



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Optimierung des Algenschnelltestverfahrens zur Gewässerüberwachung hinsichtlich
der Parameter Temperatur und Licht

Bachelorarbeit

im Studiengang Umwelttechnik

vorgelegt von

Fabian Schott

2049130

Hamburg-Bergedorf

Am 15. Mai 2015

Gutachterin: Prof. Dr. Carolin Floeter (Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Hamburg)
Gutachterin: Dr. Susanne Wanner (Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg)

Danksagung

Diese Abschlussarbeit wurde am Institut für Hygiene und Umwelt im Bereich der Umweltuntersuchungen durchgeführt. Hiermit möchte ich mich zuerst für die nette Betreuung und Unterstützung bei allen Mitarbeitern des Referats Gewässergüte bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Ing. Michael Lechelt für die Vergabe des Themas, der ausgezeichneten Betreuung sowie der freundlichen Beratung beim Verfassen dieser Arbeit. Danken möchte ich auch Frau Dr. Susanne Wanner und Frau Prof. Dr. Carolin Floeter für die Annahme der Arbeit und die konstruktive Kritik.

Zusammenfassung

Die Süßwasser-Ökosysteme sind vielfältigen Stressfaktoren ausgesetzt. Zu ihrem Schutz werden diese heutzutage neben der Einzelstoffanalytik auch durch sogenannte Biotestverfahren überwacht. Biotestverfahren liefern Aussagen über die Giftigkeit eines Stoffgemisches gegenüber bestimmten Testorganismen. Durch sie lässt sich das Gefährdungspotential von Gewässerverunreinigungen gegenüber den Süßwasser-Ökosystemen abschätzen. Am Institut für Hygiene und Umwelt (HU) in Hamburg wird dabei u. a. ein standardisiertes hauseigenes Algenschnelltestverfahren zur Gewässerüberwachung eingesetzt. Bei diesem statischen Biotest dient die Grünalge *Chlorella vulgaris* als Testorganismus. Anhand des Test-Parameters Fotosynthesehemmung, welcher mittels Puls-Amplituden-Modulation-(PAM)-Fluorometrie bestimmt wird, lässt sich die Anwesenheit fotosynthesehemmender Substanzen in Gewässerproben besonders schnell nachweisen (Magnusson et al. 2008, Lechelt et al. 2011, Chang et al. 2012).

Bei der Anwendung des statischen Algenschnelltestverfahrens wurden bei Messungen von Parallelproben jedoch hohe Abweichungen der messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt. Bei den semi-kontinuierlichen Algentoximeter des HU, die in Messstationen an der Elbe und ihren Nebenflüssen zum Einsatz kommen, konnte dieses Problem dagegen nicht festgestellt werden. Dabei sind Testdurchführung und Testorganismus gleich, der Unterschied liegt lediglich in den Temperatur- und Lichtverhältnissen. Als Ursache für die nicht reproduzierbaren Messungen mit dem Algenschnelltestverfahren wurden inkonsistente Temperatur- und Lichtverhältnisse während der Testdurchführung angenommen. Es sollte nun die Frage beantwortet werden, ob das statische Algenschnelltestverfahren hinsichtlich der Parameter Temperatur und Licht optimiert werden kann. Ebenfalls von Interesse war, ob durch eine Optimierung vergleichbar geringe Schwankungen, wie sie häufig in den Messreihen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter vorliegen, auch beim statischen Algenschnelltestverfahren erreicht werden können. Folgende Arbeitshypothesen sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

- 1) Temperaturschwankungen während der Testdurchführung, auch innerhalb des standardisierten Bereiches von 22 ± 2 °C, beeinflussen das statische Algenschnelltestverfahren.
- 2) Die Lichtintensität, welcher die Algenstammlösung während der Versuchsdauer ausgesetzt ist, beeinflusst das statische Algenschnelltestverfahren.

Um die erste Arbeitshypothese zu untersuchen, wurden Messreihen aufgenommen und miteinander verglichen, die sich hinsichtlich ihrer Proben temperatur voneinander unterschieden. Dabei bewegten sich die Proben temperaturen in dem definierten Bereich von näherungsweise 22 ± 2 °C. Die Reproduzierbarkeit dieser Versuchsreihen war dabei stets vergleichbar hoch. Die erste Arbeitshypothese hat sich demnach nicht bestätigt. Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, dass in dem definierten Temperaturbereich kein signifikanter Einfluss des Parameters Temperatur auf das Messverfahren vorliegt. Es war dennoch festzustellen, dass die Versuchsreihen sich bei unterschiedlicher Proben temperatur statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Somit liegt im Bereich von 22 ± 2 °C ein statistischer und systematischer Einfluss vor, welcher aber die Reproduzierbarkeit und damit die Anwendbarkeit des Verfahrens nicht beeinträchtigt.

Um einen möglichen Lichteinfluss auf das Messverfahren zu untersuchen, wurden Versuchsreihen aufgenommen, bei denen die Algenstammlösungen über den Versuchszeitraum unterschiedlichen

Lichtquellen ausgesetzt waren. Dabei wurden drei Beleuchtungstypen ausgewählt: Künstliche Deckenbeleuchtung, Tageslicht und dunkle Lichtverhältnisse. Die Versuchsreihen unter Einfluss des Tageslichtes zeigten bei höheren Strahlungsintensitäten über ca. $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ deutlich höhere Streuungen der Messwerte im Vergleich zu Versuchsreihen unter nahezu konstanter Laborbeleuchtung und unter dunklen Lichtverhältnissen. Bei Bestrahlung der Algenstammlösung mit geringer und konstanter Kunstlichtintensität ($< 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zeigte sich kein Einfluss auf das Messverfahren. Die zweite Arbeitshypothese hat sich somit bestätigt. Bei den Versuchsdurchführungen unter Tageslicht zeigte sich eine Lichtabhängigkeit des Verfahrens. Demnach sollte in Zukunft ein Einfluss des Tageslichtes auf die Algenstammlösung, z. B. durch abdunkeln, vermieden werden.

Die hohe Reproduzierbarkeit, welche in der Regel mit den semi-kontinuierlichen Algentoximeter des Wassergütemessnetzes Hamburg erzielt wird, konnte in den Laborversuchen mit dem statischen Algenschnelltestverfahren jedoch nicht erreicht werden. Die Messreihen unter dunklen Lichtverhältnissen wiesen, verglichen mit ausgewählten Daten der semi-kontinuierlichen Algentoximeter, im Durchschnitt eine um den Faktor 5 bis 6 höhere Streuung der Messwerte auf. Durch die Berücksichtigung der Lichtverhältnisse beim statischen Algenschnelltestverfahren konnte die Streuung der Messwerte allerdings um den Faktor 4 reduziert werden, was somit die Reproduzierbarkeit deutlich verbesserte.

Abstract

The freshwater -ecosystems are exposed to various stress factors. Nowadays, for their protection, these ecosystems are monitored by so-called bioassays in addition to single -substance analysis. Bioassays enable statements about the toxicity of a mixture of substances towards certain test organisms. By their application, the risk potential of water pollution to freshwater ecosystems can be estimated. At the Institute for Hygiene and Environment (HU) in Hamburg, a standardized on-site algae rapid test method is applied for aquatic monitoring. In this static bioassay the green alga *Chlorella vulgaris* serves as a test organism. On the basis of the test parameter Photosynthesis-inhibition, which is determined by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry, the presence of photosynthesis-inhibiting substances can be detected very quickly (Magnusson et al. 2008, Lechelt et al. 2011, Chang et al. 2012).

However, in the application of the static algae rapid test method, high variations of the metrological photosynthesis activity in samples measured in parallel, were found in dependence on the time. In the semi-continuous algae toximeters of the HU, this problem could not be found. The algae toximeters are semi-continuous bioassay devices and are employed at monitoring stations along the river Elbe and its tributaries. The test execution and test organisms are the same as in the algae rapid test method, the difference exists only in the temperature and light conditions. As a cause for the non-reproducible measurements with the algae rapid test method, inconsistent temperature and light conditions were derived. The question should be answered, if the algae rapid test method can be optimized concerning the parameters temperature and light. It was also of interest, if a reproducibility for measurement series comparable to the good reproducibility of the semi-continuous algae toximeters can be achieved by avoiding temperature and light intensity fluctuations. In this study, the following working hypotheses were investigated:

- 1) Temperature fluctuations during the test execution, also within the standardized range of 22 ± 2 °C, affect the static algae rapid test method.
- 2) The light intensity, which the algae stock solution is exposed to during the experimental period, affects the static algae rapid test method.

To investigate the first working hypothesis, test series were recorded at different sample temperatures and compared with each other. The sample temperatures were within the defined area of approximately 22 ± 2 °C. The reproducibility of the test series was constantly high. Therefore, the first hypothesis has not been confirmed. The test results demonstrated, that there is no significant influence of the temperature parameter on the reproducibility within the defined range. Nevertheless it was noted, that the test series differed statistical significantly from each other due to the temperature differences. Thus, a statistical and systematic influence of the temperature parameter exists in the range of 22 ± 2 °C, but this does not affect the reproducibility and hence the applicability of the method.

To investigate a possible light influence on the measurement method, test series were carried out, in which algae stock solutions were exposed to different light sources during the test periods. Here, three types of lighting conditions were chosen: Artificial ceiling light, natural light and dark conditions. The test series under the influence of natural light, at higher irradiance levels, above $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, showed a significant higher scatter of the measured values compared to the other test series. The variability of the photosynthesis activity values of the test series, where the algae

stock solution was exposed to natural light conditions, was much higher than the variability of the values measured under complete -exclusion of natural light. The reference test series under natural light exclusion, which were carried out at the same time as the natural light test series, indicated almost constant values. An influence of low and constant irradiance ($< 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on the algae stock solutions was not observed. No difference was found between the test series under artificial ceiling lighting and dark lighting conditions with regard to their photosynthesis activity. Both experimental methods showed comparable and reproducible results. Finally, the second hypothesis has been confirmed. In the experimental test series under natural light conditions, a light-dependence of the algae rapid test method was noticed. Therefore, an influence of natural light on the algae stock solutions should be avoided e. -g. by dimming on subsequent tests.

However, the high reproducibility, which is achieved regularly with the semi-continuous algae toximeters of the water quality monitoring network Hamburg, could not be reached with the static algae rapid test method. Compared to selected data of the semi-continuous algae toximeter, the test series under dark conditions had a scatter of the measured values, which was on average 5 to 6 times higher. Certainly, by modifying the light conditions the scatter was reduced by a factor of 4. It was possible to improve the reproducibility in the static algae rapid test method significantly.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Thematischer Hintergrund	5
1.2 Fragestellung, Zielsetzung und Hypothesen	6
1.3 Theoretische Grundlagen	8
1.3.1 Biotestverfahren.....	8
1.3.2 Fotosynthese	10
1.3.3 Fluoreszenz	11
1.3.4 Puls-Amplituden-Modulation-Fluorometrie	12
1.3.5 Das Algenschnelltestverfahren und das Algentoximeter	14
1.3.5.1 Das Algenschnelltestverfahren.....	14
1.3.5.2 Das Algentoximeter	15
1.3.5.3 Einsatz in der Gewässerüberwachung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Allgemeine Versuchsbeschreibung	17
2.2 Testorganismus <i>Chlorella vulgaris</i>	19
2.3 Nährlösung und M4-Medium.....	20
2.4 Geräteliste	21
2.5 Vorversuche: Einfluss der Temperatur auf die Fotosyntheseaktivität.....	21
2.6 Versuchsdurchführung zum Parameter Temperatur	22
2.7 Vorversuche: Einfluss des Lichtes auf die Fotosyntheseaktivität.....	23
2.8 Versuchsdurchführung zum Parameter Licht.....	25
2.8.1 Versuchsdurchführung zum Parameter Tageslicht	25
2.8.2 Versuchsdurchführung zum Parameter Kunstlicht	25
2.9 Vergleich Algenschnelltest - Algentoximeter	26
2.10 Statistische Methoden	27
2.10.1 Shapiro-Wilk-Test	27
2.10.2 Hartley-Test.....	28
2.10.3 Levene-Test	29
2.10.4 Einfaktorielle Varianzanalyse	29
2.10.5 H-Test (Kruskal-Wallis)	30

2.10.6 t - Test.....	31
2.10.7 Welch - Test.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Ergebnisse zum Parameter Temperatur.....	33
3.1.1 Messergebnisse.....	33
3.1.2 Statistische Betrachtung des Parameters Temperatur	36
3.1.2.1 Prüfung auf Normalverteilung: Versuche zum Parameter Temperatur.....	36
3.1.2.2 Prüfung auf Varianzhomogenität: Versuche zum Parameter Temperatur	37
3.1.2.3 Ergebnisse zum Einfluss der Testalgenkultur	38
3.1.2.4 Ergebnisse zum statistischen Temperatureinfluss	39
3.2 Ergebnisse zum Parameter Licht	40
3.2.1 Messergebnisse.....	41
3.2.2 Statistische Betrachtung des Parameters Licht.....	49
3.2.2.1 Prüfung auf Normalverteilung: Versuche zum künstlichen Lichteinfluss	49
3.2.2.2 Prüfung auf Varianzhomogenität: Versuche zum künstlichen Lichteinfluss.....	50
3.2.2.3 Ergebnisse zum Einfluss der Testalgenkulturwahl	51
3.2.2.4 Ergebnisse zum statistischen Kunstlichteinfluss	52
3.3 Ergebnisse des Vergleichs Algenschnelltest - Algentoximeter	53
3.4 Reduzierung der Streuung beim statischen Algenschnelltestverfahren	55
4 Diskussion.....	57
4.1 Bewertung der Arbeitshypothesen	57
4.1.1 Versuche zum Parameter Temperatur.....	57
4.1.2 Versuche zum Parameter Licht	59
4.2 Messtechnische und natürliche Fotosyntheseaktivität.....	60
4.3 Bewertung des Vergleichs Algenschnelltest – Algentoximeter.....	63
4.4 Fazit	64
Literaturverzeichnis.....	65
Webverzeichnis	67
Anhang	68
Selbsterklärung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	-	Analysis of variance
ATP	-	Adenosintriphosphat
bbe	-	biological, biophysical engineering
DIN	-	Deutsche Industrie Norm
EC	-	effective Konzentration
EN	-	Europäische Norm
F_0	-	minimale Fluoreszenz
F_m	-	maximale Fluoreszenz
F_v	-	variable Fluoreszenz
HU	-	Institut für Hygiene und Umwelt
ISO	-	International Standardization Organization
NADP ⁺	-	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	-	reduziertes NADP ⁺
PAM	-	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	-	Photosynthetically Active Radiation
PS	-	Photosystem
WGMN	-	Wassergütemessnetz

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der ermittelten Fotosynthesehemmungswerte [%] aus den Aktivitätswerten des Vorversuches 5.....	6
Abbildung 2: Darstellung der ermittelten prozentualen Fotosynthesehemmungswerte im Algentoximeter der Messstation Bunthaus über mehrere Tage.....	7
Abbildung 3: Wellenlängenspektrum des Lichts	10
Abbildung 4: Anregung eines einzelnen Chlorophyll-Moleküls	11
Abbildung 5: Charakteristische Fluoreszenzemission bei aktiven Algen	13
Abbildung 6: Charakteristische Fluoreszenzemission bei inaktiven Algen	13
Abbildung 7: bbe Küvetten-Fluorometer	15
Abbildung 8: Das semi-kontinuierliche Algentoximeter	15
Abbildung 9: Kultivierung der Grünalge <i>Chlorella vulgaris</i> im Labor des Instituts für Hygiene und Umwelt bei ständiger Beleuchtung und Luftzufuhr zur Durchmischung.....	19
Abbildung 10: Chlorella vulgaris Zellen	20
Abbildung 11: Darstellung der Fotosyntheseaktivitätswerte [%] sowie Geräteinnentemperatur [°C] bei der Fluoreszenzmessung je Probe im Vorversuch 1.....	22
Abbildung 12: Darstellung der Fotosyntheseaktivitätswerte [%] sowie einwirkende Lichtintensität [Lux] auf die Algenstammlösung (Zeitpunkt des Ansetzens) je Probe im Vorversuch 2.....	24
Abbildung 13: Ergebnisse der Temperaturversuche im Box-Whisker-Plot.....	34

Abbildung 14: Ergebnisse der Kunstlichtversuche im Box-Whisker-Plot	42
Abbildung 15: Ergebnisse der Versuchsdurchführungen zum Tageslicht im Box-Whisker-Plot	43
Abbildung 16: Versuchsdurchführungen zum künstlichen Licht - Verlauf der Fotosynthese- aktivitätswerte [%] je Messreihe.....	45
Abbildung 17: Versuchsdurchführungen zum Tageslicht - Verlauf der Fotosynthese- aktivitätswerte [%] je Messreihe.....	46
Abbildung 18: Messreihen zum 1. Tageslichtversuch. Darstellung der Aktivitätswerte [%] sowie der Lichtintensitätswerte [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] zum Zeitpunkt des Ansetzens jeder Probe aus der Algenstammlösung unter Tageslichteinfluss.....	47
Abbildung 19: Darstellung der Aktivitätsmesswerte in Abhängigkeit von der einwirkenden Lichtintensität auf die Algenstammlösung.....	48
Abbildung 20: Verlauf der Fotosynthesehemmungswerte [%] bei den gewählten Messreihen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter und des statischen Algenschnelltestverfahrens.....	54
Abbildung 21: Ergebnisse ausgewählter Vorversuche und Referenzreihen (stat. Algenschnelltest) im Box-Whisker-Plot.	56
Abbildung 22: Hemmung der Fotosynthese [%] in Abhängigkeit der Probentemperatur mit $10\mu\text{g/l}$ Isoproturon als Hemmsubstanz.	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zu den aquatischen Toxizitätstests	9
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien	21
Tabelle 3: Ergebnisse der Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur.....	34
Tabelle 4: Temperaturmittelwerte [°C] der Messreihen zu Versuchsbeginn, Versuchsende und mittlere Temperaturdifferenzen [°C] zwischen Messreihe und zugehöriger Referenzreihe	35
Tabelle 5: Prüfung der Messreihen zum Parameter Temperatur auf Normalverteilung: Anwendung des Shapiro-Wilk-Testes	36
Tabelle 6: Ergebnisse des Hartley – Tests. Paarweiser Varianzvergleich	37
Tabelle 7: Ergebnisse des Hartley – Tests.	38
Tabelle 8: Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA	38
Tabelle 9: Ergebnisse des t-Tests für die Versuchsreihen zum Parameter Temperatur	40
Tabelle 10: Zusammenfassung aller Ergebnisse zum Parameter Licht	41
Tabelle 11: Lichtintensitätsmesswerte [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] der Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur und zu den Kunstlichtversuchen	44
Tabelle 12: Ergebnisse der linearen Regression.....	45
Tabelle 13: Prüfung der Messreihen zum Parameter Kunstlicht auf Normalverteilung: Anwendung des Shapiro-Wilk-Testes	49
Tabelle 14: Ergebnisse des Hartley – Tests (Kunstlichtversuche).	50
Tabelle 15: Ergebnisse des Levene - Tests	51
Tabelle 16: Ergebnisse des H-Tests.	51
Tabelle 17: Ergebnisse des Welch-Tests (Versuchsdurchführung 1) sowie des t-Tests (Versuchsdurchführung 2 bis 4) für die Versuchsreihen zum Parameter Kunstlicht.	52
Tabelle 18: Darstellung der Fotosynthesehemmung [%] (Mittelwert) sowie der Standardabweichung je Referenzreihe und der ausgewählten Messwerte der Algentoximeter	53
Tabelle 19: Darstellung der mittleren Fotosyntheseaktivität [%] und der Standardabweichung je Versuchsreihe. Vergleich Vorversuchsreihen mit Referenzreihen der Lichtversuche	55
Tabelle 20: Versuchsreihe 1 zum Parameter künstliches Licht	68
Tabelle 21: Referenzreihe 1 zum Parameter künstliches Licht	69
Tabelle 22: Versuchsreihe 2 zum Parameter künstliches Licht	70
Tabelle 23: Referenzreihe 2 zum Parameter künstliches Licht	71
Tabelle 24: Versuchsreihe 3 zum Parameter künstliches Licht	72
Tabelle 25: Referenzreihe 3 zum Parameter künstliches Licht	73
Tabelle 26: Versuchsreihe 4 zum Parameter künstliches Licht	74
Tabelle 27: Referenzreihe 4 zum Parameter künstliches Licht	75

Tabelle 28: Versuchsreihe 1 zum Parameter Tageslicht	76
Tabelle 29: Referenzreihe 1 zum Parameter Tageslicht.....	77
Tabelle 30: Versuchsreihe 2 zum Parameter Tageslicht	78
Tabelle 31: Referenzreihe 2 zum Parameter Tageslicht.....	79
Tabelle 32: Versuchsreihe 3 zum Parameter Tageslicht	80
Tabelle 33: Referenzreihe 3 zum Parameter Tageslicht.....	81
Tabelle 34: Versuchsreihe 1 zum Parameter Temperatur	82
Tabelle 35: Referenzreihe 1 zum Parameter Temperatur.....	82
Tabelle 36: Versuchsreihe 2 zum Parameter Temperatur	83
Tabelle 37: Referenzreihe 2 zum Parameter Temperatur.....	83
Tabelle 38: Versuchsreihe 3 zum Parameter Temperatur	84
Tabelle 39: Referenzreihe 3 zum Parameter Temperatur.....	84
Tabelle 40: Versuchsreihe 4 zum Parameter Temperatur	85
Tabelle 41: Referenzreihe 4 zum Parameter Temperatur.....	85
Tabelle 42: Vorversuch 1	86
Tabelle 43: Vorversuch 2	86
Tabelle 44: Vorversuch 3 und 4	87
Tabelle 45: Vorversuch 5 und 6	88
Tabelle 46: Vorversuch 7 und 8	88
Tabelle 47: Vorversuch 9	89

1 Einleitung

1.1 Thematischer Hintergrund

Die Oberflächengewässer haben einen Anteil am weltweiten Wasservolumen von kleiner als einem Zehntausendstel. Dennoch bieten sie 12% aller uns bekannten Arten ein Zuhause (UFZ 2011). Rund 41% aller Fischarten und 25% aller Wirbeltierarten sind auf Süßwasserökosysteme als Lebensraum angewiesen. Durch die vielfältige Nutzung dieser Gewässer durch den Menschen zählen diese Lebensräume jedoch zu den am stärksten beeinträchtigten (UFZ 2011).

Durch ein stetiges Bevölkerungswachstum und suboptimales Management der weltweiten Wasservorräte verschärft sich auch die Lage um die Ressource Trinkwasser. Heutzutage leiden bereits 700 Millionen Menschen unter Wasserknappheit, davon sind 25 Millionen aus diesem Grund auf der Flucht (Petit 2009). Prognosen für das Jahr 2025 gehen davon aus, dass die Zahl der Menschen unter absoluter Wasserknappheit auf 1,8 Milliarden steigen wird (UN 2012). In einigen Regionen zeigen diese Konflikte um die Ressource Wasser auch ein erhöhtes Eskalationspotential „The next war in the Middle East will be fought over water, not politics“ (Boutros Boutros-Ghali 1985).

Durch anthropogene Einflüsse in Form von künstlichen Gewässerbebauungen, Schadstoffeinleitungen oder landwirtschaftlichen Einträgen kam bzw. kommt es zu einer Verschlechterung der Gewässerzustände. Ein Beispiel ist sicherlich der Unfall bei der Sandoz AG aus dem Jahr 1986 in Basel, welcher auch heute noch zu den größten Umweltkatastrophen in Europa zählt. Dieser wurde durch einen Brand in einer Lagerhalle des Chemieunternehmens verursacht, welcher letztendlich dazu führte, dass eine große Menge an Löschwasser mit darin gelösten Chemikalien in den Rhein floss (LUBW 2011). Dabei wurden rund 20 Tonnen einer Mischung aus Insektiziden, Fungiziden und Herbiziden in den Rhein eingetragen (IKSR 2006). Die Folgen waren gravierend: Durch die akute Vergiftung musste die Trinkwasserentnahme aus dem Rhein von der Unfallstelle bis zur Niederlande hinauf eingestellt werden. Weitere Folgen waren ein rot verfärbter Rhein sowie ein massives Fischsterben, das auch bis in den niederländischen Teil des Rheins reichte. Im Bereich der Unfallstelle, wo das Löschwasser in den Rhein gelangte, starb die komplette aquatische Flora und Fauna ab. Außerdem mussten die Sedimente im Unfallbereich aufgrund der hohen Schadstoffbelastung vollständig entfernt werden (IKSR 2006).

Dieser Unfall führte, neben anderen Negativbeispielen, zu einem steigenden Bewusstsein der betroffenen Staaten für die Aufgabe des Menschen im Umweltschutz. Um solche Gefahren frühzeitig zu erkennen und in solchen Fällen dementsprechend frühestmöglich reagieren zu können, werden die Gewässer kontinuierlich und umfangreich überwacht.

Parallel zu der industriellen und wirtschaftlichen Entwicklung hat auch die Verschmutzung der Umwelt durch Chemikalien immer stärker zugenommen. Die Problematik ist uns jedoch erst seit den 70er Jahren bewusster geworden. Heutzutage sind uns rund 5 Millionen an chemischen Verbindungen bekannt, jährlich werden etwa 500 bis 1.000 Chemikalien neu entwickelt (Fent 2013). Davon werden etwa 30.000 Stoffe und 600 Pestizide in großen Mengen hergestellt und verbraucht. Diese Chemikalien können auf unterschiedlichen Wegen in die Umwelt gelangen und unterschiedliche Wirkungen in den Ökosystemen entfalten.

Bei einer derart großen Anzahl an chemischen Verbindungen trifft die Einzelstoffanalytik an ihre Grenzen. Des Weiteren ist durch die Einzelstoffanalytik noch keine allgemeine Aussage über die gesamttoxische Wirkung einer Verbindung auf das Ökosystem zu treffen. Deswegen werden heutzutage zur Unterstützung in der Gewässerüberwachung Biotestverfahren eingesetzt (Fent 2013).

Zu solchen Biotestverfahren, welche am Institut für Hygiene und Umwelt (HU) in Hamburg eingesetzt werden, zählen die semi-kontinuierlichen Algentoximeter und auch ein statisches Algenschnelltestverfahren, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

1.2 Fragestellung, Zielsetzung und Hypothesen

Das statische Algenschnelltestverfahren wurde am HU standardisiert und steht seit Ende 2008 zur Auswertung von Wasserproben auf toxische Bestandteile zur Verfügung. In der Vergangenheit erwiesen sich jedoch des Öfteren Messungen, welche mit dem statischen Algenschnelltestverfahren im Labor aufgenommen wurden, als wenig reproduzierbar. Es wurden Schwankungen der Fotosyntheseaktivitätswerte bei gleichen Probenzusammensetzungen (Blindproben, synthetisches Wasser) mit zunehmender Zeitdauer beobachtet. Hierdurch kam es auch zu einer hohen Streuung der Hemmungswerte, welche aus den Fotosyntheseaktivitätswerten bestimmt werden. Dies ist in Abbildung 1 beispielhaft anhand der Ergebnisse des Vorversuches 5 dargestellt. Die einzelnen Messwerte dieses Vorversuches sind Anhang II, Tabelle 45 zu entnehmen. Eine Beschreibung der Testmethode erfolgt im Kapitel 1.3.4. Puls-Amplituden-Modulation-Fluorometrie.

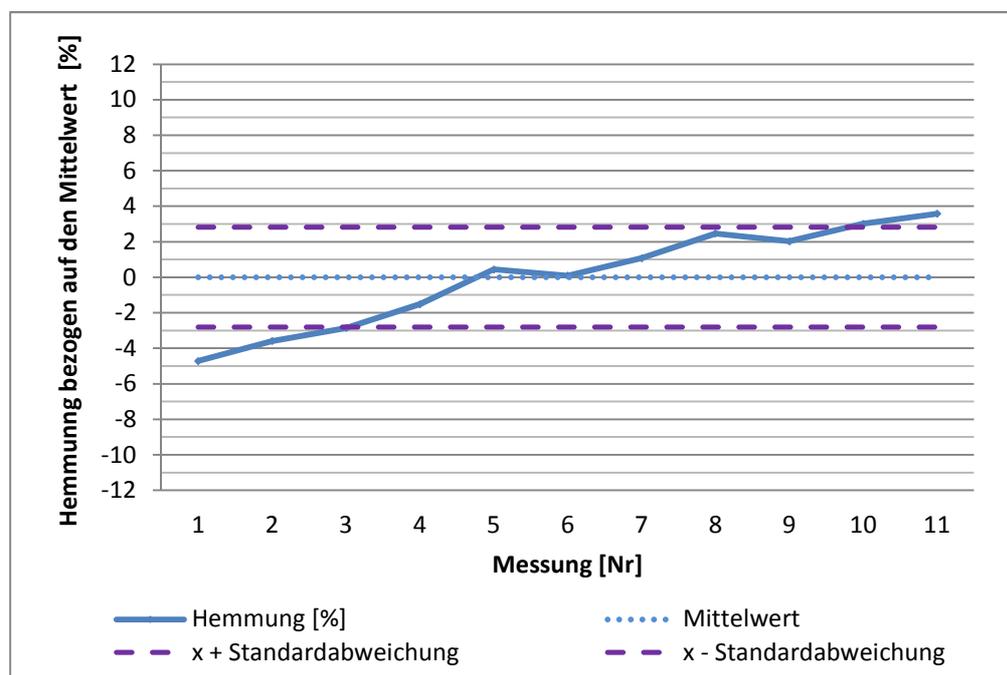


Abbildung 1: Darstellung der ermittelten Fotosynthesehemmungswerte [%] aus den Aktivitätswerten des Vorversuches 5, Institut für Hygiene und Umwelt 2013

In den Vorversuchen wurde der Mittelwert der Reihe als Bezugswert (A_k) gewählt. Bei störungsfreien Messungen mit einer geringen und zufälligen Messwertestreuung sollten theoretisch Hemmungswerte von näherungsweise 0% je Probe erreicht werden, da hierbei stets unbelastete Proben gleicher Zusammensetzung gemessen wurden. Wie zu erkennen, nahm die Hemmung je

Probe in diesem Vorversuch bei gleichbleibenden Probenzusammensetzungen jedoch stetig zu. Dies ist gleichbedeutend mit einem Abfallen der messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte. In dieser Testdurchführung kam es, ohne Einwirkung von Schadstoffen, zu Fotosynthesehemmungen in einem Bereich von -4,7 bis 3,6 %.

Dagegen weisen die semi-kontinuierlichen Algentoximeter in den Messstationen des Wassergütemessnetzes (WGMN) Hamburg überwiegend gut reproduzierbare Hemmungswerte auf, welche sich aus den gemessenen Fotosyntheseaktivitätswerten der Testalgen in einer Kontrolle im Vergleich zu denjenigen in einer realen Gewässerprobe ergeben. Ein beispielhafter Messwerteverlauf ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Reproduzierbarkeit der Messwerte ist somit in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter deutlich höher.

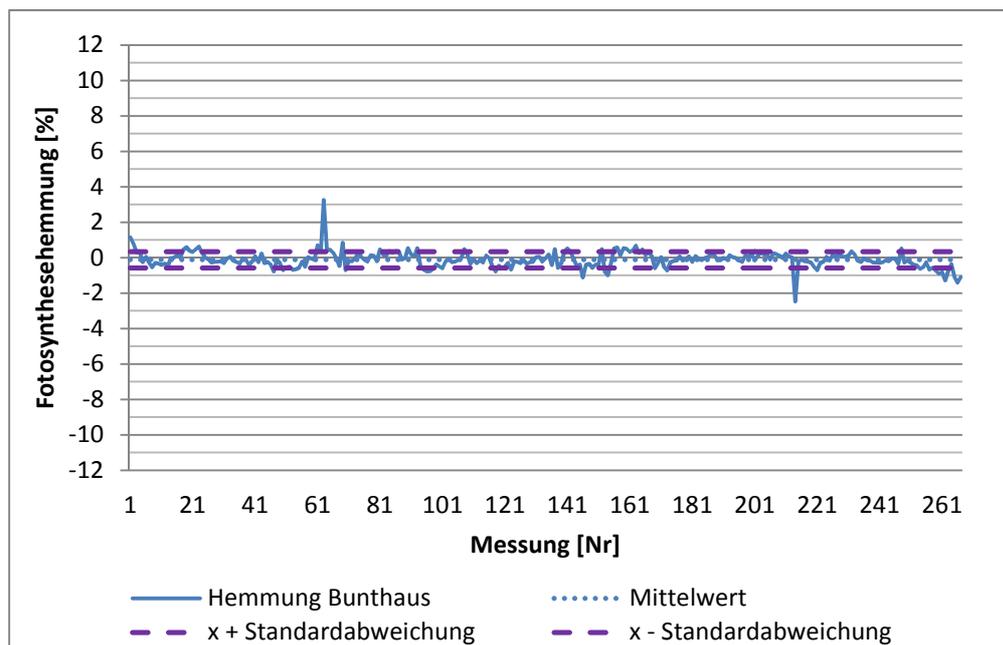


Abbildung 2: Darstellung der ermittelten prozentualen Fotosynthesehemmungswerte im Algentoximeter der Messstation Bunthaus über mehrere Tage, Institut für Hygiene und Umwelt 2013

In den semi-kontinuierlichen Algentoximeter wird die Fotosyntheseaktivität der Testalgen in realen Gewässerproben bestimmt und mit der Aktivität in einer unbelasteten Kontrollprobe (Medium Leitungswasser) verglichen. Theoretisch sollte eine zumindest vergleichbare Reproduzierbarkeit in den Laborversuchen mit dem statischen Algenschnelltest erreicht werden. Die Blindproben des statischen Algenschnelltests werden mit synthetisch hergestelltem Wasser angesetzt. Dies sollte eine deutlich konstantere Zusammensetzung aufweisen als die für die Messungen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter genutzten Gewässerproben. Es stellte sich daher die Frage, warum die messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte in den Vorversuchen mit dem statischen Algenschnelltestverfahren mit zunehmender Testdauer abnahmen, während in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter mit denselben Testorganismen über deutlich längere Zeiträume konstantere Ergebnisse erzielt wurden.

Als potentielle Einflussfaktoren auf das Algenschnelltestverfahren wurden in den Vorversuchen schwankende bzw. nicht standardisierte Temperatur- und Lichtverhältnisse ausgemacht. In dieser Arbeit wurden daher folgende Arbeitshypothesen untersucht:

- 1) Temperaturschwankungen während der Testdurchführung, auch innerhalb des standardisierten Bereiches von 22 ± 2 °C, beeinflussen das statische Algenschnelltestverfahren.
- 2) Die Lichtintensität, welcher die Algenstammlösung während der Versuchsdauer ausgesetzt ist, beeinflusst das statische Algenschnelltestverfahren.

Im Fokus stand also die Frage, ob das statische Algenschnelltestverfahren hinsichtlich der Temperatur- und Lichtverhältnisse optimiert werden kann. Die Zielsetzung war eine Minimierung des Grundrauschens (Streuung der Messwerte), wobei die Streuung der Messwerte aus den semi-kontinuierlichen Algentoximeter als Maßstab genommen wurde.

Außerdem war zu bedenken, dass am HU verschiedene Algenkulturen für die Durchführung des Testes zur Verfügung stehen, welche alle demselben Algenstamm angehören, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten angesetzt werden. Es muss dementsprechend betrachtet werden, ob und wie das Algenschnelltestverfahren von der Wahl der Algenkultur abhängig ist. Daher wurde untersucht, ob sich bei der Verwendung verschiedener Algenkulturen bei sonst identischen Versuchsdurchführungen statistisch übereinstimmende Ergebnisse erzielen lassen. Diese Versuche wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Das Verfahren sollte daher auf eine Beeinflussung durch die Wahl der Testalgenkultur sowie auf eine zeitliche Abhängigkeit hin untersucht werden.

1.3 Theoretische Grundlagen

1.3.1 Biotestverfahren

Die sogenannten Biotestverfahren oder Biotests werden generell in den Bereich der Ökotoxikologie eingeordnet (Fomin 2003). Durch Sie lässt sich eine Aussage über die schädliche Gesamtwirkung einer Umweltchemikalie oder einer Umweltprobe gegenüber bestimmten Testorganismen machen. Dabei werden Testorganismen, welche signifikante Reaktionen auf toxische Substanzen zeigen, unter standardisierten Bedingungen den Umweltproben ausgesetzt.

Die Reaktion der Testorganismen wird mit dem Verhalten bei einer Kontrolle ohne Schadstoffe verglichen (Schwoerbel 2005). Diese Reaktion der Testorganismen auf bestimmte chemische Substanzen in einer Probe wird auch als Testparameter bezeichnet. Sie ist eine sichtbare und/oder messbare Veränderung im Organismus, welcher durch den Probenkontakt direkt oder indirekt hervorgerufen wird (Fomin 2003). Akute und chronische Testparameter, u. a. morphologische, physiologische, biochemische sowie genetische Merkmale, dienen dabei zur Auswertung. Auch plötzliche Verhaltensänderungen der Testorganismen können auf eine verunreinigte bzw. belastete Probe hinweisen. Ziel der Biotestverfahren ist die Bestimmung der Ökotoxizität von einzelnen Chemikalien, Stoffgemischen oder Umweltproben.

Es gibt viele Möglichkeiten diese Biotestverfahren zu kategorisieren. Neben den eben genannten Testparametern lassen sich die Biotests auch nach Aufbau, Durchführung und verwendeten Organismen einteilen. Für die Überwachung von Roh- und Trinkwasser ist eine Kombination solcher Biotestverfahren durchaus sinnvoll, da das Empfindlichkeitsspektrum dadurch wesentlich breiter ist. Die verwendeten Testorganismen springen in unterschiedlicher Art und Weise auf die Stoffgemische an. Somit steigert eine Kombination solcher Biotests, eine sogenannte „Testbatterie“, die

Aussagefähigkeit über das toxische Potential einer Probe bzw. eines Stoffgemisches (Fent 2013). Eine Übersicht über solche gängigen Bio- bzw. Toxizitätstests im aquatischen Bereich wird im Folgenden dargestellt.

Aquatische Toxizitätstests

Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht von bei aquatischen Toxizitätstests eingesetzten Testorganismen verschiedener Trophieebenen. Grünalgen (Primärproduzenten) werden genauso eingesetzt wie Konsumenten verschiedener Ebenen (Wasserflöhe und Fische) und Destruenten (Bakterien). Des Weiteren ist ersichtlich, dass je nach Testorganismus verschiedenste Parameter zur Auswertung dienen können.

Tabelle 1: Übersicht zu den aquatischen Toxizitätstests (Auszug), Fent 2013

Organismus		Prüfparameter, Test
Bakterien	Leuchtbakterien (<i>A. fischeri</i>) Mischpopulation <i>Pseudomonas putida</i>	Biolumineszenz Inhibitionstest beim Klärschlamm Respirations-, Wachstumshemmung
Grünalgen	<i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Raphidocelis subcapitata</i>	Wachstumshemmtest Hemmung der Zellvermehrung Chlorophyll-Fluoreszenz
Muscheln (Bivalvia)	Zebrauschel (<i>Dreiss. polymorpha</i>) Miesmuschel (<i>Mytilus edulis</i>)	Akute und chronische Toxizität
Krebstiere (Crustaceen)	Wasserflöhe (<i>Daphnia magna</i>) Salinenkrebs (<i>Artemia salina</i>)	Immobilisationstest (24h) Reproduktionstest (14, 21 Tage) Akute Toxizität mit Larven (Cysten)
Fische	Forelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Goldorfe (<i>Leuciscus idus</i>) Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)	Akuter Toxizitätstest Verlängerter Toxizitätstest (14 Tage) Frühstadien (Early Life Stage Test) Chron. Toxizität über Lebenszyklus (Life Cycle Test)

Für aquatische Toxizitätstests gelten Mikroalgen als eine gängige Gruppe von Testorganismen. Ein Vorteil liegt in der einfachen Kultivierungsmöglichkeit dieser Organismen. Sie reagieren des Weiteren besonders sensitiv auf schädliche gelöste Chemikalien oder Abwasserinhaltsstoffe, wie in Wachstumshemmtests festzustellen war (Chang et al. 2012). In der Vergangenheit wurden für Biotestverfahren mit Mikroalgen vor allem die Indikatoren Wachstumshemmung, Sauerstoffentwicklung und CO₂-Austausch verwendet (Wang und Freemark 1995). Diese Methoden sind aber, nach heutigem Stand, recht komplex und langsam in Ihrer Durchführung. So auch beispielsweise der standardisierte Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest (DIN EN ISO 8692:2005-01) bei dem erst nach über drei Tagen Aussagen über das Gefährdungspotential eines Probengemisches getroffen werden können.

Dagegen bietet der Parameter Chlorophyll – Fluoreszenz entscheidende Vorteile. Die Chlorophyll a – Fluoreszenzemission von Testalgen ist einfach zu messen, liefert recht schnelle Ergebnisse und ist ein sensitiver Indikator für eine Fotosynthesehemmung von Pflanzen durch Schadstoffe (Marwood et al. 2000). Dieser Parameter dient auch zur Auswertung beim statischen Algenschnelltestverfahren, welches am HU entwickelt wurde und zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist. Das Algenschnelltestverfahren wird routinemäßig als schnelles und flexibles Testverfahren zu toxikologischen Untersuchungen eingesetzt (Lechelt et al. 2011). In diesem statischen Biotestverfahren wird die messtechnische Fotosyntheseaktivität indirekt über Chlorophyll-Fluoreszenzemissionen der Testalgen *Chlorella vulgaris* bestimmt. Diese beiden Prozesse, die Fluoreszenz und die Fotosynthese sowie deren Abhängigkeit voneinander, sollen im Folgenden erläutert werden.

1.3.2 Fotosynthese

Die Fotosynthese stellt die Grundlage für das Leben auf der Erde dar. Bei diesem biochemischen Prozess werden unter Mithilfe von Lichtenergie aus den anorganischen Verbindungen CO₂ und Wasser organische und energiereiche Verbindungen (Kohlehydrate) synthetisiert. Dabei entsteht ebenfalls elementarer Sauerstoff O₂ als Nebenprodukt.

Die Fotosynthese besteht aus zwei nebeneinander ablaufenden Prozessen: Der Lichtreaktion und der sogenannten Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus). Zusammenfassend ergibt sich aus den beiden Teilreaktionen der Licht- und Dunkelreaktion die allgemeine Bruttoreaktionsgleichung der Photosynthese:



Dabei wird nur die Strahlung im sichtbaren Bereich wirksam, da die Fotosynthesepigmente nur diese Art von Strahlung absorbieren können. Man spricht in diesem Zusammenhang von Photosynthetically Active Radiation (PAR), was die fotosynthetisch aktive Strahlung in einem Bereich von ca. 400 bis 700nm beschreibt (Kohl 1988). Auf der Erde erreicht uns ein Sonnenstrahlenspektrum von 300 bis etwa 3000nm, wobei die Bereiche von 300nm bis ca. 380nm (Ultraviolette Strahlung) und von ca. 750 nm bis 3000 nm (infrarote Strahlung) bei diesem photochemischen Prozess nicht wirksam werden.

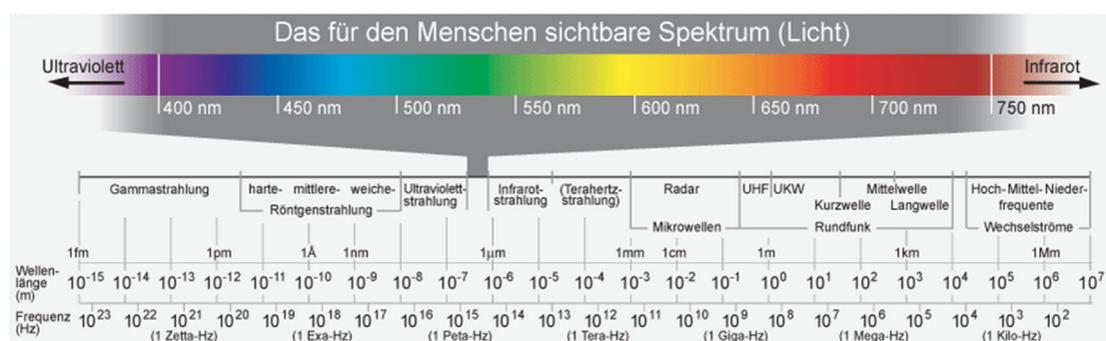


Abbildung 3: Wellenlängenspektrum des Lichts, sengpielaudio.com

Bei Pflanzen findet die Fotosynthese in den Chloroplasten statt. In deren Lichtsammelkomplexen, welche sich in den sogenannten Thylakoidmembranen der Chloroplasten befinden, sind die Fotosysteme (PS) II und I angeordnet. In der Lichtreaktion wird die Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt (Campbell und Reece 2009). Es entsteht Energie in Form von ATP und NADPH. Diese wird im Calvin-Zyklus zur Synthese von Kohlehydraten ($C_6H_{12}O_6$) „verbraucht“. Die Lichtreaktion beginnt dabei mit der Absorption von Lichtquanten durch Pigmente der Fotosysteme PS II und PS I, wodurch Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben werden. Durch die sogenannte Elektronentransportkette, welche die Verbindung zwischen diesen beiden Fotosystemen darstellt, werden die Elektronen entlang der Thylakoidmembran transportiert und später zur Bildung (Reduktion von $NADP^+$) von NADPH benötigt (Preißner 2009).

Dabei bietet dieser Teilprozess Angriffsstellen für bestimmte Stoffe, wie z. B. bestimmte Herbizide. Diese Substanzen hemmen die Fotosynthese, indem sie an den Thylakoidmembranen der Chloroplasten angreifen und den Elektronentransport unterbinden (Heitefuss 2000). Darunter leidet die Energieumwandlung, welche notwendig für den zweiten Teil der Fotosynthese, den Calvin-Zyklus, ist.

1.3.3 Fluoreszenz

Die von der Sonne ausgesendete Strahlungsenergie in Form von Photonen führt, wie in Abbildung 4 ersichtlich, zu einer Überführung von Chlorophyllmolekülen aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand.

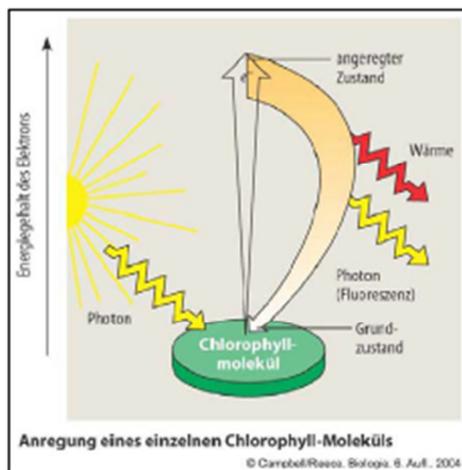


Abbildung 4: Anregung eines einzelnen Chlorophyll-Moleküls, Campbell und Reece 2004

In der Natur streben die Systeme stets den energieärmsten Zustand an. Durch den Übergang von einem angeregten Zustand in das Grundniveau wird Energie freigesetzt. Die aufgenommene Anregungsenergie kann dabei als Wärmestrahlung, Abgabe eines Quants in Form von Fluoreszenzlicht oder als Startenergie für die fotochemische Reaktion wieder abgegeben werden. Nur der Prozess der fotochemischen Reaktion dient der Fotosynthese und somit der Biomasseproduktion (Munk 2009).

Somit wirkt sich eine Hemmung oder Stimulierung der Fotosynthese auch auf die Wärme- und Fluoreszenzemission aus. Aufgrund dieser Tatsachen eignet sich die Emission der Chlorophyll a-Fluoreszenz, welche generell durch das Fotosystem II ausgesendet wird, als Indikator für den Zustand des Fotosyntheseapparates. Eine hohe Fluoreszenz deutet auf geschädigte Vegetationen, eine

niedrige auf produktive Vegetationen hin. Bei intakten fotoautotrophen Organismen beträgt die für die Fotosynthese genutzte Energie rund 30% der aufgenommenen Energiemenge, der geringe Fluoreszenzanteil beträgt hierbei rund 5%. Der größte Anteil der aufgenommenen Energie geht als Wärme wieder „verloren“. Die genauen Anteile an der Energieverwendung der fotoautotrophen Organismen hängen letztendlich von der Höhe der Anregungsenergie ab (Munk 2009).

1.3.4 Puls-Amplituden-Modulation-Fluorometrie

Die Puls-Amplituden-Modulation-Fluorometrie (PAM-Fluorometrie) bietet den Vorteil von äußerst sensitiven Chl-a-Fluoreszenzmessungen, sowohl mit Süß- als auch mit Salzwasser-Phytoplanktonzellen (Schreiber et al. 2002). Verschiedene Fluoreszenzparameter beschreiben dabei die Aktivität der Elektronentransportkette von PS II zu PS I und lassen einen Nachweis von möglichen fotosynthesehemmenden Schadstoffen zu (Schreiber et al. 1986). Diese Methode gibt somit einen Aufschluss über den physiologischen Zustand des Fotosyntheseapparates. Die fluorometrische Methode wendet drei verschiedene Beleuchtungstypen an, um die dadurch induzierte Fluoreszenzkinetik näher zu bestimmen (Juneau et al. 1999). Diese sind moduliertes, aktinisches (fotochemisch wirksames) und sättigendes Licht.

Das Messverfahren beginnt dabei nach einer kurzen dunklen Adaptionphase mit der Messung der konstanten f_0 -Fluoreszenz der Pflanzen. Die Anregung erfolgt dabei mit einer Lichtquelle von sehr geringer Intensität. Um die f_0 -Fluoreszenz zu bestimmen, wird moduliertes Licht von so geringer Anregungsenergie verwendet, dass es in den bestrahlten Pflanzenzellen nicht zum Elektronentransport kommt (Juneau et al. 1999). Diese minimale Fluoreszenz ist also diejenige Energie, welche von den Chl a Molekülen abgegeben wird, bevor diese zum PS II gelangt.

In einer zweiten Phase wird der Sättigungslichtpuls dazu geschaltet. Dieser dient der f_m Bestimmung, also der maximalen Fluoreszenzabgabe bei hoher Anregungsenergie. Diese beiden Parameter dienen beim Algenschnelltestverfahren letztendlich zur Bestimmung der messtechnischen Fotosyntheseaktivität, welche über den Genty-Parameter berechnet wird (Institut für Hygiene und Umwelt 2013):

$$Genty = \frac{f_m - f_0}{f_m} \cdot 100 [\%]$$

Nach dem Genty - Parameter ergibt sich die ermittelte Fotosyntheseaktivität aus dem Verhältnis von minimaler und maximaler Fluoreszenz. Die Differenz zwischen f_0 und f_m wird auch als variable Fluoreszenz f_v bezeichnet. Die Fluoreszenzmessung mit dem bbe Küvetten-Fluorometer besteht aus insgesamt drei Messphasen. Die Parameter f_0 und f_m werden in den ersten beiden Messphasen, die Chlorophyllkonzentration wird dagegen in der dritten Phase durch die f-Messung bestimmt (Institut für Hygiene und Umwelt 2013). Der Testparameter Fotosyntheseaktivität der betrachteten Organismen wird demnach indirekt über eine Fluoreszenzemission dieser bestimmt. Die ausgesendete Fluoreszenz erfolgt nach vorheriger Anregung. Die Anregung der Testalgen in der Probe erfolgt durch LED - Lichtpulse bei einem Wellenlängenspektrum von 470, 525, 570, 590 und 610nm. Die darauf folgenden Fluoreszenzemissionen der Algen liegen bei einer Wellenlänge von 650nm (Institut für Hygiene und Umwelt 2013). In der ersten Messphase, Messung der minimalen

Fluoreszenz f_0 , werden die Testalgen nach vorheriger Dunkeladaptation mit einem schwach gepulsten LED-Licht bestrahlt. Aktive Algen nehmen hier einen großen Teil dieser Energie in ihre fotosynthetischen Zentren auf, während inaktive bzw. geschädigte Algen diese nicht nutzen können. Die überschüssige Energie wird neben der Abgabe von Wärme als Fluoreszenz wieder abgegeben, welche bei den inaktiven Algen somit größer ausfällt (Institut für Hygiene und Umwelt 2013). In der zweiten Messphase, der Messung der maximalen Fluoreszenz, werden die Algen neben dem LED-Licht noch zusätzlich durch ein starkes Laserlicht angeregt. Dies hat zur Folge, dass der Lichtbedarf der aktiven Algen schnell gesättigt ist. Die fotosynthetischen Zentren werden geschlossen, es kann keine weitere Energie aufgenommen werden. Die Anregungsenergie wird deshalb größtenteils als Fluoreszenz wieder abgegeben und als f_m Wert registriert. Allerdings oxidieren die fotosynthetischen Zentren im Verlauf der Messung wieder, sodass erneut Energie aufgenommen werden kann und die Fluoreszenzsignale mit der Zeit abnehmen, wie in Abbildung 5 zu sehen ist. Dies gilt nur für intakte Algen, geschädigte bzw. inaktive Algen zeigen unabhängig von der Intensität der Bestrahlung dieselben hohen Fluoreszenzsignale über die zweite Messphase, wie in Abbildung 6 ersichtlich ist. Letztendlich wird über den Genty – Parameter die messtechnische Fotosyntheseaktivität der Testalgen berechnet.

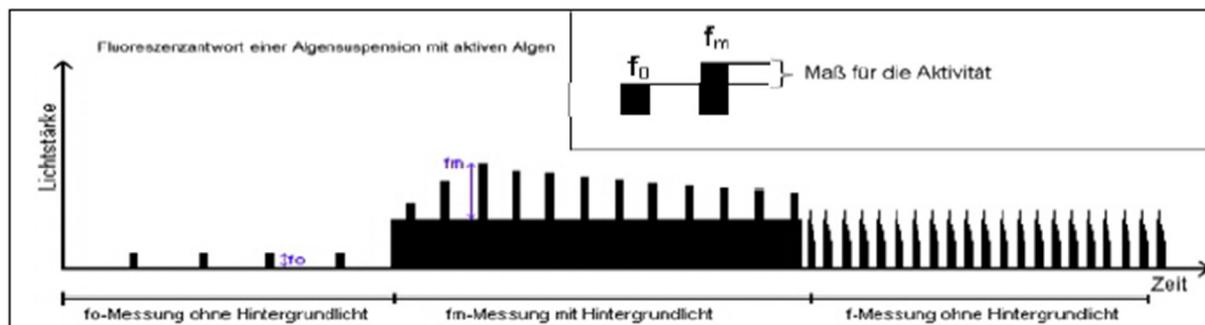


Abbildung 5: Charakteristische Fluoreszenzemission bei aktiven Algen, Institut für Hygiene und Umwelt 2013

Wie in den Abbildungen 5 und 6 zu sehen, ist diese Differenz zwischen den beiden Signaltypen bei aktiven Algen deutlich höher. Inaktive Algen zeigen in beiden Phasen relativ hohe Fluoreszenzantworten, wobei die Differenz zwischen den Signalen gering ausfällt. Dies führt zu einer geringeren messtechnischen Aktivität (Institut für Hygiene und Umwelt 2013).

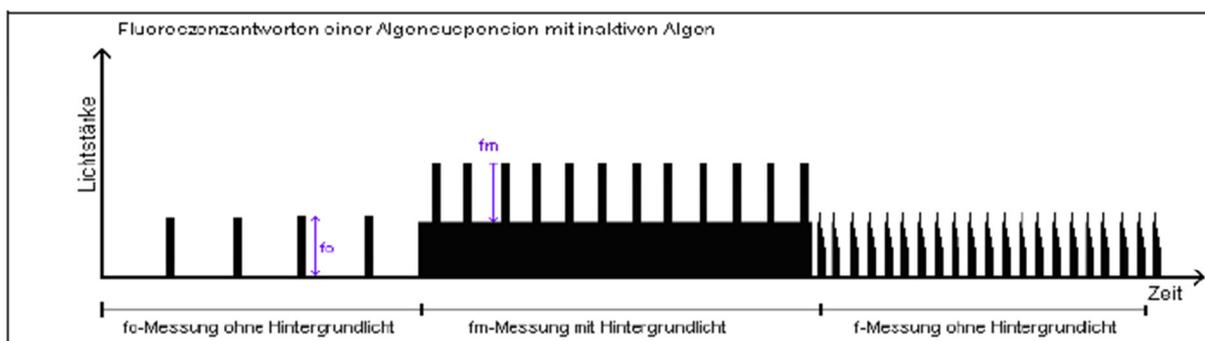


Abbildung 6: Charakteristische Fluoreszenzemission bei inaktiven Algen, Institut für Hygiene und Umwelt 2013

Aus dem Verhältnis von messtechnischer Fotosyntheseaktivität in einer Gewässerprobe und messtechnischer Fotosyntheseaktivität in einer unbelasteten Kontrollprobe kann in der Gewässerüberwachung mit dem statischen Algenschnelltestverfahren die prozentuale Fotosynthesehemmung je Probe über folgende Formel angegeben werden:

$$H_A = \frac{A_K - A_G}{A_K} \cdot \frac{10000}{H_{max}}$$

H_A : Hemmung der Fotosynthese [%]

A_K : gemessene Algenaktivität (Genty) in der Kontrolle

A_G : gemessene Algenaktivität im Testansatz

H_{max} : Maximal erreichbare Hemmung, $H_{max} = 56,26$ (Institut für Hygiene und Umwelt 2013)

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse, welche mit der Durchführung des statischen Algenschnelltestverfahrens erzielt wurden, mit ausgewählten Daten der semi-kontinuierlichen Algentoximeter verglichen. Diese beiden Biotestverfahren sollen im Folgenden beschrieben werden.

1.3.5 Das Algenschnelltestverfahren und das Algentoximeter

Zur Gewässerüberwachung stehen am HU mit dem Algenschnelltestverfahren und dem Algentoximeter zwei Biotestverfahren zur Verfügung, welche mit der Grünalge *Chlorella vulgaris* als Testorganismus im Routinebetrieb eingesetzt werden. Die Auswertung von Gewässerproben erfolgt bei den beiden Testverfahren nach der unter 1.3.4. genannten Methode.

1.3.5.1 Das Algenschnelltestverfahren

Das Algenschnelltestverfahren, welches zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist, ist ein statischer Biotest. Es wird zur Routineüberwachung eingesetzt und soll die Flexibilität der Gewässerüberwachung erweitern. Dieser Test dient hauptsächlich als Ergänzung zu weiteren statischen Biotests im Labor, wie z. B. dem statischen Daphnientest. Das statische Algenschnelltestverfahren ist von Bedeutung, falls unfallbedingt durch einen (semi-)kontinuierlichen Biotest ein Alarm ausgelöst wird. In diesem Fall kann zur Absicherung der Ergebnisse dieser statische Algenschnelltest verwendet werden, da er schnell und flexibel einsetzbar ist. Bei einer Expositionszeit von gerade einmal 15 Minuten und einer Messdauer von zwei bis drei Minuten lässt der statische Algenschnelltest nach weniger als einer halben Stunde eine Einschätzung über die Ökotoxizität einer Gewässerprobe gegenüber von Wasserpflanzen zu.

Das Küvetten-Fluorometer der Firma bbe Moldaenke, mit welchem das statische Algenschnelltestverfahren durchgeführt wird, ist durch seine Maße von 220 · 370 · 400 mm und einem Gewicht von 7,5 kg leicht transportierbar. Hieraus ergibt sich der Vorteil der flexiblen Anwendbarkeit dieses Verfahrens. Der Algenschnelltest lässt sich im Freiland oder an mobilen Messstationen genauso anwenden wie im Labor.



Abbildung 7: bbe Küvetten-Fluorometer, bbe-moldaenke.de

Das Küvetten-Fluorometer wird vor allem zur Chlorophyllbestimmung, zur quantitativen Algenklassifizierung in Gewässerproben und zur Fotosyntheseaktivitätsbestimmung der Algen eingesetzt. Seit Ende 2008 wird er im HU allerdings auch zur Toxizitätsbestimmung verwendet (Lechelt et al. 2011). Als Auswerteparameter dient die Fotosynthesehemmung, wobei als Kontrolle die Fotosyntheseaktivität von Testalgen in einer unbelasteten Probe (M4-Medium) bestimmt wird. Die Proben werden dabei manuell angesetzt.

1.3.5.2 Das Algentoximeter

Die Algentoximeter, welche zu den Elementen des Frühwarnsystems gehören, werden dagegen semi-kontinuierlich betrieben und kommen an ausgewählten Messstationen an der Elbe und ihren Nebenflüssen zum Einsatz. Ein solches Algentoximeter ist in Abbildung 8 dargestellt. In regelmäßigen Abständen werden automatisch entnommene Gewässerproben auf eventuelle toxische Substanzen untersucht.



Abbildung 8: Das semi-kontinuierliche Algentoximeter, Institut für Hygiene und Umwelt

Die Testdurchführung ist dabei identisch zu der des statischen Algenschnelltestverfahrens. Diese erfolgt hierbei allerdings automatisiert und unter definierten Temperatur- und Lichtverhältnissen. Als Auswerteparameter dient ebenfalls die Fotosynthesehemmung der Testalgen in Gewässerproben, wobei als Kontrolle die Fotosyntheseaktivität der Organismen in einer Leitungswasserprobe bestimmt wird.

1.3.5.3 Einsatz in der Gewässerüberwachung

Wie bekannt, reagieren Grünalgen gegenüber fotosynthesehemmenden Substanzen besonders empfindlich (LfU 2013). Aufgrund dieser Tatsache wird das Algenschnelltestverfahren, wie auch die semi-kontinuierlichen Algentoximeter, zum Screening von Gewässerproben auf jene Substanzen verwendet (Lechelt et al. 2011). Zu diesen Verbindungen, die fotosynthesehemmend wirken und aufgrund ihres hohen Verbrauches eine Gefährdung der Gewässer darstellen, gehören insbesondere einige Herbizide. Einer der häufigsten Angriffspunkte der Herbizide ist dabei das PS II in den Chloroplasten der Pflanzenzellen. Die sogenannten phytotoxischen PS-II-Herbizide sind in der Lage, an einen speziellen Proteinbestandteil dieses Fotosystems zu binden und damit den fotosynthetischen Elektronentransport in der Thylakoidmembran zu unterbinden (Schulten 2006). Beispielhaft seien die Herbizide Isoproturon und Diuron genannt, welche zu den am häufigsten nachgewiesenen Substanzen in Flüssen und Gewässern weltweit gehören und für Ihre fotosynthesehemmenden Eigenschaften bekannt sind (Fai et al. 2007).

Aufgrund ihrer ökotoxischen Eigenschaften sind diese Verbindungen nach der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie 2013/39/EU als prioritäre Substanzen eingestuft (Sjollema et al. 2013). Die EC_{50} -Werte nach dem Algenschnelltestverfahren betragen $42,98\mu\text{g/l}$ für die Substanz Isoproturon und $25,55\mu\text{g/l}$ für Diuron (Eis 2007). Bei Konzentrationen von $6\mu\text{g/l}$ (Isoproturon) und $2\mu\text{g/l}$ (Diuron) zeigen sich, bei der Anwendung des Algenschnelltestverfahrens, schon deutliche prozentuale Hemmungen der Fotosyntheseleistung von knapp über 10%. Eine Anwesenheit dieser und ähnlich wirkender Substanzen in Gewässerproben lässt sich somit schon in sehr geringen Konzentrationen mit dem Algenschnelltestverfahren und dem Algentoximeter nachweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Versuchsbeschreibung

Die Durchführung der Versuche orientierte sich an den Rahmenbedingungen für das Algenschnelltestverfahren, welche in der SOP HU411.120 (2013) definiert sind. „*Algenschnelltest zur Ermittlung toxischer Wirkungen von Wasserproben gegenüber Grünalgen mit dem BBE-Küvetten-Fluorometer*“ (Institut für Hygiene und Umwelt 2013).

In dieser Arbeit wurde die Fotosyntheseaktivität von Mikroalgen PAM-fluorometrisch mit einem Küvetten-Fluorometer (AlgaeLabAnalyser, ALA-01-08, bbe Moldaenke) ausschließlich in Blindproben bestimmt. Die Proben wurden angesetzt, indem M4-Medium (siehe 2.3. und Anhang III.) und Testalgen, entnommen aus einer Algenstammlösung, einer Küvette hinzu pipettiert wurden. Außerdem wurde stets ein Rührfischchen zur Durchmischung beigegeben. Anschließend wurden diese Proben auf einem Magnetrührer positioniert. In der folgenden Phase könnten nun mögliche Inhaltsstoffe einer Probe auf die Testalgen einwirken und diese in ihrer Fotosyntheseaktivität, je nach Wirkweise auf die Testalgen, einschränken. Dieser Prozess wird als Inkubation bezeichnet. Eine Hemmung war bei den aufgeführten Versuchen auszuschließen, da lediglich unbelastete Blindproben auszuwerten waren. Im Anschluss an die Phase der Inkubation wurden die Proben vom Magnetrührer in das Messgerät überführt, es erfolgten abschließend die Fluoreszenzmessungen. Die Proben temperatur wurde stets zu Versuchsbeginn und Versuchsende gemessen. Diese muss nach SOP HU411.120 (2013) in einem Bereich von 22 ± 2 °C liegen.

Es wird nun das allgemeine Vorgehen beschrieben, welches bei den Versuchen zu den Parametern Licht und Temperatur identisch war. Nach der SOP sind für eine gültige Versuchsdurchführung Chlorophyllkonzentrationen in den Blindproben von 100 ± 20 µg/l gefordert. Des Weiteren muss die Aktivität der ausgewählten Testalgenkultur überprüft werden, welche über 60% betragen muss. Diese Anforderungen waren vor Versuchsbeginn zu kontrollieren und weiterhin einzuhalten.

Kontrolle der Algenkultur

Zu Beginn erfolgte die Auswahl einer Testalgenkultur. Dieser Testalgenkultur wurde eine geringe Menge an Stammlösung entnommen und eine Küvette für den ersten Vorversuch vorbereitet. Diese Glasküvette wurde mit 25 ml M4-Medium und einem Rührfischchen versehen. Anschließend wurde ein Testalgenvolumen von 100 µl hinzu pipettiert. Schließlich wurde diese Probe in das Fluorometer überführt, hier erfolgten die Fluoreszenzmessungen. Betrug die ermittelte Fotosyntheseaktivität der Testalgen über 60%, konnte die Testalgenkultur verwendet werden, sonst musste eine andere Testalgenkultur gewählt werden. Das zu pipettierende Volumen an Algenstammlösung je Probe richtet sich nach der im Vorversuch gemessenen Chlorophyllkonzentration. Dies wird an folgendem Beispiel deutlich:

In einem Vorversuch wurde eine Küvette mit 25 ml M4-Wasser befüllt und 100 µl der entnommenen, bereits mit Nährmedium verdünnten, Algenstammlösung hinzu pipettiert. Die anschließende Fluoreszenzmessung ergab eine Gesamtchlorophyllkonzentration von 105,30 µg/l. Aus diesen Daten kann mit folgender Rechnung aufgrund der Proportionalität von Volumen und Konzentration das Volumen bestimmt werden, mit dem eine Konzentration von rund 100 µg/l in der Probe erreicht werden kann:

$$\frac{100 \mu l}{105,30 \mu g/l} = \frac{x \mu l}{100 \mu g/l}$$

$$x = \frac{100 \mu l \cdot 100 \mu g/l}{105,30 \mu g/l} = 94,97 \mu l$$

100 μ l an Algenstammlösung führten zu einer Konzentration in der Probe von 105,30 μ g/l. Also beträgt das zu pipettierende Volumen an Algenstammlösung rund 95 μ l, um eine Konzentration in der Blindprobe von annähernd 100 μ g/l zu erhalten. Generell wurden zwischen 80 und 150 μ l, je nach (verdünnter) Algenstammlösung pipettiert. Bei hoch konzentrierten Algenstammlösungen wurden jene vor Versuchsbeginn mit der Nährlösung nach Chou (siehe Anhang IV.) verdünnt. Nach dem jeweiligen Vorversuch konnte mit der Durchführung der Versuchsreihen begonnen werden.

Ansetzen der Probe

Zum Ansetzen einer Probe wurde das berechnete Volumen an Algenstammlösung aus dem Vorratsgefäß in eine 25 ml Glasküvette pipettiert, welche zuvor mit 25 ml M4-Medium und einem Rührfisch zur Durchmischung versetzt wurde.

Die Algenstammlösungen waren dabei nicht auf dem Magnetrührer postiert, um eine mögliche Erwärmung der Algenstammlösungen durch Abwärme, und somit eine deutliche Änderung der Versuchsbedingungen, zu verhindern. Um die Stammlösung vor dem Ansetzen einer Probe in eine näherungsweise homogene Form zu bringen, wurde diese kurz geschwenkt. Nach dem Ansetzen einer Probe erfolgte die Bestimmung einer Vergleichsprobentemperatur, um die annähernde Probentemperatur beim Ansetzen (Testbeginn) zu protokollieren. Diese entsprach näherungsweise der Raumtemperatur.

Inkubation

Nun wurden die angesetzten Proben auf dem Variomag Magnetrührer zur Inkubation positioniert. Als Inkubation wird der Prozess bezeichnet, bei dem mögliche Probenbestandteile auf die Testalgen einwirken können. Die Inkubation wird dabei im Dunkeln durchgeführt, um annähernd konstante Lichtbedingungen herzustellen. Die Inkubationsdauer beträgt 15 Minuten, da nach dieser Zeitdauer näherungsweise der maximale Effekt von fotosynthesehemmenden Substanzen auf die Testorganismen erreicht ist (Eis 2007). Dieser Vorgang erfolgte auf dem Magnetrührer, um einer Sedimentation der Testalgen in der Probe entgegen zu wirken und eine optimale Durchmischung der Probe zu garantieren.

Messvorgang

Nach der 15minütigen Inkubation wurde die jeweilige Probe vom Magnetrührer direkt in das Küvetten-Fluorometer überführt. Es erfolgte nun PAM-fluorometrisch die Chlorophyllkonzentrations- sowie Aktivitätsbestimmung der Testalgen in der Probe. Der Messvorgang dauerte dabei nur wenige Minuten. Die Fotosyntheseaktivität wird dabei über den Genty - Parameter ermittelt. Nach dem Messvorgang wurden die Proben umgehend aus dem Küvetten-Fluorometer genommen und deren Temperatur gemessen. Mit der Vergleichstemperatur der Proben beim Ansetzen und der Proben temperatur nach der Fluoreszenzmessung kann die Erwärmung der Probe über den gesamten Messzyklus bestimmt werden ($\Delta T = T_2 - T_1$). Die Raumtemperatur, welche relativ konstant bleiben sollte, wird im Untersuchungsraum 322 durch ein digitales Thermometer regelmäßig aufgenommen. Je nach Versuchsdurchführung zu den Parametern Temperatur und Licht wird die PAR (Photosynthetically Active Radiation), welche auf die Algenstammlösung einwirkt, gemessen. Die Bestrahlungsstärke ist dabei definiert als einfallende Energiemenge pro Zeit und Fläche. Üblicherweise wird die PAR in der Einheit $\mu\text{mol an Photonen pro Quadratmeter und Sekunde}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angegeben (Figueroa et al. 2013).

2.2 Testorganismus *Chlorella vulgaris*

Als Testorganismus für das statische Algenschnelltestverfahren dient die einzellige Grünalge *Chlorella vulgaris* (Stamm SAG-211-19) der Ordnung Chlorococcales (Institut für Hygiene und Umwelt 2013). Diese Algenart wird vom Pflanzenphysiologischen Institut Göttingen bezogen und am HU, wie in Abbildung 9 ersichtlich, kultiviert. Die Testorganismen stehen stets für Laborzwecke zur Verfügung. Regelmäßig wird eine neue Algenkultur angesetzt.

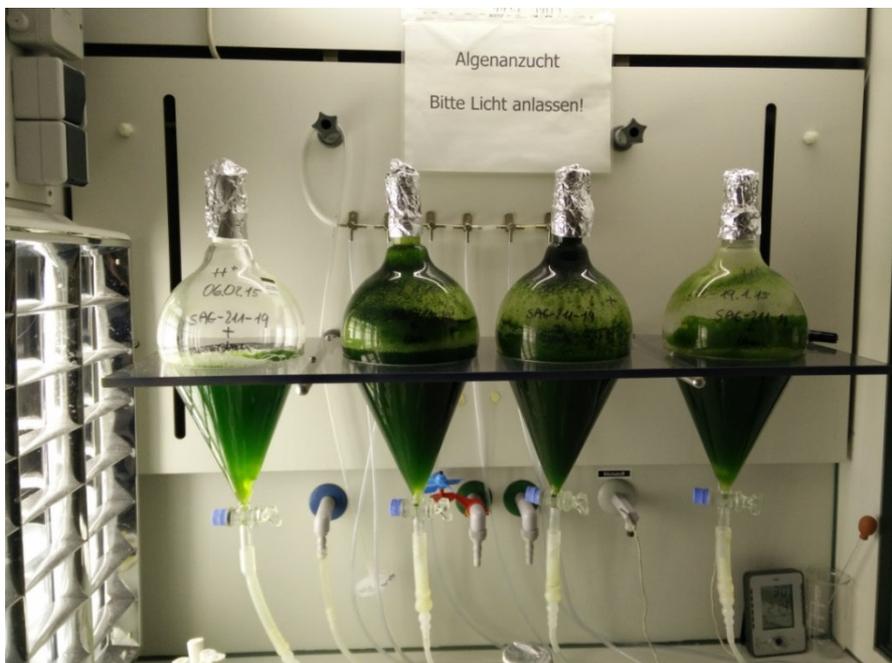


Abbildung 9: Kultivierung der Grünalge *Chlorella vulgaris* im Labor des Instituts für Hygiene und Umwelt bei ständiger Beleuchtung und Luftzufuhr zur Durchmischung, eigene Fotografie

Chlorella vulgaris ist eine einzellige coccale Alge, welche zu den einfachsten Formen der Chlorophyceen zählt. Da es sich bei ihr um eine unbegeißelte Alge handelt, ist sie unbeweglich. Generell finden sich die einzelligen Grünalgen als Plankton im Süßwasser wieder (Vogel und Angermann 1996), sie sind charakteristisch für eutrophe Gewässer (Komarek 1983).

Die Alge *Chlorella vulgaris* hat einen Durchmesser von rund 5 bis 10 µm und ihre fotosynthetisch aktiven Pigmente lassen sich mit denen von höheren Pflanzen vergleichen. (Fomin 2003). Ihre besonders starre Zellwand schützt die Alge vor fremden Organismen und rauen Umweltbedingungen (Safi et al. 2014). Sie gilt darüber hinaus als besonders „effektive“ Pflanze, da sie über einen überdurchschnittlichen Trockenmasseanteil an Chlorophyll (bis zu 4% der Trockenmasse) verfügt (chlorella-vulgaris.eu). Die außergewöhnlich hohen Fotosyntheseraten, welche sie erreicht, lassen sich nicht nur auf ihren hohen Chlorophyllanteil zurückführen, auch ihre perfekte kugelige Form bedingt diesen Vorteil gegenüber anderen Algen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die hohe Wachstumsrate. So teilt sich eine Mutterzelle der *Chlorella vulgaris* bei optimalen Bedingungen in nur 12 bis 16 Stunden je nach Kulturbedingungen in 4 bis 16 Tochterzellen (chlorella-vulgaris.eu).

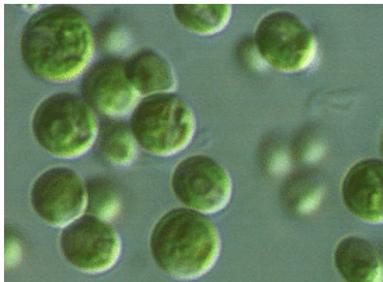


Abbildung 10: *Chlorella vulgaris* Zellen, www.nies.go.jp/biology/mcc/class/Chlorella.html

Durch das exponentielle Wachstum bzw. die außergewöhnlich hohe Wachstumsrate dieser Algenart eignet sie sich besonders zur Kultivierung im Labor. Aufgrund der dauerhaften Verfügbarkeit sind stets auch kurzfristig Toxizitätsuntersuchungen möglich.

2.3 Nährlösung und M4-Medium

Für die Versuchsdurchführungen wurde M4-Medium zum Ansetzen der Proben verwendet (siehe Anhang III.). M4-Medium oder M4-Wasser ist demineralisiertes Wasser, welches mit bestimmten Zusätzen gemäß AQS-Merkblatt P-9/2 (2000) hergestellt wird. Durch die Verwendung von M4-Wasser soll die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse erhöht bzw. gewährleistet werden, da dieses Medium aus derselben Herstellung theoretisch immer dieselbe Zusammensetzung vorweist (Eis 2007). Die verwendeten Testalgen wurden vor den Versuchsdurchführungen gelegentlich mit dem Nährmedium nach CHOU verdünnt (siehe Anhang IV.), welches auch zur Kultivierung der Grünalgen verwendet und regelmäßig am HU neu angesetzt wird.

2.4 Geräteliste

Für die Versuchsdurchführungen zu den Parametern Temperatur und Licht wurde folgende Laborausstattung verwendet:

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Typ
Küvetten-Fluorometer	bbe Moldaenke, AlgaeLabAnalyser, ALA-01-08
Softwareprogramm	bbe Moldaenke, bbe++, Version 2.3.2
Magnetrührer	Variomag, Telesystem, HP 60
Temperierbarer Magnetrührer	Ikamag, RCT
Leitfähigkeitssensor	WTW, cond 330i
Photometer	LI-COR, LI-185B
Leuchtstoffröhren	Philips, Master TL5 80W/830 HO
25 ml Glasküvetten	OG Héllma
Raumtemperaturmessgerät	Tinytag, Talk 2
Bechergläser	SCHOTT Glas
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Vollpipette, 25ml	Hirschmann Laborgeräte

2.5 Vorversuche: Einfluss der Temperatur auf die Fotosyntheseaktivität

In den Vorversuchen zeigte sich häufig, neben einer stetigen Abnahme der prozentualen Fotosyntheseaktivitätswerte, ein Anstieg der Geräteinnentemperatur der verwendeten Geräte sowie eine Zunahme der Proben temperatur über den Testzeitraum. Eine Erwärmung der Proben durch die Abwärme der Versuchsgeräte wurde durch Praktika am HU nachgewiesen. In Abbildung 11 sind die aufgenommenen Fotosyntheseaktivitätswerte von nacheinander gemessenen Blindproben gleicher Zusammensetzung sowie die Geräteinnentemperatur des Küvetten - Fluorometers bei der jeweiligen Fluoreszenzmessung des Vorversuches 1 dargestellt. Eine genauere Auflistung der Messwerte ist Tabelle 42 (Anhang II.) zu entnehmen.

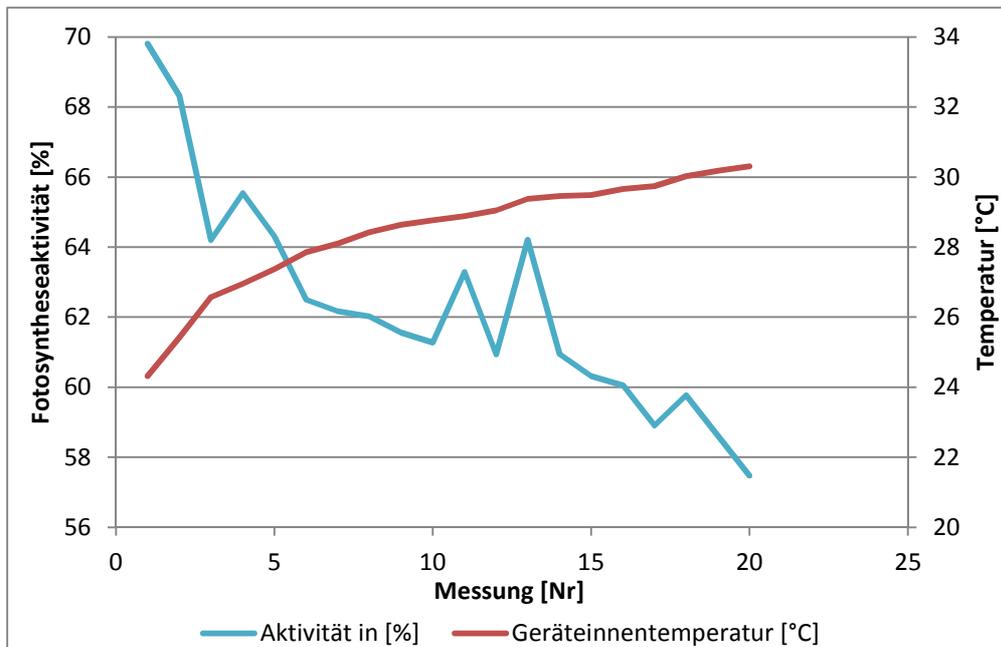


Abbildung 11: Darstellung der Fotosyntheseaktivitätswerte [%] sowie Geräteinnentemperatur [°C] bei der Fluoreszenzmessung je Probe im Vorversuch 1, Institut für Hygiene und Umwelt 2013

Hierbei ist deutlich zu sehen, dass die messtechnische Fotosyntheseaktivität von zu Beginn 69,8% auf 57,5% gegen Versuchsende abfällt. Dieser hohen Aktivitätsabnahme über den Versuchszeitraum steht eine Zunahme der Geräteinnentemperatur um ca. 6 °C gegenüber. Bei diesen deutlichen Temperaturunterschieden war ein negativer Einfluss auf das Messverfahren naheliegend. Durch eine stetige Änderung der Temperaturverhältnisse, verbunden mit einer unterschiedlichen Beeinflussung der Testorganismen in den voneinander unabhängigen Proben, schienen die hohen Messwerteschwankungen plausibel zu sein.

2.6 Versuchsdurchführung zum Parameter Temperatur

Um das statische Algenschnelltestverfahren auf eine mögliche Temperaturabhängigkeit im praxisrelevanten Bereich von 22 ± 2 °C zu untersuchen, wurden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Probetemperaturen aufgenommen. Die Fotosyntheseaktivität der Testalgen bei den gewählten Temperaturen sollte im Anschluss betrachtet werden. Es erfolgten insgesamt vier Versuchsdurchführungen, wobei je Versuchsdurchführung zwei Messreihen parallel durchgeführt wurden. Jede Messreihe bestand aus fünf Proben. Für das Ansetzen der Proben beider Messreihen wurde dieselbe Algenstammlösung verwendet, welche während der Versuchsdurchführung dem künstlichen Deckenlicht (Leuchtstoffröhren, Philips Master TL5 80W/830 HO) ausgesetzt war. Die einwirkende Lichtintensität auf die Algenstammlösung wurde zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende mit dem Photometer LI-185B gemessen. Die Proben einer Messreihe wurden allesamt bei Raumtemperatur angesetzt, während die Proben der zweiten Messreihe (Referenzreihe) bei einer konstanten Temperatur von 24,0 °C angesetzt wurden. Dies ist die nach SOP HU411.120 (2013) höchste akzeptable Probetemperatur. Des Weiteren erfolgt die Kultivierung und Aufbewahrung der Testalgen in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter im Fermenter ebenfalls bei 24,0 °C.

Um die gewählte Temperatur von 24,0 °C vor dem Ansetzen zu erreichen, wurden die Proben jeweils mit einem temperierbaren Magnetrührer erwärmt. Die Temperaturen wurden mit dem Leitfähigkeitssensor, welcher auch für Temperaturmessungen eingesetzt wird, protokolliert.

Um den Temperaturverlauf zu erfassen und gleichzeitig die Proben durch eine Temperaturmessung nicht zu beeinträchtigen bzw. zu verunreinigen, wurde die Temperatur zu Versuchsbeginn bei einer gleichbehandelten Kontrollprobe bestimmt. Erst nach der Fluoreszenzmessung der mit Testalgen versetzten Probe wurde diese zur Temperaturmessung verwendet, um den Temperaturanstieg der Proben über den gesamten Messzyklus festzuhalten. Es wurden somit pro auszuwertender Probe zwei Proben angesetzt. Diese Vorgehensweise beruhte auf der Annahme, dass Probe und Kontrollprobe näherungsweise gleiche Temperaturverläufe aufweisen.

Die Proben der Versuchsreihen bei Raumtemperatur wurden nach dem Ansetzen direkt auf den Variomag Magnetrührer, auf dem alle Proben zur Inkubation postiert wurden, gestellt. Die Küvetten für die Referenzreihe wurden zuerst auf dem temperierbaren Magnetrührer postiert. Nach erfolgter Erwärmung wurden diese vom Magnetrührer genommen und die Temperatur der Kontrollprobe bestimmt. War bei dieser eine Temperatur von 24,0 °C erreicht, wurde die andere Küvette mit dem berechneten Testalgenvolumen versehen (ca. zwischen 80 – 150 µl) und beide Küvetten auf dem Variomag Magnetrührer zur Inkubation postiert.

Nach der 15minütigen Dunkelinkubation wurde die Probe, welche mit den Testalgen versehen wurde, umgehend in das Fluorometer überführt und gemessen. Parallel zur folgenden Fluoreszenzmessung wurde die Temperatur der Vergleichsprobe (ohne Testalgen) gemessen, um die Temperaturentwicklung auf dem Variomag Magnetrührer festzuhalten.

Die Referenzreihen mit einer Proben temperatur von 24°C (zu Versuchsbeginn) wurden hinsichtlich der Messgröße Fotosyntheseaktivität den Messreihen gegenübergestellt, welche unter „normalen“ Laborbedingungen, d.h. unter Raumtemperatur, angesetzt wurden. Auch bei den Versuchsreihen unter Raumtemperatur wurden je Messzyklus zwei Proben mitgeführt, wobei wieder eine der Temperatureaufzeichnung diente, während die eigentliche Probe mit den Testalgen versehen wurde und fluorometrisch ausgewertet wurde. Die Aufnahme der Raumtemperatur erfolgte kontinuierlich mit dem digitalen Thermometer. Um einen Anstieg der Gerätetemperaturen zu minimieren, wurden die Versuchsgeräte allesamt ausreichende Zeit vor Versuchsbeginn eingeschaltet.

2.7 Vorversuche: Einfluss des Lichtes auf die Fotosyntheseaktivität

Die einzelnen Proben, welche nach dem statischen Algenschnelltestverfahren ökotoxikologisch ausgewertet werden sollen, werden alle mit einem bestimmten Volumen an Testalgen aus ein und derselben Algenstammlösung versetzt. Möglicherweise kommt es durch die Art der Lichtquelle sowie deren Strahlungsintensität, welche während der Versuchsdurchführung auf die Algenstammlösung einwirkt, zu einer Beeinflussung der Testorganismen, auch wenn diese vor der Messung 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und kurze Zeit im Messgerät dunkel adaptiert wurden.

Dieser mögliche Einflussfaktor könnte ebenfalls zu den abnehmenden Fotosyntheseaktivitätsmesswerten in den Vorversuchen (siehe Anhang II. Tabelle 42 – 47) geführt haben. Da die Lichtverhältnisse während der Versuchsphasen „Inkubation“ und „Messung“ im Fluorometer für alle

Proben konstant waren, wurde im Folgenden nur der Lichteinfluss auf die Algenstammlösungen während der Versuchsdurchführungen betrachtet.

In Vorversuch 2 wurden unabhängige Proben gleicher Zusammensetzung hintereinander angesetzt und gemessen, wobei die auf die Algenstammlösung einwirkende Lichtintensität in drei Phasen (Messung 1-5, 5-10, 11-15) variiert und aufgenommen wurde. Die Temperaturverhältnisse wurden dabei näherungsweise konstant gehalten. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, kam es dabei ab einer gewissen Intensität zu einer Abnahme der messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte. Eine Auflistung aller Messwerte dieses Vorversuches 2 ist Tabelle 43 (Anhang II.) zu entnehmen. In den weiteren aufgelisteten Vorversuchen ist der Lichteinfluss auf die Algenstammlösung nicht definiert und beachtet und somit auch nicht protokolliert worden.

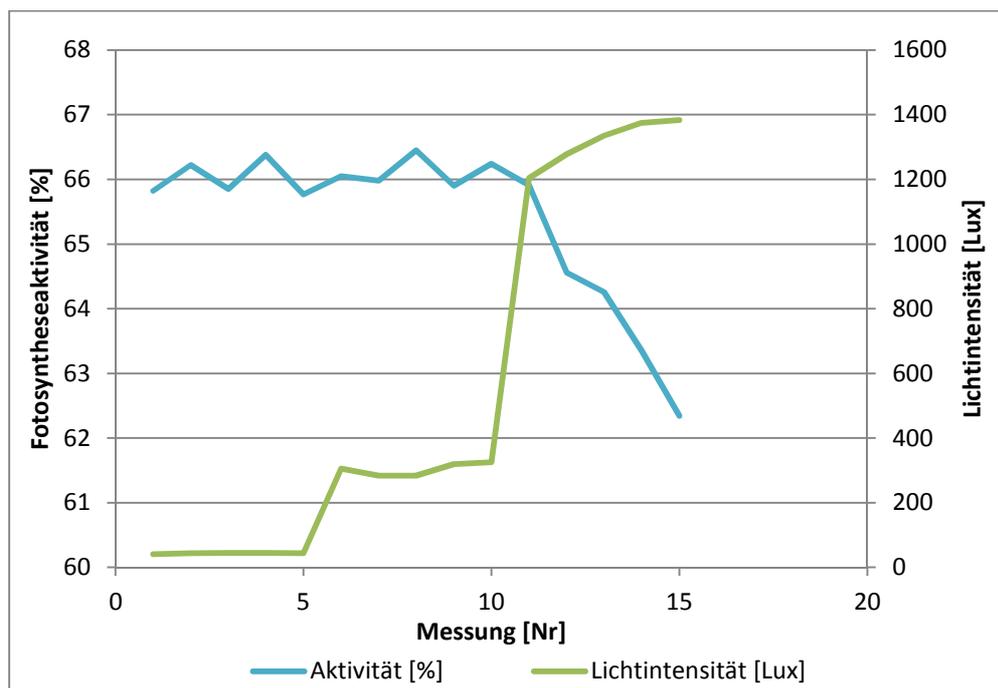


Abbildung 12: Darstellung der Fotosyntheseaktivitätswerte [%] sowie einwirkende Lichtintensität [Lux] auf die Algenstammlösung (Zeitpunkt des Ansetzens) je Probe im Vorversuch 2

Zu Beginn zeigten die Messwerte eine hohe Reproduzierbarkeit auf, hier war die Algenstammlösung einer vergleichsweise geringen Lichtintensität ausgesetzt. Ab Phase 3 (Messwerte 11 – 15), in der höhere Lichtintensitäten auf die Algenstammlösung einwirkten, kam es zu einer Abnahme der Aktivitätswerte.

Somit schien eine Beeinflussung des statischen Algenschnelltestverfahrens bei höheren Strahlungseinflüssen auf die Algenstammlösung während des Versuchszeitraumes möglich.

2.8 Versuchsdurchführung zum Parameter Licht

2.8.1 Versuchsdurchführung zum Parameter Tageslicht

Um das statische Algenschnelltestverfahren auf einen möglichen Tageslichteinfluss hin zu untersuchen, wurden wiederum zwei Messreihen parallel aufgenommen, deren Proben aus zwei separaten Algenstammlösungen identischer Algenkultur angesetzt wurden. Eine Algenstammlösung wurde dabei über den gesamten Versuchszeitraum dem Tageslicht ausgesetzt, wobei die künstliche Laborbeleuchtung ausgeschaltet blieb. Das Tageslicht diente als einzige Lichtquelle. Die zweite Algenstammlösung diente zum Ansetzen der Referenzproben und wurde über den kompletten Versuchszeitraum abgedunkelt. Die Versuchsreihen wurden unter sonst identischen Bedingungen aufgenommen.

Die 15minütige Inkubation erfolgte bei allen Proben, wie gehabt, im Dunkeln. Auch die Lichtverhältnisse im Fluorometer waren für alle Proben identisch. Die einwirkende Lichtintensität auf die Algenstammlösung unter Tageslichteinfluss wurde mit dem Photometer LI-185B der Marke LICOR Biosciences beim Ansetzen einer jeden Probe gemessen. Da die einwirkende Lichtintensität auf die Referenzstammlösung konstant und näherungsweise $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ betrug, wurden bei den Referenzreihen keine Lichtintensitäten gemessen.

Es erfolgten insgesamt drei Versuchsdurchführungen zum Parameter Tageslicht. Die Messreihen, welche aus je 27 Messwerten bestehen, wurden über einen Zeitraum von mindestens sechs Stunden aufgenommen. Die beiden parallel durchgeführten Versuchsreihen (Tageslichteinfluss und dunkle Lichtverhältnisse) sollten hinsichtlich der Messgröße Fotosyntheseaktivität miteinander verglichen werden. Um einen Anstieg der Gerätetemperaturen zu minimieren, wurden die Versuchsgeräte allesamt ausreichende Zeit vor Versuchsbeginn angeschaltet.

2.8.2 Versuchsdurchführung zum Parameter Kunstlicht

Um einen möglichen Einfluss von künstlichem Licht auf die Algenstammlösung zu untersuchen, wurde eine Tageslichteinwirkung vermieden. Als möglicher Einflussparameter galt bei diesen Versuchen die Beleuchtung der Algenstammlösung einzig durch die Deckenbeleuchtung. Diese bestand aus gewöhnlichen Leuchtstoffröhren der Marke Philips vom Typ TL5 80W/830 HO, welche eine Leistungsaufnahme von 80 Watt, eine Lichtfarbe von 830 haben und eine Farbtemperatur von 3000K. Des Weiteren weist dieser Lampentyp laut Hersteller einen nahezu konstanten Lichtstrom von 6550 Lumen über die gesamte Haltbarkeitsdauer auf (Philips 2008). Die Algenstammlösungen waren während der Versuchsdurchführungen auf dem Labortisch positioniert und hatten einen Abstand zur Lichtquelle von ca. 2,0 bis 2,5 Metern. Die einwirkende Lichtintensität auf die Algenstammlösung wurde bei den Versuchen zur Kontrolle gemessen. Unter der Annahme einer relativ konstanten Strahlung erfolgte die Lichtintensitätsmessung hierbei nur zu Versuchsbeginn und Versuchsende mit dem Photometer LI-185B.

Es wurden wiederum zwei Messreihen parallel aufgenommen, welche aus zwei separaten Algenstammlösungen identischer Algenkultur angesetzt wurden. Die Proben der einen Messreihe wurden aus einer Algenstammlösung angesetzt, welche über den gesamten Versuchszeitraum der Laborbeleuchtung ausgesetzt war. Die Proben der Referenzreihe, welche zum Vergleich dienten,

wurden, wie bei den Versuchen zum möglichen Tageslichteinfluss, aus einer abgedunkelten Algenstammlösung angesetzt.

Es erfolgten insgesamt vier Versuchsdurchführungen zum Parameter Kunstlicht. Die Messreihen, welche aus 26 oder 27 Messwerten bestehen, wurden über einen Zeitraum von mindestens sechs Stunden aufgenommen. Die beiden parallel durchgeführten Versuchsreihen (Kunstlichteinfluss und dunkle Lichtverhältnisse) sollten hinsichtlich ihrer Fotosyntheseaktivität miteinander verglichen werden.

2.9 Vergleich Algenschnelltest - Algentoximeter

Neben der Untersuchung auf eine mögliche Beeinflussung des statischen Algenschnelltestverfahrens durch die Temperatur- und Lichtverhältnisse sollte weiterhin geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen eine vergleichbar hohe Reproduzierbarkeit der Messwerte, wie sie häufig in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter vorliegt, erreicht werden kann.

In den semi-kontinuierlichen Algentoximeter werden die Fluoreszenzmessungen nach derselben Methode und mit denselben Testorganismen durchgeführt. Hierbei ist das Testmedium eine reale Gewässerprobe, deren mögliche Ökotoxizität über die Fotosyntheseaktivität der Testalgen im Vergleich zur Testalgenaktivität in einer unbelasteten Leitungswasserprobe bestimmt wird. Als Testmedium beim statischen Algenschnelltestverfahren wurde - in dieser Arbeit - dagegen ausschließlich das synthetische M4-Medium verwendet. Es erfolgen in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter zwei Messungen (möglicherweise belastete Probe und unbelastete Probe), deren Testergebnisse miteinander verglichen werden. Das Ergebnis wird als Hemmung der Fotosynthese angegeben, welche nach genannter Berechnungsvorschrift (siehe 1.3.4. PAM-Fluorometrie) bestimmt wird. Als repräsentative Versuchsreihen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter wurden geeignete Werte aus den Stationen Fischerhof und Seemannshöft ausgesucht, welche relativ konstante prozentuale Fotosynthesehemmungswerte über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigten.

Zum Vergleich wurden nur die in dieser Arbeit durchgeführten Laborversuchsreihen zum Parameter Licht herangezogen, da diese eine größere Datengrundlage aufweisen und des Weiteren auch über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurden, als die Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur. Die Berechnung der prozentualen Hemmung der Fotosynthese erfolgte bei den Laborversuchsreihen mit dem Algenschnelltestverfahren nach demselben Vorgehen. Da hierbei jedoch nur unbelastete Proben mit nahezu identischen Zusammensetzungen ausgewertet wurden, wurde die prozentuale Fotosynthesehemmung einer Probe mit dem jeweiligen Versuchsreihenmittelwert als Kontrollprobe (A_K) bestimmt.

Je Messreihe wurden hinsichtlich der Fotosynthesehemmungswerte die Größen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Die Standardabweichung galt hierbei als Maß für die Streuung (Grundrauschen) der Messwerte. Die ausgewählten Messwerte der semi-kontinuierlichen Algentoximeter wurden hinsichtlich ihrer Streuung mit den Laborversuchsreihen des statischen Algenschnelltestes verglichen.

2.10 Statistische Methoden

Neben der allgemeinen Betrachtung der Messergebnisse wurden die Versuchsdurchführungen des Weiteren statistisch ausgewertet. Es erfolgten gruppenweise und paarweise Vergleiche der Versuchsreihen.

Anhand der Gruppenvergleiche mittels der Verfahren einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und H-Test wurde zunächst untersucht, inwieweit die messtechnische Fotosyntheseaktivität von der Wahl der Testalgenkultur und von der Zeit abhängt. Hierfür wurden Versuchsreihen miteinander verglichen, welche unter identischen Versuchsbedingungen, jedoch mit unterschiedlichen Testalgenkulturen und in unterschiedlichen Versuchszeiträumen aufgenommen wurden.

Anhand paarweiser Vergleiche mit den Testverfahren t – Test und Welch – Test wurde überprüft, ob eine Variation der Temperatur- oder Lichtverhältnisse das Algenschnelltestverfahren statistisch signifikant beeinflusst. Hierbei wurden jeweils zwei parallel durchgeführte Versuchsreihen miteinander verglichen, welche sich nur durch die Faktoren Licht oder Proben temperatur voneinander unterschieden.

Für die Anwendung parametrischer Testverfahren wie u. a. der ANOVA und dem t – Test sind die notwendigen Bedingungen - Normalverteilung der Messwerte und homogene Varianzen der zu vergleichenden Messreihen - zu überprüfen. Diese Prüfungen erfolgten mit dem Shapiro-Wilk-Test, dem Test nach Hartley und dem Levene-Test. Die statistischen Methoden sowie deren Anwendung auf die Fragestellungen dieser Arbeit sind im Folgenden beschrieben.

2.10.1 Shapiro-Wilk-Test

Parametrische Verfahren, wie der t-Test und die einfaktorielle ANOVA, setzen eine Normalverteilung der Messwerte voraus (Lozán 1992). Um die Versuchsreihen des statischen Algenschnelltestverfahrens daraufhin zu überprüfen, ob eine annähernde Normalverteilung der Messgröße Fotosyntheseaktivität vorliegt, wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Dieser ist ausschließlich und besonders für eine Überprüfung auf Normalverteilung geeignet und sticht gegenüber anderen Tests durch seine besonders hohe Trennschärfe bei kleinen Wertemengen hervor (Shapiro und Wilk 2009).

Folgender Fragestellung wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Testes nachgegangen: Sind die Fotosyntheseaktivitätswerte, welche mit dem statischen Algenschnelltestverfahren bestimmt werden, annähernd normalverteilt? Ist die erste notwendige Bedingung für parametrische Testverfahren, Normalverteilung der Messwerte, erfüllt? Hierbei konnten nur Versuchsreihen mit konstanten Versuchsbedingungen untersucht werden. Daher kam die Auswertung der Versuchsreihen anhand des Shapiro-Wilk-Testes nur für die Versuchsreihen zum künstlichen Lichteinfluss und zur Temperatur in Frage. Eine Auswertung der Versuchsreihen unter Tageslichteinfluss, bei denen deutliche Differenzen in der einwirkenden Strahlungsenergie auf die Algenstammlosung möglich waren, ist mit den gewählten Verfahren somit nicht zulässig. Folgende Hypothesen wurden zu Auswertungsbeginn formuliert:

Nullhypothese H_0 : Die Fotosyntheseaktivitätswerte, welche mit dem statischen Algenschnelltestverfahren unter konstanten Versuchsbedingungen aufgenommen werden, sind annähernd normalverteilt.

Alternativhypothese H_1 : Die Fotosyntheseaktivitätswerte, welche mit dem statischen Algenschnelltestverfahren unter konstanten Versuchsbedingungen aufgenommen werden, sind nicht normalverteilt.

Als Auswertekriterium gilt nach Shapiro und Wilk die Testgröße W . Die genauen Berechnungsschritte der einzelnen Variablen sind dem Werk von Shapiro und Wilk zu entnehmen (Shapiro und Wilk 2009). Die Testgröße W wird, analog zu anderen statistischen Testverfahren wie z.B. dem t-Test, mit einem tabellierten kritischen Wert W verglichen, der vom gewählten Signifikanzniveau α und der Messwertanzahl n abhängig ist (Shapiro und Wilk 2009). In dieser Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von 5% ($\alpha = 0,05$) ausgewählt, was in der Praxis üblich ist (Rudolf et al. 2008).

Fallunterscheidung:

$W > W_{\text{tab}}$ H_0 wird beibehalten, Annahme normalverteilter Messwerte

$W \leq W_{\text{tab}}$ H_0 wird abgelehnt, Verteilung weicht von einer Normalverteilung ab

2.10.2 Hartley-Test

Eine weitere Voraussetzung für Gruppenvergleiche mittels parametrischer Verfahren wie u. a. dem t – Test und der einfaktoriellen ANOVA ist eine (annähernde) Homogenität der Varianzen dieser Gruppen (Lozán 1992). Es muss demnach nachgewiesen werden, dass die Streuungen der Messwerte der zu vergleichenden Messreihen näherungsweise gleich sind. Eine Möglichkeit, Gruppen auf homogene Varianzen zu testen, ist die Anwendung des Hartley - Tests. Vorausgesetzt werden normalverteilte und unabhängige Stichproben, die die gleiche Anzahl an Messwerten n aufweisen (Sachs 1971).

Es wurde die empirische Testgröße F_{max} ermittelt, indem die größte vorhandene Varianz der zu vergleichenden Gruppen durch die kleinste geteilt wird. Die Verteilung der Testgröße F_{max} ist tabelliert. Der empirisch ermittelte Wert wird mit dem entsprechenden Tabellenwert, abhängig von den Parametern Anzahl k an Gruppen, Freiheitsgrade $v = n - 1$ und gewähltes Signifikanzniveau α , verglichen (Sachs 1971).

Folgender Fragestellung sollte mithilfe des Hartley - Test nachgegangen werden: Weisen die zu vergleichenden Gruppen annähernd homogene Varianzen auf? Ist die zweite notwendige Bedingung (Varianzhomogenität), für Gruppenvergleiche mittels t-Test und einfaktorieller ANOVA, erfüllt? Hierbei werden die Varianzen der Versuchsreihen zum Parameter Temperatur (Messreihen und ihre Referenzreihen bei Raumtemperatur) sowie die Varianzen der Versuchsreihen zum Parameter künstliches Licht (Reihen unter künstlichem Lichteinfluss und ihre Referenzreihen) auf Homogenität getestet. Die Hypothesen für die Anwendung dieses Testes lauteten:

Nullhypothese H_0 : Die Varianzen der zu vergleichenden Gruppen sind homogen ($\sigma_1 = \sigma_2$).

Alternativhypothese H_1 : Die Varianzen der zu vergleichenden Gruppen unterscheiden sich systematisch ($\sigma_1 \neq \sigma_2$).

Fallunterscheidung:

$$\begin{aligned}\hat{F}_{max} < F_{tab} & \quad H_0 \text{ wird beibehalten, Annahme: Varianzen (näherungsweise) gleich} \\ \hat{F}_{max} \geq F_{tab} & \quad H_0 \text{ wird abgelehnt, Annahme von ungleichen Varianzen}\end{aligned}$$

2.10.3 Levene-Test

Eine Alternative zum Hartley – Test stellt der Levene – Test dar. Dieser setzt keine gleich großen Gruppenumfänge voraus, lediglich eine Unabhängigkeit der einzelnen Proben muss vorliegen. Eine genauere Beschreibung des Testverfahrens ist der angegebenen Literatur zu entnehmen (Köhler et al. 2012). Analog zum Hartley – Test wurde dieser Test auf die Fragestellung angewendet, ob die zu vergleichenden Gruppen homogene Varianzen aufweisen. Wie beim Hartley – Test lauteten auch hier die Hypothesen:

Nullhypothese H_0 : Die Varianzen der zu vergleichenden Gruppen sind homogen ($\sigma_1 = \sigma_2 = \dots = \sigma_n$).

Alternativhypothese H_1 : Die Varianzen der zu vergleichenden Gruppen unterscheiden sich systematisch

Fallunterscheidung:

$$\begin{aligned}\hat{F}_{max} < F_{max}(tab) & \quad H_0 \text{ wird beibehalten, Annahme: Varianzen (näherungsweise) gleich} \\ \hat{F}_{max} \geq F_{max}(tab) & \quad H_0 \text{ wird abgelehnt, Annahme von ungleichen Varianzen}\end{aligned}$$

2.10.4 Einfaktorielle Varianzanalyse

Neben den paarweisen Vergleichen sollten im Rahmen der statistischen Auswertung mehrere Messreihen (Anzahl Gruppen > 2) hinsichtlich der Messgröße Fotosyntheseaktivität miteinander verglichen werden. Es wurde folgender Fragestellung nachgegangen: Unterscheiden sich die Versuchsreihen, welche unter näherungsweise identischen Bedingungen durchgeführt wurden (gleiche Lichtverhältnisse, gleiches Temperaturniveau) aufgrund unterschiedlicher Algenkultur bzw. unterschiedlichem Versuchszeitraum signifikant voneinander? Wie hoch ist die Abhängigkeit der Testgröße Fotosyntheseaktivität von der Wahl der Testkultur bzw. von der Zeit?

Hierfür wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ausgewählt, da durch eine ANOVA mehrere Gruppenmittelwerte gleichzeitig miteinander verglichen werden können (Köhler et al. 2012). Die einfaktorielle ANOVA ist anzuwenden, da in den Versuchen zum jeweiligen Parameter Temperatur oder Licht nur ein Faktor variiert wurde.

Bei der ANOVA wird die Gesamtvariabilität der betrachteten Gruppen in zwei Streuungsbestandteile zerlegt: Die Variabilität innerhalb der jeweiligen Gruppen, auch Zufallsvariabilität genannt, und in den Bestandteil der Streuung zwischen den zu vergleichenden Gruppen(mittelwerten), der auf Differenzen zwischen den Gruppen beruht. Bei letzterem spricht man von „festen Effekten“ (Köhler et al. 2012). Wenn sich diese beiden Bestandteile, Streuung innerhalb der Gruppen und Streuung

zwischen den Gruppen(mittelwerten) deutlich voneinander unterscheiden, ist ein Ablehnen der Nullhypothese wahrscheinlich. Die Hypothesen für die Anwendung der ANOVA lauteten:

Nullhypothese H_0 : Die Versuchsreihen, welche unter (näherungsweise) identischen Licht- und Temperaturverhältnissen und aus unterschiedlichen Algenstammlösungen entstanden sind, entstammen derselben Grundgesamtheit.

Alternativhypothese H_1 : Von den Versuchsreihen, welche unter (näherungsweise) identischen Licht- und Temperaturverhältnissen und aus unterschiedlichen Algenstammlösungen entstanden sind, unterscheiden sich mindestens zwei signifikant voneinander.

Ein Ablehnen der Nullhypothese würde somit bedeuten, dass die Wahl der Algenkultur das statische Algenschnelltestverfahren beeinflusst. Das Beibehalten der Nullhypothese würde bedeuten, dass die Testalgenkultur frei gewählt werden kann. Das Ergebnis der einfaktoriellen ANOVA wird durch die berechnete Größe F im Vergleich zum tabellierten F-Wert dargestellt. Der tabellierte Wert ist vom Signifikanzniveau und den Freiheitsgraden abhängig: $F_{N-k}^{k-1}(\alpha)$. (Köhler et al. 2012). Wie in den anderen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt.

Fallunterscheidung:

$F_{\text{vers}} \leq F_{\text{tab}}$	H_0 wird beibehalten, alle Stichproben entstammen der gleichen Grundgesamtheit
$F_{\text{vers}} > F_{\text{tab}}$	H_0 wird verworfen, mindestens zwei Gruppen sind systematisch verschieden

2.10.5 H-Test (Kruskal-Wallis)

Der H-Test ist eine alternative Form der einfaktoriellen ANOVA, mit dem mehrere Gruppen daraufhin untersucht werden können, ob sie derselben Grundgesamtheit entstammen. Dieser Test gehört zu den parameterfreien Testverfahren und setzt keine Normalverteilung und Varianzhomogenität der Gruppen voraus (Köhler et al. 2012). Analog zur einfaktoriellen ANOVA wurde mit dem H-Test der Frage nachgegangen: Unterscheiden sich die Versuchsreihen, welche unter näherungsweise identischen Bedingungen durchgeführt wurden (gleiche Lichtverhältnisse, gleiches Temperaturniveau) aufgrund unterschiedlicher Algenkultur bzw. unterschiedlichem Versuchszeitraum signifikant voneinander?

Die Nullhypothese H_0 und Alternativhypothese H_1 entsprechen dabei denen der einfaktoriellen ANOVA (siehe 2.10.4.). Es wurde eine Testgröße H_{vers} berechnet, die mit einem tabellierten H_{tab} Wert verglichen wird. Die genauere Durchführungsbeschreibung ist der Literatur zu entnehmen (Köhler et al. 2012).

Fallunterscheidung:

$H_{\text{vers}} \leq H_{\text{tab}}$	H_0 wird beibehalten, alle Stichproben entstammen der gleichen Grundgesamtheit
$H_{\text{vers}} > H_{\text{tab}}$	H_0 wird verworfen, mindestens zwei Gruppen sind systematisch verschieden

2.10.6 t - Test

Der sogenannte t - Test gehört zu den parametrischen Verfahren und eignet sich besonders für den Mittelwertvergleich zweier unabhängiger Stichproben. Folgender Fragestellung wurde mithilfe des t - Testes nachgegangen: Unterscheiden sich die zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen signifikant voneinander? Ist ein Einfluss durch Variation der Temperatur- oder Lichtverhältnisse statistisch zu erkennen?

Der t - Test dient als Entscheidungshilfe dafür, ob eine Mittelwertdifferenz zweier Stichproben rein zufällig entstanden ist, oder ob es doch signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben gibt. Auch hier gelten als Voraussetzungen homogene Varianzen der beiden Stichproben und eine annähernde Normalverteilung der Messwerte (Lozán 1992). Die Prüfgröße ist der t - Wert, ein aus den gewonnenen Daten ermittelter Wert, welcher mit einem tabellierten t - Wert der Student-Verteilung verglichen wird. Unterschieden wird bei der Durchführung des t - Testes zwischen einseitiger und zweiseitiger Fragestellung, je nachdem, ob eine erwartete Richtung für eine mögliche Mittelwertdifferenz vorliegt oder nicht. Da im Vornherein keine Aussage über die Auswirkung der Faktoren getroffen wurde, handelt es sich hierbei um eine zweiseitige Fragestellung, da die Differenz der Mittelwerte, $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$, größer, aber auch kleiner Null sein kann. Die Art der Fragestellung hat eine Auswirkung auf die Höhe des kritischen t-Wertes, welcher zur Auswertung mit dem empirischen t - Wert verglichen wird. Die Hypothesen für die Anwendung des t - Testes lauteten:

Nullhypothese H_0 : Die Versuchsreihen zum Parameter Temperatur bzw. zum Parameter Kunstlicht entstammen derselben Grundgesamtheit. Unterschiede zwischen den Messreihen sind rein zufällig entstanden, es liegt kein Temperatureinfluss oder kein Einfluss durch die künstliche Beleuchtung vor.

Alternativhypothese H_1 : Die Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen hinsichtlich der Parameter Temperatur bzw. Kunstlicht sind signifikant. Es liegt ein systematischer Unterschied aufgrund eines Temperatureinflusses oder eines Einflusses durch die künstliche Beleuchtung vor.

Fallunterscheidung:

$t_{\text{empirisch}} \leq t_{\text{tab}}$	H_0 wird beibehalten. Annahme: Gleiche Grundgesamtheit
$t_{\text{empirisch}} > t_{\text{tab}}$	H_0 wird verworfen. Annahme: Unterschiedliche Grundgesamtheiten

2.10.7 Welch - Test

Wenn die Voraussetzungen für die Durchführung eines t - Testes, homogene Varianzen, nicht (annähernd) gilt, aber die Annahme einer Normalverteilung nicht abgelehnt wird, kann statt dem t - Test der Welch - Test verwendet werden (Lozán 1992). Hier wird, analog zum t - Test, der t - Wert berechnet, welcher wiederum mit dem entsprechenden Wert der Student t- Verteilung verglichen wird. Lediglich die Berechnung der Freiheitsgrade erfolgt auf anderem Wege (Lozán 1992). Mit der Anwendung des Welch - Testes wurde ebenfalls folgender Fragestellung nachgegangen: Unterscheiden sich zwei Versuchsreihen, aufgrund eines variierten Faktors (unterschiedliche Proben temperatur oder unterschiedliche Lichtverhältnisse) statistisch voneinander? Hier gelten dieselben Hypothesen:

Nullhypothese H_0 : Die Versuchsreihen zum Parameter Temperatur bzw. zum Parameter Kunstlicht entstammen derselben Grundgesamtheit. Unterschiede zwischen den Messreihen sind rein zufällig entstanden, es liegt kein Temperatureinfluss oder kein Einfluss durch die künstliche Beleuchtung vor.

Alternativhypothese H_1 : Die Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen hinsichtlich der Parameter Temperatur bzw. Kunstlicht sind signifikant. Es liegt ein systematischer Unterschied aufgrund eines Temperatureinflusses oder eines Einflusses durch die künstliche Beleuchtung vor.

Fallunterscheidung:

$t_{\text{empirisch}} \leq t_{\text{kritisch}}$	H_0 wird beibehalten. Annahme: gleiche Grundgesamtheit
$t_{\text{empirisch}} > t_{\text{kritisch}}$	H_0 wird verworfen. Annahme: Unterschiedliche Grundgesamtheiten

Das Verwerfen der Nullhypothese und Annehmen der Alternativhypothese bei den Verfahren t - Test und Welch - Test würde bedeuten, dass eine Variation der Licht- oder Temperaturverhältnisse das Verfahren signifikant beeinflusst. Das Beibehalten der Nullhypothese würde bedeuten, dass der variierte Faktor keinen Einfluss ausübt. Die Wahl eines Signifikanzniveaus α war festzulegen. Analog zu den vorherigen Tests wurden für die paarweisen Vergleichsverfahren $\alpha = 0,05$ gewählt.

3 Ergebnisse

Anhand der durchgeführten Versuchsreihen sollten die beiden Arbeitshypothesen untersucht werden:

- 1) Temperaturschwankungen während der Testdurchführung, auch innerhalb des standardisierten Bereiches von 22 ± 2 °C, beeinflussen das statische Algenschnelltestverfahren.
- 2) Die Lichtintensität, welcher die Algenstammlösung während der Versuchsdauer ausgesetzt ist, beeinflusst das Algenschnelltestverfahren.

Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. Dabei werden die Versuchsdurchführungen sowohl allgemein als auch statistisch betrachtet. Begonnen wird das Kapitel mit den Messergebnissen zum Parameter Temperatur.

3.1 Ergebnisse zum Parameter Temperatur

Gültigkeitskriterien

Die Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur erfüllten die Gültigkeitskriterien des Algenschnelltestverfahrens nach SOP HU411.120 (2013) hinsichtlich der messtechnischen Fotosyntheseaktivität der Testalgen sowie der Chlorophyllkonzentrationen. Die Konzentrationswerte, welche nicht zur Auswertung herangezogen wurden, sind in Anhang I.II. tabelliert. Der definierte Bereich für die Proben temperatur (22 ± 2 °C) wurde dabei bewusst teilweise über- bzw. unterschritten, um auch das Verhalten der Testalgen an den Randbereichen zu untersuchen.

3.1.1 Messergebnisse

Es sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob der Parameter Temperatur im praxisrelevanten Bereich von 22 ± 2 °C einen signifikanten Einfluss auf das statische Algenschnelltestverfahren hat. Die Versuchsreihen zum Parameter Temperatur wurden paarweise miteinander verglichen. Es wurden Messreihen bei Raumtemperaturen (Messreihen T_R) zwischen 19,4 und 20,1 sowie 21,0 und 21,5 °C aufgenommen, deren Fotosyntheseaktivitätswerte mit parallel durchgeführten Referenzreihen ($T_{24^\circ\text{C}}$) verglichen wurden. Diese Proben wurden mit einer konstanten Temperatur von 24,0 °C angesetzt. Die jeweils parallel durchgeführten Versuchsreihen T_R und $T_{24^\circ\text{C}}$ bestanden aus Proben, welche aus derselben Algenstammlösung angesetzt wurden.

Die Ergebnisse der Fotosyntheseaktivitätsmessungen sind in Tabelle 3 dargestellt. Hierbei wurden je fünf Messwerte zu einem Mittelwert zusammengefasst. Eine genaue Auflistung der einzelnen Messreihen ist im Anhang I.II. dargestellt. Angegeben wird neben Mittelwert und Standardabweichung auch die prozentuale Abweichung der Aktivitätsmittelwerte der beiden parallel durchgeführten Messreihen je Versuchsdurchführung.

Tabelle 3: Ergebnisse der Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur. Angabe von mittlerer Fotosyntheseaktivität [%] sowie Standardabweichung der Einzelmessungen. Prozentuale Abweichung der gemittelten Aktivitätswerte je Versuchsdurchführung

Versuchsdurchführung	Referenzreihen $T_{24^{\circ}\text{C}}$		Messreihen T_R		Abweich. Aktivität [%]
	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]	
1	65,37	0,16	65,78	0,14	0,62
2	65,30	0,17	65,64	0,14	0,52
3	63,85	0,16	64,23	0,22	0,59
4	65,23	0,12	65,46	0,20	0,35

Wie zu erkennen ist, liegen die gemittelten Fotosyntheseaktivitätswerte der Referenzreihen $T_{24^{\circ}\text{C}}$ für alle vier Versuchsdurchführungen leicht unter den gemittelten Werten der Messreihen T_R . Die gemittelten Fotosyntheseaktivitätswerte der Messreihen T_R und ihrer Referenzreihen $T_{24^{\circ}\text{C}}$ unterscheiden sich dabei aber für alle Versuchsdurchführungen letztendlich um weniger als ein Prozent. Die Standardabweichungen aller Versuchsreihen sind dabei vergleichbar niedrig und schwanken geringfügig in einem Bereich von 0,12 bis 0,22%. Die einzelnen Messreihen unterschiedlicher Proben temperatur zeigen somit eine gute Reproduzierbarkeit auf.

Demnach scheint ein systematischer, aber zu vernachlässigender Temperatureinfluss im Untersuchungsbereich von $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ vorzuliegen. Für eine genauere Darstellung der Messreihen hinsichtlich ihrer Verteilungen wurden diese in Abbildung 13 in Form von Boxplots dargestellt.

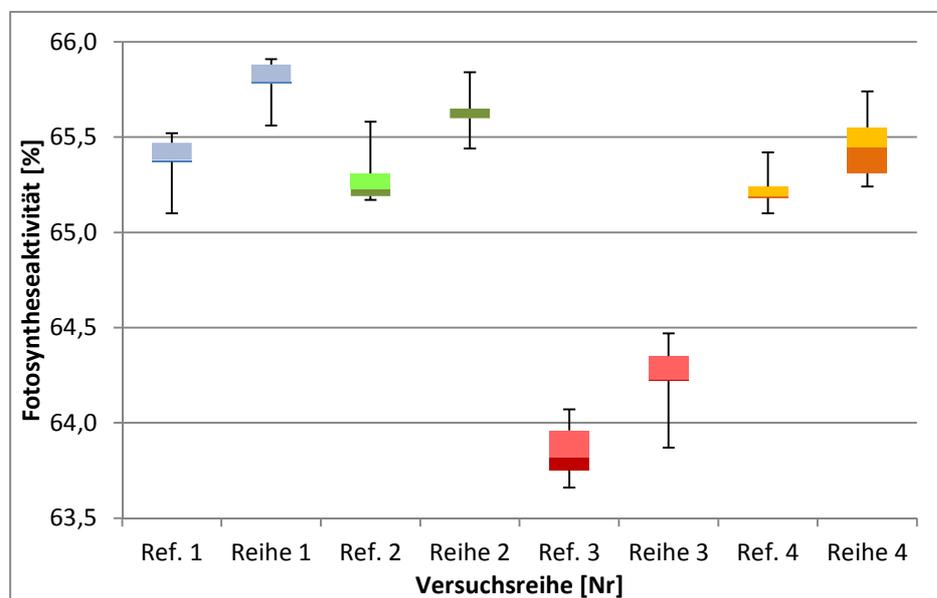


Abbildung 13: Ergebnisse der Temperaturversuche im Box-Whisker-Plot. Darstellung von Minimum, erstem Quartil, Median, drittem Quartil und Maximum, je Messreihe

Aufgrund einer geringeren Messwertanzahl sowie der geringen Streuungen sind die Intervalle Erstes Quartil-Median sowie Median-drittes Quartil nicht bei allen Versuchsreihendarstellungen ersichtlich. Des Weiteren ist es möglich, dass wie bei Reihe 2 Median und der Wert für das dritte Quartil zusammenfallen. Dennoch lässt sich, auch durch die Spannweite der Messreihen, erkennen, dass sich

die jeweiligen zu vergleichenden Reihen zwar überschneiden, jedoch die Medianwerte bei allen Reihen höher als die Medianwerte der Referenzen sind. Des Weiteren liegen die Boxen, welche einen Bereich markieren, der 50% der Werte einer Versuchsreihe beinhaltet, bei allen vier Vergleichen sichtbar auseinander. Die Betrachtung der 4 Boxplotvergleiche lässt auf einen systematischen Unterschied zwischen Reihen und Referenzen schließen.

Temperaturverläufe

Es wurden bei diesen Versuchsdurchführungen Proben, welche bei der vorherrschenden Raumtemperatur angesetzt wurden, mit Referenzen verglichen, die bei einer erhöhten Temperatur von 24,0 °C angesetzt wurden. Als Vergleichswert galt hierbei die Fotosyntheseaktivität. Um den Temperaturverlauf der Proben über den Versuchszeitraum zu kontrollieren, wurden die Temperaturen aller Proben zu Versuchsbeginn und Versuchsende gemessen.

Die gemittelten Temperaturen jeder Messreihe, zu Versuchsbeginn und Versuchsende, sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wurden hierbei wiederum 5 Messwerte je Reihe zu einem Mittelwert zusammengefasst. Eine genauere Auflistung der Messwerte ist im Anhang I.II. dargestellt. Des Weiteren sind die mittleren absoluten Temperaturdifferenzen (ΔT) zwischen jeweiliger Messreihe T_R und Referenzreihe $T_{24^\circ C}$, zu Versuchsbeginn und Versuchsende, angegeben.

Tabelle 4: Temperaturmittelwerte [°C] der Messreihen zu Versuchsbeginn, Versuchsende und mittlere Temperaturdifferenzen [°C] zwischen Messreihe und zugehöriger Referenzreihe zu Versuchsbeginn und Versuchsende

Versuchsdurchführung	Referenzreihen $T_{24^\circ C}$		Messreihen T_R		ΔT Versuchsbeginn [°C]	ΔT Versuchsende [°C]
	Temp. Versuchsbeginn [°C]	Temp. Versuchsende [°C]	Temp. Versuchsbeginn [°C]	Temp. Versuchsende [°C]		
1	24,0	24,2	21,1	23,3	2,9	0,9
2	24,0	24,5	21,4	23,7	2,6	0,8
3	24,0	23,2	19,6	21,9	4,4	1,3
4	24,0	23,4	20,0	22,4	4,0	1,0

Wie zu erkennen ist, blieben die Proben Temperaturen über den Versuchszeitraum nicht konstant. Die Temperaturdifferenzen zwischen den Proben und ihren Referenzen betragen beim Ansetzen, je nach Versuchstag und Reihe, im Mittel zwischen 2,6 und 4,4 °C. Über den Versuchszeitraum kam es dabei zu Veränderungen der Proben Temperaturen, wobei sich die Temperaturdifferenzen der zu vergleichenden Proben verringerten. Die gemittelten Temperaturdifferenzen zwischen den bei Raumtemperatur angesetzten Proben und ihren Referenzproben betragen gegen Ende der Messungen nur noch zwischen 0,8 und 1,3 °C. Es kam also bei den Proben, welche bei Raumtemperatur angesetzt wurden, zu deutlichen Anstiegen der Proben Temperatur, während die Referenzreihen $T_{24^\circ C}$ deutliche geringere Temperaturdifferenzen zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende zeigten. Durch die Abwärme bzw. Geräteinnentemperaturen von Magnetrührer, Computer und Küvetten-Fluorometer scheinen sich die Proben der Messreihen T_R deutlich aufgrund eines höheren Temperaturgefälles zu erwärmen.

Es kam dabei aber, wie zu erkennen ist, zu keiner Überschneidung der Temperaturverläufe zwischen Messreihe T_R und jeweiliger Referenz. Somit lässt sich feststellen, dass die Testorganismen in den

Referenzproben über den Versuchszeitraum erkennbar höheren Temperaturen ausgesetzt waren. Hinsichtlich der Fotosyntheseaktivitätswerte sollten die Versuchsdurchführungen noch statistisch untersucht werden, ob die Unterschiede zwischen den Messreihen und ihren Referenzen signifikant oder rein zufällig sind. Daher folgen nun die statistischen Ergebnisse zum Parameter Temperatur.

3.1.2 Statistische Betrachtung des Parameters Temperatur

Die Versuchsreihen zum Parameter Temperatur sollten des Weiteren statistisch untersucht werden. Mithilfe einer ANOVA sollte zunächst festgestellt werden, inwieweit die Wahl der Testalgenkultur einen Einfluss auf die Testgröße Fotosyntheseaktivität hat und inwieweit das Messverfahren von der Zeit abhängig ist.

Anhand paarweiser Vergleiche (t – Test) wurde dann untersucht, inwieweit die Probertemperatur das Messverfahren beeinflusst. Der paarweise Vergleich diente somit der weiteren Analyse der ersten Arbeitshypothese. Für eine statistische Analyse der Versuchsdurchführungen wurde im Vorhinein geprüft, ob die Anwendung parametrischer Verfahren wie u. a. der einfaktoriellen ANOVA und des t – Tests zulässig ist. Die notwendigen Bedingungen hierfür sind eine annähernde Normalverteilung sowie homogene Varianzen der jeweils zu vergleichenden Versuchsreihen.

3.1.2.1 Prüfung auf Normalverteilung: Versuche zum Parameter Temperatur

Die insgesamt acht Messreihen der Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test untersucht. Die Testergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Je Messreihe wurden die Maßgrößen b , S^2 und W berechnet. Es sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob die Messreihen des Algenschnelltestverfahrens normalverteilte Messwerte (Fotosyntheseaktivität [%]) aufweisen.

Tabelle 5: Prüfung der Messreihen zum Parameter Temperatur auf Normalverteilung: Anwendung des Shapiro-Wilk-Testes mit Maßgröße $W=b^2/S^2$. Je Messreihe Angabe von Aktivitätsmittelwert [%], Standardabweichung vom Mittelwert sowie die Berechnungsgrößen des Testes

Testgröße / Reihe	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]	b	S^2	W
Reihe 1	65,78	0,14	0,2567	0,0753	0,8751
Referenz 1	65,37	0,16	0,3033	0,1055	0,8719
Reihe 2	65,64	0,14	0,2779	0,0817	0,9451
Referenz 2	65,30	0,17	0,3014	0,1123	0,8090
Reihe 3	64,23	0,22	0,4301	0,2017	0,9173
Referenz 3	63,85	0,16	0,3232	0,1075	0,9716
Reihe 4	65,46	0,20	0,3902	0,1575	0,9669
Referenz 4	65,23	0,12	0,2272	0,0571	0,9033

Der kritische Wert W nach Shapiro und Wilk bei einer Messwertanzahl von $n = 5$ und einem Signifikanzniveau von 5% lautet $W_{(n=5 ; 0,05)}=0,762$ (Shapiro und Wilk 2009). Wie zu sehen ist, liegen alle ermittelten Werte W der Messreihen über diesem Wert. Somit kann mit einer statistischen

Sicherheit von 95% die Annahme einer Normalverteilung nicht abgelehnt werden. Die erste Bedingung für die Anwendung der gebräuchlichen statistischen Verfahren t-Test und ANOVA ist somit, für die Messreihen zum Parameter Temperatur, erfüllt.

3.1.2.2 Prüfung auf Varianzhomogenität: Versuche zum Parameter Temperatur

Im Folgenden finden sich die Ergebnisse des Hartley – Tests, welcher auf die Versuchsdurchführungen zu den Parametern Temperatur angewendet wurde. Geprüft wurde, ob die zu vergleichenden Testreihen homogene Varianzen aufweisen. Verglichen wurden jeweils paarweise die Varianzen der Messreihen und der gleichzeitig durchgeführten Referenzreihen. Zum anderen wurden weiterhin die Versuchsreihen der Temperaturversuche, welche unter näherungsweise gleichen Versuchsbedingungen aufgenommen wurden (Raumtemperatur und Referenztemperatur) mit dem Hartley - Test auf Varianzhomogenität getestet. Hier betrug die Anzahl an Gruppen $k = 3$ bzw. $k = 4$.

Zur Auswertung wird die berechnete Größe F_{\max} dem tabellierten F_{tab} gegenüber gestellt. Die tabellierte Maßgröße F_{tab} , welche als Vergleichswert gilt, wird durch die Anzahl an Gruppen k und die Anzahl an Freiheitsgraden in den jeweiligen Gruppen $v = n - 1$, unter der Bedingung gleich großer Stichprobenmengen, bestimmt (Sachs 1971). Die Ergebnisse des Testes sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Ergebnisse des Hartley – Tests. Paarweiser Varianzvergleich der Versuchsreihen mit ihren jeweiligen Referenzen. Berechnete Werte F_{\max} , tabellierte Werte F_{tab}

Versuchsdurchführung	F_{\max}	F_{tab}
Versuch 1	1,4	9,6
Versuch 2	1,4	9,6
Versuch 3	1,9	9,6
Versuch 4	2,8	9,6

Für die Versuchsreihen zum Temperatureinfluss ergibt sich ein tabellierter F_{\max} -Wert von $F_{(2; 4)} = 9,6$ (Sachs 1971). Wie zu erkennen ist, liegen alle berechneten Werte F_{\max} deutlich unter den tabellierten F-Werten. Somit ist mit einer statistischen Sicherheit von 95% von homogenen Varianzen auszugehen. Die Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur können nun paarweise anhand des t-Testes miteinander verglichen werden.

In Tabelle 7 folgen des Weiteren die Ergebnisse des Hartley – Testes für die Prüfung mehrerer Messreihen ($k > 2$). Wie in Tabelle 3 ersichtlich, weicht die Versuchsdurchführung 3 hinsichtlich der mittleren Fotosyntheseaktivität deutlicher von den restlichen ab. Daher erfolgte die Prüfung auf Varianzhomogenität sowie die Durchführung der ANOVA einmal mit drei (ohne Versuchsdurchführung 3) und einmal mit allen vier Versuchsreihen. Die Prüfung auf Varianzhomogenität für die Gruppenvergleiche ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse des Hartley – Tests. Multipler Varianzvergleich der Versuchsreihen mit näherungsweise gleicher Probetemperatur. Berechnete Werte F_{\max} , tabellierte Werte F_{tab}

Messreihen	F_{\max}	F_{tab}
Temperatur 3 Reihen	2,0	15,5
Temperatur 4 Reihen	2,0	20,6
Referenzen 3 Reihen	2,1	15,5
Referenzen 4 Reihen	2,7	20,6

Die berechneten Kenngrößen F_{\max} liegen deutlich unter den tabellierten kritischen Werten. Somit war die Nullhypothese – homogene Varianzen – beizubehalten und eine Anwendung der einfaktoriellen ANOVA für die Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur zulässig.

3.1.2.3 Ergebnisse zum Einfluss der Testalgenkultur

Mithilfe einer einfaktoriellen ANOVA sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich die Messreihen, aufgrund unterschiedlicher Testalgenkulturen und unterschiedlicher Versuchszeiträume, also aufgrund einer möglichen Zeitabhängigkeit, signifikant voneinander unterscheiden. Die einfaktorielle ANOVA wurde für die Temperaturversuchsreihen einmal mit drei (ohne „Ausreißer“ der Versuchsdurchführung 3) und einmal für alle vier Messreihen bei annähernd gleicher Probetemperatur durchgeführt. Die Durchführungsergebnisse der ANOVA sind in Tabelle 8 dargestellt. Der tabellierte F-Wert war abzulesen nach $F_{N-k}^{k-1}(\alpha)$. Das gewählte Signifikanzniveau α beträgt dabei 5%.

Tabelle 8: Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA. Angabe der Streuung innerhalb der Gruppen (QSI) und zwischen den Gruppen (QSZ), Anzahl an Freiheitsgraden FG sowie den berechneten Wert F und den tabellierten Vergleichswert $F_{N-k}^{k-1}(0,05)$. Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese

Einfaktor. ANOVA	QSI	QSZ	FG	F	F_{tab}	Ergebnis
Referenzen $T_{24^{\circ}\text{C}}$, 3 Gruppen	0,2749	0,0504	(2;12)	1,10	3,89	H_0 beibehalten
Reihen T_R , 3 Gruppen	0,3145	0,2664	(2;12)	5,08	3,89	H_0 abgelehnt
Referenzen $T_{24^{\circ}\text{C}}$, alle Gruppen	0,3824	7,8769	(3;16)	109,86	3,24	H_0 abgelehnt
Reihen T_R , alle Gruppen	0,5162	7,5955	(3;16)	78,48	3,24	H_0 abgelehnt

Die berechneten F-Werte liegen bei den Vergleichen aller Gruppen um ein Vielfaches über ihren jeweiligen tabellierten Vergleichswerten. Bei drei von vier Vergleichen ist letztendlich von einem

statistischen Unterschied auszugehen. Lediglich für die Betrachtung der Referenzen, wo nur drei Gruppen berücksichtigt werden, ergibt sich ein niedriger F-Wert von 1,1, der unter dem tabellierten $F_{12}^2(0,05) = 3,89$ liegt. Hierbei wurde jedoch, wie genannt, die eine Referenzreihe 3 (Ausreißer) nicht berücksichtigt.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind somit statistisch signifikant. Die Nullhypothese lautete: Die Versuchsreihen, welche unter (näherungsweise) identischen Licht- und Temperaturverhältnissen und aus unterschiedlichen Algenstammlösungen entstanden sind, entstammen derselben Grundgesamtheit. Diese Hypothese muss dementsprechend abgelehnt werden.

Die Ursache für diese Ergebnisse liegt im deutlichen Unterschied zwischen den Kenngrößen QSZ und QSI. Die Streuungen innerhalb der Gruppe (QSI) sind dabei für alle Gruppen recht niedrig. Die Versuchsreihen unterschiedlicher Temperatur zeigten alle relativ reproduzierbare Ergebnisse. Die Streuung zwischen den Gruppen (QSZ) war dagegen deutlich größer, die Mittelwerte bewegten sich in einem Bereich von 63,85 bis 65,23% für die Referenzen $T_{24^{\circ}\text{C}}$ und von 64,23 bis 65,78% für die Reihen T_{R} . Die Wahl der Testalgenkultur und des Versuchstages hat, beurteilt nach den Versuchsergebnissen zum Parameter Temperatur, statistisch einen äußerst signifikanten Einfluss auf die Höhe der messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte. Allerdings muss gleichzeitig auch gesagt werden, dass die Reproduzierbarkeit durch die Wahl der Testalgenkultur und des Versuchszeitraumes nicht negativ beeinflusst wurde. Die Streuungen der Messwerte innerhalb der Versuchsreihen waren, auch bei unterschiedlichen Probetemperaturen, vergleichbar niedrig. Ein Abfallen der Messwerte, wie in den Vorversuchen, war bei keiner der Messreihen zu erkennen. Die Versuchsreihen wiesen Aktivitätswerte von deutlich über 60% auf (siehe auch Anhang I.II). Daher beeinflussen die Faktoren Wahl der Testalgenkultur und Wahl des Versuchszeitraumes die Anwendbarkeit des statistischen Algenschnelltestverfahrens nicht.

Anhand paarweiser t – Test Vergleiche folgt nun die Untersuchung auf einen statistisch signifikanten Temperatureinfluss.

3.1.2.4 Ergebnisse zum statistischen Temperatureinfluss

Um zu erkennen, ob der Parameter Temperatur das statische Algenschnelltestverfahren beeinflusst, wurde der t-Test auf die Messreihen mit unterschiedlichen Temperaturniveaus angewendet.

Hierbei wurden aufgrund des oben dargelegten Einflusses der verwendeten Algenkultur und des Versuchszeitpunktes nur jene Versuchsreihen paarweise miteinander verglichen, welche aus derselben Algenstammlösung und zeitlich parallel angesetzt wurden. Die Referenzen sind dabei Proben, welche bei einer festen Temperatur von $T = 24^{\circ}\text{C}$ angesetzt wurden, während die Proben der Messreihen T_{R} bei Raumtemperatur angesetzt wurden. In Tabelle 9 sind die Aktivitätsmittelwerte und Standardabweichungen je Reihe sowie die daraus ermittelten t – Werte angegeben.

Tabelle 9: Ergebnisse des t-Tests für die Versuchsreihen zum Parameter Temperatur. Mittelwert (Fotosyntheseaktivität [%]) je Reihe sowie Standardabweichungen vom Mittelwert. Berechneter t-Wert t_{emp} und tabellierter Wert für $FG = 8$ und ein Signifikanzniveau von 5% bei zweiseitiger Fragestellung

Versuch	Referenzreihen $T_{24^{\circ}C}$		Messreihen T_R		t_{emp}	$t_{(8;0,05)}$	Ergebnis
	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]			
1	65,37	0,16	65,78	0,14	4,375	2,306	H ₀ abgelehnt
2	65,30	0,17	65,64	0,14	3,452		H ₀ abgelehnt
3	63,85	0,16	64,23	0,22	3,024		H ₀ abgelehnt
4	65,23	0,12	65,46	0,20	2,240		H ₀ beibehalten

Die berechneten t- Werte für den Vergleich der beiden Gruppen bewegen sich im Bereich von 2,240 bis 4,375. Der Vergleichswert nach der Student t-Verteilung, welcher sich nach Freiheitsgraden und Signifikanzniveau bestimmen ließ, beträgt $t_{(8;0,05)} = 2,306$ (Sachs 1971). Wie zu erkennen ist, liegen drei der vier berechneten t-Werte über diesem Grenzwert. Somit ist der Unterschied zwischen drei der vier Vergleichspaare statistisch signifikant. Die Nullhypothese lautete: Die Versuchsreihen zum Parameter Temperatur entstammen derselben Grundgesamtheit. Unterschiede zwischen den Messreihen sind rein zufällig entstanden, es liegt kein Temperatureinfluss vor.

Diese Hypothese muss ebenfalls abgelehnt werden. Die Temperatur beeinflusste das Messergebnis statistisch signifikant.

3.2 Ergebnisse zum Parameter Licht

Gültigkeitskriterien

Die Versuchsdurchführungen zum Parameter Licht erfüllten die Gültigkeitskriterien des statischen Algenschnelltestverfahrens nach SOP HU411.120 (2013) hinsichtlich der messtechnischen Fotosyntheseaktivität der Testalgen nur teilweise. Während die Versuchsreihen unter künstlichen Lichtbedingungen und auch alle Referenzreihen (dunkle Lichtverhältnisse) Aktivitätswerte deutlich über 60% zeigten, entstanden bei den Reihen unter Tageslichteinfluss stets Werte unter 60%. Wie in Anhang I zu erkennen, kam es bei den Versuchsdurchführungen teilweise zu Chlorophyllkonzentrationsmesswerten von über 120 $\mu\text{g/l}$, welche somit nicht mehr im definierten Bereich von $100 \pm 20 \mu\text{g/l}$ lagen. Dies kann allerdings bei der Auswertung vernachlässigt werden, da die Chlorophyllkonzentration in der Probe keinen signifikanten Einfluss auf die messtechnische Fotosyntheseaktivität hat (Eis 2007). Die Konzentrationsmesswerte wurden auch hier nicht zur Auswertung hinzu gezogen.

3.2.1 Messergebnisse

Um einen Einfluss des Parameters Licht auf das statische Algenschnelltestverfahren zu untersuchen, wurden die Algenstammlösungen, aus welchen die einzelnen Proben angesetzt wurden, verschiedenen Lichtquellen ausgesetzt. Als Lichtquellen wurden dabei das Tageslicht, die künstliche Laborbeleuchtung und dunkle Lichtverhältnisse (Referenzen) ausgewählt.

Jede Versuchsdurchführung bestand wiederum aus zwei Messreihen. Es wurde jeweils eine Referenzreihe (dunkle Lichtverhältnisse) und eine Reihe unter Kunst- oder Tageslichteinfluss parallel aufgenommen. Als Auswertekriterium galt wiederum die Messgröße Fotosyntheseaktivität. Die Versuchsergebnisse aller Messreihen zum Parameter Licht sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Dabei umfasst eine Messreihe 26 oder 27 Messwerte, welche zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden. Jede Versuchsdurchführung erfolgte über einen Zeitraum von mindestens sechs Stunden. Eine ausführlichere Auflistung aller Messwerte ist im Anhang I. hinterlegt.

Tabelle 10: Zusammenfassung aller Ergebnisse zum Parameter Licht. Angabe von Mittelwert der Fotosyntheseaktivitätswerte [%], Standardabweichung der Einzelmessungen sowie gemittelter einwirkender Lichtintensität [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

Versuchsreihe	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]	Mittelwert Strahlungsint. [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
Kunstlichtreihe 1	65,14	0,41	5,1
Kunstlichtreihe 2	65,98	0,24	5,1
Kunstlichtreihe 3	67,23	0,30	5,2
Kunstlichtreihe 4	66,19	0,50	5,1
Kunstl. 1 Referenz	65,69	0,25	---
Kunstl. 2 Referenz	66,09	0,18	---
Kunstl. 3 Referenz	66,92	0,30	---
Kunstl. 4 Referenz	66,26	0,56	---
Tageslichtreihe 1	62,23	3,77	31,5
Tageslichtreihe 2	61,94	4,33	35,0
Tageslichtreihe 3	56,31	10,11	134,5
Tageslicht 1 Referenz	66,38	0,22	---
Tageslicht 2 Referenz	66,51	0,34	---
Tageslicht 3 Referenz	66,71	0,23	---

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die Versuchsreihen unter künstlichem Licht sowie alle durchgeführten Referenzreihen aus den Lichtversuchen hinsichtlich der Kenngrößen mittlere Fotosyntheseaktivitätswerte und Standardabweichung vergleichbar sind. Die Reihen unter Tageslichteinfluss dagegen weisen deutlich niedrigere gemittelte Fotosyntheseaktivitätswerte sowie um ein Vielfaches höhere Standardabweichungen auf. Die Algenstammlösungen der Versuchsreihen unter Tageslichteinfluss waren dabei gemittelten Lichtintensitäten ausgesetzt, die die künstlichen Beleuchtungsintensitäten um ein Vielfaches überstiegen.

Um die Verteilungen genauer zu betrachten, wurden auch für diese Versuchsreihen Boxplots erstellt. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, überschneiden sich die Messwertebereiche der Versuchsreihen unter künstlichem Licht (Reihe 1 – 4) mit denen ihrer jeweiligen Referenzen (Ref. 1 – 4) deutlich sichtbar.

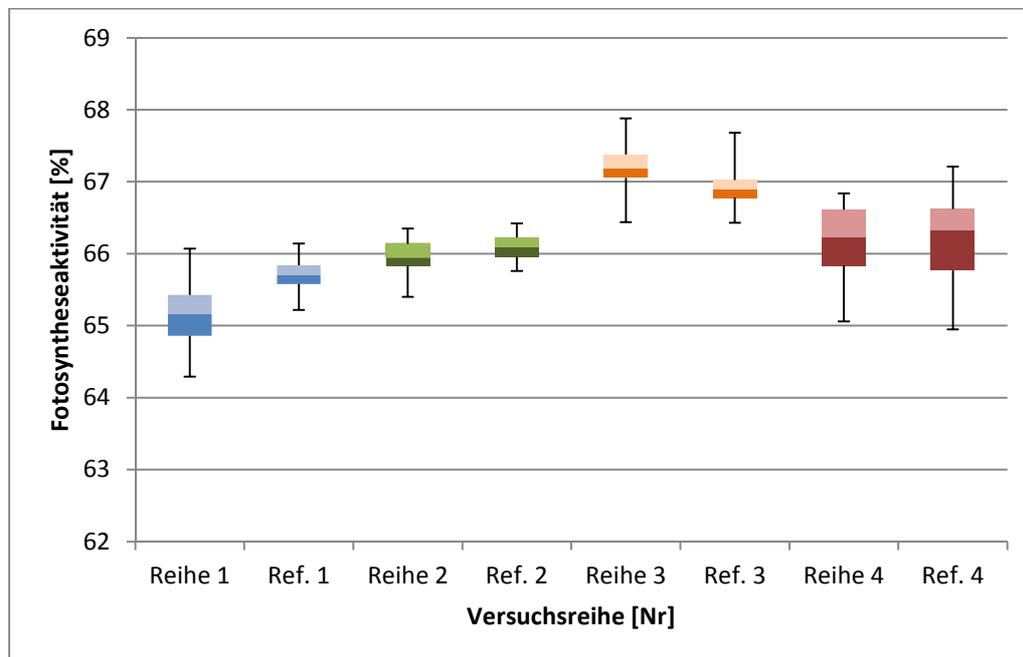


Abbildung 14: Ergebnisse der Kunstlichtversuche im Box-Whisker-Plot. Darstellung von Minimum, erstem Quartil, Median, drittem Quartil und Maximum je Messreihe

Die Medianwerte und Verteilungsbereiche der Versuchsreihen je Versuchsdurchführung unterscheiden sich geringfügig, wie anhand der jeweils zu vergleichenden Boxen zu erkennen ist. Die Boxen kennzeichnen einen Bereich, in dem sich 50% der Messwerte der jeweiligen Versuchsreihe bewegen. Dabei unterscheiden sich Versuchsdurchführung 1 und 3 in dieser Betrachtung etwas deutlicher voneinander, während die Boxen bei den Versuchsdurchführungen 2 und 4 sichtbar überlappen.

Nach Betrachtung aller vier Boxplotvergleiche ist jedoch kein systematischer Unterschied zwischen den Versuchsreihen und ihren Referenzen zu erkennen. Die gewählte künstliche Beleuchtung scheint das statische Algenschnelltestverfahren somit nicht zu beeinflussen. In Abbildung 15 folgt anhand weiterer Boxplots der Vergleich den Versuchsreihen unter Tageslichteinfluss und ihren jeweiligen Referenzreihen. Wie zu sehen ist, treten in diesen Versuchsdurchführungen deutlich höhere Streuungen auf.

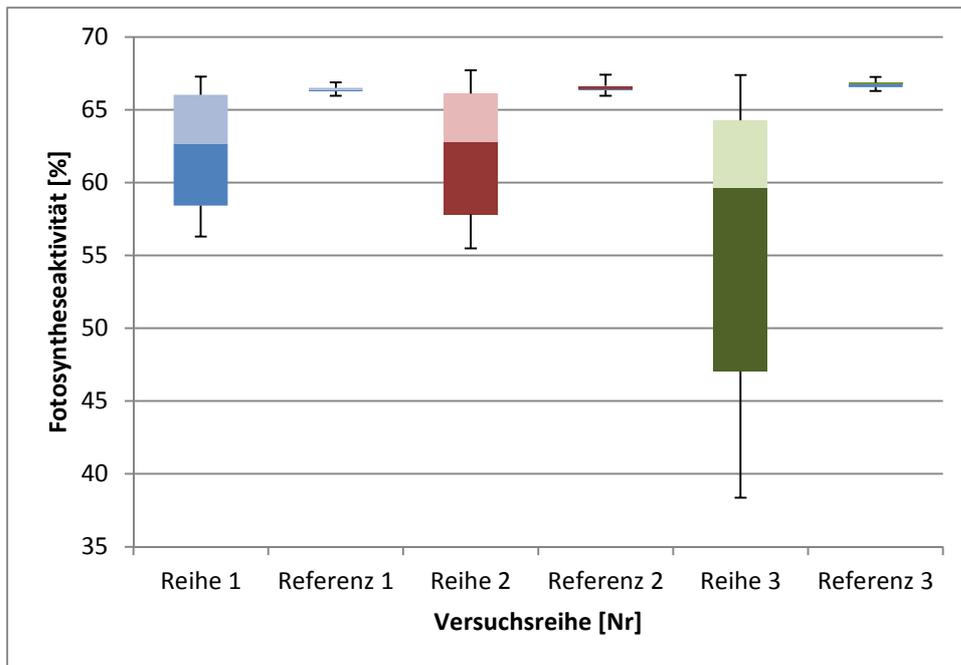


Abbildung 15: Ergebnisse der Versuchsdurchführungen zum Tageslicht im Box-Whisker-Plot. Darstellung von Minimum, Maximum, erstem Quartil, drittem Quartil und Median je Messreihe

Dies betrifft jedoch nur die Reihen unter Tageslichteinfluss, die Messwerte der jeweiligen Referenzreihen weisen dagegen nur eine geringe Spannweite auf. Nach Betrachtung der Boxplots zu den Versuchsdurchführungen unter Tageslichteinfluss ist von einem deutlichen Strahlungseinfluss auf das Messverfahren auszugehen. Zu beachten ist dabei die unterschiedliche Strahlungsintensität, der die Algenstammlösungen bei den Versuchsdurchführungen zum Tages- und Kunstlicht ausgesetzt waren.

Lichtintensitäten während der Versuche

Beim Vergleich der Reihen hinsichtlich ihrer Fotosyntheseaktivitätswerte ist der Unterschied der einwirkenden Strahlungsenergie auf die Algenstammlösung zu beachten. Diese wurde bei den Versuchsdurchführungen zum künstlichen Lichteinfluss unter der Annahme einer näherungsweise konstanten Laborbeleuchtung zu Versuchsbeginn und Versuchsende gemessen. In Tabelle 11 folgt die Auflistung der gemessenen Lichtintensitäten in der Einheit $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Referenzen waren dabei Lichtintensitäten von näherungsweise $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt, welche nicht genauer bestimmt wurden.

Tabelle 11: Lichtintensitätsmesswerte [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] der Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur und zu den Kunstlichtversuchen je zu Versuchsbeginn und Versuchsende

Versuchsdurchführung	Intensität Versuchsbeginn [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Intensität Versuchsende [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
Kunstlichtversuch 1	5,1	5,0
Kunstlichtversuch 2	5,1	5,1
Kunstlichtversuch 3	5,2	5,1
Kunstlichtversuch 4	5,0	5,1
Temperaturversuch 1	5,5	5,6
Temperaturversuch 2	5,6	5,6
Temperaturversuch 3	5,6	5,7
Temperaturversuch 4	5,7	5,6

Wie zu erkennen ist, wiesen die gemessenen Lichtintensitäten geringe Unterschiede bei Versuchsbeginn und Versuchsende auf. Die Intensität stieg über die Versuchstage leicht an. Allerdings sind diese Schwankungen, vor allem zwischen dem jeweiligen Versuchsbeginn und Versuchsende eines Versuchstages, zu vernachlässigen. Es kann von nahezu konstanten Versuchsbedingungen ausgegangen werden.

Die einwirkende Strahlungsintensität war während der Tageslichtversuchsdurchführungen dagegen deutlich höher. Hierbei traten Lichtintensitäten in einem Bereich von 4,2 bis hin zu $620 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf. Die genauen Lichtintensitätswerte der Tageslichtversuchsdurchführungen sind dem Anhang I.I. (Tabelle 28, 30 und 32) zu entnehmen.

Verlauf der Fotosyntheseaktivitätswerte: Kunstlicht

Im Folgenden werden die Versuchsreihen zum Parameter Licht hinsichtlich ihrer Fotosyntheseaktivitätsverläufe dargestellt. In Abbildung 16 wird mit den Versuchsreihen zum Parameter Kunstlicht begonnen.

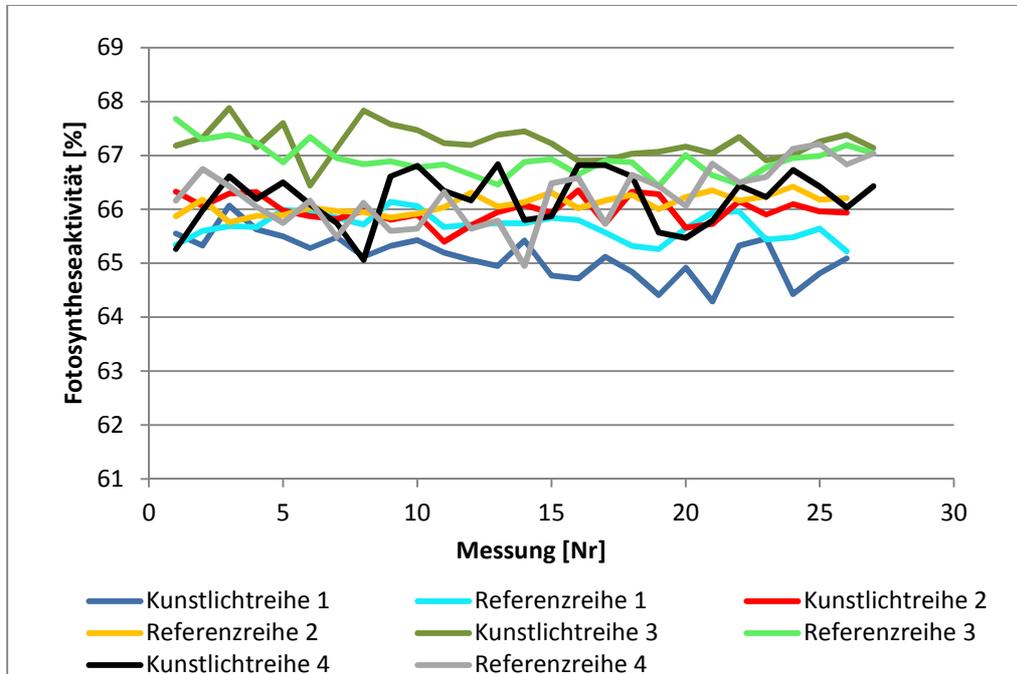


Abbildung 16: Versuchsdurchführungen zum künstlichen Licht - Verlauf der Fotosyntheseaktivitätswerte [%] je Messreihe aufgetragen gegen die Nr. der Messung (Zeitspanne mind. 6h)

Es lagen keine signifikanten Zu- oder Abnahmen der Aktivitätswerte über die Versuchszeiträume vor. Es lassen sich außerdem keine systematischen Aktivitätsunterschiede zwischen den Versuchsreihen unter künstlichem Lichteinfluss und ihren parallel durchgeführten Referenzen (dunkle Lichtverhältnisse) erkennen. Die abgebildeten Messreihen wurden des Weiteren mithilfe einer linearen Regression genauer untersucht.

Tabelle 12: Ergebnisse der linearen Regression. Angabe von Steigung sowie Bestimmtheitsmaß je Regressionsgerade

Versuchsreihe	Steigung x [%]	Bestimmtheitsmaß R^2 [-]
Kunstlicht 1	-0,0353	0,4261
Kunstlicht 2	-0,0044	0,0194
Kunstlicht 3	-0,0114	0,0816
Kunstlicht 4	0,0110	0,0309
Referenz 1	-0,0099	0,0958
Referenz 2	0,0164	0,5091
Referenz 3	-0,0196	0,2496
Referenz 4	0,0366	0,2724

Die Steigungen der linearen Regressionsgeraden weichen nur geringfügig von Null ab, was auf keinen wesentlichen negativen Einflussfaktor schließen lässt. Obwohl keine signifikante Streuung der

Aktivitätswerte in den Kunstlichtversuchen zu erkennen ist, sind die Werte der Bestimmtheitsmaße nicht besonders hoch.

Verlauf der Fotosyntheseaktivitätswerte: Tageslicht

Die grafische Darstellung aller Versuchsreihen zu einem möglichen Tageslichteinfluss folgt in Abbildung 17.

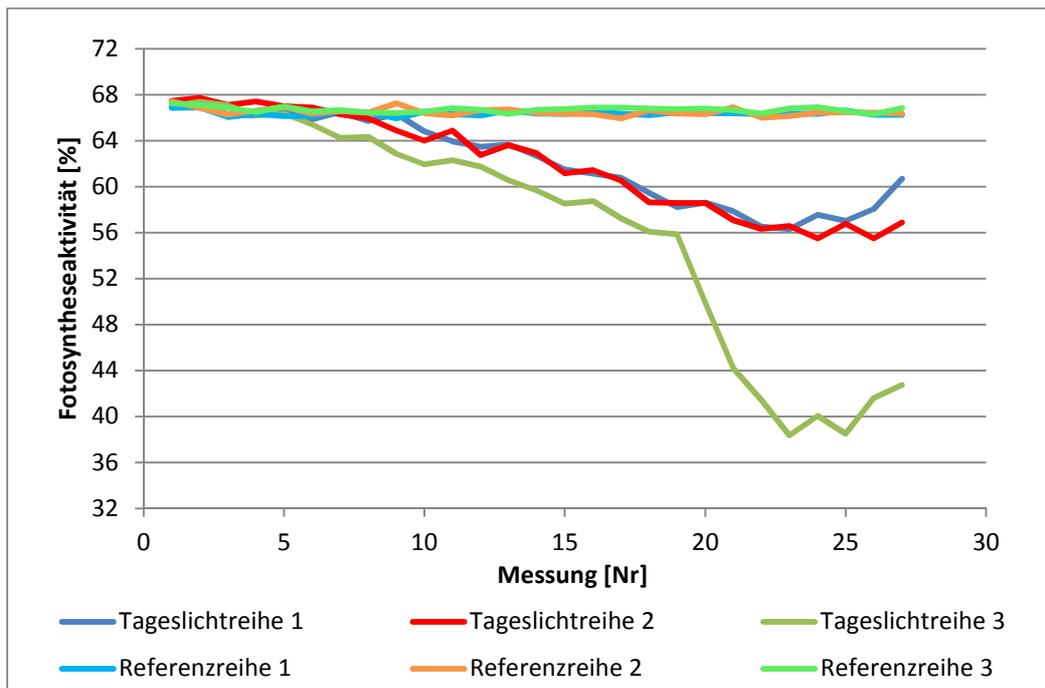


Abbildung 17: Versuchsdurchführungen zum Tageslicht - Verlauf der Fotosyntheseaktivitätswerte [%] je Messreihe aufgetragen gegen die Nr. der Messung (Zeitspanne mind. 6h)

Die abnehmenden Aktivitätswerte der Tageslichtreihen sind deutlich zu erkennen, während gleichzeitig die Referenzreihen, welche keinem Tageslichtstrahlungseinfluss ausgesetzt waren, konstante Messwerte aufweisen. Die einzelnen aufgenommenen Tageslichtintensitäten der drei Tageslichtreihen sind den Tabellen 28, 30 und 32 im Anhang I.I. zu entnehmen. Exemplarisch ist im Folgenden der Tageslichtversuch 1 grafisch dargestellt.

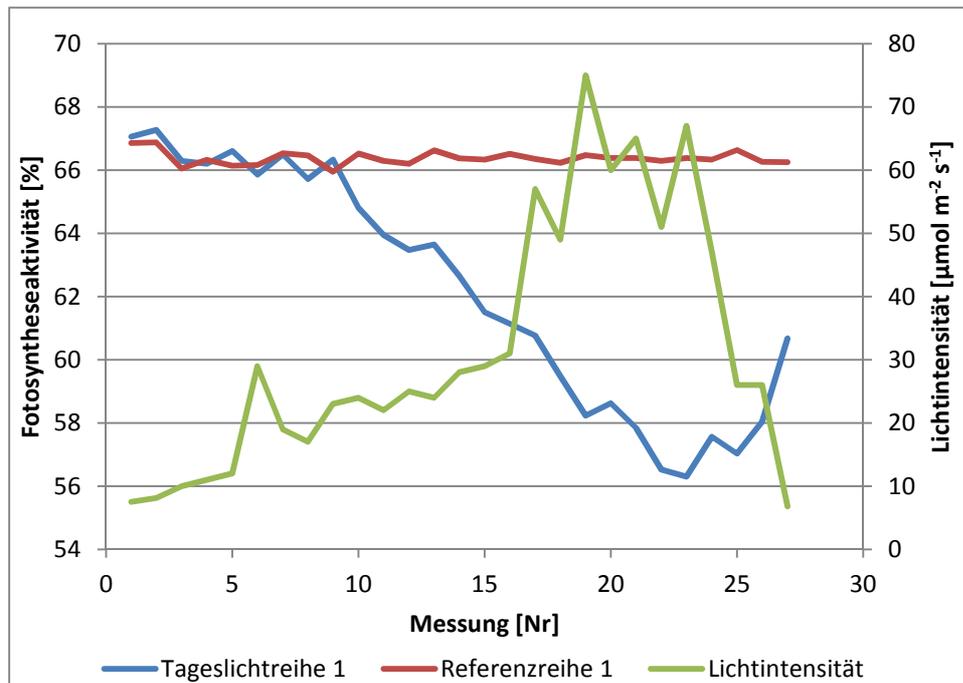


Abbildung 18: Messreihen zum 1. Tageslichtversuch (Zeitspanne mind. 6h). Darstellung der Aktivitätswerte [%] sowie der Lichtintensitätswerte [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] zum Zeitpunkt des Ansetzens jeder Probe aus der Algenstammlösung unter Tageslichteinfluss

Es ist zu erkennen, dass die Testalgenaktivitäten der Messreihe unter Tageslichteinfluss zu Beginn vergleichbar waren mit denen ihrer Referenzreihe. Ab höheren Lichtintensitätswerten von über $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nahm die Aktivität der Algen in den Proben bei dieser Versuchsdurchführung, welche aus der Stammlösung unter Strahlungseinfluss angesetzt wurden, deutlich ab. Die Testalgen, welche der abgedunkelten Referenzstammlösung entstammten, wiesen dabei über den kompletten Versuchszeitraum nahezu konstante Aktivitäten auf. Gegen Versuchsende stieg die Fotosyntheseaktivität der Versuchsreihe unter Tageslichteinfluss aufgrund einer abnehmenden Lichtintensität (Dämmerung) wieder an.

Das statische Algenschnelltestverfahren kann somit durch eine Bestrahlung der Algenstammlösung, auch bei 15minütiger Dunkelinkubation vor der Fluoreszenzmessung, beeinflusst werden.

Lichtabhängigkeit der messtechnischen Fotosyntheseaktivität

In Abbildung 19 ist die Abhängigkeit der messtechnischen Fotosyntheseaktivität von der einwirkenden tageslichtspezifischen Strahlungsintensität für alle Messreihen unter Tageslichteinfluss grafisch dargestellt. Dabei wurden von Messreihe 3 nur die ersten 19 Messwerte abgebildet, da für eine anschaulichere Darstellung ein Intensitätsintervall von 0 bis $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gewählt wurde. Wie zu erkennen, nehmen die Messwerte vor allem im niedrigen Intensitätsbereich, etwa von 0 bis $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, näherungsweise einen linearen Kurvenverlauf.

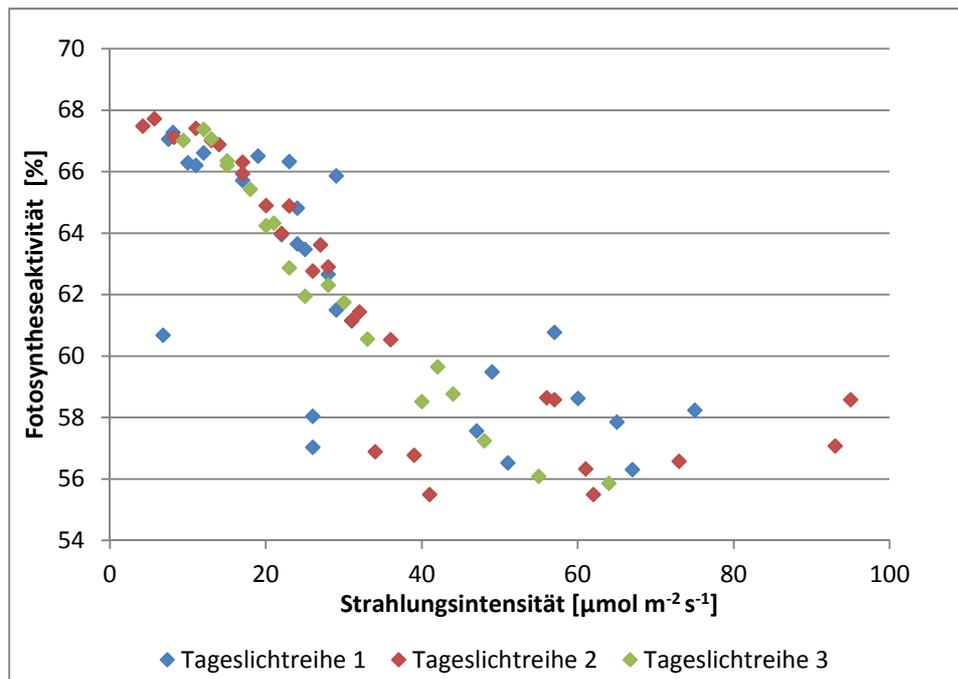


Abbildung 19: Darstellung der Aktivitätsmesswerte in Abhängigkeit von der einwirkenden Lichtintensität auf die Algenstammlösung. Alle Messwerte von Messreihe 1 und 2, erste 19 Messwerte von Reihe 3 (vergleiche Anhang I.I., Tabelle 28,30 und 32)

Bei höherer einwirkender Strahlungsintensität lässt sich eine weite Streuung erkennen, die keinen funktionellen Zusammenhang erkennen lässt. Allerdings lässt sich anhand der grafischen Darstellungen erkennen, dass die messtechnischen Aktivitätswerte für höhere Lichtintensitäten (ca. $40 - 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) deutlich niedriger sind, als die messtechnischen Aktivitätswerte der Proben unter sehr geringer Lichtintensität. Je höher die gemessene fotosynthetisch aktive Strahlungsintensität (PAR) auf die Algenstammlösung beim Ansetzen einer Probe war, desto niedriger fielen im Allgemeinen die messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte der Proben aus.

Es ließ sich daher ableiten, dass die messtechnische Fotosyntheseaktivität mit zunehmender Strahlungsintensität in einem Bereich von 0 bis $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf die Algenstammlösung abnimmt.

3.2.2 Statistische Betrachtung des Parameters Licht

Die Versuchsreihen zum Parameter Licht sollten ebenfalls statistisch untersucht werden. Hierbei konnten nur die Versuchsreihen zum Parameter Kunstlicht ausgewählt werden, da hier die Versuchsbedingungen (hinsichtlich des Strahlungseinflusses) näherungsweise konstant waren. Anhand multipler Vergleiche (H-Test) wurde untersucht, inwieweit die Wahl der Testalgenkultur einen Einfluss auf die Testgröße Fotosyntheseaktivität hat und inwieweit das Messverfahren von der Zeit abhängig ist.

Anhand paarweiser Vergleiche (t – Test und Welch-Test) konnte untersucht werden, inwieweit der künstliche Strahlungseinfluss auf die Algenstammlösung das Messverfahren beeinflusst. Der paarweise Vergleich diente somit der weiteren Analyse der zweiten Arbeitshypothese. Für eine statistische Analyse der Versuchsdurchführungen wurde im Vorhinein geprüft, ob die Anwendung parametrischer Verfahren zulässig ist. Die notwendigen Bedingungen hierfür sind eine annähernde Normalverteilung sowie homogene Varianzen der jeweils zu vergleichenden Versuchsreihen.

3.2.2.1 Prüfung auf Normalverteilung: Versuche zum künstlichen Lichteinfluss

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests für die acht Messreihen zum künstlichen Lichteinfluss dargestellt.

Tabelle 13: Prüfung der Messreihen zum Parameter Kunstlicht auf Normalverteilung: Anwendung des Shapiro-Wilk-Testes mit Maßgröße $W=b^2/S^2$. Je Messreihe Angabe von Aktivitätsmittelwert [%], Standardabweichung vom Mittelwert sowie die Berechnungsgrößen des Testes

Testgröße / Reihe	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]	b	s ²	w
Reihe 1	65,14	0,41	2,0389	4,2764	0,9721
Referenz 1	65,69	0,25	1,2061	1,5007	0,9693
Reihe 2	65,98	0,24	1,1821	1,4652	0,9537
Referenz 2	66,09	0,18	0,8666	0,7723	0,9724
Reihe 3	67,23	0,30	1,5013	2,3355	0,9651
Referenz 3	66,92	0,30	1,4765	2,2747	0,9584
Reihe 4	66,19	0,50	2,4688	6,4566	0,9440
Referenz 4	66,26	0,56	2,8072	8,0765	0,9757

Die kritischen Werte W nach Shapiro und Wilk für Messwertanzahlen von n = 26 und n = 27 und ein Signifikanzniveau von 5% betragen $W_{(n=26 ; 0,05)} = 0,920$ und $W_{(n=27 ; 0,05)} = 0,923$ (Shapiro und Wilk 2009). Wie zu sehen ist, sind die Maßgrößen W für alle Messreihen größer als die kritischen Werte W. Somit ergibt sich, dass auch bei den Messreihen der Versuchsdurchführungen zum künstlichen Licht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. Die Nullhypothese wird beibehalten. Somit ist die erste Bedingung für die Durchführbarkeit parametrischer Verfahren wie t-Test und ANOVA erfüllt. Die Gruppen wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test separat betrachtet. Für die ausgewählten Verfahren gilt es noch zu überprüfen, ob die zu vergleichenden Messreihen Ähnlichkeiten in ihren Varianzen aufweisen.

3.2.2.2 Prüfung auf Varianzhomogenität: Versuche zum künstlichen Lichteinfluss

Die zweite notwendige Bedingung für die Anwendung parametrischer Verfahren - homogene Varianzen - wurde im Folgenden für die Versuchsdurchführungen zum künstlichen Lichteinfluss untersucht. Hierbei wurden der Hartley – Test und der Levene – Test angewendet. Mit dem Hartley – Test wurde überprüft, ob die parallel durchgeführten Messreihen (künstliche Lichtquelle und dunkle Lichtverhältnisse) homogene Varianzen aufweisen.

Um die Messreihen der Versuche zum künstlichen Lichteinfluss, welche unter gleichen Lichtverhältnissen entstanden sind (künstliche Lichtquelle oder dunkle Lichtverhältnisse) auf Varianzhomogenität zu prüfen, wurde der Levene - Test ausgewählt. Dieser setzt keine gleich großen Gruppenumfänge voraus und kann deshalb, als Alternative zum Hartley-Test, in diesem Falle angewendet werden. Als Auswertekriterium gilt der berechnete F - Wert, welcher einem tabellierten Wert F_{tab} gegenübergestellt wird.

Tabelle 14: Ergebnisse des Hartley – Tests (Kunstlichtversuche). Paarweiser Varianzvergleich der Versuchsreihen mit ihren jeweiligen Referenzen. Berechnete Werte F_{max} , tabellierte Werte F_{tab}

Versuchsdurchführung	F_{max}	F_{tab}
Versuch 1	2,9	2,07 - 2,46
Versuch 2	1,9	2,07 - 2,46
Versuch 3	1,0	2,07 - 2,46
Versuch 4	1,3	2,07 - 2,46

Wie zu erkennen, liegen die berechneten F_{max} Werte bei drei von vier Vergleichen unter den kritischen tabellierten Werten. Somit ist bei den Versuchsdurchführungen zum Parameter künstliches Licht, außer bei Versuch 1, von homogenen Varianzen auszugehen. Die Versuche 2 bis 4 konnten somit mit dem t – Test untersucht werden. Für die Versuchsdurchführung 1, bei der die notwendigen Bedingungen nicht erfüllt sind, wurde daher alternativ der Welch – Test angewendet.

Die Ergebnisse des Levene - Test sind in Tabelle 15 dargestellt. Es wurden dabei die Varianzen der jeweils vier Messreihen miteinander verglichen, welche unter künstlichem Lichteinfluss und unter dunklen Lichtverhältnissen (Referenzen) entstanden sind.

Tabelle 15: Ergebnisse des Levene - Tests. Angabe von Anzahl an Freiheitsgraden FG, Streuung innerhalb der Gruppen (QSI) und zwischen den Gruppen (QSZ), sowie den berechneten Wert F und den tabellierten Vergleichswert $F_{N-k}^{k-1}(0,10)$. Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese

Levene-Test	FG	QSI	QSZ	F	F _{tab}	Ergebnis
Kunstlichtreihen	(3;102)	5,0618	0,8087	5,432	2,13 - 2,18	H ₀ abgelehnt
Referenzreihen	(3;102)	4,1724	1,5861	12,9246	2,13 - 2,18	H ₀ abgelehnt

Die berechneten Größen F liegen deutlich über dem tabellierten F_{tab}. Somit ist, bei einer statistischen Sicherheit von 90%, die Nullhypothese abzulehnen. Die Varianzen der Versuchsreihen zum künstlichen Lichteinfluss, Reihen unter künstlicher Beleuchtung sowie Referenzreihen, unterscheiden sich signifikant voneinander. Ein multipler Vergleich der Versuchsreihen mit dem parametrischen Verfahren der einfaktoriellen ANOVA ist somit nicht zulässig. Somit wurde alternativ für den multiplen Vergleich der Versuchsreihen zum künstlichen Licht der H-Test nach Kruskal-Wallis gewählt (nichtparametrisches Verfahren).

3.2.2.3 Ergebnisse zum Einfluss der Testalgenkulturwahl

Mit der Anwendung des H – Testes wurde – analog zur Anwendung der einfaktoriellen ANOVA (Temperaturversuche) - der Frage nachgegangen, ob sich die Messreihen, aufgrund unterschiedlicher Testalgenkulturen und einer Tagesform der Testalgen, signifikant voneinander unterscheiden.

Tabelle 16: Ergebnisse des H-Tests. Berechnete Testgröße H_{vers} und tabellierter Wert H_{tab}. Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese

Versuchsreihen / Testgröße	H _{vers}	H _{tab}	Ergebnis
Kunstlichtreihen	83,63	7,81	H ₀ abgelehnt
Referenzen	66,55		H ₀ abgelehnt

Nach den Ergebnissen des H-Testes liegen die empirischen Werte H_{vers} deutlich über dem tabellierten Wert H_{tab}, sodass die Nullhypothese abzulehnen ist. Die Messreihen, welche unter identischen Versuchsbedingungen, aber an verschiedenen Versuchstagen und mit verschiedenen Algenkulturen entstanden sind, unterscheiden sich signifikant voneinander. Wie auch schon bei den Versuchsreihen zum Parameter Temperatur, welche mit der einfaktoriellen ANOVA ausgewertet wurden, macht sich ein Einfluss der Algenkulturwahl bzw. der Wahl des Versuchszeitraumes statistisch bemerkbar.

Analog zu der Vorgehensweise bei den Temperaturversuchen sollten die Kunstlichtreihen und ihre Referenzen im Folgenden paarweise miteinander verglichen werden.

3.2.2.4 Ergebnisse zum statistischen Kunstlichteinfluss

Anhand paarweiser Vergleiche mit den Verfahren t – Test und Welch - Test sollte untersucht werden, ob durch die unterschiedlichen Lichteinflüsse (künstliches Licht und dunkle Lichtverhältnisse) ein Einfluss auf die Aktivitätswerte sichtbar wird. Die paarweise verglichenen Messreihen entstammen derselben Algenkultur und die Proben wurden zeitlich parallel angesetzt.

Die Referenzen sind dabei Proben, welche aus einer abgedunkelten Stammlösung angesetzt wurden. Die Proben der Kunstlichtreihen wurden dagegen aus einer Stammlösung identischer Algenkultur angesetzt, welche über den Versuchszeitraum der künstlichen Laborbeleuchtung ausgesetzt war. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der paarweisen Vergleiche zusammengefasst.

Tabelle 17: Ergebnisse des Welch-Tests (Versuchsdurchführung 1) sowie des t-Tests (Versuchsdurchführung 2 bis 4) für die Versuchsreihen zum Parameter Kunstlicht. Mittelwert (Fotosyntheseaktivität [%]) je Reihe sowie Standardabweichung vom Mittelwert. Anzahl an Freiheitsgraden FG je Vergleich, berechneter t-Wert t_{emp} und tabellierter Wert t-Wert für Anzahl FG und Signifikanzniveau von 5% bei zweiseitiger Fragestellung. Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese

Versuchsreihen	Kunstlichtreihe		Referenz		FG	t_{emp}	t_{tab}	Ergebnis
	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. [%]	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. [%]				
1	65,14	0,41	65,69	0,25	40	5,903	2,021	H_0 abgelehnt
2	65,98	0,24	66,09	0,18	50	1,849	2,009	H_0 beibehalten
3	67,23	0,30	66,92	0,30	52	3,798	2,0-2,009	H_0 abgelehnt
4	66,19	0,50	66,26	0,56	52	0,435	2,0-2,009	H_0 beibehalten

Für die Vergleiche 2 und 4 ergibt sich kein statistischer Unterschied. Die empirisch ermittelten t-Werte von 1,849 und 0,435 liegt unter dem tabellierten Vergleichswert. Für die Vergleiche 1 und 3 ergeben sich dagegen signifikante Unterschiede. Hier liegen die ermittelten t-Werte über den tabellierten Werten. Eine Interpolation des t-Wertes für FG = 52 ist nicht notwendig, da keiner der berechneten t-Werte im Intervall 2,000 bis 2,009 liegt (tabellierte Werte: $t_{(60;0,05)} = 2,000$ und $t_{(50;0,05)} = 2,009$). Es zeigte sich also nur bei zwei von vier Vergleichen ein systematischer Unterschied. Die Nullhypothese lautete: Die Versuchsreihen zum Parameter Kunstlicht entstammen derselben Grundgesamtheit. Unterschiede zwischen den Messreihen sind rein zufällig entstanden, es liegt kein Einfluss durch die künstliche Beleuchtung vor. Diese Hypothese ist beizubehalten.

Für die Versuchsdurchführungen zum Parameter Kunstlicht wird nach Betrachtung der paarweisen Vergleiche von keinem systematischen künstlichen Lichteinfluss auf die Messgröße Fotosyntheseaktivität ausgegangen. Daher wird angenommen, dass die Unterschiede zwischen den parallel durchgeführten Versuchsreihen rein zufällig entstanden sind. Das Ergebnis der paarweisen Vergleiche deckt sich mit dem der Boxplotvergleiche in Abbildung 14, wo ebenfalls kein systematischer künstlicher Lichteinfluss ersichtlich wurde.

3.3 Ergebnisse des Vergleichs Algenschnelltest - Algentoximeter

Die Laborversuchsreihen, welche in dieser Arbeit mit dem statischen Algenschnelltestverfahren erstellt wurden, sollten hinsichtlich der Streuung der Messwerte mit ausgewählten Daten der semi-kontinuierlichen Algentoximeter verglichen werden. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob unter günstigen Bedingungen eine so geringe Streuung, wie sie häufig in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter vorliegt, auch mit dem statischen Algenschnelltestverfahren erzielt werden kann.

Dabei wurde aus den Aktivitätswerten der Laborversuchsreihen nach der unter 1.3.4. beschriebenen Methode die prozentuale Fotosynthesehemmung je Probe berechnet. Es wurden dabei nur die Daten der Referenzreihen ausgewählt. Bei diesen Versuchsreihen wurden unter definierten Lichtverhältnissen (abgedunkelte Algenstammlösungen) konstante Messwerte erzielt.

Die mittleren prozentualen Hemmungswerte der gewählten Laborversuchsreihen sowie die exemplarisch ausgewählten Messreihen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Darstellung der Fotosynthesehemmung [%] (Mittelwert) sowie der Standardabweichung je Referenzreihe (Zeitspanne mind. 6h) und der ausgewählten Messwerte der Algentoximeter (Zeitspanne 1 Tag)

Versuchsreihe	Mittelwert Hemmung [%]	Stabw. Hemmung [%]
Seemannshöft	-0,33	0,21
Fischerhof	-0,51	0,09
Mittelwert	-0,42	0,15
Referenz Kunstl. 1	0,00	0,66
Referenz Kunstl. 2	0,00	0,47
Referenz Kunstl. 3	0,00	0,79
Referenz Kunstl. 4	0,00	1,50
Referenz Tagesl. 1	0,00	0,58
Referenz Tagesl. 2	0,00	0,91
Referenz Tagesl. 3	0,00	0,62
Mittelwert	0,00	0,79

Für die ausgewählten Messwerte der semi-kontinuierlichen Algentoximeter sowie der Messwerte aus den Laborversuchsreihen zum Parameter Licht wurde die mittlere prozentuale Hemmung je Probe und die Standardabweichung der Einzelmessungen bestimmt. Für die Algentoximeter ergeben sich Hemmungswerte von $-0,33 \pm 0,21$ % (Seemannshöft) und $-0,51 \pm 0,09$ % (Fischerhof). Für die Laborversuchsreihen ergeben sich mittlere Hemmungswerte von $0,00 \pm 0,79$ %. Auch ohne Berücksichtigung der Tageslichtversuchsreihen, welche eine überdurchschnittlich hohe Streuung aufweisen, liegen die mittleren Standardabweichungen der Laborversuchsreihen um den Faktor 5 bis 6 über denen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter.

Der Verlauf der berechneten Hemmungswerte für zwei Laborversuchsreihen mit relativ geringem Rauschen und den beiden ausgewählten Messwertereihen der beiden semi-kontinuierlichen Algentoximeter aus den Messstationen Fischerhof und Seemannshöft wird im Folgenden dargestellt.

Dabei wurden die beiden Laborversuchsreihen mit den geringsten Standardabweichungen (Referenzreihen des Kunstlichtversuches 2 und Tageslichtversuches 1) ausgewählt.

Wie anhand der Abbildung 20 zu erkennen ist, liegt das Rauschen des statischen Algenschnelltests auch bei relativ konstanten Messwerten noch deutlich über der Streuung der Hemmungswerte der semi-kontinuierlichen Algentoximeter.

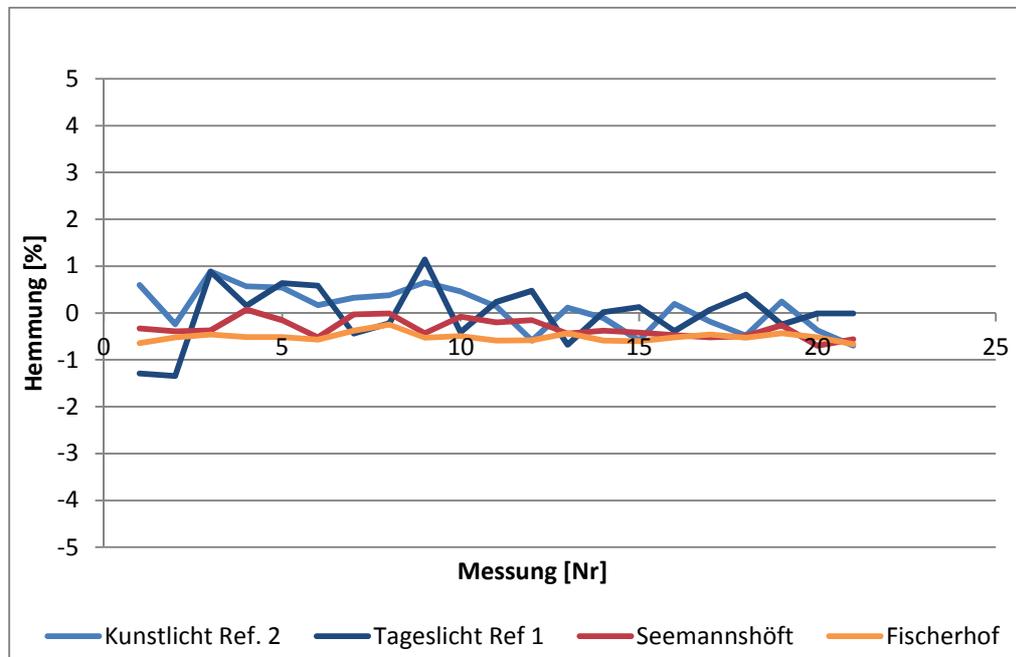


Abbildung 20: Verlauf der Fotosynthesehemmungswerte [%] bei den gewählten Messreihen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter und des statischen Algenschnelltestverfahrens

Auch bei einer Vermeidung von Strahlungseinflüssen auf die Anwendung des statischen Algenschnelltestverfahrens konnten die geringen Messwerteschwankungen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter nicht erreicht werden.

3.4 Reduzierung der Streuung beim statischen Algenschnelltestverfahren

Die Laborversuchsreihen, welche in dieser Arbeit mit dem statischen Algenschnelltestverfahren erstellt wurden, wurden abschließend mit den Versuchsreihen der Vorversuche verglichen. Die Vorversuchsreihen wurden in Praktika des HU durchgeführt und sind unter Anhang II. (Tabelle 42 – 47) tabelliert. Es sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob die hohe Streuung der Messwerte, welche in den Vorversuchen festgestellt wurde, durch Optimierung der Parameter Temperatur und Licht signifikant reduziert werden konnte. Die Versuchsreihen wurden dabei hinsichtlich der Messgröße Fotosyntheseaktivität miteinander verglichen.

Als Vergleichsreihen zu den Versuchsreihen der Vorversuche wurden dabei nur die Daten der Referenzreihen (Parameter Licht) ausgewählt. Bei diesen Versuchsreihen wurden unter definierten Lichtverhältnissen (abgedunkelte Algenstammlösungen) konstante Messwerte über längere Versuchszeiträume von mindestens sechs Stunden erzielt. Die Ergebnisse der Vorversuchsreihen und der Referenzreihen der Lichtversuche sind in Tabelle 19 hinsichtlich ihrer Aktivitätsmittelwerte sowie der Streuung der Aktivitätswerte (Standardabweichung) dargestellt.

Tabelle 19: Darstellung der mittleren Fotosyntheseaktivität [%] und der Standardabweichung je Versuchsreihe. Vergleich Vorversuchsreihen mit Referenzreihen der Lichtversuche

Versuchsreihe	Mittelwert Aktivität [%]	Stabw. Aktivität [%]
Vorversuch 1	62,31	3,12
Vorversuch 2	65,41	1,22
Vorversuch 3	65,88	0,83
Vorversuch 4	66,03	0,45
Vorversuch 5	65,11	1,03
Vorversuch 6	64,51	0,90
Vorversuch 7	63,06	1,12
Vorversuch 8	64,21	1,13
Vorversuch 9	63,15	1,01
Mittelwert	64,41	1,20
<hr/>		
Kunstlicht 1 Referenz	65,69	0,25
Kunstlicht 2 Referenz	66,09	0,18
Kunstlicht 3 Referenz	66,92	0,30
Kunstlicht 4 Referenz	66,26	0,56
Tageslicht 1 Referenz	66,38	0,22
Tageslicht 2 Referenz	66,51	0,34
Tageslicht 3 Referenz	66,71	0,23
Mittelwert	66,37	0,30

Wie unter 3.2.3. zu sehen war, konnte die geringe Streuung der Messwerte, welche in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter in der Regel vorliegt, in den Laborversuchsreihen mit dem statischen Algenschnelltestverfahren nicht erreicht werden.

Der Vergleich der Vorversuchsreihen mit den Referenzreihen zum Parameter Licht zeigt hier jedoch, dass die Streuung der messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte durch eine Vermeidung von Strahlungseinflüssen auf die Algenstammlösung um den Faktor 4 reduziert werden konnte. Jeweils vier ausgewählte Messreihen der Vorversuche (VV 1 – VV 7) und der Lichtversuche (K2 Ref. – T3 Ref.) wurden zur Veranschaulichung per Box-Whisker-Plot dargestellt.

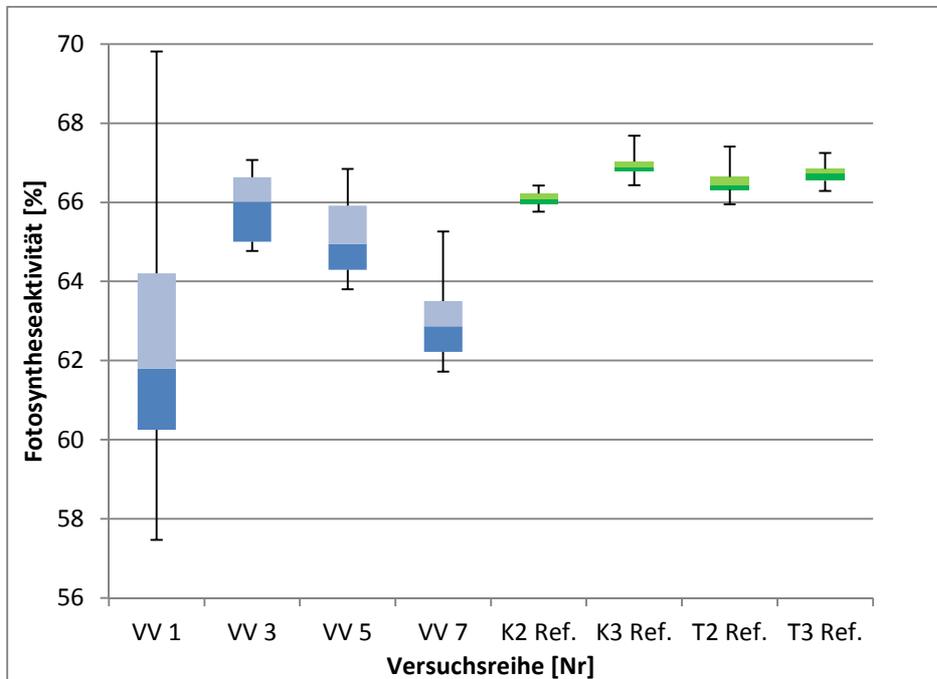


Abbildung 21: Ergebnisse ausgewählter Vorversuche und Referenzreihen (stat. Algenschnelltest) im Box-Whisker-Plot. Darstellung von Minimum, Maximum, erstem Quartil, drittem Quartil und Median je Messreihe

Die Referenzreihen wurden unter nahezu identischen Lichtverhältnissen aufgenommen. In den Vorversuchsreihen kam es zu starken Schwankungen der Fotosyntheseaktivitätswerte aufgrund des nicht definierten (und somit teilweise stark schwankenden) Lichteinflusses auf die Algenstammlösungen während der Versuchsdurchführung.

Letztendlich konnte somit, durch eine Vermeidung von Strahlungseinflüssen auf die Algenstammlösung, eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit beim statischen Algenschnelltestverfahren erreicht werden.

4 Diskussion

Ziel der Versuche war es zu überprüfen, ob das Grundrauschen (Streuung der Messwerte) beim statischen Algenschnelltestverfahren minimiert werden kann. Ein möglicher Einfluss der Temperatur- und Lichtverhältnisse auf das statische Algenschnelltestverfahren wurde durch die dargestellten Versuche untersucht. Dabei war von Interesse, ob mit dem statischen Algenschnelltestverfahren im Labor auch über längere Versuchszeiträume von mindestens sechs Stunden ähnlich reproduzierbare Ergebnisse wie in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter erzielt werden können.

4.1 Bewertung der Arbeitshypothesen

4.1.1 Versuche zum Parameter Temperatur

Die erste Arbeitshypothese lautete:

- 1) Temperaturschwankungen während der Testdurchführung, auch innerhalb des standardisierten Bereiches von 22 ± 2 °C, beeinflussen das statische Algenschnelltestverfahren.

Wie bekannt, ist die Fotosyntheseleistung von Phytoplanktonarten von der vorherrschenden Temperatur abhängig. Je nach Art variiert dabei die optimale bzw. präferierte Temperatur. Signifikante Abweichungen von der präferierten Temperatur führen aufgrund physiologischer Abhängigkeiten zu niedrigeren Fotosyntheseraten (Staehr und Birkeland 2006). Zu niedrige Temperaturen führen zu einer abnehmenden Enzymaktivität und einer abnehmenden Membranfluidität sowie einer Abnahme des Elektronentransports. Der Photonenfluss, welcher vom Fotosyntheseapparat erfasst wird, wird eingeschränkt. Bei zu hohen Temperaturen dagegen nimmt die Fotosyntheseleistung aufgrund von Inaktivierung oder Denaturierung von Proteinen ebenfalls ab (Raven und Geider 1988). Hinsichtlich der optimalen Temperatur für Stoffwechselfvorgänge bevorzugen die meisten Grünalgenarten signifikant höhere Temperaturen als andere Algenarten (Seip und Reynolds 1995). Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob die für das statische Algenschnelltestverfahren eingesetzten Grünalgen *Chlorella vulgaris* durch eine Variation der Temperatur in den aufgezeigten Versuchen signifikant beeinflusst wurden. Die Sensitivität der Grünalge *Chlorella vulgaris* in dem von der SOP HU411.120 (2013) definierten Bereich von 22 ± 2 °C galt es in dieser Arbeit zu untersuchen.

Dafür wurden zum einem Messreihen aufgenommen, deren Proben bei Raumtemperatur angesetzt wurden. Diese Probertemperaturen lagen zu Versuchsbeginn, je nach Versuchsdurchführung, in einem Bereich von 19,4 bis 20,1°C bzw. 21,0 bis 21,5°C. Somit lagen diese teilweise leicht außerhalb und eher im unteren definierten Temperaturbereich.

Die jeweiligen Referenzproben, welche aus derselben Algenstammlösung angesetzt wurden, wiesen zu Versuchsbeginn eine Probertemperatur von 24,0 °C auf. In den Versuchen zeigte sich, dass die gemittelten Fotosyntheseaktivitätswerte der erwärmten Referenzproben stets geringer ausfielen, als dies bei den Proben, welche parallel bei Raumtemperatur angesetzt wurden, der Fall war. Ein systematischer Temperatureinfluss auf das Messverfahren wurde ersichtlich. Allerdings betrogen die

prozentualen Abweichungen zwischen den Versuchsreihen T_R und ihren Referenzen $T_{24^\circ\text{C}}$ maximal 0,62%. Der Parameter Temperatur scheint das Verfahren, entgegen der bisherigen Hypothese, im betrachteten Temperaturbereich somit nicht wesentlich zu beeinflussen. Nach bisherigem Stand war von einem deutlichen Temperatureinfluss auszugehen: „Die Temperatur beeinflusst die Testergebnisse signifikant und muss definiert werden“ (Eis 2007). Hierbei wurden allerdings Proben mit erheblich höheren Temperaturdifferenzen verglichen, wie in Abbildung 22 zu erkennen ist.

Es ist die Hemmung der Fotosyntheseleistung in Prozent dargestellt, welche sich aus den berechneten Fotosyntheseaktivitäten, zwischen schadstoffbelasteter (Referenzschadstoff Isoproturon) und unbelasteter Probe (Kontrolle), ergibt. Wie in der Grafik zu erkennen ist, wurden dabei Proben miteinander verglichen, welche auf 5°C, 15°C, 25°C und 35°C erwärmt oder abgekühlt wurden. Die Temperaturdifferenz zwischen den einzelnen Proben betrug also näherungsweise 10 °C.

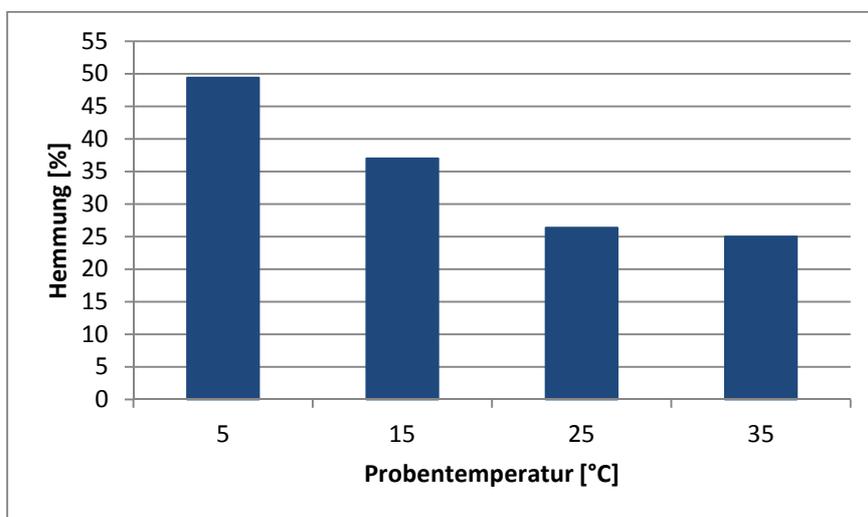


Abbildung 22: Hemmung der Fotosynthese [%] in Abhängigkeit der Probentemperatur mit 10µg/l Isoproturon als Hemmsubstanz. Eis 2007

Dabei ergaben sich nach den Ergebnissen des statischen Algenschnelltests deutliche Unterschiede in der Fotosynthesehemmung, gleichbedeutend mit Fotosyntheseaktivitätsunterschieden. Die in dieser Arbeit ausgewerteten Versuchsreihen wiesen dagegen deutlich geringere Probentemperaturdifferenzen in einem Bereich von [19,4 ; 24,0] °C (Testbeginn) und [21,9 ; 24,5] °C (Testende) auf. Des Weiteren wich der Versuchsaufbau nach Eis (2007) von dem in dieser Arbeit ab. So wurde z. B. auf eine Dunkelinkubation verzichtet. Außerdem wurden schadstoffbelastete Proben gemessen und die Fotosynthesehemmung im Verhältnis zur unbelasteten Proben berechnet, während sich in den Versuchsdurchführungen dieser Arbeit auf die Bestimmung der Fotosyntheseaktivität unbelasteter Proben beschränkt wurde.

Schlussfolgerung

Die erste Arbeitshypothese ging von einem wesentlichen Temperatureinfluss auf das statische Algenschnelltestverfahren im praxisrelevanten Bereich von ca. 22 ± 2 °C aus. Anhand der nun vorliegenden Ergebnisse lässt sich diese Hypothese nicht bestätigen. Der Parameter Temperatur hat dennoch einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Messverfahren. Die Reproduzierbarkeit der Fotosyntheseaktivitätsmessungen wird jedoch durch schwankende Temperaturverhältnisse in einem Bereich von 22 ± 2 °C nicht wesentlich beeinträchtigt.

Der Parameter Temperatur hat somit im untersuchten Bereich einen zu vernachlässigenden Einfluss auf das Messverfahren. Die Messreihen, welche sich zu Testbeginn um teilweise über 4,0 °C unterschieden, wiesen letztendlich eine durchschnittliche Aktivitätsdifferenz von unter einem Prozent auf. Eine so deutliche Temperaturdifferenz, wie sie bei den Versuchsdurchführungen gewählt wurde, tritt im geregelten Laborbetrieb nicht auf. Somit muss ein Temperatureinfluss, bei ordnungsgemäßer Durchführung des Testes, nicht befürchtet werden.

Somit kann außerdem ein Temperatureinfluss auf die Versuchsreihen zum Parameter Licht ausgeschlossen werden. In den Versuchsdurchführungen war stets ein Temperaturanstieg zu erkennen, wie in Anhang I.I. anhand der einzelnen Messreihen ersichtlich ist. Jedoch ist dabei die Temperaturdifferenz zwischen erster und letzter Probe bzw. Versuchsbeginn und Versuchsende weitaus geringer, als die gewählten Temperaturdifferenzen während der Temperaturversuche.

Die Faktoren „Wahl der Testalgenkultur“ und „Wahl des Versuchszeitraumes“ zeigten einen Einfluss auf die mittlere Fotosyntheseaktivität der Testreihen. Jedoch war die Reproduzierbarkeit aller Testreihen, bei Variation dieser beiden Faktoren, vergleichsweise hoch. Die Reproduzierbarkeit der Messwerte ist somit von diesen beiden Faktoren nicht abhängig. Es muss vor Testbeginn allerdings gewährleistet werden, dass die Fotosyntheseaktivität der gewählten Testalgenkultur über den geforderten 60% liegt.

4.1.2 Versuche zum Parameter Licht

Die zweite Arbeitshypothese lautete:

- 2) Die Lichtintensität, welcher die Algenstammlösung während der Versuchsdauer ausgesetzt ist, beeinflusst das statische Algenschnelltestverfahren.

Die Versuche zu einem möglichen Lichteinfluss zeigten ein eindeutiges Ergebnis. Verglichen wurden hierbei die messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte, welche bei den Tageslicht- oder Kunstlichtreihen und ihren Referenzreihen parallel aufgenommen wurden. Ein Lichteinfluss ist vorhanden, wenn die messtechnischen Aktivitätswerte einer Tageslicht- oder Kunstlichtmessreihe signifikant von denen ihrer jeweiligen Referenzreihe abweichen.

Die Tageslichtreihen zeigten ein strahlungsbedingtes Abfallen der Aktivitätswerte, während kein Einfluss der künstlichen Laborbeleuchtung auf das Messverfahren zu erkennen war. Die einwirkende Lichtintensität auf die Algenstammlösung der Tageslichtversuchsreihen wurde beim Ansetzen jeder Probe gemessen. Hierbei kam es durch Tageszeitpunkt, Lage des Raumes 322 und Bewölkungsverhältnisse bedingt zu teilweise stark schwankenden Lichtintensitätswerten in einem

Bereich von 4,2 bis hin zu 620 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bei den durchgeführten Versuchen zum Parameter Licht ohne Tageslichteinfluss (künstliche Lichtquelle) wurden relativ konstante Lichtintensitäten, bei gegebenem Abstand zur Lichtquelle, im Bereich von 5,0 bis 5,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen.

Wie des Weiteren zu erkennen war, nahm die messtechnische Fotosyntheseaktivität der Messreihen unter Tageslichteinfluss erst bei Lichtintensitäten von über 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ab. Bei geringeren Lichtintensitäten zeigten sich auch bei den Tageslichtversuchen keine signifikanten Abweichungen der Tageslichtreihe zur Referenzreihe, wodurch ein Einfluss bei geringen Lichtintensitäten ($< 15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ausgeschlossen werden kann. Ein möglicher Einfluss in diesem Bereich könnte möglicherweise durch die anschließende 15minütige Dunkelinkubation ausgeglichen werden.

Durch die Betrachtung der Ergebnisse wird also deutlich, dass die messtechnische Fotosyntheseaktivität von der einwirkenden, tageslichtspezifischen Strahlungsenergie auf die Algenstammlösung abhängig ist. Nach vorherigem Stand war von keinem Lichteinfluss auf das statische Algenschnelltestverfahren auszugehen: „Der Lichteinfluss ist für das Messverfahren unbedeutend und somit frei wählbar“ (Eis 2007). Hierbei wurde jedoch kein Lichteinfluss auf die Algenstammlösung, sondern ein möglicher Lichteinfluss auf die Proben während der 15 minütigen Inkubation untersucht. So wurden Proben, welche im Dunkeln inkubiert wurden, mit Proben verglichen, die unter einer künstlichen Lichtquelle (ca. 3000 Lux) stehend, inkubiert wurden. Hierbei ergaben sich keine eindeutigen Differenzen, sodass von einem Lichteinfluss nicht auszugehen war.

Dabei ist zu bedenken, dass die Testalgen nur eine kurze Zeit einer höheren Lichtintensität als die im Dunkeln inkubierten Testalgen ausgesetzt waren (15 Minuten), während bei den durchgeführten Tageslichtversuchen sehr hohe Lichtintensitäten mindestens sechs Stunden auf die Algenstammösungen einwirken konnten. Des Weiteren wurde in den Versuchsdurchführungen nach Eis (2007) eine andere Lichtquelle verwendet. Nicht nur die Höhe der Bestrahlung, sondern der unterschiedliche Lichtquellentyp sowie die Einwirkzeit der Strahlung könnten hierbei ausschlaggebend sein. Daher scheinen diese unterschiedlichen Schlussfolgerungen plausibel zu sein.

4.2 Messtechnische und natürliche Fotosyntheseaktivität

Wie in 1.3.4. beschrieben, berechnet sich die messtechnische Fotosyntheseaktivität nach den Fluoreszenzmesswerten mit dem Genty-Parameter (Institut für Hygiene und Umwelt 2013):

$$Genty = \frac{f_m - f_o}{f_m} \cdot 100 [\%]$$

Die Berechnung der Fotosyntheseaktivität erfolgt also indirekt über die Fluoreszenzabgabe der Grünalgen. Die Testalgen, welche deutlich höheren PAR Strahlungen (dem Tageslicht) ausgesetzt waren, zeigten niedrigere messtechnische Fotosyntheseaktivitätswerte. Dabei ist aber eine schädigende Wirkung der PAR auf die Testalgen auszuschließen. Die natürliche Fotosyntheseaktivität dürfte bei den Testalgen unter Tageslichteinfluss deutlich höher sein als bei den abgedunkelten Referenzreihen, da sie während der Versuchsdurchführung einer höheren Anregungsenergie ausgesetzt waren.

Die Bestrahlung der Testalgen mit einer hohen Lichtintensität führt dazu, dass der Lichtenergiebedarf der Algen nach kurzer Zeit gesättigt ist. Die fotosynthetischen Zentren der Algen schließen sich. Durch die Reduktion der Fotozentren kommt es zum Elektronenstau, die Elektronentransportkette ist gestört und überschüssige Energie kann nicht mehr aufgenommen und gespeichert werden. Eine mögliche Abfuhr dieser überschüssigen Energie ist per Wärme oder Fluoreszenz möglich. Dadurch kommt es wohl dazu, dass die gemessenen Fluoreszenzwerte, sowohl f_0 als auch f_m , deutlich höher sind. Obwohl die Algen die 15 minütige Inkubationszeit im Dunkeln verbringen, reicht diese Zeit höchstwahrscheinlich nicht aus, um bei stetiger und starker Sonneneinstrahlung auf die Algenstammlösung einen Sättigungszustand abzubauen. Die Adaptionsphase, welche zu Beginn der Fluoreszenzmessungen erfolgt, um ebenfalls einen solchen Zustand abzubauen, ist nur von kurzer Dauer. Der gesamte Messvorgang im Fluorometer dauert nur zwei bis drei Minuten. Dieser Sättigungszustand führt zu einer geringeren Differenz des Zählers ($f_m - f_0$) und somit, im Gegensatz zu ungesättigten Algen der Referenzreihen, zu einer geringeren messtechnischen Fotosyntheseaktivität. Die Testalgen der Tageslichtversuchsreihen zeigten eine niedrigere messtechnische Aktivität, wie sie bei geschädigten Algen bzw. inaktiven Algen gewöhnlich auftritt, welche durch fotosynthesehemmende Stoffe bedingt höhere Fluoreszenzantworten aussenden. Eine Photoinhibition, verursacht durch einen deutlichen Lichtüberschuss, scheint bei Testdurchführungen mit höherer Tageslichteinstrahlung vorzuliegen.

Diese Schlussfolgerungen decken sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie, bei der Feldmessungen mit der Flechte *Punctelia subrudecta* durchgeführt wurden. Hierbei wurden ebenfalls hohe Tageslichtabhängigkeiten der Parameter f_0 und f_m bei PAM-fluorometrischen Messungen (Mini-PAM, Walz, Germany) aufgezeigt (Baruffo und Tretiach 2007). Auch bei vorheriger 30 minütiger Dunkeladaption vor den jeweiligen Fluoreszenzmessungen zeigten die Organismen an den Messtagen, wo niedrigere Tageslichtstrahlung auf die Testorganismen einwirkte, eine höhere messtechnische Fotosyntheseaktivität. Der Strahlungseinfluss auf die Testorganismen schwankte dabei deutlich in einem Bereich von 40 bis 580 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Diese Spannweite ist vergleichbar zu den Werten aus den in dieser Arbeit durchgeführten Tageslichtversuchen. Hierbei war zu bedenken, dass neben der fotosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) auch andere Faktoren wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur variierten. Die Problematik von saisonalen Temperaturschwankungen in einem Bereich von 5 - 7°C bis hin zu 22°C sollte durch Temperatur-Korrekturkennlinien minimiert werden. Nichtsdestotrotz wurde aus den Daten eine deutliche Abhängigkeit der PS II Funktionalität von den vorherrschenden Lichtbedingungen ausgemacht.

In einer Studie mit der mediterranen Alge *Peyssonnelia squamata* wurden ebenfalls unter Tageslichteinfluss niedrigere messtechnische Fotosyntheseaktivitäten mittels PAM-Fluorometrie erzielt (Häder et al. 1998). Hierbei zeigte sich auch ein Hemmungseffekt bei den PAM-Messungen nach vorheriger PAR Bestrahlung der Algen. Bei Messungen über einen ganzen Tag nahmen die zunächst hohen Fotosyntheseaktivitäten zum Nachmittag hin, verbunden mit zunehmender Sonneneinstrahlung auf die Testalgen (übliche Einstrahlung bei klarem Himmel mit bis zu 390W/m² angegeben), um bis zu 25% ab. Gegen Abend stiegen die Fotosyntheseaktivitätswerte wieder an.

Dies deckt sich mit den Versuchsergebnissen der Tageslichtversuche (siehe beispielhaft Abbildung 18). Die Versuchsdurchführung erfolgte hier an einem Tag im Winter, wobei es zu Versuchsbeginn und Versuchsende dämmerte. Wie zu erkennen ist, war die messtechnische Fotosyntheseaktivität zu Beginn relativ hoch und fiel mit zunehmender PAR über den Vormittag/Nachmittag ab, stieg aber

gegen Testende wieder an. Dies lag an der abnehmenden Tageslichtstrahlung aufgrund der einsetzenden Dämmerung.

In anderen Untersuchungen mit Keimlingen von gewöhnlichen Weizenblättern wurde die Fotosyntheseaktivität dieser PAM-fluorometrisch nach Kultivierung unter unterschiedlichen Strahlungsintensitäten bestimmt (Behera und Choudhury 2003). Die fünf- bis siebentägige Kultivierung erfolgte mit mäßiger und höherer Bestrahlungsstärken (15, 30, 45 W/m²) und einmal mit anschließender fünftägiger Kultivierung unter Lichtstress bei 250 W/m². Es zeigte sich für alle Proben eine geringere messtechnische Fotosyntheseaktivität bei anschließender Kultivierung unter hoher Lichtintensität als ohne dieser zweiten Phase, auch wenn die Proben vor den Fluoreszenzmessungen jeweils 10 Minuten dunkel adaptiert wurden. Des Weiteren wurde ausgesagt, eine Kultivierung mit anschließender Bestrahlung mit hoher Lichtintensität vor der Fluoreszenzmessung führe zu einer geringeren messtechnischen Aktivität, woraus eine geringere Effizienz der fotochemischen Reaktionszentren suggeriert wird.

In einer Studie, wo Phytoplanktonproben mit Stickstoff und Phosphor ergänzt wurden, um deren Einfluss auf die PS II Fluoreszenz zu untersuchen, wurde ebenfalls ein Beeinflussung der PAM-fluorometrischen Auswertung durch eine PAR Strahlung festgestellt (Harrison und Smith 2013). Die entnommenen Seeproben wurden vor der ersten Messphase zwei Stunden lang bei „geringer Lichtintensität“ von 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert, was eine Beeinflussung durch höhere Tageslichtstrahlung bei der Probennahme ausgleichen sollte. Bei solchen einwirkenden Lichtintensitäten auf die Algenstammlösung zeigte sich dagegen beim statischen Algenschnelltestverfahren teilweise schon ein deutlicher Einfluss. In einer zweiten Messphase, nachdem die Proben vor der zweiten Messung eine Stunde dunkel adaptiert wurden, war eine deutliche Steigerung der messtechnischen Fotosyntheseaktivitätswerte zu erkennen. Dabei stieg die messtechnische Fotosyntheseaktivität vergleichsweise überproportional bei den Proben an, welche zu Beginn die geringsten Fotosyntheseaktivitätswerte aufwiesen. Dies wurde auf einen, zu Beginn, störenden Strahlungseinfluss zurückgeführt. Auch hier wurde in der Diskussion für zukünftige Messungen empfohlen, einen störenden Einfluss der Tageslichtstrahlung bei PAM-fluorometrischen Anwendungen zu vermeiden.

Es muss nun zwischen natürlicher und messtechnischer Fotosyntheseaktivität unterschieden werden. Das Tageslicht hat durch seine hohe Intensität und tageszeitbedingte oder bewölkungsbedingte Schwankungen, anhand der Messergebnisse ersichtlich, einen negativen Einfluss auf das Messverfahren bzw. die Testgröße messtechnische Fotosyntheseaktivität.

Auch die Chlorophyllkonzentrationsbestimmung beim statischen Algenschnelltestverfahren wird durch höhere und länger einwirkende PAR Strahlungseinflüsse auf die Algenstammlösung negativ beeinflusst. Aufgrund der gespeicherten Kalibrierung (Proportionalität von Fluoreszenzemission der Testalgen und Chlorophyllkonzentration in der Probe) nahm die angezeigte Chlorophyllkonzentration über den Versuchszeitraum, aufgrund einer zunehmenden Sättigung der Algen verbunden mit zunehmender Fluoreszenzabgabe, bei den Tageslichtversuchsreihen deutlich zu. Dies wird an den Chlorophyllkonzentrationsmesswerten im Anhang I Tabellen 28, 30 und 32 deutlich.

Schlussfolgerung

Die zweite Arbeitshypothese ging von einem Strahlungseinfluss auf das statische Algenschnelltestverfahren aus. Dabei war eine mögliche Beeinflussung durch die Bestrahlung der Algenstammlösung über den Versuchszeitraum genauer zu untersuchen. Diese Arbeitshypothese hat sich durch die durchgeführten Versuchsreihen zum Parameter Licht bestätigt.

Wie bei den Versuchsdurchführungen zum Parameter Temperatur zeigte sich auch hier ein statistisch signifikanter Einfluss der Faktoren „Wahl der Testalgenkultur“ sowie der „Wahl des Versuchszeitraumes“ auf das statische Algenschnelltestverfahren. Dies hatte jedoch, analog zu den Versuchen zum Parameter Temperatur, keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Werte.

Es wurde deutlich, dass die schwankende Tageslichtstrahlung die messtechnische Fotosyntheseaktivität beeinflusst hat. Ein Einfluss der künstlichen Beleuchtung wurde dagegen nicht nachgewiesen. Bei zukünftigen Testdurchführungen muss gewährleistet werden, dass die Algenstammlösung konstanten und vor allem niedrigen Strahlungsintensitäten über den Versuchszeitraum ausgesetzt wird.

4.3 Bewertung des Vergleichs Algenschnelltest – Algentoximeter

Die Versuchsdurchführungen unter Tageslichtausschluss zeigten reproduzierbare Messergebnisse. Die Streuungen (Standardabweichungen der Einzelmessungen) der Aktivitätswerte waren dabei relativ niedrig. Dennoch zeigte sich bei den Versuchsdurchführungen mit dem statischen Algenschnelltestverfahren im Vergleich zu einem semi-kontinuierlichen Algentoximeter eine um den Faktor 5 bis 6 höhere Streuung der Messwerte, auch bei Vermeidung von einem negativ wirkenden Tageslichteinfluss. Die niedrigen Standardabweichungen der ausgewählten Hemmungsreihen der semi-kontinuierlichen Algentoximeter konnten in keiner der Laborversuchsreihen erzielt werden.

Dies liegt wahrscheinlich an den deutlich konstanteren Lichtverhältnissen in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter. Die Algen werden in den Fermentern der semi-kontinuierlichen Algentoximeter, welche vom Tageslicht und anderen äußeren Lichteinflüssen abgeschirmt sind, bei einer konstanten Temperatur von 24 °C und einer konstanten Dauerbeleuchtung kultiviert. Des Weiteren wird die Chlorophyllkonzentration automatisch kontrolliert und auf einen Schutz vor Kontaminationen geachtet (Herrmann 2009). Solch optimale Bedingungen konnten in den Laborversuchen nicht hergestellt werden.

4.4 Fazit

Das statische Algenschnelltestverfahren, welches am HU angewandt wird, sollte hinsichtlich der Parameter Temperatur und Licht optimiert werden. Es war von Bedeutung, ob sich mit dem statischen Algenschnelltestverfahren Messreihen mit einer hohen Reproduzierbarkeit, wie sie häufig in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter vorliegen, aufnehmen lassen. Des Weiteren sollte auch untersucht werden, welchen Einfluss die Wahl der Testalgenkultur auf das Algenschnelltestverfahren hat.

Durch die Versuchsergebnisse hat sich gezeigt, dass der Parameter Licht die wesentliche Einflussgröße beim statischen Algenschnelltest darstellt. Die Probleme inkonsistenter Messwerte, welche in den Vorversuchen auftraten, waren nicht auf einen Temperatureinfluss, sondern vor allem auf die hohe Lichtabhängigkeit des Verfahrens zurück zu führen. Im praxisrelevanten Bereich von 22 ± 2 °C hat der Parameter Temperatur keinen signifikanten Einfluss auf das Messverfahren. In dem getesteten Temperaturbereich zeigten sich nur geringfügige Aktivitätsunterschiede. Dennoch muss bei zukünftigen Testdurchführungen die Proben temperatur stets kontrolliert und protokolliert werden. Der Bereich von 22 ± 2 °C nach SOP HU411.120 (2013) ist einzuhalten. Die Sensitivität der Testalgen außerhalb des definierten Temperaturbereiches müsste ggf. in weiteren Versuchen untersucht werden.

Die Reproduzierbarkeit der Testgröße Fotosyntheseaktivität wird auch durch die Wahl der Testalgenkultur nicht entscheidend beeinflusst. Vor Versuchsbeginn ist aber dennoch die Aktivität der gewählten Kultur zu überprüfen. Diese muss über 60% betragen.

Dagegen ist entscheidend, welchen Lichtverhältnissen die Algenstammlösung, aus der alle Proben angesetzt werden, über den Versuchszeitraum ausgesetzt ist. Die einwirkende Tageslichtstrahlung beeinflusste das statische Algenschnelltestverfahren, auch bei 15 minütiger Dunkelinkubation vor der Messung, wesentlich. Daher muss bei der Durchführung des statischen Algenschnelltestverfahrens in Zukunft die Algenstammlösung so positioniert werden, dass längere und hohe Strahlungseinflüsse (PAR über ca. $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) vermieden werden. Eine Möglichkeit wäre das Abdunkeln der Algenstammlösung über den Versuchszeitraum.

Die Durchführung des statischen Algenschnelltestverfahrens ist auch unter Laborbeleuchtung möglich, da die gemessenen Intensitätswerte der Laborbeleuchtung, im Vergleich zur Tageslichteinstrahlung, bei gegebenem Versuchsaufbau gering genug waren. Bei einer Abweichung des Testaufbaus (Abstand zur Lichtquelle, Typ der Leuchtstoffröhren) bedarf es jedoch einer erneuten Prüfung. Theoretisch kann das statische Algenschnelltestverfahren in gewissen Situationen auch bei natürlichem Strahlungseinfluss, z.B. bei Dämmerung, eingesetzt werden, solange die auf die Algenstammlösung einwirkende PAR Strahlung deutlich unter $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bleibt.

Die hohe Reproduzierbarkeit, welche in der Regel in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter festgestellt wird, kann mit dem statischen Algenschnelltestverfahren nicht erreicht werden. Dies lässt sich durch die äußerst konstanten Temperatur-, und vor allem Lichtverhältnisse, erklären, welche in den semi-kontinuierlichen Algentoximeter vorliegen. Die Bedingungen im Labor können nicht so optimal eingestellt werden. Durch die Berücksichtigung der Lichtverhältnisse beim statischen Algenschnelltestverfahren konnte die Reproduzierbarkeit der Messwerte allerdings deutlich, um den Faktor 4, im Vergleich zu den Vorversuchen verbessert werden.

Literaturverzeichnis

- Baruffo, L.; Tretiach, M., 2007: Seasonal variations of F_0 , F_m and F_v/F_m in an epiphytic population of the lichen *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog. *The Lichenologist* 39(6) p. 555 – 565, United Kingdom
- Behera, R. K.; Choudhury, N. K., 2003: High irradiance-induced changes in carotenoid composition and increase in non-photochemical quenching of Chl a fluorescence in primary wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* 160, ProQuest Aquatic Science Collection, p. 1141 – 1146, India
- Campbell, N. A.; Reece, J. B., 2009: *Biologie*. 8. Überarbeitete Auflage, Pearson Studium, München
- Chang, J. C.; John, A. B.; Young, E. B., 2012: Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae. *Water Research* 46: p. 2615 – 2626, USA
- Eis, L., 2007: Entwicklung eines Schnelltestverfahrens zur Bestimmung toxischer Wirkungen von Wasserproben gegenüber Grünalgen. Diplomarbeit, Hamburg
- Eis, Lajana, 2009: Schnelltestverfahren für Wasserproben: Bestimmung toxischer Wirkungen von Wasserproben gegenüber Grünalgen, VDM Verlag, Saarbrücken
- Fai, P. B.; Grant, A.; Reid, B., 2007: Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, No. 7, p. 1520 – 1531, USA
- Fent, Karl, 2013: *Ökotoxikologie*, Thieme Verlag, Stuttgart
- Figuerola, F. L.; Jerez, C. G.; Korbee, N., 2013: Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. *Lat. Am. J. Aquatic Research* 41(5): p. 801- 819, Spain
- Fomin, A.; Oehlmann, J.; Markert, B., 2003: *Praktikum zur Ökotoxikologie – Grundlagen und Anwendung biologischer Testverfahren*. ecomed-Verlag, Landsberg ; Stuttgart-Hohenheim
- Häder, D. P.; Porst, M.; Santas, R., 1998: Photoinhibition by solar radiation in the Mediterranean alga *Peyssonelia squamata* measured on site. *Plant Ecology* 139, p. 167 – 175, Netherlands
- Harrison, J. W.; Smith, R. E. H., 2013: Effects of nutrients and irradiance on PSII variable fluorescence of lake phytoplankton assemblages, *Aquatic Sciences* 75, p. 399 – 411, Springer Verlag, Basel
- Herrmann, H., 2009: Untersuchungen zur Praxistauglichkeit eines modifizierten Algentoximeters. Bachelorarbeit, Hamburg
- Institut für Hygiene und Umwelt (HU), 2013: Algenschnelltest zur Ermittlung toxischer Wirkungen von Wasserproben gegenüber Grünalgen mit dem BBE-Küvetten-Fluorometer. SOP HU411.120, Hamburg
- Juneau, P.; Popovic, R., 1999: Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application. *ProQuest Aquatic Science Collection, Ecotoxicology* 8: p. 447 – 453, Netherlands
- Kohl, J. G.; Nicklisch, A., 1988: *Ökophysiologie der Algen, Wachstum und Ressourcennutzung*. Akademie-Verlag, Berlin
- Köhler, W.; Schachtel, G.; Voleske, P., 2012: *Biostatistik. Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler*. 5.Auflage, Springer Verlag, Gießen und Aachen

- Komárek, J.; Fott, B., 1983: Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In: Das Phytoplankton des Süßwassers, 7. Teil (Huber-Pestalozzi), Stuttgart
- Lechelt, M.; Eis, L.; Baier, B., 2011: Algenschnelltest – Eine Alternative zum Wachstumshemmtest? Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg
- Lozán, J. L., 1992: Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg
- Magnusson, M.; Heimann, K.; Negri, A. P., 2008: Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. Marine Pollution Bulletin 56, p. 1545–1552, Australia
- Marwood, C.A.; Smith, R.E.H.; Furgal, J. A.; Charlton, M.N.; Solomon, K.R.; Greenberg, B.M., 2000: Photoinhibition of natural phytoplankton assemblages in lake Erie exposed to solar ultraviolet radiation, Aquatic Science 57, p. 371 - 379
- Munk, K.; Tüffers, A. et al. , 2009: Taschenlehrbuch Biologie: Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Petit, P. U., 2009: Globale Wasserkrise und internationale Wasserkonflikte, in: Peter Cornelius Meyer-Tasch (Hg.): Welt ohne Wasser. p. 157 – 182, Frankfurt am Main
- Preißner, I., 2009: Die Rolle des Cytochrom b_6/f -Komplexes in der photosynthetischen Elektronentransportkette. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf
- Raven, J.A.; Geider R.J., 1988: Temperature and algal growth. New Phytologist 110, p. 441 - 461
- Rudolf, M.; Kuhlisch, W., 2008: Biostatistik. Eine Einführung für Biowissenschaftler. 1. Auflage, Addison-Wesley Verlag, München
- Sachs, L., 1971: Statistische Auswertungsmethoden. 3. Auflage, Springer Verlag, Kiel
- Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P. Y.; Vaca-Garcia, C., 2014: Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Reviews 35, p. 265 – 278, France and Saudi Arabia
- Schreiber, U.; Müller, J.F.; Haugg, A.; Gademann, R., 2002: New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. Photosynthesis Research 74, p. 317 – 330
- Schreiber, U.; Schliwa, U.; Bilger, W., 1986: Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthetic Research, p. 51 - 62
- Schulten, C., 2006: Aufreinigung und Charakterisierung des D1-Proteins aus dem Photosystem II höherer Pflanzen: Entwicklung eines Biosensors auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie. Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn
- Schwoerbel, J.; Brendelberger, H., 2005: Einführung in die Limnologie. 9. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag ; Heidelberg
- Seip, K.I.; Reynolds, C.S., 1995: Phytoplankton functional attributes along trophic gradient and season. Limnology and Oceanography 40, p. 589 - 597
- Shapiro, S. S.; Wilk, M. B., 2009: An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). Biometrika Trust, Vol. 52, p. 591 – 611, Great Britain

Sjollema, S. B.; Garcia, G. M.; van der Geest, H. G.; Kraak, M. H.S.; Booij, P.; Vethaak, A. D.; Admiraal, W., 2013: Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environmental Pollution* 187, p. 106 – 111, Amsterdam

Staehr, P.A.; Birkeland, M., 2006: Temperature acclimation of growth, photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species. *Aquatic Science Collection, Phycologia* 45, p. 648 - 656

Vogel, G.; Angermann, H., 1996: dtv-Atlas zur Biologie. Band 1, München

Wang, W.; Freemark, K., 1995: The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol. Environmental Saf* 30: p. 289 – 301

Webverzeichnis

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU), 2013: Chemikalien in Gewässern: Risikoanalyse – Exposition und Wirkung. http://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/chemikalien_gewaesser-/index.htm (Stand 18.03.2015)

Chlorella-vulgaris.eu: Chlorella vulgaris – die grüne Kraft. <http://www.chlorella-vulgaris.eu/> (Stand 01.03.2015)

Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ), 2011: Biodiversität und Wasser. <http://www.ufz.de/index.php?de=19987> (Stand 19.04.2015)

Internationale Kommission zum Schutz des Rheins (IKSR), 2006: Der Wendepunkt: Der Sandoz-Unfall (1.11.1986). <http://www.iksr.org/index.php?id=387> (Stand 18.03.2015)

Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (LUBW), 2011: 25 Jahre Sandoz - Die LUBW setzte neue Akzente bei der Gewässerüberwachung. <https://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/211117/> (Stand 18.03.2015)

Philips, 2008: Hohe Lichtströme trotz Temperaturschwankungen – Philips MASTER TL5 HO TOP. Hamburg. http://www.lighting.philips.de/pwc_li/de_de/connect/tools_literature/Broschueren_Datenblaetter_Leporellos/Assets/Lampen_EVG_Datenblaetter/Leuchtstofflampen/tl5_ho_top_d_juni08.pdf (Stand 12.04.2015)

United Nations (UN), 2012: World Water Development Report 4. <http://www.un.org/waterforlife-decade/scarcity.shtml> (Stand 28.04.2015)

Anhang

Im Anhang I sind alle Versuchsergebnisse zu den Parametern Temperatur und Licht tabelliert. Unter Anhang II sind die einzelnen Messwerte der ausgewählten Vorversuche angegeben. Anhang III und IV schließen das Kapitel durch die Angaben zur Herstellung des M4-Mediums und zur Nährlösung CHOU ab.

I. Versuchsergebnisse zu den Parametern Temperatur und Licht

I.I. Versuchsergebnisse zum Parameter Licht

Tabelle 20: Versuchsreihe 1 zum Parameter künstliches Licht, Algenkultur vom 02.10.2014 unter Lichtquelle Deckenbeleuchtung (Philips Leuchtstoffröhren TL5 80W/830 HO). Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	65,55	121,04	19,8	21,2
2	65,33	127,15	19,8	21,2
3	66,07	117,50	19,8	21,3
4	65,63	123,26	19,8	21,4
5	65,50	128,49	19,9	21,4
6	65,28	118,76	19,9	21,6
7	65,48	122,55	19,9	21,5
8	65,12	127,43	20,0	21,7
9	65,32	119,76	20,0	21,5
10	65,43	128,30	20,0	21,7
11	65,20	121,59	20,1	21,8
12	65,06	120,86	20,1	21,8
13	64,95	131,86	20,1	21,9
14	65,42	121,67	20,1	22,0
15	64,77	122,46	20,1	21,9
16	64,72	122,65	20,2	21,9
17	65,12	132,16	20,2	21,8
18	64,84	122,67	20,2	22,0
19	64,41	124,86	20,2	22,0
20	64,92	123,20	20,2	21,8
21	64,29	124,82	20,3	21,9
22	65,33	127,50	20,3	22,1
23	65,46	125,58	20,3	22,0
24	64,43	130,62	20,3	22,1
25	64,81	125,31	20,3	22,0
26	65,09	126,71	20,3	22,2
Mittelwert	65,14			
Stabw.	0,41			

Tabelle 21: Referenzreihe 1 zum Parameter künstliches Licht, Algenkultur vom 02.10.2014, keine Beleuchtung, AlgenstammLösung abgedunkelt. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	65,34	123,14	19,8	21,1
2	65,60	130,78	19,8	21,3
3	65,69	131,29	19,8	21,3
4	65,67	133,81	19,9	21,2
5	65,99	134,27	19,9	21,5
6	65,96	130,88	19,9	21,6
7	65,84	132,19	20,0	21,6
8	65,72	130,80	20,0	21,6
9	66,14	130,74	20,0	21,7
10	66,06	132,77	20,0	21,9
11	65,67	130,82	20,1	21,7
12	65,72	140,05	20,1	21,7
13	65,74	131,94	20,1	22,1
14	65,74	130,33	20,1	22,1
15	65,84	130,75	20,1	22,0
16	65,80	131,41	20,2	21,9
17	65,57	131,52	20,2	22,0
18	65,32	130,92	20,2	21,7
19	65,26	130,96	20,2	22,0
20	65,65	130,88	20,2	21,9
21	65,94	131,24	20,3	21,9
22	65,96	128,51	20,3	22,0
23	65,44	132,44	20,3	22,1
24	65,48	130,14	20,3	22,2
25	65,64	132,95	20,3	22,1
26	65,22	131,32	20,3	22,1
Mittelwert	65,69			
Stabw.	0,25			

Tabelle 22: Versuchsreihe 2 zum Parameter künstliches Licht, Algenkultur vom 17.10.2014 unter Lichtquelle Deckenbeleuchtung(Philips Leuchtstoffröhren TL5 80W/830 HO). Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	66,33	108,85	19,2	20,6
2	66,06	121,19	19,3	20,6
3	66,29	106,92	19,3	20,8
4	66,32	106,84	19,4	20,7
5	65,98	121,55	19,4	20,7
6	65,87	106,80	19,4	20,9
7	65,82	107,63	19,4	21,1
8	65,98	120,80	19,4	20,8
9	65,81	120,75	19,5	21,1
10	65,90	130,24	19,5	21,0
11	65,40	108,48	19,5	21,3
12	65,70	107,27	19,6	21,2
13	65,95	121,99	19,6	21,1
14	66,08	109,76	19,6	21,2
15	65,93	110,91	19,6	21,2
16	66,35	110,37	19,6	21,2
17	65,74	123,90	19,7	21,1
18	66,33	110,05	19,7	21,2
19	66,28	111,45	19,7	21,5
20	65,66	124,45	19,7	21,5
21	65,73	110,97	19,7	21,3
22	66,15	112,06	19,7	21,2
23	65,90	123,85	19,8	21,6
24	66,10	112,56	19,8	21,5
25	65,96	125,36	19,8	21,6
26	65,94	113,88	19,8	21,5
Mittelwert	65,98			
Stabw.	0,24			

Tabelle 23: Referenzreihe 2 zum Parameter künstliches Licht, Algenkultur vom 17.10.2014, keine Beleuchtung, AlgenstammLösung abgedunkelt. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	65,87	118,62	19,3	20,7
2	66,18	117,88	19,3	20,8
3	65,76	123,69	19,3	20,7
4	65,88	121,50	19,4	20,9
5	65,89	121,70	19,4	20,9
6	66,03	123,70	19,4	21,0
7	65,97	118,52	19,4	20,8
8	65,95	124,60	19,5	21,2
9	65,85	124,26	19,5	21,0
10	65,92	123,14	19,5	21,2
11	66,04	124,56	19,5	21,3
12	66,31	124,81	19,6	21,3
13	66,05	124,45	19,6	21,3
14	66,13	124,26	19,6	21,2
15	66,31	125,82	19,6	21,3
16	66,02	126,69	19,6	21,2
17	66,16	124,76	19,7	21,1
18	66,27	125,01	19,7	21,3
19	66,00	124,96	19,7	21,2
20	66,23	126,86	19,7	21,5
21	66,35	125,80	19,7	21,5
22	66,16	126,18	19,8	21,5
23	66,24	125,13	19,8	21,6
24	66,42	127,70	19,8	21,4
25	66,18	123,79	19,8	21,6
26	66,21	126,17	19,8	21,6
Mittelwert	66,09			
Stabw.	0,18			

Tabelle 24: Versuchsreihe 3 zum Parameter künstliches Licht, Algenkultur vom 28.11.2014 unter Lichtquelle Deckenbeleuchtung(Philips Leuchtstoffröhren TL5 80W/830 HO). Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	67,18	107,54	19,6	21,2
2	67,33	106,64	19,6	21,3
3	67,88	106,97	19,7	21,4
4	67,15	100,48	19,7	21,3
5	67,60	99,83	19,8	21,6
6	66,44	97,91	19,8	21,5
7	67,14	107,53	19,8	21,5
8	67,83	105,16	19,9	21,7
9	67,58	106,87	19,9	21,8
10	67,47	107,55	19,9	21,6
11	67,23	107,19	20,0	21,8
12	67,19	105,92	20,0	21,8
13	67,38	107,50	20,1	21,9
14	67,45	107,45	20,1	22,0
15	67,22	108,40	20,1	22,1
16	66,90	101,29	20,1	22,2
17	66,91	102,70	20,1	22,1
18	67,03	109,03	20,2	22,2
19	67,07	109,79	20,2	22,4
20	67,16	110,25	20,2	22,2
21	67,04	107,80	20,3	22,1
22	67,34	105,84	20,3	22,4
23	66,91	104,70	20,3	22,4
24	67,01	103,88	20,3	22,2
25	67,26	112,38	20,3	22,3
26	67,38	111,69	20,4	22,5
27	67,14	112,67	20,4	22,5
Mittelwert	67,23			
Stabw.	0,30			

Tabelle 25: Referenzreihe 3 zum möglichen Kunstlichteinfluss, Algenkultur vom 28.11.2014, keine Beleuchtung, Algenstammlösung abgedunkelt. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	67,68	109,01	19,6	21,1
2	67,30	103,59	19,7	21,3
3	67,38	107,52	19,7	21,4
4	67,24	133,87	19,7	21,5
5	66,87	108,45	19,8	21,6
6	67,34	101,90	19,8	21,6
7	66,95	106,88	19,9	21,6
8	66,84	105,77	19,9	21,7
9	66,89	107,25	19,9	21,8
10	66,78	102,51	20,0	21,6
11	66,83	106,94	20,0	21,6
12	66,64	106,11	20,0	21,9
13	66,46	106,58	20,1	22,0
14	66,88	106,13	20,1	22,0
15	66,93	106,99	20,1	21,9
16	66,65	106,09	20,1	21,9
17	66,90	106,28	20,2	22,1
18	66,87	106,36	20,2	22,1
19	66,43	105,54	20,2	22,3
20	67,01	105,77	20,2	22,3
21	66,63	101,31	20,3	22,3
22	66,46	102,27	20,3	22,3
23	66,78	102,40	20,3	22,4
24	66,95	100,92	20,3	22,4
25	66,99	106,67	20,3	22,3
26	67,19	105,78	20,4	22,4
27	67,04	99,93	20,4	22,5
Mittelwert	66,92			
Stabw.	0,30			

Tabelle 26: Versuchsreihe 4 zum Parameter künstliches Licht, Algenkultur vom 28.11.2014 unter Lichtquelle Deckenbeleuchtung(Philips Leuchtstoffröhren TL5 80W/830 HO). Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	65,26	101,05	20,2	22,1
2	65,98	104,73	20,2	22,3
3	66,61	107,78	20,2	22,2
4	66,19	100,61	20,3	22,3
5	66,50	105,25	20,3	22,4
6	66,09	108,47	20,3	22,4
7	65,74	109,58	20,4	22,3
8	65,06	101,34	20,4	22,6
9	66,61	106,03	20,4	22,5
10	66,81	110,21	20,5	22,4
11	66,34	109,85	20,5	22,6
12	66,16	105,12	20,6	22,6
13	66,84	106,89	20,6	22,5
14	65,80	111,64	20,6	22,7
15	65,87	106,02	20,6	22,8
16	66,82	107,71	20,7	22,9
17	66,82	114,18	20,7	23,0
18	66,61	114,53	20,7	22,9
19	65,57	114,86	20,7	22,9
20	65,47	109,56	20,8	23,0
21	65,79	109,18	20,8	23,1
22	66,44	116,22	20,8	23,0
23	66,23	110,18	20,8	23,0
24	66,73	112,02	20,8	23,2
25	66,42	117,79	20,8	23,0
26	66,03	111,08	20,9	23,1
27	66,43	114,41	20,9	23,2
Mittelwert	66,19			
Stabw.	0,50			

Tabelle 27: Referenzreihe 4 zum Parameter künstliches Licht, Algenkultur vom 28.11.2014, keine Beleuchtung, Algenstammlösung abgedunkelt. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	66,16	108,94	20,2	22,0
2	66,75	109,33	20,2	22,1
3	66,43	110,13	20,3	22,3
4	66,05	110,24	20,3	22,4
5	65,75	109,21	20,3	22,3
6	66,16	109,23	20,4	22,6
7	65,49	108,71	20,4	22,5
8	66,12	108,64	20,4	22,4
9	65,60	109,34	20,5	22,7
10	65,64	108,35	20,5	22,6
11	66,32	108,89	20,5	22,6
12	65,64	108,19	20,6	22,8
13	65,79	108,63	20,6	22,8
14	64,95	108,53	20,6	22,8
15	66,48	107,69	20,6	22,8
16	66,58	108,33	20,7	22,9
17	65,73	107,80	20,7	22,8
18	66,64	108,27	20,7	23,0
19	66,43	108,21	20,8	22,9
20	66,06	107,56	20,8	23,1
21	66,85	108,16	20,8	23,0
22	66,50	107,73	20,8	22,9
23	66,60	107,95	20,8	23,1
24	67,12	108,29	20,8	23,1
25	67,21	107,66	20,8	23,0
26	66,83	107,53	20,9	22,9
27	67,03	108,74	20,9	23,1
Mittelwert	66,26			
Stabw.	0,56			

Versuchsdurchführungen unter Tageslichteinfluss

Tabelle 28: Versuchsreihe 1 zum Parameter Tageslicht, Stammlsg. unter Tageslichteinfluss. Algenkultur angesetzt am 28.11.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Einwirkende Strahlung beim Ansetzen [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] sowie Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende in $^{\circ}\text{C}$ je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Lichtintensität [$\mu\text{mol/m}^2\text{s}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	67,06	87,18	7,5	19,9	21,6
2	67,27	89,65	8,1	19,9	21,8
3	66,29	85,45	10,0	19,9	21,8
4	66,20	86,29	11,0	19,9	21,9
5	66,61	86,93	12,0	19,9	22,0
6	65,86	88,80	29,0	19,9	21,7
7	66,50	90,39	19,0	19,9	22,0
8	65,72	88,08	17,0	19,9	21,9
9	66,33	91,59	23,0	19,9	22,0
10	64,81	89,59	24,0	19,9	22,0
11	63,95	94,13	22,0	19,9	22,0
12	63,47	92,16	25,0	20,0	22,0
13	63,65	91,25	24,0	20,0	21,9
14	62,66	91,00	28,0	20,0	22,1
15	61,50	96,39	29,0	20,0	22,2
16	61,14	101,22	31,0	20,0	22,2
17	60,77	102,82	57,0	20,0	22,2
18	59,48	106,06	49,0	20,2	22,3
19	58,23	105,14	75,0	20,3	22,5
20	58,62	104,37	60,0	20,3	22,5
21	57,85	104,85	65,0	20,3	22,6
22	56,52	103,32	51,0	20,4	22,7
23	56,30	105,27	67,0	20,4	22,6
24	57,56	106,08	47,0	20,4	22,6
25	57,03	105,38	26,0	20,4	22,7
26	58,04	105,00	26,0	20,4	22,9
27	60,68	103,42	6,8	20,4	22,8
Mittelwert	62,23				
Stabw.	3,77				

Tabelle 29: Referenzreihe 1 zum Parameter Tageslicht, Reihe ohne Tageslichteinfluss. Algenkultur angesetzt am 28.11.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	66,86	90,32	19,9	21,6
2	66,88	90,44	19,9	21,7
3	66,05	90,78	19,9	21,8
4	66,32	91,12	19,9	21,9
5	66,14	90,18	19,9	21,9
6	66,16	94,78	19,9	22,0
7	66,54	86,93	19,9	22,0
8	66,46	90,22	20,0	22,1
9	65,95	89,78	20,0	22,0
10	66,53	87,31	20,0	21,9
11	66,29	91,82	20,0	22,2
12	66,20	90,35	20,0	22,1
13	66,63	91,33	20,0	22,2
14	66,37	90,55	20,0	22,2
15	66,33	91,20	20,1	22,4
16	66,52	89,51	20,3	22,4
17	66,35	91,31	20,3	22,5
18	66,23	90,20	20,3	22,6
19	66,47	90,28	20,4	22,7
20	66,38	90,27	20,4	22,7
21	66,38	89,72	20,4	22,6
22	66,29	90,27	20,4	22,8
23	66,38	89,60	20,4	22,8
24	66,33	87,75	20,4	22,8
25	66,64	90,08	20,4	22,8
26	66,26	90,33	20,4	22,9
27	66,25	96,41	20,4	22,6
Mittelwert	66,38			
Stabw.	0,22			

Tabelle 30: Versuchsreihe 2 zum Parameter Tageslicht, Reihe unter Tageslichteinfluss. AlgenstammLösung aus Kultur vom 02.01.2015. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Einwirkende Strahlung beim Ansetzen [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] sowie Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Lichtintensität [$\mu\text{mol/m}^2\text{s}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	67,48	95,88	4,2	19,4	21,4
2	67,72	103,73	5,7	19,4	21,4
3	67,12	95,00	8,2	19,4	21,5
4	67,41	94,84	11,0	19,4	21,5
5	67,01	105,30	13,0	19,5	21,5
6	66,88	108,37	14,0	19,5	21,5
7	66,31	99,71	17,0	19,5	21,6
8	65,93	108,55	17,0	19,5	21,5
9	64,89	102,08	20,0	19,5	21,6
10	63,99	109,47	22,0	19,5	21,6
11	64,88	108,21	23,0	19,5	21,5
12	62,76	114,50	26,0	19,5	21,7
13	63,62	109,83	27,0	19,6	21,8
14	62,90	116,69	28,0	19,6	21,9
15	61,15	109,44	31,0	19,6	21,6
16	61,44	118,45	32,0	19,6	21,9
17	60,53	118,89	36,0	19,6	21,7
18	58,64	118,08	56,0	19,7	21,9
19	58,58	119,67	57,0	19,7	22,1
20	58,58	124,03	95,0	19,7	22,2
21	57,07	124,75	93,0	19,8	22,1
22	56,32	124,54	61,0	19,8	22,3
23	56,57	129,17	73,0	19,8	22,2
24	55,49	129,27	62,0	19,8	22,4
25	56,77	130,07	39,0	19,9	22,5
26	55,49	127,93	41,0	20,0	22,6
27	56,88	131,53	34,0	20,1	22,5
Mittelwert	61,94				
Stabw.	4,33				

Tabelle 31: Referenzreihe 2 zum Parameter Tageslicht, Reihe ohne Tageslichteinfluss. AlgenstammLösung aus Kultur vom 02.01. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	67,41	104,75	19,4	21,3
2	66,87	98,05	19,4	21,5
3	66,27	96,21	19,4	21,5
4	66,60	104,08	19,4	21,5
5	66,94	100,90	19,4	21,5
6	66,36	102,88	19,5	21,6
7	66,57	100,82	19,5	21,6
8	66,43	103,29	19,5	21,6
9	67,25	104,64	19,5	21,7
10	66,39	100,13	19,5	21,5
11	66,20	103,36	19,5	21,6
12	66,66	105,44	19,5	21,8
13	66,72	104,86	19,5	21,9
14	66,40	104,33	19,6	21,7
15	66,33	104,50	19,6	21,9
16	66,31	104,97	19,6	21,9
17	65,95	104,95	19,6	22,0
18	66,63	104,05	19,6	21,8
19	66,36	104,53	19,7	22,0
20	66,31	104,73	19,7	21,9
21	66,90	105,37	19,7	22,2
22	66,00	105,53	19,8	22,3
23	66,14	105,58	19,8	22,3
24	66,44	105,56	19,8	22,4
25	66,48	104,33	19,9	22,5
26	66,45	105,34	20,0	22,6
27	66,37	104,71	20,1	22,6
Mittelwert	66,51			
Stabw.	0,34			

Tabelle 32: Versuchsreihe 3 zum Parameter Tageslicht, Reihe unter Tageslichteinfluss. Algenstammlösung aus Kultur vom 19.01.2015. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Einwirkende Strahlung beim Ansetzen [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] sowie Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Licht-intensität [$\mu\text{mol/m}^2\text{s}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	67,01	98,63	9,4	19,6	21,1
2	67,38	104,33	12,0	19,6	21,3
3	67,07	103,83	13,0	19,7	21,5
4	66,20	95,07	15,0	19,7	21,2
5	66,35	105,60	15,0	19,7	21,5
6	65,42	95,60	18,0	19,7	21,4
7	64,24	108,73	20,0	19,7	21,5
8	64,32	110,74	21,0	19,7	21,5
9	62,87	99,53	23,0	19,7	21,6
10	61,94	102,17	25,0	19,7	21,5
11	62,31	105,24	28,0	19,8	21,6
12	61,75	115,71	30,0	19,8	21,7
13	60,55	117,07	33,0	19,8	21,7
14	59,65	119,77	42,0	19,8	21,6
15	58,52	120,72	40,0	19,8	21,8
16	58,76	114,65	44,0	19,8	21,7
17	57,24	121,96	48,0	19,8	21,8
18	56,08	119,27	55,0	20,3	22,0
19	55,86	122,57	64,0	20,6	22,4
20	49,90	120,67	460,0	20,6	22,5
21	44,18	121,97	620,0	20,6	22,8
22	41,44	120,10	600,0	20,7	23,0
23	38,36	119,27	320,0	20,7	23,1
24	40,04	122,42	340,0	20,8	23,4
25	38,51	125,62	350,0	20,9	23,4
26	41,60	125,38	310,0	21,0	23,7
27	42,76	125,75	76,0	21,2	23,8
Mittelwert	56,31				
Stabw.	10,11				

Tabelle 33: Referenzreihe 3 zum Parameter Tageslicht, Reihe ohne Tageslichteinfluss. Algenstammlösung aus Kultur vom 19.01.2015. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Temperatur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	67,25	103,51	19,6	21,1
2	67,10	105,18	19,6	21,2
3	66,86	104,19	19,7	21,4
4	66,50	105,93	19,7	21,4
5	66,98	100,47	19,7	21,5
6	66,56	103,79	19,7	21,5
7	66,67	104,84	19,7	21,5
8	66,45	104,30	19,7	21,6
9	66,42	103,76	19,7	21,5
10	66,53	103,66	19,7	21,5
11	66,83	103,98	19,8	21,5
12	66,69	104,21	19,8	21,6
13	66,33	105,01	19,8	21,5
14	66,69	105,08	19,8	21,7
15	66,74	105,23	19,8	21,7
16	66,89	104,45	19,8	21,8
17	66,89	104,81	19,8	21,9
18	66,81	104,13	20,0	21,9
19	66,75	103,96	20,6	22,0
20	66,81	103,37	20,6	22,5
21	66,66	102,07	20,6	22,6
22	66,36	102,62	20,6	22,8
23	66,81	99,13	20,7	23,1
24	66,92	102,58	20,7	23,3
25	66,58	105,86	20,8	23,4
26	66,29	102,44	21,0	23,6
27	66,83	97,98	21,1	23,8
Mittelwert	66,71			
Stabw.	0,23			

I.II. Versuchsergebnisse zum Parameter Temperatur

Tabelle 34: Versuchsreihe 1 zum Parameter Temperatur, angesetzt bei Raumtemperatur. Algenkultur vom 10.12.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [µg/l], Proben­temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchs­ende [°C] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [µg/l]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [°C]	Temperatur der Probe nach Inkubation [°C]	Temperatur der Probe nach Messung [°C]
1	65,88	107,01	21,0	22,4	23,0
2	65,56	106,45	21,0	22,4	23,3
3	65,91	111,16	21,1	22,5	23,4
4	65,79	111,75	21,2	22,5	23,5
5	65,78	111,71	21,2	22,7	23,5
Mittelwert	65,78				
Stabw.	0,14				

Tabelle 35: Referenzreihe 1 zum Parameter Temperatur, Ansetztemperatur T=24 °C. Algenkultur vom 10.12.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [µg/l], Proben­temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchs­ende [°C] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [µg/l]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [°C]	Temperatur der Probe nach Inkubation [°C]	Temperatur der Probe nach Messung [°C]
1	65,47	111,47	24,0	23,9	24,1
2	65,38	109,31	24,0	23,7	24,0
3	65,37	107,95	24,0	23,8	24,2
4	65,10	112,07	24,0	23,0	24,3
5	65,52	112,09	24,0	23,8	24,4
Mittelwert	65,37				
Stabw.	0,16				

Tabelle 36: Versuchsreihe 2 zum Parameter Temperatur, angesetzt bei Raumtemperatur. Algenkultur angesetzt am 28.11.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Proben temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Inkubation [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	65,65	103,44	21,3	22,7	23,5
2	65,65	108,53	21,4	22,7	23,6
3	65,84	103,80	21,4	22,9	23,8
4	65,60	109,15	21,5	22,8	23,7
5	65,44	105,23	21,5	22,9	24,0
Mittelwert	65,64				
Stabw.	0,14				

Tabelle 37: Referenzreihe 2 zum Parameter Temperatur, Ansetztemperatur $T=24^{\circ}\text{C}$. Algenkultur vom 28.11.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Proben temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Inkubation [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	65,58	112,68	24,0	23,8	24,4
2	65,19	107,38	24,0	24,0	24,5
3	65,23	107,00	24,0	24,1	24,5
4	65,17	108,85	24,0	23,9	24,5
5	65,31	114,35	24,0	24,0	24,5
Mittelwert	65,30				
Stabw.	0,17				

Tabelle 38: Versuchsreihe 3 zum Parameter Temperatur, angesetzt bei Raumtemperatur. Algenkultur angesetzt am 02.01.2015. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Proben temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Inkubation [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	64,23	105,37	19,4	20,9	21,5
2	63,87	105,99	19,5	21,0	21,8
3	64,35	105,19	19,6	21,2	22,0
4	64,22	106,55	19,7	21,3	22,0
5	64,47	99,16	19,8	21,1	22,1
Mittelwert	64,23				
Stabw.	0,22				

Tabelle 39: Referenzreihe 3 zum Parameter Temperatur, Ansetztemperatur $T=24^{\circ}\text{C}$. Algenkultur vom 02.01.2015. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [$\mu\text{g/l}$], Proben temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchsende [$^{\circ}\text{C}$] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Inkubation [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur der Probe nach Messung [$^{\circ}\text{C}$]
1	63,75	105,08	24,0	22,8	23,0
2	63,66	105,59	24,0	22,9	23,1
3	63,96	106,63	24,0	23,0	23,3
4	64,07	106,06	24,0	23,0	23,2
5	63,82	103,43	24,0	22,9	23,3
Mittelwert	63,85				
Stabw.	0,16				

Tabelle 40: Versuchsreihe 4 zum Parameter Temperatur, Angesetzt bei Raumtemperatur. Algenkultur vom 30.10.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [µg/l], Proben­temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchs­ende [°C] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [µg/l]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [°C]	Temperatur der Probe nach Inkubation [°C]	Temperatur der Probe nach Messung [°C]
1	65,55	115,45	19,9	21,4	22,2
2	65,24	116,71	19,9	21,5	22,4
3	65,31	112,09	20,0	21,4	22,5
4	65,45	108,37	20,0	21,6	22,6
5	65,74	106,58	20,1	21,7	22,5
Mittelwert	65,46				
Stabw.	0,20				

Tabelle 41: Referenzreihe 4 zum Parameter Temperatur, Ansetztemperatur T=24°C. Algenkultur vom 30.10.2014. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Chlorophyllkonzentration [µg/l], Proben­temperatur zu Versuchsbeginn, nach der Inkubation und zu Versuchs­ende [°C] je Probe

Messung	Aktivität [%]	Konz. [µg/l]	Temperatur der M4-Lsg beim Ansetzen [°C]	Temperatur der Probe nach Inkubation [°C]	Temperatur der Probe nach Messung [°C]
1	65,42	111,58	24,0	23,1	23,4
2	65,24	113,75	24,0	23,3	23,5
3	65,10	118,40	24,0	23,0	23,4
4	65,18	117,59	24,0	23,0	23,4
5	65,19	122,48	24,0	23,2	23,5
Mittelwert	65,23				
Stabw.	0,12				

II. Vorversuche

Tabelle 42: Vorversuch 1. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%] sowie Geräteinnentemperatur des Fluorometers [°C] je Messvorgang

Messung	Aktivität [%]	Temp. Sensor [°C]
1	69,81	24,32
2	68,32	25,42
3	64,20	26,57
4	65,54	26,95
5	64,31	27,37
6	62,50	27,85
7	62,17	28,10
8	62,02	28,42
9	61,56	28,64
10	61,27	28,77
11	63,29	28,88
12	60,94	29,05
13	64,21	29,38
14	60,95	29,46
15	60,32	29,49
16	60,05	29,66
17	58,90	29,74
18	59,77	30,02
19	58,61	30,18
20	57,47	30,31
Mittelwert	62,31	
Stabw.	3,12	

Tabelle 43: Vorversuch 2. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], einwirkende Lichtintensität beim Ansetzen [Lux], Vergleichstemperatur des M4-Mediums beim Ansetzen [°C], Temperatur der Probe nach der Messung [°C] sowie der Geräteinnentemperatur des Fluorometers (Sensor) während des Messvorganges [°C]

Messung	Aktivität [%]	Licht-intensität [Lux]	Temperatur beim Ansetzen [°C]	Temperatur nach Messung [°C]	Temp. Sensor [°C]
1	65,82	41	20,5	23	26,78
2	66,22	44	20,5	23,1	26,8
3	65,85	45	20,5	23,2	26,96
4	66,38	45	20,5	23,1	26,92
5	65,77	44	20,4	23,3	27,08
6	66,05	306	20,5	23,4	27,29
7	65,98	284	20,5	23,2	27,22
8	66,45	284	20,5	23,3	27,2
9	65,9	319	20,5	23,4	27,4
10	66,24	325	20,6	23,5	27,43
11	65,91	1204	20,6	23,4	27,53
12	64,56	1278	20,7	23,4	27,58
13	64,26	1335	20,6	23,5	27,55
14	63,35	1375	20,6	23,5	27,57
15	62,34	1384	20,6	23,5	27,62
Mittelwert	65,41				
Stabw.	1,22				

Tabelle 44: Vorversuch 3 und 4. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Fotosynthesehemmung [%] je Probe (Referenz Mittelwert) und der Geräteinnentemperatur des Fluorometers (Sensor) während des Messvorganges [°C] sowie Mittelwert und Standardabweichung

Vorversuch 3				Vorversuch 4			
Messung	Aktivität [%]	Hemmung [%]	Temp. Sensor [°C]	Messung	Aktivität [%]	Hemmung [%]	Temp. Sensor [°C]
1	67,07	-3,22	25,54	1	66,91	-2,36	28,45
2	66,79	-2,47	26,21	2	65,82	0,58	28,46
3	66,93	-2,84	26,27	3	65,56	1,28	28,36
4	66,75	-2,36	26,46	4	66,15	-0,31	28,27
5	66,07	-0,52	26,56	5	66,06	-0,07	28,26
6	65,96	-0,23	26,66	6	66,26	-0,61	28,23
7	64,88	2,69	26,8	7	66,44	-1,09	28,33
8	64,77	2,98	26,75	8	65,96	0,2	28,45
9	64,88	2,69	26,73	9	66	0,09	28,47
10	64,93	2,55	26,84	10	65,59	1,2	28,48
11	65,24	1,72	26,89	11	66,08	-0,12	28,5
12	66,3	-1,14	26,86	12	66,56	-1,42	28,48
13	66,13	-0,69	26,87	13	66,21	-0,47	28,62
14	65,56	0,85	26,81	14	65,89	0,39	28,58
Mittelwert	65,88	0,00		15	65,02	2,73	28,79
Stabw.	0,83	2,25		Mittelwert	66,03	0,00	
				Stabw.	0,45	1,21	

Tabelle 45: Vorversuch 5 und 6. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Fotosynthesehemmung [%] je Probe (Referenz Mittelwert) und der Geräteinnentemperatur des Fluorometers (Sensor) während des Messvorganges [°C] sowie Mittelwert und Standardabweichung

Vorversuch 5				Vorversuch 6			
Messung	Aktivität [%]	Hemmung [%]	Temp. Sensor [°C]	Messung	Aktivität [%]	Hemmung [%]	Temp. Sensor [°C]
1	66,84	-4,72	26,51	1	66,85	-6,44	26,7
2	66,43	-3,6	27,11	2	64,57	-0,16	27,32
3	66,16	-2,86	27,47	3	64,95	-1,2	27,5
4	65,67	-1,52	27,79	4	64,33	0,51	27,85
5	64,95	0,44	28,11	5	64,59	-0,21	27,98
6	65,08	0,09	28,04	6	64,78	-0,73	28,06
7	64,72	1,07	28,43	7	64,48	0,09	28,35
8	64,21	2,46	28,52	8	63,83	1,88	28,5
9	64,37	2,03	28,56	9	64,04	1,3	28,54
10	64,01	3,01	28,61	10	63,51	2,77	28,69
11	63,8	3,58	28,46	11	63,72	2,19	28,54
Mittelwert	65,11	0,00		Mittelwert	64,51	0,00	
Stabw.	1,03	2,81		Stabw.	0,90	2,48	

Tabelle 46: Vorversuch 7 und 8. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Fotosynthesehemmung [%] je Probe (Referenz Mittelwert) sowie Mittelwert und Standardabweichung

Vorversuch 7			Vorversuch 8		
Messung	Aktivität [%]	Hemmung [%]	Messung	Aktivität in [%]	Hemmung [%]
1	65,26	-6,21	1	66,08	-5,19
2	64,93	-5,28	2	66,49	-6,32
3	61,72	3,77	3	64,77	-1,56
4	62,58	1,35	4	64,68	-1,31
5	63,48	-1,19	5	63,06	3,17
6	63,15	-0,26	6	63,2	2,79
7	63,19	-0,37	7	63,53	1,87
8	62,31	2,11	8	63,77	1,21
9	62,16	2,53	9	63,26	2,62
10	62,11	2,67	10	64,47	-0,73
11	63,56	-1,42	11	63,66	1,51
12	62,24	2,30	12	63,51	1,93
Mittelwert	63,06	0,00	Mittelwert	64,21	0,00
Stabw.	1,12	3,15	Stabw.	1,13	3,12

Tabelle 47: Vorversuch 9. Angabe von Fotosyntheseaktivität [%], Fotosynthesehemmung [%] je Probe (Referenz Mittelwert) sowie Mittelwert und Standardabweichung

Messung	Aktivität [%]	Hemmung [%]
1	65,23	-5,88
2	64,82	-4,72
3	64,84	-4,78
4	63,68	-1,50
5	64,29	-3,23
6	64,27	-3,17
7	63,60	-1,28
8	62,65	1,41
9	62,49	1,86
10	63,10	0,13
11	62,36	2,22
12	62,45	1,97
13	62,56	1,66
14	62,35	2,25
15	62,16	2,79
16	62,18	2,73
17	62,58	1,60
18	62,51	1,80
19	62,44	2,00
20	62,39	2,14
Mittelwert	63,15	0,00
Stabw.	1,01	2,86

III. Herstellung des M4-Mediums

Zur Herstellung des M4-Mediums, in welchem die Testorganismen angesetzt wurden, wurden folgende Lösungen verwendet (gem. Empfehlung AQS-Merkblatt P-9/2, Stand Feb. 2000). Alle Lösungen werden in deionisiertem Wasser angesetzt.

Makronährstoffe:

Lösung 1: Calciumchlorid-Lösung	73,45 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Lösung 2: Magnesiumsulfatheptahydrat-Lösung	123,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Lösung 3: Kaliumchlorid-Lösung	5,8 g/l KCl
Lösung 4: Natriumhydrogencarbonat-Lösung	64,8 g/l NaHCO_3

Mikronährstoffe:

Lösung 5: Kationenlösung

7210 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
6120 mg LiCl

1420 mg RbCl
3040 mg SrCl₂ * 6 H₂O
335 mg CuCl₂ * 2 H₂O
260 mg ZnCl₂
200 mg CoCl₂ * 6 H₂O in A. deion. Lösen und mit A. deion. Wasser auf 2 Liter auffüllen

Lösung 6: Anionenlösung

548 mg NaNO₃
5719 mg H₃BO₃
32 mg NaBr
126 mg Na₂MoO₄ * 2 H₂O
6,5 mg KJ
6,66 mg Na₂SeO₃ * 5 H₂O
1,15 mg NH₄VO₃ in A. deion. Lösen und mit A. deion. auf 1 Liter auffüllen

Lösung 7: Silikatlösung

21 475 mg/l Na₂SiO₃ (auf Wasserlöslichkeit achten! Bewährt hat sich o. g. Produkt)

Lösung 8: Eisen-/EDTA-Lösung

500 mg Na₂EDTA * 2 H₂O (Titriplex III)
199,1 mg FeSO₄ * 7 H₂O
Beide Reagenzien werden einzeln in 500ml A. deion. angesetzt, zusammengegeben und sofort autoklaviert und im Dunkeln verwahrt.

Lösung 9: Phosphatlösung

286 mg KH₂PO₄ in A. deion. Lösen und mit
368 mg K₂HPO₄ A. deion. Auf 1 Liter auffüllen.

Lösung 10: Vitaminlösung

750 mg Thiaminchloridhydrochlorid in A. deion. Wasser Lösen und mit A. deion. Wasser Auf 1 Li
10 mg Cyanocobalamin (B12), auffüllen
7,5 mg Biotin

Herstellung von 10 Litern M4-Medium:

40 ml der Lösung 1
10 ml der Lösung 2
10 ml der Lösung 3
10 ml der Lösung 4
1 ml der Lösung 5
5 ml der Lösung 6
2 ml der Lösung 7
50 ml der Lösung 8
5 ml der Lösung 9

1 ml der Lösung 10

Die angegebenen Volumina werden mit deion. Wasser auf 10 Liter aufgefüllt.

IV. Herstellung der Nährlösung nach CHOU

Die Nährlösungen, welche teilweise zum Verdünnen der verwendeten Algenstammlösungen verwendet wurden, wurden vom Institut für Hygiene und Umwelt bereitgestellt.

Stammlösungen nach CHOU

Stamm I:

in 2000 ml Messkolben lösen

50 g	NaNO ₃
5 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
15 g	MgSO ₄ * 7H ₂ O
35 g	KH ₂ PO ₄
5 g	NaCl

Stamm II:

in 2000 ml Messkolben lösen

15 g	K ₂ HPO ₄
------	---------------------------------

Stamm III:

in 100 ml Messkolben lösen

1,142 g	H ₃ BO ₃
0,882 g	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
0,144 g	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
0,120 g	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
0,157 g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
0,049 g	Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O

Zum Schluss wird diese Stammlösung mit einigen Tropfen 16% HCl angesäuert.

Stamm IV:

in 100 ml Messkolben lösen

4,5 g	Titriplex III
3,1 g	KOH

Stamm V:

in 100 ml Messkolben lösen

0,498 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O + 0,1 ml H ₂ SO ₄
0,5 g	Titriplex III

Ansetzen der Gebrauchslösungen: Es werden zwei Mal 5 Liter angesetzt und auf acht 2 Liter Glasflaschen verteilt.

Herstellung von 5 Litern Nährlösung:

Stamm I	250 ml
Stamm II	250 ml
Stamm III	5 ml
Stamm IV	5 ml
Stamm V	5 ml

Die Volumina werden auf 5000 ml mit deion. Wasser aufgefüllt und danach auf Rundkolben verteilt. Die Gefäße werden zu ca. 1/3 unbefüllt gelassen, mit Alufolie verschlossen und bei 121 °C im Varioklav 20 Minuten sterilisiert (Institut für Hygiene und Umwelt, 2013).

Selbsterklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt, nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt, alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel angegeben, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate gekennzeichnet habe.

Hamburg, den 15. Mai 2015