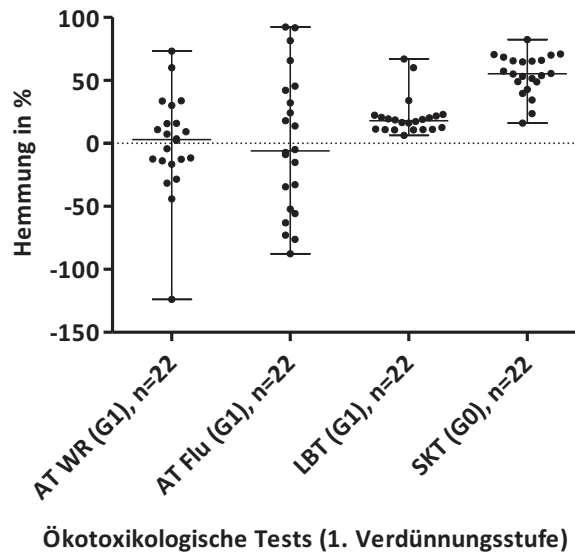


Abbildung 10 Verteilung der Ergebnisse als Streudiagramm (Punkt-Wolke); Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests als Hemmungen in % der 1. Verdünnungsstufe der insgesamt 22 Oberflächen-Sedimentproben aus dem Mühlenberger Loch (Probenahme: 24.3.2011), aus Heuckenlock (Probenahme: 29.3.2011) und aus dem Neufelder Watt (Probenahme: 9.5.2011); AT WR (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Algenwachstumshemmtests (WR = Wachstumsrate), AT Flu (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Algenwachstumshemmtests (Flu = Fluoreszenz nach 3 Tagen (T3)), LBT (G1) = 1. Verdünnungsstufe G1 des Leuchtbakterientests, SKT (G0) = 1. Verdünnungsstufe G0 des Süßwasser-Kontakttests; n = Anzahl der Proben

Ein Vergleich der Medianwerte der verschiedenen Biotests (Abbildung 9, Abbildung 10 und Tabelle 6) zeigt, dass der Median der Ergebnisse des Süßwasser-Kontakttests (SKT) mit 55 % Hemmung am größten ist, danach folgt der Median des Leuchtbakterientests (LBT) mit 18 % Hemmung und die kleinsten Mediane hat der Algenwachstumshemmtest (AT) mit 3 % Hemmung der Wachstumsrate (WR) und -6 % Stimulation der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu).

Anhand der Box-Whiskers Plots in Abbildung 9 und Tabelle 6 ist zu erkennen, dass die Interquartilsabstände (IQR) des Algenwachstumshemmtests der Fluoreszenz nach 3 Tagen mit 96 % Hemmung (-53 % bis 43 %) und der Wachstumsrate mit 34 % Hemmung (-15 % bis 19 %) am größten sind im Vergleich zu den anderen Biotests. Beim Süßwasser-Kontakttest ist der Bereich von 25 bis 75 Perzentil mit 19 % (47 % bis 67 %) am zweitgrößten und beim Leuchtbakterientest streuen die Werte mit 11 % IQR am geringsten (11 % bis 22 %). Bei den Hemmungen der Fluoreszenzen nach 3 Tagen des Algentests ist der Interquartilsabstand viel größer (96 %) als bei den Hemmungen der Wachstumsraten des Algentests (34 %).

Beim Algentest sind auch die Spannweiten mit 197 % (WR) und 180 % (Flu) am größten, beim Süßwasser-Kontakttest mit 66 % ist die Spannweite am zweitgrößten und beim Leuchtbakterientest mit 61 % am geringsten. Die große Spannweite des Algentests der Wachstumsrate wird jedoch zum großen Teil durch den Minimum-Wert -124 % bestimmt, der in weitem Abstand zu den übrigen Werten liegt.

Die mittleren 50 % der Werte des Leuchtbakterientests liegen im Vergleich zu den anderen Biotests sehr nahe am Median, trotzdem ist die Spannweite der LBT-Daten ca. 6-mal so hoch

wie der Interquartilsabstand. Dies ist hauptsächlich auf die zwei höchsten Toxizitäten zurückzuführen, die in deutlichem Abstand zu den anderen Werten liegen (Abbildung 10).

4.2 Vergleich der Ergebnisse der drei Probenahmeorte mittels der Toxizitäten der verschiedenen Biotests

In dem Streudiagramm in Abbildung 11 ist für jeden Biotest der Vergleich der Toxizitäten an den drei Probenahmeorten Mühlenberger Loch (ML), Heuckenlock (HL) und Neufelder Watt (NF) angegeben als prozentuale Hemmungen in der geringsten Verdünnungsstufe zu sehen. Dieser Vergleich ist dargestellt für die Hemmung der Wachstumsrate (AT, WR) sowie der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (AT, Flu) im Algenwachstumshemmtest, die Hemmung im Leuchtbakterientest (LBT) und im Süßwasser-Bakterienkontakttest (SKT).

Die jeweils sechs bis acht Werte eines Probenahmeortes sind hier zusammengefasst, d.h. für das Mühlenberger Loch sowie für Heuckenlock schließt dies jeweils die Werte von Oberstrom und von Unterstrom ein und für das Neufelder Watt die Werte von WP20 und von WP24 (WP = Wegpunkt). In dem Diagramm sind außerdem die Spannweiten der Daten und deren Mittelwerte abgebildet (Werte siehe Tabelle 7).

Tabelle 7 Berechnungen zu Abbildung 11 Vergleich der Toxizitäten der Probenahmeorte; Berechnungen aus den Ergebnissen der ökotoxikologischen Tests als Hemmungen in % (H%) der jeweils 6 bis 8 Oberflächen-Sedimentproben pro Probenahmeort (Mühlenberger Loch (ML), Heuckenlock (HL), Neufelder Watt (NF)); AT = Algenwachstumshemmtest, LBT = Leuchtbakterientest, SKT = Süßwasser-Bakterienkontakttest

Probenahmeort	AT (WR) G1 H%			AT (Flu) G1 H%			LBT G1 H%			SKT G0 H%		
	ML	HL	NF	ML	HL	NF	ML	HL	NF	ML	HL	NF
Anzahl der Werte	8	8	6	8	8	6	8	8	6	8	8	6
Minimum	124	2	-17	-88	-33	-15	6	11	11	51	16	56
Maximum	-12	34	73	-5	81	92	34	22	67	82	53	71
Spannweite	112	31	90	83	114	108	28	12	56	31	37	15
Mittelwert	-35	19	21	-56	29	35	16	17	33	63	39	66

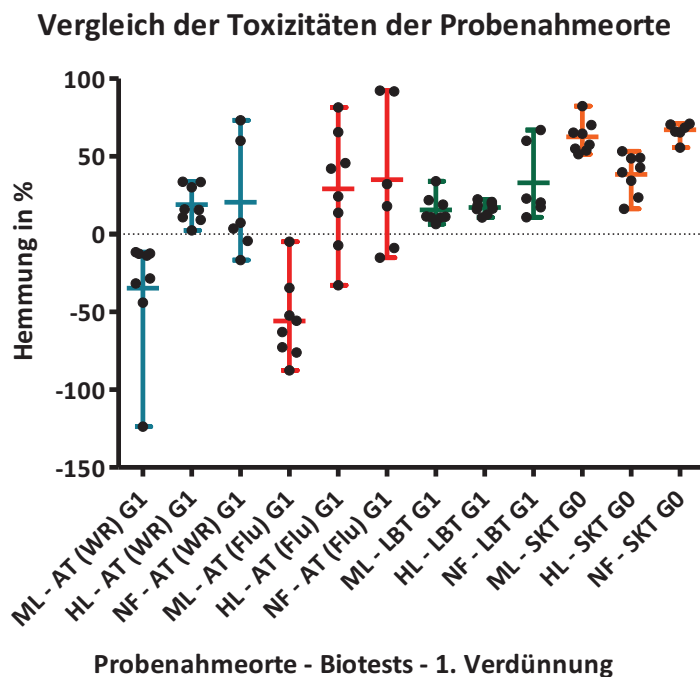


Abbildung 11 Vergleich der Toxizitäten der Probenahmeorte; Darstellung des Mittelwerts und der Spannweite (Maximum – Minimum); Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests als Hemmungen in % der jeweils 6 bis 8 Oberflächen-Sedimentproben pro Probenahmeort (Mühlenberger Loch (ML), Heuckenlock (HL), Neufelder Watt (NF)); AT = Algenwachstumshemmtest, LBT = Leuchtbakterientest, SKT = Süßwasser-Bakterienkontakttest

Algenwachstumshemmtest:

Der Algenwachstumshemmtest (AT) zeigt in den aus der Wachstumsrate (WR) und aus der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu) berechneten Ergebnissen sowohl Hemmung als auch Stimulation (Abbildung 11). Der Mittelwert der Hemmungen bzw. Stimulationen der Wachstumsrate (WR) ist beim Mühlenberger Loch mit -35 % Stimulation am geringsten und in Heuckenlock (19 %) und im Neufelder Watt (21 %) liegen die Mittelwerte deutlich höher, wobei die Abweichung zwischen den beiden nur 2 % beträgt. Der Mittelwert der Hemmungen bzw. Stimulationen der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu) ist beim Mühlenberger Loch mit -56 % Stimulation am geringsten, danach folgt Heuckenlock mit 29 % Hemmung und im Neufelder Watt ist der Mittelwert am höchsten mit 35 % Hemmung. Auffällig sind in Abbildung 11 die großen Spannweiten der AT-Daten aus dem Mühlenberger Loch (WR: 112 %, Flu: 83 %) und aus dem Neufelder Watt (WR: 90 %, Flu: 108 %) und bei der Messung der Fluoreszenz nach 3 Tagen auch die Spannweite für Heuckenlock mit 114 %. Beim Neufelder Watt liegen die Werte der zwei Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 (WR: 60 % und 73 %, Flu: beide 92 %) deutlich höher als die übrigen Werte. Die Probe ML-Os- 1 zeigt beim Mühlenberger Loch die höchste Stimulation der Wachstumsrate (-124 %) und die niedrigste Stimulation der Fluoreszenz nach 3 Tagen (-5 %), wodurch jeweils hohe Spannweiten erreicht werden.

Zusammenfassung der Mittelwert-Beziehungen für AT (WR, Flu): (NF ≥ HL) > ML

Leuchtbakterientest:

Im Leuchtbakterientest zeigen sich in der geringsten Verdünnung G1 ausschließlich Hemmungen. Der Mittelwert der Ergebnisse des Leuchtbakterientests (Abbildung 11) hat die gleiche Rangfolge der Probenahmeorte wie beim Algentest. Hier weichen jedoch die Mittelwerte des Mühlenberger Lochs (16 %) und Heuckenlock (17 %) kaum ($\Delta 1$ %) voneinander ab (Tabelle 7). Der Mittelwert der Hemmungen im Neufelder Watt ist mit 33 % ungefähr doppelt so hoch wie die Mittelwerte des Mühlenberger Lochs und von Heuckenlock. Im Neufelder Watt ist jedoch auch die Spannweite der Werte höher, wobei lediglich zwei Hemmungen der Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 (60 % und 67 %) des Neufelder Watts deutlich über den übrigen Werten des Neufelder Watts liegen und auch über denen des Mühlenberger Lochs und aus Heuckenlock. Das Mühlenberger Loch hat beim Leuchtbakterientest beurteilt nach den Mittelwerten die geringsten Hemmungen (ML-Mittelwert = 16 %), jedoch zeigt sich am Mühlenberger Loch Oberstrom auch der dritthöchste Wert aller Hemmungen bei der Probe ML-Os-1 mit 34 %.

Zusammenfassung der Mittelwert-Beziehungen für LBT:

NF > (HL \geq ML)

Süßwasser-Bakterienkontakttest:

Im Süßwasser-Kontakttest zeigen sich in der geringsten Verdünnung G0 ausschließlich Hemmungen. In Abbildung 11 ist zu sehen, dass der Mittelwert der Hemmungen des Süßwasser-Kontakttests im Neufelder Watt mit 66 % am größten ist, am zweithöchsten im Mühlenberger Loch mit 63 % und am geringsten in Heuckenlock mit 39 % (Tabelle 7). Beim Süßwasser-Kontakttest ist die Spannweite der Daten aus dem Neufelder Watt mit 15 % Hemmung kleiner als beim Algenwachstumshemmtest (WR: 90 %, Flu: 108 %) und dem Leuchtbakterientest (56 %). Die Spannweite der SKT-Daten im Neufelder Watt ist auch kleiner als bei den Probenahmeorten Mühlenberger Loch (31 %) und Heuckenlock (37 %) im Süßwasser-Kontakttest. Die höchste Hemmung mit dem Süßwasser-Kontakttest wurde im Mühlenberger Loch Oberstrom (ML-Os-1) mit 82 % gemessen.

Zusammenfassung der Mittelwert-Beziehungen für SKT:

(NF \geq ML) > HL

Zusammenfassung der Spannweiten-Beziehungen der Biotests für die drei Orte:

Mühlenberger Loch:	AT (WR)	> AT (Flu)	> SKT	> LBT
Heuckenlock:	AT (Flu)	> (SKT ~ AT (WR))	> LBT	
Neufelder Watt:	AT (Flu)	> AT (WR)	> LBT	> SKT

Der Leuchtbakterientest hat beim Mühlenberger Loch und bei Heuckenlock die geringsten Spannweiten und auch beim Neufelder Watt steht der LBT an dritter Stelle. Der Süßkontakttest hat auch geringe Spannweiten und steht damit außer beim Neufelder Watt zwischen dem AT und LBT. Der Algenwachstumshemmtest hat in mindestens einem Endpunkt die höchste Spannweite aller Biotests.

4.3 Betrachtung des Verlaufs der Toxizitäten über die Verdünnungsstufen bei den verschiedenen Biotests mittels von Clusteranalysen

4.3.1 Beschreibung der Clusteranalyse und der K-means-Analyse

Um Ähnlichkeiten der Verläufe der Verdünnungsreihen der 22 Proben zu erkennen, wurden für die Ergebnisse innerhalb jedes Biotests eine Clusteranalyse und eine K-means-Analyse mit dem Programm Statistica (Version 6.0) extern von S. Heise durchgeführt. Dabei wurden die Proben in Gruppen (Cluster) nach ähnlichen Verläufen der Verdünnungsreihen eingeteilt. In der Clusteranalyse wurde zunächst ein Baumdiagramm erstellt, wobei das Complete Linkage-Verfahren mit euklidischen Distanzen, d.h. Verschmelzungsniveaus, gewählt wurde. Das Baumdiagramm für den Endpunkt „Hemmung der Wachstumsrate“ im Algenwachstumshemmtest ist in Abbildung 12 beispielhaft dargestellt. In dem Baumdiagramm ist durch den Verbund von Linien zu sehen, welche Proben nach dieser Analyse in Beziehung zueinander stehen, das heißt in diesem Fall ähnliche Verläufe der Verdünnungsreihen aufweisen. Die Anzahl der Cluster wird aus dem Baumdiagramm nach Plausibilität und anhand der Größe der euklidischen Distanzen abgeschätzt. Die Linkage Distanz zwischen den Schritten der Verschmelzung sollte nicht zu groß sein, da sie etwas über den Grad der Ähnlichkeiten der Proben der gewählten Cluster aussagt. Allerdings erlaubt ein Baumdiagramm nur einen ersten optischen Eindruck der Ähnlichkeiten zwischen den Proben. In einer K-means-Analyse werden die Proben einer vorgegebenen Anzahl an Clustern zugeordnet, wobei als Anzahl die aus den Baumdiagrammen abgeschätzte Anzahl als Orientierungswert genommen wird. Diese Art der Analyse bestimmt die Mittelwerte der Eigenschaften, die ein jeweiliges Cluster charakterisieren. Die Eigenschaften sind in diesem Fall die Mittelwerte der Hemmungen in den jeweiligen Verdünnungsstufen. Bei der K-means-Analyse wurden für die Clusterbildung maximal 10 Iterationen durchgeführt und die Option der Maximierung der Zwischen-Cluster-Distanzen gewählt.

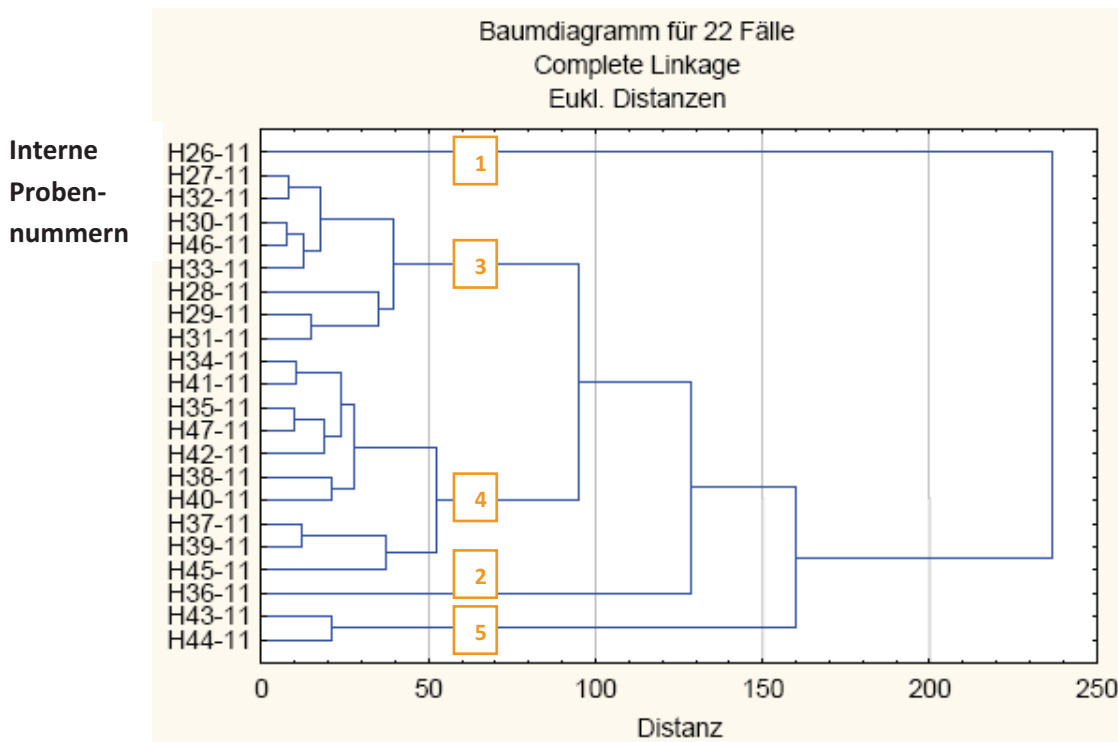


Abbildung 12 Beispiel eines Baumdiagramms für 22 Fälle als Complete Linkage mit euklidischen Distanzen erstellt aus den Ergebnissen des Algenwachstumshemmtests (prozentuale Hemmung der Wachstumsrate) der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und dem Neufelder Watt (interne Nummern)

4.3.2 Verlauf der Toxizitäten der Verdünnungsstufen des Algenwachstumshemmtests

Die Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests der insgesamt 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt wurden in Säulendiagrammen als Toxizitäten der Eluate aus Oberflächenproben mit ihren Verdünnungsstufen G1 bis G16 angegeben als prozentuale Hemmung der Wachstumsrate sowie der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (T3) dargestellt (siehe Anlage auf CD).

Für die Ergebnisse der Endpunkte „Hemmung der Wachstumsrate“ und „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ im Algenwachstumshemmtest der Verdünnungsreihen (G1, G2, G4, G8 und G16) der 22 Proben wurde eine Clusteranalyse durchgeführt (Beschreibung der Clusteranalyse siehe 4.3.1). Bei dem Endpunkt „Hemmung der Wachstumsrate“ im Algenwachstumshemmtest wurden aus dem Baumdiagramm (siehe 4.3.1) bei einer euklidischen Distanz von ca. 53 für die Verdünnungsreihen der Proben 5 Cluster gewählt (siehe Nummern in Abbildung 12 in 4.3.1). In Tabelle 8 sind die mit der K-means-Analyse berechneten Mittelwerte der prozentualen Hemmung bzw. Stimulation der Wachstumsrate der Verdünnungen für die 5 Cluster wiedergegeben und in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Die Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Clustern sind in Tabelle 9 zusammen mit den jeweiligen Hemmungen bzw. Stimulationen aufgeführt. Um die unterschiedlichen Verläufe in den Verdünnungsreihen zu verdeutlichen, sind diese in Abbildung 14 exemplarisch dargestellt.

Tabelle 8 Mittelwerte der Cluster des Algenwachstumshemmtests (Hemmung in % (H%) der Wachstumsrate) der Verdünnungsstufen G1, G2, G4, G8 und G16 nach der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5
AT-WR H% G1	-124	34	-21	13	67
AT-WR H% G2	-48	-22	-17	4	47
AT-WR H% G4	-39	-51	-16	2	43
AT-WR H% G8	-34	-69	-18	-8	10
AT-WR H% G16	-33	-45	-20	-9	6

Tabelle 9 Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests (Hemmung in % (H%) der Wachstumsrate) der Verdünnungsstufen G1, G2, G4, G8 und G16 geordnet nach Clustern aus der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt (erstellt mit Statistica 6.0)

	Interne Nr.	Standort-Beschreibung	AT WR G1 H%	AT WR G2 H%	AT WR G4 H%	AT WR G8 H%	AT WR G16 H%
Cluster 1	H26-11	ML-Os-1	-124	-48	-39	-34	-33
Cluster 2	H36-11	HL-Os-3	34	-22	-51	-69	-45
Cluster 3	H27-11	ML-Os-2	-12	-8	-17	-19	-13
	H28-11	ML-Os-3	-44	-17	-14	-11	-23
	H29-11	ML-Os-4	-28	-33	-31	-32	-20
	H30-11	ML-Us-1	-13	-11	-10	-11	-21
	H31-11	ML-Us-2	-32	-22	-22	-29	-25
	H32-11	ML-Us-3	-12	-12	-16	-16	-19
	H33-11	ML-Us-4	-14	-20	-13	-18	-21
Cluster 4	H46-11	NF-WP24-2	-17	-16	-9	-7	-19
	H34-11	HL-Os-1	9	-7	-10	-9	-20
	H35-11	HL-Os-2	2	-7	-3	-6	-3
	H37-11	HL-Os-4	30	16	0	-2	-5
	H38-11	HL-Us-1	16	6	0	-24	-9
	H39-11	HL-Us-2	34	16	10	-5	-9
	H40-11	HL-Us-3	16	9	-2	-4	-10
	H41-11	HL-Us-4	11	-2	-6	-18	-20
	H42-11	NF-WP20-1	4	-5	12	-11	-13
H45-11	NF-WP24-1	7	19	17	12	9	
Cluster 5	H47-11	NF-WP24-3	-4	-6	1	-11	-5
	H43-11	NF-WP20-2	73	44	37	7	4
	H44-11	NF-WP20-3	60	51	50	13	9

Das Cluster 1 zeichnet sich durch eine sehr hohe Stimulation des Mittelwerts der Stufe G1 (-124 %) und ein Sinken der Stimulationen mit den Mittelwerten der Proben-Verdünnungsstufen aus (Abbildung 13).

Bei den Proben des Clusters 2 zeigt auch nur der Mittelwert der Stufe G1 mit 34 % (Tabelle 8) eine relativ hohe Hemmung, während alle anderen Stufen mit Stimulation reagieren. Bei den Mittelwerten steigt die Stimulation über die Verdünnungen G2, G4 und G8, aber die

Stimulation der höchsten Verdünnung G16 sinkt wieder im Vergleich zu G8. Der Mittelwert der Verdünnungsstufe G8 reagiert im Vergleich zu den anderen Proben-Verdünnungen mit -69 % mit der größten Stimulation der Wachstumsrate.

Die Verdünnungen der Proben im Cluster 3 reagieren ausschließlich mit Stimulation. Die Punkte-Linie der Mittelwerte der Stimulationen der Verdünnungen verläuft nahezu flach bei Werten zwischen -21 % und -16 %.

Bei den Proben in Cluster 4 sinken die Mittelwerte der Hemmungen der Verdünnungen über G1, G2 und G4, während die Mittelwerte der zwei höchsten Verdünnungen von G8 nach G16 Stimulationen zeigen (Abbildung 13). Die Mittelwerte der Verdünnungen G8 und G16 des Clusters 4 haben mit -8 % und -9 % geringere Stimulationen als bei den Mittelwerten der Cluster 1, 2 und 3 auftreten.

Bei den Proben aus Cluster 5 (Abbildung 13) reagieren die Verdünnungen ausschließlich mit Hemmung, die mit zunehmender Verdünnung der Proben absinkt. Beim Cluster 5 sinkt der Mittelwert der Hemmungen der Verdünnungen von G4 nach G8 am stärksten, während G8 und G16 nahezu gleich sind. Auch bei den Clustern 1, 3 und 4 ist zu erkennen, dass sich der Mittelwert von G8 zu G16 nur noch wenig verändert.

Zu dem Cluster 1 gehört allein die Probe ML-Os-1 aus dem Mühlenberger Loch von Oberstrom. Der Wert der Stufe G1 dieser Probe stellt die höchste Stimulation der Verdünnungsstufen aller Proben dar. Der Cluster 2 wird auch nur durch eine Probe (HL-Os-3) aus Heuckenlock gebildet. Die Gruppe 3 (Cluster 3) besteht aus der Probe NF-WP-24-2 und allen Proben aus dem Mühlenberger Loch mit Ausnahme der Probe ML-Os-1. Zu Cluster 4 gehören drei Proben aus dem Neufelder Watt (NF-WP20-1, NF-WP24-1 und NF-WP24-3) und alle Proben aus Heuckenlock mit Ausnahme der Probe HL-Os-3. Den Cluster 5 (Abbildung 13) bilden die beiden Proben NF-W20-2 und NF-WP20-3 aus dem Neufelder Watt. Die Probe NF-WP20-2 hat mit 73 % der Stufe G1 die höchste Hemmung und die Probe NF-WP20-3 hat mit 60 % der Stufe G1 die zweithöchste Hemmung aller Verdünnungen der 22 Proben (Tabelle 9).

Hemmung in %

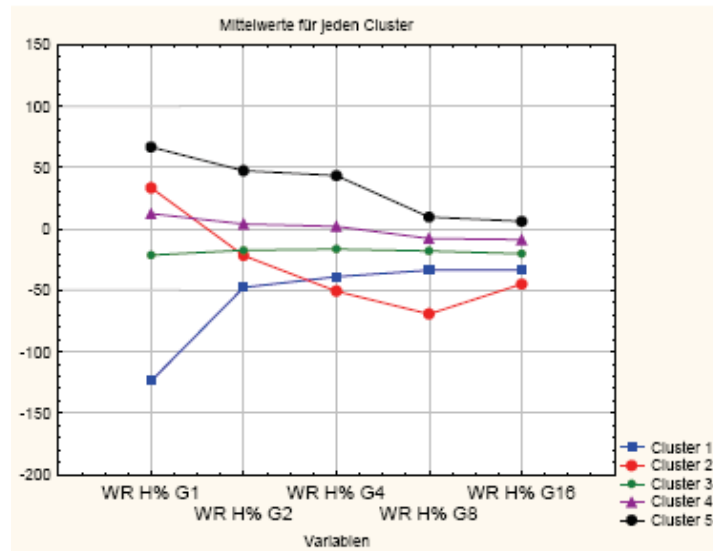


Abbildung 13 Diagramm der Mittelwerte der Verdünnungsstufen (G1, G2, G4, G8, G16) des Algenwachstumshemmtests (Hemmung in % (H%) der Wachstumsrate (WR)) für jeden Cluster berechnet nach der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

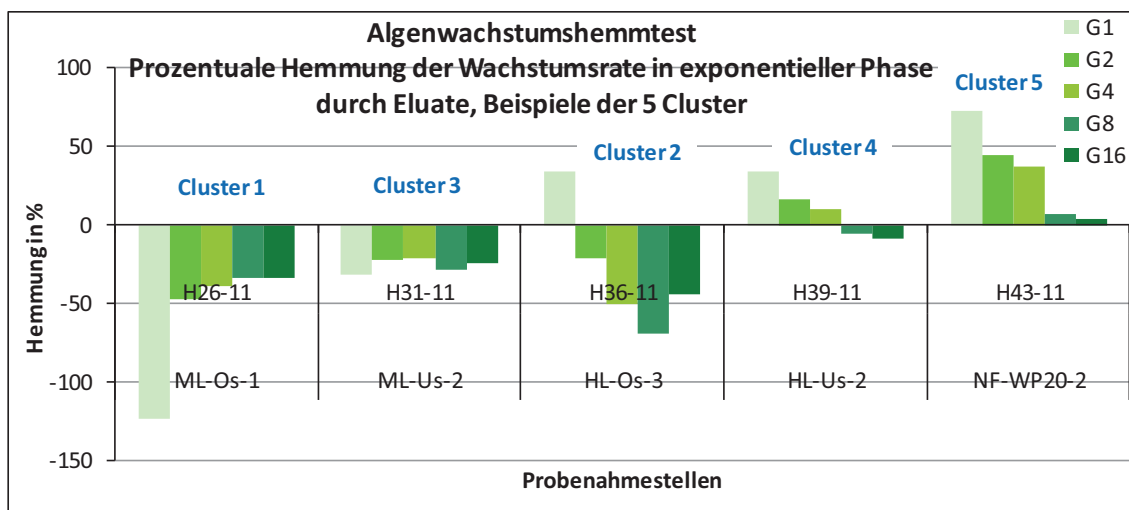


Abbildung 14 Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests als Hemmung der Wachstumsrate in % der Verdünnungsstufen G1, G2, G4, G8 und G16; Darstellung von fünf Proben exemplarisch für die 5 Cluster aus der K-means-Analyse

Um zu ermitteln, ob und wie stark die Verdünnungsstufen des Algenwachstumshemmtests (WR) G1, G2, G4, G8 und G16 der einzelnen Proben miteinander korrelieren, d.h. in Beziehung stehen, wurde eine Korrelationsmatrix (Tabelle 10) mit Microsoft Office Excel 2007 erstellt. In die Berechnungen wurden die Ergebnisse der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt einbezogen. Anhand der Korrelationskoeffizienten zweier Verdünnungsstufen ist zu sehen, dass viele Verdünnungsstufen mit Werten nahe 1,0 sehr stark miteinander korrelieren. Es handelt sich dabei um die Konzentrationen der Verdünnungsstufen, die einander am nächsten sind, z.B. G2 und G4 (stärkste Korrelation mit 0,91). Große Verdünnungsschritte führen zu niedrigeren Korrelationskoeffizienten wie die Beziehungen G1 zu G4 (0,65), G1 zu G8 (0,37) und G1 zu G16 (0,55) zeigen. Zusätzlich wurden mit GraphPad Prism 5.04 die P-Werte der

Korrelationskoeffizienten berechnet und festgestellt, dass nur der P-Wert (Erklärung P-Wert siehe 4.4) der Beziehung G1 zu G8 größer 0,05 ist, das bedeutet, hier ist die Korrelation nicht signifikant.

Tabelle 10 Korrelationsmatrix der Verdünnungsstufen G1, G2, G4, G8 und G16 des Algenwachstumshemmtests (AT, WR) der Toxizitäten als Hemmung in % der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

AT (WR)	G1	G2	G4	G8	G16
G1	1,00				
G2	0,84	1,00			
G4	0,65	0,91	1,00		
G8	0,37	0,71	0,86	1,00	
G16	0,55	0,83	0,89	0,87	1,00

Bei dem Endpunkt „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ im Algenwachstumshemmtest wurden für die Verdünnungsreihen der Proben bei einer euklidischen Distanz von ca. 125 vier Cluster gewählt (Baumdiagramm nicht dargestellt). In Tabelle 11 sind die mit der K-means-Analyse berechneten Mittelwerte der prozentualen Hemmung bzw. Stimulation der Fluoreszenz nach 3 Tagen der Verdünnungen für die vier Cluster wiedergegeben und in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Die Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Clustern sind in Tabelle 12 zusammen mit den jeweiligen Hemmungen bzw. Stimulationen aufgeführt. Um die unterschiedlichen Verläufe in den Verdünnungsreihen zu verdeutlichen, sind diese in Abbildung 16 exemplarisch dargestellt.

Tabelle 11 Mittelwerte der Cluster des Algenwachstumshemmtests (Hemmung in % der Fluoreszenz nach 3 Tagen) berechnet nach der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt (erstellt mit Statistica 6.0)

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
AT-Flu H% G1	-43	53	92	-5
AT-Flu H% G2	-66	22	88	-17
AT-Flu H% G4	-84	-5	78	-21
AT-Flu H% G8	-74	-43	36	-18
AT-Flu H% G16	-49	2	16	8

Tabelle 12 Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests (Hemmung in % (H%) der Fluoreszenz nach 3 Tagen) der Verdünnungsstufen G1, G2, G4, G8 und G16 geordnet nach Clustern aus der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt (erstellt mit Statistica 6.0)

	Interne Nr.	Standortbeschreibung	AT Flu G1 H%	AT Flu G2 H%	AT Flu G4 H%	AT Flu G8 H%	AT Flu G16 H%
Cluster 1	H26-11	ML-Os-1	-5	-97	-128	-67	-60
	H27-11	ML-Os-2	-35	-56	-91	-74	-32
	H28-11	ML-Os-3	-88	-73	-96	-94	-57
	H29-11	ML-Os-4	-63	-88	-104	-97	-7
	H30-11	ML-Us-1	-56	-43	-58	-54	-60
	H31-11	ML-Us-2	-52	-69	-60	-51	-46
	H32-11	ML-Us-3	-73	-78	-85	-59	-30
	H33-11	ML-Us-4	-76	-89	-90	-54	-55
	H34-11	HL-Os-1	24	-29	-78	-75	-64
	H41-11	HL-Us-4	-7	-34	-53	-110	-78
Cluster 2	H36-11	HL-Os-3	81	37	-11	-22	25
	H37-11	HL-Os-4	66	22	-21	-25	-18
	H38-11	HL-Us-1	46	29	6	-50	-9
	H39-11	HL-Us-2	42	1	-20	-95	35
	H42-11	NF-WP20-1	32	21	21	-25	-21
Cluster 3	H43-11	NF-WP20-2	92	85	72	31	32
	H44-11	NF-WP20-3	92	91	85	42	0
Cluster 4	H35-11	HL-Os-2	-33	-55	-44	-33	5
	H40-11	HL-Us-3	14	1	-32	-30	13
	H45-11	NF-WP24-1	18	0	-15	0	29
	H46-11	NF-WP24-2	-9	-8	-9	4	10
	H47-11	NF-WP24-3	-15	-23	-3	-31	-16

Bei allen Proben aus Cluster 1 reagieren alle Verdünnungsstufen mit Stimulation bis auf die Verdünnungsstufe G1 der Probe HL-Os-1 mit 24 % Hemmung. Bei dem Cluster 1 ist der Mittelwert der Stimulation der Verdünnungsstufe G1 am geringsten (-43%), steigt dann über G2 nach G4 (-84 %) an und sinkt über G8 zu G16 (-49 %) wieder (Abbildung 15).

Beim Cluster 2 tritt bei den Verdünnungen der Proben sowohl Stimulation als auch Hemmung auf, wobei mindestens die Stufen G1 und G2 Hemmung zeigen und G8 Stimulation. Der höchste Mittelwert einer Verdünnung dieses Clusters liegt bei G1 mit 53 % Hemmung. Der Mittelwert der Stufe G2 liegt mit 22 % Hemmung niedriger und die Stufen G4 und G8 (-43 %) zeigen eine steigende Stimulation, während G16 wieder mit sehr leichter Hemmung reagiert.

Die Proben des 3. Clusters reagieren in allen Verdünnungsstufen mit Hemmung, die mit der Verdünnung der Proben absinkt. Der Mittelwert der Verdünnungsstufe G1 liegt mit 92 % am höchsten und der Mittelwert der stärksten Verdünnung G16 mit 16 % am niedrigsten (Tabelle 11). Dieses Cluster zeigt im Vergleich zu den anderen Clustern die höchsten Mittelwerte der Hemmungen der Verdünnungen. Die Mittelwerte sinken über die Stufen G1,

G2 und G4 nur wenig ab (Δ 14 %) im Vergleich zu dem Abfall von G4 zu G8 (Δ 42 %) und G8 zu G16 (Δ 20 %).

Der Mittelwert der Verdünnungen der Proben aus Cluster 4 steigt von G1 mit -5 % Stimulation bis G4 (-21 %) an, um dann über G8 wieder zu fallen und in G16 eine leichte Hemmung von 8 % zu zeigen.

Die 8 Proben aus dem Mühlenberger Loch und zwei Proben aus Heuckenlock (HL-Os-1 und HL-Us-4) bilden den Cluster 1. Der Cluster 2 beinhaltet vier Proben aus Heuckenlock (HL-Os-3, HL-Os-4, HL-Us-1, HL-Us-2) und die Probe NF-WP20-1 aus dem Neufelder Watt. Die Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 machen den 3. Cluster aus. Zu dem Cluster 4 gehören die drei Proben aus dem Neufelder Watt am Wegpunkt 24 sowie die Proben HL-Os-2 und HL-Us-3 aus Heuckenlock (Tabelle 12).

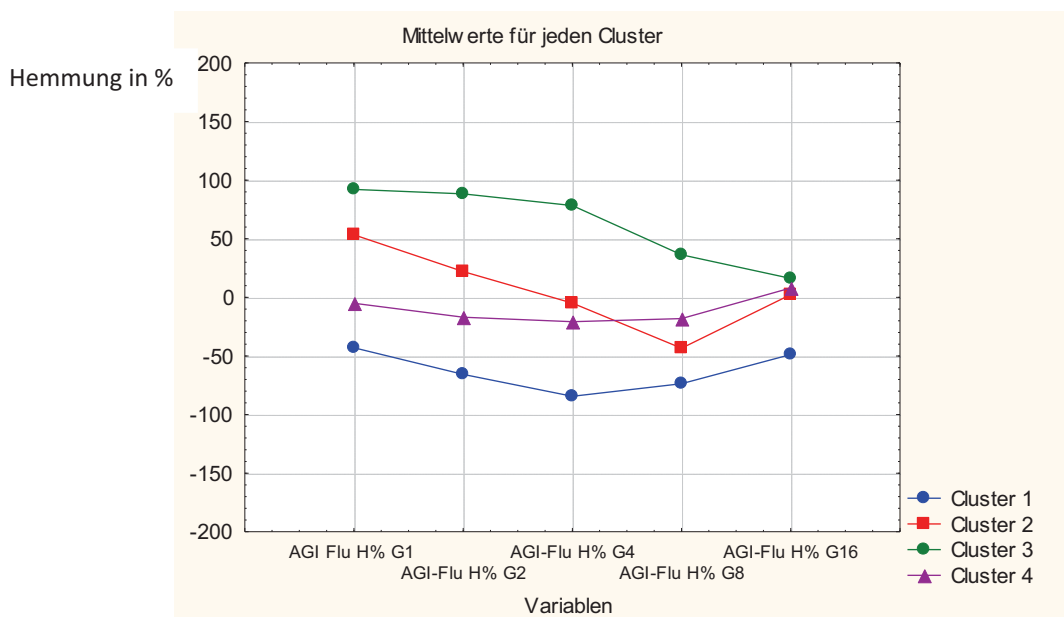


Abbildung 15 Diagramm der Mittelwerte der Verdünnungsstufen (G1, G2, G4, G8, G16) des Algenwachstumshemmtests (Hemmung in % (H%) der Fluoreszenz am T3 (Flu)) für jeden Cluster berechnet nach der K-means-Analyse; AGI = AT; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

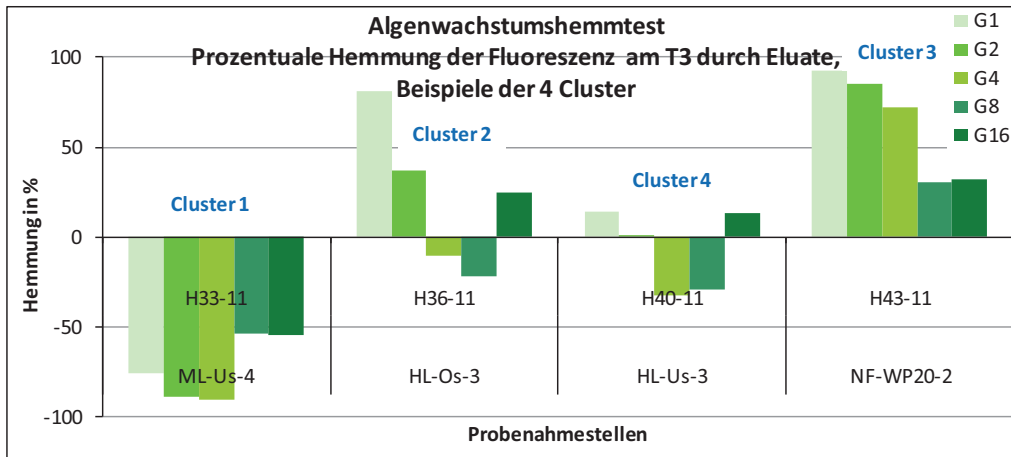


Abbildung 16 Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests als Hemmung in % (Fluoreszenz nach 3 Tagen (T3)) der Verdünnungsstufen G1, G2, G4, G8 und G16; Darstellung von fünf Proben exemplarisch für die 4 Cluster nach der K-means-Analyse

Wie für den Endpunkt „Hemmung der Wachstumsrate“ wurde auch für die „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ eine Korrelationsmatrix (Tabelle 13) erstellt. Auch hier zeigten sich die stärksten Korrelationen bei den nahe beieinander liegenden Konzentrationen, wie z.B. bei G2 und G4 (0,94). Eine Ausnahme ist dabei die Beziehung G8 zu G16 mit einem Koeffizienten von 0,57. Die niedrigsten Korrelationskoeffizienten zeigen außerdem die Beziehungen G1 zu G8 (0,58), G1 zu G16 (0,56), G2 zu G16 (0,62) und G4 zu G16 (0,62).

Tabelle 13 Korrelationsmatrix der Verdünnungsstufen G1, G2, G4, G8 und G16 des Algenwachstumshemmtests (AT, Flu) der Toxizitäten als Hemmung in % der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

AT (Flu)	G1	G2	G4	G8	G16
G1	1,00				
G2	0,91	1,00			
G4	0,78	0,94	1,00		
G8	0,58	0,72	0,79	1,00	
G16	0,56	0,62	0,62	0,57	1,00

Außerdem wurde der Korrelationskoeffizient der Toxizitäten der Wachstumsrate und der Fluoreszenz nach 3 Tagen jeweils der Verdünnungsstufe G1 der 22 Proben im Algenwachstumshemmtest berechnet. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,67 und der P-Wert beträgt 0,0007, d.h. er liegt unter 0,001 und die Korrelation ist damit als höchst signifikant zu betrachten. Es liegt also eine starke Beziehung zwischen den beiden ermittelten Endpunkten des Algentests vor.

4.3.3 Verlauf der Toxizitäten der Verdünnungsstufen des Leuchtbakterientests

Die Ergebnisse des Leuchtbakterientests der insgesamt 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, Heuckenlock und dem Neufelder Watt wurden in Säulendiagrammen als Toxizitäten der Eluate aus Oberflächenproben mit ihren Verdünnungsstufen G1, G2, G3, G4 und G6 angegeben als prozentuale Hemmung der Lumineszenz-Emission dargestellt (siehe Anlage als CD).

Für die Ergebnisse des Leuchtbakterientests der Verdünnungsreihen (G1, G2, G3, G4 und G6) der 22 Proben wurde eine Clusteranalyse durchgeführt (Beschreibung der Clusteranalyse siehe 4.3.1). Bei einer euklidischen Distanz von ca. 18 wurden für die Verdünnungsreihen der Proben vier Cluster gewählt (Baumdiagramm nicht dargestellt). In Tabelle 14 sind die mit der K-means-Analyse berechneten Mittelwerte der prozentualen Hemmung der Verdünnungen für die vier Cluster wiedergegeben und in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Die Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Clustern sind Tabelle 15 zusammen mit den jeweiligen Hemmungen bzw. Stimulationen aufgeführt. Um die unterschiedlichen Verläufe in den Verdünnungsreihen zu verdeutlichen, sind diese in Abbildung 18 exemplarisch dargestellt.

Tabelle 14 Mittelwerte in Hemmung in % (H%) der Cluster des Leuchtbakterientests der Verdünnungsstufen G1, G2, G3, G4 und G6 berechnet nach der K-means-Analyse (erstellt mit Statistica 6.0)

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
LBT -G1 H%	34	20	11	64
LBT -G2 H%	21	11	6	46
LBT -G3 H%	14	4	1	35
LBT -G4 H%	10	2	1	27
LBT -G6 H%	9	1	1	21

Tabelle 15 Ergebnisse des Leuchtbakterientests in Hemmung in % (H%) der Verdünnungsstufen G1, G2, G3, G4 und G6 geordnet nach Clustern aus der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt (erstellt mit Statistica 6.0)

	Interne Nr.	Standort-Beschreibung	LBT -G1 H%	LBT -G2 H%	LBT -G3 H%	LBT -G4 H%	LBT -G6 H%
Cluster 1	H26-11	ML-OS-1	34	21	14	10	9
Cluster 2	H27-11	ML-OS-2	19	12	-1	-2	-5
	H29-11	ML-OS-4	22	11	6	3	2
	H34-11	HL-OS-1	16	7	4	4	4
	H35-11	HL-OS-2	16	10	5	3	2
	H36-11	HL-OS-3	22	10	4	2	3
	H37-11	HL-OS-4	21	9	5	1	1
	H39-11	HL-US-2	19	16	0	-1	-2
	H41-11	HL-US-4	19	11	8	4	3
	H42-11	NF-WP20-1	23	11	7	5	3
	H45-11	NF-WP24-1	17	8	3	2	3
H46-11	NF-WP24-2	20	14	3	2	0	
Cluster 3	H28-11	ML-OS-3	6	1	-3	-4	-3
	H30-11	ML-US-1	11	6	-2	-2	-2
	H31-11	ML-US-2	11	7	3	1	0
	H32-11	ML-US-3	11	5	5	2	1
	H33-11	ML-US-4	11	6	-1	-2	0
	H38-11	HL-US-1	11	7	1	2	5
	H40-11	HL-US-3	13	6	3	3	1
	H47-11	NF-WP24-3	11	7	5	5	5
Cluster 4	H43-11	NF-WP20-2	67	49	36	28	20
	H44-11	NF-WP20-3	60	42	33	27	22

Die Proben-Gruppe 4 (Cluster 4) hat die höchsten Mittelwerte der Toxizitäten der Verdünnungen, Cluster 1 die zweitgrößten, Cluster 2 die drittgrößten und Cluster 3 zeigt die geringsten (Tabelle 14). Bei allen Clustern sinkt der Mittelwert der Hemmungen mit der Verdünnung der Probe, nur bei Cluster 3 bleibt der Mittelwert der höchsten Verdünnungen G3, G4 und G6 mit ca. 1 % Hemmung auf gleichem Niveau. Bei allen Clustern ist der Unterschied der Mittelwerte bei den geringsten Verdünnungen von G1 zu G2 und von G2 zu G3 am größten und bei den höchsten Verdünnungen wird die Punkte-Linie flacher. Die Mittelwerte des Clusters 4 haben die größte Differenz zwischen G1 und G6 (43 %), die des Clusters 1 haben die zweitgrößte mit 25 %, die des Clusters 2 die drittgrößte mit 18 % und die des Clusters 3 ist mit 10 % am kleinsten. Man kann also sagen, je höher die Mittelwerte der Toxizitäten der Verdünnungen eines Clusters sind, desto größer ist die Differenz zwischen G1 und G6.

Zu Cluster 1 gehört allein die Probe ML-OS-1 (Abbildung 18) und der Cluster 4 wird durch die beiden Proben NF-WP20-2 (Abbildung 18) und NF-WP20-3 gebildet. Alle vier Proben von Heuckenlock-Oberstrom gehören u. a. dem Cluster 2 an und alle vier Proben vom

Mühlenberger Loch-Unterstrom gehören u. a. dem Cluster 3 an (Proben geordnet nach Clustern siehe Tabelle 15).

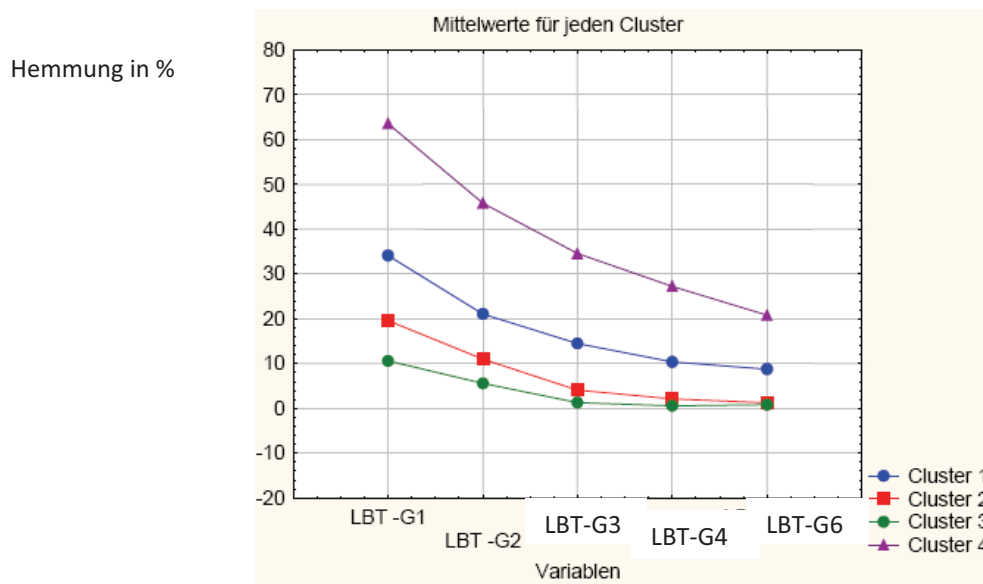


Abbildung 17 Diagramm der Mittelwerte der Verdünnungsstufen (G1, G2, G3, G4, G6) des Leuchtbakterientests (LBT) als Hemmung in % für jeden Cluster berechnet nach der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

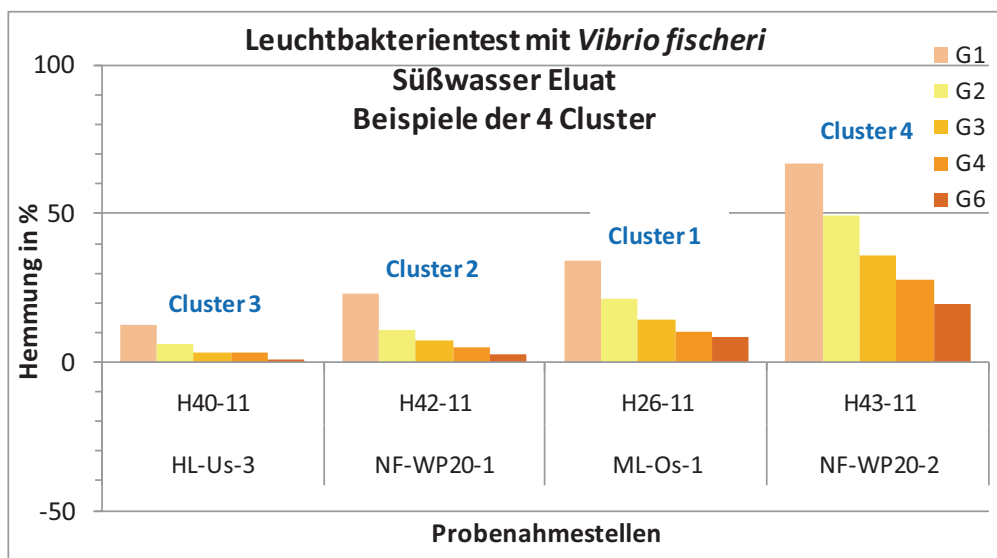


Abbildung 18 Ergebnisse des Leuchtbakterientests als Hemmung in % der Verdünnungsstufen G1, G2, G3, G4 und G6; Darstellung der Verdünnungsreihen von vier Proben exemplarisch für die 4 Cluster aus der K-means-Analyse

In Abbildung 18 zeigen alle vier Proben das gleiche Muster des Verlaufs der Verdünnungen, das heißt die Hemmung sinkt mit der Verdünnung der Probe. In Abbildung 19 ist anhand der Proben ML-Os-2 und HL-Us-1 zu sehen, dass die Verläufe der Verdünnungen auch anders als in Abbildung 18 verlaufen können. Bei der Probe HL-Us-1 steigt die Hemmung der geringsten Konzentration G6 wieder etwas an im Vergleich zu den höheren Konzentrationen G4 ($\Delta 3\%$)

und G3 (Δ 4 %). Bei der Probe ML-Os-2 zeigen nur G1 und G2 Hemmung und G3, G4 und G6 reagieren mit Stimulation.

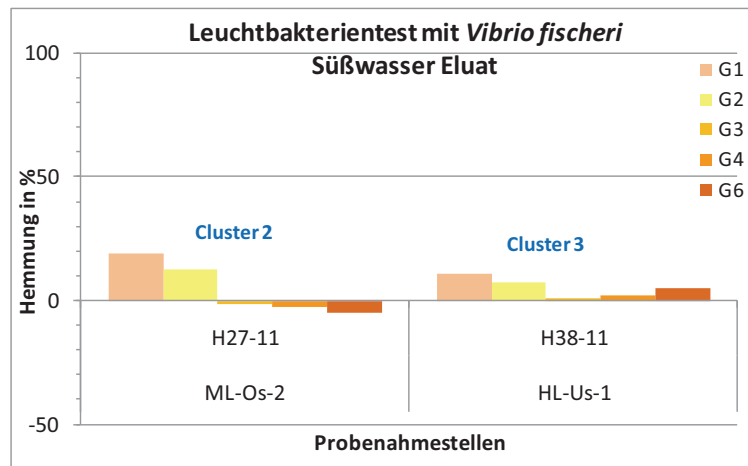


Abbildung 19 Ergebnisse des Leuchtbakterientests mit *Vibrio fischeri* angegeben als prozentuale Hemmung der Lumineszenz mit Süßwasser Eluat; Vergleich der Verdünnungsreihen (G1, G2, G3, G4 und G6) von zwei Proben

In Abbildung 20 werden die unterschiedlichen Verhältnisse der Verdünnungsstufe G1 zu G2 bei zwei Proben aus Heuckenlock des Clusters 2 miteinander verglichen. Bei der Probe HL-Os-3 beträgt die Hemmung von G2 nur 44 % von G1 und bei der Probe HL-Us-2 beträgt die Hemmung von G2 84 % von G1. Bei der Einteilung der Cluster spielt dieser Unterschied jedoch keine Rolle, da die beiden Proben dem gleichen Cluster angehören.

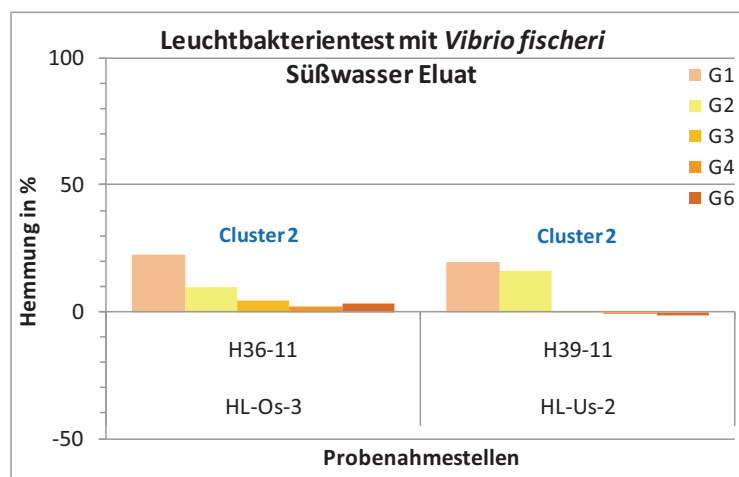


Abbildung 20 Ergebnisse des Leuchtbakterientests mit *Vibrio fischeri* angegeben als prozentuale Hemmung der Lumineszenz mit Süßwasser Eluat; Vergleich der 2 Verdünnungsstufen G1 und G2 bei zwei Proben aus Heuckenlock

In den Ergebnissen der Biotests (Tabelle 15) fällt auf, dass es bei den Proben aus dem Mühlenberger Loch mehrere Proben mit Stimulation gibt, bei Heuckenlock gibt es nur eine Probe mit Stimulation und im Neufelder Watt gibt es keine Probe mit Stimulation.

Die geringste Konzentration der Stufe G6 der Probe ML-Os-1 hat eine Hemmung von 9 %, die fast so groß ist wie die Hemmung der höchsten Konzentration G1 der Proben aus dem Mühlenberger Loch - Unterstrom.

Um zu ermitteln, ob und wie stark die Verdünnungsstufen des Leuchtbakterientests G1, G2, G3, G4 und G6 der einzelnen Proben miteinander korrelieren, d.h. in Beziehung stehen, wurde eine Korrelationsmatrix (Tabelle 16) mit Microsoft Office Excel 2007 erstellt. In die Berechnungen wurden die Ergebnisse der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt einbezogen. Anhand der Korrelationskoeffizienten, die nahe bei 1,0 liegen, kann zwischen allen Verdünnungsstufen eine starke Korrelation festgestellt werden. Daher wird es als ausreichend angesehen in den weiteren Betrachtungen der Ergebnisse nur die Verdünnungsstufe G1 zu verwenden.

Tabelle 16 Korrelationsmatrix der Verdünnungsstufen G1, G2, G3, G4 und G6 des Leuchtbakterientests (LBT) der Toxizitäten als Hemmung in % der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

LBT	G1	G2	G3	G4	G6
G1	1,00				
G2	0,98	1,00			
G3	0,96	0,94	1,00		
G4	0,94	0,93	0,99	1,00	
G6	0,89	0,87	0,96	0,98	1,00

4.3.4 Verlauf der Toxizitäten der Verdünnungsstufen des Süßwasser-Bakterienkontakttests

Die Ergebnisse des Süßwasser-Bakterienkontakttests der insgesamt 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, Heuckenlock und dem Neufelder Watt sind in Säulendiagrammen als Toxizitäten der Oberflächensediment-Proben mit ihren Verdünnungsstufen angegeben als prozentuale Hemmung der Dehydrogenaseaktivität dargestellt (siehe Anlage auf CD). Die Proben des Mühlenberger Lochs wurden nach der alten Arbeitsvorschrift mit den Verdünnungsstufen G0, G1, G2 und G4 gemessen und die Proben aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt wurden nach der neuen Arbeitsvorschrift mit den Verdünnungsstufen G0, G2, G4 und G8 gemessen. Die alte und die neue Arbeitsvorschrift unterscheiden sich nur durch die Verdünnungsstufen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen allen Proben herzustellen, werden im Folgenden nur die Verdünnungsstufen G0, G2 und G4 verwendet.

Für die Ergebnisse des Süßwasser-Bakterienkontakttests der Verdünnungsreihen (G0, G2 und G4) der 22 Proben wurde eine Clusteranalyse durchgeführt (Beschreibung der Clusteranalyse siehe 4.3.1). Bei einer euklidischen Distanz von ca. 37 wurden für die Verdünnungsreihen der Proben drei Cluster gewählt (Baumdiagramm nicht dargestellt). In Tabelle 17 sind die mit der K-means-Analyse berechneten Mittelwerte der prozentualen Hemmung der Verdünnungen für die drei Cluster wiedergegeben und in Abbildung 21 graphisch dargestellt. Die Zuordnung der Proben zu den jeweiligen Clustern sind in Tabelle 18 zusammen mit den jeweiligen Hemmungen bzw. Stimulationen aufgeführt. Um die

unterschiedlichen Verläufe in den Verdünnungsreihen zu verdeutlichen, sind diese in Abbildung 22 exemplarisch dargestellt.

Tabelle 17 Mittelwerte in Hemmung in % (H%) der Cluster des Süßwasser-Bakterienkontakttests der Verdünnungsstufen G0, G2, und G4 berechnet nach der K-means-Analyse (erstellt mit Statistica 6.0)

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
SKT H% G0	70	29	53
SKT H% G2	65	25	51
SKT H% G4	54	29	38

Tabelle 18 Ergebnisse des Süßwasser-Bakterienkontakttests (SKT) als Hemmung in % (H%) der Verdünnungsstufen G0, G2 und G4 geordnet nach Clustern aus der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt (erstellt mit Statistica 6.0)

	Interne Nr.	Standort-Beschreibung	SKT H% G0	SKT H% G2	SKT H% G4
Cluster 1	H26-11	ML-OS-1	82	69	50
	H28-11	ML-OS-3	65	61	47
	H29-11	ML-OS-4	70	64	51
	H42-11	NF-WP20-1	66	61	53
	H43-11	NF-WP20-2	71	68	63
	H44-11	NF-WP20-3	68	71	56
	H46-11	NF-WP24-2	70	61	52
	H47-11	NF-WP24-3	65	64	57
Cluster 2	H34-11	HL-OS-1	24	28	21
	H37-11	HL-OS-4	34	12	20
	H38-11	HL-US-1	16	34	37
	H40-11	HL-US-3	43	28	38
Cluster 3	H27-11	ML-OS-2	65	65	29
	H30-11	ML-US-1	57	55	28
	H31-11	ML-US-2	55	56	43
	H32-11	ML-US-3	54	52	43
	H33-11	ML-US-4	51	55	45
	H35-11	HL-OS-2	49	37	27
	H36-11	HL-OS-3	53	34	38
	H39-11	HL-US-2	40	55	42
	H41-11	HL-US-4	49	47	39
	H45-11	NF-WP24-1	56	55	48

In allen Clustern des Süßwasser-Bakterienkontakttests reagieren alle Verdünnungsstufen mit Hemmung. Der Cluster 1 zeigt die höchsten Mittelwerte der Toxizitäten der Verdünnungsstufen, Cluster 3 die zweitgrößten und Cluster 2 zeigt mit größerem Abstand die geringsten. Bei den Clustern 1 und 3 sinkt der Mittelwert der Hemmungen mit der Verdünnung der Probe. Die Mittelwerte der Stufen G0 und G2 im Cluster 3 sind nahezu gleich bei etwas über 50 % und beim nächsten Konzentrationsschritt von G2 zu G4 sinkt der Mittelwert stärker ab (Δ 13 %). Bei Cluster 2 liegt der Mittelwert der Verdünnungsstufe G2 mit 25 % Hemmung niedriger als bei G0 und G4, die beide bei einem Mittelwert von 29 % Hemmung liegen.

Auffällig ist, dass das Cluster 2 ausschließlich von vier Proben aus Heuckenlock gebildet wird, wobei zwei Proben von Oberstrom stammen und zwei Proben von Unterstrom. Außerdem wurden dem Cluster 1 u. a. alle Proben aus dem Neufelder Watt bis auf die Probe NF-WP24-1 zugeordnet (Tabelle 18).

Hemmung in %

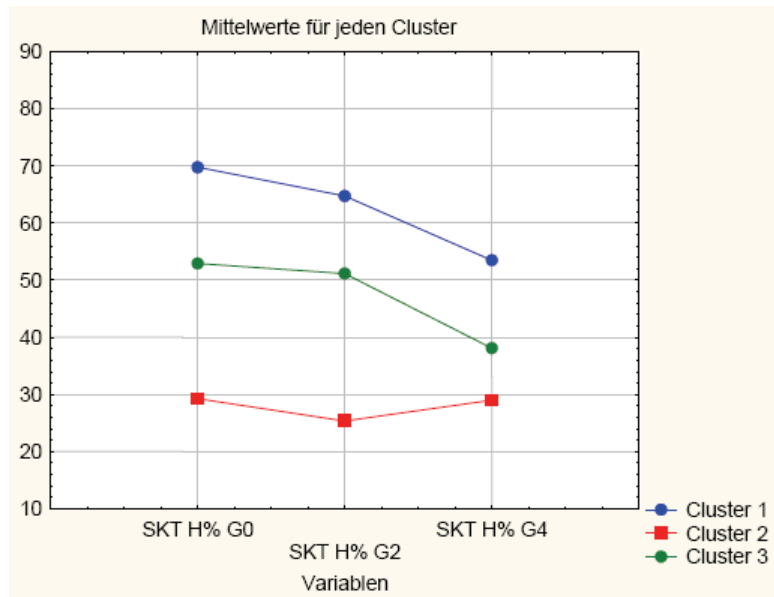


Abbildung 21 Diagramm der Mittelwerte als Hemmung in % (H%) der Verdünnungsstufen (G0, G2, G4) des Süßwasser-Bakterienkontakttests (SKT) für jeden Cluster berechnet nach der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

Für jeden der 3 Cluster ist in Abbildung 22 die Verdünnungsreihe mit G0, G2 und G4 einer Probe exemplarisch dargestellt. Bei den Proben ML-Os-1 (Cluster 1) und ML-Us-3 (Cluster 3) in Abbildung 22 sinken die Hemmungen mit der Verdünnung der Probe. Die Probe HL-Us-3 (Cluster 2) ist jedoch ein Beispiel dafür, dass dieses Muster nicht bei allen Proben auftritt, denn bei dieser Probe ist G2 kleiner als G0 und G4. Die Proben aus dem Neufelder Watt haben mit Ausnahme der Probe NF-WP20-3 (Cluster 1) einen absinkenden Verlauf der Hemmungen über G0, G2 und G4 (Tabelle 18). Auch die Proben aus dem Mühlenberger Loch haben mit Ausnahme der Proben ML-Us-2 und ML-Us-4 (beide Cluster 3) einen absinkenden Verlauf der Hemmungen über G0, G2 und G4 (Tabelle 18). Bei den Proben aus Heuckenlock zeigen nur die zwei Proben HL-Os-2 und HL-Us-4 (beide Cluster 3) einen absinkenden Verlauf und alle anderen Verdünnungsreihen sind unregelmäßig (Tabelle 18).

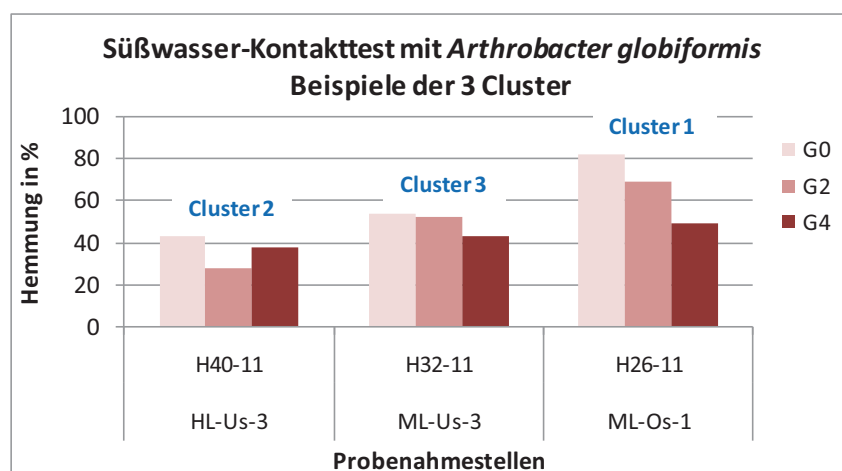


Abbildung 22 Ergebnisse des Süßwasser-Bakterienkontakttests angegeben als prozentuale Hemmung der Dehydrogenaseaktivität; Darstellung der Verdünnungsreihe von drei Proben exemplarisch für die 3 Cluster aus der K-means-Analyse

Um zu ermitteln, ob und wie stark die Verdünnungsstufen des Süßwasser-Bakterienkontakttests (SKT) G0, G2 und G4 der einzelnen Proben miteinander korrelieren, d.h. in Beziehung stehen, wurde eine Korrelationsmatrix (Tabelle 19) mit Microsoft Office Excel 2007 erstellt. In die Berechnungen wurden die Ergebnisse der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt einbezogen. Die Verdünnungsstufen G0 und G2 zeigen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,82 eine starke Korrelation, während die Korrelationskoeffizienten G0 zu G4 (0,66) und G2 zu G4 (0,76) etwas geringer sind.

Tabelle 19 Korrelationsmatrix der Verdünnungsstufen G0, G2 und G4 des Süßwasser-Bakterienkontakttests (SKT) der Toxizitäten als Hemmung in % der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

SKT	G0	G2	G4
G0	1,00		
G2	0,82	1,00	
G4	0,66	0,76	1,00

4.4 Variation der Toxizität an den Probenahmestationen mit Betrachtung der verschiedenen Biotests

4.4.1 Variation der Toxizität an den Probenahmestationen - Mittelwert und Standardabweichung

In Kapitel 4.2 wurden bereits die drei Probenahmeorte Mühlenberger Loch, Heuckenlock und Neufelder Watt anhand von Spannweiten und Mittelwerten, berechnet aus allen Werten eines Orts, unter Betrachtung der verschiedenen Biotests miteinander verglichen, um einen ersten Eindruck des Unterschieds der Wertebereiche der Orte zu vermitteln. In diesem Kapitelabschnitt werden dagegen die einzelnen Probenahmestationen Ober- und Unterstrom vom Mühlenberger Loch, Ober- und Unterstrom von Heuckenlock und Wegpunkt 20 und 24 vom Neufelder Watt anhand von Mittelwert und Standardabweichung miteinander verglichen. Mittels der Standardabweichung wird die Variation der Toxizitäten der drei bis vier Sedimentproben von einer Probenahmestation betrachtet. Die Berechnungen wurden für jede Station aus der Hemmung der Wachstumsrate (AT, WR) sowie der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (AT, Flu) im Algenwachstumshemmtest, der Hemmung im Leuchtbakterientest und im Süßwasser-Bakterienkontakttest durchgeführt (Tabelle 20, Tabelle 21, Tabelle 22 und Tabelle 23).

Tabelle 20 Variation der Toxizität der Wachstumsrate des Algenwachstumshemmtests (AT) an den Probenahmestationen, Mittelwert und Standardabweichung in % Hemmung

	ML-Os AT (WR) H% G1	ML-Us AT (WR) H% G1	HL-Os AT (WR) H% G1	HL-Us AT (WR) H% G1	NF-WP20 AT (WR) H% G1	NF-WP24 AT (WR) H% G1
Anzahl der Werte	4	4	4	4	3	3
Mittelwert	-52	-18	19	19	46	-4
Standardabweichung	50	9	15	10	37	12

Tabelle 21 Variation der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Toxizität) des Algenwachstumshemmtests (AT) an den Probenahmestationen, Mittelwert und Standardabweichung in % Hemmung

	ML-Os AT (Flu) H% G1	ML-Us AT (Flu) H% G1	HL-Os AT (Flu) H% G1	HL-Us AT (Flu) H% G1	NF-WP20 AT (Flu) H% G1	NF-WP24 AT (Flu) H% G1
Anzahl der Werte	4	4	4	4	3	3
Mittelwert	-47	-64	35	24	72	-2
Standardabweichung	36	12	51	25	35	18

Tabelle 22 Variation der Toxizität des Leuchtbakterientests (LBT) an den Probenahmestationen, Mittelwert und Standardabweichung in % Hemmung

	ML-Os LBT H% G1	ML-Us LBT H% G1	HL-Os LBT H% G1	HL-Us LBT H% G1	NF-WP20 LBT H% G1	NF-WP24 LBT H% G1
Anzahl der Werte	4	4	4	4	3	3
Mittelwert	20	11	19	15	50	16
Standardabweichung	11	0,3	3	4	24	5

Tabelle 23 Variation der Toxizität des Süßwasser-Bakterienkontakttests (SKT) an den Probenahmestationen, Mittelwert und Standardabweichung in % Hemmung

	ML-Os SKT H% G0	ML-Us SKT H% G0	HL-Os SKT H% G0	HL-Us SKT H% G0	NF-WP20 SKT H% G0	NF-WP24 SKT H% G0
Anzahl der Werte	4	4	4	4	3	3
Mittelwert	71	54	40	37	68	64
Standardabweichung	8	2	14	14	3	8

Bei einem Vergleich der Mittelwerte der Proben von einer Station fällt auf, dass beim Leuchtbakterientest (Tabelle 22) und beim Süßwasser-Kontakttest (Tabelle 23) der Mittelwert von Mühlenberger Loch-Oberstrom sowie von Heuckenlock-Oberstrom größer ist als der Mittelwert jeweils von Unterstrom. Besonders hoch ist dieser Unterschied der Mittelwerte von ML-Os zu ML-Us im Süßwasser-Kontakttest mit 17 % Hemmung. Bei der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest ist der Mittelwert von HL-Os auch größer als HL-Us ($\Delta 11$ %) und der Mittelwert der Stimulation ist bei ML-Os geringer als bei ML-Us ($\Delta 17$ %). Bei der Wachstumsrate im Algentest ist der Mittelwert von HL-Os gleich dem von HL-Us. Bei den Proben aus dem Neufelder Watt fällt auf, dass der Mittelwert der Station

NF-WP20 bei allen Tests jeweils größer ist als bei der Station NF-WP24. Dieser Unterschied ist außer beim Süßwasser-Kontakttest sehr hoch (bis zu $\Delta 74\%$). Beim Algentest liegt der Mittelwert der Station NF-WP24 sogar unter den Mittelwerten der beiden Stationen in Heuckenlock und beim LBT liegt der Mittelwert der Station NF-WP24 im Bereich der Stationen in Heuckenlock. Die Mittelwerte der Stationen ML-Os und ML-Us zeigen im Algentest Stimulation. Bei der Station ML-Os liegt im Süßwasser-Kontakttest der höchste Mittelwert mit 71 % der Stationen, die Mittelwerte der Stationen NF-WP20 (68 %) und NF-WP24 (64 %) sind am zweitgrößten und die Mittelwerte der Stationen in Heuckenlock sind am geringsten (HL-Os: 40 %, HL-Us: 37 %). Der Mittelwert der Station ML-Us ist mit 54 % größer als die Mittelwerte in Heuckenlock, aber kleiner als die Mittelwerte im Neufelder Watt.

Vergleicht man die Standardabweichungen der verschiedenen Probenahmestationen und verschiedenen Biotests miteinander, so stellt man fest, dass die geringsten Standardabweichungen der Leuchtbakterientest (ML-Us: 0,3 %, HL-Os: 3 %, HL-Us: 4 %, NF-WP24: 5 %) in Tabelle 22 und der Süßwasser-Kontakttest (ML-Us: 2 %, NF-WP20: 3 %) in Tabelle 23 aufweisen. Solche geringen Standardabweichungen sind beim Algentest bei keiner Station zu finden, hier zeigen sich sogar bei der Wachstumsrate bei den Stationen ML-Os (50 %) und NF-WP20 (37 %) und bei der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen bei den Stationen ML-Os (36 %), HL-Os (51 %) und NF-WP20 (35 %) die größten Standardabweichungen aller Stationen. Auch im Leuchtbakterientest haben ML-Os mit 11 % und NF-WP20 mit 24 % die größten Standardabweichungen. Im Süßwasser-Kontakttest haben die Stationen in Heuckenlock mit 14 % die größten Standardabweichungen. Die große Standardabweichung der Probenahmestation NF-WP20 des Neufelder Watts im Algentest ist damit zu erklären, dass die zwei Werte 60 % und 73 % der Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 deutlich höher als der dritte Wert 4 % der Probe NF-WP20-1 liegen (Tabelle 9 in 4.3.2). Auch beim Leuchtbakterientest sind bei der Station NF-WP20 die zwei Hemmungen 60 % und 67 % (NF-WP20-2 und NF-WP20-3) deutlich größer als der dritte Wert 23 % der Probe NF-WP20-1 (Tabelle 15 in 4.3.3). Bei allen drei Tests ist die Standardabweichung der Werte vom Mühlenberger Loch-Oberstrom höher als die der Werte vom Mühlenberger Loch-Unterstrom. Beim Algentest ist auch bei Heuckenlock-Oberstrom die Standardabweichung größer als bei Heuckenlock-Unterstrom ($\Delta 5,3\%$). Beim Leuchtbakterientest und beim Algentest ist die Standardabweichung der Station NF-WP20 des Neufelder Watts größer als die der Station NF-WP24 (AT: $\Delta 25\%$, LBT: $\Delta 19\%$). Beim Mühlenberger Loch Oberstrom liegt im Leuchtbakterientest der dritthöchste Wert aller Hemmungen bei der Probe ML-Os-1 mit 34 % nach den beiden Proben aus dem Neufelder Watt.

4.4.2 Variation der Toxizität an den Probenahmestationen - zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way-Anova)

Mit der Software GraphPad Prism 5.04 wurde die Varianzanalyse „Two-way-Anova“ durchgeführt, um signifikante Unterschiede der Mittelwerte unter Einbeziehung der Varianzen der normalisierten Toxizitäten der einzelnen Probenahmestationen, von denen Sedimentproben mit drei verschiedenen Biotests gemessen wurden, festzustellen. Bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse „Two-way-Anova“ (Anova = analysis of variance) wird ein Vergleich der Mittelwerte zwischen mehreren Gruppen vorgenommen, die von zwei Eigenschaften beeinflusst werden. Für die Analyse wird die Varianz der Mittelwerte zwischen den Gruppen mit den Varianzen der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen in Beziehung gesetzt. Eine Gruppe besteht in diesem Fall aus den Toxizitäten der drei bis vier Proben von einer Probenahmestation. Die erste Eigenschaft, durch die die Gruppe beeinflusst wird, ist die Probenahmestation und die zweite Eigenschaft ist das Biotestsystem, das entweder der Algenwachstumshemmtest (G1 der Wachstumsrate (WR) oder der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu)), der Leuchtbakterientest (G1) oder der Süßwasser-Kontakttest mit den Verdünnungen G0, G2 oder G4 sein kann. Es gibt also 2 Varianten an Kombinationen der Biotestergebnisse, auf welche die Two-way-Anova angewendet wurde (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24 Biotestergebnis-Kombinationen, für welche die Two-way-Anova angewendet wurde; AT Flu H% G1 = Hemmung in % der Fluoreszenz nach 3 Tagen der Verdünnungsstufe G1 im Algenwachstumshemmtest; AT WR H% G1 = Hemmung in % der Wachstumsrate der Verdünnungsstufe G1 im Algenwachstumshemmtest; LBT H% G1 = Hemmung in % der Verdünnungsstufe G1 im Leuchtbakterientest; SKT H% G0, G2 bzw. G4 = Hemmung in % der Verdünnungsstufen G0, G2 bzw. G4 im Süßwasser-Bakterienkontakttest

Kombination 1	Kombination 2
AT Flu H% G1	AT WR H% G1
LBT H% G1	LBT H% G1
SKT H% G0	SKT H% G0
SKT H% G2	SKT H% G2
SKT H% G4	SKT H% G4

Wie hoch die statistische Signifikanz ist, wird nach dem P-Wert (Signifikanzniveau oder Überschreitungswahrscheinlichkeit) entschieden. Je kleiner der P-Wert ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass tatsächlich Unterschiede der Gruppen bestehen, das heißt, dass die Nullhypothese nicht zutrifft. Die Nullhypothese besagt, dass keine Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Ab einem P-Wert größer 0,05 spricht man davon, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen statistisch signifikant sind, d.h. die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass sie nicht durch Zufall zustande gekommen sind. Es gibt also immer eine bestimmte Irrtumswahrscheinlichkeit für das Ergebnis „signifikant“ sowie auch ein bestimmtes Risiko, dass das Ergebnis „nicht signifikant“ falsch ist. Die weiteren Bedeutungen des P-Werts sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25 Bedeutung des P-Werts (Precht, et al., 1993); k.A. = keine Angabe

P-Wert	Bedeutung	Abk. der Bedeutung
> 0,05	nicht signifikant	ns
< 0,05	signifikant	*
< 0,01	hoch signifikant	**
< 0,001	höchst signifikant	***
< 0,0001	k.A. in Precht et al. 1993	****

Das Programm GraphPad Prism 5.04 zeigt außerdem eine Signifikanz mit 4 Sternchen (****) mit einem P-Wert < 0,0001 an, die in der Literatur nicht erklärt wird. Deshalb werden 4 Sternchen in dieser Arbeit als „mehr als höchst signifikant“ definiert.

Voraussetzung für die Durchführung einer Varianzanalyse ist eine Normalverteilung der Grundgesamtheit der Werte. Mit GraphPad Prism 5.04 wurde mit dem „D'Agostino & Pearson omnibus normality test“ ermittelt, dass die Toxizitätswerte dieser Arbeit der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algenwachstumshemmtest und des Süßwasser-Bakterienkontakttests normalverteilt sind. Für die Wachstumsrate im Algenwachstumshemmtest liegt nur eine Normalverteilung bei Weglassen eines Wertes vor und das bedeutet, dass eine Annäherung an die Normalverteilung besteht. Da die Werte des Leuchtbakterientests dieser Arbeit nicht normalverteilt sind, wurde eine größere Grundgesamtheit getestet. Hierfür wurden die Biotest-Daten der TU-Hamburg-Harburg und der HAW Hamburg hinzugenommen, jedoch wurde auch in dieser Grundgesamtheit keine Normalverteilung festgestellt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Abweichungen von der Normalverteilung gering sind, denn es wurde ermittelt, dass die Mittelwerte von zufälligen Untergruppen der Grundgesamtheit des Leuchtbakterientests normalverteilt sind. Der zentrale Grenzwertsatz (central limit theorem) der Statistik besagt, dass die Two-way-Anova bei einer großen Anzahl Werten stabil gegenüber Abweichungen von der Normalverteilung ist und dabei eine Anzahl von 10 Proben meist ausreicht, d.h. mit 22 Proben pro Test sollte die Anova stabil sein. Für nicht normalverteilte Daten werden in der Literatur nicht-parametrische Tests empfohlen, jedoch gibt es bei diesen Tests eine geringere Güte, falls Zweifel bestehen, dass die Normalverteilung doch vorliegt (Precht, et al., 1993). In dieser Arbeit wurde wegen der genannten Gründe auf einen nicht-parametrischen Test verzichtet. Um zu verhindern, dass ein Test, der eine höhere Reaktionsbreite und damit auch höhere Werte besitzt, einen stärkeren Einfluss in den Anova-Berechnungen erhält als ein Test, bei dem bereits kleine Unterschiede in den Werten große Bedeutung haben, wurden die 22 Daten jeweils eines Biotests mit GraphPad Prism 5.04 normalisiert. Dabei wurde der niedrigste Wert eines Datensatzes auf 0 % und der höchste Wert auf 100 % gesetzt. Die übrigen Werte dazwischen wurden den Prozentzahlen zwischen 0 % und 100 % entsprechend zugeordnet.

Die folgenden Fragen können mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse wie folgt beantwortet werden („K1“ = Biotestergebnis-Kombination 1 mit Endpunkt „Hemmung der Fluoreszenz

nach 3 Tagen“; „K2“ = Biotestergebnis-Kombination 2 mit Endpunkt „Hemmung der Wachstumsrate“ in Tabelle 24):

- Hat die Wahl der Probenahmestation einen Einfluss auf das Ergebnis?
 - Aussage des P-Werts (K1 und K2): Ja, mehr als höchst signifikant (****)
 - 28,7 % (K1 mit Flu) /27,7 % (K2 mit WR) der Gründe für die Unterschiede in den Ergebnissen der Gruppen gehen auf die Probenahmestationen zurück.
- Hat die Wahl des Biotests einen Einfluss auf das Ergebnis?
 - Aussage des P-Werts (K1 und K2): Ja, mehr als höchst signifikant (****)
 - 22,5 % (K1 mit Flu)/27,3 % (K2 mit WR) der Gründe für die Unterschiede in den Ergebnissen der Gruppen gehen auf die Biotests zurück.
- Stehen die beiden Einflüsse „Probenahmestation“ und „Biotest“ in Wechselwirkung (Interaktion) zueinander?
 - Aussage des P-Werts (K1 und K2): Ja, mehr als höchst signifikant (****)
 - 27,9 % (K1 mit Flu)/24 % (K2 mit WR) der Gründe für die Unterschiede in den Ergebnissen der Gruppen gehen auf die Interaktionen der beiden Einflüsse zurück.

Die signifikanten Interaktionen (Wechselwirkungen) zwischen den zwei Eigenschaften „Biotest“ und „Probenahmestation“ bedeuten, dass sich die beiden Eigenschaften nicht immer gleich zueinander verhalten. Die Trends in den Biotests sind also unterschiedlich bei den einzelnen Probenahmestationen. Anhand der oben angegebenen Aussagen der P-Werte kann jedoch nicht interpretiert werden, wie die Unterschiede von „Biotests“ untereinander und von „Probenahmestationen“ untereinander genau aussehen. Daher wurden zusätzlich Bonferroni Post-Hoc-Tests angewendet. Mit den Post-Tests wird der Mittelwert von jeder Probenahmestation mit jedem Mittelwert der übrigen Probenahmestationen verglichen und die Signifikanzen der Unterschiede berechnet. In Tabelle 26 und Tabelle 27 werden als Ergebnisse der Post-Tests jeweils zwei Probenahmestationen gegenübergestellt und es ist aufgeführt, ob und in welchen Biotests sich die beiden Probenahmestationen signifikant, d.h. deutlich erkennbar, unterscheiden und mit welcher Höhe der Signifikanz. Mit den Post-Tests kann folgende Frage beantwortet werden:

- Bei welchen Biotests gibt es signifikante Unterschiede zwischen welchen Probenahmestationen?

Tabelle 26 Ergebnisse der Two-way-Anova nach Biotestergebnisse-Kombination 1 (Tabelle 24) mit der Messung der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu) des Algenwachstumshemmtests (AT G1); LBT G1 = 1. Verdünnungsstufe G1 im Leuchtbakterientest, SKT G0, G2 bzw. G4 = Verdünnungsstufe G0, G2 bzw. G4 im Süßwasser-Bakterienkontakttest; ML = Mühlenberger Loch, HL = Heuckenlock, NF = Neufelder Watt; Os = Oberstrom; Us = Unterstrom; WP20 bzw. 24 = Wegpunkt 20 bzw. 24

	ML-Os	ML-Us	HL-Os	HL-Us	NF-WP20	NF-WP24
ML-Os	-					
ML-Us	ns	-				
HL-Os	AT, Flu G1 ** SKT G0 ** SKT G2 ****	AT, Flu G1 *** SKT G2 **	-			
HL-Us	SKT G0 ** SKT G2 *	AT, Flu G1 **	ns	-		
NF-WP20	AT, Flu G1 **** LBT G1 *	AT, Flu G1 **** LBT G1 ****	LBT G1 ** SKT G2 **** SKT G4 ****	LBT G1 *** SKT G0 * SKT G2 *	-	
NF-WP24	ns	ns	SKT G2 ** SKT G4 ***	ns	LBT G1 **	-

In Tabelle 26 ist zu sehen, dass sich die Station ML-Os nicht signifikant von der Station ML-Us und von der Station NF-WP24 unterscheidet. Sie unterscheidet sich aber von HL-Os (G0 **, G2 ****) und von HL-Us (G0 **, G2 *) im Süßwasser-Kontakttest und von HL-Os in der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest (G1 **) und von NF-WP20 in der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest (G1 ****) und im Leuchtbakterientest (G1 *).

Die Station NF-WP20 unterscheidet sich signifikant (unterschiedlicher Stärke) im Leuchtbakterientest (G1) von allen anderen Stationen. Die Signifikanz des Unterschieds ist am höchsten im Vergleich mit dem ML-Us (G1 ****). Die Station NF-WP20 unterscheidet sich außerdem von den Stationen HL-Os (G2 ****, G4 ****) und HL-Us (G0 *, G2 *) im Süßwasser-Bakterienkontakttest und von den Stationen ML-Os (G1 ****) und ML-Us (G1 ****) in der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest.

Die Station NF-WP24 unterscheidet sich von der Station HL-Os im Süßwasser-Bakterienkontakttest in den Verdünnungen G2 (**) und G4 (***) und von der Station NF-WP20 im Leuchtbakterientest (G1 **).

Die Station ML-Us unterscheidet sich zusätzlich zu den genannten Unterschieden außerdem von der Station HL-Os im Süßwasser-Bakterienkontakttest (G2 **) und in der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest (G1 ***) und von der Station HL-Us in der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen nur im Algentest (G1 **).

Tabelle 27 Ergebnisse der Two-way-Anova nach Biotestergebnisse-Kombination 2 (Tabelle 24) mit der Hemmung der Wachstumsrate des Algenwachstumshemmtests (AT G1); LBT G1 = 1. Verdünnungsstufe G1 im Leuchtbakterientest, SKT G0, G2 bzw. G4 = Verdünnungsstufe G0, G2 bzw. G4 im Süßwasser-Bakterienkontakttest; ML=Mühlenberger Loch, HL = Heuckenlock, NF = Neufelder Watt; Os = Oberstrom; Us = Unterstrom; WP20 bzw. 24 = Wegpunkt 20 bzw. 24

	ML-Os	ML-Us	HL-Os	HL-Us	NF-WP20	NF-WP24
ML-Os	-					
ML-Us	ns	-				
HL-Os	SKT G0 ** SKT G2 **** SKT G4 *	SKT G2 **	-			
HL-Us	SKT G0 *** SKT G2 *	ns	ns	-		
NF-WP20	AT,WR G1 ** LBT G1 **	LBT G1 **** SKT G4 *	LBT G1 ** SKT G0 * SKT G2 ****	LBT G1 *** SKT G0 ** SKT G2 *	-	
NF-WP24	ns	ns	SKT G2 *** SKT G4 ****	ns	LBT G1 **	-

In der Kombination 2 mit der Wachstumsrate des Algentests (Tabelle 27) statt der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Tabelle 26, Kombination 1) hat die Two-way-Anova etwas andere Ergebnisse ermittelt als mit der Kombination 1. Hier findet sich ein Unterschied im Algentest lediglich zwischen der Station ML-Os und NF-WP24 (G1 **). Außerdem ist in Tabelle 27 kein Unterschied in der Verdünnung G4 des SKT zwischen HL-Os und NF-WP20 festgestellt worden. Dafür wurde aber ein Unterschied zwischen ML-Os und HL-Os in der Verdünnung G4 (*) im SKT festgestellt sowie ein Unterschied zwischen HL-Os und NF-WP20 in der Verdünnung G0 (*) im SKT. Es sind außerdem leichte Unterschiede in der Höhe der Signifikanz der Unterschiede im Süßwasser-Kontakttest vorhanden, die aber in dieser Betrachtung vernachlässigt werden können.

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Vergleich der statistischen Verteilung der Sedimenttoxizitäten gemessen mit verschiedenen Biotests

In Box-Whiskers Plots sind in 4.1 die statistischen Verteilungen der Sedimenttoxizitäten, die mit verschiedenen Biotests in der geringsten Verdünnungsstufe gemessen wurden, dargestellt. Anhand der Box-Whiskers Plots ist zu erkennen, dass die Bereiche, in denen die mittleren 50 % der Werte liegen, d.h. der Interquartilsabstand (IQR), sowie die Spannweite und die Mediane der Daten aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten der Testorganismen gegenüber dem belasteten Sediment von Test zu Test variieren. Im Algenwachstumshemmtest reagieren einige Proben mit Hemmung und einige mit Stimulation, d.h. es ergeben sich auch negative Hemmungswerte. Die Bereiche der Ergebnisse liegen bei unterschiedlichen Hemmungen bzw. Stimulationen, weil die Testorganismen spezifisch auf die Schadstoffe in den Sedimenten bzw. Eluaten reagieren und weil die Endpunkte der Tests verschieden sind (Ahlf, et al., 2005). Die Endpunkte sind in diesem Fall beim Algenwachstumshemmtest die „Hemmung der Wachstumsrate“ und die „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ von *Pseudokirchneriella subcapitata*. Beim Leuchtbakterientest ist der Endpunkt die Hemmung der Leuchtintensität von *Vibrio fischeri* und beim Süßwasser-Bakterienkontakttest die Hemmung der Dehydrogenase-Aktivität von *Arthrobacter globiformis*.

Zusammenfassung:

Es konnte anhand der unterschiedlichen Hemmungsbereiche der Biotests gezeigt werden, dass die Organismen der drei Biotests verschieden sensitiv auf die Sediment-Proben reagieren. Es handelt sich also um eine Biotest-Kombination, bei der sich die Biotests in ihren Aussagen ergänzen können.

5.2 Vergleich der Mittelwerte und Spannweiten der Ergebnisse der drei Probenahmeorte mittels der Toxizitäten der verschiedenen Biotests

In dem Kapitel 4.2 werden die Ergebnisse der drei Probenahmeorte Mühlenberger Loch, Heuckenlock und Neufelder Watt anhand der geringsten Verdünnung der verschiedenen Biotests miteinander verglichen. Beim Süßwasser-Bakterienkontakttest ist der Mittelwert der Hemmung der geringsten Verdünnung im Mühlenberger Loch mit 63 % Hemmung fast so hoch wie im Neufelder Watt mit 66 % und der Mittelwert der Hemmung in Heuckenlock ist mit 39 % deutlich geringer. Im Leuchtbakterientest ist der Mittelwert der Hemmung der geringsten Verdünnungsstufe im Neufelder Watt mit 33 % Hemmung ungefähr doppelt so hoch wie die Mittelwerte vom Mühlenberger Loch und von Heuckenlock. Im Algenwachstumshemmtest ist der Mittelwert der Hemmung der Wachstumsrate (WR) sowie der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu) in Heuckenlock mit 19 % (WR) und 29 % (Flu) Hemmung fast so hoch wie im Neufelder Watt mit 21 % (WR) und 35 % (Flu), während

der Mittelwert des Mühlenberger Lochs mit -35 % (WR) und -56 % (Flu) Stimulation zeigt (Gründe für Stimulation siehe Kapitel 7). Im Folgenden ist zusammenfassend aufgeführt, wie die Probenahmeorte anhand der Mittelwerte miteinander in Beziehung stehen (\geq bedeutet größer, aber nur um wenige Prozent):

Algenwachstumshemmtest: (NF \geq HL) > ML

Leuchtbakterientest: NF > (HL \geq ML)

Süßwasser-Bakterienkontakttest: (NF \geq ML) > HL

Anhand der Tatsache, dass eine zunehmende Verdünnung der Toxizität der Sedimente durch marine Sedimente ab Seemannshöft in Richtung Nordsee stattfindet (Heise, et al., 2007), könnte man an der Elbemündung im Neufelder Watt eine geringere Toxizität gegenüber den Probenahmeorten in Hamburg erwarten. Anhand dieses Kapitels und auch anhand der Ergebnisse der Klassifizierung (Kapitel 6) lässt sich dieser Sachverhalt jedoch nicht bestätigen. Der Mittelwert der Toxizitäten aus dem Neufelder Watt ist sogar bei allen Biotests größer als an den anderen Orten und im Streudiagramm (Abbildung 11 in 4.2) für den Vergleich der Probenahmeorte erkennt man, dass beim Neufelder Watt sowohl im Leuchtbakterientest als auch im Algenwachstumshemmtest jeweils zwei Werte aus dem Neufelder Watt (NF-WP20-2 und NF-WP20-3) deutlich größer sind als die anderen. Das Ergebnis der erhöhten Toxizität im Neufelder Watt an der Station WP20 ist auch in der Klassifizierung sichtbar (siehe Kapitel 6).

Die Probe ML-Os-1 zeigt beim Mühlenberger Loch die höchste Stimulation der Wachstumsrate (-124 %) und die niedrigste Stimulation der Fluoreszenz nach 3 Tagen (-5 %). Von allen Tests zeigt nur der Algenwachstumshemmtest Stimulation bei vielen Proben in der geringsten Verdünnung, wobei im Mühlenberger Loch ausschließlich Stimulationen des Wachstums der Algen auftreten. Eine Stimulation der Algen könnte bedeuten, dass sich in den Proben des Mühlenberger Lochs vermehrt Nährstoffe befinden. Diese Nährstoffe könnten aus dem Obstanbaugebiet „Altes Land“ stammen, das eine diffuse Quelle für Nährstoffe ist (diffuse Quellen siehe (EG-WRRRL-Tideelbe, 2004)). In der Clusteranalyse hatten die Proben des Mühlenberger Lochs jedoch mittlere bis hohe Toxizitätsstufen im Süßwasser-Bakterienkontakttest und eine Probe hatte im Leuchtbakterientest die mittlere Toxizitätsstufe, weshalb einige Proben des Mühlenberger Lochs mit mittlerer bis hoher Sediment-Toxizität in der Klassifizierung (Kapitel 6) eingestuft worden sind. Die Sedimente könnten zusätzlich zum Beispiel durch die Schadstoffe aus dem Hamburger Hafen, der als Sedimentationsbecken ein großer Schadstoffsammler ist (Heise, et al., 2005b) oder durch die Einleitungen der chemischen Industrie belastet sein (EG-WRRRL-Tideelbe, 2004).

Bei einem Vergleich der Spannweiten der Biotests war ersichtlich, dass der Leuchtbakterientest außer beim Neufelder Watt (Spannweite im SKT am geringsten) die geringsten Spannweiten hat und der Algenwachstumshemmtest hat mit mindestens einem Endpunkt die höchste Spannweite aller Biotests. Hohe Variationen in den Ergebnissen des Algenwachstumshemmtests wurden auch in der Arbeit von Claus et al. „Effektorientierte Untersuchungen zur Algentoxizität fraktionierter Porenwässer und Eluate aus

Elbesedimenten“ für die Toxizitäten von Sedimentproben von jeweils einem Standort festgestellt (Claus, et al., 2009).

Zusammenfassung:

Die größten Spannweiten der drei Biotests zeigt der Algenwachstumshemmtest und zwar vorrangig im Endpunkt „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“, außerdem zeigt der Test als einziger in der geringsten Verdünnung bei fast der Hälfte der Proben Stimulation.

Es lässt sich anhand dieses Kapitels keine Rangfolge der Orte für die Toxizitäten festlegen, da die Rangfolge der Höhe der Mittelwerte der Toxizitäten der einzelnen Orte von Test zu Test verschieden ist und die Unterschiede teilweise hoch und teilweise nur gering sind. Allerdings ist zu erkennen, dass der Mittelwert der Toxizitäten aus dem Neufelder Watt bei allen Biotests größer ist als bei den anderen Orten. Das Ergebnis der erhöhten Toxizität im Neufelder Watt ist auch in der Klassifizierung erzielt worden (siehe Kapitel 6).

5.3 Betrachtung des Verlaufs der Toxizitäten über die Verdünnungsstufen bei den verschiedenen Biotests mittels von Clusteranalysen

Beim Leuchtbakterientest wurden die Proben nach steigenden Hemmungen in die vier Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 18 in 4.3.3). Dass die Korrelationskoeffizienten der Verdünnungen im Leuchtbakterientest nahe 1 liegen, bedeutet, dass sie stark miteinander korrelieren und sich die Verläufe der Verdünnungsreihen der 22 Proben ähnlich verhalten. Nahezu überall sinkt die Hemmung mit der Verdünnung der Probe, d.h. die Toxizitätswirkung wird entsprechend der Konzentration an Sediment-Eluat im Testansatz weniger. Es reicht bei diesem Test demnach aus, für mathematische Analysen und Klassifizierungen der Toxizitäten die erste Verdünnung zu betrachten. In die Klassifizierung dieser Arbeit sind trotzdem alle Verdünnungsstufen eingegangen, da die Klassifizierung anhand der Clusteranalysen durchgeführt wurde und dies gleichermaßen für alle Biotests. Der Artikel „Sediment Toxicity Assessment - Rationale for effect classes“ von W. Ahlf und S. Heise beschreibt eine Einteilung von Toxizitätsdaten des Leuchtbakterientests, d.h. die Reaktionen des Testorganismus als Hemmung in %, in drei Toxizitätskategorien (Ahlf, et al., 2005). Diese wurden mit „keine oder wenig Reaktion“ (< 25 %), „mittelmäßige Reaktion“ (25 - 50 %) und „starke Reaktion“ (> 50 %) bezeichnet. In der Clusteranalyse des Leuchtbakterientests dieser Arbeit sind ähnliche Toxizitätskategorien ermittelt worden. Man könnte die Cluster 2 und 3 der Kategorie „keine oder wenig Reaktion“ ($G1 < 25\%$) zuordnen, wobei der Cluster 3 eher keiner Reaktion ($G1 = 11\%$) und der Cluster 2 wenig Reaktion ($G1 = 20\%$) entspricht. Den Cluster 1 könnte man in die „mittlere Reaktion“ einordnen ($G1 = 25 - 50\%$), denn der Mittelwert der Verdünnung $G1$ beträgt 34 %. Der Mittelwert von Cluster 4 mit 64 % ($G1$) könnte der Kategorie „hohe Reaktion“ zugeordnet werden. In der Arbeit von W. Ahlf und S. Heise wurde außerdem die Größe der Überlappungen der verschiedenen Kategorien mit 10 %, d.h. $\pm 5\%$, festgelegt (Ahlf, et al., 2005). Man könnte also eine Unsicherheit von $\pm 5\%$ für jeden Toxizitätswert des Leuchtbakterientests angeben. Zu den anderen Tests können

keine Vergleiche gezogen werden, da sie in der Methodendurchführung nicht mit der Arbeit von W. Ahlf und S. Heise zu vergleichen sind.

Beim Süßwasser-Bakterienkontakttest wurden die Proben auch nach steigenden Hemmungen in die drei Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 22 in 4.3.4), allerdings zeigt sich hier eine nicht so starke Korrelation zwischen den Verdünnungsstufen. Das bedeutet, die Verläufe der Verdünnungsreihen der 22 Proben verhalten sich nicht so ähnlich innerhalb des Tests wie die Verläufe innerhalb des Leuchtbakterientests. Die geringste Korrelation liegt zwischen den Verdünnungen G0 und G4 mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,66 vor. Das heißt, hier kann überlegt werden, ob in einem Klassifizierungssystem die Verdünnung G4 zusätzlich zu der Verdünnung G0 verwendet wird, denn G4 verhält sich über die Proben etwas anders als G0. In dieser Arbeit sind jedoch wegen der Grundlage der Clusteranalyse, die auf der Einteilung der Proben nach den Mustern der Verdünnungsreihen beruht, ohnehin alle Verdünnungsstufen einer Probe in die Klassifizierung eingegangen.

Beim Algenwachstumshemmtest wurden die Proben zwar auch nach steigenden Hemmungen in die Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 14 und Abbildung 16 in 4.3.2), allerdings spielten dabei noch andere Bewertungen der Muster der Verdünnungsreihen eine Rolle. Bei der Wachstumsrate (WR) im Algenwachstumshemmtest zeigen nicht alle Proben das Muster der absinkenden Hemmung mit der Verdünnung wie die Proben aus Cluster 5 (AT, WR), wie es bei einer zunehmenden Verdünnung der Inhaltsstoffe erwartet werden könnte. Der Cluster 1 (AT, WR) zeigt sehr hohe Stimulationen, die mit der Verdünnung der Probe absinken. Eine Stimulation des Wachstums der Algen bedeutet, dass die Algen in den Eluaten stärker gewachsen sind als in den Kontrollen. Auf die möglichen Gründe für Stimulation des Algenwachstums wird in Kapitel 7 weiter eingegangen. Die Verdünnungen der Proben im Cluster 3 (AT, WR) reagieren auch nur mit Stimulation, aber hier ist die Stimulation niedriger und es zeigt sich kaum eine Veränderung über die Stufen. Möglicherweise sind die Inhaltsstoffe, die in Cluster 1 (AT, WR) eventuell für die hohen Stimulationen verantwortlich sind, bei Cluster 3 (AT, WR) weniger vorhanden und es besteht ein nicht so großer Zusammenhang der Höhe der Stimulation von der Stärke der Verdünnung. Bei den Proben des Clusters 2 (AT, WR) zeigt nur der Mittelwert der Stufe G1 Hemmung, während alle anderen Stufen mit zunächst sogar steigender Stimulation mit jedem Verdünnungsschritt reagieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Nährstoffe, die eventuell in dem Eluat vorhanden sind, bei stärkeren Verdünnungen besser für die Algen verfügbar sind oder ab der zweiten Verdünnung der Einfluss der Nährstoffe dem Einfluss der Schadstoffe überwiegt. Bei den Proben in Cluster 4 (AT, WR) sinken die Mittelwerte der Hemmungen der Verdünnungen über G1, G2 und G4, während die Mittelwerte der zwei höchsten Verdünnungen von G8 nach G16 geringe Stimulationen zeigen. Der Cluster 4 (AT, WR) verhält sich demzufolge ähnlich wie Cluster 2 (AT, WR), hält aber die Hemmungsreaktionen über mehrere geringere Verdünnungen. Da auch nur geringe Stimulationen auftreten, kann auf einen erhöhten Anteil an Schadstoffen geschlossen werden. Möglicherweise führen unterschiedliche Zusammensetzungen von Nähr- und Schadstoffen in den Proben zu den unterschiedlichen Mustern der Verdünnungsstufen, die die Cluster bestimmen. Die Korrelationskoeffizienten im Algenwachstumshemmtest (WR)

sind bei den nahe beieinander liegenden Konzentrationen höher als zum Beispiel G1 zu G4, G1 zu G8 und G1 zu G16. Laut des P-Wertes ($> 0,5$) sind die Verdünnungen G1 zu G8 nicht signifikant miteinander korreliert, das heißt G8 verhält sich über die Proben stark anders als G1. Bei einer Erarbeitung eines Klassifizierungssystems kann deshalb überlegt werden, ob die Verdünnung G8 zusätzlich zu der Verdünnung G1 verwendet wird. In dieser Arbeit wurde für die Klassifizierung aber nur die Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu) im Algenwachstumshemmtest verwendet.

Bei der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu) im Algenwachstumshemmtest haben auch die nahe beieinander liegenden Konzentrationen stärkere Korrelationen. Hier haben aber die Verdünnungen G8 und G16 die schwächsten Korrelationen und auch G8 zu G1 und G16 zu allen anderen Stufen haben schwächere Korrelationen. Bei der Erarbeitung eines Klassifizierungssystems wäre es eventuell sinnvoll, die Verdünnungen G8 und G16 zusätzlich zu der Verdünnung G1 zu verwenden, da sich G16 über die Proben anders als die anderen Stufen und sich G8 anders als G1 verhält. In dieser Arbeit sind aber, wie schon erwähnt, ohnehin alle Verdünnungsstufen von einer Probe in die Klassifizierung eingegangen. Bei der Hemmung der Fluoreszenz nach drei Tagen (Flu) wurden nur vier Proben-Gruppen ermittelt (Abbildung 16 in 4.3.2), da dies eine plausiblere Einteilung der Proben darstellte als bei fünf Gruppen. Der Cluster 1 (Flu) entspricht in etwa dem Muster von Cluster 3 (WR), jedoch zeigen sich hier höhere Stimulationen. Cluster 2 (Flu) und 4 (Flu) sind vergleichbar mit den Clustern 2 (WR) und 4 (WR). Bei der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen gibt es aber größere Schwankungen in den Verdünnungsstufen. Der Cluster 3 (Flu) ist sogar sehr ähnlich wie der Cluster 5 (WR), nur dass der Cluster 3 (Flu) höhere Hemmungen zeigt. Ein Muster der Verdünnungen wie in Cluster 1 (WR) taucht bei der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen nicht auf.

Zusammenfassung:

Die Clusteranalyse mit anschließender K-means-Analyse machte deutlich, dass es bei den Proben unterschiedliche Verläufe der Toxizitäten der Verdünnungsstufen gibt und diese sich in Gruppen einteilen lassen. Die Korrelationskoeffizienten im Algenwachstumshemmtest waren bei den nahe beieinander liegenden Konzentrationen höher als bei größeren Verdünnungsschritten. Bei dem Endpunkt „Hemmung der Wachstumsrate“ waren G1 zu G8 nicht signifikant miteinander korreliert und bei dem Endpunkt „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ fallen besonders G8 und G16 mit schwachen Korrelationen zu anderen Verdünnungen auf. Beim Süßwasser-Bakterienkontakttest zeigte sich unter Einbeziehung der Verdünnungen G0, G2 und G4 die geringste Korrelation zwischen den Verdünnungsstufen G0 und G4. Die Verdünnungsstufen des Leuchtbakterientests korrelierten sehr stark miteinander, weshalb die erste Verdünnungsstufe allein aussagekräftig für die Testergebnisse einer Probe ist. Die mit der Clusteranalyse und der K-means-Analyse bestimmten Cluster des Leuchtbakterientests konnten mit Toxizitätsstufen benannt werden, die den Toxizitätsklassen einer Studie von S. Heise und W. Ahlf sehr ähnlich sind (Ahlf, et al., 2005).

5.4 Variation der Toxizität an den Probenahmestationen mit Betrachtung der verschiedenen Biotests – Mittelwerte und Standardabweichungen – Two-way-Anova

In 4.4.2 wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse „Two-way-Anova“ durchgeführt, um signifikante Unterschiede der Mittelwerte unter Einbeziehung der Varianzen der normalisierten Toxizitäten der einzelnen Probenahmestationen, von denen Sedimentproben mit drei verschiedenen Biotests gemessen wurden, festzustellen. In die Analyse gingen die jeweils drei bis vier Proben einer Station ein. Für die Two-way-Anova wurden „Probenahmestation“ und „Biotest“ als mögliche Faktoren, die Einfluss auf die Ergebnisse der Stationen haben könnten, benannt. Der Biotest kann entweder die Hemmung der Wachstumsrate (WR) oder die Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu) im Algenwachstumshemmtest (G1), der Leuchtbakterientest (G1) oder der Süßwasser-Kontakttest mit den Verdünnungen G0, G2 oder G4 sein. In dem Kapitel 4.4.1 wurden außerdem der Mittelwert und die Standardabweichung der drei bis vier Toxizitäten einer Probenahmestation berechnet. Mit der Two-way-Anova wurde herausgefunden, dass sowohl der Faktor „Probenahmestation“ als auch der Faktor „Biotest“ höchst signifikante Einflüsse auf das Ergebnis haben. Außerdem wurde festgestellt, dass es signifikante Interaktionen (Wechselwirkungen) zwischen den zwei Eigenschaften „Biotest“ und „Probenahmestation“ gibt. Das heißt, die Trends in den Biotests sind unterschiedlich bei den einzelnen Probenahmestationen. Es kann außerdem der Schluss gezogen werden, dass sich einige Probenahmestationen signifikant in den Biotests voneinander unterscheiden. In Tabelle 26 in 4.4.2 sind die Ergebnisse der Bonferroni Post-Tests der „Two-way-Anova“ zusammengefasst. Es ist zusehen, dass sich die Station ML-Os in dieser Analyse, die viele Werte und Einflüsse mit einbezieht, nicht signifikant von der Station ML-Us unterscheidet. Es fällt aber auf, dass der Mittelwert der prozentualen Hemmungen der geringsten Verdünnung beim Leuchtbakterientest (G1) und beim Süßwasser-Bakterienkontakttest (G0) an Mühlenberger Loch „Oberstrom“ größer ist als an Mühlenberger Loch „Unterstrom“ (LBT: $\Delta 9\%$, SKT: $\Delta 17\%$). In der Clusteranalyse des Leuchtbakterientests in 0 wird die Probe ML-Os-1 allein in das Cluster 1, das in dem Klassifizierungsverfahren mit „mittlere Toxizitätsstufe“ benannt wurde (Kapitel 6), eingeordnet und auch beim Süßwasser-Kontakttest befindet sich diese Probe in dem Cluster 1 der hohen Toxizitätsstufe. Der Wert der geringsten Verdünnung G0 dieser Probe im Süßwasser-Kontakttest ist der höchste Wert, der mit diesem Test gemessen wurde. In der Klassifizierung in Kapitel 6 wurde die Station Mühlenberger Loch „Oberstrom“ mit zweimal „mittlere Sediment-Toxizität“ und einmal „hohe Sediment-Toxizität“ höher toxisch eingestuft als die Station Mühlenberger Loch „Unterstrom“, bei der alle Proben eine „geringe Sediment-Toxizität“ haben. Geringe Toxizitäten im Mühlenberger Loch könnten durch die Verdünnung der Tideelbe-Sedimente mit marinen Sedimenten zustande kommen, die von der Elbemündung bis Seemannshöft stattfindet (Heise, et al., 2007). Die höhere Toxizität an der Station ML-Os könnte damit begründet sein, dass es eventuell zu einem erhöhten Eintrag an Schadstoffen durch das Deichsiel bzw. das Obstanbaugebiet „Altes Land“ kommt. An „Oberstrom“ findet

möglicherweise auch eine erhöhte Sedimentation und damit ein erhöhter Eintrag von neuem Material aufgrund von mehr Bewegungen des Wassers, wie z.B. Zirkulationsströmungen (Malcherek), durch die Nähe zum Deichsiel statt. Im Algenwachstumshemmtest zeigt die Probe ML-Os-1 allerdings in der geringsten Verdünnung G1 bei dem Endpunkt „Hemmung der Wachstumsrate“ die höchste Stimulation aller Proben und auch bei dem Endpunkt „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ im Algentest zeigt sie Stimulation. Die Stimulation könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich in dem Eluat vermehrt Nährstoffe befinden (Stimulation siehe Kapitel 7), die über das abfließende Wasser der Oberflächen des Alten Landes eingetragen wurden. Es könnte der Schluss gezogen werden, dass die Stoffe in der Probe ML-Os-1, auf welche die Organismen *Vibrio fischeri* und *Arthrobacter globiformis* im LBT und SKT reagieren, die Algen nicht am Wachstum gehemmt haben, weil *Pseudokirchneriella subcapitata* eventuell nicht für diese Stoffe sensitiv ist. Einige der Substanzen gegenüber denen die Testorganismen sensitiv sind, werden in dem Unterkapitel 5.5 genannt. Hohe Toxizitäten im Mühlenberger Loch könnten aber auch durch eingetragene Schadstoffe aus dem Hamburger Hafen, aus Einleitungen der Industrie oder aus historisch kontaminierten Sedimenten, die vom Oberstrom der Elbe angespült werden, begründet sein (Heise, et al., 2005b; Heise, et al., 2007; EG-WRRL-Tideelbe, 2004).

Das Eluat der Probe ML-Os-1 war im Test gelb-bräunlich gefärbt und dieses könnte zu einer Überschätzung der Toxizität im Leuchtbakterientest führen (Bedeutung der Färbung des Eluats siehe Kapitel 7). Da diese Probe allerdings im Süßwasser-Bakterienkontakttest eine sehr hohe Hemmung zeigt, kann angenommen werden, dass die Toxizität im Leuchtbakterientest tatsächlich hoch ist und der mögliche Einfluss der Färbung keine große Rolle spielt.

Die Station ML-Os unterscheidet sich signifikant von der Station HL-Os (G0 **, G2 ****) und von der Station HL-Us (G0 **, G2 *) im Süßwasser-Kontakttest. Die Unterschiede im Süßwasser-Kontakttest zwischen ML-Os und den Stationen in Heuckenlock sind auch bei der Berechnung der Mittelwerte der Verdünnung G0 feststellbar. ML-Os hat den höchsten Mittelwert der Verdünnung G0 von allen Stationen mit 71 % Hemmung, während an HL-Os und HL-Us die Mittelwerte nur bei 40 % und 37 % liegen. Bei der Clusteranalyse liegen vier Proben aus Heuckenlock in dem Cluster 2 der geringen Toxizitätsstufe (siehe Klassifizierung in Kapitel 6) und keine Probe aus Heuckenlock liegt in dem Cluster 1 der hohen Toxizitätsstufe, während vom Mühlenberger Loch immerhin drei Proben in dem Cluster 1 liegen. Die Unterschiede im SKT zwischen ML-Os und Heuckenlock könnten dadurch zustande kommen, dass es im Bereich des Mühlenberger Lochs mehr Schadstoffeinträge durch zum Beispiel den Hamburger Hafen, der stromabwärts hinter Heuckenlock liegt, oder das Alte Land gibt und dass es sich überwiegend um partikelgebundene Schadstoffe handelt. Die Station ML-Os unterscheidet sich auch in der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest (G1 **) signifikant von der Station „Oberstrom“ in Heuckenlock. Dieser Unterschied entsteht dadurch, dass bei den Proben aus dem Mühlenberger Loch Stimulationen auftreten und bei den Proben aus Heuckenlock „Oberstrom“ Hemmung. Auch die Station ML-Us unterscheidet sich aus diesem Grund signifikant von den Stationen HL-Os (G1 ***) und HL-Us (G1 **) im Algentest (Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen).

Die Station Heuckenlock „Oberstrom“ unterscheidet sich in den Ergebnissen der Two-way-Anova nicht signifikant von der Station Heuckenlock „Unterstrom“. Im Algenwachstumshemmtest ist der Mittelwert der geringsten Verdünnung der Station HL-Os in beiden Endpunkten höher als bei der Station HL-Us. Im Leuchtbakterientest und im Süßwasser-Kontakttest ist der Mittelwert bei beiden Stationen in etwa gleich. Die erhöhte Toxizität der Sedimente im Algentest könnte damit begründet sein, dass möglicherweise bei Flut feine Sedimente in Richtung der Station „Oberstrom“ getragen werden, während die größeren Korngrößen am Anfang des Priels sedimentieren (Malcherek) und an den kleineren Partikeln haften eventuell mehr Schadstoffe (Sonnen, 1993; Liechti, et al., 1995). In der Klassifizierung, in die alle Verdünnungsstufen eingingen, werden die Sedimente der beiden Stationen in die gleichen Sediment-Toxizitätsklassen eingestuft (siehe Kapitel 6). Eine Probe hat die Klasse „geringe Sediment-Toxizität“, eine Probe wurde in „keine oder geringe Toxizität/Stimulation“ eingestuft und zwei Proben sind in der Klasse „mittlere Sedimenttoxizität“. Dies deutet darauf hin, dass die Stationen HL-Os und HL-Us eventuell nicht durch verschiedene Schadstoffquellen beeinflusst werden. Nur die Unterschiede im Algentest in der geringsten Verdünnung deuten auf Unterschiede der Schadstoffzusammensetzungen in den Proben von HL-Os und HL-Us hin (s.o.). Da der Algenwachstumshemmtest besonders sensitiv auf Schwermetalle wie Kupfer (Ahlf, et al., 1986), Chrom (Giloni-Lima, et al., 2010) und Zink (Neumann-Hensel, 1998), auf PAKs und auf Ammoniumionen (Claus, et al., 2009) reagiert, sind möglicherweise diese Stoffe an „Oberstrom“ vermehrt vorhanden.

Die Station NF-WP20 unterscheidet sich signifikant im Leuchtbakterientest (G1) von allen anderen Stationen. Der Mittelwert der Verdünnung G1 ist bei dieser Station mit 50 % Hemmung im LBT mit Abstand am höchsten von allen Stationen (siehe 4.4.1). In der Clusteranalyse wurden die beiden Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 im LBT in den Cluster 4 der hohen Toxizitätsstufe (siehe Klassifizierung in Kapitel 6) eingeordnet, die Probe NF-WP20-1 jedoch nur in den Cluster 1 der geringen Toxizitätsstufe. Bei Betrachtung des Streudiagramms (Abbildung 11 in 4.2) für den Vergleich der Probenahmeorte erkennt man, dass beim Neufelder Watt sowohl im Leuchtbakterientest als auch im Algenwachstumshemmtest jeweils die Werte der Stationen NF-WP20-2 und NF-WP20-3 deutlich höher sind als die anderen. Bei den Proben 2 und 3 der Station NF-WP20 wurde festgestellt, dass die Eluate der Proben gelblich gefärbt sind und dieses könnte zu einer Überschätzung der Toxizität führen (Bedeutung der Färbung des Eluats siehe Kapitel 7). Die Toxizität könnte hier auch erhöht sein, weil an der Station WP20 die höchsten Trockengewichte der Sedimente ermittelt wurden (Bedeutung des Trockengewichts siehe Kapitel 7). Da allerdings diese beiden Proben von Station NF-WP20 auch im Algentest (Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen) und im Süßwasser-Kontakttest in den Cluster mit der höchsten Toxizitätsstufe eingeordnet wurden, könnte man davon ausgehen, dass die Proben tatsächlich auch im LBT eine erhöhte Toxizität haben.

Die Station NF-WP20 unterscheidet sich von den Stationen HL-Os (G2 ****, G4 ****) und HL-Us (G0 *, G2 *) im Süßwasser-Bakterienkontakttest. Die Stationen unterscheiden sich zum Beispiel dadurch, dass bei NF-WP20 der Mittelwert der Verdünnung G0 mit 68 %

Hemmung höher ist als die Mittelwerte von HL-Os (40 %) und HL-Us (37 %). Zudem sind die drei Proben der Station NF-WP20 in der Clusteranalyse mit „hoher Toxizität“ (siehe Klassifizierung in Kapitel 6) im SKT eingestuft worden und die Proben aus Heuckenlock nur in Stufen von „gering“ bis „mittel“. Die Proben aus Heuckenlock wurden dementsprechend auch nur bis höchstens der Sediment-Toxizitätsklasse „mittel“ eingestuft und die Proben aus dem Neufelder Watt der Station WP20 bis zu der Klasse „sehr hoch“ (siehe auch Kapitel 6). Bei den anderen Stationen, mit denen NF-WP20 verglichen wurde, sind die Eluattests für den signifikanten Unterschied ausschlaggebend. Bei den Stationen HL-Os und HL-Us kommt jedoch noch der Gesamtsedimenttest SKT mit mehreren Verdünnungen dazu und es gibt keine signifikanten Unterschiede im Algentest. Dies könnte darauf schließen lassen, dass im Neufelder Watt besonders die von Partikeln nicht wasserlöslichen Schadstoffe eine Rolle spielen im Gegensatz zu Heuckenlock. Die erhöhte Toxizität könnte auch durch die hohen Trockengewichte an NF-WP20 zustande kommen, wäre aber dennoch ein natürliches Abbild der Situation vor Ort (siehe Kapitel 7).

Es gibt außerdem signifikante Unterschiede der Station NF-WP20 und den Stationen ML-Os (G1 ****) und ML-Us (G1 ****) in der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest. Auch hier ist der Mittelwert der Verdünnung G1 mit 72 % bei NF-WP20 wesentlich höher als bei den Stationen des Mühlenberger Lochs (4.4.1) und es wurden zwei Proben von NF-WP20 in der Clusteranalyse in die hohe Toxizitätsstufe eingeordnet. Die Proben des Mühlenberger Lochs gehören aber im Algentest alle zum Cluster 1 „Stimulation“. Der Unterschied zwischen NF-WP20 und dem Mühlenberger Loch ist im Gegensatz zu dem Vergleich mit Heuckenlock nur durch Eluattests hervorgerufen, die hauptsächlich die Wirkungen von wasserlöslichen Schadstoffen erfassen.

Die Station NF-WP20 unterscheidet sich von der Station NF-WP24 nur im Leuchtbakterientest (G1 **). Der Mittelwert der Verdünnung G1 mit 16 % ist bei NF-WP24 Hemmung geringer als bei NF-WP20 mit 50 %. Hier sind die Toxizitätswirkungen der nicht von Partikeln wasserlöslichen Schadstoffe anscheinend ähnlich wie bei NF-WP20, während die Wirkung der wasserlöslichen Stoffe zumindest im Eluat des LBT unterschiedlich ist. Da *V. fischeri* sensitiv gegenüber elementarem Schwefel ist (Ricking, et al., 2002; Svenson, et al., 1998), könnte an der Station NF-WP20 diese Substanz vermehrt auftreten (siehe auch Kapitel 5.5). Auch der Mittelwert der Verdünnung G1 der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen im Algentest ist bei der Station NF-WP24 mit -2 % Stimulation wesentlich geringer als bei der Station NF-WP20 mit 72 % Hemmung.

Bei dem Vergleich der Standardabweichungen der verschiedenen Probenahmestationen und verschiedenen Biotests wurde in 4.4.1 festgestellt, dass die geringsten Standardabweichungen der Leuchtbakterientest (ML-Us, HL-Os, HL-Us, NF-WP24) und der Süßwasser-Kontakttest (ML-Us, NF-WP20) aufweisen. Solche geringen Standardabweichungen sind beim Algentest bei keiner Station zu finden, hier zeigen sich sogar bei der Hemmung der Wachstumsrate bei den Stationen ML-Os und NF-WP20 und bei der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen bei den Stationen ML-Os, HL-Os und NF-WP20 die größten Standardabweichungen aller Stationen. Eine hohe Variation der Toxizitäten im Algenwachstumshemmtest am Standort wurde auch in der Arbeit „Effektorientierte

Untersuchungen zur Algentoxizität fraktionierter Porenwässer und Eluate aus Elbesedimenten“ von Claus et al. festgestellt (Claus, et al., 2009). In der Arbeit wurden bei Leopoldhafen in Dessau in einem Bereich der Elbe von 200 m Länge an drei Stellen jeweils vier Proben im Abstand von 2 m genommen und diese mit Eluaten im Algenwachstumshemmtest untersucht. Es ergaben sich hohe Schwankungsbreiten sowohl in den Toxizitäten der drei Stellen als auch in den Toxizitäten der Proben einer Stelle untereinander. Ein Zusammenhang mit sedimentologischen Eigenschaften konnte in der Arbeit nicht bewiesen werden.

Eine hohe Variation der Toxizitäten der Proben eines Standortes lässt möglicherweise auf eine große Inhomogenität des Sediments schließen. Eine hohe Homogenität kann möglicherweise eher bei Sedimenten mit geringem Trockengewicht, d.h. hohem Wasseranteil, auftreten, da dort eine bessere Vermischung des Sediments stattfinden kann (siehe Kapitel 7). Vergleichsweise trockenere Sedimente gibt es bei den Stationen „Wegpunkt 20“ im Neufelder Watt und der Station „Oberstrom“ in Heuckenlock. Die Standardabweichungen der Toxizitäten der Station „Wegpunkt 20“ im AT und im LBT gehören zu den höheren Standardabweichungen, jedoch nicht im SKT. Die Standardabweichungen der Station HL-Os gehört im AT (Fluoreszenz nach 3 Tagen) und SKT zu den höchsten, aber im AT (Wachstumsrate) und LBT nicht (siehe 4.4.1). Die Stationen ML-Os und NF-WP20 zeigen im Leuchtbakterientest und im Algenwachstumshemmtest relativ hohe Standardabweichungen, das heißt Schwankungen am Standort. Die Station NF-WP20 hat den größten Mittelwert der prozentualen Trockengewichte der 6 Stationen mit 67 %, was ein Grund sein könnte für die hohe Varianz an dieser Station.

Sedimente mit einem hohen Anteil an feinen Korngrößen sind möglicherweise ebenfalls homogener als Sedimente mit einem hohen Anteil an großen Korngrößen. Von der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) wurden die Korngrößen der 6 Stationen im Juli 2010 für die HAW Hamburg bestimmt. Eine Station, die der Station NF-WP20 nahe liegt, hat einen geringen Anteil an feinen Sedimenten mit 28,3 % im Vergleich zu den anderen Stationen und es zeigt sich eine Abnahme des Feinkornanteils in Richtung des Festlandes. Man kann also davon ausgehen, dass an der Station WP20 ein noch geringerer Feinkornanteil vorhanden ist. Ein höherer Anteil an großen Korngrößen könnten also hier der Grund für die hohe Varianz der Toxizitäten der Proben im LBT und AT sein. Die Station NF-WP24 hat eine geringere Varianz der Toxizitäten im AT und LBT, die eventuell u. a. durch den höheren Anteil an feinkörnigem Material und das geringere Trockengewicht gegenüber NF-WP20 begründet sein könnte. Die Station ML-Os hat zwar eine relativ große Variation der Toxizitäten, allerdings auch das geringste Trockengewicht mit 18 %. Dafür hat sie aber zusammen mit der Station ML-Us den höchsten Anteil an Korngrößen kleiner 60 µm von allen Stationen mit ca. 93,3 %.

Bei allen drei Tests ist die Standardabweichung der Werte vom Mühlenberger Loch „Oberstrom“ höher als die der Werte vom Mühlenberger Loch „Unterstrom“. Eventuell ist das Sediment an „Oberstrom“ weniger homogen als an „Unterstrom“, da die Station „Oberstrom“ näher an dem Deichsiel liegt und dort möglicherweise eine erhöhte

Sedimentation und damit ein erhöhter Eintrag von neuem Material aufgrund von mehr Bewegungen des Wassers, wie z.B. Zirkulationsströmungen (Malcherek), stattfindet.

Zusammenfassung:

Aus den Ergebnissen der zweifaktoriellen Varianzanalyse kann der Schluss gezogen werden, dass sich einige Probenahmestationen in den Biotests signifikant voneinander unterscheiden. Die Station, die im Neufelder Watt näher am Festland liegt, unterschied sich sogar von jeder anderen Station signifikant in verschiedenen Biotests. Insgesamt zeigten die Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests anhand der Standardabweichungen der Toxizitäten von einer Probenahmestation die höchsten Variationen. Im Algenwachstumshemmtest war die Standardabweichung der Toxizitäten besonders groß bei den Stationen ML-Os, NF-WP20 und HL-Os und im Leuchtbakterientest an den Stationen ML-Os und NF-WP20. Im Süßwasser-Bakterienkontakttest ist die Variation der Toxizitäten etwas erhöht an den Stationen in Heuckenlock. Im Mühlenberger Loch ergaben sich sehr unterschiedlich hohe Toxizitäten der Sedimente und auch unterschiedliche Kombinationen an Toxizitätsstufen der einzelnen Biotests, was in der Klassifizierung sichtbar ist. Stressfaktoren im Mühlenberger Loch könnten eingetragene Schadstoffe aus dem Hamburger Hafen, aus Einleitungen der Industrie oder aus historisch kontaminierten Sedimenten, die vom Oberstrom der Elbe angespült werden, sein. Die Variation der Toxizitäten an Mühlenberger Loch „Oberstrom“ ist besonders hoch. Höhere Toxizitäten bzw. Stimulationen im Algentest an der Station Mühlenberger Loch „Oberstrom“, die direkt an einem Deichsiel liegt, könnten damit begründet sein, dass es eventuell zu einem erhöhten Eintrag an Schadstoffen durch das Obstanbaugebiet „Altes Land“ kommt. Eventuell spielt auch ein erhöhter Eintrag von neuem Material aufgrund von mehr Bewegungen des Wassers eine Rolle. Außerdem wurden als Gründe für hohe Variationen der Toxizitäten an einem Standort, d.h. der Inhomogenität der Sedimente, ein geringer Anteil an feinen Korngrößen sowie ein hohes Trockengewicht der Sedimente diskutiert.

5.5 Sensitivitäten der Testorganismen gegenüber Substanzen

Um einen Hinweis auf die in den Sedimentproben möglicherweise vorhandenen Substanzen zu bekommen, ist es wichtig die Substanzen zu kennen, gegenüber denen die Testorganismen sensitiv sind. Eine erhöhte Toxizität in einem Test kann jedoch keine Aussage darüber treffen, um welche Substanzen es sich handelt oder ob Kombinationseffekte der Inhaltsstoffe des Sediments für die hohen Hemmungen der Organismen verantwortlich sind.

Algenwachstumshemmtest mit *Pseudokirchneriella subcapitata*:

Pseudokirchneriella subcapitata ist sensitiv gegenüber Schwermetallen wie zum Beispiel Kupfer (Ahlf, et al., 1986), Chrom (Giloni-Lima, et al., 2010) und Zink (Neumann-Hensel,

1998). Die Toxizität im Algenwachstumshemmtest wird außerdem durch Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) wie zum Beispiel die Herbizide (Unkrautbekämpfungsmittel), ein paar Heterozyklen sowie Ammoniumionen hervorgerufen (Claus, et al., 2009).

Leuchtbakterientest mit *V. fischeri*:

V. fischeri ist sensitiv gegenüber elementarem Schwefel im Festphasen-Biotest (Ricking, et al., 2002) und im Biotest mit einem Methanol-Extrakt (Svenson, et al., 1998). *V. fischeri* ist wenig sensitiv gegenüber PAKs, einigen Pestiziden und PCBs (Ricking, et al., 2002). Gegenüber Schwermetallen sind die Leuchtbakterien wenig sensitiv. In der Arbeit von Neumann-Hensel von 1998 wurde auch festgestellt, dass die Leuchtintensität von *V. fischeri* keine Hemmung gegenüber Zink zeigt (Neumann-Hensel, 1998).

Süßwasser-Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*:

In der Arbeit von H. Neumann-Hensel und S. Pudenz von 2003 wurde festgestellt, dass *A. globiformis* in dem Test nach DIN 38412-48:2002-09 „*Arthrobacter globiformis* für kontaminierte Feststoffe“ besonders sensitiv auf Zink mit Hemmungen nahe 100 % reagiert (Neumann-Hensel, et al., 2003). In einer anderen Arbeit wurde auch festgestellt, dass die Dehydrogenaseaktivität von *A. globiformis* durch Zink gehemmt wird (Neumann-Hensel, 1998). Außerdem reagierte *A. globiformis* in den Tests der Arbeit mit teilweise hohen Hemmungen auf n-Paraffin (> 100 % Hemmung), das Antibiotikum Tetracyclin (ca. 25 %), Benzalkoniumchlorid (BAC; > 150 %) und APEO (45 %). Die Abkürzung APEO bedeutet Alkylphenolpolyethylenglycoether auf Basis von i-Octylphenol.

6 Klassifizierung der Toxizitäten der Oberflächensedimente aus der Tideelbe

6.1 Verfahren der Klassifizierung

Die Klassifizierung wurde anhand der Ergebnisse der Clusteranalyse und der K-means-Analyse in Kapitel 4.3 vorgenommen. In die Klassifizierung gehen alle Verdünnungsstufen der „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ im Algenwachstumshemmtest, des Leuchtbakterientests und des Süßwasser-Bakterienkontakttests ein. Die Hemmung der Wachstumsrate im Algenwachstumshemmtest wird hier nicht berücksichtigt, da zum einen eine gute Korrelation (0,67) zwischen der Hemmung der Wachstumsrate und der Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen vorliegt (4.3.2) und zum anderen in der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg bisher hauptsächlich die Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen gemessen und für Auswertungen verwendet wurde. Hierdurch lässt sich bei Bedarf eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe herstellen. Bei der Clusteranalyse wurden die 22 Proben anhand der Ergebnisse innerhalb eines Biotests in Cluster, d.h. Gruppen mit ähnlichem Muster des Verlaufs der Verdünnungen, eingeteilt. Jeder Biotest hat dabei eine spezifische Anzahl an Cluster, die auch unterschiedliche Verläufe der Mittelwerte aus der K-means-Analyse haben (Abbildung 23).

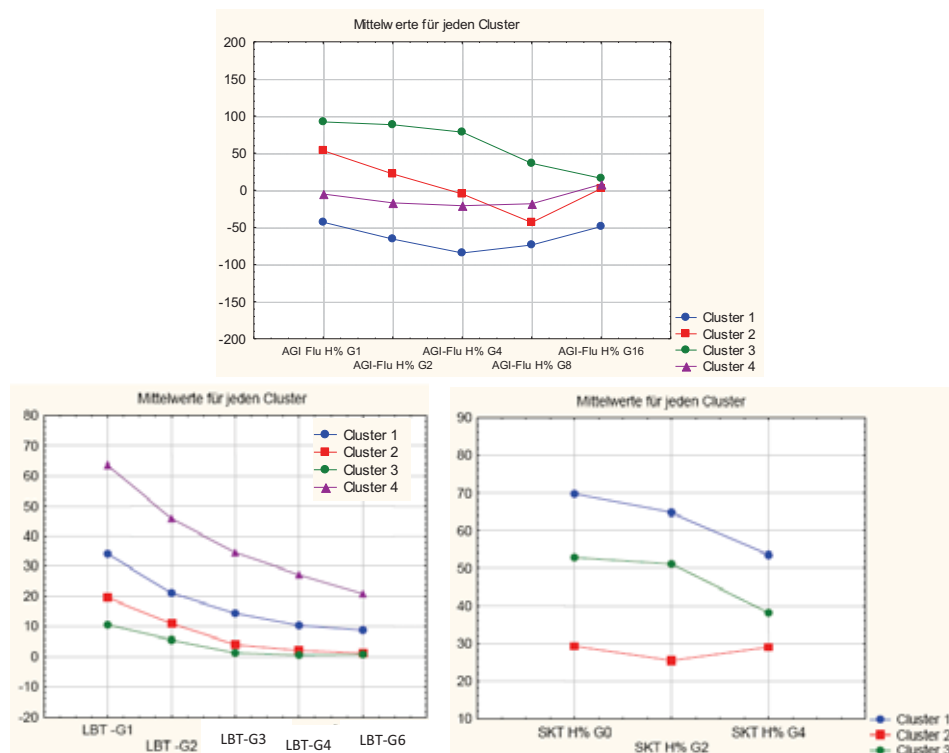


Abbildung 23 Diagramme der Mittelwerte der Verdünnungsstufen der Tests LBT, AT (Flu) und SKT als Hemmung in % für jeden Cluster berechnet nach der K-means-Analyse; Clusteranalyse für 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt

Im ersten Schritt der Klassifizierung wurden die vorliegenden Cluster der einzelnen Biotests nach Toxizitätsstufen benannt (Tabelle 28). Dabei wurden die fünf Toxizitätsstufen

„Stimulation“, „keine oder sehr geringe Toxizität“, „geringe Toxizität“, „mittlere Toxizität“ und „hohe Toxizität“ für die Cluster festgelegt. Diese Stufen sind allgemein definiert und wurden jeder Cluster-Kombination entsprechend der Verläufe der Mittelwerte der K-means-Analyse zugeordnet. Dabei muss bei einem Biotest nicht jede Stufe mit einem Cluster belegt sein. Zum Beispiel gibt es die Stufe „Stimulation“ nur beim Algenwachstumshemmtest und dafür gibt es im Algenwachstumshemmtest kein Cluster das mit „geringer Toxizität“ benannt wurde.

Tabelle 28 Toxizitätsstufen der Cluster für den Leuchtbakterientest (LBT), der „Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen“ im Algenwachstumshemmtest (AT, Flu) und den Süßwasser-Bakterienkontakttest

Toxizitätsstufen der Cluster	LBT	AT (Flu)	SKT
	Cluster Nr.		
Stimulation	-	1	-
keine oder sehr geringe Toxizität	3	4	-
geringe Toxizität	2	-	2
mittlere Toxizität	1	2	3
hohe Toxizität	4	3	1

Im zweiten Schritt wird für jede Probe in Tabelle 30 aufgelistet, welchem Cluster sie in welchem der drei Biotests angehört. Entsprechend der Tabelle 28 wurden die Cluster-Nummern eingefärbt, um die Toxizitätsstufen der Cluster deutlich zu machen.

Daraus folgt der dritte Schritt der Klassifizierung, bei dem die verschiedenen Kombinationen der Toxizitätsstufen der Cluster der drei Biotests in Tabelle 28 für die Proben in fünf Klassen eingeteilt wurden. Diese Klassen werden „Sediment-Toxizitätsklassen“ genannt und sind nach den Regeln in Tabelle 29 definiert. Vereinfacht kann man sagen, dass die Sediment-Toxizität höher eingestuft wird, je höher die Toxizitätsstufen der Cluster sind und je mehr höhere Stufen jeweils vorkommen. Sedimente in Stufe IV haben zum Beispiel nur höchstens eine Toxizitätsstufe „hohe Toxizität“ des Clusters und Sedimente der Stufe V haben in allen drei Biotests die Toxizitätsstufe „hohe Toxizität“ des Clusters.

Tabelle 29 Sediment-Toxizitätsklassen I bis V mit Beschreibung der Regel für jede Klasse; in den Regeln wird sich auf die Toxizitätsstufen der Cluster aus Tabelle 28 bezogen; Tox. = Toxizität

Sediment-Toxizitätsklassen	Farbe / Nr.	Beschreibung der Sediment-Toxizitätsklassen
Keine oder sehr geringe Sediment-Toxizität / Stimulation	I	jeder Test kann die Stufe "Stimulation" oder "keine oder sehr geringe Toxizität" oder "geringe Toxizität" aufweisen
Geringe Sediment-Toxizität	II	kein Test "hohe Toxizität" und höchstens einer "mittlere Toxizität"
Mittlere Sediment-Toxizität	III	höchstens ein Test "hohe Tox." und keiner "mittlere Tox." ODER mindestens zwei "mittlere Tox."
Hohe Sediment-Toxizität	IV	mindestens ein Test "hohe Tox." und einer "mittlere Tox."
Sehr hohe Sediment-Toxizität	V	alle Tests "hohe Toxizität"

Tabelle 30 Einfärbung nach Toxizitätsstufen (Tox. Stufe) der Cluster nach Tabelle 28 für die Biotests Leuchtbakterientest (LBT), Algenwachstumshemmtest (AT, Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen (Flu)) und Süßwasser-Bakterienkontakttest (SKT) für die 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt; Einordnung jeder Probe in eine Sediment-Toxizitätsklasse nach den Regeln aus Tabelle 29

Interne Nr.	Standort-beschreibung	LBT	AT (Flu)	SKT	Sediment-Toxizitäts-klasse
		Cluster Nr. / Tox. Stufe (Farbe)			
H26-11	ML-Os-1	1	1	1	IV
H27-11	ML-Os-2	2	1	3	II
H28-11	ML-Os-3	3	1	1	III
H29-11	ML-Os-4	2	1	1	III
H30-11	ML-Us-1	3	1	3	II
H31-11	ML-Us-2	3	1	3	II
H32-11	ML-Us-3	3	1	3	II
H33-11	ML-Us-4	3	1	3	II
H34-11	HL-Os-1	2	1	2	I
H35-11	HL-Os-2	2	4	3	II
H36-11	HL-Os-3	2	2	3	III
H37-11	HL-Os-4	2	2	2	II
H38-11	HL-Us-1	3	2	2	II
H39-11	HL-Us-2	2	2	3	III
H40-11	HL-Us-3	3	4	2	I
H41-11	HL-Us-4	2	1	3	II
H42-11	NF-WP20-1	2	2	1	IV
H43-11	NF-WP20-2	4	3	1	V
H44-11	NF-WP20-3	4	3	1	V
H45-11	NF-WP24-1	2	4	3	II
H46-11	NF-WP24-2	2	4	1	III
H47-11	NF-WP24-3	3	4	1	III

6.2 Klassifizierungskarte der Probenahmestationen mit Sedimenttoxizitäts-Klassen

Zur besseren Übersicht wurden in Tabelle 31 die 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch, aus Heuckenlock und aus dem Neufelder Watt nach Sediment-Toxizitätsklassen aufgelistet.

In Abbildung 24 ist eine Klassifizierungskarte der Probenahmestationen Mühlenberger Loch Ober- und Unterstrom, Heuckenlock Ober- und Unterstrom und den Wegpunkten 20 und 24 im Neufelder Watt zu sehen. Für die drei bis vier Proben von jeder Station sind die ermittelten Sediment-Toxizitätsklassen dargestellt.

Tabelle 31 Zuordnung der 22 Proben aus dem Mühlenberger Loch (ML), aus Heuckenlock (HL) und aus dem Neufelder Watt (NF); Os = Oberstrom; Us = Unterstrom; WP20 bzw. 24 = Wegpunkt 20 bzw. 24; 1,2,3,4 = Nummer der Probe von der jeweiligen Station; Sediment-Toxizitätsklassen I bis V nach den Regeln aus Tabelle 29

Sediment-Toxizitätsklassen				
I	II	III	IV	V
HL-Os-1	ML-Os-2	ML-Os-3	ML-Os-1	NF-WP20-2
HL-Us-3	ML-Us-1	ML-Os-4	NF-WP20-1	NF-WP20-3
	ML-Us-2	HL-Os-3		
	ML-Us-3	HL-Us-2		
	ML-Us-4	NF-WP24-2		
	HL-Os-2	NF-WP24-3		
	HL-Os-4			
	HL-Us-1			
	HL-Us-4			
	NF-WP24-1			

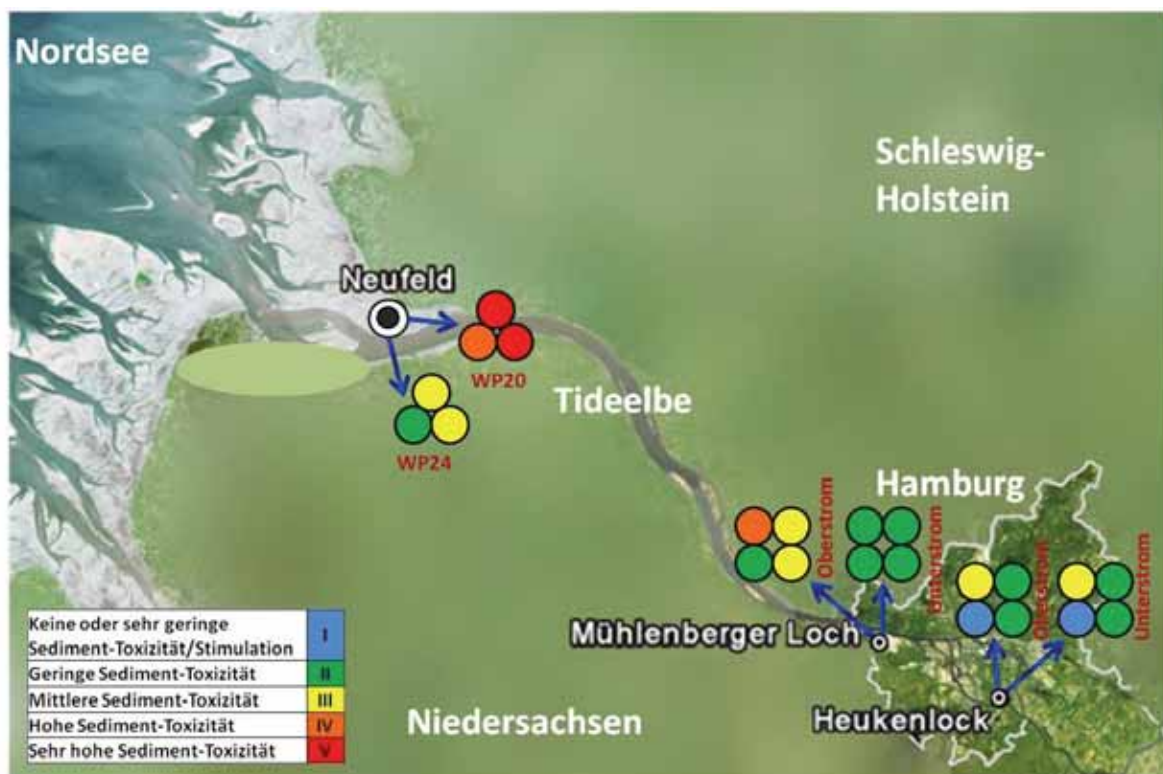


Abbildung 24 Klassifizierungskarte der Probenahmestationen Mühlenberger Loch (Ober- und Unterstrom), Heuckenlock (Ober- und Unterstrom) und Neufelder Watt (WP20 und WP24) mit den Sedimenttoxizitätsklassen I bis V (Hintergrundbild: Google Earth, modifiziert von Hsu, Pei-Chi)

Die Klassifizierung der Ergebnisse zeigt, dass die Station Mühlenberger Loch Unterstrom in allen vier Proben mit „Geringe Sediment-Toxizität“ eingestuft wird. Bei diesen Sedimenten ist nicht mit einer Gefahr für die Qualität der Elbe zu rechnen. Die Stationen in Heuckenlock werden beide jeweils mit einer Probe in „Sehr geringe Sediment-Toxizität /Stimulation“, mit zwei Proben in „Geringe Sediment-Toxizität“ und mit einer Probe in „Mittlere Sediment-

Toxizität“ klassifiziert. Die Station am Wegpunkt 24 im Neufelder Watt zeigt mit zwei Proben „Mittlere Sediment-Toxizität“ und in einer Probe „Geringe Sediment-Toxizität“. Die Station Mühlenberger Loch Oberstrom zeigt mit einer Probe „Hohe Sediment-Toxizität“ und zwei Proben „Mittlere Sediment-Toxizität“ eine noch weiter erhöhte Gefährdung an, die von den Sedimenten ausgehen kann. Die größte mögliche Gefahr für das Ökosystem geht von den Sedimenten am Wegpunkt 20 im Neufelder Watt aus, bei der die Sediment-Toxizitäten mit einmal „Hoch“ und zweimal „Sehr hoch“ höher als bei den anderen Stationen liegen.

7 Diskussion der Methoden

Algenwachstumshemmtest mit *Pseudokirchneriella subcapitata*:

Im Algenwachstumshemmtest reagiert *P. subcapitata* häufig mit Stimulation. Auch in den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg gibt es viele Testergebnisse mit Stimulation des Algenwachstums. Stimulation tritt dann als Messergebnis auf, wenn die Algen in den Eluaten schneller gewachsen sind als in den Kontrollen. Einige der möglichen Gründe für die Stimulation bei Algen sind im Folgenden genannt:

- Die Eluate sind nährstoffreicher als die Kontrollen, sodass die Algen in der Kontrolle langsamer wachsen.
- Die Stimulation deutet auf Industrieabfälle hin: In einer Studie, in der sieben verschiedene Algenarten in Biotests mit Industrieabfällen aus Textilfabriken in Kontakt gebracht wurden, wurde herausgefunden, dass Industrieabfälle sowohl Hemmung als auch Stimulation des Wachstums bei Algen hervorrufen kann. Teilweise wurde auch Stimulation bei geringen Konzentrationen, aber Hemmung bei hohen Konzentrationen festgestellt (Walsh, et al., 1980).
- Hormesis, das heißt Förderung des Wachstums der Algen aufgrund von Stressreaktionen (Ahlf, et al., 2005)

Die Hormesis besagt, dass geringe Dosen von Schadstoffen eine positive Wirkung auf einen Organismus, in diesem Fall die Förderung des Algenwachstums, haben können. Die mitochondriale Hormesis (Mitohormesis) wird von M. Ristow und K. Zarse 2010 zwar nicht für Algen, aber andere Organismen beschrieben (Ristow, et al., 2010). Bei der Mitohormesis werden durch eine geringe Dosis an Schadstoffen, die einen Stressfaktor darstellt, die Mitochondrien aktiviert und dadurch vermehrt freie Radikale freigesetzt, die wiederum zur Aktivierung der zelleigenen Abwehr gegen Radikale führen. Die wenigen freien Radikale funktionieren sozusagen als Impfstoff gegen den oxidativen Stress, der durch die Schadstoffe verursacht wurde und die Organismen können gut leben und sich vermehren. Ob es beim Algenwachstumshemmtest zu einer Mitohormesis kommt, ist unklar.

Beim Algenwachstumshemmtest zeigt ein Wert aus dem Mühlenberger Loch Oberstrom (Probe ML-Os-1) in der geringsten Verdünnung G1 mit -123,8 % die höchste Stimulation aller Werte. In der Auswertung der Rohdaten der Messung nach 24 h musste ein Fluoreszenz-Wert von drei Parallelen gelöscht werden, weil er nach Abzug des Blindwerts negativ war (-51 relative Fluoreszenzeinheiten) und so keine Berechnung der Wachstumsrate möglich gewesen wäre. Für diesen Wert liegt also ein Unsicherheitsfaktor vor, der das Vertrauen in diesen Wert etwas herabsetzt.

In den meisten Ergebnissen des Algenwachstumshemmtests wurden die Gültigkeitskriterien der Wachstumsrate der Kontrolle ($WR > 1,4$) und des Variationskoeffizienten der Kontrolle ($VarK < 5\%$) nicht erfüllt. Der Variationskoeffizient der Kontrollen ist nur bei drei von 22

Proben < 5 % und die Wachstumsrate ist bei nur sechs Proben > 1,4. Der Algenwachstumshemmtest weist also Unsicherheiten für die Ergebnisse auf. Auch in den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg werden die Gültigkeitskriterien oft überschritten und es zeigen sich große Schwankungen in den Testergebnissen.

Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri*:

Im Leuchtbakterientest werden die Eluate vor dem Test mit Natriumchlorid aufgesalzen, damit das Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* die optimalen Lebensbedingungen vorfindet. Die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen im Sediment kann jedoch durch die Änderung der Salinität beeinflusst werden (Chapman, et al., 2001).

Süßwasser-Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis*:

Eine mögliche Störung auf das Ergebnis der fluorometrischen Messung von Resorufin könnte die Tatsache sein, dass Resorufin in einem zweiten Reduktionsschritt zu dem farblosen Dihydroresorufin reduziert wird (siehe 3.3.2). Allerdings tritt diese 2. Reduktion nicht auf, wenn Resazurin ausreichend bioverfügbar ist, wovon bei diesem Versuch ausgegangen wurde (Feiler, et al., 2009). Nach Christian Harbeck findet eine Umwandlung zu Dihydroresorufin erst statt, wenn das Redox-Potential der Testansätze den Wert -51 mV unterschreitet (Harbeck, 2003; Feiler, et al., 2009). Da vor dem Test nach der DIN 38412-48:2002-09 sichergestellt wird, dass der Redox-Wert der vorverdünnten Proben einen positiven Wert hat, ist nicht davon auszugehen, dass am Ende des Tests der Redox-Wert unter einen Wert von -51 mV sinkt. Jedoch wird in dem Bericht SeKT „Definition von Referenzbedingungen, Kontrollsedimenten und Toxizitätsschwellen für limnische Sedimentkontakttests“ vorgeschlagen, am Ende des Tests den Redox-Wert zu kontrollieren (Feiler, et al., 2009).

Ein weiterer Störfaktor können reduktive Substanzen in der Probe sein, wenn die Probe vor dem Versuch nicht vollständig oxidiert wurde (Feiler, et al., 2009; Ahlf, et al., 1998). In diesem Fall würden die reduktiven Substanzen zu der Resorufin-Erzeugung beitragen und dies würde ein falsch-positives Ergebnis verursachen. Die Toxizität, d.h. die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität, würde dabei unterschätzt werden. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich oxidierte Sedimente untersucht, da die Proben aus dem oberen ersten Zentimeter genommen wurden. Jedoch können teilweise auch nur die ersten Millimeter einer Bodenschicht oxisch sein und darunter finden sich anoxische Bedingungen (Ahlf, Datum unbekannt). Die Proben aus dem Mühlenberger Loch hatten nach der Probenahme einen Redox-Wert von im Mittel -218 mV (siehe Tabelle 2 in 2.2). Die Proben aus Heuckenlock (Ø63 mV) und dem Neufelder Watt (Ø113 mV) hatten alle einen positiven Redox-Wert. Vor dem Süßwasser-Kontakttest wurde jedoch durch 48-stündiges Überkopfschütteln und 1-stündigem Belüften dafür gesorgt, dass alle vorverdünnten Proben einen positiven Redox-Wert haben. Die Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 mussten

allerdings trotz der genannten Vorbehandlung erst ein paar mal per Hand belüftet und geschüttelt werden, um einen positiven Redox-Wert zu erlangen.

Der Abschlussbericht SeKT der Bundesanstalt für Gewässerkunde (Feiler, et al., 2009) sowie Heise und Ahlf (Heise, et al., 2005a; Ahlf, 2007) schlagen eine Korrekturmethode für den Süßwasser-Bakterienkontakttest vor, um die Resorufin-Zunahme bei unbekanntem Proben mit verschiedenen Resazurin-/Resorufin-Konzentrationsverhältnissen in Ansätzen ohne Bakterien zu kalibrieren. Eine Kalibriermethode wurde in dieser Arbeit eingesetzt (siehe 3.3.2). Studien haben belegt, dass natürliche Sedimente unterschiedliche Resorufin-Konzentrationskurven erzeugen, was möglicherweise durch verschiedene Adsorptionspotentiale oder Quenching Effekte verursacht wird (Heise, et al., 2005a). Das Quenching ist eine Fluoreszenzlöschung, bei der die Energie der fluoreszierenden Moleküle durch den Zusammenstoß mit anderen im Sediment befindlichen Molekülen ohne Aussendung von Strahlung an die anderen Moleküle in Form von Wärme abgegeben wird. Quenching beschreibt auch andere Effekte, die dazu führen, dass die fluoreszierenden Moleküle ohne Aussendung von Strahlung in den Grundzustand zurückfallen oder daran gehindert werden in den angeregten Zustand zu gelangen.

Ein weiterer Störfaktor des Süßwasser-Bakterienkontakttests kann die mikrobielle Eigenaktivität der Sedimente sein (Ahlf, et al., 1998). Die Proben werden zwar bei 80°C im Wasserbad pasteurisiert, damit die Dehydrogenaseaktivität der Sedimente unterdrückt wird, jedoch besteht immer das Risiko, dass noch Eigenaktivität bleibt. In diesem Fall würden die Organismen des Sediments mit zur Resorufin-Produktion beitragen und im Ergebnis die Toxizität unterschätzen. Dieser mögliche Störfaktor wird jedoch durch die Kalibrierung berücksichtigt.

Färbung des Eluats im Leuchtbakterientest und im Algenwachstumshemmtest:

Eine Färbung des Eluats kann beim Leuchtbakterientest eine Verfälschung des Ergebnisses, d.h. Überschätzung der Toxizität, hervorrufen. Denn die Farbe des Eluats kann das Licht vom Luminometer teilweise absorbieren, wenn die Wellenlänge der Farbe im Bereich der Wellenlänge der jeweiligen Geräte-Strahlung liegt. Beim Leuchtbakterientest sind dies insbesondere rote bis braune Färbungen. Deshalb wird nach DIN EN ISO 11348-2:2009-05 im Leuchtbakterientest falls nötig eine Farbkorrektur durchgeführt, für die an der HAW Hamburg in dieser Arbeit die nötigen Materialien fehlten. Die Eluate der Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 waren gelblich gefärbt und das Eluat der Probe ML-Os-1 war gelb-bräunlich gefärbt. Die Ergebnisse dieser drei Proben könnten also durch die Färbungen der Eluate ungenau sein. Da die Probe ML-Os-1 allerdings im Süßwasser-Bakterienkontakttest eine sehr hohe Hemmung zeigt, kann angenommen werden, dass die Toxizität im Leuchtbakterientest tatsächlich hoch ist und der mögliche Einfluss der Färbung keine große Rolle spielt. Die Proben NF-WP20-2 und NF-WP20-3 wurden im Algentest (Hemmung der Fluoreszenz nach 3 Tagen) und im Süßwasser-Kontakttest in den Cluster mit der höchsten Toxizitätsstufe eingeordnet und man könnte auch hier davon ausgehen, dass die Proben tatsächlich auch im Leuchtbakterientest eine erhöhte Toxizität haben. Nach der Durchführung des

Leuchtbakterientests wurden die Eluate als Blindwerte aus dem Neufelder Watt mit dem Luminometer gemessen. Es konnten allerdings keine auffälligen Werte festgestellt werden. Auch beim Algenwachstumshemmtest wurden Sediment-Eluate eingesetzt. Nach DIN EN ISO 8692:2004 wird allerdings keine Farbkorrektur vorgeschlagen, denn der Einfluss der Färbung wird beim Algenwachstumshemmtest durch die Verwendung von Blindwerten ohne Algen berücksichtigt.

Toleranz der Testorganismen gegenüber Salinitätsschwankungen:

Die Organismen sollten eine Toleranz gegenüber ästuarinen abiotischen Umweltfaktoren wie zum Beispiel Schwankungen der Salinität besitzen (Arbeitsgruppe-Ökotoxikologie-TU-Hamburg-Harburg, 2004). Der Organismus *Pseudokirchneriella subcapitata* ist zwar eine Süßwasser-Alge, trotzdem wird sie in dieser Arbeit im Algenwachstumshemmtest eingesetzt, da sie einen Bereich bis 1,5 % Salinität (Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg) toleriert und der Salzgehalt durch die Verwendung von Eluaten, d.h. wässrigen Lösungen, der Sedimente, von denen auch Verdünnungsstufen gemessen werden, herabgesetzt wird. Betroffen wäre möglicherweise auch nur der Probenahmeort Neufelder Watt, der im Mündungsbereich der Elbe liegt. Der Testorganismus *V. fischeri* des Leuchtbakterientests ist ein marines Bakterium, das jedoch nur in einem begrenzten Bereich der Salinität überleben kann, weshalb die Eluate gegebenenfalls aufgesalzen werden müssen.

Bioverfügbarkeit und Störfaktoren wie Lagerung und Vorbehandlung der Proben:

Die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe im Sediment kann durch die Lagerung und Vorbehandlung der Proben verändert werden. Die Steigerung oder Verminderung der ökotoxikologischen Wirkung kann z.B. durch das 24- bis 48-stündige Schütteln, Homogenisieren oder das Pasteurisieren der Proben hervorgerufen sein. Auch ein veränderter pH-Wert beeinflusst die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen (Ahlf, et al., 1998). Die Lagerung bei kalten Temperaturen bei etwas über 0 °C verhindert Alterungsprozesse der Sedimente. Jedoch kann dies die Toxizität der Sedimente mit der Zeit zunehmend verändern (Ahlf, et al., 1998). Für metallhaltige Sedimentproben wird eine Lagerungszeit von zwei Tagen bis zu „weniger als zwei Wochen“ empfohlen (Burton, 1991). In der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg sollen üblicherweise die Proben spätestens nach vier Wochen mit den Biotests gemessen worden sein. Sie werden während der Lagerungszeit nicht eingefroren oder gefriergetrocknet, sondern lediglich bei ca. 8 °C gekühlt. Die Proben dieser Arbeit wurden mit dem Algentest nach 5 - 21 Tagen, mit dem Leuchtbakterientest nach 2 - 13 Tagen und mit dem Süßwasser-Kontakttest nach 4 - 22 Tagen gemessen. In der Norm DIN EN ISO 5667-3 „Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Wasserproben“ ist beschrieben, nach welcher maximalen Lagerungszeit Chemikalien analysiert werden sollten. Für viele Schadstoffe reicht eine Untersuchung nach einem Monat aus, aber viele besonders flüchtige Substanzen sollten unmittelbar (Chloramin, Chlordioxid) oder nach wenigen Tagen (CO₂, Nitrat, Sulfide, ionische Tenside, Anionen) untersucht werden. Die

Wirkung dieser Substanzen könnte möglicherweise in den Biotests teilweise nicht erfasst worden sein. Jedoch reicht es für die überwiegende Zahl der in der Norm genannten Substanzen aus, diese nach einem Monat zu untersuchen wie zum Beispiel Schwermetalle, Bromverbindungen und Bor. In der Norm EN ISO 5667-16:1998 „Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren“ wird für Abwasserproben in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit der Proben eine maximale Lagerungszeit von mehreren Wochen bis zwei Monaten angegeben. Die Lagerungsdauer kann also einen Einfluss auf die Bestimmung der Toxizität haben.

Einfluss der wässrigen Testphase „Eluat“:

Für den Algenwachstumshemmtest und den Leuchtbakterientest werden die Eluate der Sedimentproben verwendet, d.h. es werden nur die Schadstoffe erfasst, die sich mit Wasser aus dem Sediment lösen lassen. Hiermit wird zum Beispiel die Situation von Resuspensionsprozessen bei Entnahme oder bei Verklappen von Baggergut in der Elbe nachgeahmt (Ahlf, et al., 1998; Liß, 1997). Mit Eluaten lässt sich die Gesamtoxizität des Sediments also nur in Teilen bestimmen, da die mit Wasser nicht löslichen Stoffe im Sediment verbleiben (Rönnpapel, et al., 1995; Liß, 1997).

Weitergehende Bewertung mit der „Sediment-Triade“:

In dieser Arbeit wurde die Sediment-Qualität ausschließlich durch Biotests bewertet. Eine umfassendere Bewertung von Sedimenten kann mit der sogenannten „Sediment-Qualitäts-Triade“ erreicht werden. Hierfür wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig, die in dieser Arbeit aufgrund des hohen Arbeits- und Kostenaufwandes nicht durchgeführt wurden. Die Sediment-Triade besteht aus folgenden drei Bewertungen (Chapman, 1996):

- Sedimentchemie: Bestimmung der Konzentrationen von Schadstoffen im Sediment mit chemischen Analyseverfahren
- Ökotoxikologie: Toxizitätsbestimmungen mittels Sediment-Biotests
- Ökologie: Ermittlung der Veränderungen der vor Ort angesiedelten Sediment-Lebensgemeinschaft (benthische Infauna)

Die Ergebnisse der Sediment-Triade können nicht schematisch interpretiert werden. Einige Aussagen können jedoch getroffen werden, wenn man die Ergebnisse der drei Messungen zu Ja-Nein-Antworten vereinfacht (Chapman, 1996). So könnte man beispielsweise bei Ja-Antworten der Ökotoxikologie und der Ökologie, aber einer Nein-Antwort der Sedimentchemie zu der Aussage kommen, dass möglicherweise ungemessene toxische Stoffe die Sedimentqualität verschlechtern. Findet sich die einzige Ja-Antwort in den Biotests, dann liegt eine mögliche Qualitätsminderung der Sedimente durch ungemessene Schadstoffe oder Bedingungen vor.

Einfluss des Trockengewichtes der Proben auf die Bestimmung der Toxizität:

Die Höhe des Trockengewichts könnte einen Einfluss auf das Ergebnis der Toxizität haben, denn je wässriger ein Sediment ist, desto verdünnter sind eventuell die Schadstoffe. Proben mit höheren Trockengewichten könnten bei der Annahme, dass die meisten Schadstoffe an das Sediment gebunden sind, eine höhere Toxizität haben, da der Anteil an Sediment in der Probe erhöht ist. Dies muss allerdings nicht zwangsläufig der Fall sein, denn die Schadstoffe könnten auch vermehrt im Wasser gelöst sein. Das Mühlenberger Loch hat die geringsten Sedimentanteile in den Proben (Oberstrom: 18 % TG, Unterstrom: 26 % TG), danach folgen die Proben aus Heuckenlock Unterstrom (45 % TG), aus dem Neufelder Watt am WP24 (55 % TG), aus Heuckenlock Oberstrom mit 63 % TG und am größten ist das Trockengewicht der Proben aus dem Neufelder Watt am WP20 mit 67 %.

Eine Diskussion über den Einfluss von Trockengewichten kann geführt werden, jedoch muss gesagt sein, dass bei Toxizitätstests die natürliche Situation vor Ort erfasst werden soll, wie sie auch für die Organismen des Sediments vorliegt. Deshalb ist es in der Ökotoxikologie auch zulässig Sedimente mit verschiedenen Trockengewichten miteinander zu vergleichen.

8 Zusammenfassung

In dieser Bachelorarbeit wurde untersucht, ob und wie sich Sediment-Toxizitäten, die als prozentuale Hemmwirkungen auf Testorganismen im Vergleich zu einer Kontrolle vorliegen, an einzelnen Probenahmeorten und -stationen in verschiedenen ökotoxikologischen Tests unterscheiden und von welchen Faktoren diese Unterschiede verursacht sein könnten. Außerdem wurde die Variation der Toxizität von mehreren zeitgleich genommener Proben einer Station ermittelt und diskutiert. Dafür wurden die Toxizitäten von Oberflächensedimentproben aus der Tideelbe an den drei Probenahmeorten Mühlenberger Loch und Heuckenlock in Hamburg und Neufelder Watt an der Elbemündung mit drei Biotests bestimmt. Die Biotestkombination setzte sich aus dem Algenwachstumshemmtest mit *Pseudokirchneriella subcapitata*, dem miniaturisierten Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* und dem Süßwasser-Bakterienkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* zusammen, die unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Schadstoffen zeigen und sich in ihren Aussagen ergänzen. Mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde ermittelt, dass sich einige Probenahmestationen in bestimmten Biotests signifikant voneinander unterscheiden. Die Station, die im Neufelder Watt näher am Festland liegt, unterschied sich sogar von jeder anderen Station signifikant in verschiedenen Biotests. Die Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests zeigten die höchsten Standardabweichungen der Toxizitäten von einer Probenahmestation, wobei *Pseudokirchneriella subcapitata* am häufigsten von allen Testorganismen mit Stimulation auf die Sedimente reagierte. Stimulation trat besonders häufig bei den Proben des Mühlenberger Lochs auf, was ein Hinweis auf vermehrt auftretende Nährstoffe sein kann, die aus dem Obstanbaugebiet „Altes Land“ stammen könnten. Im Mühlenberger Loch war die Variation der Toxizitäten der Sedimente sehr hoch, was durch die vielen unterschiedlichen Stressfaktoren wie Schadstoffe aus dem „Alten Land“, aus dem Hamburger Hafen, aus Einleitungen der Industrie oder aus historisch kontaminierten Sedimenten vom Oberstrom der Elbe begründet sein kann. Dabei ist die Station im Mühlenberger Loch, die nahe einem Deichsiel liegt, eventuell besonders durch die Schadstoffe aus dem „Alten Land“ beeinflusst. Die Ergebnisse einer Biotestkombination inklusive der Verdünnungsstufen sind komplex und es fällt somit schwer aus diesen eine bewertende Aussage zu treffen. Deshalb wurde eine Klassifizierung entwickelt, die die gesamten Informationen berücksichtigt und in Toxizitätsklassen integriert. Die Grundlage für die Klassifizierung der Elbesedimente bildete eine Clusteranalyse, mit der die Ergebnisse von jeder Probe innerhalb eines Biotests in Gruppen mit ähnlichen Toxizitäten eingeordnet wurden. Jede Gruppe innerhalb der Ergebnisse eines Biotests konnte einer bestimmten Toxizitätsstufe zugeordnet werden. Aus der Kombination der Toxizitätsstufen der drei Biotests, für die Regeln beschrieben wurden, ließen sich Sediment-Toxizitätsklassen ableiten. Die Klassifizierung als integrierte Darstellung der Ergebnisse ergab, dass die Sediment-Toxizitäten an der Station nahe dem Deichsiel im Mühlenberger Loch mit zweimal „mittel“ und einmal „hoch“ und an der Station im Neufelder Watt, die näher dem Festland liegt, mit einmal „hoch“ und zweimal „sehr hoch“ im Vergleich zu den anderen Stationen die größte Wirkung auf die Testorganismen hatten.

9 Literaturverzeichnis

- Ahlf, W. 2007.** Comments on the article 'Optimisation of the Solid-Contact Test with *Arthrobacter globiformis*'. *Journal of Soils and Sediments*. 2007, 7 (2), 1.
- Ahlf, W. und Gratzner, H. 1998.** *Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe - Entwicklung methodischer Ansätze*. Technische Universität Hamburg-Harburg. Hamburg : UBA-Texte 41/99, UBA-FB 98-119, 1998.
- Ahlf, W. und Heise, S. 2005.** Sediment Toxicity Assessment - Rationale for effect classes. *Journal of Sediments and Soils*. 2005, 5 (1), 16-20.
- Ahlf, W., Calmano, W. und Förstner, U. 1986.** The Effects of Sediment-Bound Heavy-Metals on Algae and Importance of Salinity. [Buchverf.] P.G. Sly. *Sediments and Water Interactions*. New York : Springer-Verlag, 1986, S. 319-324, Chapter 26.
- Ahlf, Wolfgang. Datum unbekannt.** Biotests an Sedimenten V-3.6.1. [Buchverf.] Steinberg, Bernhardt und Klapper. *Handbuch für Angewandte Limnologie, Aquatische Ökotoxikologie; 44 Seiten*. Datum unbekannt.
- Ahlf, Wolfgang, et al. 2002.** A Guidance for the Assessment and Evaluation of Sediment Quality - A German Approach Based on Ecotoxicological and Chemical Measurements. *JSS – J Soils & Sediments* . 2002, 2 (1), 37 – 42.
- Arbeitsgruppe-Ökotoxikologie-TU-Hamburg-Harburg. 2004.** Ökotoxikologische Untersuchungen in drei Gebieten der deutschen Ostseeküste. Erstellt im Auftrag der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz : Beratungszentrum Integriertes Sedimentmanagement "BIS" der TU Technologie GmbH Hamburg, Dr. S. Heise (Projektleitung), 2004.
- Burton, Allen. 1991.** Assessing the Toxicity of Freshwater Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1991, Vol. 10, pp. 1585-1627.
- Calmano, W. 1996.** Notwendigkeit einer ökotoxikologischen Beurteilung von Sedimenten. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. 1996, 24 (2) 101-103.
- Chapman, P. M. 1996.** Presentation and interpretation of Sediment Quality Triad data. *Ecotoxicology*. 1996, 5, 327-339.
- Chapman, P. M. und Wang, F. 2001.** Assessing Sediment Contamination in Estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001, Vol. 20, No. 1, pp. 3–22.
- Claus, Evelyn, et al. 2009.** Effektorientierte Untersuchungen zur Algentoxizität fraktionierter Porenwässer und Eluate aus Elbesedimenten. *Umweltwiss Schadst Forsch*. 2009, 21: 267–271, Springer Verlag.
- EG-WRRL-Tideelbe. 2004.** *Bericht über die Umsetzung der Anhänge II, III und IV der Richtlinie 2000/60/EG im Koordinierungsraum Tideelbe (B-Bericht)*. s.l. : Behörde für Stadtentwicklung und Umwelt, Niedersächsisches Umweltministerium, Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft, 2004. EG-WRRL = EG-Wasserrahmenrichtlinie.
- EG-WRRL-Tideelbe-C. 2004.** *Umsetzung der EG-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) Koordinierungsraum Tideelbe Bestandsaufnahme und Erstbewertung (Anhang II / Anhang IV der WRRL) des Tideelbestroms (C-Bericht) - Entwurf*. s.l. : Sonderaufgabenbereich Tideelbe

der ARGE-Elbe der Länder Hamburg, Niedersachsen und Schleswig-Holstein mit Wassergütestelle Elbe, 2004.

Feiler, U., et al. 2009. Definition von Referenzbedingungen, Kontrollsedimenten und Toxizitätsschwellenwerten für limnische Sedimentkontakttests - SeKT. Koblenz : Bundesanstalt für Gewässerkunde, Auftraggeber: Bundesministerium für Bildung und Forschung, 2009. BfG-1614, 251.

Giesy, J.P., Hoke, R.A. 1990. Freshwater sediment quality criteria toxicity. [Buchverf.] R. Baudo, J. Giesy und H. Muntau. *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Boca Raton, Florida, USA : Lewis, 265-348, 1990.

Giloni-Lima, P. C., et al. 2010. A study of the effects of chromium exposure on the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) hindak evaluated by Central Composite Design and Response Surface Methodology. *Ecotoxicology, Springer*. 2010, 19:1095–1101.

Harbeck, C. 2003. Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in der Nahrungsmittelindustrie bei der Aufarbeitung landwirtschaftlicher Rohstoffe. Fachbereich Chemie Universität Hannover : s.n., 2003.

Heise, S. und Ahlf, W. 2005a. A New Microbial Contact Assay for Marine Sediments. *Journal of Soils and Sediments*. 2005a, 5 (1), 9-15.

Heise, S., et al. 2007. *Bewertung von Risiken durch Feststoff-gebundene Schadstoffe im Elbeeinzugsgebiet*. Hamburg : Im Auftrag der Flussgebietsgemeinschaft Elbe und Hamburg Port Authority, erstellt vom Beratungszentrum für integriertes Sedimentmanagement (BIS/TuTech) an der TU Hamburg-Harburg, 2007. 349 Seiten.

Heise, S., et al. 2005b. *Studie zur Schadstoffbelastung der Sedimente im Elbeeinzugsgebiet: Ursachen und Trends*. Hamburg : Im Auftrag der Flussgebietsgemeinschaft Elbe und Hamburg Port Authority, erstellt vom Beratungszentrum für integriertes Sedimentmanagement (BIS/TuTech) an der TU Hamburg-Harburg, 2005b. 169 Seiten.

Hsu, P., et al. 2007. Seasonal variation of sediment toxicity in the Rivers Dommel and Elbe. *Environmental Pollution*. 2007, 148 Pages, 817-823.

Jansen, P. H. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. 2006, Vol. 72 No. 3, p. 1719–1728.

Liechti, P., et al. 1995. *Die Baggerung von Sedimenten bei Hafenanlagen und Schifffahrtsrinnen - Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr. 19*. s.l. : Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), 1995.

Liß, Waltraud. 1997. *Vergleich mikrobieller Biotests zur ökotoxikologischen Bewertung kontaminierter Sedimente unter Berücksichtigung der Wirkpfade von Schadstoffen*. Düsseldorf : Fortschritt-Berichte, Reihe 15: Umwelttechnik, Nr. 176, VDI-Verlag, 1997.

Malcherek, Andreas. *Sedimenttransport und Morphodynamik*. s.l. : Universität der Bundeswehr München - Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen.

Manz, W. und Krebs, F. *Umweltgerechtes Baggergut-Management in Bundeswasserstraßen - Ökotoxikologische Gefährdungsabschätzung von Baggergut*. Koblenz : Referat G3, Ökotoxikologie, Bundesanstalt für Gewässerkunde.

Neumann-Hensel, H. 1998. *Praxiserprobung einer mikroorganismischen Testbatterie zur raschen und kostengünstigen Beurteilung des Restrisikos von Industriechemikalien in*

(sanierten) Böden. Hamburg : Technische Universität Hamburg Harburg, Arbeitsbereich Umweltschutztechnik; Dr. Fintelmann und Dr. Meyer Handels- und Umweltschutzzlaboratorien GmbH, 1998.

Neumann-Hensel, Helga und Pudenz, Stefan. 2003. Toxizitätsdaten aus einer ökotoxikologischen Testbatterie - Auswertemethode und Interpretationshilfe. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox, Originalarbeiten, 6. SETAC-Tagung.* 2003, 15 (1), 13 - 20.

Precht, M. und Kraft, R. 1993. *Bio-Statistik 2.* München, Wien : R. Oldenbourg Verlag GmbH, 1993. 5. Auflage.

Ricking, Mathias, Beckman, Erik und Svenson, Anders. 2002. Polycyclic Aromatic Compounds and Microtox® Acute Toxicity in Contaminated Sediments in Sweden. *Journal of Soils and Sediments.* 2002, 2 (3), 129-136.

Ristow, M. und Zarse, K. 2010. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology- Elsevier.* 2010, 45, 410-418.

Rönnpagel, K., Liß, W. und Ahlf, W. 1995. Microbial Bioassays to Assess the Toxicity of Solid-Associated Contaminants. Technische Universität Hamburg-Harburg, Arbeitsbereich Umweltschutztechnik : *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31, 99-103, 1995.

Sonnen, Dr. 1993. *Handbuch Altlasten und Grundwasserschadensfälle - Handbuch Bodenwäsche.* Karlsruhe : Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 1993.

Svenson, Anders, Viktor, Tomas und Remberger, Mikael. 1998. Toxicity of Elemental Sulfur in Sediments. *John Wiley & Sons, Inc. Environ Toxicol Water .* 1998, Qual 13, 217-224.

Tamura, T., Nishii, T. und Hatano, K. Microbewiki. [Online] [Zitat vom: 16. Juli 2011.] <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrobacter>.

Walsh, G. E. und Alexander, S. V. 1980. A Marine Algal Bioassay Method: Results with Pesticides and Industrial Wastes. *Water, Air, and Soil Pollution .* 1980, 13, 45-55.

10 Anhang

10.1 Hinweise zu der Anlage auf CD

Auf der Anlage auf CD befindet sich die Bachelorarbeit in digitalisierter Form sowie die Auswertungen der Rohdaten der Biotests mit graphischen Darstellungen, die Daten der Trockengewicht-Berechnung, die Redox- und pH-Werte der Proben in Microsoft Office Excel 2007-Dateien.

10.2 Berechnung des Variationskoeffizienten und der Wachstumsrate für die Auswertung der Ergebnisse des Algenwachstumshemmtests mit *Pseudokirchneriella subcapitata*

Berechnung des Variationskoeffizienten:

Vor Verwendung der Fluoreszenz-Werte für Berechnungen wird der zugehörige Blindwert einer Kontrolle bzw. Verdünnungsstufe von dieser subtrahiert. Der Variationskoeffizient VarK in % der Kontrollen berechnet sich aus dem Mittelwert der Fluoreszenzen F_{MW} der drei Parallelwerte der Kontrollen einer Platte und der Standardabweichung F_{Stdabw} dieser drei Werte nach Gleichung 9.

$$\boxed{VarK \text{ (in \%)} = F_{Stdabw} / F_{MW}}$$

Gleichung 9 Berechnung des Variationskoeffizienten VarK in %

Der Variationskoeffizient, auch relative Standardabweichung genannt, wird außerdem wie in Gleichung 9 für die Verdünnungsstufen der Proben und der Positiv-Kontrollen berechnet.

Berechnung der Wachstumsrate:

Die Wachstumsrate wird für jeden der drei Parallelwerte der Kontrolle einer Platte zuerst einzeln berechnet und dann als Mittelwert für das Gültigkeitskriterium gebildet. Die Wachstumsrate (WR) beschreibt die durchschnittliche relative Zunahme der Algenzellen aufgrund von Vermehrung pro Tag und wird als Faktor angegeben. Die Wachstumsrate der Kontrollen (Gleichung 10) entspricht der Steigung der Regressionsgeraden, die aus dem natürlichen Logarithmus der Fluoreszenz-Werte der Kontrollen und der Zeit in Tagen von t_1 bis t_3 erstellt wurde. Hierfür wird auch das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet, aus dem erkannt werden kann, wie nahe die Messwerte an der Geraden liegen, d.h. wie gut die lineare Regression ist. Ist die halb-logarithmische Kurve linear, so handelt es sich um ein exponentielles Wachstum der Algenpopulation. Wenn die Kurve jedoch abflacht, dann hat die Population die stationäre Wachstumsphase erreicht (Quelle: DIN EN ISO 8692:2004).

$$WR = \frac{\sum_{x=t1}^{t3} (t_x - t_{MW})(\ln F_x - \ln F_{MW})}{\sum_{x=t1}^{t3} (t_x - t_{MW})^2}$$

Gleichung 10 Wachstumsrate WR

Mit:

- WR Wachstumsrate (entspricht der Steigung) als Faktor
 t_x Zeit in Bezug auf t_0 bei der Messung x (t_1 , t_2 oder t_3) in Tagen
 F_x Fluoreszenz bei der Messung x (t_1 , t_2 oder t_3)
 t_{MW} Mittelwert der Zeit über t_1 bis t_3 in Tagen
 F_{MW} Mittelwert der Fluoreszenz-Werte von t_1 bis t_3

Die Wachstumsraten der Verdünnungen aller Proben, Kontrollen und Positiv-Kontrollen werden wie in Gleichung 10 berechnet. Nur bei der Kontrollplatte werden für den Mittelwert alle Fluoreszenz-Werte für die Berechnung der Steigung herangezogen. Für jede Verdünnungsstufe und jede Kontrolle wird eine Wachstumskurve erstellt, in der die Werte des natürlichen Logarithmus der Fluoreszenz über die Zeit dargestellt sind. Zusätzlich zum Mittelwert werden die Standardabweichung und der Variationskoeffizient der Wachstumsraten berechnet.

Für die Berechnung der Wachstumsrate kann alternativ zuerst der Mittelwert der Fluoreszenz-Werte der jeweiligen drei Parallelansätze gebildet und dann daraus der natürliche Logarithmus berechnet werden. Mit diesen Werten und der Zeit in Tagen wird dann die Steigung, das heißt die Wachstumsrate der jeweiligen Verdünnung bzw. Kontrolle berechnet.

Sollte das Bestimmtheitsmaß aus der Berechnung, die mit den Werten der t_0 -Messung durchgeführt wurde, größer sein als bei der Berechnung ohne die t_0 -Werte, dann werden die t_0 -Werte für die Berechnung der Wachstumsraten mit einbezogen und hieraus die Hemmung berechnet.

10.3 Herstellung der Nährmedien für die Durchführung der Biotests

DIN-Stammlösungen für die Herstellung der Medien für *Pseudokirchneriella subcapitata*

1) Makro-Nährstoffe

	g/500 ml
NH ₄ Cl	0,75
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,6
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,9
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,75
KH ₂ PO ₄	0,08

2) Fe-EDTA

	g/250 ml
FeCl ₃ * 6H ₂ O	0,016
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	0,025

3) Spurenelemente

	g/500 ml
H ₃ BO ₃	0,0925
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0,2075
ZnCl ₂	0,0015
[CoCl ₂ * 6 H ₂ O } CuCl ₂ * 2 H ₂ O }	500 µl
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,0035
→ Extralösung:	
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,75 g/500 ml
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,005 g/500 ml

4) NaHCO₃ 25 g/500 ml steril filtrieren, 0,2 µm Membran

→ alle Lösungen autoklavieren

KL-Stammlösungen für *Pseudokirchneriella subcapitata* (KL = Kuhl-Lorenzen)

Makroelemente Stammlösungen (1-5):

	g/L
1) KH ₂ PO ₄	90
2) KNO ₃	100
3) Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	28
4) CaCl ₂ * 2 H ₂ O	2,5
5) MgSO ₄ * 7 H ₂ O	25

Mikroelemente Stammlösungen (6):

	mg/L
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	3
H ₃ BO ₃	61
Triplex III	9300
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	6900
MnSO ₄ * 7 H ₂ O	169
ZnSO ₄	287
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 2 H ₂ O	12

→ alle Lösungen autoklavieren

KL-Medium für *Pseudokirchneriella subcapitata* (KL = Kuhl-Lorenzen)

500 ml Messzylinder

5 ml von Stammlösung 1-5 } unter der Clean Bench!
0,5 ml von Stammlösung 6 }
(1 M NaOH)

pH 6,8 einstellen, auffüllen bis 500 ml mit Reinstwasser, in 100 ml Kolben (10 Stück) füllen, autoklavieren

ASW (Artificial Sea Water) für *Vibrio fischeri*

	g/L
KCl 10 mmol/L	0,7455
CaCl ₂ * 2 H ₂ O 10mmol/L	1,4702
MgCl ₂ * 6H ₂ O 50 mmol/L	10,165
NaCl 250 mmol/L	14,61

pH 7,2 ±0,2 (mit 0,1 M NaOH), autoklavieren

DSM-Medium für *Arthrobacter globiformis*

	g/L
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	10
Hefeextrakt	5
D(+)-Glukose	5
NaCl	5

pH 7,2 – 7,4 einstellen, in 100 ml Kolben (10 Stück) aufteilen, autoklavieren

1/3 DSM-Medium für *Arthrobacter globiformis*

	g/L
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	3,33
Hefeextrakt	1,67
D(+)-Glukose	1,67
NaCl	1,67

pH-Wert 7,2 ±0,2 einstellen, in 100 ml Kolben (10 Stück) aufteilen, autoklavieren

MOPS-Puffer für die Farblösungen im Süßwasser-Bakterienkontakttest

MOPS Pufferan ≥ 99 % 41,86 g
(C₇H₁₅NO₄S)

VE-Wasser 200 ml

pH-Wert auf 8,2 einstellen (10M NaOH)

steril filtrieren und je 40 ml in Falcon-Röhrchen aliquotieren, bei -20 °C einfrieren

10.4 Materialien und Testdurchführung des Algenwachstumshemmtests mit *Pseudokirchneriella subcapitata* (anwendungsbezogen)

Liste der Materialien (neben dem üblichen Laborbedarf):

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (Stammnummer SAG 61.81), Stammkultur in KL-Medium
- KL-Medium (Herstellung siehe Anhang 10.3)
- Algenstammlösungen (Herstellung 10.3)
- Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von ca. 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ aus der Reinstwasseranlage Arium® pro UV von Sartorius Stedim Biotech GmbH
- 3,5-Dichlorphenol-Stammlösung (10mg/100ml)
- Multimodereader für Mikrotiterplatten „infinite F200 TECAN“ zur Messung der Fluoreszenz
- Computer mit der Software “Microsoft Office Excel 2007” und “Tecan i-control 1.5”
- Zentrifuge „Heraeus Multifuge 1 S-R“ mit Programm für 10.000 xg von Thermo Scientific
- Klimaschrank (BINDER) für Algen bei 20 °C und einer Beleuchtungsstärke zwischen 6000 lx und 10.000 lx
- Schüttler für 24-Well-Mikrotiterplatten
- pH/mV-Messgerät (Seven Easy, METTLER TOLEDO) mit Kalibrierlösungen (pH 4, pH 7 und pH 9), pH-Sonde (InLab®Expert Pro) und Redox-Sonde (InLab®Redox)
- Überkopfschüttler (Heidolph, Reax 2)
- Clean-Bench (MSC Advantage, EN 12469:200, Class II) von Thermo Scientific
- Waage „Precisa“, Ablesbarkeit bis 0,01 g
- Einkanal-Kolbenhubpipetten mit Pipettenspitzen von Thermo Scientific
- Stepper-Pipetten
- Magnetrührer
- Autoklav
- flache, transparente 24-Well-Mikrotiterplatten von costar® (corning Incorporated)
- 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Tubes)
- Abgeschnittene Spritzen zum Abfüllen von 5 ml Sediment

Vorbereitung des Tests:

Das 1-fach-Nährmedium (100 ml) für die Algenvorkultur wird drei bis vier Tage vor dem Test aus folgenden Substanzen (Zusammensetzung der Algenstammlösungen siehe 10.3) hergestellt:

- 98,2 ml steriles Reinstwasser
- 1 ml Algenstammlösung 1 für DIN Medium
- 0,1 ml Algenstammlösung 2 für DIN Medium
- 0,1 ml Algenstammlösung 3 für DIN Medium
- 0,6 ml Algenstammlösung 4 für DIN Medium

Danach wird das 1-fach-Medium über Nacht offen unter der Clean Bench (Reinraumwerkbank) stehen gelassen, um die Lösung ins Gleichgewicht zu bringen. Alternativ kann 30 min sterile Luft durch das 1-fach-Medium geblasen werden.

Am nächsten Tag wird der pH-Wert des 1-fach-Mediums mit verdünnter Salzsäure (HCl) und/oder verdünnter Natronlauge (NaOH) auf $8,1 \pm 0,2$ eingestellt.

Unter der Clean Bench wird zur Herstellung einer exponentiell wachsenden Algenvorkultur 1 ml einer ungefähr 3 Monate alten Algen-Stammkultur in das 1-fach-Medium gegeben. Die Vorkultur wird in einem Klimaschrank bei 20 °C auf dem Magnetrührer unter Dauerbeleuchtung inkubiert.

Einen Tag vor dem Test werden aus den Sedimenten die Eluate vorbereitet. Dafür werden 5 ml Sediment mit 20 ml Reinstwasser in einem Zentrifugenröhrchen versetzt und dunkel im Überkopfschüttler 24 Stunden durchmischt.

Es wird außerdem das 10-fach-Nährmedium (100 ml) aus den folgenden Substanzen hergestellt und über Nacht offen unter der Clean Bench stehen gelassen:

- 82 ml steriles Reinstwasser (autoklaviert)
- 10 ml Algenstammlösung 1 für DIN Medium
- 1 ml Algenstammlösung 2 für DIN Medium
- 1 ml Algenstammlösung 3 für DIN Medium
- 6 ml Algenstammlösung 4 für DIN Medium

Testdurchführung:

Die am Vortag vorbereiteten Sediment-Reinstwasser-Gemische werden 20 min lang bei 10.000 g zentrifugiert, danach werden die Eluate mit einer Pipette entnommen und in ein 50 ml-Tube gegeben. Der pH-Wert der Eluate wird gemessen.

Es muss außerdem der pH-Wert des 10-fach-Mediums mit verdünnter Salzsäure (HCl) und/oder verdünnter Natronlauge (NaOH) auf $8,1 \pm 0,2$ eingestellt werden.

Die Positivkontrolle wird aus 3,5-Dichlorphenol (DCP G1) der Konzentration 10 mg/ 100ml und Reinstwasser im Verhältnis 1:10 hergestellt.

Aus dem am Vortag hergestellten 10-fach-Medium wird durch eine 1:10 Verdünnung mit Reinstwasser ein 1-fach-Medium hergestellt.

Es können nun die 24-Well-Mikrotiterplatten mit Reinstwasser, Eluaten, Positiv-Kontrollen und 10-fach-Medium mit Stepper-Pipetten belegt werden (Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27). Auf der flachen 24-Well-Mikrotiterplatte aus transparentem Kunststoff sind 24 runde Vertiefungen (Wells) in 6 Spalten und 4 Reihen angeordnet. Es gibt eine Kontrollplatte, eine DCP-Platte und für jede zu untersuchende Probe eine weitere Platte. In Abbildung 26 sind die Volumenangaben in μl aufgeführt, die sich jeweils auf alle Wells einer Spalte der Abbildung 25 beziehen. Allerdings beziehen sich die Angaben für die Algen jeweils nur auf die obersten drei Zellen einer Spalte und die Angaben für das 1-fach-Medium nur auf

die letzte Zelle (Blindwert) einer Spalte. Die Volumenangaben in μl in Abbildung 27 gelten für jede Spalte der Kontrollplatte.

	Kontrolle	G1	G2	G4	G8	G16
Algen →						
Algen →						
Algen →						
1-fach-Med. →	BW	BW	BW	BW	BW	BW

Abbildung 25 Belegungsschema der 24-Well-Mikrotiterplatten; Probenplatte und DCP-Kontrollplatte; BW = Blindwert, Med. = Medium, G1, G2, G4, G8, G16 = Verdünnungsstufen

	Kontrolle	G1	G2	G4	G8	G16
Reinstwasser	1600	/	600	1100	1350	1475
Eluat bzw. DCP	/	1600	1000	500	250	125
10-fach-Medium	200	200	200	200	200	200
Algen (nur erste 3 Zeilen)	200	200	200	200	200	200
BW: 1-fach-Medium statt Algen (nur letzte Zeile)	200	200	200	200	200	200

Abbildung 26 Volumenangaben in μl für die Pipettierung der Probenplatten und DCP-Kontrollplatte; BW = Blindwert, G1, G2, G4, G8, G16 = Verdünnungsstufen

Reinstwasser	1600
Eluat bzw. DCP	/
10x-Medium	200
Algen (nur erste 3 Zeilen)	200
BW: 1-fach-Medium statt Algen (nur letzte Zeile)	200

Abbildung 27 Volumenangaben in μl für die Pipettierung der Kontrollplatte (BW = Blindwert)

Nach der Pipettierung von Reinstwasser, Eluaten, DCP-Kontrollen und 10-fach-Medium wird die Ausgangsfluoreszenz der Algenvorkultur mit dem Multimodereader in einer 24-Well-Mikrotiterplatte gemessen. Es wird danach eine 1:10 Algen-Verdünnung aus Algen und 1-fach-Medium hergestellt und von dieser wird ebenso die Fluoreszenz gemessen.

Je nach Ergebnis werden entweder 1-fach-Medium oder Algen-Vorkultur zu der 1:10 Algen-Verdünnung pipettiert und diese wieder gemessen bis die Fluoreszenz 12400 ± 200 entspricht. Die Menge der Zugaben muss aus Erfahrungswerten abgeschätzt werden.

Die Algen-Vorverdünnung wird dann mit 1-fach-Medium 1:5 verdünnt. Die 1:5-Algen-Verdünnung und das 1-fach-Medium können nun in die 24-Well-Mikrotiterplatten pipettiert werden (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

Die Platten werden nacheinander mit dem Multimodereader (Einstellungen siehe Tabelle 32) gemessen und die Fluoreszenz-Ergebnisse zur der Zeit t0 werden durch das Programm Tecan i-control in eine Excel-Datei geschrieben. Die Platten mit Deckel werden danach mit Parafilm umschlossen und in den Klimaschrank bei 20 °C und Dauerbeleuchtung auf den Schüttler bei ca. 250 rpm gestellt.

Die Kontrolle mit Algen wird nochmals in einem Well einer 24-Well-Platte hergestellt und der pH-Wert wird mit einem Indikatorstreifen visuell bestimmt.

Nach einem Tag (t1), nach 2 Tagen (t2) und nach 3 Tagen (t3) wird jeweils zur gleichen Uhrzeit nochmals die Fluoreszenz der Ansätze aller Platten wie bei der t0-Messung gemessen. Vor jeder Messung muss der Inhalt jedes Wells, in dem sich Algen befinden, mit einer Pipette homogenisiert werden. Nach der t3-Messung wird nochmals der pH-Wert in der Kontrolle mit Algen bestimmt.

Die in einer Excel-Datei gespeicherten Ergebnisse werden nach dem Test in die Excel-Vorlage der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg für den Algenwachstumshemmtest kopiert. Dort werden die Fluoreszenz-Werte zu Hemmung in Prozent umgerechnet und alle weiteren Angaben zu den Proben und der Durchführung des Tests eingetragen.

Tabelle 32 Einstellungen im Skript „AT – Tecan i-control“ für den Multimodereader

Plattendefinition	[COS24ft] - Corning Flat Transparent
Schütteln	Dauer: 30 s Amplitude: 1 mm Frequenz: 173,9 U/min Modus: Linear
Warten	Dauer: 1 s
Fluoreszenz-Intensität	Exzitations-Wellenlänge: 465 nm Emission-Wellenlänge: 680 nm Anzahl der Blitze: 50 Messmodus: oben Verstärkung: 58 (manuell) Integrationszeit: 40 µs Verzögerungszeit: 0 µs

10.5 Materialien und Testdurchführung des Leuchtbakterientests mit *Vibrio fischeri* (anwendungsbezogen)

Liste der Materialien (neben dem üblichen Laborbedarf):

- flüssiggetrocknete Leuchtbakterien *Vibrio fischeri* von der HACH Lange GmbH (Art: 30189)
- gefrorene Rekonstitutionslösung (HACH Lange GmbH) in einem 1 ml-Eppi (Eppendorf-Reaktionsgefäß)
- Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von ca. 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ aus der Reinstwasseranlage Arium® pro UV von Sartorius Stedim Biotech GmbH
- Artificial Seawater (ASW) (Herstellung siehe 10.3)
- Natriumchlorid (NaCl)
- 3,5-Dichlorphenol-Stammlösung (10mg/100ml), $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$
- Multimodereader für Mikrotiterplatten „infinite F200 TECAN“ zur Messung der Lumineszenz
- Computer mit der Software “Microsoft Office Excel 2007” und “Tecan i-control 1.5”
- Gefrierschrank zur Lagerung der konservierten Leuchtbakterien und der Rekonstitutionslösung
- Kühlschrank für Temperierung der Materialien und Testansätze bei 15 °C
- Zentrifuge „Heraeus Multifuge 1 S-R“ mit Programm für 10.000 xg von Thermo Scientific
- pH/mV-Messgerät (Seven Easy, METTLER TOLEDO) mit Kalibrierlösungen (pH 4, pH 7 und pH 9), pH-Sonde (InLab®Expert Pro) und Redox-Sonde (InLab®Redox)
- Refraktometer zur Bestimmung der Salinität in ‰
- Überkopfschüttler (Heidolph, Reax 2)
- Waage „Precisa“, Ablesbarkeit bis 0,01 g
- Clean-Bench (MSC Advantage, EN 12469:200, Class II) von Thermo Scientific
- Einkanal- und Mehrkanal-Kolbenhubpipetten mit Pipettenspitzen von Thermo Scientific
- Stoppuhr
- Autoklav
- flache 96-Well-Mikrotiterplatten von costar® (Corning Incorporated) in weiß und grau mit Deckel
- Zentrifugenröhrchen (50ml und 15 ml)
- Reservoir (Behälter der Breite der Mehrkanalpipette) für die Bakterien

Testdurchführung:

Ein oder zwei Tage vor dem Test werden die Eluate aus den Oberflächensedimenten vorbereitet. Die Sedimente werden dafür mit einem Spatel homogenisiert und dann werden 5 ml Sediment mit 20 ml Reinstwasser in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen 24 h über Kopf geschüttelt.

Am Testtag wird zur Fertigstellung der Eluate die Wasserphase von der Sediment-Reinstwasser-Suspension durch Zentrifugation (20 min, 10.000 x g, Programm 1) getrennt. Von den Eluaten werden jeweils 5 ml entnommen und in 15 ml Tubes überführt. Anschließend wird der Salzgehalt mit dem Refraktometer gemessen und falls nötig mit Natriumchlorid (NaCl) bis zu einer Salinität zwischen 2 % und 2,2 % aufgesalzen. Danach wird der pH-Wert gemessen und mit NaOH und/oder HCl auf 6,8 - 7,2 eingestellt. In einem Kühlschrank werden zur Vorkühlung bei 15 °C eine weiße und eine graue 96-Well-Mikrotiterplatte mit Deckel, ein Reservoir und ca. 50 ml ASW (Artificial Sea-Water) hineingestellt. Auf der Mikrotiterplatte sind die 96 Wells (runde Vertiefungen) in 12 Spalten und 8 Reihen angeordnet.

Es wird eine Positivkontrolle aus einer 3,5-Dichlorphenol-Stammlösung (10 mg/ 100ml) hergestellt, indem diese 1:10 mit ASW verdünnt wird.

Zur weiteren Vorbereitung des Tests wird die Bakteriensuspension hergestellt. Zunächst werden die flüssiggetrockneten Leuchtbakterien rekonstituiert, wobei 500 µl einer Rekonstitutionslösung schnell auf die Bakterien pipettiert und nach Mischung der Suspension 5 min bei 15 °C inkubiert werden. Danach werden 4,5 ml ASW zu den Bakterien pipettiert und dieses Gemisch wird mindestens 10 min bei 15 °C inkubiert.

Als nächstes sind die Verdünnungen nach folgendem Pipettierschema (Abbildung 28) in einer transparenten 96-Well Mikrotiterplatte herzustellen. Zunächst wird das ASW pipettiert, danach die Proben-Eluate und Verdünnungen und zuletzt das DCP. Wenn weniger als maximal 8 Proben pro Platte gemessen werden, wird in die übrigen Wells 300 µl ASW pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	G0	G0	G3	G3	G1	G1	G3	G3	G1	G1	G3	G3
B	G1	G1	G4	G4	G2	G2	G4	G4	G2	G2	G4	G4
C	G2	G2	G6	G6	G3	G3	G6	G6	G0	G0	G6	G6
D	G3	G3	G1	G1	G4	G4	G1	G1	G3	G3	G1	G1
E	G4	G4	G2	G2	G0	G0	G2	G2	G4	G4	G2	G2
F	G6	G6	G3	G3	G6	G6	G3	G3	G6	G6	G0	G0
G	G1	G1	G4	G4	G1	G1	G4	G4	G1	G1	G0	G0
H	G2	G2	G6	G6	G2	G2	G6	G6	G2	G2	G0	G0

Abbildung 28 Belegungsschema der 24-Well-Mikrotiterplatte für den Leuchtbakterientest

Verdünnungsstufen:

G0 = 300 µl ASW (graue Markierung)

G1 = 300 µl Probe

G2 = 188 µl Probe + 112 µl ASW

G3 = 125 µl Probe + 175 µl ASW

G4 = 94 µl Probe + 206 µl ASW

G6 = 63 µl Probe + 237 µl ASW

DCP (rote Markierung):

G1 = 300 µl DCP

G2 = 188 µl DCP + 112 µl ASW

Für die Durchführung des Tests werden die Leuchtakterien in das vorgekühlte Reservoir gefüllt. Mit einer Mehrkanalpipette werden 50 µl in jedes Well der weißen vorgekühlten Mikrotiterplatte gegeben. Die Mikrotiterplatte wird 15 min bei 15 °C inkubiert und es wird danach die Ausgangsbiolumineszenz zum Zeitpunkt t0 mit dem Multimodereader gemessen (Einstellungen Multimodereader siehe Tabelle 33). Sofort nach der Ausgangsmessung werden mit einer Mehrkanalpipette 200 µl die Verdünnungen aus allen Wells der transparenten Mikrotiterplatte in die Wells der weißen Mikrotiterplatte mit den Bakterien gegeben. Die transparente Mikrotiterplatte wird 30 min ab Beginn der Pipettierung bei 15 °C inkubiert. Danach wird mit dem Multimodereader die Lumineszenz zum Zeitpunkt t30 gemessen.

Die in einer Excel-Datei gespeicherten Ergebnisse werden nach dem Test in die Excel-Vorlage für den Leuchtbakterientest der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg kopiert. Dort werden die Lumineszenz-Werte zu Hemmung in Prozent umgerechnet und alle weiteren Angaben zu den Proben und der Durchführung des Tests.

Tabelle 33 Einstellungen im Skript „LB-Test – Tecan i-control“ für den Multimodereader

Plattendefinition	[COS96fw] - Corning 96 Flat White
Schütteln	Dauer: 15 s Amplitude: 1 mm Frequenz: 87,6 U/min Modus: Orbital
Lumineszenz	Integrationszeit: 1000 ms Ruhezeit: 1 ms keine Abschwächung

10.6 Materialien und Testdurchführung des Süßwasser-Bakterienkontakttests mit *Arthrobacter globiformis* (anwendungsbezogen)

Liste der Materialien (neben dem üblichen Laborbedarf):

- *Arthrobacter globiformis*, tiefgefroren in 1 ml-Eppi (Eppendorf-Reaktionsgefäß) bei -70 °C
- Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von ca. 0,055 µS/cm aus der Reinstwasseranlage Arium® pro UV von Sartorius Stedim Biotech GmbH
- Benzalkoniumchlorid (BAC), Summenformel: C₂₅H₄₆NCl, Stammlösung (100mg/l)
- 1/3-DSM-Medium (Herstellung siehe 10.3)
- Quarzmehl-SMH, MILLISIL W 4, Quarzwerke
- Resorufin sodium salt (C₁₂H₆NNaO₃) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Resazurin (Redoxindikator, C₁₂H₆NNaO₄) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- MOPS-Puffer (Herstellung siehe 10.3)
- Multimodereader für Mikrotiterplatten „infinite F200 TECAN“ für die Messung der Fluoreszenz
- Computer mit der Software “Microsoft Office Excel 2007” und “Tecan i-control 1.5”
- Brutschrank bei 30 °C mit Schüttler (Edmund Bühler GmbH, TH15 TiMix) für 96-Well-Mikrotiterplatten
- Brutschrank bei 30 °C mit Schüttler für Bakterien-Vorkultur (BINDER)
- pH- und Redox-Potential-Messgerät (Seven Easy Mettler Toledo) mit Sonden und Kalibrierlösungen (pH 4, pH 7 und pH 9)
- Photometer mit Einmalküvetten
- Magnetrührer
- Überkopfschüttler (Heidolph, Reax 2)
- Trockenschrank (Heraeus instruments) für 110°C
- Elektrisches Wasserbad für 80 °C von Memmert
- Clean-Bench (MSC Advantage, EN 12469:200, Class II) von Thermo Scientific
- Vortex (Heidolph, Reax, top)
- Waage „Precisa“, Ablesbarkeit bis 0,01 g
- Waage „sartorius“, MC1 Analytic AC 2010 P für Spurenanalytik
- Einkanal- und Mehrkanal-Kolbenhubpipetten mit Pipettenspitzen von Thermo Scientific
- transparente, flache 96-Well-Mikrotiterplatten von costar® (corning Incorporated)
- Zentrifugenröhrchen (50 ml und 15 ml)
- Einmalröhrchen ohne Deckel, mit rundem Boden
- gasdurchlässige Abdeck-Folie für Mikrotiterplatten
- Reservoirs (Behälter der Breite der Mehrkanalpipetten)
- Stoppuhr

Vorbereitung vor dem Tag der Testdurchführung:

Zwei Tage vor dem Versuchstag werden 10 g der Probe, die mit einem Spatel homogenisiert wurde, und 10 ml Reinstwasser in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und dieses im Überkopfschüttler 2 Tage durchmischt. Zwischendurch muss das Röhrchen eine Stunde unter dem Abzug offen stehen. Es müssen die Trockengewichte der Proben in Prozent ermittelt werden. Diese werden benötigt, um den Feststoffanteil der Quarzmehlsuspensionen, die als Verdünnung verwendet werden, an die jeweilige Probe anzupassen.

Herstellung der Quarzmehlkontrolle: 5 g Quarzmehl plus 15 ml Reinstwasser
Herstellung der Probenverdünnung: Berechnung der Anteile mit Berücksichtigung der Trockengewichte der Proben:
Quarzmehl in g: TG in % / 10
Reinstwasser in ml = $(10 - (\text{TG in \%} / 10)) \text{ ml} + 10 \text{ ml}$
Herstellung der Positiv-Kontrolle - BAC G0: 5 g Quarzmehl + 14 ml Reinstwasser + 1 ml BAC Stammlösung (100mg/l);
(BAC erst am Versuchstag zugeben)

Ein Tag vor dem Test wird nachmittags 1 ml einer *Arthrobacter globiformis*-Stammkultur (Stock) in 50 ml 1/3-DSM-Medium geimpft. Diese wird bei 30 °C 14 bis 16 Stunden auf dem Schüttler bei 160 rpm inkubiert.

Vorbereitung am Tag der Testdurchführung:

Nach 14 bis 16 Stunden werden die Bakterien neu in 50ml 1/3-DSM-Medium geimpft, sodass mit dem Photometer eine optische Dichte (O.D.) von 0,05 gemessen wird. Für den Blindwert wird eine Küvette mit 1/3-DSM-Medium gefüllt und für die Messung der O.D. der Bakterien wird eine Küvette mit Bakteriensuspension gefüllt und gemessen. Die neue Kultur wird so lange bei 30°C und 240 rpm inkubiert, bis sie eine optische Dichte von 0,3 hat.

Um die Verdünnungen BAC G1 (5 mg/l) und BAC G2 (2,5 mg/l) aus der Positiv-Kontrolle BAC G0 (10 mg/l) herzustellen, werden 3 ml Quarzmehlkontrolle in BAC G1 und 1,5 ml Quarzmehlkontrolle in BAC G2 gegeben. Dann werden 3 ml von BAC G0 in BAC G1 gegeben und von dem homogenisierten BAC G1 werden 1,5 ml in BAC G2 gegeben.

Die Proben müssen vor der Verwendung im Test pasteurisiert werden, indem die Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten in einem 80 °C heißen Wasserbad aufgeheizt werden. Danach werden sie in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann werden der pH-Wert und das Redox-Potential der Proben gemessen. Das Redox-Potential muss positiv sein, ansonsten muss die Probe solange belüftet geschüttelt werden, bis sich ein positives Redox-Potential einstellt. Der pH-Wert muss zwischen 6 und 9 liegen (DIN 38412-48:2002-09).

Herstellung der Probenverdünnungen:

Es werden für jede Probe vier Verdünnungsstufen hergestellt, von denen drei im Test verwendet werden. Die Konzentration wird mit jeder Verdünnungsstufe halbiert. Die Verdünnungen werden mit der Quarzmehlsuspension für die jeweilige Probe hergestellt (s.o.).

Folgende Verdünnungen werden nach der neuen Arbeitsvorschrift der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg verwendet:

G0 = Originalprobe (1:1 mit Reinstwasser versetzt)

G1 = 1. Verdünnungsstufe (nur zur Verdünnung, keine Verwendung im Test)

G2 = 2. Verdünnungsstufe

G4 = 3. Verdünnungsstufe

G8 = 4. Verdünnungsstufe

Nach der alten Arbeitsvorschrift werden die Originalprobe G0 und die Verdünnungsstufen G1, G2 und G4 verwendet.

Testdurchführung:

In jedes Well einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte werden nun nach dem Pipettierschema (Abbildung 29) 120 µl der vorverdünnten Proben, der Verdünnungen und der Kontrollen pipettiert, wobei diese zur Homogenisierung vor jeder Pipettierung mit einem Vortex geschüttelt werden. Ebenso werden außerdem Kalibrierungsplatten nach den Pipettierschemata nach Abbildung 30 und Abbildung 31 befüllt. Die Platten werden mit einer gasdurchlässigen Folie abgeklebt.

Wenn die Bakterienkultur auf eine optische Dichte von 0,3 gewachsen ist, werden 40 µl davon in jedes orange markierte Well und 40 µl vom 1/3-DSM-Medium in die grau markierten Wells pipettiert (siehe Abbildung 29, Abbildung 30 und Abbildung 31).

Die Platten werden dann 2 Stunden bei 30 °C und 400 rpm inkubiert.

Nach der Inkubation werden in die Platten die Resazurin- und Resorufin-Farblösungen pipettiert (siehe Abbildung 29, Abbildung 30 und Abbildung 31). Die Lösungen haben eine Konzentration von 45 mg/l und sind mit 1 ml MOPS-Puffer (Herstellung siehe 10.3) auf 100 ml versetzt.

Es wird nun alle 15 Minuten über eine Dauer von 45 Minuten die Fluoreszenz eines jeden Wells der Probenplatte mit dem Multimodereader gemessen. Bei Beginn der Pipettierung der Farblösungen starten die ersten 15 Minuten und die erste Messung bei der Zeit t0 wird sofort nach der Pipettierung durchgeführt. Die nächsten Messungen, zwischen denen die Probenplatte wieder inkubiert wird, erfolgen nach 15 Minuten (t15), nach 30 Minuten (t30) und nach 45 Minuten (t45). Die Fluoreszenz-Werte der Kalibrierungsplatten werden nach der t45-Messung gemessen.

Tabelle 34 Einstellungen im Skript SKT – Tecan i-control für den Multimodereader für Mikrotiterplatten

Plattendefinition	[COS96ft] - Corning Flat Transparent
Temperieren	30 °C
Schütteln	Dauer: 50s Amplitude: 1mm Frequenz: 87,6 U/min Modus: Orbital
Warten	Dauer: 30 s
Fluoreszenz-Intensität	Exzitations-Wellenlänge: 530 nm Emission-Wellenlänge: 590 nm Anzahl der Blitze: 25 Messmodus: oben Verstärkung: 33 (manuell) Integrationszeit: 20 µs

Alle Ergebnisse werden in einer Excel-Datei gespeichert und nach dem Test in die Excel-Vorlage der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie der HAW Hamburg für den Süßwasser-Bakterienkontakttest kopiert. Dort werden die Fluoreszenz-Werte zu Hemmung in Prozent umgerechnet und alle weiteren Angaben zu den Proben und der Durchführung des Tests eingetragen.

	Resazurin	K↓	BAC G0↓	BAC G1↓	BAC G2↓	Pr. 1 G0↓	Pr. 1 G2↓	Pr. 1 G4↓	Pr. 1 G8↓	Pr. 2 G0↓	Pr. 2 G2↓	Pr. 2 G4↓	Pr. 2 G8↓
DSM→	80µl	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW
Bkt →	80µl												
Bkt →	80µl												
Bkt →	80µl												
Bkt →	80µl												
Bkt →	80µl												
Bkt →	80µl												
DSM→	80µl	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW
		G0↑ Pr.3	G2↑ Pr.3	G4↑ Pr.3	G8↑ Pr.3	G0↑ Pr.4	G2↑ Pr.4	G4↑ Pr.4	G8↑ Pr.4	G0↑ Pr.5	G2↑ Pr.5	G4↑ Pr.5	G8↑ Pr.5

Abbildung 29 Pipettierschema, 96-Well-Mikrotiterplatte – Proben (K = Kontrolle, Pr. = Probe, BW = Blindwert, Bkt = Bakterien, DSM = 1/3-DSM-Medium)

	Probe 1↓			
	Resa : Reso = 80µl : 0µl	Resa : Reso = 60µl : 20µl	Resa : Reso = 40µl : 40µl	Resa : Reso = 20µl : 60µl
G0 →				
G2 →				
G4 →				
G8 →				
G0 →				
G2 →				
G4 →				
G8 →				
	Probe 2 ↑			

Abbildung 30 Pipettierschema, 96-Well-Mikrotiterplatte – Kalibrierungsplatte 1 (Resa = Resazurin, Reso = Resorufin)

	Probe 3↓											
	Resa: Reso= 80μl:0μl			Resa: Reso= 60μl:20μl			Resa:Reso= 40μl: 40μl			Resa:Reso=20μl:60μl		
G0 →												
G2 →												
G4 →												
G8 →												
K →												
BAC G0→												
BAC G1→												
BAC G2→												
	Kontrolle/ Positiv-Kontrolle↑											

Abbildung 31 Pipettierschema, 96-Well-Mikrotiterplatte – Kalibrierungsplatte 2 (K = Kontrolle, Resa = Resazurin, Reso = Resorufin)