

Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Aufbau eines chronischen Leuchtbakterientests mit *Aliivibrio fischeri*

Bachelorarbeit

Im Studiengang Umwelttechnik

vorgelegt von

Julia Müller

Matrikel-Nr. 2046838

Hamburg,

am 02.02.2016

Gutachterin: Prof. Dr. Carolin Floeter (HAW Hamburg)

Gutachter: Diplom Biol. Jakob Menz (Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie der Leuphana Universität Lüneburg)

Zusammenfassung

Arzneimittel leisten einen wertvollen Beitrag für die menschliche und tierische Gesundheit und werden in großen Mengen eingesetzt, wobei hinsichtlich der Verbrauchsmengen Antibiotika zu den wichtigsten Arzneimitteln zählen.

Sowohl Human- als auch Tierarzneimittel gelangen nach ihrer Ausscheidung sowohl durch direkte als auch indirekte Pfade in die Umwelt. Insgesamt konnten bislang mehr als 155 Arzneimittelwirkstoffe in relevanten Konzentrationen in Oberflächengewässern im oberflächenwasserbeeinflussten Grundwasser und vereinzelt im Trinkwasser festgestellt werden. Dabei wurde auch der konzentrationsbezogene Schwellenwert von 0,01 µg/l, welcher in dem Leitfaden zur Umweltbewertung von Humanarzneimitteln durch die europäische Arzneimittelagentur EMA festgelegt wurde, überschritten. Somit stellen diese Arzneimittel ein potenzielles Umweltrisiko dar. Ein großer Nachteil vieler etablierter Biotests zur ökotoxikologischen Risikobewertung ist jedoch, dass diese Verfahren häufig nur akute Toxizitäten untersuchen, sodass chronische Effekte aufgrund der kurzen Kontaktzeit nicht erfasst werden und die Toxizität des Antibiotikums unterschätzt werden kann. Jedoch ist die Erfassung der akuten als auch chronischen Effekte notwendig, um das Risiko von Antibiotika zuverlässig einschätzen zu können.

Das marine Leuchtbakterium *Aliivibrio fischeri* wird in verschiedenen Biotests zur Untersuchung der ökotoxikologischen Wirkung von Schadstoffen eingesetzt. Das am häufigsten angewandte Verfahren ist der Leuchtbakterientest nach DIN EN ISO 11348, bei dem die akute Toxizität durch Bestimmung der Lumineszenzhemmung nach 30 minütiger Exposition bestimmt wird.

Ein großer Nachteil dieses Verfahrens ist, dass chronische Effekte aufgrund der kurzen Kontaktzeit durch diesen Test nicht erfasst werden und die Toxizität des Schadstoffes möglicherweise unterschätzt wird.

Weitere Biotests mit dem Leuchtbakterium stellen der Zellvermehrungshemmtest nach DIN 38412-37 und der chronischen Leuchtbakterientests nach Ziesenis et al. dar. Beim Zellvermehrungshemmtest wird nach 7 h die Zellvermehrungshemmung der Leuchtbakterien, durch Messung der optischen Dichte bestimmt. In dem chronischen Leuchtbakterientest nach Ziesenis et al. wird hingegen die Expositionszeit des akuten Leuchtbakterientests auf 24 h verlängert. Dadurch können in beiden Tests chronische Toxizität erfasst werden.

Menz et al. (2013) entwickelte zur Erfassung der akuten und chronischen Toxizität den „kinetischen Leuchtbakterientest“ der die oben genannten Methoden vereinigt und zudem miniaturisiert auf 96-well Mikrotiterplatte durchgeführt wird. Neben der akuten Toxizität nach 30 Minuten, wird ebenso die chronische Leuchthemmung nach 24 h sowie die Hemmung des Zellwachstums nach 14 h bestimmt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein modifiziertes Testverfahren des kinetischen Leuchtbakterientests für das Biologielabor der HAW-Hamburg aufzubauen. Hierfür

wurden die Leuchtakterien frisch gezüchtet. Es wurde neben der Lumineszenz der Parameter Zelldichte zu Testbeginn, nach 30 Minuten und nach 24 Stunden erfasst. Die Belegung der (negativ) Kontrollen auf 96-Well-Mikrotiterplatte wurde auf Homogenität der Well-Positionen untersucht und ein valides Testlayout entwickelt. Für ein optimales Wachstum wurden unterschiedliche Start-Zelldichten sowie verschiedene Nährmedien getestet. Das Nährmedium sollte einerseits optimales Wachstum über den Testzeitraum gewährleisten, andererseits sollten die Nährstoffkonzentrationen so gering wie möglich sein, um Ressourcen zu schonen und Wechselwirkungen mit Schadstoffen zu reduzieren.

Hierfür wurden verschiedene Kombinationen von modifiziertem Phosphat - reduzierten - Nährmedien untersucht und die geeignetste Kombination anhand ihrer Wachstums- und Lumineszenzeigenschaften ausgewählt.

In einem ersten Vor-Versuch konnte die Sensitivität der Leuchtakterien gegenüber der Referenzsubstanz 3,5 – Dichlorphenol für das ausgewählte Nährmedium im Vergleich zum ursprünglichen Vollmedium mit dem hier aufgebauten akuten und chronischen Testdesign ermittelt werden.

Summary

Medicines make a valuable contribution to human and animal health and are used in large quantities. Antibiotics – with respect to the consumption rate – are falling into the class of most essential medicines. Both human and veterinary drugs end up in the environment by direct and indirect paths after excretion.

In total more than 155 pharmaceutical ingredients have been detected in relevant concentrations in surface waters, surface affected groundwaters and were sporadically found in drinking waters. Thereby also the concentration-related threshold value of 0.01 µg/l has been exceeded which was defined in the Guidelines for the environmental assessment of human medicines by the European Medicines Agency.

Therefore, these drugs represent a potential environmental risk. A major disadvantage of many established bioassays for ecotoxicological risk assessment is, that these methods often only examine acute toxicities, so that chronic effects can't be detected due to the short contact time and the toxicity of the antibiotic may be underestimated. However, the detection of the acute and chronic effects is necessary to estimate the risk of antibiotics in a reliable way.

The marine luminescent bacterium *Aliivibrio fischeri* already has been implemented as a test organism in diverse biological testing methods for the investigation of toxic effects of pollutants. The most frequently applied procedure is the luminescent bacteria test according to DIN EN ISO 11348 which determines the acute toxicity by measuring the luminescence inhibition after 30 minutes. A disadvantage of this method is, that due to

the short exposition period chronic effects can't be determined. Consequently the toxicity of the pollutant could be underestimated.

Further bioassays are the cellgrowth inhibition test according to DIN 38412-37 and the chronic luminous bacteria tests according to Zieseniss et al. The cellgrowth inhibition test determines the growth inhibition by measuring the optical density after 7 hours of exposure time. However the chronic luminous bacteria tests according to Zieseniss et al. extends the exposure time of the acute luminescence inhibition test to 24 hours. Thereby it is possible to determine chronic toxicity effects in both test.

Menz et al. (2013) evolved the kinetic luminescent bacteria test, which combines the above-named procedures to a miniaturised procedure on 96-well-plates. Besides the acute luminescent inhibition after 30 minutes exposure time, this procedure determines die chronic luminescent inhibition after 24 hours plus the cellgrowth - inhibition after 14 hours of exposure time.

The aim of this study was to assemble a modified method of the kinetic luminescence bacteria test for the biology laboratory of the HAW Hamburg. For this purpose the luminescent bacteria were freshly cultivated. Besides the measurement of the luminescence, the parameter of cell densities at the start of the test, after 30 minutes and after 24 hours has been detected.

The assignment of the (negative) controls on 96 - well microtiter plate has been analysed for homogeneity of the well positions. Furthermore, a valid test layout has been developed. For optimal growth, different starting cell densities and different culture media were tested. On the one hand the nutrient medium should guarantee the optimal growth over the exposition time, on the other hand, the concentrations of nutrients should be as low as possible in order to conserve resources and reduce interactions with pollutants. Therefore various combinations of modified phosphate- reduced-nutrient solutions were tested and the most appropriate combination based on their growth- and luminescence properties has been selected.

The sensitivity of the luminescence bacteria to the reference substance 3,5-dichlorophenol and the selected nutrient solution has been determined in comparison to the nutrient solution in a preliminary test, with the established acute and chronic test design

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Summary	3
Inhaltsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	9
Formelverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	10
I. Einleitung	11
I. 1. Der Testorganismus <i>Aliivibrio fischeri</i>	12
I. 2. Der akute, kinetische und chronische Leuchtbakterientest (LBT)	14
I. 2.1. Der akute Leuchtbakterientest nach DIN EN ISO 11348 (2009).....	15
I. 2.2. Chronischer Leuchtbakterientest nach Ziesenis	15
I. 2.3. Zellvermehrungshemmtest nach DIN 38412-L37.....	15
I. 2.4. Kinetischer und chronischer Leuchtbakterientest nach Menz.....	15
I. 3. Zielsetzung	16
II. Methoden	18
II. 1. Material und Methoden	18
II. 1.1. Der Testorganismus	18
II. 1.2. Genutztes Verbrauchsmaterial und Geräte.....	18
II. 1.3. Herstellung Nährmedien für die Aufzucht und Testdurchführung	20
II. 1.4. Bestimmung der Zellzahl mithilfe der optischen Dichte	22
II. 1.5. Validierung der optischen Dichte am Plattenreader mit Formazin	22
II. 1.6. Allgemeine Vorgehensweise zur Vorbereitung der Leuchtbakterientests	22
II. 2. Methodenentwicklung	24
II. 2.1. Verkürzung der chronischen Tests auf 6 – 8 h.....	24
II. 2.2. Herstellung der Leuchtbakteriensuspension und Testdurchführung (angelehnt an die Arbeitsanweisung für den akuten LBT des Biologielabors der HAW- Hamburg (Stanko und Floeter 2014).....	25
II. 2.3. Herstellung von Stammkulturen zur Kryokonservierung	26
II. 2.4. Vergleich von verschiedenen Kombinationen aus Anfangszellichte und Medienzusammensetzung	26
II. 2.5. Prüfung der Homogenität der 96-well-Mikrotiterplattenbelegung	27
II. 2.6. Auswahl der Positivkontrollen.....	28

II. 2.7. Optimale 96-Well-Mikrotiterplattenbelegung.....	29
II. 2.8. Berechnung der scheinbaren Hemmungen aufgrund der Position auf der Mikrotiterplatte.....	29
II. 2.9. Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium mit 3,5 –DCP als Referenzsubstanz	30
II. 2.10. Definition der Gültigkeitskriterien und Überprüfung der Einhaltung	30
II. 3. Berechnung der Testergebnisse	31
II. 3.1. Berechnungen zur Analyse des Wachstums und Auswertung des kinetischen Leuchtbakterientests	31
II. 4.1. Berechnungen zur Prüfung der Homogenität der 96-well-Mikrotiterplattenpositionen	37
II. 4.2. Berechnung der scheinbaren Hemmungen aufgrund der Position auf der Mikrotiterplatte.....	38
II. 4.3. Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium mit 3,5 –DCP als Referenzsubstanz	38
III. Ergebnisse.....	39
III. 1. Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung: „Verkürzung der chronischen Tests auf 6 - 8h“	39
III. 2. Darstellung der Ergebnisse der Validierung der optischen Dichte am Plattenreader mit Formazin	39
III. 3. Ergebnisse zur Methodenentwicklung.....	41
III. 3.1. Zellzahlbestimmung.....	41
III. 3.2. Entwurf des Plattenlayouts.....	42
III. 3.3. Vergleich von verschiedenen Kombinationen aus Anfangszellichte und Medienzusammensetzung	44
III. 3.4. Definition eines ausreichend homogenen Plattenbereichs	47
III. 3.5. Berechnung von scheinbaren Hemmungen anhand des erstellten Plattenlayouts.....	52
III. 4. Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium (5) mit 3,5 –DCP als Referenzsubstanz.....	54
III. 4.1. Erfüllung der Gültigkeitskriterien	54
III. 4.2. Ergebnisse der EC ₅₀ – Werte Berechnung von 3,5 – DCP.....	55
IV. Diskussion.....	57
IV. 1. Diskussion der Ergebnisse der Untersuchung: „Verkürzung der chronischen Tests auf 6 - 8h“	57
IV. 2. Definition eines ausreichend homogenen Plattenbereichs	58
IV. 2.1. Überprüfung der einzelnen Mikrotiterplatten auf Abweichungen, verursacht durch den Anwender, sowie deren Auswirkungen auf die chronischen Tests	58
IV. 2.2. Identifizierung von systematischen Messfehlern	58
IV. 2.3. Berechnung von fiktiven Hemmungen anhand des erstellten Plattenlayouts	59

IV. 3.	Vergleich von verschiedenen Kombinationen aus Anfangszelldichte und Medienzusammensetzung.....	60
IV. 4.	Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium (5) mit 3,5 –DCP als Referenzsubstanz.....	61
IV. 4.1.	Bewertung der Ergebnisse im Hinblick zur Auswahl der geeignetsten Nährmedienkombination	61
IV. 4.2.	Maßnahmen zur Verringerung der Messabweichungen in den Tests	62
V.	Fazit und Ausblick.....	64
	Literaturverzeichnis	65
	Anhang	67
	Danksagung	110
	Erklärung.....	111

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: REAKTIONSSCHEMA DER BAKTERIELLEN LUMINESZENZ.....	13
ABBILDUNG 2: VERLAUF DER LUMINESZENZ UND OPTISCHEN DICHTEN ÜBER EINEN TESTZEITRAUM VON 240 MIN:39	
ABBILDUNG 3: KALIBRIERGERADE DER OPTISCHEN DICHTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON FORMAZIN - TRÜBUNGSEINHEITEN.....	41
ABBILDUNG 4: ENTWURF DES IM LBT ZU VERWENDENDEN PLATTENLAYOUTS	43
ABBILDUNG 5: PIPETTIERHILFE ZUR BELEGUNG DER MIKROTITERPLATTE	44
ABBILDUNG 6: MP5 - VARIATIONSKOEFFIZIENTEN [%] DER OPTISCHEN DICHTEN FÜR T0 (UNTEN) UND T24 (OBEN) 49	
ABBILDUNG 7: MP5 - VARIATIONSKOEFFIZIENTEN [%] DER LUMINESZENZ FÜR T0 (UNTEN) UND T24 (OBEN).....	49
ABBILDUNG 8: ERGEBNISSE DER T - TESTS UND DARSTELLUNG DER VARIATIONSKOEFFIZIENTEN DER WELLS ALLER MIKROTITERPLATTEN (LEGENDE FARBUNTERLEGUNG ERGÄNZEN)	51
ABBILDUNG 9: ERGEBNISSE DER LEUCHT- SOWIE ZELLVERMEHRUNGSHemmungen, SOWIE DES SIGNIFIKANZTESTS ANHAND DES ENTWORFENEN PLATTENLAYOUTS UND DER SICH DARAUF BEFINDLICHEN VERDÜNNUNGSSTUFEN (MIKROTITERPLATTE VOLLSTÄNDIG MIT NEGATIVKONTROLLEN BELEGT)	53
ABBILDUNG 10: VARIOSKAN FLASH ZUR BESTIMMUNG DER ABHÄNGIGKEIT DER OD ZU FORMAZIN – TRÜBUNGSEINHEITEN. ERSTELLT VON JAKOB MENZ FÜR DEN KINETISCHEN LBT (MENZ 2012).	67
ABBILDUNG 11: LUMINESZENZ UND OD ZUM ANFANGS- UND ENDZEITPUNKT (0 H BZW. 24 H) DER VERSCHIEDENEN NÄHRMEDIEN (15 BZW. 20 FTU ANFANGSZELLDICHTE).....	68
ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG DER LUMINESZENZ UND OD ALLER GEMESSENEN ZEITPUNKTE DER NÄHRMEDIEN 1 BIS 3 (MIT 15 BZW. 20 FTU ANFANGSZELLDICHTE)	69
ABBILDUNG 13: DARSTELLUNG DER LUMINESZENZ UND OD ALLER GEMESSENEN ZEITPUNKTE DER NÄHRMEDIEN 4, 5 UND VOLLMEDIUM (MIT 15 BZW. 20 FTU ANFANGSZELLDICHTE)	70
ABBILDUNG 14: PIPETTIERHILFE ZUR EINFACHEREN BELEGUNG DER MIKROTITERPLATTE.....	99
ABBILDUNG 15: BELEGUNGSSCHEMA FÜR DIE PIPETTIERHILFE.....	99
ABBILDUNG 16: SCHEMA ZUR BELEGUNG DER MIKROTITERPLATTE	102
ABBILDUNG 17: KALIBRIERGERADE ZUR UMRECHNUNG DER TRÜBUNG IN DIE OPTISCHE DICHTEN ZUR BESTIMMUNG DER OD DER HAUPTKULTUR ZU TESTBEGINN.....	107
ABBILDUNG 18: KALIBRIERGERADE ZUR UMRECHNUNG DER OPTISCHEN DICHTEN IN DIE ZELLZAHL PRO ML.....	107

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GLASGERÄTE	18
TABELLE 2: VERWENDETE GERÄTE	19
TABELLE 3: ZUSAMMENSETZUNG DER NÄHRMEDIEN	20
TABELLE 4: ZUSAMMENSETZUNG DER NÄHRMEDIEN	21
TABELLE 5: KONZENTRATIONEN DER 3, 5 –DCP VERDÜNNUNGSSTUFEN DER PROBEN- UND TESTVERDÜNNUNGEN	29
TABELLE 6 : DARSTELLUNG DER MESSERGEBNISSE (MITTELWERTE DER OPTISCHEN DICHTEN) DER FORMAZIN – VERDÜNNUNGSREIHE (N = ANZAHL)	40
TABELLE 7: ZUSAMMENSETZUNG DER REFERENZ-, KONTROLL-, UND TESTANSÄTZE.....	43
TABELLE 8: VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN NÄHRMEDIEN (15 UND 20 FTU) IN BEZUG AUF DIE OPTISCHE DICHTEN UND WACHSTUMSRATE.....	46
TABELLE 9: ABSOLUTE ANZAHL DER WELLS AUF EINER 96- WELL - MIKROTITERPLATTE, DEREN VARIATIONSKOEFFIZIENTEN DAS ANGELEGTE KRITERIUM ÜBERSTIEGEN	47
TABELLE 10: EC50 -WERTE FÜR 3,5 - DCP VOM NM NR. 5 UND DES VOLLMEDIUMS (STANDARD SSWC) BEI 15 UND 20 FTU HAUPTKULTURZELLDICHTE.....	56
TABELLE 11; LITERATURDATEN AUS REFERENZMETHODEN ZU DEM EC50 - WERTEN VON 3,5 -DCP.....	56
TABELLE 12: VORSCHLAG EINER 3,5 - DCP KONZENTRATIONSREIHE FÜR WEITERGEHENDE TESTS	63
TABELLE 13: VERWENDETE SUBSTANZEN	96
TABELLE 14: ZUSAMMENSETZUNG DES MODIFIZIERTEN SSWC-MEDIUMS.....	97
TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG DER REFERENZ-, KONTROLL-, UND TESTANSÄTZE	102
TABELLE 16: ZUSAMMENSETZUNG DES VOLLWERTIGEN SSWC NÄHRMEDIUMS.....	105

Formelverzeichnis

FORMEL 1: BERECHNUNG DES KORREKTURFAKTORS	32
FORMEL 2: BERECHNUNG DES KORRIGIERTEN ANFANGSLEUCHTENS.....	32
FORMEL 3: BERECHNUNG DER AKUTEN LEUCHTHEMMUNG	32
FORMEL 4: BERECHNUNG DER CHRONISCHEN LEUCHTHEMMUNG	33
FORMEL 5: BERECHNUNG DER SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATE BEZOGEN AUF DIE OD	33
FORMEL 6: UMRECHNUNG DER OPTISCHEN DICHTEN IN DIE ABSOLUTE ZELLZAHL	33
FORMEL 7: BERECHNUNG DER SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATE BEZOGEN AUF DIE ZZ.....	34
FORMEL 8: BERECHNUNG DER VERDOPPLUNGSZEIT BEZOGEN AUF DIE OD.....	34
FORMEL 9: BERECHNUNG DER VERDOPPLUNGSZEIT BEZOGEN AUF DIE ZZ.....	34
FORMEL 10: BERECHNUNG DER ZELLVERMEHRUNGSHemmUNG.....	35
FORMEL 11: „VIERPARAMETRISCHE LOGISTISCHE GLEICHUNG“	36
FORMEL 12: GERADENGLEICHUNG ZUR BERECHNUNG DER OD AUS FORMAZIN - TRÜBUNGSEINHEITEN	40

Abkürzungsverzeichnis

3,5-DCP	3,5-Dichlorphenol
AHL	Acyl-Homoserin-Lacton
ATP	Adenosintriphosphat
DIN	Deutsches Institut für Normung
EC50	effektive Konzentration mit einer Hemmwirkung von 50% [^]
FMNH ₂	Flavinmonocleotid
FTU	Formazin-Trübungseinheit (Formazine Turbidity Unit)
GK	Gültigkeitskriterien
GÜBAK	Gemeinsamen Übergangsbestimmungen zum Umgang mit Baggergut im Küstenbereich
HABAB-WSV	Handlungsanweisung zur Bewertung von Baggergut im Binnenland
HAW	Hochschule für angewandte Wissenschaften
KF	Korrekturfaktor
LBT	Leuchtbakterientest
LH	Leuchthemmung
MP	Mikrotiterplatte
OD	optische Dichte
PK	Positivkontrolle
RLU	relative Lichteinheit (Relative Light Unit)
rpm	rounds per minute
SSWC-Medium	Supplemented Seawater Complete Medium
VarK	Variationskoeffizient
ZVH	Zellvermehrungshemmung
ZZ	Zellzahl

I. Einleitung

Arzneimittel leisten einen wertvollen Beitrag für die menschliche und tierische Gesundheit und werden in großen Mengen eingesetzt, wobei hinsichtlich der Verbrauchsmengen Antibiotika zu den wichtigsten Arzneimitteln zählen (Alexy 2003).

Die Arzneimittel werden in unveränderter Form, als Metaboliten oder in Form von Konjugaten wieder ausgeschieden und gelangen im Falle von Humanarzneimitteln mit dem Abwasser in die Kläranlagen. Viele Arzneimittel werden in der Kläranlage nur unzureichend eliminiert und gelangen anschließend mit dem geklärten Abwasser in die Oberflächengewässer. Veterinärpharmaka hingegen werden nach ihrem Einsatz in der landwirtschaftlichen Tierproduktion als deren Ausscheidungen als Wirtschaftsdünger auf landwirtschaftliche Flächen ausgebracht oder werden von den Tieren in Freilandhaltung direkt in die Umwelt ausgeschieden und können durch Abschwemmung in Oberflächengewässer und durch Versickerung in das Grundwasser eingetragen werden (Vogel 2011; Alexy 2003).

Insgesamt konnten bislang mehr als 155 Arzneimittelwirkstoffe in relevanten Konzentrationen in Oberflächengewässern im oberflächenwasserbeeinflussten Grundwasser und vereinzelt im Trinkwasser festgestellt werden (Walz und Götz 2014; Kümmerer 2010).

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Hygiene und Umwelt konnte das Biologielabor der HAW-Hamburg in Wasser- und Sedimentproben der Bille und Ammersbek Wirkstoffe der Substanzgruppen der Analgetika und Antirheumatika, Betablocker sowie Röntgenkontrastmittel oberhalb 0,01 µg/l nachweisen (Stanko 2015). Diese übersteigen damit den konzentrationsbezogenen Schwellenwert von 0,01 µg/l, welcher in dem Leitfaden zur Umweltbewertung von Humanarzneimitteln durch die europäische Arzneimittelagentur EMA festgelegt wurde (Schulte-Oehlmann et al. 2007). Somit stellen diese Arzneimittel ein potenzielles Umweltrisiko dar.

Das marine Leuchtbakterium *Aliivibrio fischeri* wird in verschiedenen Biotests zur Untersuchung der ökotoxikologischen Wirkung von Schadstoffen eingesetzt. Das am häufigsten angewandte Verfahren ist der Leuchtbakterientest nach DIN EN ISO 11348, bei dem die akute Toxizität durch Bestimmung der Lumineszenzhemmung nach 30 minütiger Exposition bestimmt wird. Dieses Verfahren wird an der HAW- Hamburg bei wässrigen Umweltproben und bei Antibiotika zur Bestimmung der akuten Toxizität angewandt. Ein großer Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, dass chronische Effekte aufgrund der kurzen Kontaktzeit durch diesen Test nicht erfasst werden und die Toxizität des Antibiotikums unterschätzt werden kann (Stanko 2015).

Für das zukünftige PharmCycle –Projekt (Kooperation der HAW- Hamburg und Leuphana Universität Lüneburg) in dem nachhaltige Arzneimittel entwickelt werden sollen, soll zudem eine ökotoxikologische Risikobewertung von Arzneimitteln/Antibiotika erfolgen. Um auch chronische Toxizitäten der Antibiotika erfassen zu können, soll ein Verfahren etabliert werden, dass auf dem akuten Leuchtbakterientest nach DIN EN ISO 11348

basiert, jedoch auch chronische Effekte über mehrere Generationen anzeigt. Bereits bestehende chronische Biotests mit dem Leuchtbakterium stellen der Zellvermehrungshemmtest nach DIN 38412-37 (1999) und der chronische Leuchtbakterientest nach Zieseniss et al. (1995) dar. Beim Zellvermehrungshemmtest wird nach 7 h die Zellvermehrungshemmung der Leuchtbakterien, durch Messung der optischen Dichte bestimmt. In dem chronischen Leuchtbakterientest nach Zieseniss et al. (1995) wird hingegen die Expositionszeit des akuten LBT auf 24 h verlängert. Dadurch kann in beiden Tests die chronische Toxizität erfasst werden (siehe Kapitel I. 2.2, I. 2.3). Menz et al. (2013) entwickelte zur Erfassung der akuten und chronischen Toxizität den „kinetischen Leuchtbakterientest“ der die oben genannten Methoden kombiniert und zudem miniaturisiert auf 96-well Mikrotiterplatte durchgeführt wird. Neben der akuten Toxizität nach 30 Minuten, wird ebenso die chronische Leuchthemmung nach 24 h sowie die Hemmung des Zellwachstums nach 14 h bestimmt (siehe Kapitel I. 2.4).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der akuten und chronischen Hemmung der Biolumineszenz, sowie die Hemmung des chronischen Zellwachstums (Zellvermehrungshemmung) von *A. fischeri* in einem miniaturisierten Testansatz bei Exposition gegenüber Chemikalien (Arzneimittel/Antibiotika) oder wässrigen Umweltproben zu erfassen. Hierfür wurde auf dem an der HAW im Biologielabor etablierten akuten LBT nach DIN EN ISO 11348-2 auf 96-Well-Mikrotiterplatte aufgebaut und sich an dem Testverfahren nach (Menz et al. 2013) orientiert. Im Vordergrund der Arbeit stand das Ziel der manuellen Erfassung der Endpunkte akute und chronischen Biolumineszenzhemmung nach 30 min und 24 h sowie der chronischen Zellvermehrungshemmung nach ebenfalls 24 h Expositionszeit (siehe Abschnitt I. 3). Ferner sollten die geeignetsten Parameter und Grundbedingungen für dieses Testverfahren (Zelldichte zu Testbeginn, Zusammensetzung des Nährmediums, Homogenität des Wachstums auf den Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte, Erstellung eines Layout zur Belegung der Mikrotiterplatten, Auswahl der Referenzsubstanz) bestimmt werden (siehe Methodenentwicklung Kapitel II. 2).

I. 1. Der Testorganismus *Aliivibrio fischeri*

Aliivibrio fischeri (ehemals *Vibrio fischeri* und *Photobacterium phosphoreum*) ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium mit polarer Begeißelung, das ubiquitär im marinen Bereich vorkommt (Link 1992).

Dort lebt es hauptsächlich mit verschiedenen Meerestieren wie z.B. Zwergtintenfischen (Sepiolida) in Symbiose, kommt aber auch saprophytisch und freilebend im Meerwasser vor, indem es organisches Material abbaut (Schulz 1993). 2007 wurde *V. fischeri* aufgrund genetischer Untersuchungen neu klassifiziert und der Gattung *Aliivibrio* zugeordnet (Urbanczyk et al. 2007).

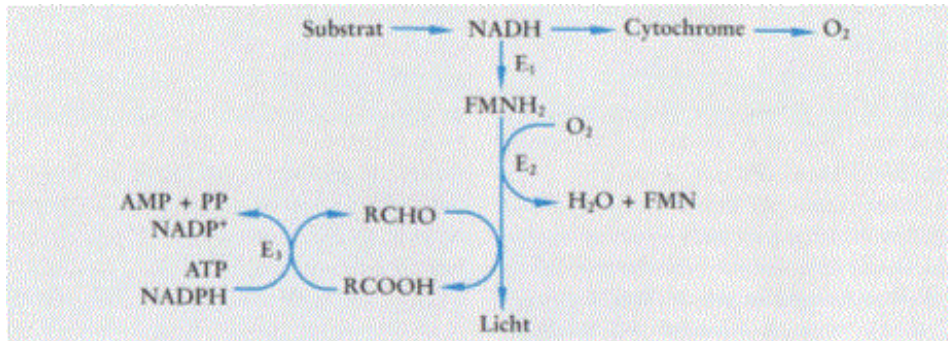


Abbildung 1: Reaktionsschema der bakteriellen Lumineszenz

Die Biolumineszenz ist ein wichtiger Parameter für den akuten und chronischen Leuchtbakterientest (LBT), sodass diese im Folgenden erklärt wird. Unter aeroben Bedingungen können Leuchtbakterien aufgrund von Stoffwechselaktivitäten biolumineszieren. Die Biolumineszenz ist ein Nebenprodukt des Kohlenstoffwechsels, der dazu dient NADH₂ mittels Luciferase als Reduktionäquivalent zu regenerieren (Schulz 1993). In Abbildung 1 wird die Beziehung der Luciferasereaktion zur Atmungskette dargestellt: Nicotinamidadenindinucleotide (NADH) werden durch das Enzym Flavin – Reduktase (E₁) zu Flavinmononucleotid (FMNH₂) reduziert, welches anschließend mit der Luciferase (E₂) oxidiert wird und in einen angeregten Zustand gelangt. Es entsteht FMN und Säure (RCOOH), das unter Verbrauch von ATP und mithilfe von Myristidinsäure- Reductase (E₃) zu einem Aldehyd (RCHO) reduziert wird. Außerdem wird unter Lichtemission mit der Wellenlänge von 490 nm die oxidierte Luciferase regeneriert, sichtbar als das typische „kalte Leuchten“ der Biolumineszenz. (Gunkel 1994; Schulz 1993).

Die Biolumineszenz ist nur selten bei frei lebenden Leuchtbakterien zu sehen, da der Energieverbrauch sehr hoch ist. Nach Hoffmann (1981) werden etwa 20% des verbrauchten Sauerstoffs für die Leuchtreaktion aufgewendet. Daher ist die Biolumineszenz häufig bei symbiontisch lebenden Formen mit höherer Zelldichte zu beobachten.

Grund hierfür ist die Genregulation der bakteriellen Lumineszenz. Ein Autoinduktor wird als Produkt eines Genabschnitts konstitutiv während des Wachstums der Zellen gebildet und ins umgebende Nährmedium abgegeben. Wird eine bestimmte

Schwellenkonzentration erreicht, induziert der Autoinduktor die Synthese der an der Biolumineszenz beteiligten Enzyme sowie die Synthese seiner selbst, wodurch eine positive Rückkopplung entsteht. (Link 1992). Die Lichtemission kann durch Faktoren wie einen geringen Sauerstoffpartialdruck, Eisenmangel oder Nährstoffen wie Hefeextrakt, Pepton oder Harnstoff gesteigert werden, während Glucose die Autoinduktion hemmt. Eine Veränderung der Stoffwechselintensität hat somit eine Auswirkung auf die Lichtemission und lässt dadurch Rückschlüsse auf den generellen physiologischen Zustand der Bakterien schließen (Link 1992). Dies bildet die Grundlage für den akuten sowie chronischen Leuchtbakterientest (LBT), die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

I. 2. Der akute, kinetische und chronische Leuchtbakterientest (LBT)

Da die Biolumineszenz ein an den bakteriellen Energiestoffwechsel gekoppelter Prozess ist, wird die Hemmung derselben als Maß für die Toxizität von Wasserproben und Reinsubstanzen betrachtet. *Aliivibrio fischeri* wird in vielen Biotests repräsentativ für die Destruenten in aquatischen Ökosysteme eingesetzt, da sie sensibel auf viele Schwermetalle sowie unspezifisch wirkende Chemikalien reagieren (Fent 2013).

In der Regel erfolgen die Leuchtbakterientests nach dem gleichen Prinzip und basieren auf der Messung der Lichtemission mit einem Luminometer. Hierbei wird zunächst das Anfangsleuchten der Zellsuspension ermittelt. Im Anschluss wird die Probe zugegeben und nach einer bestimmten Kontaktzeit die Lichtemission erneut gemessen. Die Berechnung der prozentualen Leuchthemmung (LH) erfolgt anhand der ermittelten Werte.

I. 2.1. Der akute Leucht bakterientest nach DIN EN ISO 11348 (2009)

Bei dem international und national standardisierten akuten Leucht bakterientest (DIN EN ISO 11348- 1-3) wird die Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* (frisch gezüchtete, gefriergetrocknete oder flüssiggetrocknete Bakterien) nach 30-minütiger Exposition gegenüber einer flüssigen Probe in Referenz zu einer Negativkontrolle gemessen. Das Verfahren gilt für Abwässer, wässrige Extrakte und Sickerwasser, Süßwasser (Oberflächenwasser und Grundwasser), Meerwasser und Brackwasser, Eluate von Sedimenten (Süßwasser, Brackwasser und Meerwasser), Porenwasser sowie in Wasser gelöste Einzelstoffe.

Er wird nach nationalem Recht u.a. für die Untersuchung von Abwasser (AbwV) gefordert. Des Weiteren wird der Test als Bestandteil von Biotestkombinationen zur Bewertung für limnische und marine Sedimente nach der „Handlungsanweisung zur Bewertung von Baggergut im Binnenland“ (HABAB-WSV) und der „Gemeinsamen Übergangsbestimmungen zum Umgang mit Baggergut im Küstenbereich“ (GÜBAK) angewendet (Floeter et al. 2007; Bundesanstalt für Gewässerkunde 2011).

I. 2.2. Chronischer Leucht bakterientest nach Zieseniss

Der akute Leucht bakterientest zeichnet sich zwar durch eine einfache Handhabung und geringe Versuchszeiten von 30 Minuten Kontaktzeit aus, jedoch werden chronische bzw. subakute Toxizitäten mit dieser Methode nicht ausreichend dargestellt. 1995 beschrieb Zieseniss erstmals eine Methode zur Bestimmung der chronischen Leuchthemmung mit einer Kontaktzeit von 24 h. Neben der verlängerten Expositionszeit wurde die Zusammensetzung des Testmediums verändert. Die wichtigste Veränderung hierbei war, dass im Test ein steril filtriertes Nährmedium genutzt wurde, mit dem bereits Bakterienzellen kultiviert wurden. Daher lag bereits eine hohe Konzentration des Autoinduktors (siehe Kapitel 1.1) vor, der die Biolumineszenz anregte und diese für die Kontaktzeit stabil halten sollte (Zieseniss 1995).

I. 2.3. Zellvermehrungshemmtest nach DIN 38412-L37

In einer weiteren Testvariante wird die Hemmung der Zellvermehrung von *Aliivibrio fischeri* NRRLB-11177 nach 7 h Kontaktzeit durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 436 nm bestimmt (DIN 38412-L37). Aufgrund der verlängerten Kontaktzeit von 7 h eignet sich das Verfahren ebenfalls zur Erfassung von chronischen Effekten, die sich auf die Zellvermehrung auswirken.

I. 2.4. Kinetischer und chronischer Leucht bakterientest nach Menz

An der Leuphana Universität Lüneburg wurde zur Erfassung der chronischen Toxizität ein „kinetischer Leucht bakterientest“ entwickelt, der die Vorteile des herkömmlichen akuten LBT nach DIN EN ISO 11348-2 (2009), des Zellvermehrungshemmtest nach DIN

38412-37 (1999) und des chronischen Leuchtbakterientests nach Zieseniss et al. (1995) vereinigt und zudem miniaturisiert auf 96-well Mikrotiterplatten (MP) durchgeführt wird. So können neben der akuten Toxizität nach 30 Minuten auch die chronische Leuchthemmung nach 24 h sowie die Hemmung des Zellwachstums nach 14 h bestimmt werden. Der kinetische Leuchtbakterientest wird erfolgreich angewendet und konnte die chronischen Effekte von u.a. Chloramphenicol, Streptomycin-Sulfat, und 3,4-Dichloroaniline auf *Aliivibrio fischeri* nachweisen (Menz et al. 2013).

I. 3. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die akute und chronische Hemmung der Biolumineszenz, sowie die Hemmung des chronischen Zellwachstums (Zellvermehrungshemmung (ZVH)) von *A. fischeri* in einem miniaturisierten Testansatz bei Exposition gegenüber Chemikalien oder wässrigen Umweltproben zu erfassen. Hierfür wurde auf dem an der HAW im Biologielabor etablierten akuten LBT nach (DIN EN ISO 11348-2) auf 96-Well-Mikrotiterplatte aufgebaut und sich an dem Testverfahren nach Menz et al. (2013) orientiert.

Im Unterschied zu Menz et al. (2013) wurde die chronische und nicht die kinetische Hemmung erfasst, sodass keine stündlichen (automatisierten) Messungen sondern manuelle Anfangs- und Endpunktmessungen erfolgten.

Hierdurch sollte bei derselben Aussagekraft der Aufwand reduziert werden. Darüber hinaus kann durch diese Maßnahme der Durchsatz an Tests erhöht werden, da der Plattenreader nicht die komplette Testdurchführung über belegt ist und somit parallel mehrere Mikrotiterplatten mit Proben getestet werden können.

Um die Durchführung des Tests für den Benutzer zu erleichtern, wurden die Endpunktmessung der Zellvermehrungshemmung und der chronischen Leuchthemmung auf denselben Zeitpunkt gelegt und die Möglichkeit der Verkürzung der Testzeit auf max. 6 - 8 h überprüft.

Zur Bestimmung der optischen Dichte (und der daraus resultierenden Zellzahl), sowie der Lumineszenz galt es geeignete Parameter zu definieren:

Es galt zu prüfen, dass die Testbedingungen auf der 96-Well-Mikrotiterplatte über den geplanten Testzeitraum einheitlich sind und alle Vertiefungen (Wells) in vollem Umfang genutzt werden können.

Ferner sollte die Kultivierung der Stammkulturen vereinfacht werden und eine Optimierung der Zusammensetzung der Nährmedien im Hinblick auf die enthaltenen Phosphatanteile erfolgen. Phosphate sind in der Lage Schwermetalle zu komplexieren und auszufällen (Herrmann 2009). Es ist möglich, dass das Risiko einer Probe im Test unterschätzt wird, wenn der Schwermetallanteil durch die im Nährmedium enthaltenen Phosphate komplexiert wird. Dadurch wären die Schwermetalleanteile nicht mehr, oder

in geringerem Maße für *A. fischeri* bioverfügbar und es könnte somit eine geringere Hemmwirkung auftreten.

Aus diesem Grunde sollte das Nährmedium zur Kultivierung der Bakterien dahingehend modifiziert werden, dass ein möglichst geringer Phosphatanteil enthalten ist und dennoch das Wachstum und die Lumineszenz von *A. fischeri* im Vergleich zum Vollmedium (Standardnährmedium) nicht negativ beeinträchtigt wird und über den gesamten Zeitraum hin anhält. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Anfangszellichten getestet, um diejenige Kombination aus Anfangszellichte und Nährmedienzusammensetzung auswählen zu können, deren Wachstums- und Lumineszenzeigenschaften für den Test am geeignetsten sind.

Zur ersten Überprüfung der Sensitivität und Validität (Reproduzierbarkeit) des aufgebauten Testverfahrens wurde die Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) untersucht. .

II. Methoden

II. 1. Material und Methoden

II. 1.1. Der Testorganismus

Der Bakterienstamm *Alivibrio fischeri* wurde in flüssiggetrockneter Form (Testkit LCK 480) von der Hach GmbH aus Düsseldorf bezogen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

II. 1.2. Genutztes Verbrauchsmaterial und Geräte

In den folgenden Kapiteln wurden für die Experimente und Methoden verschiedene Verbrauchsmaterialien und Geräte genutzt, die in Tabelle 1 und 2 aufgelistet sind

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte

Modell	Eigenschaft	Hersteller
Aluminiumfolie		Aromata, Neckarsalm
Enghals- Erlenmeyerkolben mit Zellstopfen	250ml ,50ml, steril	Schott, Mainz
Kryoröhrchen (steril)	1,2 ml mit Außengewinde	Carl Roth, Karlsruhe
Laborglasflaschen	1000ml, 500ml, 250ml	Schott, Mainz
Messkolben	1000ml, 250ml, 100ml, 50ml	Brand, Wertheim
Mikrotiter – Platte	Ref.Nr.(655094), 96- well, f – bottom µclear, white, steril	Greiner Bio One, Frickenhausen
Mikrotiter – Platte (akut)	costar 3912, white, nicht steril,	Corning Incorporated, New York
Pipettenspitzen	1000 µl; 300 µl;	Eppendorf, Hamburg Thermo Scientific, Waltham
8-fach-Reagenz - Reservoirs	60 ml	Thermo Scientific, Waltham
Reagenz- Reservoirs	(V-Form, Einweg)	Thermo Scientific, Waltham
Zentrifugenröhrchen (steril)	50 ml, 15 ml	VWR International, Düsseldorf

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerätetyp	Modell	Hersteller
Analysenwaage	Precisa 90M-300 C	Precisa Gravimetrics AG
Autoklav	Systemec DE- 65	Systemec Labor-Systemtechnik GmbH
Handrefraktometer	DIGIT-028 ATC	VWR International
Klimaschrank	ICH750 L	Memmert
Laborschüttler	MTS 2/4	IKA
Magnetrührer	IC – MAG (H57)	IKA
Magnetrührstäbchen	-	-
Mehrkanalpipette 30 - 300 µl	Finnpipette™ F1	Thermo SCIENTIFIC
Metallspatel	-	-
Metallstäbchen	-	-
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Laminar Air low, Class 100	GELAIRE – Gelman Instrument
Multifunktions-Plattenreader	TECAN Infinite F200 Pro-Plattenreader	Tecan Group
pH- /Salinität-/ O2-Messgerät	WTW Universal -	WTW GmbH
Pipette 0,5 - 5 ml	Finnpipette™ F1	Thermo SCIENTIFIC
Pipette 100 - 1000 µl	Finnpipette™ F2	Thermo SCIENTIFIC
Taschenrechner	Fx -991ES	Casio
Thermoschrank	WTW TS 606- G/2	WTW GmbH
Trockenschrank	ED 53	Binder GmbH
Vortexer	REAX 2000	Heidolph

II. 1.3. Herstellung Nährmedien für die Aufzucht und Testdurchführung

Die Inhaltsstoffe (Tabelle 3) wurden in der angegebenen Konzentration (s. Tabelle 4) vollständig in demineralisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1M NaOH auf $7 \pm 0,2$ eingestellt. Anschließend wurden je 250 ml der vorbereiteten Lösung in Laborglasflaschen abgefüllt und durch Autoklavieren (121 °C, 20 min, 2 bar) sterilisiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei +4 °C.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Nährmedien

Substanz	CAS - Nr. / Typ	Reinheit	Hersteller
NaCl	7647-14-5	99,9 %	AnalaR Normapur, (VWR International) , Düsseldorf
HCl (1M)	7647-01-0	1 mol/l	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaOH (1M)	1310-73-2	≥ 99%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Pepton aus Casein	91079-40-2	Für Mikrobiologie	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaH₂PO₄ · H₂O	10049-21-5	≥ 98%	VWR Chemicals, Düsseldorf
MgSO₄ · 7H₂O	10034-99-8	≥ 99%	Merck, Darmstadt
(NH₄)₂HPO₄	7783-28-0	≥ 98%	VWR Chemicals, Düsseldorf
Glycerin (87%)	56-81-5	87%	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	7783-28-0	Für die Mikrobiologie	AppliChem, Darmstadt
K₂HPO₄ · 3H₂O	7758-14-4	≥ 98%	Alpha Aesar, Minderslachen

Tabelle 4: Zusammensetzung der Nährmedien

Bezeichnung des Nährmediums (NM) im Test:		Vollmedium	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5
Inhaltsstoffe der Nährmedien	Konzentration [g/l]	Standard SSWC ¹	Phosphat reduzierte Nährmedien				
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	+	+	+	+	+	+
Hefeextrakt	0,5	+	+	+	+	+	+
Glycerin [ml/l]	3	+	+	+	+	+	+
Pepton aus Casein	5	+	+	+	+	+	+
NaCl	30	+	+	+	+	+	+
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	+	-	-	+	+	-
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	2,1	+	-	-	-	-	+
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,3	+	-	+	+	-	-

II. 1.3.1 NaCl-Lösung (2%)

5 g NaCl wurde in 250 ml demineralisiertem Wasser vollständig gelöst, sodass eine Konzentration von 20 mg/l entstand.

II. 1.3.2 Rekonstitutionslösung

Die von Hach Lange mitgelieferte Rekonstitutionslösung entspricht dem in der DIN EN ISO 11348-2 vorgeschriebenem Nährmedium und wurde in dem Abschnitt II. 2.1 (Verkürzung der chronischen Tests auf 6 – 8 h) sowie in Abschnitt II. 2.3 (Herstellung von Stammkulturen zur Kryokonservierung) verwendet.

¹ SSWC Nährmedium nach dem kinetischen Leucht bakterientest nach Menz.

II. 1.4. Bestimmung der Zellzahl mithilfe der optischen Dichte

Die Messungen zur Bestimmung der Zellvermehrungshemmung erfolgten anhand der Bestimmung der optischen Dichte (OD). Um die OD ins Verhältnis zu einer tatsächlichen Zellzahl setzen zu können, wurde eine Kalibriergerade erstellt. Hierfür wurde aus einer nach II. 1.6 hergestellten Vorkultur eine Verdünnungsreihe mit 5 Verdünnungsstufen in Reagenzgläsern angesetzt (1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64) und die Gesamtzellzahl am Mikroskop (10x Objektiv, Hellfeld) mit der Neubauer-Improved Zählkammer bestimmt.

Anschließend wurde mit dem Multifunktionsplattenreader die OD der Verdünnungen gemessen und gegen die ermittelte Zellzahl aus der Neubauer- Improved -Zählkammer aufgetragen und mithilfe einer linearen Regression die Kalibriergerade erstellt.

II. 1.5. Validierung der optischen Dichte am Plattenreader mit Formazin

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Bestimmung des Zellwachstums anhand der optischen Dichte (OD) bzw. Trübung vorgenommen, die mithilfe der Absorptionsmessung des TECAN Infinite F200 Plattenreader bei $\lambda = 610$ nm stattfand. Im kinetischen Leuchtbakterientest nach Menz wurde hingegen die OD bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578$ nm gemessen.

Da die OD der Hauptkultur zu Testbeginn im LBT einen definierten Wert haben sollte, der 20 FTU entspricht, musste um eine Vergleichbarkeit zu anderen Plattenreadern oder Photometern herstellen zu können, eine Kalibriergerade mit einer Formazin-Standardlösung (4000 FTU, bezogen von der Firma HACH) erstellt werden. Hierfür wurden von der Ausgangslösung (4000 FTU) mehrere Verdünnungen (0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 FTU) hergestellt und jeweils die OD bestimmt. Die optischen Dichte wurde gegen die FTU -Trübungseinheiten aufgetragen und mithilfe einer linearen Regression eine Kalibriergerade erstellt.

Mit dieser Kalibriergeraden konnte für den Plattenreader eine OD berechnet werden, die 20 FTU entspricht und mit den Werten einer von Menz verwendeten Kalibriergeraden (Anhang I) verglichen werden.

II. 1.6. Allgemeine Vorgehensweise zur Vorbereitung der Leuchtbakterientests

Unabhängig von dem Aufbau und des Ziels der verschiedenen in dieser Arbeit entwickelten und durchgeführten Testmethoden, wiederholten sich bestimmte Arbeitsvorgänge in jedem anzusetzendem Leuchtbakterientest (bis auf II. 2.1: Dieser Abschnitt orientiert sich an der Arbeitsvorschrift der HAW-Hamburg für den akuten LBT)

Diese Arbeitsvorgänge sind in den folgenden Abschnitten zusammenfassend dargestellt. Abweichende Vorgänge werden in den jeweiligen Abschnitten dargestellt. Eine aus den Resultaten der Tests dieser Arbeit erarbeitete, vollständige Arbeitsvorschrift befindet sich im Anhang XVI und soll Verwendung bei der zukünftigen Durchführung des akuten und chronischen LBT finden.

II. 1.6.1 Herstellung der Vorkultur und Hauptkultur

Unter sterilen Bedingungen wurden in einen Erlenmeyerkolben 50ml des zu verwendenden SSWC –Nährmediums vorgelegt. Anschließend wurde ein Aliquot der eingefrorenen Stammkulturen aufgetaut, homogenisiert und 100 μ l der Bakteriensuspension in den Erlenmeyerkolben mit dem Nährmedium überführt.

Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte, indem der Kulturansatz verschlossen und unter Schütteln für 22 h inkubiert (+20 °C, 200 rpm) wurde. Anders als während des Test selbst erfolgte die Inkubierung der Vorkultur bei 20°C, da dadurch schneller eine hohe Zelldichte erreicht wird und so bereits nach 22 h ein Test begonnen werden konnte.

Zur Herstellung der Hauptkultur wurde am Plattenphotometer mit der Absorptionsfunktion die optische Dichte ($\lambda = 610 \text{ nm}$) gemessen und durch Verdünnung mit SSWC-Medium eine Hauptkultur mit der gewünschten Anfangszelldichte (15 bzw. 20 FTU) hergestellt.

II. 1.6.2 Vortemperierung

Das Plattenmessgerät wurde im Klimaschrank durchgängig auf + 15°C temperiert, damit während der Durchführung des LBT die zu untersuchenden Proben möglichst konstanten Temperaturbedingungen unterlagen und dadurch ein gleichmäßiges Wachstum über die Gesamte Mikrotiterplatte zu ermöglichen werden sollte. Ebenso wurden Mikrotiterplatten, Reagenzreservoirs, Nährmedien sowie Probe- und Referenzlösungen wurden vor jedem Test mindestens 30 min lang auf 15 °C vortemperiert,

Die Testtemperatur von + 15 °C entspricht der Testtemperatur im akuten LBT nach DIN EN ISO 11348 -2. Ferner sollte während der Inkubationszeit im Test die Verdunstung der Proben vermieden werden, weswegen die Durchführung des Tests bei 15 °C im Vergleich zu 20 °C von Vorteil war, auch wenn die Wachstumsrate dadurch geringer war.

II. 1.6.3 Präparieren der Mikrotiterplatte und Starten der Messung

Für den Leuchtbakterientest wurden weiße 96-Well Mikrotiterplatten (Ref. Nr.: 655094 von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit Klarboden verwendet, um Messungen der optischen Dichte zu ermöglichen.

Zum Ansetzen des Tests wurde das /die jeweiligen Nährmedien (für Blindwerte (BK) und Blindproben (B VX) bzw. Hauptkultur (für Negativkontrollen (NK) und Verdünnungen (VX) entsprechend des jeweiligen Belegungsschemas in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte vorgelegt.

Anschließend wurde die Platte mit Deckel für 30 Minuten bei 15°C inkubiert, damit ein stabiles Leuchten der Bakterien erreicht werden konnte. Es erfolgte eine erste Messung

im Plattenreader (siehe Skript in der Arbeitsanweisung Anhang XVI), die der Bestimmung des Anfangsleuchtens I_0 dient

Sofort danach wurden NaCl (für BK) und die Proben (für VX und B VX), nach dem jeweiligen Belegungslayout hinzugefügt. Die Zeitmessung für die jeweiligen Endpunkte begann, wenn die Proben hinzu pipettiert wurden. Im Anschluss erfolgte einer weitere Messung zur Bestimmung der optischen Dichte (OD_0).

Um Evaporationsverluste zu vermindern und die Proben vor Lichteinfluss zu schützen, wurden die Proben in Alufolie und zusätzlich in eine Plastiktüte gewickelt. Die Inkubation der Platten bis zu den jeweiligen Endpunkten erfolgte im Klimaschrank auf einem Schüttler mit ca.200 rpm bei 15 °C.

II. 2. Methodenentwicklung

II. 2.1. Verkürzung der chronischen Tests auf 6 – 8 h

Im Biologielabor der HAW Hamburg ist der akute Leuchtbakterientest bereits etabliert. Die Vorschrift zur Durchführung des dortigen Leuchtbakterientests erfolgt in Anlehnung an die DIN EN ISO 11348-2 und basiert auf der Weiterentwicklung der Testvorschrift von 2002, die von Carolin Floeter an der TUHH erstellt wurde.

Zunächst sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, ob sich der chronische LBT aus der vorhandenen Testvorschrift entwickeln und für den chronischen LBT modifizieren ließ. Dadurch wäre der Aufwand des Aufbaus des Tests im Vergleich zu einem kompletten Neuaufbau geringer und bereits vorhandene Ergebnisse des akuten LBT wären direkt vergleichbar gewesen. Aus Vorversuchen von Stanko (2015) und einem Telefonat mit dem Hersteller Hach des LCK480 –Sets für den akuten LBT war bekannt, dass das im akuten Test verwendete Nährmedium nach DIN EN ISO 11348-2 nicht für eine Verlängerung der Testzeit geeignet ist, da die Nährstoffkonzentration zu gering ist, um ein stabiles Leuchten und Zellwachstum über mehrere Stunden aufrecht zu erhalten.

Daher sollte das SSWC – Nährmedium, das bereits erfolgreich im kinetischen LBT nach Menz über 24h hinweg angewandt wird - statt des DIN Nährmediums - verwendet werden, da die Zusammensetzung und Konzentration der Nährstoffe deutlich höher ist.

Zudem sollte getestet werden, ob die Testzeit des chronischen LBT sich von 24h (kinetischer LBT nach Menz) auf 6 – 8 h verkürzen ließ, da hierdurch ein kompletter Testdurchlauf an nur einem Arbeitstag durchgeführt werden könnte.

Hierzu wurde nach der Testvorschrift des akuten LBT des Biolabors der HAW-Hamburg vorgegangen (Stanko und Floeter 2014), jedoch mussten teilweise Änderungen vorgenommen werden, damit eine Verlängerung des Tests und die Messung der optischen Dichte möglich wurde:

- Statt des angegebenen Nährmediums nach DIN EN ISO 11348-2 wurde SSWC Medium verwendet. Auf die 96- Well -Mikrotiterplatte (costar 3590), die im akuten

LBT angewendet wird, um die Verdünnungsstufen in der richtigen Reihenfolge vorzulegen, konnte verzichtet werden, da nur Negativkontrollen und keine Verdünnungsstufen im Test genutzt wurden.

- Statt der 96- Well Mikrotiterplatte (costar 3912) wurde die 96- Well- MP (Greiner Bio One 655094), da diese einen durchsichtigen Boden besitzt und für die Messung der optischen Dichte verwendet werden kann.
- Die Randbereiche wurden als Blindwerte für die Absorptionsmessung bzw. Bestimmung der OD genutzt. Diese Vertiefungen wurden nur mit SSWC und NaCl befüllt.

II. 2.2. Herstellung der Leuchtbakteriensuspension und Testdurchführung (angelehnt an die Arbeitsanweisung für den akuten LBT des Biologielabors der HAW- Hamburg (Stanko und Floeter 2014))

Für die Herstellung der Leuchtbakterientestsuspension wurden die flüssiggetrockneten Leuchtbakterien zunächst 2 Min. erwärmt (20 ± 2 °C). Anschließend wurden 0,5 ml der Rekonstitutionslösung von HACH (15 ± 1 °C) in eine Rundkuvette pipettiert und in einem Schwung auf die konservierten Bakterien gegeben und gemischt. Die Bakteriensuspension wurde 15 min bei $15 \pm 0,3$ °C (Kühlschrank) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in 11,5 ml SSWC – NM überführt und die Testsuspension für 15 min (15 °C) akklimatisiert.

Eine Mikrotiterplatte (Greiner Bio One, 655094) und ein Reservoir (60ml) wurden im Klimaschrank 15 min lang auf $15 \pm 0,3$ °C temperiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl des SSWC – NM bzw. der Leuchtbakterientestsuspension in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte mit einer Mehrkanalpipette pipettiert und 15 min bei $15 \pm 0,3$ °C im Klimaschrank temperiert. Das Ausgangsleuchten (I_0) wurde gemessen und anschließend sofort jeweils 200 µl NaCl -Lösung aus einem Reservoir mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. In einer 2. Messung erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD_0) zu Testbeginn. Nach 30 min Kontaktzeit wurde die Leuchtintensität (I_{30}), sowie die Optische Dichte (OD_{30}) durch eine 2. Messung bestimmt. Weitere Messungen der Leuchtintensität und der OD erfolgten zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min, 180 min, 240 min

II. 2.3. Herstellung von Stammkulturen zur Kryokonservierung

Es war nicht möglich mit den von Hach – Lange gelieferten Bakterien direkt in einen chronischen Test einzusteigen, da die Lumineszenz aufgrund einer zu geringen Autoinduktor- Konzentration (AHL) im Nährmedium bereits nach 60 Minuten stark absank und somit nicht für einen chronischen Test geeignet war (vgl. Abschnitt IV. 1). Um die Konzentration des AHL im Nährmedium zu erhöhen, war eine mehrfache Vorkultivierung und anschließende Herstellung von Stammkulturen aus den flüssiggetrockneten Bakterien notwendig.

Da in dieser Arbeit die Herstellung der Stammkulturen im Vergleich zum kinetischen LBT nach Menz vereinfacht werden sollte, wurde auf die dort genutzte Ausplattierung und Bebrütung auf SSWC –Agar verzichtet und stattdessen direkt eine Kultivierung in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml Standard SSWC –NM durchgeführt. Die Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank.

Hierzu wurde ein Röhrchen der flüssiggetrockneten Bakterien aus dem Hach –Lange Set (LCK 480) 2 Minuten lang aufgetaut und 0,5 ml Rekonstitutionslösung hinzu pipettiert. Anschließend wurde das gesamte Röhrchen mit den Bakterien in den Kolben mit dem Standard SSWC -NM überführt.

Die Inkubation erfolgte bei 20°C auf dem Schüttler (200 rpm) im Klimaschrank. Ziel war es, das Wachstum von *A. fischeri* in die exponentielle Phase zu bringen und dadurch eine deutlich beschleunigte Zunahme der Zelldichte zu bewirken. Deswegen wurde nach 76 h unter sterilen Bedingungen 100µl der Kultur in einen neuen Kolben mit ebenfalls 50ml Standard SSWC überführt und ebenfalls inkubiert. Bei der alten Kultur wurde die OD gemessen. Der Vorgang wurde wiederholt, bis bei der Bakterienkultur bereits nach 72 h Inkubation eine OD_{610nm} von 1,08 gemessen werden konnte. Diese Kultur wurde anschließend für die Vorbereitung der Kryo – Stocks verwendet.

Unter sterilen Bedingungen wurden 20 ml der Kultur mit 5 ml Glycerol versetzt, in Kryoröhrchen aliquotiert (1000 µl/Röhrchen) und bei -80 °C eingelagert. Durch das Einfrieren sollte ein weiteres Wachstum der Zellen unterbunden werden, während diese gleichzeitig durch das Glycerol vor Gefrierbrand geschützt wurden und nach dem Auftauen sofort einsetzbar sein sollten.

II. 2.4. Vergleich von verschiedenen Kombinationen aus Anfangszelldichte und Medienzusammensetzung

In der Anwendung des kinetischen LBT nach Menz hat sich das eingesetzte Standard SSWC-Medium bereits bewährt. Allerdings ist es - wie bereits in der Zielsetzung der Arbeit beschrieben (siehe I. 3l. 3) - möglich, dass aufgrund der im Nährmedium enthaltenen Phosphate Schwermetalle in Proben während des Tests komplexiert werden und nicht mehr für *A. fischeri* bioverfügbar sein könnten. Aus diesem Grund sollten verschiedene Nährmedien angesetzt werden, die dem SSWC- Nährmedium

entsprechen, jedoch um ein bis drei Inhaltsstoffe, die Phosphate enthalten, reduziert wurden. Die unterschiedlichen Nährmedien und deren Komponenten sind unter II. 1.1 einzusehen. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die NM durchnummeriert und diese Nummern im Text verwendet.

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob die modifizierten Nährmedien ein vergleichbares Wachstum und Lumineszenz von *A. fischeri* hervorrufen wie beim Einsatz von dem SSWC - Standardnährmedium (Vollmedium). Wie schon Menz in seiner Diplomarbeit (2012) betonte, ist „das Verhältnis aus Bakteriendichte und Nährstoffangebot im Test von hoher Bedeutung für die Qualität der Ergebnisse.“ Da die Nährstoffzusammensetzung verändert wurde, sollten die Nährmedien mit zwei verschiedenen Anfangszellichten (15 FTU und 20FTU) ¹ auf Wachstum und Lumineszenz untersucht werden, um die geeignetsten Kombinationen auswählen zu können. Bei der Messung der Lumineszenz galt es insbesondere darauf zu achten, dass die Leuchtintensität zum Ende des Tests hin nicht absinkt, da ansonsten von einem Nährstoffmangel auszugehen ist.

Da die Idee der verkürzten Testzeit von 6 h bis 8 h als nicht praktikabel verworfen wurde (vgl. IV. 1), sollte in diesem Versuch die Endpunktmessung der chronischen Leuchthemmung und Zellvermehrungshemmung nach 24 h erfolgen.

Für jede Anfangszellichte wurde je eine Hauptkultur mit den verschiedenen modifizierten Nährmedien (NM Nr. 1 bis 5) sowie für das Vollmedium für den direkten Vergleich angesetzt² (siehe II. 1.6) und jeweils im Fünffachansatz 100 µl pro Well vorgelegt. Blindwerte wurden mit 100µl des jeweiligen Nährmediums belegt. Direkt nach der Bestimmung des Anfangsleuchtens (I_0) wurde zu jedem Well 100 µl NaCl-Lösung (2%) hinzu pipettiert und anschließend die Anfangstrübung (OD_0) gemessen. Neben den Endpunktmessungen nach 24 h wurden zusätzliche Messungen (nach 21 h, 22 h, 23 h) durchgeführt, um den Verlauf des Anstiegs der Leuchtintensität und des Zellwachstums zum Ende des Tests hin besser einschätzen zu können.

II. 2.5. Prüfung der Homogenität der 96-well-Mikrotiterplattenbelegung

Für die Entwicklung eines geeigneten Layouts der Belegung für den Test, war es notwendig die Belegung der 96-wells auf eine ausreichende Homogenität zu überprüfen. Um die Ursachen der intraexperimentellen Variabilität aufzudecken, musste zunächst geklärt werden, ob diese Abweichungen durch den Anwender z.B. bei der Belegung der Mikrotiterplatte ausgelöst wurden bzw. ob durch sonstige zufällige oder systematische Effekte die Wachstumsgeschwindigkeit der Leuchtbakterien beeinflusste. Abweichungen die ggf. durch den Anwender hervorgerufen wurden, sollten sich insbesondere dadurch auszeichnen, dass die optische Dichte des Wells zum Teststart (OD_0) im Vergleich zum Gesamtmittelwert der

¹ Der Begriff Anfangszellichte bezieht sich auf die optische Dichte der angesetzten Hauptkultur von 200 µl (ohne NaCl), gemessen bei einer Wellenlänge $\lambda = 610\text{nm}$.

² Die einzustellende Anfangszellichte von 15 bzw. 20 FTU wurde mithilfe der unter II. 1.5 bestimmten Kalibriergleichung in die entsprechende OD umgerechnet ($OD_{610\text{nm}} = 0,0427$ bzw. $0,0452$).

Platte eine große Standardabweichung bzw. einen großen Variationskoeffizienten aufweist. Systematische Messabweichungen, ausgelöst z.B. durch Temperaturunterschiede innerhalb des Plattenbereichs, können zu einem Verlust der Sensitivität und im schlechtesten Falle sogar zu falsch - positiven bzw. falsch - negativen Testergebnissen führen.

Zur Überprüfung eines ausreichend homogenen Plattenbereichs wurde eine Hauptkultur aus Vollmedium (Standard – SSWC) mit einer Anfangszelldichte von 20 FTU hergestellt (siehe II. 1.6).

Eine Mikrotiterplatte (Greiner Bio – One, 655094) wurde zunächst vollständig mit 100 µl Hauptkultur je Well belegt, 30 min bei 15 °C inkubiert und anschließend sofort die Anfangslumineszenz I_0 gemessen. 100 µl NaCl-Lsg. [2%]) wurden in jedes einzelne Well hinzupipettiert und die optische Dichte zu Beginn des Tests gemessen (OD_0). Bei 200 rpm und 15 °C inkubierte die Mikrotiterplatte - komplett belegt mit den Negativkontrollen - über 24 h ehe bei der Endpunktmessung die Lumineszenz und die OD erneut gemessen wurden. Dieses Experiment wurde insgesamt fünfmal wiederholt, um systematische Fehler erkennbar zu machen.

II. 2.6. Auswahl der Positivkontrollen

Bei umwelttoxikologischen Versuchen sollte zur Qualitätssicherung neben den zu untersuchenden Proben mit unbekannter Wirkung auch Positivkontrollen eingesetzt werden, deren Wirkung bekannt ist. Dies dient der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Testansatzes und gegebenenfalls der Erfassung von Veränderungen der Sensitivität von *A. fischeri*.

Als Positivkontrolle für die akuten Leuchthemmung nach 30 min Testzeit (PKI) wurde 3,5 –DCP (in NaCl-Lösung [2%]) ausgewählt, da diese Substanz sowohl im DIN EN ISO 11348-2 (2009) gefordert wird und sowohl im akuten LBT der HAW - Hamburg als auch im Leuchtbakterientest nach Menz (Jahr) mitgeführt wird. Das 3,5-DCP (Reinheit: 97%) wurde von Alpha Aesar aus Minderslachen bezogen

Eine weitere Kontrolle (PKII) sollte für die chronische Leuchthemmung als auch für die Zellvermehrungshemmung eingesetzt werden. Das im kinetischen LBT nach Menz eingesetzte Chloramphenicol ist als CMR -Stoff (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) eingestuft. Da der Leuchtbakterientest nach seiner Etablierung im Hochschulbetrieb u.a. von Studierenden durchgeführt werden soll und diese so wenig wie möglich potentiell gefährlichen Substanzen ausgesetzt werden sollten, sollte auf die Verwendung von Chloramphenicol verzichtet werden. Stattdessen wurde für die zweite Positivkontrolle ebenfalls 3,5 – DCP ausgewählt, da diese Substanz weniger bedenklich ist, bereits Anwendung in diesem Test findet und somit ohne viel weiteren Aufwand aus der Stammlösung ansetzen ließe. Ferner existieren bereits aus den im kinetischen LBT von Menz bestimmten EC_{50} -Werte (chronische LH: 1,47 mg/l ZVH: 1,73 mg/l). Eine Verdünnungsreihe von 3,5 - DCP sollte im Abschnitt II. 2.9 getestet werden und anschließend die berechneten EC_{50} –Werte mit den oben genannten von Menz verglichen werden.

Hierfür wurde eine 3,5 – DCP Stammlösung in einer NaCl –Lösung[2%]) mit einer Konzentration von $\beta(3,5 - DCP) = 334 \text{ mg/l}$ angesetzt und daraus eine Konzentrationsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: Konzentrationen der 3, 5 –DCP Verdünnungsstufen der Proben- und Testverdünnungen

Bezeichnung der Verdünnungsstufe (V)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
Konzentration 3,5-DCP im Messkolben [mg /l]	18,00	9,00	4,50	2,25	1,13	0,56	0,28
Konzentration 3,5-DCP im Testansatz [mg /l]	9,00	4,50	2,25	1,13	0,56	0,28	0,14

II. 2.7. Optimale 96-Well-Mikrotiterplattenbelegung

Im Abschnitt IV. 2.2 wurden Plattenbereiche bestimmt, die aufgrund ihrer systematischen Messabweichungen nicht dafür geeignet sind, als Negativkontrolle (NK) oder Verdünnungsstufe der zu untersuchenden Probe(VX) definiert zu werden, da dort das Wachstum bzw. das Leuchten der Bakterienzellen signifikant vom durchschnittlichen Wert abweicht und somit bei der späteren Berechnung der Hemmung einen verfälschenden Einfluss auf das Ergebnis haben kann.

Der folgende Schritt war ein Plattenlayout zu entwerfen, das Bereiche mit homogenem Wachstum für Negativkontrollen und Verdünnungsstufen definiert, wobei die Negativkontrollen und die verschiedenen Verdünnungsstufen möglichst „zufällig“ über die gesamte Mikrotiterplatte verteilt sein sollen. Die Bereiche, die zu signifikanten systematischen Abweichungen im Wachstum der Negativkontrollen führten, können jedoch noch als Positionen für Blindwerte genutzt werden.

Neben den vorangegangenen Kriterien muss das Plattenlayout auch so beschaffen sein, dass letztlich auch die Mikrotiterplatte schnell und fehlerfrei mit den eingesetzten Lösungen belegt werden kann.

II. 2.8. Berechnung der scheinbaren Hemmungen aufgrund der Position auf der Mikrotiterplatte

Nach dem Entwurf des Layouts sollte anhand der bestehenden Biolumineszenz und Trübungsdaten nach 30 min und 24 h der Negativkontrollen aus Abschnitt II 2.5 rechnerisch die prozentuale Hemmung vom Mittelwert der Negativkontrollen berechnet werden, die auf der Position auf der Mikrotiterplatte beruht und nicht auf eine toxische Substanz zurückzuführen ist. Die wiederholten Messungen der Negativkontrollen, die komplett über fünf Mikrotiterplatten hinweg ohne Zugabe von Prüfsubstanz belegt wurden, sollten nach dem im Abschnitt III. 3.2 erstellten Layout

ausgewertet werden. So wurden diejenigen Positionen, die die Replikate einer Verdünnung auf der MP darstellen, für die Endpunkte der chronischen Zellvermehrungshemmung sowie chronischen Leuchthemmung ausgewertet, um herauszufinden ob innerhalb der zueinander gehörenden Replikate eine systematische Messabweichung auftritt.

II. 2.9. Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium mit 3,5 – DCP als Referenzsubstanz

Für das aus dem Abschnitt IV. 2 ausgewählte Nährmedium Nr.5 sollte ein erster Test mit der Referenzsubstanz 3,5 –DCP durchgeführt werden, da diese später als Positivkontrollen eingesetzt werden sollten (siehe Abschnitt II. 2.6). In diesem Versuch sollten sowohl für das NM Nr. 5 als auch – zum Vergleich – für das Vollmedium deren EC_{50} – Werte für die Endpunkte (akute Leuchthemmung nach 30 min, chronische Leuchthemmung nach 24 h, Zellvermehrungshemmung nach 24 h) bei 15 FTU und 20 FTU Anfangszelldichte bestimmt und deren Empfindlichkeit verglichen werden: Hierfür wurde basierend auf den Ergebnissen von Abschnitt III. 3.2 ein erstes Layout entworfen (siehe Abbildung 5), das die Positionseffekte auf der Mikrotiterplatte berücksichtigen sollte und trotzdem die einzelnen Verdünnungsstufen über die ganze Platte verteilt. Somit konnte auch eine erste Überprüfung des Layouts auf seine Anwendbarkeit gemacht werden. Der Test wurde nach den Angaben von der Arbeitsanweisung in Anhang XVI durchgeführt.

Der Vergleich der Sensitivität der Parameter und der beiden Nährmedien erfolgt, indem zu jedem Parameter (Endpunkt) der Mittelwert aus den berechneten EC_{50} -Werten (siehe Methode EC_{50} -Werte) gebildet.

II. 2.10. Definition der Gültigkeitskriterien und Überprüfung der Einhaltung

Für den akuten LBT wurden die Gültigkeitskriterien nach (DIN EN ISO 11348-2) angewendet. Die Gültigkeitskriterien für die chronischen Endpunkte (Hemmung der Biolumineszenz nach chronischer Exposition und Hemmung der Zellvermehrung) wurden aus dem chronischen LBT definierten GK von Menz (2012) übernommen. Die Anforderung an die Mindestwachstumsrate der Bakterien wurde ebenfalls von Menz (2012) (bzw. DIN 38412-37 : 1999) übernommen.

Anschließend sollte die Erfüllung und Eignung dieser Kriterien anhand der Daten aus den zuvor durchgeführten Messungen überprüft werden. Bei der Zellvermehrungshemmung könnte eine Veränderung der Gültigkeitskriterien notwendig sein, da dessen Endpunktmessung von 14 h auf 24 h verschoben wurde.

Akute Leuchthemmung

- Der Korrekturfaktor (KF) muss zwischen 0,6 und 1,3 liegen.
- Die Positivkontrolle PKI (3,5-DCP) muss eine Hemmung von 20-80% bewirken.
- Die relative Abweichung des Korrekturfaktors (KF) darf nicht mehr als 3% Betragen.

- Die Abweichung der Hemmwirkungen aus den parallelen Testansätzen (Replikaten) darf nicht mehr als 3%-Punkte betragen.

Chronische Leuchthemmung

- PK II muss eine Hemmung von 20-80% bewirken
- Die Negativkontrolle darf das Lumineszenzmaximum nicht überschreiten.
- Die relative Abweichung der Leuchtintensität in den Negativkontrollen darf nicht mehr als 5% betragen
- Die Abweichung der Hemmwirkungen aus den replizierten Testansätzen darf nicht mehr als 5%-Punkte betragen

Zellvermehrungshemmung

- Die Verdopplungszeit der Negativkontrolle darf nicht mehr als 4 h betragen
- PKII muss eine Hemmung von 15-50% bewirken
- Die relative Abweichung der Optischen Dichte in den Kontrollansätzen darf nicht mehr als 5% betragen
- Die Abweichung der Hemmwirkungen aus den replizierten Testansätzen darf nicht mehr als 5%-Punkte betragen.

II. 3. Berechnung der Testergebnisse

II. 3.1. Berechnungen zur Analyse des Wachstums und Auswertung des kinetischen Leuchtbakterientests

II. 3.1.1 Berechnung der akuten Leuchthemmung

Die Berechnung der akuten Leuchthemmung erfolgte nach EN ISO 11348 und entspricht dem Vorgehen des kinetischen LBT nach Menz (2013).

Hierbei wurden folgende Formeln angewendet:

1. Berechnung des Korrekturfaktors:

Um die systematisch, zeitlich bedingte Abnahme der Biolumineszenz bei der Berechnung der Leuchtintensität zu berücksichtigen, welche auch ohne Schadstoffeinfluss auf die Probe hervorgerufen wird (Klein 1991), wurde anhand der Leuchtwerte der Negativkontrollen ein Korrekturfaktor berechnet.

Formel 1: Berechnung des Korrekturfaktors

$$KF = \frac{I_{30min}}{I_A}$$

KF Korrekturfaktor

I_{30min} Mittelwert der Leuchtintensität der Negativkontrolle nach 30 min

I_A Mittelwert der Leuchtintensität der Negativkontrolle vor Probenzugabe (Anfangsleuchten)

II. 3.1.2 Berechnung der korrigierten Werte für das Anfangsleuchten im Testansatz:**Formel 2: Berechnung des korrigierten Anfangsleuchtens**

$$KI_A = I_A \cdot KF$$

KI_A Korrigierter Wert für I_A

I_A Mittelwert der Leuchtintensität der Negativkontrolle vor Probenzugabe (Anfangsleuchten)

II. 3.1.3 Berechnung der Leuchthemmung:**Formel 3: Berechnung der akuten Leuchthemmung**

$$LH_{30min} = \frac{KI_A - I_{30min}}{KI_A} \cdot 100$$

LH_{30min} Leuchthemmung in Prozent nach 30min

I_{30min} Leuchtintensität nach 30 min im Testansatz

KI_A Korrigierter Wert für I_A

II. 3.1.4 Berechnung der chronischen Leuchthemmung

Da die Entwicklung der Biolumineszenz über den Zeitraum von 24 h nicht konstant ist, kann zur Berechnung der chronischen Leuchthemmung nicht dieselbe Formel wie zur Berechnung der akuten Leuchthemmung genutzt werden. Stattdessen wurde im

kinetischen LBT nach Menz eine modifizierte Gleichung herangezogen, die von Backhaus (1997) beschrieben wurde und auch in dieser Arbeit Anwendung fand.

Formel 4: Berechnung der chronischen Leuchthemmung

$$LH_{24h} = \frac{(I_{NK} - I_T)}{I_{NK}} \cdot 100$$

LH_{24h} Leuchthemmung in Prozent nach 24 h

I_{NK} Mittelwert der Leuchtintensität der Negativkontrollen nach 24 h

I_T Leuchtintensität nach 24 h im Testansatz

II. 3.1.5 Analyse des Wachstums

Die Zellvermehrung wurde zunächst wie im kinetischen LBT nach Menz anhand der Wachstumsrate μ_{OD} und der daraus resultierenden Verdopplungszeit $t_{d(OD)}$ charakterisiert. Für die Bestimmung der Zellvermehrungshemmung sollte in den Tests eine Verdopplungszeit $< 4h$ erreicht werden. Zusätzlich wurde die aus der unter III. 3.1 bestimmten Kalibriergerade zur Umrechnung der OD zur absoluten Zellzahl verwendet, um für die absolute Zellzahl ebenfalls eine Wachstumsrate μ_{ZZ} und Verdopplungszeit $t_{d(ZZ)}$ zu bestimmen (siehe Formel 2). Die Wachstumsraten und Verdopplungszeiten sollten im Anschluss miteinander verglichen werden.

Zur Berechnung wurden folgende Formeln verwendet:

Formel 5: Berechnung der spezifischen Wachstumsrate bezogen auf die OD

$$\mu_{OD} = \frac{\ln(OD_{24}) - \ln(OD_0)}{24h}$$

μ_{OD} spezifische Wachstumsrate bezogen auf die OD

OD_0 Optische Dichte zum Zeitpunkt 0

OD_{24} Optische Dichte nach 24h

Formel 6: Umrechnung der optischen Dichte in die absolute Zellzahl

$$ZZ_t = \frac{OD_t + 0,0068}{7 \cdot 10^{-10}}$$

ZZ_t Zellzahl zum Zeitpunkt t

OD_t Optische Dichte zum Zeitpunkt t

Formel 7: Berechnung der spezifischen Wachstumsrate bezogen auf die ZZ

$$\mu_{ZZ} = \frac{\ln(ZZ_{24}) - \ln(ZZ_0)}{24h}$$

μ_{ZZ}	spezifische Wachstumsrate bezogen auf die ZZ
ZZ_0	Zellzahl zum Zeitpunkt 0
ZZ_{24}	Zellzahl nach 24h

Formel 8: Berechnung der Verdopplungszeit bezogen auf die OD

$$t_{d(OD)} = \frac{\ln 2}{\mu_{OD}}$$

$t_{d(OD)}$	Verdopplungszeit bezogen auf die OD [h]
μ_{OD}	spezifische Wachstumsrate bezogen auf die OD

Formel 9: Berechnung der Verdopplungszeit bezogen auf die ZZ

$$t_{d(ZZ)} = \frac{\ln 2}{\mu_{ZZ}}$$

$t_{d(ZZ)}$	Verdopplungszeit bezogen auf die ZZ [h]
μ_{ZZ}	spezifische Wachstumsrate bezogen auf die ZZ

II. 3.1.6 Berechnung der Zellvermehrungshemmung

Im kinetischen LBT nach Menz (2012) wurde gezeigt, dass nach seinen definierten Testparametern nach etwa 14 h die stationäre Phase erreicht wird, weshalb dieser Zeitpunkt für die Bestimmung der Zellvermehrungshemmung im dortigen Test gewählt wurde. Da in dieser Arbeit keine automatische Aufzeichnung der Messung sondern nur eine Anfangs- und Endpunktmessung durchgeführt werden, sollte der Zeitpunkt der Messung für die Zellvermehrungshemmung auf 24 h gelegt werden, da dadurch eine bessere Anwendbarkeit gegeben ist.

Zunächst wurde von allen Messwerten der zugehörige Leerwert (Blank) abgezogen. Die prozentuale Hemmung der Zellvermehrung wurde anhand der Formel 3 berechnet.

Formel 10: Berechnung der Zellvermehrungshemmung

$$WH_{24h} = \frac{(OD_{NK} - OD_{24})}{(OD_{NK} - OD_0)} \cdot 100$$

ZVH_{24h}	Zellvermehrungshemmung in Prozent zum Zeitpunkt t
OD_{24}	Optische Dichte im Testansatz nach 24 h
OD_{NK}	Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen nach 24 h
OD_0	Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen nach Probenzugabe

II. 3.1.7 Bestimmung der halbmaximalen Effektkonzentration (EC₅₀)

Der EC₅₀-Wert beschreibt die Stoffkonzentration, bei der eine halbmaximale Hemmwirkung von 50% auftritt.

Die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve zur Berechnung der EC₅₀ Werte erfolgte mit der Statistik – Software GraphPad Prism 6 mittels einer nichtlinearen Regressionsanalyse, wobei die Funktion „vierparametrische logistische Gleichung“ verwendet wurde.

Formel 11: „Vierparametrische logistische Gleichung“

$$EC_{50(\text{abs.})} = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50(\text{rel.})}}\right)^{-\text{Hillslope}}}$$

<i>min</i>	Minimum der Dosis-Effekt-Kurve
<i>max</i>	Maximum der Dosis-Effekt-Kurve
EC ₅₀ (abs.)	absolute halbmaximale Effektkonzentration
EC ₅₀ (rel.)	relative halbmaximale Effektkonzentration
<i>Hillslope</i>	Steigung am Kurvenmittelpunkt

II. 4.1. Berechnungen zur Prüfung der Homogenität der 96-well-Mikrotiterplattenpositionen

Mit den aus Abschnitt II. 2.5 erhaltenen Werten wurden verschiedene Auswertungen durchgeführt, um Aussagen bezüglich Anwenderfehlern, zufälligen - sowie systematischen Messabweichungen treffen zu können. Die zur Auswertung benötigten Berechnungen sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

II. 4.1.1 Überprüfung der einzelnen Mikrotiterplatten auf Abweichungen, verursacht durch den Anwender, sowie deren Auswirkungen auf die chronischen Tests

Zur Bestimmung der intraexperimentellen Variabilität wurde zunächst für jede Mikrotiterplatte (MP) die Lumineszenz sowie die optische Dichte zu Testbeginn und nach 24 h (Endpunktmessung der chronischen Tests) betrachtet. Hierfür wurde für jedes Well der MP die absolute Abweichung (Standardabweichung), sowie die relative Abweichung (Variationskoeffizient) zum Gesamtmittelwert¹ der MP berechnet und visuell dargestellt

Anschließend wurde tabellarisch für t_0 und t_{24} die Anzahl von Wells auf der MP bestimmt, deren relative Abweichung vom Gesamtmittelwert größer als 5 % und 10 % bzw. 10% und 20 % war.

II. 4.1.2 Identifizierung von systematischen Messfehlern

Zur Bestimmung von systematischen Messfehlern wurden die 5 parallel angesetzten Mikrotiterplatten gemeinsam betrachtet. Hierbei wurde jede einzelne Position auf der MP mit seinen Replikaten auf den anderen Mikrotiterplatten für die Lumineszenz sowie die optische Dichte nach 24 h Testzeit gemittelt. Anschließend wurde für jede Position die Standardabweichung und der Variationskoeffizient in Bezug auf den Gesamtmittelwert² aller Replikate aller Platten berechnet. Hiermit sollen Wells identifiziert werden, deren Werte über die Tests hinweg verhältnismäßig stark gestreut haben.

Anschließend wurde in einem t-Test für gepaarte Stichproben (Zweistichproben t-Test) unter Annahme einer Normalverteilung überprüft, ob die Mittelwerte der jeweiligen Position auf den Platten signifikant vom Gesamtmittelwert aller Replikate abweichen. Bei einem Signifikanzwert (p-Wert) von $\leq 0,05$ wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen, dessen Ursache auf systematischen Abweichungen basiert. Alle t-Tests wurden mithilfe Excel 2013 durchgeführt.

¹ Die Vermutung bestand, dass die Randbereiche der Mikrotiterplatte deutlichen Randeffekten unterliegen und wurden deshalb im Gesamtmittelwert nicht berücksichtigt

II. 4.2. Berechnung der scheinbaren Hemmungen aufgrund der Position auf der Mikrotiterplatte

Für jede „Verdünnungsreihe“ wurde für alle dazugehörigen Positionen des Layouts auf der Mikrotiterplatte die chronische Leuchthemmung bzw. chronische Zellvermehrungshemmung nach Formel 4 und Formel 9 aus Abschnitt 1 und der Mittelwert und die relative Standardabweichung aller Replikate der jeweiligen "Verdünnungsstufe" auf der MP gebildet. Dies wurde für die restlichen MP wiederholt. Nicht eingeflossen sind die Wells C6, C7; D5-D8; F6; G1, G2, F4 und H3 für die chronische Leuchthemmung, sowie bei der chronischen Zellvermehrungshemmung die Wells B4, F3, F4, F6,G2 und G7 für die bereits eine systematische Messabweichung im Abschnitt VIII.1.1.1 festgestellt und deswegen bei der Auswertung hier nicht berücksichtigt wurden.

In einem weiteren Schritt wurde aus allen Ergebnissen für jeweils jede "Verdünnungsstufe" der einzelnen Mikrotiterplatten (n = 5) ein Gesamtmittelwert sowie die relative Standardabweichung berechnet. Außerdem wurde anhand der Ergebnisse der einzelnen Platten jede Verdünnungsstufe einem t- Test unterworfen, wobei die Positionen der Negativkontrolle die Funktion der Kontrollgruppe übernahmen. Diese für die Replikate der Negativkontrolle geben den Sollwert vor (0% Hemmung).

In den t-Tests für gepaarte Stichproben (Zweistichproben t-Test) wurde – unter Annahme einer Normalverteilung – überprüft, ob die Mittelwerte der jeweiligen Position auf den Platten signifikant von der Kontrollgruppe abweichen. Bei einem Signifikanzwert (p-Wert) von $\leq 0,05$ wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen. Alle t-Tests wurden mithilfe Excel 2013 durchgeführt.

II. 4.3. Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium mit 3,5 – DCP als Referenzsubstanz

Für jede Platte wurde für die jeweiligen Verdünnungsstufen⁵ und jeden der Endpunktmessungen die Mittelwerte der Hemmungen berechnet sowie die relative Standardabweichung in Prozentpunkten (Variationskoeffizient). Hierzu wurden die Formeln 1 bis 10 aus dem Abschnitt 1 zur Berechnung für die akute und chronische Leuchthemmung ,sowie der chronischen Zellvermehrungshemmung und die spezifischen Wachstumsraten angewandt und für jede Platte für 3,5 - DCP der EC₅₀ - Wert für die Endpunkte bestimmt.

⁵ In diesem Test wurden die Positionen im mittleren Bereich, die eine nachgewiesene systematische Abweichung mit sich bringen nicht aus der Auswertung ausgeschlossen. Stattdessen wurde alles genauso ausgewertet, wie es im Layout zu sehen ist.

III. Ergebnisse

III. 1. Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung: „Verkürzung der chronischen Tests auf 6 - 8h“

In Abbildung 3 ist der Verlauf der optischen Dichte (OD) und die Lumineszenz in relativen Lichteinheiten [RLU] dargestellt. Die OD der Kultur steigt innerhalb der 240 min geringfügig von einer $OD_{610nm}(t_0) = 0,0012$ auf eine $OD_{610nm}(t_{240}) = 0,002$. Die Lumineszenz steigt innerhalb der ersten 60 Minuten von $3,3 \cdot 10^4$ RLU auf $5,2 \cdot 10^4$ RLU. Bei den folgenden Zeitpunkten sinkt die Lumineszenz stetig, zuletzt sogar unter den Wert der Anfangslumineszenz ($3,2 \cdot 10^4$ RLU zum Zeitpunkt 240 min), weswegen die Messung nach 240 Minuten abgebrochen wurde. Daher wird auch auf die berechneten Standardabweichungen nicht weiter eingegangen.

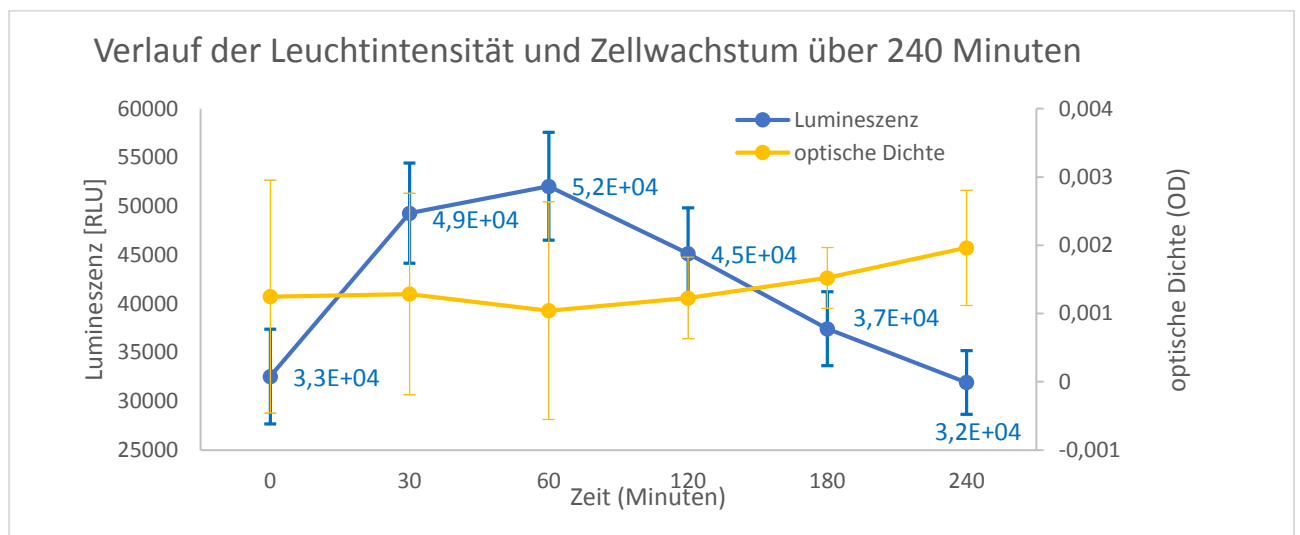


Abbildung 2: Verlauf der Lumineszenz und optischen Dichte über einen Testzeitraum von 240 min:

III. 2. Darstellung der Ergebnisse der Validierung der optischen Dichte am Plattenreader mit Formazin

In Tabelle 6 sind die gemittelten Messwerte der optischen Dichte zur jeweiligen Verdünnungsstufe von Formazin dargestellt. Die sich aus der linearen Regression ergebende Kalibriergerade ist in Abbildung 3 einzusehen.

Der Variationskoeffizient der Standardabweichung beträgt im kleinsten Wert 0,9 % (V1, 400 FTU) und streut am Meisten im Blindwert (0 FTU) mit 6,8 %. Die sich aus der Kalibriergeraden ergebende Geradengleichung ist in Formel 12 dargestellt und hat ein Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,999$.

Formel 12: Geradengleichung zur Berechnung der OD aus Formazin - Trübungseinheiten

$$OD_{610nm} = 0,005 \cdot \text{Trübung (FTU)} + 0,0352$$

Mit der Geradengleichung konnte die einzustellende Anfangszell-dichte der Hauptkultur – für die, in dieser Arbeit durchzuführenden Untersuchungen – berechnet werden, die in den Versuchen 15 FTU ($OD_{610nm} = 0,0427$) bzw. 20 FTU ($OD_{610nm} = 0,0452$) betragen sollte.

Im 670 Abbildung 11 ist die Kalibriergerade des Multifunktionsplattenreaders bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578$ nm dargestellt, die für den kinetischen LBT von Menz erzeugt wurde. Die Anfangszell-dichten betragen dort 15 FTU ($OD_{610nm} = 0,0416$), sowie 20 FTU ($OD_{610nm} = 0,0451$). Die genannten Anfangszell-dichten weichen im dortigen und hiesigen Test aufgrund der unterschiedlichen Wellenlänge bei der gemessen wird um 2,6 % (15 FTU) bzw. 0,2 % voneinander ab.

Tabelle 6 : Darstellung der Messergebnisse (Mittelwerte der optischen Dichte) der Formazin – Verdünnungsreihe (N = Anzahl)

Mittelwerte der Ansätze	Trübung (FTU)	MW(OD)	SD	CV [%]
Blindwert (Wasser (N=14))	0	0,0352	0,00238	6,8%
V1 (N=8)	400	0,2426	0,00209	0,9%
V2 (N=8)	200	0,1391	0,00440	3,2%
V3 (N=8)	100	0,0864	0,00244	2,8%
V4 (N=8)	50	0,0614	0,00131	2,1%
V5 (N=8)	25	0,0493	0,00326	6,6%
V6 (N=8)	12,5	0,0409	0,00095	2,3%

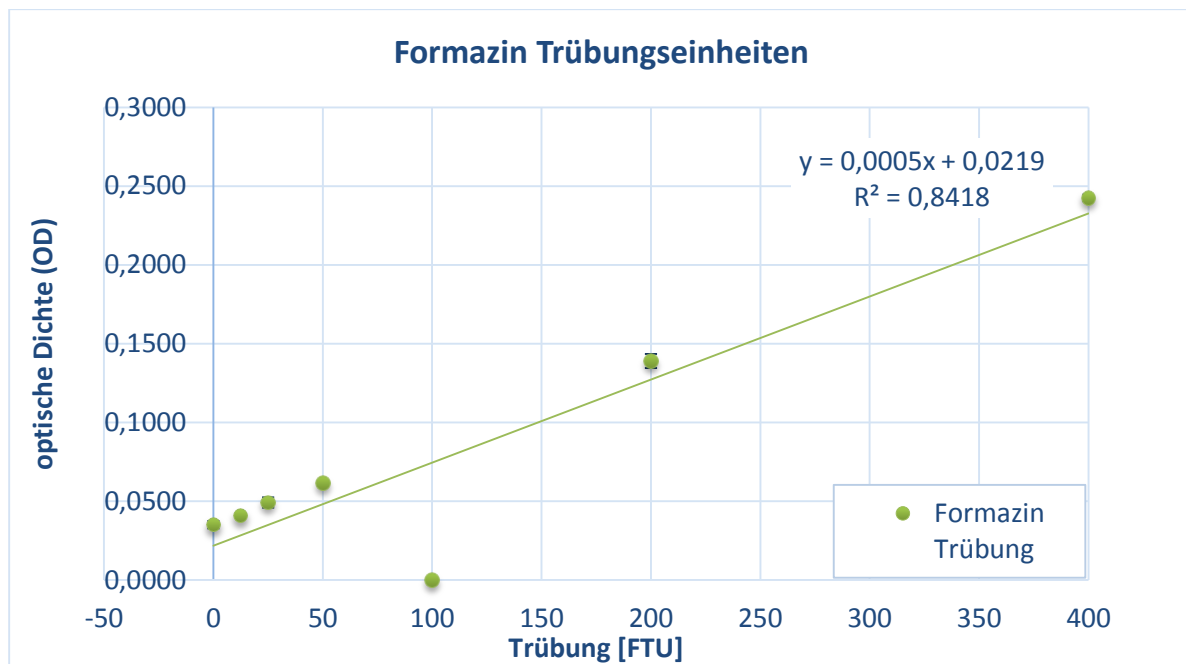


Abbildung 3: Kalibriergerade der optischen Dichte in Abhängigkeit von Formazin - Trübungseinheiten

III. 3. Ergebnisse zur Methodenentwicklung

III. 3.1. Zellzahlbestimmung

Abbildung 4 stellt als Ergebnis die Kalibriergerade der optischen Dichte in Abhängigkeit der Zellzahl dar. Die sich aus der Kalibriergeraden ergebende Geradengleichung hat ein Bestimmtheitsmaß von 0,9913. Durch Umstellung erhält man die Geradengleichung zur Bestimmung der Zellzahl aus den Messwerten der optischen Dichte (Formel 6: Umrechnung der optischen Dichte in die absolute Zellzahl).

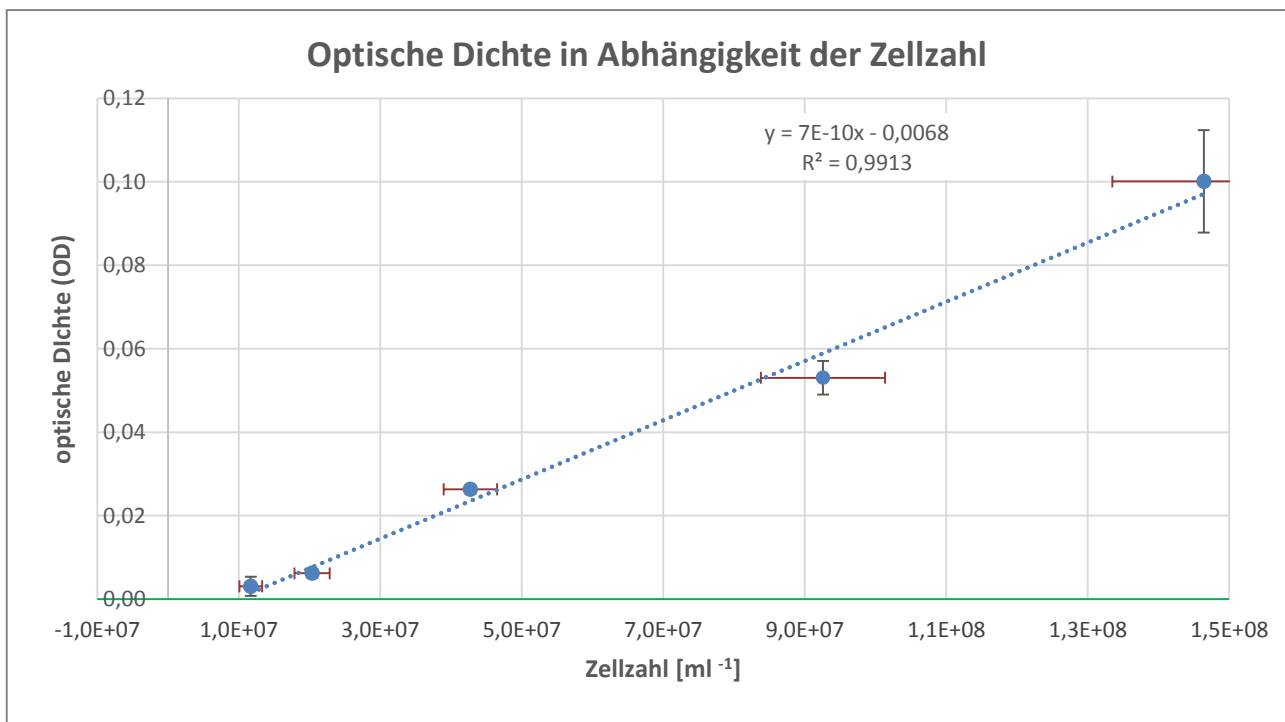


Abbildung 4: : Kalibriergerade der optischen Dichte in Abhängigkeit der Zellzahl

III. 3.2. Entwurf des Plattenlayouts

Das für den LBT entworfene Plattenlayout ist der Abbildung 5 zu entnehmen. Die Bezeichnung und Zusammensetzung der Ansätze wird ergänzend in Tabelle 7 erklärt. Für die Erstellung des Belegungsschemas wurden die Randbereiche für Blindproben (BK und BVX) definiert, da für 23 der 36 - Wells ein signifikanter Randeffekt bei der Lumineszenz und/ oder der OD – Messung nachgewiesen wurde. Zudem sollten bei der Berechnung der Hemmung der chronischen Lumineszenz die Wells C6, C7; D5-D8; F6; G1, G2, F4, H3 sowie bei der chronischen Zellvermehrungshemmung die Wells B4, F3, F4, F6, G2, G7 nicht berücksichtigt werden. Dadurch gibt es bei einigen Verdünnungsstufen weniger Replikate, jedoch hat bei korrekter Belegung der Mikrotiterplatte jede Verdünnungsstufe 5 und die Negativkontrolle 8 mindestens 5 Replikate, was als eine ausreichende Anzahl betrachtet wird.

Plattenlayout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BP1	BK	BK	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BK	BK
B	BP2	NK	V6	V4	V2	V1	V7	V5	V3	NK	V6	BP1
C	BP3	V1	V7	V5	V3	V2	NK	V6	V4	V1	V7	BP2
D	BP4	V2	NK	V6	V4	V3	V1	V7	V5	V2	NK	BP3
E	BP5	V3	V1	V7	V5	V4	V2	NK	V6	V3	V1	BP4
F	BP6	V4	V2	NK	V6	V5	V3	V1	V7	V4	V2	BP5
G	BP7	V5	V3	V1	V7	V6	V4	V2	NK	V5	V3	BP6
H	BK	BK	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BK	BK	BP7

Abbildung 5: Entwurf des im LBT zu verwendenden Plattenlayouts

Tabelle 7: Zusammensetzung der Referenz-, Kontroll-, und Testansätze

Ansatz	Bezeichnung	Zugabe von (jeweils 100µl)					
		1. SSWC - Medium	2. Hauptkultur	3. PK I	4. PK II	5. NaCl- Lsg.	6. Verdünnung bzw. Probe X
BK	Blindwert NK/PK	+	-	-	-	+	-
BVX	Blindwert V X	+	-	-	-	-	+
PK I	Positivkontrolle I	-	+	+	-	-	-
PKII	Positivkontrolle II	-	+	-	+	-	-
NK	Negativkontrolle	-	+	-	-	+	-
VX	Verdünnung bzw. Probe X	-	+	-	-	-	+

Die Verdünnungsstufen der Proben sowie die Negativkontrollen sind über die Platte verteilt, sodass auftretende Einflüsse sich nur auf einzelne Replikate und nicht auf die gesamte Verdünnungsstufe auswirken sollten. Um eine anwendbare und schnelle

Belegung der Mikrotiterplatte zu gewährleisten wurde eigens für den Test eine Pipettierhilfe entworfen, um mit der Multipipette pipettieren zu können. In die Pipettierhilfe (siehe Abbildung 7) werden auf die aufgeklebten Mehrkanal-Reservoirs zwei weitere gesteckt. Vor dem Zusammenstecken muss an einem der Reservoirs ein „Kanal“ abgeschnitten werden, sodass die beiden Reservoirs überlappen. Wichtig ist hierbei, dass die Kanäle der beiden Reservoirs so eng beieinander liegen, dass beim Eintauchen der Mehrkanalpipette nicht zwei Pipettenspitzen in denselben Kanal gelangen. Die Proben sollen in der Reihenfolge des Belegungsschemas entsprechend (unterer Teil in der Abbildung) in die Mehrkanal-Reservoirs vorgelegt werden. Mit 6 Pipettenspitzen auf der Multipipette kann anschließend entsprechend des Plattenlayouts die Mikrotiterplatte belegt werden. Nach der Belegung können die oberen Reagenzreservoirs entsorgt werden, während die unteren Reservoirs nur der Stabilisierung der Oberen dienen und nicht belegt werden sollten. Vorteil der Pipettierhilfe ist, dass die Reagenzreservoirs fixiert sind und daher auch kurze Strecken transportiert werden können (z.B. zum Klimaschrank zum Vortemperieren).



Abbildung 6: Pipettierhilfe zur Belegung der Mikrotiterplatte

Eine erste Überprüfung und einhergehende Bewertung des Plattenlayouts erfolgte in den Abschnitten II. 2.8 und II. 2.9

III. 3.3. Vergleich von verschiedenen Kombinationen aus Anfangszellichte und Medienzusammensetzung

Um analysieren zu können, welche Kombinationen aus Nährmedium und Anfangszellichte überhaupt geeignet sind, wurden die Ergebnisse in Tabelle 8 sowie

Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14 aus Anhang II zusammenfassend dargestellt.

In Tabelle 6 werden die verschiedenen Nährmedienkombinationen (15 und 20 FTU) in Bezug auf die optische Dichte und Wachstumsrate dargestellt. In der ersten Zeile wurde der Gesamtmittelwert der Start-OD aller getesteter Nährmedien – Bakteriensuspensionen zum Zeitpunkt t_0 (nach Zugabe von NaCl) bei 15 FTU Anfangszell-dichte berechnet. Analog wird in Zeile 2 der Wert für 20 FTU dargestellt.

Da in dem Versuch alle NM auf eine MP belegt wurden und dadurch die Herstellung der 15 bzw. 20 FTU Hauptkulturen zeitaufwändig war, konnte eine größere Variation der Anfangszell-dichte in der Hauptkultur bzw. bei der OD_0 zum Testbeginn nicht vermieden werden. Deswegen wird in der dritten bzw. vierten Zeile die tatsächliche OD bzw. die Abweichung der OD von dem Gesamtmittelwert aus Reihe 1 bzw. 2 dargestellt. Die kleinste Startdichte hatte das NM Nr. 5 (15 FTU) mit einer OD_0 von 0,0236 (- 14,3 % Abweichung vom Gesamtmittelwert (GMW)), während die größte Startdichte bei NM Nr. 1(20 FTU) mit einer $OD_0 = 0,0357$ (18,4% Abweichung v. GMW) in den Test startete. In Abbildung 12 wird für alle Kombinationen neben der Anfangszell-dichte und -Lumineszenz von t_0 auch diejenige zur Endpunktmessung nach 24 h (t_{24}) abgebildet. Es fällt auf, dass nach 24 h Testzeit die Nährmedien mit 15 FTU Anfangszell-dichte der Hauptkultur sowohl eine höhere Lumineszenz als auch optische Dichte aufweisen, obwohl beides bei t_0 noch kleinere Werte im Vergleich zu den 20 FTU – Ansätzen aufwies. Nur bei NM Nr. 1 weist nach 24 h der 20 FTU Ansatz eine größere OD auf als der mit 15 FTU. Die berechneten spezifischen Wachstumsraten sind in Tabelle 8 Zeile 5 und 6 dargestellt, wobei die Wachstumsrate der Zellzahl (μ_{ZZ}) anhand des Abschnitts II. 3.1.5 „Analyse des Wachstums“ aus der Optischen Dichte berechnet wurde. Dabei ist die spezifische Wachstumsrate der Zellzahl immer etwas niedriger als die Wachstumsrate der optischen Dichte, aufgrund der Steigung der Geradengleichung in Abschnitt III. 3.1.

Der Bereich der spezifischen Wachstumsraten der OD reicht von 0,0833 [h^{-1}] (NM Nr. 3, 20 FTU) bis 0,1097 [h^{-1}] (Vollmedium, 15 FTU) Die größte spezifische Wachstumsrate eines modifizierten Nährmediums beträgt 0,1093 [h^{-1}] (NM Nr.5, 15 FTU). Die spezifischen Wachstumsraten der 15 FTU - Ansätze sind allesamt (zwischen 3,2 % bis 16,9% (NM Nr. 4 bzw. Vollmedium) größer als ihre analogen Ansätze mit 20 FTU. Im Durchschnitt ist das Wachstum um 9,1% größer.

In Abbildung 13 und Abbildung 14 vom Anhang II sind alle Messpunkte für die Lumineszenz und OD für alle Kombinationen im Verlauf dargestellt. Durch die Messungen der Zeitpunkte t_{21} – t_{24} lässt sich erkennen, dass die Lumineszenz auch in den letzten Stunden vor Ende der Messung immer noch kontinuierlich steigt. Wie bereits erwähnt, haben alle NM mit einem 15 FTU Ansatz nach 24 h eine höhere Lumineszenz - Intensität als die 20 FTU Ansätze, wobei alle Ansätze mit 15 FTU eine Lumineszenz von mehr $20 \cdot 10^5$ RLU erreichen, während bei den 20 FTU - Ansätzen – bis auf NM Nr.5 – keiner die $20 \cdot 10^5$ RLU überschreitet. Hierbei erreichen die NM Nr. 3 und 5 (15 FTU) die höchsten Werte von $26,3 \cdot 10^5$ RLU.

Tabelle 8: Vergleich der verschiedenen Nährmedien (15 und 20 FTU) in Bezug auf die optische Dichte und Wachstumsrate

	NM 1		NM 2		NM 3		NM 4		NM 5		Vollmedium (Standard SSWC)	
	15 FTU	20 FTU	15 FTU	20 FTU	15 FTU	20 FTU	15 FTU	20 FTU	15 FTU	20 FTU	15 FTU	20 FTU
Gesamtmittelwert der OD nach Zugabe von NaCl bei 15 FTU	0,0269	-	0,0269	-	0,0269	-	0,0269	-	0,0269	-	0,0269	-
Gesamtmittelwert der OD nach Zugabe von NaCl bei 20 FTU	-	0,0291	-	0,0291	-	0,0291	-	0,0291	-	0,0291	-	0,0291
Tatsächliche OD bei Start des Tests	0,0316	0,0357	0,029	0,0285	0,0245	0,0269	0,0276	0,0289	0,0236	0,0248	0,0253	0,0301
Abweichung vom Mittelwert OD [%]	14,8	18,4	7,2	-2,4	-10	-8,4	2,3	-0,9	-14,3	-17,3	-6,3	3,1
Wachstumsrate $\mu_{OD_{t0-t24}}$ [h⁻¹]	0,0924	0,0891	0,0945	0,089	0,0994	0,0833	0,097	0,0939	0,1093	0,0997	0,1097	0,0911
Wachstumsrate $\mu_{ZZ_{t0-t24}}$ [h⁻¹]	0,0853	0,0828	0,0868	0,0812	0,0903	0,0753	0,0888	0,0861	0,0996	0,0906	0,1006	0,0837

III. 3.4. Definition eines ausreichend homogenen Plattenbereichs

III. 3.4.1 Überprüfung der einzelnen Mikrotiterplatten auf Abweichungen, verursacht durch den Anwender, sowie deren Auswirkungen auf die chronischen Tests

Zur besseren Verdeutlichung wurden die Variationskoeffizienten für ihre jeweilige Position auf der MP in dem Belegungsschema eingetragen. Beispielhaft wird die Auswertung der Ergebnisse der Mikrotiterplatte Nr. 5 anhand Abbildung 7 (optische Dichte) und Abbildung 8 (Lumineszenz) betrachtet. Die restlichen Auswertungen der Mikrotiterplatten 1-4 und 6 befinden sich im Anhang VII MP1:

Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t0 und t24 zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender bis Anhang XII:

MP6: Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t0 und t24 zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender

Zusammenfassend für alle Mikrotiterplatten wurde für t0 und t24 die Anzahl von Wells auf der MP bestimmt, deren relative Abweichung vom Gesamtmittelwert größer als 5 % und 10 % bzw. 10% und 20 % ist (siehe Tabelle 9: Absolute Anzahl der Wells auf einer 96-Well - Mikrotiterplatte, deren Variationskoeffizienten das angegebene Kriterium übersteigen).

Tabelle 9: Absolute Anzahl der Wells auf einer 96- Well - Mikrotiterplatte, deren Variationskoeffizienten das angegebene Kriterium übersteigen

Mikrotiterplatten- Nummer	OD: Anzahl der Wells				Lumineszenz: Anzahl der Wells			
	t0		t24		t0		t24	
	VarK >5 %	VarK >10 %	VarK >10 %	VarK >20 %	VarK >5 %	VarK >10 %	VarK >10 %	VarK >20 %
1	6	0	45	8	7	2	11	1
2	23	3	45	6	1	0	21	5
3	74	34	42	12	19	7	30	5
4	7	1	10	0	4	9	0	28
5	5	0	42	7	5	1	24	2
6	9	0	41	4	14	0	17	0

Bei Mikrotiterplatte Nr. 5 traten zu Testbeginn bei der Messung der OD fünf Wells auf, deren Variationskoeffizient größer als 5% war. Insgesamt beträgt die größte Abweichung 8,7 % zu diesem Zeitpunkt. Nach 24 h Testzeit trat bei 42 Wells ein Variationskoeffizient >10 % auf was 44 % aller Wells auf der Platte entspricht. 7 Wells hatten einen Variationskoeffizienten (VarK) >20 %. Dies entspricht 7 % aller Wells auf der MP. Bei der Betrachtung der Lumineszenz gab es ebenfalls für MP5 5 Wells dessen VarK > 5% zu Testbeginn betrug. Jedoch wies nur eine Position zum Zeitpunkt t0 sowohl für die Lumineszenz als auch die OD einen VarK > 5 auf. Nach 24 h wies MP5 weniger Wells mit einem VarK > 10 % und 20 % auf, als die OD (24 Wells >10% , 2 > 20%).

Die Ergebnisse der anderen Platten sind vergleichbarer Größenordnung. Nur MP3 weist erhöhte Anzahlen auf. So haben 74 Wells einen VarK > 5% und 34 Wells >10% (OD, t_0), was 77 % bzw. 35 % der gesamten Platte ausmacht. MP2 wies ebenfalls eine höhere Anzahl (23 Wells, 24% der gesamten Platte) von Wells auf, deren VarK > 5 % betrug, jedoch nur von 3 Wells war der VarK >10%.

Vergleicht man jeweils t_0 und t_{24} in

Var[%] t_{24}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30,5	2,1	27,2	19,2	13,1	9,0	2,4	5,3	6,5	11,3	1,9	2,6
B	25,8	31,6	24,9	16,5	6,8	9,3	5,5	7,8	1,9	8,5	6,1	7,3
C	12,6	3,4	21,4	2,7	2,5	4,5	2,7	1,2	5,8	18,2	11,3	5,1
D	32,2	4,9	16,5	11,2	8,1	6,9	1,6	11,0	6,9	18,3	11,5	12,5
E	7,5	5,2	14,1	12,1	6,6	4,7	14,1	13,5	8,9	10,9	7,2	3,0
F	7,0	3,4	10,9	6,1	9,8	13,9	7,4	6,8	15,5	15,5	2,7	17,2
G	7,8	4,4	8,2	12,2	11,1	4,3	0,3	7,4	5,7	18,0	8,8	17,3
H	12,9	8,3	10,7	11,3	0,7	12,5	5,8	11,2	15,7	15,5	0,9	14,5
Var[%] t_0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6,5	3,8	4,6	2,3	2,6	0,8	0,4	1,0	3,0	1,8	1,0	0,5
B	4,0	2,2	0,8	8,7	2,8	2,9	0,9	1,0	3,3	1,7	0,5	0,8
C	6,2	2,8	3,8	0,9	0,2	0,2	1,2	1,5	2,2	1,1	2,3	1,7
D	4,1	4,6	0,8	0,9	1,9	1,6	0,4	0,1	1,8	1,0	2,5	1,4
E	4,4	2,5	0,9	2,3	1,9	0,4	2,7	0,8	1,7	1,2	3,9	3,6
F	2,8	3,3	1,8	1,2	1,8	1,2	0,6	0,0	0,2	1,0	0,8	3,1
G	4,5	5,2	0,8	0,8	1,6	1,8	0,4	0,8	1,1	1,2	3,8	4,8
H	4,3	5,2	0,0	1,6	0,3	1,4	3,5	0,7	1,9	3,6	0,5	4,8

Abbildung 8 wird deutlich, dass – wie vorhergehenden Abschnitt bereits beschrieben, und anhand der Tabelle deutlich wurde – viel mehr Wells nach 24 einen auffällig großen VarK (>10%) aufweisen als es zum Zeitpunkt t_0 (VarK > 5%) der Fall war. Außerdem weisen Wells mit höheren VarK zu dem Zeitpunkt t_0 nicht notwendigerweise ebenfalls zum Zeitpunkt t_{24} entsprechend höhere VarK auf als Wells, deren VarK zu Versuchsbeginn gering war. Im Gegenteil wurden ebenfalls auffällig hohe VarK zum Testende bei Wells gemessen, deren VarK zu Testbeginn kleiner als 5 % war.

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30,5	2,1	27,2	19,2	13,1	9,0	2,4	5,3	6,5	11,3	1,9	2,6
B	25,8	31,6	24,9	16,5	6,8	9,3	5,5	7,8	1,9	8,5	6,1	7,3
C	12,6	3,4	21,4	2,7	2,5	4,5	2,7	1,2	5,8	18,2	11,3	5,1
D	32,2	4,9	16,5	11,2	8,1	6,9	1,6	11,0	6,9	18,3	11,5	12,5
E	7,5	5,2	14,1	12,1	6,6	4,7	14,1	13,5	8,9	10,9	7,2	3,0
F	7,0	3,4	10,9	6,1	9,8	13,9	7,4	6,8	15,5	15,5	2,7	17,2
G	7,8	4,4	8,2	12,2	11,1	4,3	0,3	7,4	5,7	18,0	8,8	17,3
H	12,9	8,3	10,7	11,3	0,7	12,5	5,8	11,2	15,7	15,5	0,9	14,5

Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6,5	3,8	4,6	2,3	2,6	0,8	0,4	1,0	3,0	1,8	1,0	0,5
B	4,0	2,2	0,8	8,7	2,8	2,9	0,9	1,0	3,3	1,7	0,5	0,8
C	6,2	2,8	3,8	0,9	0,2	0,2	1,2	1,5	2,2	1,1	2,3	1,7
D	4,1	4,6	0,8	0,9	1,9	1,6	0,4	0,1	1,8	1,0	2,5	1,4
E	4,4	2,5	0,9	2,3	1,9	0,4	2,7	0,8	1,7	1,2	3,9	3,6
F	2,8	3,3	1,8	1,2	1,8	1,2	0,6	0,0	0,2	1,0	0,8	3,1
G	4,5	5,2	0,8	0,8	1,6	1,8	0,4	0,8	1,1	1,2	3,8	4,8
H	4,3	5,2	0,0	1,6	0,3	1,4	3,5	0,7	1,9	3,6	0,5	4,8

Abbildung 7: MP5 - Variationskoeffizienten [%] der optischen Dichte für t0 (unten) und t24 (oben)

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	23,1	13,9	7,2	6,5	1,2	5,0	7,3	5,5	4,5	20,6	13,9	11,5
B	16,2	8,8	1,2	1,3	0,6	1,2	9,8	12,1	18,1	9,2	3,5	1,4
C	13,9	0,1	1,9	1,7	1,5	1,7	2,2	9,9	4,7	9,7	7,3	9,0
D	15,2	3,0	6,5	2,4	4,6	8,5	5,6	15,2	5,8	5,2	1,2	2,2
E	9,8	0,0	9,5	6,3	0,7	3,6	3,2	3,8	1,9	11,7	8,9	2,3
F	11,2	1,1	7,3	3,6	5,7	1,8	5,8	5,3	0,3	4,0	1,5	14,2
G	10,9	8,2	6,8	5,8	11,2	5,8	0,8	1,8	5,6	3,7	0,9	14,0
H	8,2	14,0	9,4	11,6	1,4	9,4	15,2	19,9	11,7	4,7	12,5	18,2

Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,8	7,9	0,9	3,1	1,1	2,5	2,7	0,4	0,1	1,5	6,0	1,9
B	1,3	1,2	0,1	0,0	2,0	0,2	1,9	3,4	2,2	1,1	0,8	4,8
C	8,0	3,4	1,3	0,3	0,5	0,5	2,7	1,6	3,8	1,7	2,4	3,7
D	3,9	3,0	0,2	4,2	3,8	1,6	0,2	1,8	1,8	1,0	0,3	1,1
E	2,7	0,1	0,4	1,3	1,0	0,0	0,8	3,6	0,1	0,5	1,1	2,4
F	0,0	1,1	1,7	0,1	2,8	0,5	0,6	1,0	1,0	2,2	0,4	2,2
G	1,9	1,8	0,1	0,3	1,4	0,7	1,2	0,6	2,2	4,0	1,3	12,4
H	4,3	2,4	0,9	1,3	0,8	0,6	0,2	1,2	2,6	2,1	2,6	7,6

Abbildung 8: MP5 - Variationskoeffizienten [%] der Lumineszenz für t0 (unten) und t24 (oben)

III. 3.4.2 Identifizierung von systematischen Messfehlern

Um Abweichungen systematischer Natur zu identifizieren, wurden die ausgewerteten Ergebnisse aus Abschnitt II. 4.1.2 visuell in Abbildung 9 zusammengefasst. Dort sind auf der rechten Seite die Variationskoeffizienten [%] in Bezug auf den Gesamtmittelwert aller Replikate aller 5 untersuchten Mikrotiterplatten dargestellt (Lumineszenz und OD nach 24 h Testzeit). Variationskoeffizienten deren Werte größer als 15 % sind, wurden rot markiert. Auf der linken Seite hingegen sind – ebenfalls für

die optische Dichte und die Lumineszenz nach 24 h Testzeit – die Ergebnisse der t – Tests für jede Position dargestellt. Signifikante Abweichungen wurden rot gekennzeichnet. Bereiche, die gerade eben nicht mehr signifikant sind (p-Wert zwischen 0,05 und 0,06) wurden gelb markiert.

Insgesamt hat der t-Test bei der Lumineszenz 24 Wells als signifikant abweichend eingestuft. Ferner treten 3 Werte auf, die gerade eben nicht als signifikant eingestuft wurden. Im Randbereich befinden sich die meisten als signifikant oder knapp nicht signifikant einzustufende Werte (18 Wells). Im mittleren Bereich der Mikrotiterplatte sind die Wells C6, C7; D5-D8; F6; G1, G2, F4 und H3 betroffen.

Bei der Auswertung der optischen Dichte durch den t-Test treten 19 Wells als signifikant abweichend auf, sowie 2 Werte, die knapp nicht unter die Signifikanzgrenze fallen. 16 der signifikanten Wells treten dabei im Randbereich auf. Im mittleren Bereich sind die Wells B4, F3, F4, F6, G2 und G7 betroffen.

Bei der Betrachtung der Auswertung der Variationskoeffizienten treten bei der Lumineszenz 29 Wells auf deren VarK > 15 % ist. Bei der optischen Dichte sind es sogar 50 Wells.

Im Vergleich der betroffenen Wells auf der Seite des t- Tests mit denen des VarK – Übersicht fällt auf, dass die Wells, die im t –Test signifikante Positionen aufweisen, bei der Betrachtung des VarK jedoch meist eine geringere prozentuale Abweichung als 15% aufweisen. Nur wenige Wells weisen sowohl eine hohe VarK hat als auch eine signifikante Abweichung im t –Test. Davon 4 Wells bei der Lumineszenz-Auswertung (D8, G12, H1, H5) und einer bei der OD (H6).

Signifikante Abweichung nach t- Test Lumineszenz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,003	0,359	0,195	0,003	0,521	0,079	0,159	0,251	0,332	0,233	0,157	0,014
B	0,005	0,886	0,192	0,418	0,121	0,734	0,377	0,530	0,152	0,879	0,906	0,683
C	0,124	0,621	0,128	0,953	0,265	0,036	0,044	0,391	0,275	0,810	0,671	0,452
D	0,079	0,835	0,548	0,470	0,045	0,021	0,025	0,033	0,331	0,530	0,824	0,756
E	0,017	0,495	0,497	0,483	0,121	0,361	0,167	0,601	0,345	0,396	0,195	0,449
F	0,009	0,209	0,904	0,053	0,830	0,008	0,491	0,458	0,069	0,506	0,790	0,209
G	0,053	0,035	0,385	0,330	0,246	0,852	0,387	0,990	0,973	0,367	0,707	0,032
H	0,014	0,006	0,053	0,017	0,029	0,002	0,041	0,114	0,001	0,167	0,002	0,003

Variationskoeffizient [%] Lumineszenz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,8	20,5	8,1	10,0	12,9	10,8	8,1	18,8	14,3	16,8	9,7	11,6
B	5,9	10,7	12,7	10,4	11,2	10,9	15,9	19,8	19,9	20,7	14,5	13,1
C	12,7	17,2	9,6	11,8	12,9	11,3	11,5	7,6	10,7	20,8	10,1	7,5
D	10,0	14,9	10,0	14,1	12,9	14,6	12,7	16,9	6,2	18,0	11,8	13,9
E	11,6	16,9	7,3	11,3	12,2	14,9	9,2	17,6	16,3	17,3	7,0	16,9
F	12,5	16,6	9,1	12,2	15,4	11,2	16,6	17,4	16,7	28,8	13,6	13,7
G	14,4	13,5	10,7	11,8	18,0	14,9	13,3	13,4	16,2	36,0	14,5	15,3
H	20,1	14,2	11,4	10,4	15,1	12,2	11,4	8,9	12,0	29,0	12,3	14,8

Signifikante Abweichung nach t- Test OD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,236	0,307	0,922	0,740	0,864	0,550	0,292	0,346	0,046	0,028	0,644	0,128
B	0,937	0,122	0,600	0,053	0,614	0,393	0,582	0,786	0,772	0,516	0,743	0,162
C	0,838	0,523	0,861	0,687	0,987	0,696	0,353	0,459	0,991	0,191	0,755	0,087
D	0,476	0,336	0,689	0,607	0,771	0,836	0,109	0,390	0,460	0,120	0,570	0,003
E	0,003	0,687	0,660	0,431	0,079	0,805	0,469	0,244	0,500	0,664	0,281	0,281
F	0,071	0,970	0,005	0,018	0,752	0,059	0,778	0,528	0,597	0,085	0,427	0,048
G	0,001	0,025	0,997	0,858	0,307	0,868	0,017	0,271	0,797	0,182	0,122	0,002
H	0,005	0,012	0,611	0,150	0,048	0,016	0,031	0,047	0,000	0,003	0,134	0,008

Variationskoeffizient [%] OD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20,9	15,6	12,8	15,0	7,4	17,2	8,0	20,5	10,4	10,4	12,0	12,1
B	13,2	14,4	15,3	10,5	8,1	16,3	24,1	21,9	21,6	20,4	21,8	9,6
C	18,8	18,4	18,5	14,1	10,1	18,4	19,6	16,8	23,5	24,6	13,7	6,9
D	20,2	15,2	13,2	20,5	15,4	21,4	12,1	23,1	19,0	19,9	16,8	9,7
E	10,8	12,7	9,4	22,1	5,9	18,4	12,8	18,4	19,3	21,7	18,4	5,9
F	18,1	17,8	11,3	11,1	15,5	13,0	16,2	19,2	32,3	19,2	9,2	14,1
G	9,3	9,6	19,6	18,7	3,7	17,2	17,8	12,1	12,6	20,5	10,2	8,9
H	5,6	8,3	9,3	15,5	10,0	16,4	10,1	9,1	8,3	11,3	16,8	9,7

Abbildung 9: Ergebnisse der t - Tests und Darstellung der Variationskoeffizienten der Wells aller Mikrotiterplatten (Legende Farbrunterlegung ergänzen)

III. 3.5. Berechnung von scheinbaren Hemmungen anhand des erstellten Plattenlayouts

Für die Positionen auf den Mikrotiterplatten, die für die spätere Testvorschrift für die Verdünnungsstufen der Proben bzw. vorgesehen sind, werden jeweils die Mittelwerte der Hemmwerte der Replikate, sowie die relative Abweichung vom Sollwert in %-Punkten angegeben (siehe Abbildung 10: Ergebnisse der Leucht- sowie Zellvermehrungshemmungen, sowie des Signifikanztests anhand des entworfenen Plattenlayouts und der sich darauf befindlichen Verdünnungsstufen (Mikrotiterplatte vollständig mit Negativkontrollen belegt) Gleiches gilt für den Gesamtmittelwert aller Platten für die jeweiligen Verdünnungsstufen.

Die Replikate der im Layout vorgesehenen Negativkontrollen geben den Sollwert vor und haben daher grundsätzlich eine mittlere Hemmung von 0% Hemmung je Platte.

Innerhalb der einzelnen untersuchten Platten⁶ treten für die verschiedenen "Verdünnungsstufen" verschieden große Hemmbereiche auf:

Leuchthemmung (LH):

Nr. 1:	-3,1 %	bis	2,1 % Hemmung
Nr. 2:	-4,6 %	bis	6,6 % Hemmung;
Nr. 4:	-6,3 %	bis	3,7 %; Hemmung;
Nr. 5:	-2,7 %	bis	10,7 % Hemmung;
Nr. 6:	-7,3 %	bis	9,1 %; Hemmung

Dabei reicht die relative Standardabweichung von -28,3 % -Punkten bis 40,0 % -Punkten (beide Extremwerte bei V5).

Zellvermehrungshemmung (ZVH):

Nr. 1:	-1,8 %	bis	20,2 % Hemmung
Nr. 2:	-4,4 %	bis	8,6 % Hemmung
Nr. 4:	-10,6%	bis	4,0 % Hemmung
Nr. 5:	-24,9 %	bis	-13,2% Hemmung
Nr.6:	-3,6 %	bis	12,2% Hemmung

Dabei reicht die relative Standardabweichung von -3,6 % -Punkten (V6) bis 33,5 % -Punkten (V7).

Hierbei zeigt insbesondere „Verdünnungsstufe Nr. 5“ stark negative Hemmung im Vergleich zur Kontrolle (NK)

Über die Wiederholungen (N=5) der Versuche hinweg mitteln sich die Werte, sodass bei der LH Hemmungen im Bereich von $-0,5\% \pm 3,5\%$ - Punkte (V4) bis $3,1 \pm 4,1\%$ - Punkte (V2) auftreten, während bei der ZVH der Bereich der Hemmungen etwas größer ist: $(-7,7\% \pm 9,5\%$ - Punkte (V4) bis $1,9\% \pm 11,6\%$ -Punkte (V7). Bei der ZVH ist der Bereich der relativen Standardabweichung von 5 - 12,5 % - Punkten größer als der, der LH (3,3 % bis 4,9 % -Punkte). Es gibt zwei Verdünnungsstufen, deren Hemmungen um mehr als $\pm 5\%$ Hemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe (NK) abweichen. Dies sind V1 (-5,5% Hemmung) sowie V4 (-7,7% Hemmung) und treten bei der Bestimmung der ZVH auf.

Beim t -Test (Ergebnisse ebenfalls in Abbildung 10: Ergebnisse der Leucht- sowie Zellvermehrungshemmungen, sowie des Signifikanztests anhand des entworfenen Plattenlayouts und der sich darauf befindlichen Verdünnungsstufen (Mikrotiterplatte vollständig mit Negativkontrollen belegt) wurde keine der zu untersuchenden Verdünnungen als signifikant abweichend also mit einem p- Wert $\leq 0,05$ identifiziert. V1 hat mit 0,080 den kleinsten p – Wert.

⁶ Es wurden hier nur fünf MP ausgewertet, da in Abschnitt IV. 2.1 eine MP aufgrund zu großer Anwendungsfehler nicht in die weitere Auswertung einbezogen werden durfte.

Auswertung der einzelnen Platten		NK (Kontrolle)		V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7	
		MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]
chronische Lumineszenzhemmung [LH]	Platte Nr. 1	0,0	6,2	-3,1	4,0	1,4	9,1	-0,4	3,2	0,2	9,1	2,1	8,4	-0,5	11,8	-0,7	8,2
	Platte Nr. 2	0,0	11,7	5,5	10,8	6,6	8,6	5,5	15,9	-1,4	23,1	-4,6	40,0	0,9	4,7	2,2	10,8
	Platte Nr. 4	0,0	12,5	-3,9	13,2	-0,2	12,2	-5,9	12,7	-6,3	15,3	3,7	10,2	0,1	7,6	-2,3	6,3
	Platte Nr. 5	0,0	10,1	-2,7	10,5	-1,5	5,9	0,1	12,8	4,7	10,7	9,0	-28,3	8,3	5,8	10,7	19,6
	Platte Nr. 6	0,0	6,2	4,0	-1,3	9,1	6,6	3,2	-7,3	0,2	9,1	2,1	8,4	-0,5	11,8	-0,7	8,2
chronische Zellwachstumshemmung [WH]	Platte Nr. 1	0,0	22,2	-1,8	16,0	9,3	14,6	12,5	17,1	0,6	11,8	10,2	18,2	6,1	-3,6	20,2	28,3
	Platte Nr. 2	0,0	20,2	-3,4	29,1	5,8	13,7	-0,5	18,4	-4,4	33,5	8,6	10,9	0,1	23,2	4,2	25,8
	Platte Nr. 4	0,0	6,9	-7,0	12,0	-2,4	5,7	-2,7	7,8	-10,6	14,1	0,6	5,7	-1,2	8,2	4,0	12,3
	Platte Nr. 5	0,0	20,3	-15,0	24,1	-17,3	23,6	-17,1	14,8	-24,9	19,4	-22,4	25,1	-13,2	22,4	-15,4	28,8
	Platte Nr. 6	0,0	22,2	-1,8	16,0	9,3	14,6	12,5	17,1	0,6	11,8	10,2	18,2	6,1	20,2	-3,6	28,3
Gesamtmittelwert aller Platten (n=5)				V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7	
		MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]	MW Hemmung [%]	SD in [% - Punkten]
		LH	0,0	4,0	3,1	4,1	0,5	3,9	-0,5	3,5	2,5	4,4	1,7	3,3	1,8	4,7	
		WH	-5,8	5,0	0,9	10,1	0,9	11,0	-7,7	9,5	1,5	12,5	-0,4	7,1	1,9	11,6	
Signifikanz T-Test	LH	p-Wert	0,994		0,206		0,813		0,786		0,324		0,377		0,472		
		Signifikanz	Nein		Nein		Nein		Nein		Nein		Nein		Nein		
	WH	p-Wert	0,080		0,863		0,874		0,181		0,826		0,910		0,763		
		Signifikanz	Nein		Nein		Nein		Nein		Nein		Nein		Nein		

Abbildung 10: Ergebnisse der Leucht- sowie Zellvermehrungshemmungen, sowie des Signifikanztests anhand des entworfenen Plattenlayouts und der sich darauf befindlichen Verdünnungsstufen (Mikrotiterplatte vollständig mit Negativkontrollen belegt)

III. 4. Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium (5) mit 3,5 –DCP als Referenzsubstanz

III. 4.1. Erfüllung der Gültigkeitskriterien

Die Testergebnisse mit den berechneten Hemmungen und Wachstumsraten befinden sich für die untersuchten NM (Nr. 5 15 FTU und 20 FTU, Vollmedium 15 FTU und 20 FTU) im Anhang 0. bewirken. Das Gültigkeitskriterium für die chronische Leuchthemmung nach 24 h „die Negativkontrolle darf das Lumineszenzmaximum nicht überschreiten“ konnte nicht untersucht werden, da dafür eine kinetische Aufnahme von mehreren Messzeitpunkten innerhalb der 24 h Testzeit notwendig gewesen wäre. Außerdem wurden die Gültigkeitskriterien der Positivkontrollen (PK I und PKII) für alle Endpunkte nicht untersucht, da die Referenzsubstanz 3,5 – DCP noch für den Test validiert werden muss und in diesem Experiment das erste Mal als Referenzsubstanz mitgeführt wurde.

Die berechneten Hemmwerte erfüllten nur bei dem Versuch mit NM Nr. 5 (20 FTU) im akuten Leuchthemmungstest die angegebenen Gültigkeitskriterien (Der Korrekturfaktor (KF) zwischen 0,6 und 1,3 , Die relative Abweichung von KF < 3 %, Variabilität Proben < 3%-Punkte).

Die 20 FTU Ansätze wurden jedoch mit einem anderen Layout, als dem für die Testvorschrift entworfenen getestet. Dort lagen die Replikate einer Verdünnungsstufe nebeneinander, weswegen systematische Abweichung (z.B. aufgrund eines Temperaturdrifts) im Test aufgrund einer nicht gleichmäßigen Verteilung nicht auffallen würden. Deswegen werden die Ergebnisse der 20 FTU – Ansätze stets nur als ergänzende Hilfe im Vergleich zu den 15 FTU Ansätzen bei den Gültigkeitskriterien betrachtet.

Da alle anderen Tests der verschiedenen Nährmedien die jeweiligen Gültigkeitskriterien aufgrund großer relativer Standardabweichungen nicht erfüllten, wird im Folgenden auf eine detaillierte Ergebnisdarstellung verzichtet und stattdessen ein Überblick gegeben:

Im akuten LBT nach 30 min traten rel. Standardabweichungen im Bereich von 0,1 % - Punkten bis 32,0 % -Punkten auf, dabei überschritten je Test 2- 5 Verdünnungsstufen (NM Nr. 5, 20 FTU wird hier nicht betrachtet - siehe oben) die angegebenen Gültigkeitskriterien (GK). Außerdem wurden in 2 von 3 Tests das GK für die Negativkontrolle nicht eingehalten. Nur NM 5 (15 FTU) wies eine rel. Standardabweichung von unter 3 % - Punkten auf.

Der Bereich der rel. Standardabweichung betrug zwischen 0,1 – 32 % -Punkte. Insgesamt überstiegen von 34 getesteten Verdünnungsstufen (inklusive der Replikate der Negativkontrollen) 11 die Gültigkeitskriterien (32, 4 %). Davon bei NM Nr. 5 (15 FTU) 6 von 8 getesteten Verdünnungsstufen, 2 von 8 bei dem Vollmedium (15 FTU) sowie 3 von 9 bei dem Vollmedium (20 FTU)

Im chronischen Leuchthemmungstest nach 24 h traten rel. Standardabweichungen im Bereich von 0,0 % -Punkten bis 32,0 % -Punkten auf, dabei überschritten je Test 1 bis 5 Verdünnungsstufen die angegebenen GK, sowie alle Negativkontrollansätze (rel. Abweichung der Leuchtintensität in den Negativkontrollen < 5% -Punkte, die Abweichung der Hemmwirkungen replizierten Testansätze < 5%-Punkte).

Insgesamt überstiegen von den getesteten Verdünnungsstufen 14 die Gültigkeitskriterien (41,2 %). Davon bei NM Nr. 5 und dem Vollmedium (15 FTU) 6 von 8 getesteten Verdünnungsstufen, 2 von 9 bei dem NM Nr. 5 (15 FTU) sowie dem Vollmedium (20 FTU).

Im chronischen Zellvermehrungshemmungstest nach 24 h traten rel. Standardabweichungen im Bereich von 2,2% -Punkten bis 21,7 % -Punkten auf, dabei überschritten je Test 5 bis 8 Verdünnungsstufen die angegebenen GK, sowie alle Negativkontrollansätze (rel. Abweichung der optischen Dichte in den Negativkontrollen < 5% -Punkte, die Abweichung der Hemmwirkungen replizierten Testansätze < 5%-Punkte, sowie Verdopplungszeit⁷ der Negativkontrolle < 4 h).

Insgesamt überstiegen von den getesteten Verdünnungsstufen 14 die Gültigkeitskriterien (88,2 %). Davon bei NM Nr. 5 (15 FTU) und alle des Vollmediums (15 FTU), jeweils 8 von 9 bei dem NM Nr. 5 (20 FTU) sowie dem Vollmedium (20 FTU).

Die spezifischen Wachstumsraten wurden bezogen auf die Wachstumsrate berechnet über die optische Dichte. Diese beträgt 6,4 h bei dem NM Nr. 5 (20 FTU), 6,7 h für das Vollmedium (20 FTU), 6,4 h bei dem Ansatz NM Nr. 5 (15 FTU), sowie die geringste Verdopplungszeit benötigt mit 6,1 h das Vollmedium (15 FTU). Somit hielt kein Ansatz das GK (Verdopplungszeit der Negativkontrolle < 4 h) ein.

III. 4.2. Ergebnisse der EC₅₀ – Werte Berechnung von 3,5 – DCP

Die Ergebnisse der EC₅₀ - Werte Berechnung der einzelnen Nährmedien sind in Tabelle 10 dargestellt. Die entsprechenden Dosis - Wirkungs- Kurven befinden sich im Anhang III Dosis- Wirkungskurve NM Nr. 5 (15 NTU) bis Anhang VI Dosis- Wirkungskurve NM Nr. 8 (20 NTU).

Das Vollmedium (15 FTU) weist für alle Endpunkte die niedrigsten EC₅₀ Werte (akute LH : 3,38 mg/l (3,28 bis 3,48 mg/l), chronische LH: 1,91 mg/l (1,63 bis 2,25 mg/l), chronische WH: 5,20 mg/l (4,42 bis 6,12 mg/l)) auf.

Der kleinste EC₅₀ - Wert für die akute LH liegt bei 3,38 mg/l (3,28 bis 3,48 mg/l), (Vollmedium, 15 FTU), gefolgt von NM Nr. 5 (15 FTU) dessen EC₅₀ bei 3,54 mg/l (3,48 bis 3,60) beträgt. Den höchsten EC₅₀ weist jedoch das Vollmedium (20 FTU) 3,79 mg/l (3,63 bis 3,95 mg/l) auf. Im Vergleich zu dem in Tabelle 11 dargestellten Referenzwert vom LBT nach DIN EN ISO 11348-2: 2009-05 liegen die Ergebnisse um rund 28 % bis 20% niedriger. Gegenüber dem kinetischen LBT nach Menz sind die EC₅₀ - Werte um 29 % bis 19 % niedriger.

Bei der Betrachtung der EC₅₀ –Werte für die chronische Leuchthemmung weist das Vollmedium (20 FTU) einen undefinierten Wertebereich von „very wide“ auf, weswegen es ~~in der Betrachtung außen vor nicht berücksichtigt wurde gelassen wird~~. Das Vollmedium (15 FTU) weist mit 1,91 mg/l (1,63 bis 2,25 mg/l) einen 1,8 –fach niedrigeren Wert auf als NM 5. (15 FTU) 3,38 mg/l (2,80 bis 4,09 mg/l), das insgesamt den größten EC₅₀ – Wert aufweist. Im Vergleich zu dem in Tabelle 11 dargestellten Referenzwert des kinetischen LBT nach Menz liegt der, des Vollmediums (15 FTU) am nächsten daran,

⁷ Auf das GK der Verdopplungszeit wird weiter unten eingegangen

weist jedoch eine Abweichung von rund + 23 % auf, während der EC₅₀ – Wert von NM 5 (15 FTU) um rund 57 % abweicht.

Die EC₅₀ – Werte der chronischen Zellvermehrungshemmung reichen von 5,20 mg/l (4,42 bis 6,12 mg/l) bis 8,01 mg/l (3,13 bis 20,47 mg/l) beides NM 8 (15 bzw. 20 FTU) und sind 3 bis 4,6 mal so groß wie der Referenzwert von Menz aus dem kinetischen LBT.

x Es fehlt noch der Vergleich EC₅₀-Werte akut-chronisch in Worten

Tabelle 10: EC₅₀ -Werte für 3,5 - DCP vom NM Nr. 5 und des Vollmediums (Standard SSWC) bei 15 und 20 FTU Hauptkulturzellidichte

EC ₅₀ Wert 3,5 - DCP	NM 5		Vollmedium (Standard SSWC)	
	15 FTU	20 FTU	15 FTU	20 FTU
Anfangszellidichte der Hauptkultur				
akute Leuchthemmung [mg/l]	3,54 (3,48 to 3,60)	3,70 (3,61 to 3,79)	3,38 (3,28 to 3,48)	3,79 (3,63 to 3,95)
chronische Leuchthemmung [mg/l]	3,38 (2,80 to 4,09)	2,255 (1,68 to 3,02)	1,91 (1,63 to 2,25)	ungefähr 2,23 (Very wide)
Zellvermehrungshemmung [mg/l]	5,27 (4,88 to 5,69)	5,89 (4,81 to 7,21)	5,20 (4,42 to 6,12)	8,01 (3,13 to 20,47)

Tabelle 11; Literaturdaten aus Referenzmethoden zu dem EC₅₀ - Werten von 3,5 -DCP

EC ₅₀ - Werte	Kinetischer LBT nach Menz [mg/l]	DIN EN ISO 11348-2: 2009-05 [mg/l]	Chronischer LBT [mg/l] ⁸	<i>P. phosphoreum</i> – ZVH ⁹ [mg/l]
akute Leuchthemmung	4,73	4,69	-	-
chronische Leuchthemmung	1,47	-	2,2	-
Zellvermehrungshemmung	1,73	-	-	2,64

⁸ DIN 38412-37 : 1999

⁹ Zieseniss 1995

IV. Diskussion

Die Entwicklung eines Testsystems für die Untersuchung der Langzeittoxizität gegenüber *Vibrio fischeri* stellt das Primärziel der vorliegenden Arbeit dar. In diesem Kontext wurde ein Prozess der Methodenentwicklung und –validierung bis hin zur ersten Anwendung des neuen Testsystems durchschritten und dabei eine Vielzahl von interessanten Ergebnissen hervorgebracht, deren Interpretation und Bewertung in diesem Kapitel erfolgt.

IV. 1. Diskussion der Ergebnisse der Untersuchung: „Verkürzung der chronischen Tests auf 6 - 8h“

Es war bekannt, dass das im akuten Test verwendete Nährmedium nach DIN EN ISO 11348-2 nicht für eine Verlängerung der Testzeit geeignet war. Dies gründet darauf, dass eine zu geringen Nährstoffkonzentration vorliegt, um ein stabiles Leuchten und Zellwachstum über mehrere Stunden aufrecht zu erhalten. Da hingegen das im kinetischen LBT eingesetzte Nährmedium für chronische Tests über 24 h Testzeit eingesetzt wurde, wurde davon ausgegangen, dass mit diesem Nährmedium auch ein Test über 6 bis 8 h funktionieren müsste. Dennoch wurde der Test aufgrund einer nur sehr langsam steigenden optischen Dichte (OD) und insbesondere aufgrund der nach 60 Minuten stark abfallenden Lumineszenz nach nur 240 min Testzeit abgebrochen.

Durch weitere Rücksprachen mit HACH und Menz wurde deutlich, dass das geringe Wachstum und das Abfallen der Lumineszenz darauf begründet ist, dass keine Vorkultivierung frischer Bakterien stattfand, sondern die Bakterien direkt nach dem Auftauen genutzt wurden, wie es bislang in dem akuten LBT gehandhabt wurde. Für die chronischen Tests funktioniert diese Vorgehensweise jedoch nicht, da – wie in Abschnitt I. 1 bereits beschrieben wurde – die Lumineszenz durch einen Autoinduktor induziert wird, der während des Wachstums der Zellen gebildet und ins umgebende Nährmedium abgegeben wird. Da die Bakterien direkt für den Test genutzt wurden, lag die Konzentration des Autoinduktors deutlich unter der beschriebenen Schwellenkonzentration und die Lumineszenz sank ab.

Um einen chronischen LBT durchführen zu können, ist es folglich notwendig, dass eine Vorkultivierung von *A. fischeri* stattfindet, damit zu Testbeginn eine erhöhte Konzentration des Autoinduktors im Nährmedium vorliegt, die die Lumineszenz der Bakterien über den gesamten Testzeitraum anregt. Das für den kinetischen LBT von Menz beschriebene Vorgehen zur Herstellung von Stammkulturen sowie die Vorkultivierung der Stammkultur vor Testbeginn sollte als Grundlage für das weitere Vorgehen genommen werden. Einerseits könnte durch die Herstellung von Stammkulturen aus einem Teströhrchen aus dem LCK 480 - Testkit erheblich an Kosten gespart werden, andererseits könnten dort die Bakterien vorgezüchtet werden, bis sie innerhalb einer gewünschten Zeit eine bestimmte optische Dichte erreichen. Dadurch sollte bereits bei den Stammkulturen eine gewisse Menge an Autoinduktor vorliegen. Durch die anschließende Vorkultivierung der Stammkultur über 22 h vor Testbeginn sollte die Konzentration des Autoinduktors im Nährmedium erneut erhöht werden und zudem die LAG – Phase des Bakterienwachstums für den eigentlichen Test deutlich verkürzt werden.

Da während dieses Experiments deutlich wurde, dass ein 6 – 8 h LBT durch die notwendige Vor- und Nachbereitung durch den Anwender insgesamt einen Zeitraum von ca. 10 h an einem Tag einnehmen würde, wurde beschlossen, dass die Idee des verkürzten LBT über 6- 8 h Testzeit verworfen wird. Stattdessen sollten wie die Endpunkte der chronischen Tests nun bei 24 h Testzeit etabliert werden¹⁰, da dies zeitlich besser für den Laborbetrieb anwendbar sein sollte und die Ergebnisse mehr Generationszyklen von *A. fischeri* umfassen als es bei einem 6 h oder 8 h – Test der Fall gewesen wäre

IV. 2. Definition eines ausreichend homogenen Plattenbereichs

IV. 2.1. Überprüfung der einzelnen Mikrotiterplatten auf Abweichungen, verursacht durch den Anwender, sowie deren Auswirkungen auf die chronischen Tests

Die Ergebnisse aus II. 4.1.1 zeigten, dass die Mikrotiterplatte Nr. 3 bei der Präparation der Mikrotiterplatte inhomogen belegt wurde, also ein Fehler des Anwenders vorlag. Da 77 % der Wells einen VarK >5 % haben und 35 % > 10 % kann diese Platte bei der weiteren Untersuchung zur Identifizierung von systematischen Messabweichungen nicht herangezogen werden, da zu viele der Positionen zu stark abweichen, als das man einzelne Werte hätte genauer prüfen und ggf. bei der Auswertung auslassen hätte können.

Die Mikrotiterplatte Nr. 2 weist ebenfalls viele Werte mit einem VarK > 5 % auf, da jedoch alle bis auf 3 Werte unter einem VarK von 10 % liegen, werden Ergebnisse der Mikrotiterplatte für weitere Untersuchungen herangezogen.

Außerdem zeigte sich, dass sich ein höherer VarK – also eine inhomogene Belegung der Wells – nicht unbedingt zu einem höheren VarK zum Testende nach 24 h führen muss. Viel entscheidender sind andere zufällige und systematische Einflüsse deren Ursachen hier nicht weiter bestimmt werden konnten.

Daher ist es im weiteren Vorgehen zur Erstellung eines Belegungslayouts wichtig, dass die Positionen auf den Mikrotiterplatten, die systematische Abweichungen aufweisen, identifiziert werden.

IV. 2.2. Identifizierung von systematischen Messfehlern

In Abschnitt III. 3.4.2 wurde erläutert, dass viele Wells (29 Lumineszenz und 50 OD) einen VarK > 15 % aufwiesen, aber die meisten beim t- Test dennoch nicht als signifikante Abweichung identifiziert wurden, während beim t-Test Wells als signifikant eingestuft

¹⁰ Durch die kinetische Aufzeichnung der optischen Dichte von Menz (2012) wurde eine stationäre Phase nach 14h erfasst und somit musste für den 24 h Test ein optimierter Testaufbau realisiert werden, der ein exponentielles Wachstum über 24h gewährt

wurden, obwohl deren prozentuale Streuung um den Gesamtmittelwert zumeist unter 15 % lag.

Da in diesem Fall alle Platten mit identischen, unbehandelten Proben belegt wurden ist dies dahingehend zu interpretieren, dass durch die Bildung der Mittelwerte aus den Wiederholungen des Versuchs eher zufällig entstandene Messabweichungen herausgemittelt wurden, da diese gleichmäßiger um den Mittelwert herum streuten und deswegen im t-Test keine hohe Signifikanz aufwiesen – trotz eines hohen VarK. Abweichungen systematischer Ursache hingegen streuten oftmals in einem kleineren Radius, jedoch nicht gleichmäßig um den Gesamtmittelwert herum, weswegen sie als signifikante Abweichungen identifiziert wurden. Insbesondere sind die Randbereiche offenbar Effekten systematischer Natur unterlegen, da dort doppelt (bezogen auf die Lumineszenz) bzw. dreimal (bezogen auf die OD) so viele Wells im Vergleich zum mittleren Bereich als signifikant abweichend identifiziert wurden. Solche für die Belegung mit Bakteriensuspensionen unbrauchbare Bereiche sollten bei der Erstellung eines Plattenlayouts möglichst nur für die Messung von Blindwerten eingesetzt werden, da ansonsten durch diese Wells die Sensitivität des Test aufgrund von stark abweichenden Wachstumsgeschwindigkeiten verringert werden könnte.

Ebenfalls unbrauchbar sind für die Auswertung der chronischen Lumineszenzhemmung die Wells C6, C7; D5-D8; F6; G1, G2, F4 und H3, sowie bei der chronischen Zellvermehrungshemmung die Wells B4, F3, F4, F6,G2 und G7. Diese sollten entsprechend nicht in die Auswertung der Hemmungen einfließen.

Wells deren Abweichung im t-Test als nicht signifikant identifiziert wurden, gelten zunächst als ein ausreichend homogener Bereich für die Belegung der Verdünnungsstufen mit Bakteriensuspensionen. Jedoch sollte bei der Entwicklung des Plattenlayouts überprüft werden, ob weitere systematische Abweichungen auftreten sowie weiterhin Untersuchungen hinsichtlich der tatsächlichen Variabilität und Reproduzierbarkeit der einzelnen Wells stattfinden.

IV. 2.3. Berechnung von fiktiven Hemmungen anhand des erstellten Plattenlayouts

Da in dieser Untersuchung alle Mikrotiterplatten mit identischen, unbehandelten Proben bestückt wurden (Negativkontrollen) und durch die Bildung der Mittelwerte aus den Wiederholungen des Experiments (alle Platten gemittelt) zufällige Fehler aufgehoben wurden, müssen die auftretenden Abweichungen systematischer Herkunft sein. Es konnte für das in der Testvorschrift definierte Plattenlayout im t- Test jedoch keine signifikante systematische Abweichung nachgewiesen werden. Die maximalen systematischen Abweichung betragen -5,5% Hemmung(V1) sowie -7,7% Hemmung(V7) bei der ZVH. Sowohl bei der chronischen LH als auch bei der chronischen Zellvermehrungshemmung traten keine weiteren Hemmungen über $\pm 5\%$ Hemmung auf. Das entworfene Belegungslayout für den Test scheint also für die chronische LH und ZVH grundsätzlich zu funktionieren. Allerdings sind die intraexperimentellen Abweichungen der einzelnen Platten derzeit noch groß (Zwischen -28,3 % -Punkten bis 40,0 %-Punkten), sodass einerseits die unter Abschnitt II. 2.10 definierten Gültigkeitskriterien für die chronischen Tests nicht

eingehalten werden und dies zudem einen Verlust der möglichen Sensitivität des Tests bedeuten kann

Neben einem Pilotversuch, in dem eine Referenzsubstanz und deren tatsächliche Verdünnungsstufen auf dem entwickelten Layout getestet werden – anhand dessen weitere Aussagen zur Variabilität der intraexperimentellen Abweichungen gemacht werden können –, sollten weitere Überlegungen angestrebt werden wie diese Abweichungen minimiert werden könnten.

IV. 3. Vergleich von verschiedenen Kombinationen aus Anfangszellichte und Medienzusammensetzung

Um die Eignung der Nährmedien und Startdichten in der Hauptkultur zu Testbeginn beurteilen zu können, wurde diese auf verschiedene Kriterien hin untersucht (Verlauf der Lumineszenz zwischen t_{21} und t_{24} , spezifische Wachstumsrate, Höhe der Lumineszenz und OD nach 24 h Testzeit).

Beim Verlauf der Lumineszenz zwischen t_{21} und t_{24} wäre eine Stagnation oder eine Abnahme der Lumineszenz und/ oder der optischen Dichte ein Anzeichen gewesen, dass in dem jeweiligen Nährmedium eine Limitation an Nährstoffen vorherrschen würde und stellt ein Ausschlusskriterium dar. Jedoch gab es in dem Experiment bei keinem der Kombinationen eine vorzeitige Abnahme der Lumineszenz oder optischen Dichte. Dadurch sind grundsätzlich alle Kombinationen für den Test geeignet und es musste anhand der restlichen Kriterien ermittelt werden, welche Kombination am geeignetsten ist.

Beim Vergleich der 15 und 20 FTU Testansätze fiel auf, dass nach 24 h Testzeit die Nährmedien (außer NM Nr. 1) mit 15 FTU Anfangszellichte der Hauptkultur sowohl eine höhere Lumineszenz als auch optische Dichte aufwiesen, obwohl beide bei t_0 noch kleinere Werte im Vergleich zu den 20 FTU – Ansätzen aufwiesen. Erwartungsgemäß wäre davon auszugehen gewesen, dass die 20 FTU Ansätze nach 24 h aufgrund der höheren Startdichte höhere Endwerte als die 15 FTU Ansätze aufweisen würden. Da dies nicht der Fall ist und dies ebenfalls durch die spezifische Wachstumsrate bestätigt wird (im Durchschnitt ist das Wachstum der 15 FTU – Ansätze um rund 9 % größer als das der 20 FTU Kombinationen), könnte bei den 20 FTU Ansätzen eine Limitation vorliegen. Dies spricht für die Verwendung der 15 FTU –Ansätze im Aufbau des Tests.

Das NM Nr. 5 (15 FTU) wies die größte spezifische Wachstumsrate eines modifizierten Nährmediums ($0,1093 \text{ h}^{-1}$) und zudem mit NM Nr. 3 die größte Lumineszenzintensität von $26,3 \cdot 10^5$ RLU nach 24 h auf und ließ das NM Nr. 5 am geeignetsten erscheinen. Da der Inhalt des NM Nr. 5 um 2 Phosphatkomponenten reduziert wurde ($5,3 \text{ g/l NaH}_2\text{PO}_4$ und $0,5 \text{ g/l (NH}_4)_2\text{HPO}_4$), während NM Nr. 3 nur ohne K_2HPO_4 ($2,1 \text{ g/l}$) angesetzt wurde, viel die Auswahl des NM auf die Kombination NM Nr. 5 (15 FTU).

In weitergehenden Tests sollte das ausgewählte Nährmedium auf seine Sensibilität gegenüber einer Referenzsubstanz getestet werden. Zudem sollte ein Vergleich der EC_{50} - Werte zwischen 15 FTU und 20 FTU stattfinden. Als Vergleichsmedium sollte das Vollmedium verwendet werden (siehe Abschnitt II. 2.9).

IV. 4. Vorversuch mit dem ausgewählten, modifizierten Nährmedium (5) mit 3,5 –DCP als Referenzsubstanz

Aufgrund der großen relativen Standardabweichungen und der nicht validen Gültigkeitskriterien sind die erlangten Ergebnisse nicht besonders aussagekräftig. Dennoch konnten anhand des Pilotversuchs Erkenntnisse für den weiteren Aufbau des Leuchtbakterientests gewonnen werden und erste EC_{50} - Werte berechnet werden.

IV. 4.1. Bewertung der Ergebnisse im Hinblick zur Auswahl der geeignetsten Nährmedienkombination

In Abschnitt IV. 2 wurde festgestellt, dass grundsätzlich alle Kombinationen der Nährmedien und Anfangszelldichten aufgrund des vergleichbaren Wachstums und Lumineszenz für den Leuchtbakterientest in Frage kommen. Die 15 FTU Ansätze wiesen im Allgemeinen nach 24 h höhere Zelldichten und Lumineszenzen auf, weswegen die 15 FTU Ansätze bei der Wahl der Zelldichte der Hauptkultur tendenziell eher ausgewählt werden würden. Aufgrund des besten Wachstums wurde NM Nr. 5 (15 FTU) in die engere Auswahl genommen. In diesem Test sollten dennoch sowohl die 15 FTU als auch 20 FTU Startdichten für das NM Nr. 5 und das Vollmedium getestet werden und EC_{50} - Werte bestimmt werden, sodass eine Aussage zur Sensitivität der NM und Zelldichten gemacht werden kann. Aufgrund der unterschiedlichen Testdurchführungen bei 20 FTU und 15 FTU und die hohen Messabweichungen im Test kann keine aussagekräftige Bewertung zur Sensitivität der Ansätze gemacht werden. Grobe Abschätzungen können jedoch getroffen werden. So scheinen im akuten Test alle Kombinationen etwas sensitiver auf 3,5 –DCP zu reagieren als in den Referenzmethoden. Die EC_{50} - Werte der chronischen Zellvermehrungshemmung sind aus den bereits unter IV. 4.1 beschriebenen Gründen bis zu vier Mal so groß und entsprechend weniger sensitiv als die Ergebnisse aus dem kinetischen LBT nach Menz. Bei der chronischen Leuchthemmung traten innerhalb der verschiedenen Kombinationen der Nährmedien größere Unterschiede auf, wobei das Vollmedium (15 FTU) sensitiver zu reagieren scheint als das für den zukünftigen Test derzeit präferierte NM Nr. 5 (15 FTU). In jedem Falle sollten mehrere weitere Experimente wie dem Pilotversuch und 3,5 –DCP durchgeführt werden,¹¹ um aussagekräftige EC_{50} Werte zu erhalten und diese durch Wiederholung zu bestätigen

¹¹ Bevorzugt unter modifizierten Testbedingungen, damit die Gültigkeitskriterien erreicht werden.

IV. 4.2. Maßnahmen zur Verringerung der Messabweichungen in den Tests

Die großen Standardabweichungen resultieren daraus, dass einerseits in diesem Versuch Wells im mittleren Bereich des Plattenlayouts mit ausgewertet wurden, die im Abschnitt IV. 2.2 als signifikant abweichend aufgrund systematische Messabweichungen identifiziert wurden und daher diese Abweichungen in die Auswertung mit hinein getragen wurden. Andererseits wurde in Abschnitt IV. 2.3 nachgewiesen, dass auch wenn die betroffenen Positionen nicht in die Auswertung mit eingehen, immer noch eine systematische Abweichung vorliegt, auch wenn diese als nicht signifikant gilt. In zukünftigen Versuchen gilt es die Ursachen für das inhomogene Wachstum und die großen Abweichungen herauszufinden.

Ein Ansatzpunkt könnte hier die Verdopplungszeit bzw. Wachstumsrate der Leuchtbakterien sein. In den Tests ergab sich eine Verdopplungszeit von 6,1 h bis 6,7 h, während bei den Gültigkeitskriterium eine Verdopplungszeit vom 4 h nicht überschritten werden sollte. An der Wachstumsrate der gezüchteten Stammkulturen für den Test konnte nach einem Vergleich mit der Testvorschrift des kinetischen LBT nach Menz kein geringeres Wachstum der Vorkultur aus den Stammkulturen nachgewiesen werden: In der Testvorschrift ist eine minimale Trübung von 550 FTU bei einer Vorkultur für den Testansatz vorgeschrieben. Umgerechnet auf die optische Dichte des Tecan – Plattenreaders der HAW- Hamburg (siehe Formel 12: Geradengleichung zur Berechnung der OD aus Formazin - Trübungseinheiten) entspricht dies einer $OD_{610nm} = 0,031$, die bei jeder hergestellten Vorkultur nach 22 h überschritten wurde.

Es ist möglich, dass die Wachstumsrate geringer ist, da die Endpunktmessung der Zellvermehrungshemmung hier nach 24 h Testzeit statt nach 14 h stattfand. Ursprünglich wurde von Menz et al. (2013) der Zeitpunkt für die Messung der chronischen Zellvermehrungshemmung gewählt, da zu diesem Zeitpunkt das Wachstum seiner Kultur von *A. fischeri* in die stationäre Phase überging. Ist das Wachstum der Kultur in die stationäre Phase übergegangen, erfolgt keine signifikante weitere Zunahme des Wachstums. Da die Wachstumsrate – aus der die Verdopplungszeit bestimmt wird – berechnet wird, indem die Zunahme der optischen Dichte durch die jeweilige Testzeit von 24 h geteilt wird, erscheint nach 24 h die Zeit, die die Leuchtbakterien zur Verdopplung benötigen, groß. Diese liegen im Vergleich zur Referenzmethode nach Menz um das 3 bis 4,6 –fach höher. Entsprechend führt die Berechnung der ZVH nach 24 h zu einem Test, der nur eine geringe Sensitivität und große Abweichungen aufweist. Allerdings wurde in Abschnitt III. 3.3 (Vergleich von verschiedenen Kombinationen aus Anfangszelldichte und Medienzusammensetzung) gezeigt, dass auch in dem Zeitraum von 21 h – 24 h die optische Dichte immer weiter zunahm, was ein Indikator ist, dass die stationäre Phase noch nicht erreicht wurde.

Um herauszufinden, worauf das geringe Wachstum gründet, sollte einmalig die Aufzeichnung einer Kinetik über den Testzeitraum¹² erfolgen, um den tatsächlichen

¹² Idealerweise erfolgt die Aufzeichnung der Kinetik über die angestrebte Testzeit von 24 h hinaus. Dadurch könnte gleichzeitig bestimmt werden, nach welcher Zeit die Lumineszenz ihr Maximum erreicht und so einmalig gezeigt werden, dass das GK „Negativkontrolle darf das Lumineszenzmaximum nicht überschreiten“ idealer Weise eingehalten und nicht in jedem Test erneut bestimmt werden muss, da das Maximum der Lumineszenz erst weit nach Testende erreicht wird.

Übergang der genutzten Stammkulturen in die stationäre Phase zu bestimmen. Sollte die Kultur tatsächlich weit vor Testende in die stationäre Phase übergehen, sollte geprüft werden, ob es sinnvoll und anwendbar ist die Endpunktmessung der ZVH auf einen anderen Zeitpunkt zu legen. Alternativ müssten ggf. die Zelldichte/ Nährmedium erneut angepasst werden, damit das Zellwachstum über einen Zeitraum von ca. 24 h exponentiell ist.

Ein weiterer Ansatz um die Abweichungen im Test zu verringern, liegt darin, die Konzentrationen der Referenzsubstanz weiter anzupassen, da die einzelnen Konzentrationen im Test durch die 1:2 – Verdünnungsreihe einen relativ weiten Bereich abdecken und bis zu einer Test - Konzentration von 0,14 mg/l hinunter reicht. Statt einer 1:2 Verdünnung könnte eine 1: 1,5 – Verdünnungsreihe angesetzt werden, damit der Konzentrationsbereich entsprechend näher beieinander liegt und die EC₅₀ – Werte besser umschließen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Vorschlag einer 3,5 - DCP Konzentrationsreihe für weitergehende Tests

	Verdünnungsstufe	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
Verdünnung bisheriger Tests mit 3,5 - DCP	Proben-Verdünnung [mg/l]	18,00	9,00	4,50	2,25	1,13	0,56	0,28
	Test-Verdünnung [mg/l]	9,00	4,50	2,25	1,13	0,56	0,28	0,14
Vorschlag für zukünftigen Test mit 3,5 - DCP	Proben-Verdünnung [mg/l]	18,00	12,00	8,00	5,33	3,56	2,37	1,58
	Test-Verdünnung [mg/l]	9,00	6,00	4,00	2,67	1,78	1,19	0,79

Zur weiteren Verringerung von Abweichungen sollte zudem an dem entworfenem Layout weiter gearbeitet werden. Durch die gleichmäßige Verteilung der Proben über die Platte hinweg werden so z.B. die Effekte von Temperaturdrifts, die sich nur über einen Teil der Platte auswirken mit berücksichtigt – und können sich letztendlich über erhöhte Standardabweichungen bei der Auswertung der jeweiligen Verdünnungsstufen auszeichnen. Durch weitere Tests sollten die Wells bzw. Bereiche auf der Mikrotiterplatte weiterhin auf signifikante, systematische Abweichungen untersucht werden. Zudem sollte bei den nächsten Tests bereits identifizierte systematisch abweichende Wells im inneren Plattenbereich aus der Auswertung herausgenommen werden, da das hier noch nicht der Fall war. Wurden weitere Plattenbereiche mit signifikanten, systematischen Abweichungen identifiziert, könnte es ggf. hilfreich sein, für diese Bereiche Korrekturfaktoren bei der Auswertung zu definieren, um die systematische Abweichung zu berücksichtigen

V. Fazit und Ausblick

Das Hauptziel dieser Arbeit war es einen kombinierten akuten und chronischen LBT in miniaturisierter Form, d.h. auf 96-well Mikrotiterplatte für das Biologielabor der HAW-Hamburg aufzubauen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vorkultivierung der Leuchtbakterien für chronische Tests zwingend notwendig ist, da ansonsten die Lumineszenz aufgrund der geringen Autoinduktorkonzentration im Nährmedium bereits nach einer Stunde abnimmt und somit für eine längerfristige Testzeit nicht nutzbar ist. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde hierfür die Herstellung der Stammkultur gegenüber dem kinetischen LBT nach Menz vereinfacht. Ferner wurde die Möglichkeit der Verkürzung der Testzeit auf 6 - 8 h verworfen, da dies im Laborbetrieb aufgrund von zusätzlichen Vor- und Nachbereitungszeiten nicht anwendbar ist.

Signifikante, systematisch abweichende Messabweichungen wurden für die jeweiligen Positionen auf den Mikrotiterplatten identifiziert und diese Erkenntnisse bei der Entwicklung eines Belegungslayouts berücksichtigt.

Für die Verdünnungsstufen des erstellten Plattenlayouts wurde anhand von identischen unbehandelten Proben die Hemmwerte sowie deren Abweichungen rechnerisch bestimmt. Es wurden verschiedene Kombinationen von modifiziertem Phosphat - reduzierten - Nährmedien mit unterschiedlichen Zelldichten zu Testbeginn untersucht und die geeignetste Kombination anhand ihrer Wachstums- und Lumineszenzeigenschaften ausgewählt. Diese soll bei weiteren Tests zur Überprüfung der Sensibilität gegenüber Referenzsubstanzen eingesetzt werden.

Anschließend konnte in einem ersten Vorversuch für das ausgewählte NM auf dem erstellten Layout im Vergleich zum ursprünglichen Vollmedium (Standard SSWC) ein grober Einblick auf die Sensitivität gegenüber der Referenzsubstanz 3,5 - DCP gewonnen werden.

Weitere kinetische Untersuchungen müssen zeigen, ob die Testkultur über einen Zeitraum von 24h limitiert ist (stationäre Phase).

Es wurde folglich die Bestimmung der akuten Leuchthemmung, der chronischen Leuchthemmung und der Zellvermehrungshemmung in einem einzigen, miniaturisierten Testansatz ermöglicht. Die Erfassung der Daten erfolgte manuell als Anfangs- und Endpunktmessungen und nicht als stündliche, automatisierte Messungen. Hierdurch konnte die Anzahl der Messdaten für die Auswertung erheblich reduziert werden.

Es besteht weiterer Handlungsbedarf bei der Analyse der inter- und intraexperimentellen Variabilität. Die Einhaltung Gültigkeitskriterien konnte noch nicht gewährleistet werden, da Abweichungen im Test aufgrund weiterer Positionseffekte zu groß sind. Außerdem ist die benötigte Verdopplungszeit der Bakterien zu groß, was daran liegt, dass die Endpunktmessung der Zellvermehrungshemmung auf den Zeitpunkt t_{24} statt t_{14} verlegt wurde und sich damit die Kultur vermutlich zu Testende bereits mehrere Stunden in der stationären Phase befindet. Das Gültigkeitskriterium „Negativkontrolle übersteigt nicht das Lumineszenzmaximum“ konnte nicht anhand von Endpunktmessungen überprüft werden. Sowohl für die spezifische Wachstumsrate (Verdopplungszeit) als auch das Gültigkeitskriterium des Lumineszenzmaximums, dass nicht von NK überschritten werden darf, sollte eine einmalige kinetische Messung durchgeführt werden, bei der die optische Dichte und Lumineszenz einmalig aufgezeichnet werden. Hierbei sollte insbesondere das Augenmerk auf den Zeitraum $>t_{10}$ gelegt werden, um den Eintritt in die stationäre Phase beim Wachstum des Organismus zu detektieren. Ferner sollte die Kinetik den Testzeitraum von 24 h übersteigen, um zeigen zu können, nach wie vielen Stunden Testzeit die Negativkontrolle erstmals das Lumineszenzmaximum übersteigt. Die Referenzsubstanz

3,5 – DCP muss für den Einsatz als Positivkontrolle (PK I und PK II) noch validiert und auf dem Plattenlayout positioniert werden, Für die Positivkontrolle der chronischen Endpunkte (PK II) muss eine geeignete Konzentration bestimmt werden. Zuletzt sollte die Testung von ausgewählten Referenzsubstanzen erfolgen und deren Übereinstimmung mit Werten aus dem kinetischen LBT nach Menz bzw. anhand der beschriebenen Referenzmethoden verglichen werden, um die Sensitivität des aufgebauten Test einschätzen zu können. Nach seiner Etablierung soll diese modifizierte Methode im Biologie - Labor der HAW - Hamburg Anwendung finden. In Labor- und Studienprojekten sowie weiteren Abschlussarbeiten könnte der Test eingesetzt werden, um Arzneimittel wie Antibiotika auf deren Ökotoxizität zu testen sowie und Wasser- und Baggergutproben zu untersuchen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Alexy, Radka (2003): Antibiotika in der aquatischen Umwelt. Eintrag, Elimination und Wirkung auf Bakterien. Online verfügbar unter <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/660/pdf/Diss-gesamt.pdf>.
- Backhaus, T. (1997): Toxicity testing with *Vibrio Fischeri*: A comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. In: *Chemosphere* 1997 (35), S. 2925–2938.
- DIN 38412-37 : 1999, 1999: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (*Photobacterium phosphoreum* –Zellvermehrungshemmtest).
- DIN EN ISO 11348-2: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri*. Normenausschuss Wasserwesen (NAW).
- Bundesanstalt für Gewässerkunde (2011): BfG-Merkblatt "Ökotoxikologische Baggergutuntersuchung". Ökotoxikologische Untersuchung von Sedimenten, Eluaten und Porenwässern. Hg. v. Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz. Koblenz. Online verfügbar unter http://www.bafg.de/Baggergut/DE/04_Richtlinien/merkblatt_oekotox.pdf?__blob=publicationFile, zuletzt geprüft am 11.05.2015.
- Floeter, Carolin; Ahlf, Wolfgang; Müller, Rudolf (2007): Entwicklung von ökotoxikologischen Instrumenten und ihre rechtliche Implementierung zur marinen ökologischen Risikobewertung von Chemikalien, Pestiziden und Baggergut. Techn. Univ., Inst. für Umwelttechnik und Energiewirtschaft, Diss.--Hamburg-Harburg, 2007. Aachen: Shaker (Berichte aus der Biologie).
- Gunkel, Günter (Hg.) (1994): Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Bioindikation in limnischen und küstennahen Ökosystemen ; Grundlagen, Verfahren und Methoden. Jena u.a.: G. Fischer (Umweltforschung).
- Herrmann, Ludwig (2009): Rückgewinnung von Phosphor aus der Abwasserreinigung. Eine Bestandsaufnahme. Bundesamt für Umwelt BAFU. Bern (Umwelt-Wissen, 0929). Online verfügbar unter <http://www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/01517/index.html?lang=de>, zuletzt geprüft am 31.01.2016.
- Hoffmann, Klaus H. (1981): Leuchtende Tiere: Chemie und biologische Bedeutung. In: *Biologie in unserer Zeit* 11 (4), S. 97–106. DOI: 10.1002/biuz.19810110404.
- Kümmerer, Klaus (2010): Neuartige Spurenstoffe im Wasser. In: *Hydrologie und Wasserbewirtschaftung* (54), S. 349–359.
- Link, M. (1992): Zum physiologischen Hintergrund des Leuchtbakterientests. In: *SCHRIFTENREIHE-VEREIN FÜR WASSER BODEN UND LUFTHYGIENE*, S. 625–632.

Menz, J.; Schneider, M.; Kümmerer, K. (2013): Toxicity testing with luminescent bacteria--characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects. In: *Chemosphere* 93 (6), S. 990–996. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.067.

Menz, Jakob (2012): Entwicklung einer automatisierten Methode zur Bestimmung der akuten und chronischen Toxizität von Chemikalien und Arzneimitteln gegenüber *Vibrio fischeri*. Diplomarbeit. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.

Schulte-Oehlmann, Ulrike; Oehlmann, Jörg; Püttmann, Wilhelm (2007): Humanpharmakawirkstoffe in der Umwelt. Einträge, Vorkommen und der Versuch einer Bestandsaufnahme. In: *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 19 (3), S. 168–179. DOI: 10.1065/uwsf2007.07.202.

Schulz, Claus-Jürgen (1993): Leuchtbakterien in der Ostsee. In: *Biologie in unserer Zeit* 23 (2), S. 108–112. DOI: 10.1002/biuz.19930230210.

Stanko, Katrin (2015): Die Erfassung der akuten Toxizität von Wasser- und Sedimentproben der Bille- und Ammersbek sowie ausgewählten Arzneimitteln auf Leuchtbakterien. Hochschule für angewandte Wissenschaften, Hamburg.

Urbanczyk, Henryk; Ast, Jennifer C.; Higgins, Melissa J.; Carson, Jeremy; Dunlap, Paul V. (2007): Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57 (Pt 12), S. 2823–2829. DOI: 10.1099/ijs.0.65081-0.

Vogel, Ines (2011): Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Umweltbundesamt. Online verfügbar unter <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/4188.pdf>, zuletzt geprüft am 30.01.2016.

Walz, Anna; Götz, Konrad (2014): Arzneimittelwirkstoffe im Wasserkreislauf. ISOE-Materialien Soziale Ökologie (36). Online verfügbar unter <http://www.isoe.de/fileadmin/redaktion/Downloads/Risikoanalyse/msoe-36-isoe-2014.pdf>, zuletzt geprüft am 30.01.2016.

Zieseniss, Kerstin (1995): LUMIStox Leuchtbakterientest. Bestimmung der chronischen Toxizität. In: *Bioforum* 11/95 (11), S. 455–457.

Anhang

Anhang I

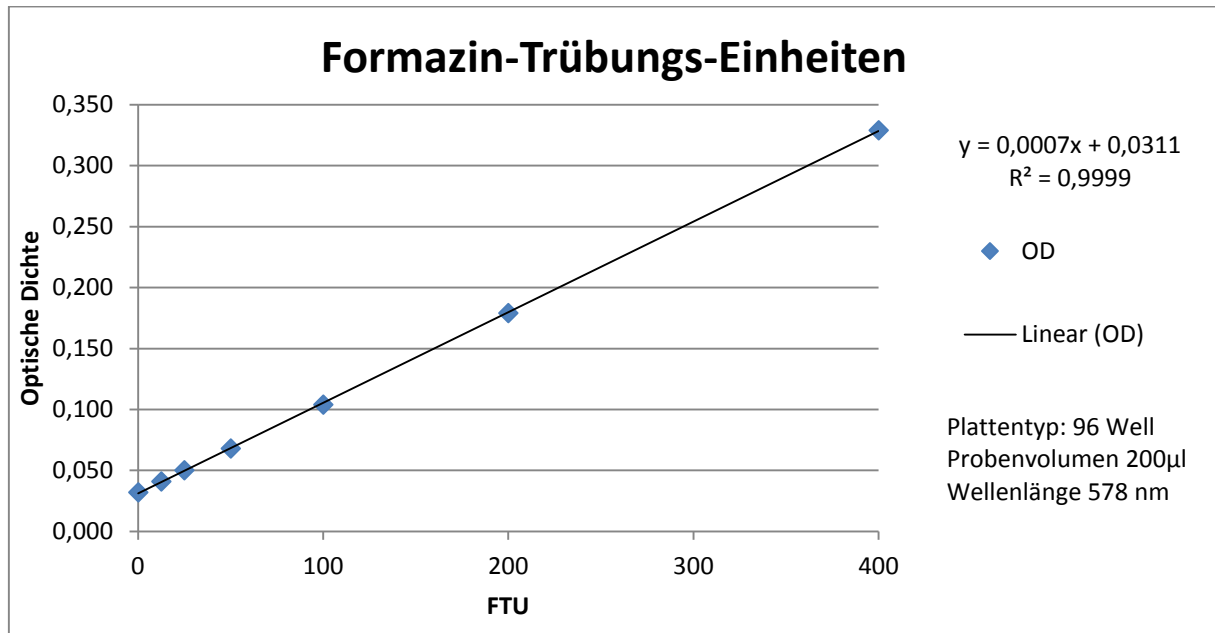


Abbildung 11: Varioskan Flash zur Bestimmung der Abhängigkeit der OD zu Formazin – Trübungseinheiten. Erstellt von Jakob Menz für den kinetischen LBT (Menz 2012).

Anhang II

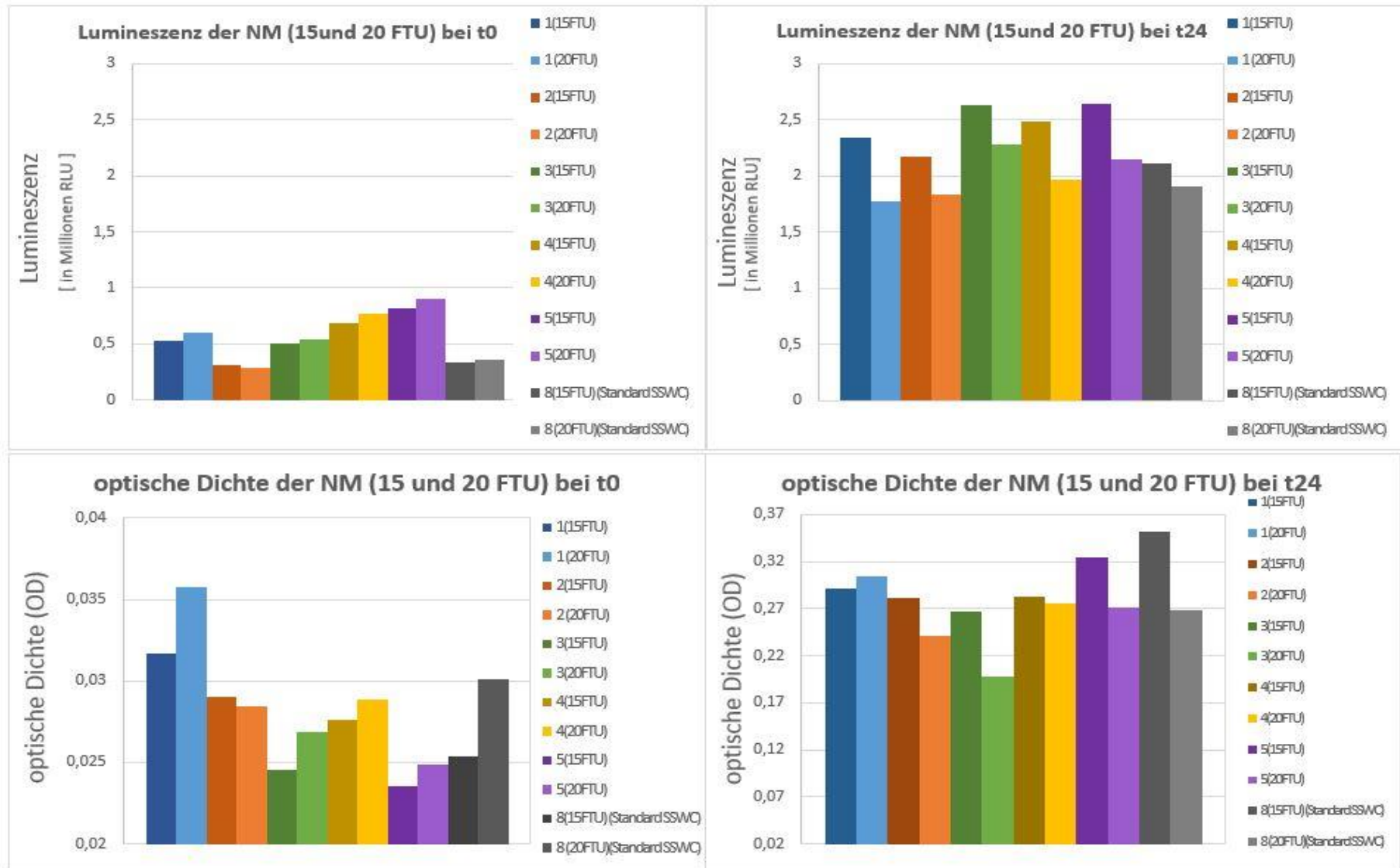


Abbildung 12: Lumineszenz und OD zum Anfangs- und Endzeitpunkt (0 h bzw. 24 h) der verschiedenen Nährmedien (15 bzw. 20 FTU Anfangszellichte)

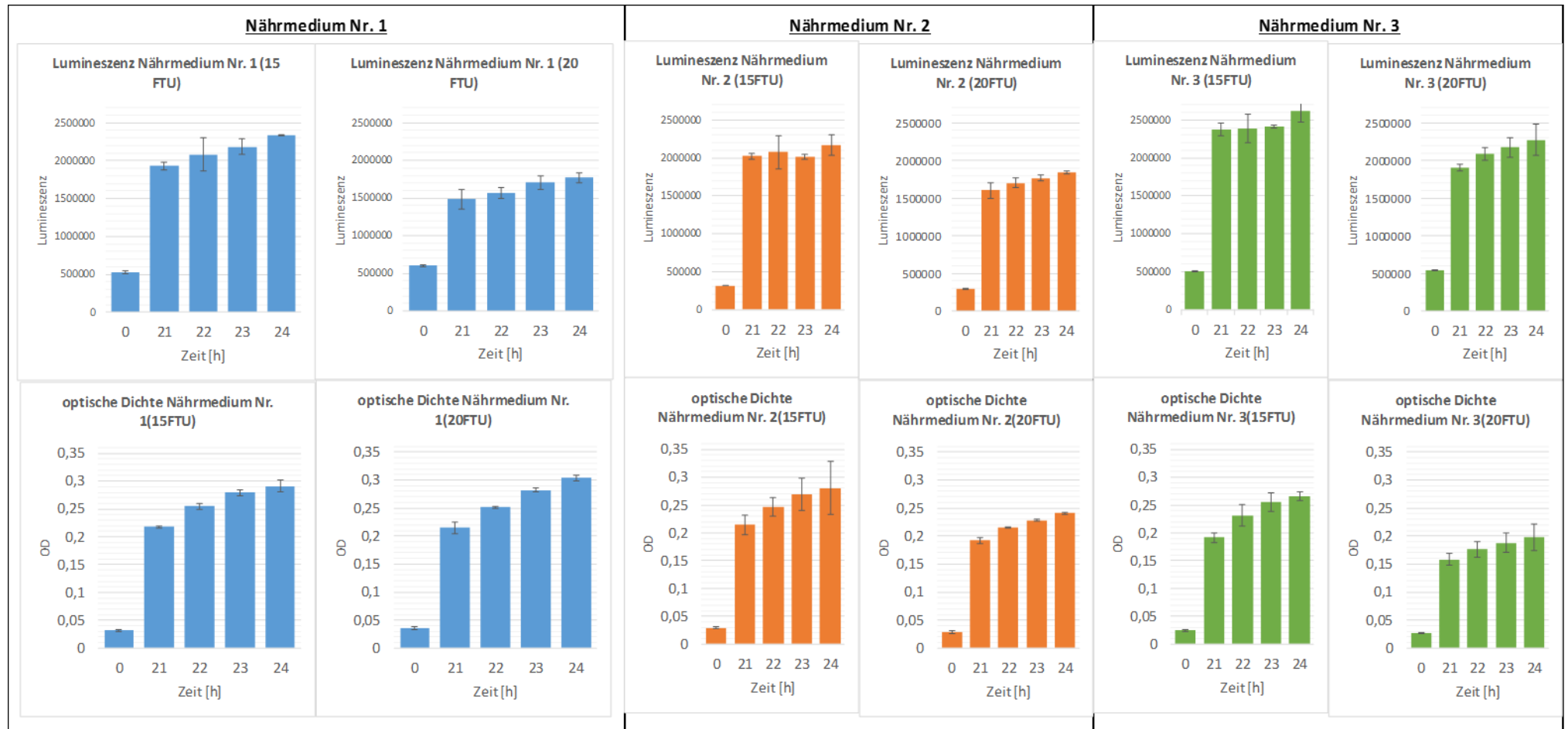


Abbildung 13: Darstellung der Lumineszenz und OD aller gemessenen Zeitpunkte der Nährmedien 1 bis 3 (mit 15 bzw. 20 FTU Anfangszellidichte)

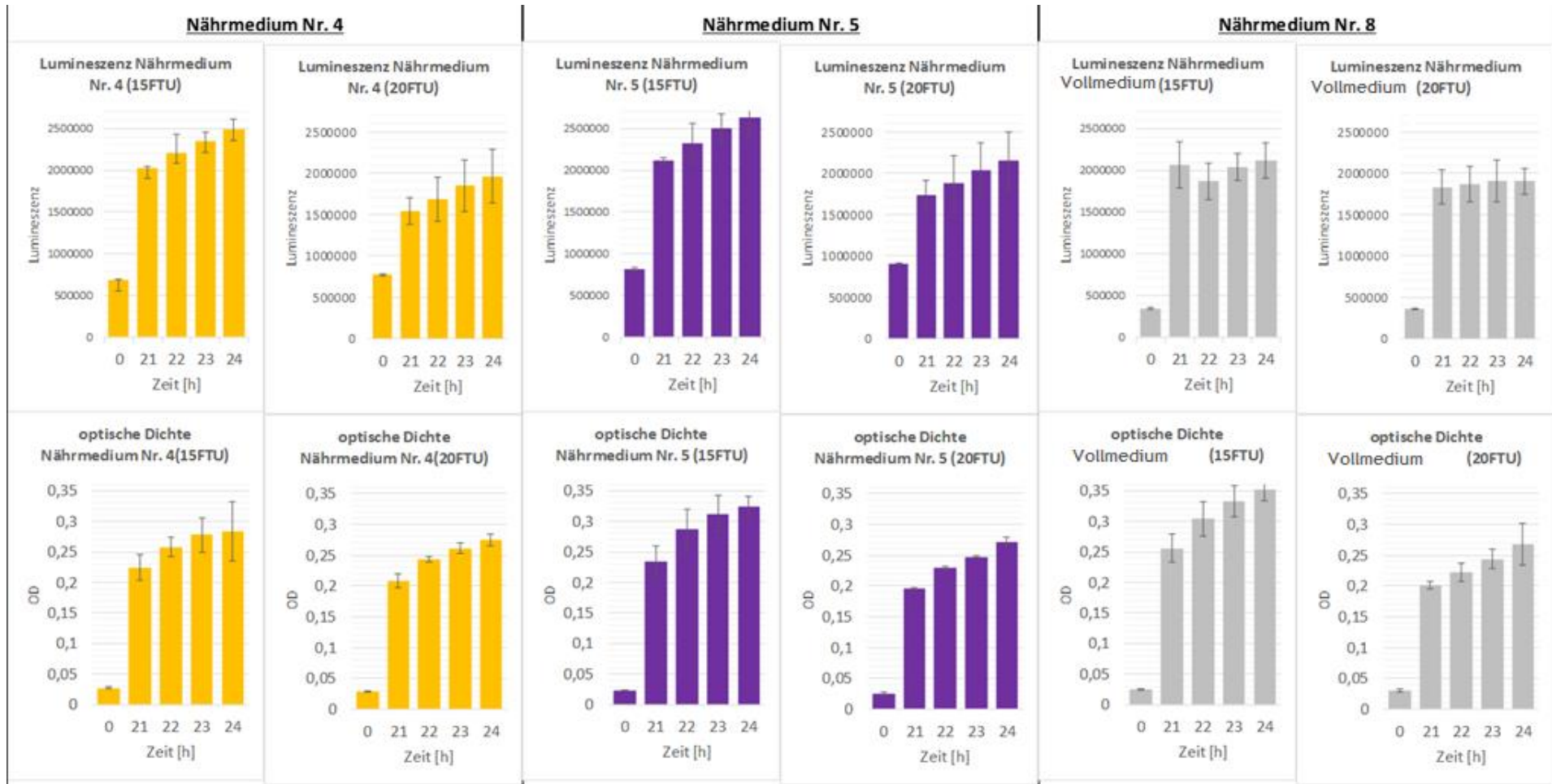
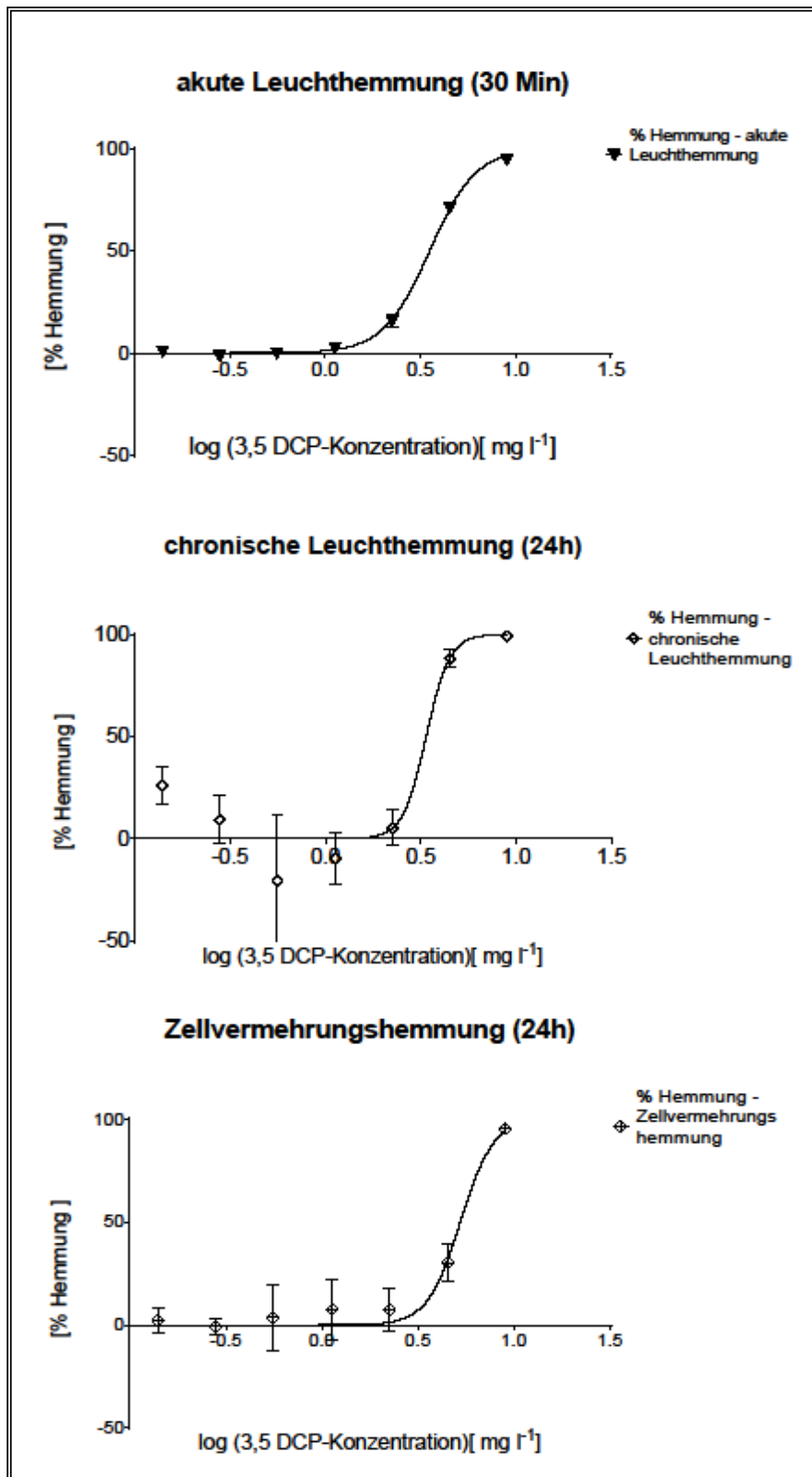
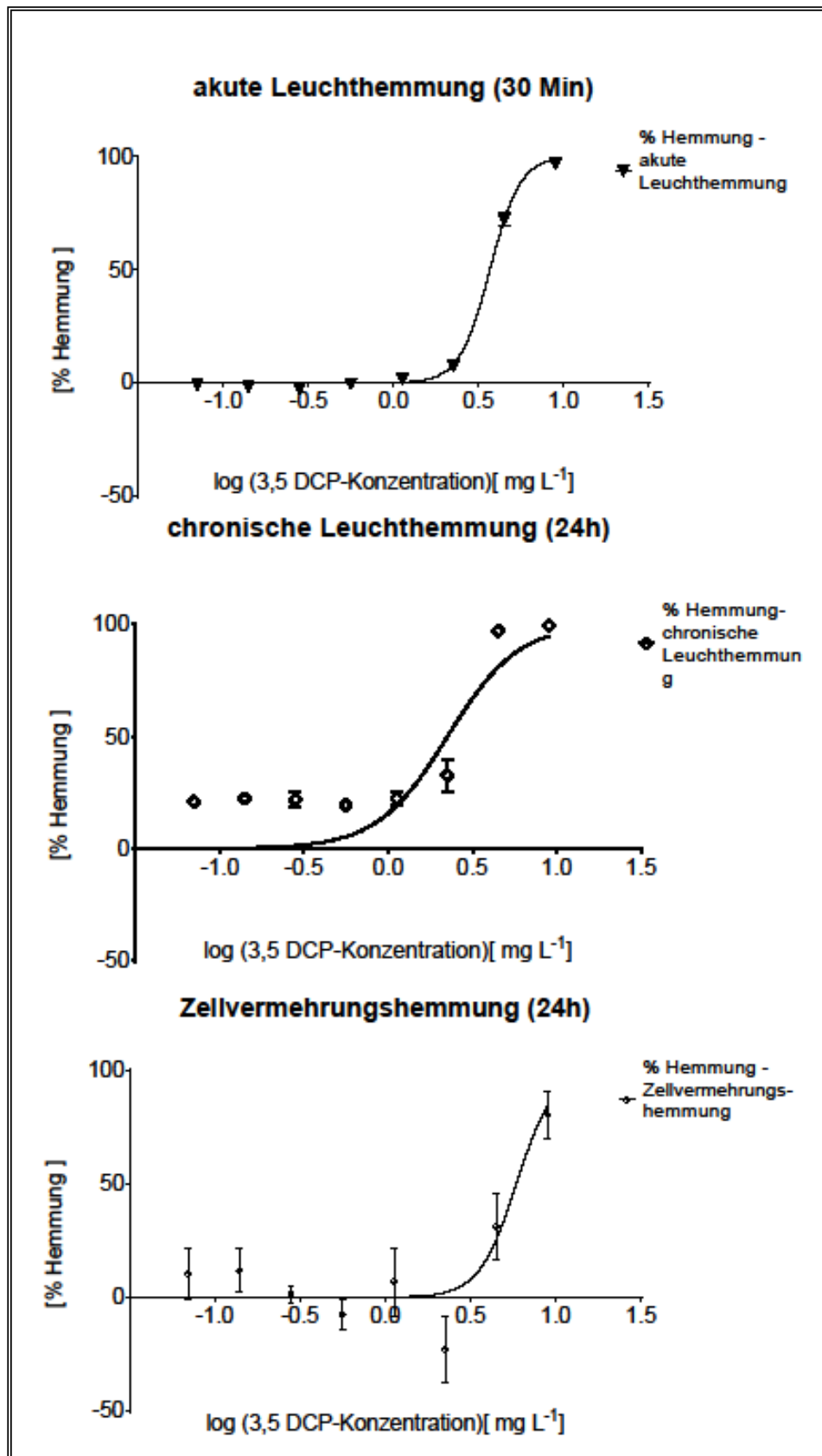


Abbildung 14: Darstellung der Lumineszenz und OD aller gemessenen Zeitpunkte der Nährmedien 4, 5 und Vollmedium (mit 15 bzw. 20 FTU Anfangszellichte)

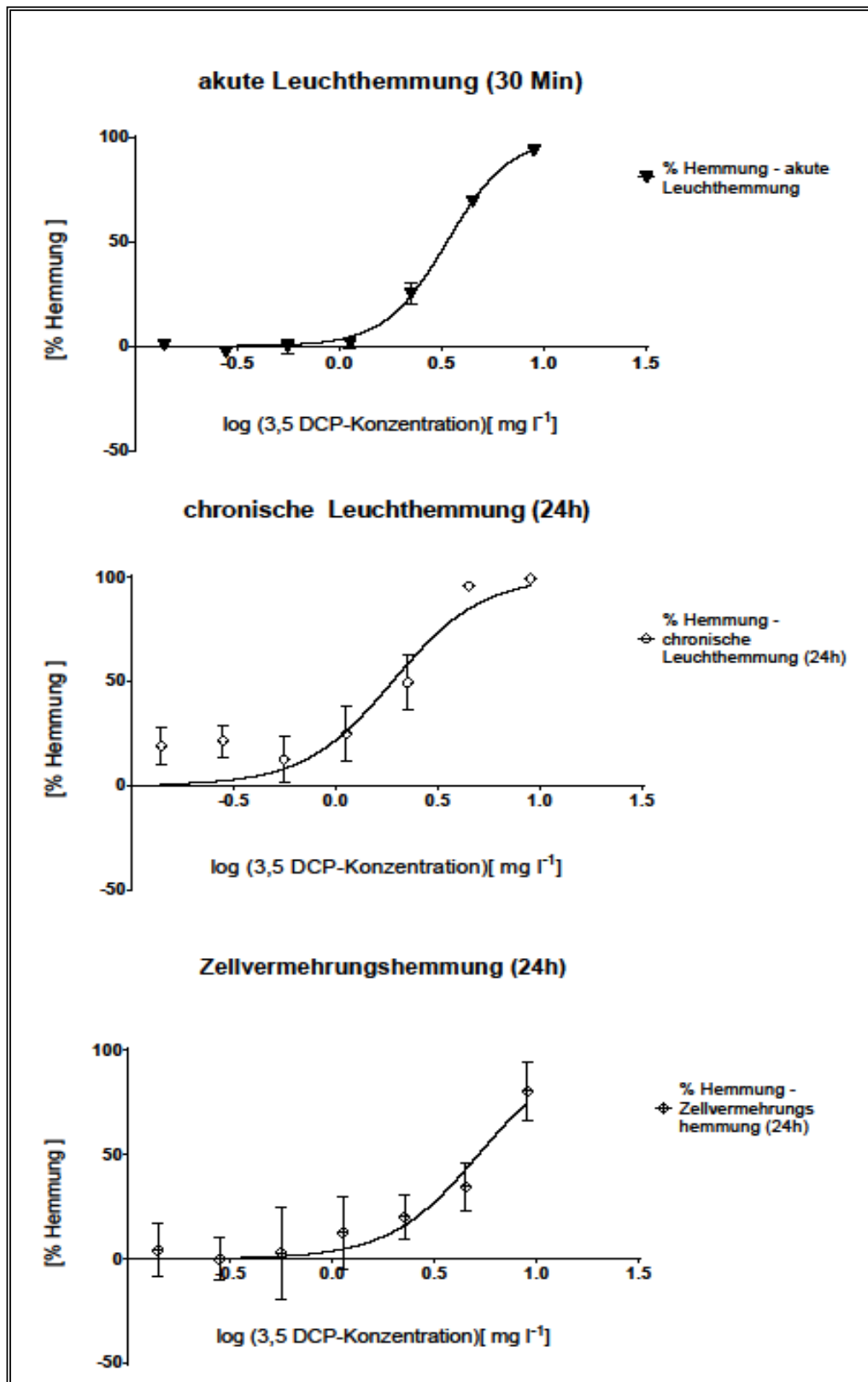
Anhang III Dosis- Wirkungskurve NM Nr. 5 (15 NTU)



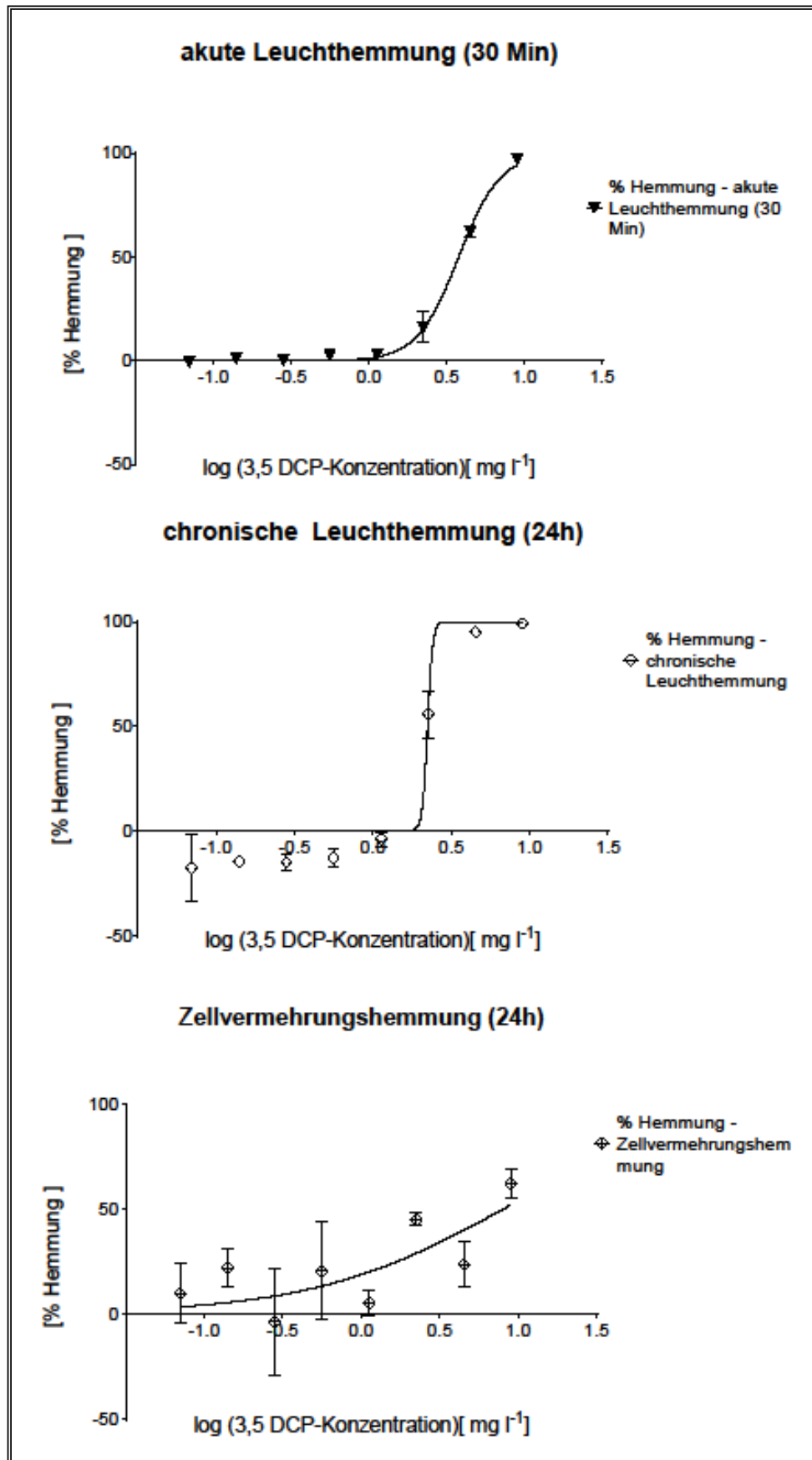
Anhang IV Dosis- Wirkungskurve NM Nr. 5 (20 NTU)



Anhang V Dosis- Wirkungskurve NM Nr. 8 (15 NTU)



Anhang VI Dosis- Wirkungskurve NM Nr. 8 (20 NTU)



Anhang VII MP1: Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t_0 und t_{24} zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender¹³

MP1 : Optische Dichte

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18,3	2,6	10,7	13,4	12,1	8,5	12,4	30,5	6,6	15,5	6,5	28,9
B	6,5	6,7	5,6	3,1	11,1	13,6	4,2	27,9	12,2	10,5	5,0	15,3
C	1,6	9,8	15,8	8,8	10,6	13,0	1,7	4,3	17,3	2,0	9,3	13,5
D	2,7	5,6	19,5	3,5	5,1	17,0	0,5	6,5	5,8	1,4	2,7	13,4
E	7,7	2,0	15,1	5,4	3,3	11,1	8,0	10,5	14,4	10,6	5,1	16,6
F	5,9	8,6	10,9	4,9	10,9	9,5	7,4	8,5	8,4	2,6	6,6	17,5
G	12,1	17,1	2,9	2,6	3,4	3,0	15,4	2,2	2,7	3,4	6,8	19,8
H	28,6	26,0	8,3	12,6	16,9	3,5	12,2	15,0	19,5	12,8	10,4	19,7
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,8	2,3	0,3	1,9	2,3	2,2	5,0	4,5	1,1	3,6	3,2	4,8
B	2,4	3,9	3,3	3,6	3,7	2,1	2,5	5,9	2,5	1,3	1,7	1,3
C	2,5	3,1	0,6	1,4	3,0	0,2	2,8	5,7	1,9	1,8	3,1	1,7
D	1,0	2,1	0,9	0,1	1,6	1,7	1,1	5,6	3,7	1,0	2,5	1,2
E	2,0	0,9	0,7	1,9	3,5	0,3	1,6	3,1	0,0	1,2	0,5	1,7
F	0,9	0,1	2,8	2,1	3,8	0,6	5,9	2,4	0,6	1,2	1,9	0,2
G	2,9	1,2	2,4	2,9	1,2	0,8	1,8	5,5	4,4	2,1	4,0	1,6
H	3,3	3,9	1,9	1,7	2,0	1,4	1,8	2,8	4,3	2,6	3,1	1,4

MP1 : Lumineszenz

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	14,0	2,5	1,1	3,8	1,6	1,4	2,5	11,3	1,6	5,1	5,8	9,2
B	4,4	1,4	5,7	1,2	2,1	2,0	7,3	6,8	5,8	4,2	7,6	5,7
C	4,1	0,2	3,2	1,3	0,4	1,8	9,1	5,8	1,6	6,5	5,8	0,2
D	1,6	3,5	1,1	3,8	0,0	1,1	4,6	0,3	7,3	4,5	2,5	6,7
E	4,2	0,9	1,5	0,9	0,5	2,2	2,3	5,8	4,4	0,7	0,1	12,7
F	8,2	1,5	1,0	2,8	5,1	1,0	6,8	7,1	4,7	3,5	0,8	14,4
G	4,1	6,5	0,2	5,6	5,4	1,1	4,2	4,3	1,1	6,2	7,0	19,5
H	14,7	15,2	3,9	7,2	8,5	6,4	7,9	6,8	11,5	11,8	14,9	24,3
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6,0	4,7	3,0	1,2	9,7	2,3	1,3	10,0	3,2	0,8	3,8	12,9
B	1,8	2,5	0,5	0,7	0,8	0,9	0,3	8,7	2,9	5,2	2,5	1,0
C	4,3	3,8	0,5	1,7	0,2	1,7	2,1	0,2	1,8	0,3	0,0	0,3
D	1,5	0,4	2,0	2,8	2,8	1,4	2,2	1,5	0,5	0,1	1,2	5,2
E	0,4	0,2	0,8	0,5	2,5	1,7	0,5	1,9	0,0	2,2	1,7	0,2
F	2,6	1,1	2,7	0,8	1,0	0,0	2,7	2,0	0,3	1,4	0,2	1,5
G	1,8	0,3	2,5	1,0	1,2	1,2	1,0	3,0	4,1	1,8	4,9	1,6
H	1,3	0,7	2,8	1,2	0,9	1,8	3,9	0,8	4,0	2,3	0,6	2,3

¹³: In diesem Falle bezieht sich der Variationskoeffizient auf die prozentuale Abweichung des einzelnen Replikats in einem Well einer Mikrotiterplatte bezogen auf den Gesamtmittelwert aller Replikate einer Platte.

Anhang VIII MP2: Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t_0 und t_{24} zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender¹⁴

MP2 OD

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	21,1	3,8	10,5	13,5	6,0	15,1	11,2	5,8	1,5	22,3	12,8	15,2
B	10,6	3,1	9,1	7,9	8,3	2,1	9,8	12,1	11,6	17,0	7,4	4,8
C	2,2	4,2	5,6	6,2	2,0	4,5	0,4	14,2	2,3	26,6	8,1	14,3
D	0,3	0,5	0,5	15,5	7,5	6,5	10,7	13,7	0,5	8,0	12,3	9,4
E	12,6	2,0	8,2	6,9	6,4	6,4	16,2	12,5	11,5	14,9	0,7	14,0
F	12,8	3,7	8,8	6,5	7,7	3,6	14,4	3,3	20,7	24,0	3,4	12,0
G	14,2	2,3	10,9	5,1	3,5	10,4	18,1	5,1	10,2	3,0	1,8	15,3
H	16,2	10,2	6,0	11,6	6,8	17,8	12,0	11,5	18,1	18,1	23,6	19,1
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,0	2,8	2,1	2,5	3,4	1,5	5,4	3,8	0,3	3,3	5,4	0,8
B	2,6	4,9	1,6	1,0	1,0	5,4	5,4	1,5	2,6	2,5	4,6	2,4
C	3,9	5,8	2,2	3,9	4,5	4,3	0,6	0,8	1,8	3,8	5,3	1,1
D	1,7	2,0	2,0	0,4	1,5	4,6	2,6	1,1	0,9	0,5	1,8	2,0
E	6,4	3,4	0,6	0,9	2,4	4,5	0,3	0,5	5,6	7,5	1,2	0,4
F	6,0	1,4	0,3	5,6	0,2	2,1	3,8	1,1	2,6	4,4	0,4	0,2
G	13,5	6,0	3,3	1,0	5,3	1,2	2,6	2,5	3,9	11,2	2,3	6,7
H	10,4	5,0	4,8	0,5	2,4	3,4	8,6	5,8	2,4	6,5	5,4	9,3

MP2 Lumineszenz

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	9,9	4,2	0,8	2,0	5,8	7,0	3,9	4,7	0,2	20,2	3,9	3,4
B	8,1	10,5	2,2	2,4	7,4	7,0	3,8	0,3	7,0	13,4	5,8	6,1
C	3,2	6,9	8,2	7,9	14,8	6,9	12,1	0,3	15,3	12,8	8,0	5,5
D	4,7	6,6	1,4	4,8	11,5	2,3	12,0	3,4	14,5	9,8	5,3	9,5
E	5,0	3,4	2,8	6,6	11,5	2,3	3,2	2,1	1,1	17,5	1,6	1,1
F	7,3	1,4	6,4	7,6	0,6	3,0	8,9	4,2	8,6	23,8	3,6	1,3
G	8,6	0,6	0,6	7,5	5,7	3,7	5,5	4,2	0,0	31,6	5,2	4,3
H	25,2	12,4	1,6	1,3	2,7	13,1	14,4	8,9	9,3	29,5	13,0	17,9
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,4	0,9	0,4	2,0	1,1	0,9	2,2	1,1	0,5	1,8	1,3	2,3
B	0,0	0,5	0,5	0,3	1,9	0,2	1,7	1,0	2,2	0,1	2,0	1,1
C	0,1	0,8	3,0	0,7	1,0	2,3	0,7	0,0	1,0	1,0	1,2	0,7
D	0,4	0,2	1,0	2,3	1,4	2,8	1,5	0,1	0,1	0,8	1,3	1,4
E	0,4	0,5	2,3	0,5	2,6	3,5	0,6	1,8	0,9	4,4	0,1	0,3
F	1,5	0,7	2,8	1,7	3,2	3,3	1,8	1,3	0,3	3,6	0,7	0,1
G	2,6	0,7	1,4	1,2	1,5	1,3	0,0	0,5	1,6	4,8	0,6	0,1
H	3,5	3,2	0,3	1,8	0,7	2,1	1,7	0,1	0,5	3,6	9,0	0,1

¹⁴: In diesem Falle bezieht sich der Variationskoeffizient auf die prozentuale Abweichung des einzelnen Replikats in einem Well einer Mikrotiterplatte bezogen auf den Gesamtmittelwert aller Replikate einer Platte.

Anhang IX MP3: Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t_0 und t_{24} zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender¹⁵

MP3 OD

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,7	12,0	#DIV/0!	#DIV/0!	13,1	5,3	25,2	4,9	5,5	25,3	22,4	12,3
B	3,8	6,8	#DIV/0!	#DIV/0!	9,8	4,3	22,0	9,3	8,7	13,1	16,0	22,5
C	11,8	1,5	#DIV/0!	#DIV/0!	10,9	3,1	13,7	10,5	5,7	11,1	16,1	23,1
D	3,5	9,8	#DIV/0!	#DIV/0!	14,8	3,6	14,4	14,6	11,8	9,1	8,6	23,1
E	12,3	12,9	#DIV/0!	#DIV/0!	15,2	9,3	2,7	3,8	13,6	8,0	12,2	24,7
F	7,5	16,4	#DIV/0!	#DIV/0!	11,6	3,7	12,0	8,0	6,2	5,5	11,1	20,9
G	4,1	7,8	#DIV/0!	#DIV/0!	16,1	7,3	16,8	4,7	1,3	9,4	10,1	24,7
H	19,1	13,8	#DIV/0!	#DIV/0!	1,8	3,3	1,7	2,6	6,9	17,1	21,0	27,8
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	7,1	8,2	#DIV/0!	#DIV/0!	5,4	10,3	8,1	6,3	4,7	16,1	14,2	17,8
B	4,3	4,2	#DIV/0!	#DIV/0!	4,0	5,1	5,8	5,6	7,9	17,9	15,5	19,6
C	7,3	6,4	#DIV/0!	#DIV/0!	5,1	6,9	8,9	9,4	7,0	15,9	14,6	18,2
D	7,5	5,0	#DIV/0!	#DIV/0!	7,3	6,5	9,3	8,7	8,2	15,3	14,1	18,3
E	5,4	6,6	#DIV/0!	#DIV/0!	7,7	7,3	2,6	7,1	9,1	15,6	14,8	18,1
F	11,7	7,9	#DIV/0!	#DIV/0!	7,0	8,2	0,2	6,0	8,9	16,1	15,4	18,0
G	15,7	7,5	#DIV/0!	#DIV/0!	13,2	9,2	8,8	10,7	11,4	14,0	14,0	18,9
H	11,7	10,2	#DIV/0!	#DIV/0!	12,9	9,6	8,6	6,3	11,4	13,1	15,0	16,5

MP3 Lumineszenz

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	24,8	18,1	#DIV/0!	#DIV/0!	9,5	4,8	14,8	6,7	7,6	21,3	3,6	4,6
B	16,1	11,5	#DIV/0!	#DIV/0!	1,9	3,1	6,5	0,4	0,2	13,3	11,8	6,2
C	15,5	12,5	#DIV/0!	#DIV/0!	1,6	5,2	11,0	1,4	1,6	11,1	15,1	4,4
D	14,9	6,5	#DIV/0!	#DIV/0!	1,4	1,9	6,2	0,5	1,4	19,5	6,9	4,4
E	19,5	14,3	#DIV/0!	#DIV/0!	2,6	3,8	6,9	2,8	1,8	17,7	16,1	0,5
F	11,4	11,8	#DIV/0!	#DIV/0!	2,6	0,3	8,9	5,7	0,6	16,8	21,8	0,8
G	19,2	10,4	#DIV/0!	#DIV/0!	2,8	8,1	2,4	5,0	2,0	9,1	18,9	4,6
H	23,4	18,3	#DIV/0!	#DIV/0!	19,0	7,0	5,3	1,9	9,2	3,8	6,6	23,2
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,6	6,4	#DIV/0!	#DIV/0!	6,1	5,5	2,6	13,8	0,6	10,5	11,8	5,6
B	1,5	2,6	#DIV/0!	#DIV/0!	0,6	0,4	5,2	1,0	0,4	0,1	10,4	2,9
C	5,3	0,8	#DIV/0!	#DIV/0!	2,7	0,6	3,1	0,7	1,7	1,2	8,4	10,1
D	1,7	0,9	#DIV/0!	#DIV/0!	2,9	0,5	1,9	0,3	2,0	1,1	0,2	9,3
E	6,0	1,0	#DIV/0!	#DIV/0!	1,3	0,6	0,6	1,3	0,5	2,7	4,0	10,8
F	7,9	1,3	#DIV/0!	#DIV/0!	3,1	0,4	3,2	0,5	0,0	2,6	3,7	5,8
G	4,9	1,9	#DIV/0!	#DIV/0!	1,8	3,3	0,3	0,7	0,7	3,7	4,5	4,1
H	4,1	0,5	#DIV/0!	#DIV/0!	2,2	1,2	1,2	0,0	0,8	5,7	1,0	12,2

¹⁵: In diesem Falle bezieht sich der Variationskoeffizient auf die prozentuale Abweichung des einzelnen Replikats in einem Well einer Mikrotiterplatte bezogen auf den Gesamtmittelwert aller Replikate einer Platte. Beim Auftreten des Zeichens „#DIV/0!“ wurde das Replikat aufgrund von Belegungsfehlern nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Anhang X MP4: Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t0 und t24 zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender¹⁶

MP4 OD

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	17,3	13,9	4,2	8,7	0,3	4,3	2,5	7,3	#DIV/0!	7,2	4,5	8,3
B	5,0	1,8	3,5	0,3	0,2	2,5	0,5	0,3	#DIV/0!	2,3	3,6	5,0
C	15,3	12,7	6,3	1,2	2,6	2,4	2,4	4,0	#DIV/0!	2,7	4,3	9,2
D	11,0	6,2	3,8	1,3	5,9	0,6	0,4	10,5	#DIV/0!	1,2	0,5	6,2
E	13,1	7,1	6,4	0,7	7,3	7,9	3,1	8,4	#DIV/0!	0,4	2,9	0,6
F	14,9	10,5	6,3	2,2	6,4	1,8	5,2	5,2	#DIV/0!	1,4	0,1	3,1
G	14,4	12,1	2,3	5,7	6,0	6,4	10,9	2,9	#DIV/0!	1,7	3,1	9,3
H	15,3	15,7	8,5	10,2	9,4	12,1	1,8	0,5	#DIV/0!	8,1	2,6	4,9
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,2	0,6	1,5	5,2	1,9	3,6	2,6	1,1	#DIV/0!	1,4	1,6	3,8
B	3,5	2,0	1,2	0,3	2,8	1,9	0,7	0,1	#DIV/0!	0,1	4,3	2,9
C	1,3	0,5	26,3	0,2	2,8	6,0	0,5	0,4	#DIV/0!	1,2	1,0	0,4
D	2,0	0,5	0,1	0,7	4,3	3,4	1,8	1,4	#DIV/0!	1,5	5,4	1,1
E	0,7	2,4	0,3	1,0	2,9	5,2	1,9	0,2	#DIV/0!	1,2	3,6	0,1
F	1,7	0,4	1,2	1,2	4,8	3,5	3,6	0,7	#DIV/0!	2,5	2,7	1,2
G	2,6	2,2	4,8	0,0	6,5	2,2	7,4	1,3	#DIV/0!	0,0	1,7	0,6
H	1,3	1,9	0,5	0,5	3,4	1,5	3,6	3,1	#DIV/0!	1,1	1,9	1,4

¹⁶: In diesem Falle bezieht sich der Variationskoeffizient auf die prozentuale Abweichung des einzelnen Replikats in einem Well einer Mikrotiterplatte bezogen auf den Gesamtmittelwert aller Replikate einer Platte. Beim Auftreten des Zeichens „#DIV/0!“ wurde das Replikat aufgrund von Belegungsfehlern nicht in die Auswertung miteinbezogen.

MP4 Lumineszenz

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	12,1	21,1	4,6	5,9	2,1	2,6	1,2	1,3	#DIV/0!	0,0	5,3	13,0
B	10,0	6,0	0,3	1,7	1,2	2,1	1,2	13,8	#DIV/0!	0,5	3,2	2,0
C	15,2	12,8	0,1	4,5	0,2	1,7	0,1	12,5	#DIV/0!	9,3	2,4	3,6
D	13,8	11,2	4,8	5,0	4,3	1,6	0,7	9,3	#DIV/0!	12,9	5,2	8,5
E	13,4	12,8	2,6	7,9	2,4	6,5	3,0	18,7	#DIV/0!	10,2	3,8	5,6
F	15,4	14,2	2,4	3,1	1,0	2,3	3,8	14,8	#DIV/0!	12,8	13,5	4,4
G	16,4	14,2	7,7	3,9	3,2	0,5	1,7	1,2	#DIV/0!	8,1	3,8	8,6
H	19,0	18,0	11,8	11,8	9,9	12,0	5,6	6,4	#DIV/0!	0,7	7,9	14,5
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,4	2,0	2,1	1,4	0,9	0,4	0,6	1,4	#DIV/0!	0,1	5,4	0,9
B	0,1	3,0	0,3	0,6	3,6	2,4	1,9	0,1	#DIV/0!	1,3	7,0	8,5
C	1,3	0,9	0,3	1,4	2,8	2,1	0,1	1,8	#DIV/0!	0,3	4,8	3,6
D	1,6	0,2	0,7	1,8	3,2	1,8	2,5	1,4	#DIV/0!	3,7	7,4	0,9
E	0,4	1,4	0,7	1,3	2,5	1,6	2,0	1,4	#DIV/0!	3,8	9,4	3,4
F	2,0	2,7	1,0	0,3	0,7	0,7	0,2	0,5	#DIV/0!	3,2	0,9	5,7
G	4,4	3,6	0,8	0,1	0,3	0,0	1,8	1,6	#DIV/0!	2,2	0,6	1,5
H	6,2	2,7	2,9	2,3	0,4	1,9	1,8	2,4	#DIV/0!	0,2	7,5	7,0

Anhang XI : MP5: Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t0 und t24 zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender¹⁷

MP5 : Variationskoeffizienten [%] der optischen Dichte für t0 (unten) und t24 (oben)

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30,5	2,1	27,2	19,2	13,1	9,0	2,4	5,3	6,5	11,3	1,9	2,6
B	25,8	31,6	24,9	16,5	6,8	9,3	5,5	7,8	1,9	8,5	6,1	7,3
C	12,6	3,4	21,4	2,7	2,5	4,5	2,7	1,2	5,8	18,2	11,3	5,1
D	32,2	4,9	16,5	11,2	8,1	6,9	1,6	11,0	6,9	18,3	11,5	12,5
E	7,5	5,2	14,1	12,1	6,6	4,7	14,1	13,5	8,9	10,9	7,2	3,0
F	7,0	3,4	10,9	6,1	9,8	13,9	7,4	6,8	15,5	15,5	2,7	17,2
G	7,8	4,4	8,2	12,2	11,1	4,3	0,3	7,4	5,7	18,0	8,8	17,3
H	12,9	8,3	10,7	11,3	0,7	12,5	5,8	11,2	15,7	15,5	0,9	14,5

Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6,5	3,8	4,6	2,3	2,6	0,8	0,4	1,0	3,0	1,8	1,0	0,5
B	4,0	2,2	0,8	8,7	2,8	2,9	0,9	1,0	3,3	1,7	0,5	0,8
C	6,2	2,8	3,8	0,9	0,2	0,2	1,2	1,5	2,2	1,1	2,3	1,7
D	4,1	4,6	0,8	0,9	1,9	1,6	0,4	0,1	1,8	1,0	2,5	1,4
E	4,4	2,5	0,9	2,3	1,9	0,4	2,7	0,8	1,7	1,2	3,9	3,6
F	2,8	3,3	1,8	1,2	1,8	1,2	0,6	0,0	0,2	1,0	0,8	3,1
G	4,5	5,2	0,8	0,8	1,6	1,8	0,4	0,8	1,1	1,2	3,8	4,8
H	4,3	5,2	0,0	1,6	0,3	1,4	3,5	0,7	1,9	3,6	0,5	4,8

MP5 : Variationskoeffizienten [%] der Lumineszenz für t0 (unten) und t24 (oben)

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	23,1	13,9	7,2	6,5	1,2	5,0	7,3	5,5	4,5	20,6	13,9	11,5
B	16,2	8,8	1,2	1,3	0,6	1,2	9,8	12,1	18,1	9,2	3,5	1,4
C	13,9	0,1	1,9	1,7	1,5	1,7	2,2	9,9	4,7	9,7	7,3	9,0
D	15,2	3,0	6,5	2,4	4,6	8,5	5,6	15,2	5,8	5,2	1,2	2,2
E	9,8	0,0	9,5	6,3	0,7	3,6	3,2	3,8	1,9	11,7	8,9	2,3
F	11,2	1,1	7,3	3,6	5,7	1,8	5,8	5,3	0,3	4,0	1,5	14,2
G	10,9	8,2	6,8	5,8	11,2	5,8	0,8	1,8	5,6	3,7	0,9	14,0
H	8,2	14,0	9,4	11,6	1,4	9,4	15,2	19,9	11,7	4,7	12,5	18,2

Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,8	7,9	0,9	3,1	1,1	2,5	2,7	0,4	0,1	1,5	6,0	1,9
B	1,3	1,2	0,1	0,0	2,0	0,2	1,9	3,4	2,2	1,1	0,8	4,8
C	8,0	3,4	1,3	0,3	0,5	0,5	2,7	1,6	3,8	1,7	2,4	3,7
D	3,9	3,0	0,2	4,2	3,8	1,6	0,2	1,8	1,8	1,0	0,3	1,1
E	2,7	0,1	0,4	1,3	1,0	0,0	0,8	3,6	0,1	0,5	1,1	2,4
F	0,0	1,1	1,7	0,1	2,8	0,5	0,6	1,0	1,0	2,2	0,4	2,2
G	1,9	1,8	0,1	0,3	1,4	0,7	1,2	0,6	2,2	4,0	1,3	12,4
H	4,3	2,4	0,9	1,3	0,8	0,6	0,2	1,2	2,6	2,1	2,6	7,6

¹⁷: In diesem Falle bezieht sich der Variationskoeffizient auf die prozentuale Abweichung des einzelnen Replikats in einem Well einer Mikrotiterplatte bezogen auf den Gesamtmittelwert aller Replikate einer Platte. Beim Auftreten des Zeichens „#DIV/0!“ wurde das Replikat aufgrund von Belegungsfehlern nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Anhang XII: MP6: Variationskoeffizienten [%] der einzelnen Replikate (Wells) der Mikrotiterplatte für die Zeitpunkte t0 und t24 zur Bestimmung von Abweichungen der Lumineszenz und optischen Dichte durch den Anwender¹⁸

MP6 OD

Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	19,2	5,2	3,1	13,7	12,1	8,8	7,3	6,0	10,8	3,3	12,1	5,1
B	0,6	17,2	4,5	15,6	6,6	4,1	30,6	8,2	13,4	5,9	22,0	5,0
C	4,3	3,8	21,6	14,6	11,6	3,7	22,6	4,6	4,8	3,3	11,5	6,1
D	15,4	14,3	11,2	10,1	6,7	4,3	9,7	9,7	4,8	6,3	10,7	9,3
E	5,4	8,9	2,8	10,9	6,3	4,6	4,0	10,4	13,5	8,2	12,2	1,5
F	8,3	1,1	18,5	1,6	2,9	14,5	4,9	11,9	13,1	8,3	12,4	9,4
G	13,9	10,4	16,9	17,1	6,9	3,4	9,3	0,3	9,1	7,0	2,3	11,8
H	15,8	11,4	6,6	7,3	2,8	15,4	9,0	14,2	18,4	18,2	4,3	17,3
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6,1	2,4	2,0	0,3	0,7	3,5	3,2	1,5	1,1	0,2	1,0	4,4
B	2,1	0,8	0,1	4,1	1,6	0,1	3,3	0,6	1,8	1,1	4,9	1,1
C	5,4	0,5	4,0	4,8	5,9	0,9	1,6	0,3	1,1	0,1	4,0	0,8
D	0,1	0,9	3,8	6,4	0,9	1,5	4,6	4,9	4,1	1,3	3,4	7,8
E	2,9	1,0	3,5	0,4	0,6	4,2	0,4	0,2	1,0	4,1	2,4	0,7
F	1,1	1,2	7,1	4,8	1,1	1,4	1,5	0,4	3,6	2,1	0,1	3,6
G	2,2	0,5	1,4	4,0	4,3	3,0	2,4	2,7	1,7	0,4	1,8	4,3
H	5,1	6,0	0,7	0,8	1,1	2,1	4,3	1,4	2,7	4,4	1,3	5,6

MP6 Lumineszenz

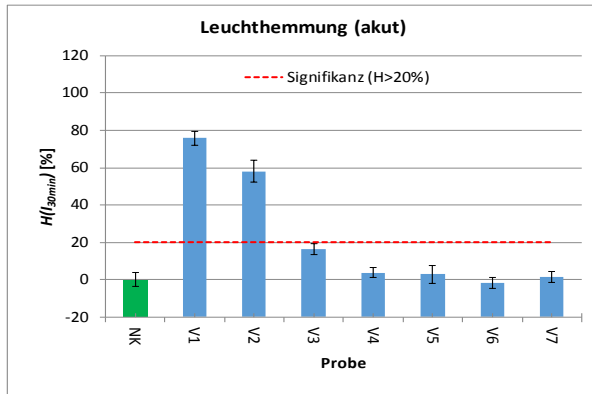
Var[%] t24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	13,3	1,6	4,1	8,0	13,4	9,6	7,6	14,4	19,5	2,5	18,8	6,5
B	11,4	5,0	16,4	1,3	4,6	5,1	2,7	1,7	5,2	2,6	8,8	2,5
C	5,2	2,0	6,4	5,7	0,9	7,7	13,1	8,9	10,9	1,8	0,7	4,3
D	6,1	1,2	3,5	4,9	6,3	5,1	7,1	7,1	1,8	5,1	6,0	3,8
E	7,9	0,5	1,2	2,3	13,5	9,3	8,9	0,3	11,8	3,9	4,7	3,6
F	7,6	4,5	4,3	2,2	5,0	0,7	0,5	0,3	12,8	6,8	14,1	8,0
G	2,1	12,4	2,2	7,9	7,4	3,7	5,9	4,5	8,2	1,0	2,2	10,9
H	6,2	0,9	4,8	2,1	14,6	4,7	2,4	8,1	1,9	10,5	1,0	6,2
Var[%] t0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,2	2,9	0,2	2,0	1,8	1,9	2,8	1,6	6,4	0,8	4,9	5,4
B	3,7	2,5	4,6	0,6	0,7	1,4	1,9	1,3	5,0	0,2	5,9	3,1
C	8,1	2,6	4,7	0,0	0,2	0,6	2,7	1,9	0,7	0,6	1,8	2,3
D	7,1	3,5	6,0	0,7	0,4	0,7	2,1	0,8	0,1	0,3	4,4	5,6
E	7,6	1,1	5,3	0,8	0,8	1,0	0,1	0,7	4,3	1,4	2,3	1,3
F	1,5	0,1	6,5	1,5	1,3	0,6	1,8	0,7	3,3	0,6	1,1	2,8
G	3,4	2,5	6,1	2,4	0,2	1,9	4,0	0,9	1,9	1,2	0,5	5,1
H	3,3	1,5	0,0	0,3	1,7	0,4	0,7	0,3	1,6	1,2	1,6	6,6

¹⁸: In diesem Falle bezieht sich der Variationskoeffizient auf die prozentuale Abweichung des einzelnen Replikats in einem Well einer Mikrotiterplatte bezogen auf den Gesamtmittelwert aller Replikate einer Platte. Beim Auftreten des Zeichens „#DIV/0!“ wurde das Replikat aufgrund von Belegungsfehlern nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Anhang XIII 3,5 – DCP Test mit NM Nr. 5 (15 FTU)

<u>Testansatz</u>			
Ansatz	Probenbezeichnung	Proben-Verdünnung [mg/l]	Test-Verdünnung [mg/l]
V1	NM Nr. 5 mit 3,5- DCP (15 FTU)	18,00	9,00
V2	NM Nr. 5 mit 3,5- DCP (15 FTU)	12,00	6,00
V3	NM Nr. 5 mit 3,5- DCP (15 FTU)	8,00	4,00
V4	NM Nr. 5 mit 3,5- DCP (15 FTU)	5,33	2,67
V5	NM Nr. 5 mit 3,5- DCP (15 FTU)	3,56	1,78
V6	NM Nr. 5 mit 3,5- DCP (15 FTU)	2,37	1,19
V7	NM Nr. 5 mit 3,5- DCP (15 FTU)	1,58	0,79

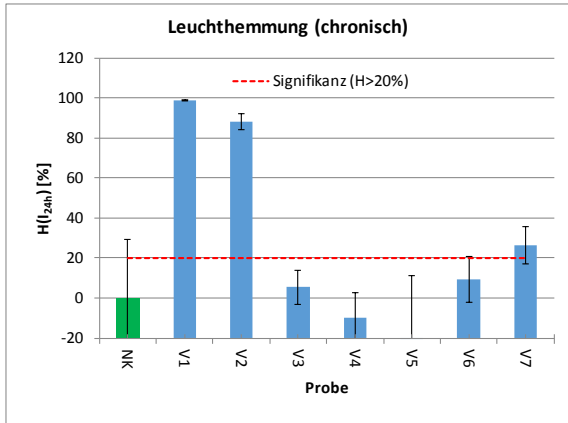
Modifizierter Leuchtbakterientest - Leuchthemmung (akut)



Korrekturfaktor (KF)	VarK (KF) [%]
1,81	3,73
Gültigkeitskriterien	
KF liegt zwischen 0,6 und 1,3	nicht valide
PKI: 20-80% Hemmung	20,#BEZUG
VarK (KF) < 3%	nicht valide
Variabilität Proben < 3%-Punkte	nicht valide
I _A	Anfangsleuchten
I _{30min}	Leuchtintensität nach 30 min
KI _A	korrigiertes Anfangsleuchten
H(I _{30min})	Leuchthemmung nach 30 min
KF	Korrekturfaktor

Testansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	I _A [RLU]	I _{30min} [RLU]	KI _A [RLU]	H(I _{30min}) [%]	Mittelwert H(I _{30min}) [%]	SD [%-Punkte]
NK	Negativkontrolle	1	480363 475843 560877 561038 551168 560767 566211 573630	925672 888417 1026489 1036198 989354 984535 972243 1015251	871188 862990 1017208 1017500 999600 1017009 1026882 1040337	-6,3 -2,9 -0,9 -1,8 1,0 3,2 5,3 2,4	0,0	3,7
V1	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9	551960 523260 582239 523869 557558 560411 559592 537367	250845 160472 308219 247219 237880 227202 279355 218842	1001036 948986 1055951 950091 1011189 1016363 1014878 974571	74,9 83,1 70,8 74,0 76,5 77,6 72,5 77,5	75,9	3,8
V2	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	6,00	560262 582996 498135 559008 578766 523819 552878 561965	550349 428582 316013 448098 402283 356378 436485 422493	1016093 1057323 903419 1013819 1049652 950000 1002701 1019182	45,8 59,5 65,0 55,8 61,7 62,5 56,5 58,5	58,2	5,9
V3	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	4,00	492458 567527 595676 535972 567926 563770 563696 541483	782119 878656 913044 788400 891202 812988 826628 804117	893123 1029269 1080320 972041 1029992 1022455 1022321 982035	12,4 14,6 15,5 18,9 13,5 20,5 19,1 18,1	16,6	3,0
V4	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	2,67	548265 572212 563936 544153 539275 576915 558665	983911 1037607 958761 934452 957336 980262 966205	994335 1037766 1022756 986878 978031 1046295 1013197	1,0 0,0 6,3 5,3 2,1 6,3 4,6	3,7	2,6
V5	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1,78	465400 547957 563664 576563 529478 526495 574438	756015 981387 1031844 1040257 914005 981416 974046	844051 993777 1022263 1045657 960263 954853 1041803	10,4 1,2 -0,9 0,5 4,8 -2,8 6,5	2,8	4,6
V6	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1,19	557920 569417 566589 576459 577425 550159 555445	1064718 1071858 1041340 1044663 1030381 987620 1055902	1011846 1032697 1027568 1045468 1047220 997770 1007357	-5,2 -3,8 -1,3 0,1 1,6 1,0 -4,8	-1,8	2,8
V7	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,79	580849 547475 562636 573734 578105 570313 535729	1058172 1001830 994641 989285 1000659 1015379 1004032	1053430 992902 1020398 1040526 1048453 1034321 971600	-0,5 -0,9 2,5 4,9 4,6 1,8 -3,3	1,3	3,0

Modifizierter Leuchtbakterientest - Leuchthemmung (chronisch)

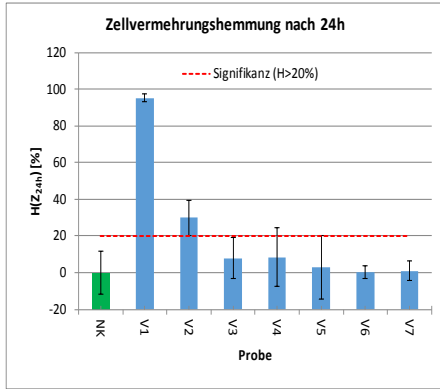


Gültigkeitskriterien	
PKII: 20-80% Hemmung	20; Hemmung
NK überschreitet nicht das Lumineszenzmaximum	31) # [LBT_3
Variabilität NK < 5%-Punkte	nicht valide
Variabilität Proben < 5%-Punkte	nicht valide

I _{24h}	Leuchtintensität nach 24h
H(I _{24h})	Leuchthemmung nach 24h

Testansätze						
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	I _{24h} [RLU]	H(I _{24h}) [%]	Mittelwert H(I _{24h}) [%]	SD [%-Punkte]
NK	Negativkontrolle	1	3043464	-64,6	0,0	29,3
			1896422	-2,6		
			1946229	-5,3		
			1390229	24,8		
			2006764	-8,5		
			1533429	17,1		
			1404548	24,0		
			1569497	15,1		
V1	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9	16467	99,1	99,0	0,2
			12062	99,3		
			22940	98,8		
			24304	98,7		
			18122	99,0		
			19055	99,0		
			22922	98,8		
			16571	99,1		
V2	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	6,00	204707	88,9	88,2	4,1
			200055	89,2		
			119591	93,5		
			191210	89,7		
			190638	89,7		
			301456	83,7		
			357641	80,7		
			175615	90,5		
V3	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	4,00	1543740	16,5	5,4	8,7
			1803150	2,5		
			1860725	-0,6		
			1561361	15,5		
			1818272	1,7		
			1670868	9,6		
			1705486	7,8		
			2022113	-9,4		
V4	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	2,67	2086429	-12,9	-9,9	12,5
			2266753	-22,6		
			1913191	-3,5		
			1983218	-7,3		
			1701350	8,0		
			2376787	-28,6		
			1892191	-2,3		
V5	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1,78	3094530	-67,4	-20,7	32,0
			1847801	0,1		
			2383720	-28,9		
			1575366	14,8		
			2076416	-12,3		
			1724138	6,7		
			2916004	-57,7		
V6	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1,19	1596353	13,7	9,4	11,5
			1612957	12,8		
			1479058	20,0		
			1708144	7,6		
			1546429	16,4		
			1653801	10,5		
			2127796	-15,1		
V7	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,79	1312733	29,0	26,1	9,3
			1712523	7,4		
			1243644	32,7		
			1273252	31,1		
			1401577	24,2		
			1197690	35,2		
			1416289	23,4		

Modifizierter Leuchtbakterientest - Zellvermehrungshemmung



Wachstumsrate und Verdopplungszeit	
bezogen auf OD	bezogen auf ZZ
Wachstumsrate	Wachstumsrate
0,108	0,100
Verdopplungszeit td	Verdopplungszeit td
6,4	6,9

Gültigkeitskriterien	
Verdopplungszeit der NK < 4h	nicht valide
PKI: 15-50% Hemmung	WENN(OD DER(aq8
Variabilität NK < 5%-Punkte	nicht valide
Variabilität Proben < 5%-Punkte	nicht valide

OD24h	Optische Dichte nach 24h
ODO	Optische Dichte nach 0h
Z24h	Zellvermehrung (OD) nach 24h
H(Z24h)	vermehrungshemmung nach
μ	wachstumsrate im Kontrollansatz
td	Verdopplungszeit im Kontrollansatz

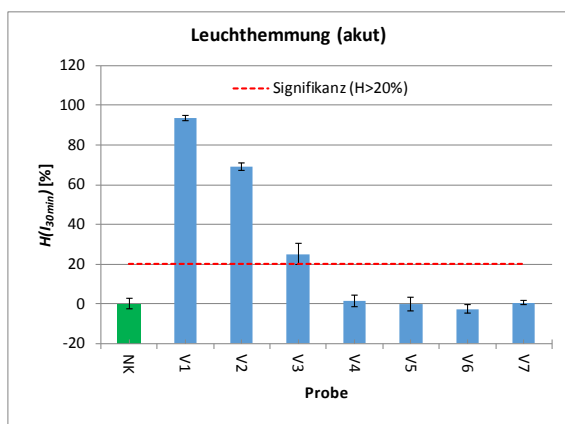
Testansätze														
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	Blank OD ₀	OD ₀	OD _{24h}	OD ₀ (-Blank)	OD _{24h} (-Blank)	ZVM(OD) 24h	ZZ0 (-Blank)	ZZ24h (-Blank)	ZVM(ZZ) 24h	H(Z24h) [%]	Mittelwert H(Z24h) [%]	SD [%-Punkte]
NK	Negativkontrolle	1	0,0383	0,0613	0,3301	0,023	0,292	0,269	4,3E+07	4,3E+08	3,8E+08	19,0		
				0,0704	0,4509	0,032	0,413	0,380	5,6E+07	6,0E+08	5,4E+08	###		
				0,0655	0,3471	0,027	0,309	0,282	4,9E+07	4,5E+08	4,0E+08	15,2		
				0,0629	0,3989	0,025	0,361	0,336	4,5E+07	5,2E+08	4,8E+08	-1,2	0,0	11,7
				0,0634	0,4066	0,025	0,368	0,343	4,6E+07	5,4E+08	4,9E+08	-3,4		
				0,0627	0,4059	0,024	0,368	0,343	4,5E+07	5,3E+08	4,9E+08	-3,4		
				0,0602	0,4308	0,022	0,392	0,371	4,1E+07	5,7E+08	5,3E+08	###		
				0,0679	0,3991	0,030	0,361	0,331	5,2E+07	5,3E+08	4,7E+08	###		
V1	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9,00	0,0381	0,0636	0,0845	0,026	0,046	0,021	4,6E+07	7,6E+07	3,0E+07	93,7		
				0,0612	0,0646	0,023	0,027	0,003	4,3E+07	4,8E+07	4,9E+06	99,0		
				0,0649	0,0880	0,027	0,050	0,023	4,8E+07	8,1E+07	3,3E+07	93,0		
				0,0616	0,0813	0,024	0,043	0,020	4,3E+07	7,1E+07	2,8E+07	94,1	95,1	2,2
				0,0604	0,0677	0,022	0,030	0,007	4,2E+07	5,2E+07	1,0E+07	97,8		
				0,0643	0,0866	0,026	0,049	0,022	4,7E+07	7,9E+07	3,2E+07	93,3		
				0,0608	0,0763	0,023	0,038	0,016	4,2E+07	6,4E+07	2,2E+07	95,3		
				0,0613	0,0781	0,023	0,040	0,017	4,3E+07	6,7E+07	2,4E+07	94,9		
V2	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	6	0,037	0,0637	0,2870	0,027	0,250	0,223	4,8E+07	3,7E+08	3,2E+08	33,2		
				0,0627	0,2844	0,026	0,248	0,222	4,7E+07	3,6E+08	3,2E+08	33,2		
				0,0602	0,2671	0,023	0,230	0,207	4,3E+07	3,4E+08	3,0E+08	37,7		
				0,0641	0,3057	0,027	0,269	0,242	4,9E+07	3,9E+08	3,5E+08	27,2	29,9	9,4
				0,0653	0,2949	0,029	0,258	0,230	5,1E+07	3,8E+08	3,3E+08	30,8		
				0,0625	0,2927	0,026	0,256	0,230	4,7E+07	3,8E+08	3,3E+08	30,6		
				0,0760	0,3721	0,039	0,335	0,296	6,6E+07	4,9E+08	4,2E+08	10,8		
				0,0613	0,2635	0,025	0,227	0,202	4,5E+07	3,3E+08	2,9E+08	39,1		
V3	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	4	0,038	0,0602	0,3877	0,022	0,350	0,327	4,2E+07	5,1E+08	4,7E+08	1,3		
				0,0672	0,3688	0,029	0,331	0,302	5,2E+07	4,8E+08	4,3E+08	9,1		
				0,0643	0,3892	0,027	0,351	0,325	4,8E+07	5,1E+08	4,6E+08			
				0,0618	0,3288	0,024	0,291	0,267	4,4E+07	4,3E+08	3,8E+08	19,6	8,0	11,0
				0,0661	0,3677	0,028	0,330	0,302	5,0E+07	4,8E+08	4,3E+08	9,1		
				0,0617	0,3442	0,024	0,306	0,282	4,4E+07	4,5E+08	4,0E+08	14,9		
				0,0671	0,3493	0,029	0,311	0,282	5,2E+07	4,5E+08	4,0E+08	15,0		
				0,0630	0,4382	0,025	0,400	0,375	4,6E+07	5,8E+08	5,4E+08	###		
V4	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	2 2/3	0,037	0,0620	0,2767	0,025	0,240	0,215	4,5E+07	3,5E+08	3,1E+08	35,3		
				0,0646	0,4270	0,028	0,390	0,362	4,9E+07	5,7E+08	5,2E+08	-9,2		
				0,0653	0,3914	0,028	0,354	0,326	5,0E+07	5,2E+08	4,7E+08			
				0,0627	0,3988	0,026	0,362	0,336	4,7E+07	5,3E+08	4,8E+08	-1,3	8,4	16,0
				0,0626	0,3410	0,026	0,304	0,278	4,6E+07	4,4E+08	4,0E+08	16,1		
				0,0642	0,3984	0,027	0,361	0,334	4,9E+07	5,3E+08	4,8E+08	-0,7		
				0,0635	0,3614	0,027	0,324	0,298	4,8E+07	4,7E+08	4,3E+08	10,2		
				0,1119	0,4924	0,075	0,456	0,380	1,2E+08	6,6E+08	5,4E+08	###		
V5	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1 7/9	0,037	0,0633	0,2815	0,027	0,245	0,218	4,8E+07	3,6E+08	3,1E+08	34,3		
				0,0637	0,4078	0,027	0,371	0,344	4,9E+07	5,4E+08	4,9E+08	-3,7		
				0,0631	0,3722	0,027	0,336	0,309	4,8E+07	4,9E+08	4,4E+08		3,0	17,5
				0,0628	0,4011	0,026	0,365	0,338	4,7E+07	5,3E+08	4,8E+08	-1,9		
				0,0624	0,3576	0,026	0,321	0,295	4,7E+07	4,7E+08	4,2E+08	11,1		
				0,0658	0,4218	0,029	0,385	0,356	5,2E+07	5,6E+08	5,1E+08	-7,3		
				0,0634	0,3770	0,028	0,342	0,314	5,0E+07	5,0E+08	4,5E+08	5,5		
				0,0639	0,4021	0,029	0,367	0,338	5,1E+07	5,3E+08	4,8E+08	-1,9		
V6	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1 5/27	0,035	0,0624	0,4041	0,027	0,369	0,342	4,9E+07	5,4E+08	4,9E+08	-3,0		
				0,0635	0,3835	0,028	0,348	0,320	5,0E+07	5,1E+08	4,6E+08	3,6	0,3	3,4
				0,0628	0,4135	0,028	0,378	0,351	4,9E+07	5,5E+08	5,0E+08			
				0,0630	0,3981	0,028	0,363	0,335	5,0E+07	5,3E+08	4,8E+08	-1,0		
				0,0638	0,4011	0,029	0,366	0,337	5,1E+07	5,3E+08	4,8E+08	-1,6		
				0,0663	0,4139	0,031	0,379	0,348	5,4E+07	5,5E+08	5,0E+08	-4,7		
				0,0667	0,4106	0,031	0,375	0,344	5,5E+07	5,5E+08	4,9E+08	-3,6		
				0,0677	0,3743	0,032	0,339	0,307	5,6E+07	4,9E+08	4,4E+08	7,6		
V7	NM Nr. 5 mit 3,5-DCP (15 FTU)	64/81	0,035	0,0610	0,3741	0,026	0,339	0,313	4,7E+07	4,9E+08	4,5E+08	5,7		5,2
				0,0642	0,3843	0,029	0,349	0,320	5,1E+07	5,1E+08	4,6E+08	3,6		
				0,0698	0,3712	0,035	0,336	0,301	5,9E+07	4,9E+08	4,3E+08			
				0,0672	0,4067	0,032	0,371	0,339	5,5E+07	5,4E+08	4,8E+08	-2,3		

Anhang XIV 3,5 – DCP Vollmedium (Standard SSWC, 15 FTU).

<u>Testansatz</u>			
Ansatz	Probenbezeichnung	Proben-Verdünnung	Test-Verdünnung
V1	Vollmedium NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	18,00	9,00
V2	Vollmedium NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9,00	4,50
V3	Vollmedium NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	4,50	2,25
V4	Vollmedium NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	2,25	1,13
V5	Vollmedium NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1,125	0,56
V6	Vollmedium NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,563	0,28
V7	Vollmedium NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,281	0,14

Bemerkung: In Reihe 5 wurde doppelt pipettiert, weswegen die komplette Reihe 5 nicht in die Auswertung hineingenommen wird.

Modifizierter Leuchtbakterientest - Leuchthemmung (akut)

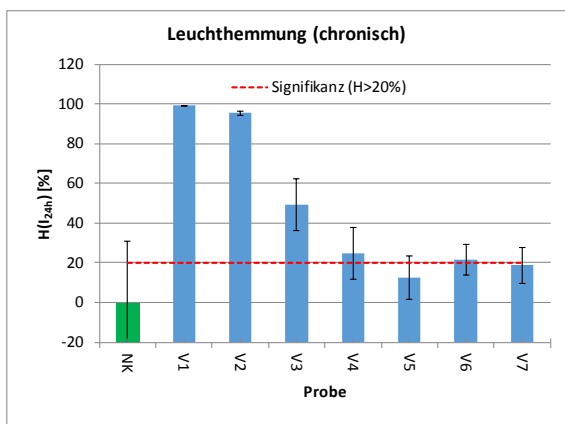


Korrekturfaktor (KF)	VarK (KF) [%]
1,34	2,64
Gültigkeitskriterien	
KF liegt zwischen 0,6 und 1,3	nicht valide
PKI: 20-80% Hemmung	20;#BEZUG
VarK (KF) < 3%	valide
Variabilität Proben < 3%-Punkte	nicht valide

I_A	Anfangsleuchten
I_{30min}	Leuchtintensität nach 30 min
KI_A	korrigiertes Anfangsleuchten
$H(I_{30min})$	Leuchthemmung nach 30 min
KF	Korrekturfaktor

Testansätze								
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	I_A [RLU]	I_{30min} [RLU]	KI_A [RLU]	$H(I_{30min})$ [%]	Mittelwert $H(I_{30min})$ [%]	SD [%-Punkte]
NK	Negativkontrolle	1	497310 516585 531418 507091 458716 517084 541611 469380	672611 702442 716714 690656 619959 707193 680957 631990	668002 693892 713817 681140 616161 694563 727508 630485	-0,7 -1,2 -0,4 -1,4 -0,6 -1,8 6,4 -0,2	0,0	2,6
V1	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9	495843 478102 491402 497177 487009 459288 493536 468386	35707 36610 39744 45831 40377 27851 51533 58626	666031 642201 660066 667823 654165 616929 662932 629150	94,6 94,3 94,0 93,1 93,8 95,5 92,2 90,7	93,5	1,5
V2	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	4,50	518042 497562 475003 509191 510820 520111 459752 456955	37745 209732 188316 213899 221949 201067 182898 208709	695849 668340 638038 683961 686149 698629 617553 613796	68,6 70,5 68,7 67,7 71,2 70,4 66,0	69,0	1,8
V3	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	2,25	511797 498460 504559 477548 539261 514382 515226 400412	544556 517181 208411 489384 534453 547914 516114 344335	687461 669546 677739 641457 724351 690933 692067 537845	20,8 22,8 23,7 26,2 20,7 25,4 36,0	25,1	5,2
V4	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1,13	508943 514824 504455 484386 492875 500867 433374	688326 684527 517027 652640 616635 661519 582243	683627 691527 677599 650642 662044 672779 582121	-0,7 1,0 -0,3 6,9 1,7 0,0	1,4	2,8
V5	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,56	528528 507061 495187 524546 494683 457255 416709	736014 701186 664816 712254 666203 576552 566627	709935 681099 665150 704586 664473 614199 559736	-3,7 -2,9 0,1 -0,3 6,1 -1,2	-0,3	3,5
V6	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,28	512390 533905 499937 516201 536019 460288 504296	720795 746326 695470 691687 685716 620292 698467	688258 717157 671530 693377 719997 618273 677385	-4,7 -4,1 -3,6 0,2 -0,3 -3,1	-2,6	2,1
V7	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,14	510375 489023 513840 512390 495925 514734 539732	694327 655583 685524 684144 654455 630804 713536	685551 656870 690205 688258 666141 691406 724984	-1,3 0,2 0,7 0,6 1,8 1,6	0,6	1,1

Modifizierter Leuchtbakterientest - Leuchthemmung (chronisch)

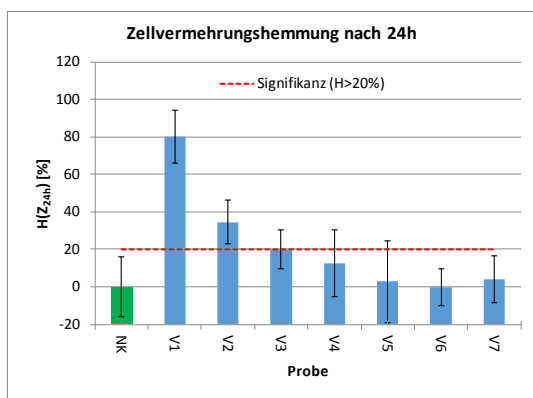


Gültigkeitskriterien	
PKI: 20-80% Hemmung	20;Hemmung
NK überschreitet nicht das Lumineszenzmaximum	31)#[LBT_3
Variabilität NK < 5%-Punkte	nicht valide
Variabilität Proben < 5%-Punkte	nicht valide

I_{24h}	Leuchtintensität nach 24h
$H(I_{24h})$	Leuchthemmung nach 24h

Testansätze						
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	I_{24h} [RLU]	$H(I_{24h})$ [%]	Mittelwert $H(I_{24h})$ [%]	SD [%-Punkte]
NK	Negativkontrolle	1	1436691 1131323 919368 810680 659518 689294 716754 693135	-62,9 -28,3 -4,2 8,1 25,2 21,9 18,7 21,4	0,0	31,1
V1	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9	5564 5367 8256 8440 7473 5926 8318 6807	99,4 99,4 99,1 99,0 99,2 99,3 99,1 99,2	99,2	0,1
V2	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	4,50	5656 37821 41215 35941 43023 41987 24837 53620	95,7 95,3 95,9 95,1 95,2 97,2 93,9	95,5	1,0
V3	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	2,25	420637 519891 22426 624990 380612 468866 454338 255354	52,3 41,1 29,1 56,9 46,8 48,5 71,1	49,4	13,0
V4	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1,13	721082 674569 235813 676062 769086 693264 439658	18,3 23,5 23,4 12,8 21,4 50,2	24,9	13,0
V5	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,56	705045 792837 767525 410814 754603 948198 670639	20,1 10,1 13,0 14,5 -7,5 24,0	12,4	10,9
V6	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,28	716415 631327 692663 655097 544580 816169 649012	18,8 28,4 21,5 25,7 7,5 26,4	21,4	7,7
V7	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	0,14	762540 660871 588734 725527 744160 532407 817488	13,6 25,1 33,3 17,7 15,6 7,3	18,8	9,2

Modifizierter Leuchtbakterientest - Zellvermehrungshemmung



Wachstumsrate μ [h ⁻¹]	Verdopplungszeit t_d
0,113	6,1

Gültigkeitskriterien	
Verdopplungszeit der NK < 4h	nicht valide
PKI: 15-50% Hemmung	nicht valide
Variabilität NK < 5%-Punkte	nicht valide
Variabilität Proben < 5%-Punkte	nicht valide

OD_{24h}	Optische Dichte nach 24h
OD₀	Optische Dichte nach 0h
Z_{24h}	Zellvermehrung (dOD) nach 24h
H(Z_{24h})	Zellvermehrungshemmung nach 24h
μ	Wachstumsrate im Kontrollansatz
t_d	Verdopplungszeit im Kontrollansatz

Testansätze											
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	Blank OD ₀	OD ₀	OD _{24h}	OD ₀ (-Blank)	OD _{24h} (-Blank)	Z _{24h}	H(Z _{24h}) [%]	Mittelwert H(Z _{24h}) [%]	SD [%-Punkte]
NK	Negativkontrolle	1	0,0371	0,0615	0,3461	0,024	0,309	0,285	21,5	0,0	15,8
				0,0634	0,4403	0,026	0,403	0,377	-3,9		
				0,0672	0,3290	0,030	0,292	0,262	27,8		
				0,0611	0,4330	0,024	0,396	0,372	-2,5		
				0,0595	0,4727	0,022	0,436	0,413	-13,9		
				0,0609	0,4699	0,024	0,433	0,409	-12,8		
				0,0611	0,4586	0,024	0,421	0,398	-9,6		
				0,0599	0,4467	0,023	0,410	0,387	-6,641		
V1	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9,00	0,0365	0,0623	0,1173	0,026	0,081	0,055	84,8	80,3	14,1
				0,0602	0,0895	0,024	0,053	0,029	91,9		
				0,0600	0,1162	0,024	0,080	0,056	84,5		
				0,0637	0,0991	0,027	0,063	0,035	90,2		
				0,0602	0,1102	0,024	0,074	0,050	86,2		
				0,0597	0,1515	0,023	0,115	0,092	74,7		
				0,0600	0,1249	0,024	0,088	0,065	82,1		
				0,0585	0,2480	0,022	0,212	0,189	47,8		
V2	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	4 1/2	0,037	0,0773	0,1006	0,040	0,064	0,023	39,3	34,6	11,6
				0,0600	0,2802	0,023	0,243	0,220	48,6		
				0,0607	0,2470	0,024	0,210	0,186	36,3		
				0,0618	0,2929	0,025	0,256	0,231	35,9		
				0,0603	0,2928	0,023	0,256	0,233	35,9		
				0,0598	0,2911	0,023	0,254	0,231	36,2		
				0,0605	0,2961	0,024	0,259	0,236	35,0		
				0,0579	0,3825	0,021	0,346	0,325	10,5		
V3	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	2 1/4	0,038	0,0631	0,3697	0,025	0,332	0,307	15,5	20,0	10,4
				0,0606	0,3612	0,023	0,323	0,301	17,1		
				0,0604	0,2140	0,022	0,176	0,154	40,9		
				0,0662	0,2806	0,028	0,243	0,214	23,3		
				0,0632	0,3413	0,025	0,303	0,278	13,6		
				0,0610	0,3744	0,023	0,336	0,313	21,3		
				0,0602	0,3457	0,022	0,308	0,285	8,6		
				0,0601	0,3917	0,022	0,354	0,332	23,2		
V4	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	1 1/8	0,037	0,0626	0,3411	0,026	0,305	0,279	23,2	12,4	17,7
				0,0624	0,4884	0,026	0,452	0,426	-17,4		
				0,0607	0,2497	0,024	0,213	0,189	28,4		
				0,0609	0,3205	0,024	0,284	0,260	27,7		
				0,0684	0,3308	0,032	0,294	0,262	7,6		
				0,0607	0,3960	0,024	0,359	0,335	5,0		
				0,0574	0,4018	0,021	0,365	0,344	10,5		
				0,0631	0,3877	0,025	0,350	0,325	3,9		
V5	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9/16	0,038	0,0611	0,4096	0,023	0,372	0,348	3,9	2,7	21,7
				0,0625	0,5344	0,025	0,497	0,472	-30,1		
				0,0611	0,2950	0,023	0,257	0,234	-1,1		
				0,0605	0,4271	0,023	0,389	0,367	36,9		
				0,0620	0,2909	0,024	0,253	0,229	-3,9		
				0,0570	0,4337	0,019	0,396	0,377	14,9		
				0,0634	0,3719	0,026	0,334	0,308	1,7		
				0,0625	0,4189	0,025	0,381	0,356	1,7		
V6	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9/32	0,038	0,0601	0,4168	0,023	0,379	0,357	1,7	0,0	9,9
				0,0620	0,4779	0,024	0,440	0,416	-14,7		
				0,0602	0,3136	0,023	0,276	0,253	2,4		
				0,0587	0,4127	0,021	0,375	0,354	-6,3		
				0,0634	0,4489	0,026	0,411	0,386	8,6		
				0,0618	0,3933	0,020	0,351	0,331	-4,2		
				0,0647	0,4428	0,023	0,401	0,378	-0,3		
				0,0620	0,4257	0,020	0,384	0,364	-0,9		
V7	NM Nr. 8 mit 3,5-DCP (15 FTU)	9/64	0,042	0,0608	0,4266	0,019	0,385	0,366	-0,3	4,1	12,6
				0,0627	0,4486	0,021	0,407	0,386	-6,4		
				0,0698	0,3712	0,028	0,329	0,301	27,7		
				0,0665	0,3289	0,025	0,287	0,262			

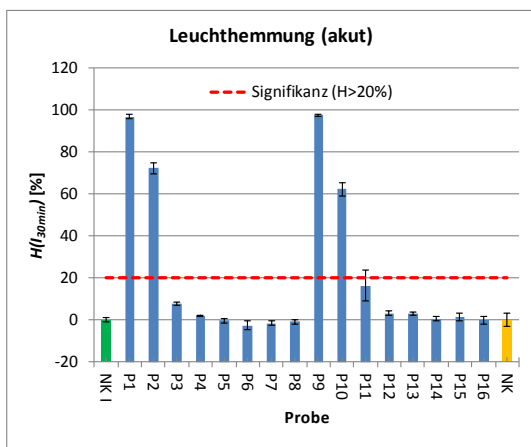
**Anhang XV
FTU)**

3,5 – DCP NM Nr. 5 und Vollmedium (Standard SSWC) (20

Testansatz

Ansatz	Probenbezeichnung	Proben- Verdünnung	Test- Verdünnung
P1	NM Nr. 5 (20 FTU)	18,00	9,00
P2	NM Nr. 5 (20 FTU)	9,00	4,50
P3	NM Nr. 5 (20 FTU)	4,50	2,25
P4	NM Nr. 5 (20 FTU)	2,25	1,13
P5	NM Nr. 5 (20 FTU)	1,125	0,56
P6	NM Nr. 5 (20 FTU)	0,563	0,28
P7	NM Nr. 5 (20 FTU)	0,281	0,14
P8	NM Nr. 5 (20 FTU)	0,141	0,07
P9	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	18,00	9,00
P10	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	9,00	4,50
P11	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	4,50	2,25
P12	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	2,25	1,13
P13	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	1,13	0,56
P14	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	0,56	0,28
P15	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	0,28	0,14
P16	Vollmedium NM Nr. 8 (20 FTU)	0,14	0,07

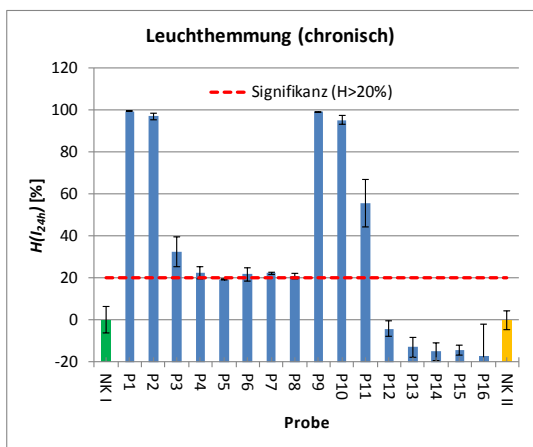
Modifizierter Leuchtbakterientest - Leuchthemmung (akut)



	Korrekturfakt0nacr	VarK (KF) [%]
NM5	1,20	0,92
NM 8	1,30	3,11
Gültigkeitskriterien		
KF liegt zwischen 0,6 und 1,3	valide	
PKI: 20-80% Hemmung	20;K80>80)	
VarK (KF) < 3%	nicht valide	
Variabilität Proben < 3%-Punkte	nicht valide	
I _A	Anfangsleuchten	
I _{30min}	Leuchtintensität nach 30 min	
KI _A	korrigiertes Anfangsleuchten	
H(I _{30min})	Leuchthemmung nach 30 min	
KF	Korrekturfakt0nacr	

Testansätze								
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	I _A [RLU]	I _{30min} [RLU]	KI _A [RLU]	H(I _{30min}) [%]	Mittelwert H(I _{30min}) [%]	SD [%-Punkte]
NK I	Negativkontrolle NM 1	1	401895	487266	483893	-0,7	0,0	0,9
			524074	637624	631000	-1,0		
			448918	538817	540510	0,3		
			507491	608644	611033	0,4		
			400829	484701	482609	-0,4		
			447510	530860	538814	1,5		
P1	NM Nr. 5 (20 FTU)	9	368542	9847	443735	97,8	96,8	1,0
			449570	17293	541295	96,8		
			468999	23550	564688	95,8		
P2	NM Nr. 5 (20 FTU)	4 1/2	312695	92643	376493	75,4	72,4	2,6
			422451	147022	508643	71,1		
			439754	155120	529476	70,7		
P3	NM Nr. 5 (20 FTU)	2 1/4	451100	496992	543137	8,5	7,8	1,0
			499199	561280	601049	6,6		
			520357	575509	626524	8,1		
P4	NM Nr. 5 (20 FTU)	1 1/8	472533	560838	568943	1,4	2,0	0,5
			525689	618181	632944	2,3		
			525344	619188	632529	2,1		
P5	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/16	486123	592178	585305	-1,2	-0,3	1,0
			520308	629738	626465	-0,5		
			520662	622073	626891	0,8		
P6	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/32	504467	637076	607392	-4,9	-2,5	2,1
			530379	644930	638591	-1,0		
			529516	648732	637552	-1,8		
P7	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/64	496818	613248	598183	-2,5	-1,5	0,9
			527035	641915	634565	-1,2		
			520203	631037	626339	-0,8		
P8	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/128	506674	609436	610049	0,1	-0,8	0,9
			506413	615401	609735	-0,9		
			510394	624955	614528	-1,7		
P9	NM Nr. 8 (20 FTU)	9	415747	12243	540398	97,7	97,6	0,5
			435833	17017	566506	97,0		
			403884	10905	524978	97,9		
P10	NM Nr. 8 (20 FTU)	4 1/2	411485	208757	534858	61,0	62,3	3,0
			425832	220644	553507	60,1		
			341507	152084	443899,0	65,7		
P11	NM Nr. 8 (20 FTU)	2 1/4	414343	479163	538573	11,0	16,4	7,2
			381545	428321	495941	13,6		
			317738	311771	413003,5	24,5		
P12	NM Nr. 8 (20 FTU)	1 1/8	390023	495703	506961	2,2	3,1	1,0
			387625	482782	503844	4,2		
			388847	490262	505432,7	3,0		
P13	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/16	406029	517267	527766	2,0	2,9	0,8
			413311	521012	537232	3,0		
			408816	511965	531388,9	3,7		
P14	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/32	427259	546070	555362	1,7	0,6	1,2
			395762	517994	514421	-0,7		
			394475	508791	512748,1	0,8		
P15	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/64	391777	506319	509241	0,6	1,5	1,7
			407933	512142	530241	3,4		
			379642	491464	493467,8	0,4		
P16	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/128	210838	280902	274052	-2,5	-0,3	1,9
			408826	528742	531402	0,5		
			403842	518986	524924	1,1		
NK	Negativkontrolle NM 4	1	425292	537614	552805	2,7	0,0	3,1
			331688	442607	431136	-2,7		
			431373	545160	560709	2,8		
			396854	516706	515840	-0,2		
			416791	530957	541755	2,0		
			253641	345137	329689	-4,7		

Modifizierter Leuchtbakterientest - Leuchthemmung (chronisch)

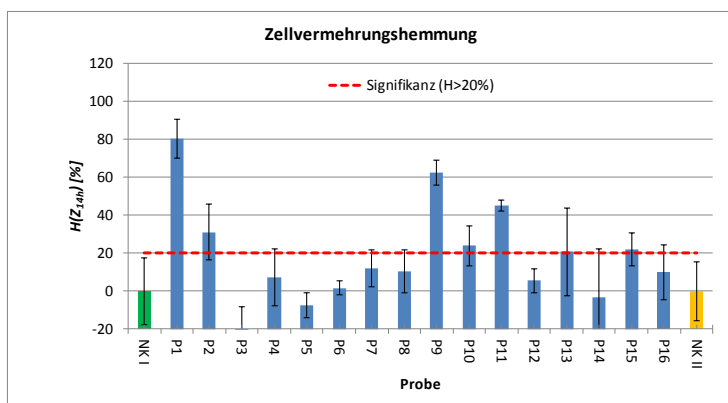


Gültigkeitskriterien	
PKII: 20-80% Hemmung	20: Hemmung
NK überschreitet nicht das Lumineszenzmaximum	#BEZUG!
Variabilität NK < 5%-Punkte	nicht valide
Variabilität Proben < 5%-Punkte	nicht valide

I _{24h}	Leuchtintensität nach 24h
H(I _{24h})	Leuchthemmung nach 24h

Testansätze						
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	I _{24h} [RLU]	H(I _{24h}) [%]	Mittelwert H(I _{24h}) [%]	SD [%-Punkte]
NK I	Negativkontrolle	1	3826125	-1,9	0,0	6,2
			3295612	12,2		
			3748557	0,2		
			3872590	-3,2		
			3909781	-4,1		
P1	NM Nr. 5 (20 FTU)	9	21898	99,4	99,4	0,0
P2	NM Nr. 5 (20 FTU)	4 1/2	40501	98,9	97,1	1,6
			140520	96,3		
			145599	96,1		
P3	NM Nr. 5 (20 FTU)	2 1/4	2394773	36,2	32,6	7,1
			2834680	24,5		
			2357924	37,2		
P4	NM Nr. 5 (20 FTU)	1 1/8	2974534	20,8	22,3	2,9
			2787962	25,7		
			2983804	20,5		
P5	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/16	3035531	19,1	19,3	0,3
			3017650	19,6		
			3038768	19,1		
P6	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/32	3074812	18,1	21,8	3,2
			2870379	23,5		
			2858728	23,9		
P7	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/64	2920004	22,2	22,4	0,5
			2891555	23,0		
			2928518	22,0		
			3021148	19,5		
P8	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/128	2972742	20,8	20,9	1,4
			2916178	22,3		
			19016	99,0		
			15901	99,2		
P9	NM Nr. 8 (20 FTU)	9	13905	99,3	99,1	0,1
			106063	94,4		
			121086	93,6		
P10	NM Nr. 8 (20 FTU)	4 1/2	43268	97,7	95,2	2,2
			975306	48,6		
			947087	50,1		
			592098	68,8		
P12	NM Nr. 8 (20 FTU)	1 1/8	2025299	-6,8	-4,1	3,7
			1894703	0,1		
			2003230	-5,6		
			2201629	-16,1		
P13	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/16	2041287	-7,7	-13,0	4,6
			2183384	-15,2		
			2262206	-19,3		
			2100169	-10,8		
P14	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/32	2181168	-15,0	-15,0	4,3
			2161348	-14,0		
			2130262	-12,3		
P15	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/64	2222500	-17,2	-14,5	2,5
			1895396	0,0		
			2478280	-30,7		
			2319209	-22,3		
P16	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/128	1938618	-2,2	-17,7	15,9
			1826259	3,7		
			1935250	-2,1		
			1937499	-2,2		
			1945906	-2,6		
			1793106	5,4		
NK II	Negativkontrolle NM 4	1	1938618	-2,2	0,0	4,5
			1826259	3,7		
			1935250	-2,1		
			1937499	-2,2		
			1945906	-2,6		

Modifizierter Leuchtbakterientest - Zellvermehrungshemmung



Wachstumsrate μ [h⁻¹]	Verdopplungszeit t_d
NKI	0,108
NKII	0,103
	6,4
	6,7
Gültigkeitskriterien	
Verdopplungszeit der NK < 4h	nicht valide
PKII: 15-50% Hemmung	nicht valide
Variabilität NK < 5%-Punkte	nicht valide
Variabilität Proben < 5%-Punkte	nicht valide
OD_{24h}	Optische Dichte nach 24h
OD₀	Optische Dichte nach 0h
Z_{24h}	Zellvermehrung (dOD) nach 24h
H(Z_{24h})	Zellvermehrungshemmung nach 24h
μ	Wachstumsrate im Kontrollansatz
t_d	Verdopplungszeit im Kontrollansatz

Testansätze											
Ansatz	Probenbezeichnung	Test-Verdünnung	Blank OD ₀	OD ₀	OD _{24h}	OD ₀ (-Blank)	OD _{24h} (-Blank)	Z _{24h}	H(Z _{24h}) [%]	Mittelwert H(Z _{24h}) [%]	SD [%-Punkte]
NK I	Negativkontrolle	1	0,0361	0,057	0,480	0,021	0,444	0,423	-25,3	0,0	17,6
				0,067	0,354	0,030	0,318	0,288	14,6		
				0,058	0,432	0,022	0,396	0,374	-10,8		
				0,067	0,340	0,031	0,304	0,273	19,1		
				0,064	0,431	0,028	0,395	0,367	-8,9		
				0,066	0,366	0,030	0,329	0,299	11,3		
P1	NM Nr. 5 (20 FTU)	9	0,0347	0,056	0,159	0,022	0,124	0,103	69,6	80,4	10,4
				0,060	0,123	0,025	0,088	0,063	81,2		
				0,061	0,093	0,026	0,058	0,032	90,4		
				0,058	0,347	0,021	0,310	0,289	14,4		
				0,064	0,279	0,028	0,243	0,215	36,2		
				0,063	0,256	0,026	0,220	0,194	42,6		
P3	NM Nr. 5 (20 FTU)	2 1/4	0,038	0,061	0,496	0,024	0,458	0,435	-28,8	-23,0	14,9
				0,064	0,516	0,026	0,478	0,452	-34,0		
				0,065	0,423	0,027	0,385	0,358	-6,1		
P4	NM Nr. 5 (20 FTU)	1 1/8	0,037	0,063	0,430	0,026	0,394	0,367	-8,9	7,0	15,0
				0,066	0,332	0,029	0,296	0,267	20,9		
				0,070	0,377	0,034	0,340	0,307	9,0		
				0,065	0,428	0,027	0,389	0,362	-7,4		
				0,065	0,406	0,027	0,368	0,341	-1,1		
				0,065	0,450	0,027	0,412	0,385	-14,1		
P6	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/32	0,036	0,065	0,390	0,029	0,354	0,325	3,5	1,5	3,7
				0,067	0,414	0,031	0,378	0,347	-2,8		
				0,066	0,391	0,030	0,355	0,325	3,6		
				0,064	0,378	0,026	0,340	0,314	6,9		
				0,075	0,392	0,037	0,354	0,317	6,0		
				0,068	0,328	0,030	0,290	0,260	23,0		
P8	NM Nr. 5 (20 FTU)	9/128	0,035	0,067	0,354	0,032	0,320	0,288	14,6	10,4	11,4
				0,067	0,340	0,033	0,305	0,273	19,1		
				0,066	0,411	0,031	0,377	0,346	-2,5		
				0,062	0,153	0,027	0,117	0,091	57,5		
				0,062	0,147	0,027	0,111	0,084	59,5		
				0,061	0,110	0,025	0,074	0,049	69,8		
P10	NM Nr. 8 (20 FTU)	4 1/2	0,036	0,060	0,304	0,024	0,268	0,243	12,3	23,9	10,7
				0,065	0,237	0,029	0,201	0,172	33,3		
				0,058	0,256	0,022	0,220	0,197	25,9		
				0,062	0,426	0,017	0,381	0,363			
				0,068	0,208	0,023	0,163	0,140	43,0		
				0,062	0,187	0,017	0,142	0,125	47,3		
P12	NM Nr. 8 (20 FTU)	1 1/8	0,036	0,063	0,375	0,028	0,339	0,311		9,8	5,5
				0,080	0,332	0,045	0,296	0,252			
				0,064	0,345	0,028	0,309	0,281	1,1		
				0,064	0,441	0,027	0,404	0,377			
				0,067	0,337	0,030	0,300	0,270	4,4		
				0,071	0,231	0,034	0,194	0,160	37,0		
P14	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/32	0,038	0,068	0,421	0,030	0,384	0,353	-20,4	-3,5	25,7
				0,068	0,266	0,031	0,228	0,197	26,0		
				0,067	0,406	0,029	0,368	0,339	-16,2		
				0,107	0,283	0,071	0,247	0,176	32,2		
				0,067	0,293	0,031	0,257	0,226	17,4		
				0,064	0,293	0,027	0,256	0,229	16,5		
P16	NM Nr. 8 (20 FTU)	9/128	0,035	0,058	0,342	0,023	0,307	0,284	0,2	10,0	14,4
				0,066	0,261	0,031	0,227	0,195	26,5		
				0,063	0,338	0,029	0,303	0,274	3,1		
NK II	Negativkontrolle NM 4	1	0,037	0,060	0,410	0,023	0,373	0,350	-19,4	0,0	15,5
				0,070	0,342	0,034	0,305	0,271	4,0		
				0,062	0,375	0,025	0,339	0,314	-8,6		
				0,067	0,261	0,031	0,225	0,194	26,9		
				0,061	0,359	0,024	0,323	0,299	-4,1		
				0,057	0,338	0,020	0,301	0,281	1,24		

Anhang XVI Arbeitsanweisung akuter und chronischer Leuchtbakterientest des Biologielabors der HAW- Hamburg

TESTPRINZIP UND ANWENDUNGSBEREICH

Es wird die Hemmung der Lichtemission und des Wachstums von *Aliivibrio fischeri* ermittelt. Hierzu werden definierte Volumina einer verdünnten oder unverdünnten Probe mit der Leuchtbakteriensuspension auf einer 96- Well Mikrotiterplatte pipettiert und über 24 h inkubiert. Das Verfahren eignet sich sowohl zur Untersuchung der akuten als auch der chronischen Toxizität. Als Endpunkte werden die akute Leuchthemmung nach 30 min, die chronische Leuchthemmung nach 24 h sowie die Hemmung der Zellvermehrung nach 24 h bestimmt.

Stark gefärbte Proben können aufgrund möglicher Interferenzen bei der Lumineszenzmessung nicht hinsichtlich der Leuchthemmung analysiert werden. Die Bestimmung der Zellvermehrungshemmung ist jedoch auch für gefärbte Proben möglich.

HINTERGRUND DES TESTS

An der Leuphana Universität Lüneburg wurde zur Erfassung der chronischen Toxizität ein „kinetischer Leuchtbakterientest“ entwickelt, der die Vorteile des herkömmlichen akuten LBT nach (DIN EN ISO 11348-2), des Zellvermehrungshemmtest nach (DIN 38412-37 : 1999) und des chronischen Leuchtbakterientests nach (Ziesenis 1995) vereinigt und zudem miniaturisiert auf 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt wird. So können neben der akuten Toxizität nach 30 Minuten auch die chronische Leuchthemmung nach 24 h sowie die Hemmung des Zellwachstums nach 14 h bestimmt werden. Der Leuchtbakterientest nach Menz et. Al wird erfolgreich angewendet und konnte die chronischen Effekte von u.a. Chloramphenicol, Streptomycin-Sulfat, und 3,4-Dichloroaniline auf *Aliivibrio fischeri* nachweisen (Menz et al. 2013).

In dieser Arbeitsanweisung wird der Leuchtbakterientest nach Menz et al. 2013 in einer modifizierten Weise durchgeführt und kann so den vorhandenen Gegebenheiten und Ansprüchen in dem Biologielabor der HAW-Hamburg genügen. Hierbei wird ebenfalls die Bestimmung der akuten Leuchthemmung, der chronischen Leuchthemmung und der Zellvermehrungshemmung in einem einzigen, miniaturisierten Testansatz ermöglicht, damit das Verfahrens zur Beurteilung der akuten und chronischen Toxizität von Reinsubstanzen und Wasserproben gegenüber *A. fischeri* herangezogen werden kann.

Anders als in dem nach Menz etabliertem LBT nach Menz et al. 2013 muss aus technischen Gegebenheiten des Plattenreaders die Messung der Zellvermehrungshemmung bei einer Wellenlänge von 610 nm statt 578 nm realisiert werden. Außerdem wird der Test nicht als kinetischer Test, sondern als akuter und chronischer Test durchgeführt. Hierfür wird die Erfassung der Daten manuell und als Endpunktmessungen und nicht als stündliche, automatisierte Messungen erfolgen. Hierdurch sollte die Anzahl der Messdaten für die Auswertung erheblich reduziert. Andererseits kann durch diese Maßnahme der Durchsatz an Tests erhöht werden, da der Plattenreader nicht die komplette Testdurchführung über belegt ist und somit parallel mehrere Mikrotiterplatten mit Proben getestet werden können.

Um die Durchführung des Tests für den Benutzer zu erleichtern, liegt nun die Endpunktmessungen der Zellvermehrungshemmung und der chronischen Leuchthemmung auf dem gleichen Zeitpunkt (24h).

Ferner ist die Kultivierung der Stammkulturen vereinfacht worden und eine Optimierung der Zusammensetzung der Nährmedien im Hinblick auf die enthaltenen Phosphatanteile erfolgt. Phosphate sind in der Lage Schwermetalle zu komplexieren und auszufällen (Herrmann 2009). Es ist möglich, dass das Risiko einer Probe im Test unterschätzt wird, wenn der Schwermetallanteil durch die im Nährmedium enthaltenen Phosphate komplexiert wird und nicht mehr oder in geringerem Maße für *A. fischeri* bioverfügbar ist und somit eine geringere Hemmwirkung auftritt.

Aus diesem Grunde wurde das Nährmedium zur Kultivierung der Bakterien dahingehend modifiziert, dass ein geringerer Phosphatanteil enthalten ist und dennoch das Wachstum und die Lumineszenz von *A. fischeri* im Vergleich zum Standardnährmedium nicht negativ beeinträchtigt wird.

MATERIAL UND METHODEN

Verwendete Geräte

- Analysenwaage (Precisa Gravimetrics AG)
- Autoklav (Systec Labor- Systemtechnik GmbH)
- Handrefraktometer (VWR International)
- Klimaschrank (Mettler)
- Kühl- /Gefrierschrank
- Laborschüttler (IKA, 200 rpm)
- Magnetrührer (IKA)
- Magnetrührstäbchen
- Mehrkanalpipette 30 - 300 µl (Thermo SCIENTIFIC)
- Metallspatel
- Metallstäbchen
- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (GELAIRE – Gelman Instrument)
- Multifunktions-Plattenreader (Tecan Group)
- pH- /Salinität-/ O₂- Messgerät (WTW GmbH)
- Pipette 0,5 - 5 ml (Thermo SCIENTIFIC)
- Pipette 100 - 1000 µl (Thermo SCIENTIFIC)
- Taschenrechner (Casio)
- Thermoschrank (WTW GmbH)
- Trockenschrank (Binder GmbH)
- Vortexer (Heidolph)

Verwendete Verbrauchsmaterialien

- Aluminiumfolie (Aromata, Neckarsalm)
- Enghals- Erlenmeyerkolben mit Zellstopfen (250ml, 50ml, steril; Schott, Mainz)
- Kryoröhrchen (steril; Carl Roth, Karlsruhe)
- Laborglasflaschen (1000ml, 500ml, 250ml; Schott, Mainz)
- Messkolben (1000ml, 250ml, 100ml, 50ml; Brand, Wertheim)
- Mikrotiter – Platten (96 Well; Ref.Nr.:655094; Greiner Bio - One, Frickenhausen)
- Pipettenspitzen (100 - 1000µl; 30 - 300µl; 0,5 - 5ml; Eppendorf, Hamburg; Thermo Scientific, Waltham)
- 8-fach-Reagenz – Reservoirs (Thermo Scientific, Waltham)
- Reagenz- Reservoirs (V-Form, Einweg; Thermo Scientific, Waltham)
- Zentrifugenröhrchen (steril) (50ml, 15 ml; VWR International, Düsseldorf)
- Selbstgebastelte Pipettierhilfe

CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Tabelle 13: Verwendete Substanzen

Substanz	CAS - Nr. / Typ	Reinheit	Hersteller
NaCl	7647-14-5	99,9 %	AnalaR Normapur, (VWR International) , Düsseldorf
HCl (1M)	7647-01-0	1 mol/l	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaOH (1M)	1310-73-2	≥ 99%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Pepton aus Casein	91079-40-2	Für Mikrobiologie	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaH₂PO₄ · H₂O	10049-21-5	≥ 98%	VWR Chemicals, Düsseldorf
MgSO₄ · 7H₂O	10034-99-8	≥ 99%	Merck, Darmstadt
(NH₄)₂HPO₄	7783-28-0	≥ 98%	VWR Chemicals, Düsseldorf
Glycerin (87%)	56-81-5	87%	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	7783-28-0	Für die Mikrobiologie	AppliChem, Darmstadt
K₂HPO₄ · 3H₂O	7758-14-4	≥ 98%	Alpha Aesar, Minderslachen

Rekonstitutionslösung

Die von Hach Lange mitgelieferte Rekonstitutionslösung entspricht dem in der DIN EN ISO 11348-2 vorgeschriebenem Nährmedium.

TESTORGANISMUS

Der Bakterienstamm *Aliivibrio fischeri* wurde in flüssiggetrockneter Form (Testkit LCK 480) von der Hach Lange GmbH aus Düsseldorf bezogen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

NÄHRMEDIEN UND LÖSUNGEN

Herstellung des modifiziertem (Phosphaat reduziertem) SSWC-Nährmediums ⁽¹⁾

Die Inhaltsstoffe werden in der angegebenen Konzentration (s. Tabelle 5) vollständig in demineralisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1M NaOH auf $7 \pm 0,2$ eingestellt. Anschließend werden je 500ml der vorbereiteten Lösung in Laborglasflaschen abgefüllt und durch Autoklavieren ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, 2 bar) sterilisiert. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank bei $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ für max. 3 Monate.

Tabelle 14: Zusammensetzung des modifizierten SSWC-Mediums

Inhaltsstoff	Konzentration [g/l]
NaCl	30,0
K₂HPO₄ · 3H₂O	2,1
MgSO₄ · 7 H₂O	0,2
Pepton aus Casein	5,0
Hefeextrakt	0,5
Glycerin [ml/l]	3,0

NaCl-Lösung (2%) ⁽²⁾

5 g NaCl wird in 250 ml Reinstwasser vollständig gelöst. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank bei $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Haltbarkeit max. 2 Wochen).

Positivkontrolle I (PK I)

Positivkontrolle II (PK II)

Infobox zu dem modifiziertem SSWC - Nährmedium

⁽¹⁾ Bei diesem Nährmedium wurde der Anteil an Phosphaten verringert um ggf. bei Proben mit Schwermetallen eine Komplexbildung zu vermeiden. Auswirkungen auf die Pufferkapazität sind noch nicht bekannt.

Ursprünglich gehörten zu dem Nährmedium noch:

5,3mg/l NaH₂PO₄
0,5 mg/l (NH₄)₂HPO₄

⁽²⁾ Durch den Ansatz entsteht eine NaCl-Konzentration von 20 g/l (2%)

Infobox Positivkontrollen

Sobald passende Konzentrationen ausgewählt worden sind, sollte hier die Vorschrift ergänzt werden.

KULTIVIERUNG DER LEUCHTBAKTERIEN (STERILE BEDINGUNGEN) ⁽¹⁾

Herstellung der Vorkultur

In einen Erlenmeyerkolben werden 50ml des modifiziertem SSWC –Nährmediums vorgelegt. Anschließend wird eine eingefrorene Stammkultur aufgetaut, im Vortexer homogenisiert, und 100µl der Bakteriensuspension in den Erlenmeyerkolben mit dem Nährmedium überführt ⁽²⁾.

Der Reinkulturansatz wird mit einem Stopfen aus Zellstoff verschlossen und unter Schütteln für 22 h inkubiert (+20 °C, 200 rpm) ⁽²⁾. Darüber hinaus werden min. 30 ml SSWC-Medium aus der Vorratsflasche in ein steriles Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bis zur Herstellung der Hauptkultur bei +4 °C gelagert.

LBT- VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Vortemperierung

Das Plattenmessgerät wird im Klimaschrank auf 15°C temperiert.

Probenvorbereitung

Es können maximal 7 Proben bzw. Verdünnungen untersucht werden. Das benötigte Probenvolumen sollte je Probe bzw. Verdünnung ungefähr 2000 µl betragen ⁽³⁾. Tiefgefrorene Proben dürfen bei max. 25 °C im Wasserbad aufgetaut werden. Testgut mit hoher Mikrobendichte (z.B. Abwasser) muss durch Filtration sterilisiert werden, bevor eine Weiterverarbeitung erfolgen kann.

Wässrige Proben

Alle zu testenden Proben werden auf eine NaCl-Konzentration von 20 g/l (2%) eingestellt. Der pH-Wert wird überprüft und ggf. auf $7 \pm 0,2$ korrigiert. Liegt der pH-Wert zwischen 6,0 und 8,5 ist keine Korrektur notwendig. Zur Bestimmung der niedrigsten ineffektiven Verdünnung einer Probe (G L -Wert bzw. LID-Wert) muss ggf. mit NaCl-Lösung (2%) eine geometrische Verdünnungsreihe vorbereitet werden.

Infobox Herstellung der Vorkultur:

⁽¹⁾ Die Arbeitsschritte erfolgen mithilfe der Sicherheitswerkbank, unter sterilen Bedingungen um eine Kontamination durch andere Bakterien und Schimmelpilze zu verhindern.

Im Test selber kann auf steriles Arbeiten verzichtet werden.

⁽²⁾ Nach dem Auftauen muss die Bakteriensuspension durch leichtes Schwenken oder Schütteln durch den Vortexer homogenisiert werden, da sich die Bakterien am Boden des Kryoröhrchens absetzen können.

⁽²⁾ Anders als im Test selbst erfolgt die Inkubierung bei 20°C, da dadurch schneller eine hohe Zelldichte erreicht wird. Bei 15°C müsste man die Vorkultur wesentlich länger wachsen lassen. Durch das Schütteln wächst die Kultur wesentlich besser, da die Bakterien und Nährstoffe im gesamten Kolben verteilt vorkommen und nicht hauptsächlich als Bodensatz, wo ein Platz- und Nährstoffmangel entstehen könnte.

Infobox Probenvorbereitung

⁽³⁾ Die 2000µl Probenvolumen pro Verdünnung bestimmen sich wie folgt:

	7 bis	8 x 100µl VX
+		4 x 100µl B VX
+		ca. 800 µl

um zu berücksichtigen, dass der Bodensatz sich schlecht aus den Mehrkanal- Reservoirs pipettieren lässt. Dadurch wird ein bequemes pipettieren möglich.

Reinsubstanzen

Beim Testen von Reinsubstanzen wird zunächst eine definierte Einwaage der Testsubstanz in einem definierten Volumen Reinstwasser vollständig gelöst ⁽¹⁾.

Anschließend wird diese Stammlösung auf eine NaCl-Konzentration von 20 g/l (2%) eingestellt. Der pH-Wert muss überprüft und ggf. auf $7 \pm 0,2$ korrigiert werden. Liegt der pH-Wert zwischen 6,0 und 8,5 ist keine Korrektur notwendig.

Anschließend wird ausgehend von der Stammlösung mit NaCl-Lösung (2%) eine Verdünnungsreihe angesetzt.

Vorbereitung der Reagenz-Reservoirs

In die Pipettierhilfe (siehe Abbildung 15: Pipettierhilfe zur einfacheren Belegung der Mikrotiterplatte) werden auf die aufgeklebten Mehrkanal-Reservoirs zwei weitere gesteckt. Vor dem Zusammenstecken muss an einem der Reservoirs ein „Kanal“ abgeschnitten werden, sodass die beiden Reservoirs überlappen. Wichtig ist hierbei, dass die Kanäle der beiden Reservoirs so eng beieinander liegen, dass beim Eintauchen der Mehrkanalpipette nicht zwei Pipettenspitzen in denselben Kanal gelangen, sondern in nebeneinanderliegende Kanäle.

Die Proben werden der Reihenfolge des Belegungsschemas entsprechend (s. Abbildung 2) in die Mehrkanal-Reservoirs vorgelegt (NK und V1 bis V7). Hierbei darf das zur Verfügung stehende Probenvolumen pro Kanal nicht weniger als 600 µl betragen. Die Reagenz-Reservoirs werden bis zur Probenzugabe mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Vortemperierung der Referenzlösungen und Proben

Es muss spätestens 30 min vor Beginn der Messung mit der Vortemperierung begonnen werden. Für den Kontrollansatz werden ca. 15 ml NaCl-Lösung (2%) aus dem Vorratsgefäß in ein Einkanal-Reservoir überführt. Dieses wird anschließend gemeinsam mit den Positivkontrollen (PK I, PK II) und den Proben (Reagenz-Reservoirs) bis zur Verwendung im Weinschrank auf +15 °C vortemperiert.

Infobox Reinsubstanzen:

(1) Hierbei gilt es für den Test geeignete Konzentrationen zu wählen. Sind keine Vorkenntnisse über Effektkonzentrationen vorhanden empfiehlt es sich in einem Vortest einen großen Konzentrationsbereich abzudecken und diesen in Folgetests weiter einzuengen. Bei der Planung der Verdünnungsreihe unbedingt beachten, dass im Ansatz aufgrund der Testvorschrift unvermeidbar eine Verdünnung der Probe im Verhältnis 1:2 erfolgt.



Abbildung 15: Pipettierhilfe zur einfacheren Belegung der Mikrotiterplatte



Abbildung 16: Belegungsschema für die Pipettierhilfe

Herstellung der Hauptkultur

Für die Herstellung der Hauptkultur wird das am Vortag abgefüllte SSWC-Medium verwendet ⁽¹⁾. Die Trübung der Vorkultur wird nach 22 h Inkubation am Plattenlesegerät mit Hilfe der Absorptionsfunktion (OD_{610nm}) bestimmt ⁽²⁾.

Hierzu wird pro Well 200µl von der Vorkultur hineingegeben. Als Referenz (Blank) dient stets SSWC-Medium. Jeweils 3 Replikate von der Vorkultur und SSWC – Medium sind ausreichend. Nach der Messung wird der Mittelwert der Vorkultur gebildet und mit dem des Blindwertes abgezogen ⁽³⁾.

Anschließend soll in einem Reagenzröhrchen die Vorkultur mit SSWC-Medium verdünnt werden, sodass bei einem Gesamtvolumen von 25 ml eine optische Dichte von ca. 15 FTU (OD_{610nm} ca. 0,0427) vorliegt ⁽⁴⁾. Das zuzugebende Volumen der Vorkultur zur Herstellung der Hauptkultur wird anhand der Gleichung 1 berechnet.

$$V_{VK} = 0,0427 \cdot 25 \text{ ml} / OD_{VK} \quad (1)$$

V_{VK} Volumen der Vorkultur in ml

OD_{VK} Optische Dichte der Vorkultur in FTU

Infobox Herstellung der Hauptkultur

⁽¹⁾ Es ist praktischer, dass SSWC-Medium am Vortag von der 500ml Vorratsflasche in ein steriles Zentrifugenröhrchen umzufüllen und vermeidet zusätzlich eine Kontamination der großen Vorratsflasche.

⁽²⁾ Unter.... C:// ... befindet sich ein Messskript.

⁽³⁾ Bei Überschreitung des linearen Messbereichs ($OD_{610nm} > 0,7$) muss die Probe mit SSWC-Medium im Verhältnis 1:10 verdünnt und anschließend der gemessene Wert mit dem Faktor 10 multipliziert werden. Die Trübung der Vorkultur nach 22 h Inkubation sollte mindestens 550FTU betragen. Dies entspricht einer $OD_{610nm} = 0,31$.

⁽⁴⁾ Im Test selber wird die Hauptkultur 1:2 verdünnt, sodass rechnerisch eine Startdichte OD_{610nm} von ca. 0,02135 vorliegen sollte. (Meist ist die OD jedoch höher... vermutlich da die Bakterien weiterwachsen und NaCl auch trüb ist).

Nachdem durch Verdünnung der Vorkultur mit SSWC-Medium ein Gesamtvolumen von 25 ml eingestellt wird, wird die OD_{610nm} der Hauptkultur erneut gemessen und notiert. Die OD_{610nm} der Hauptkultur soll im Bereich von $0,0427 \pm 0,003$ liegen.

Präparieren der Mikrotiterplatte und Starten der Messung
Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze ist in Tabelle 15: Zusammensetzung der Referenz-, Kontroll-, und Testansätze dargestellt.

Das SSWC-Medium und die Hauptkultur werden entsprechend dem Belegungsschema (Abbildung 17: Schema zur Belegung der Mikrotiterplatte) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte vorgelegt.

Die Reihenfolge bei der Belegung:

- SSWC in die Blindwerte (BK) und Blindproben (B VX) geben.
- Hauptkultur auf die Wells für Negativkontrollen (NK) und Verdünnungen (VX) geben.

Anschließend wird die Platte mit Deckel für 30 Minuten⁽¹⁾ im Weinschrank bei 15°C inkubiert.

Im Plattenreader wird nun das Skript ausgeführt und die Startmessung $t_{0(I)}$ durchgeführt⁽²⁾.

Anschließend werden sofort die Proben, NaCl und Referenzsubstanzen nach dem Pipettierschema hinzugefügt.⁽³⁾

- NaCl in die Blindwerte (BK)
- Verdünnungen bzw. Proben (VX und B VX)⁽⁴⁾
- Positivkontrollen (PK I und PK II)

Sofort nach der Zugabe erfolgt eine weitere Messung⁽⁵⁾ ($t_{0(OD)}$).

Bis zur Messung nach 30 Minuten wird die Mikrotiterplatte geschüttelt.

30 Minuten nach dem Pipettieren der Proben wird erneut eine Messung für den akuten Test durchgeführt ($t_{0,5}$).

Nach der Messung wird die Mikrotiterplatte in Alufolie⁽⁶⁾ und anschließend in eine dafür vorgesehene Plastiktüte⁽⁷⁾ gewickelt und auf dem Schüttler bei 200rpm, 15 °C inkubiert.

Nach 24h erfolgt die Messung für die chronische Leuchthemmung und die Zellvermehrungshemmung (t_{24}).

Infobox Präparieren der Mikrotiterplatte und Starten der Messung:

(1) Die 30 Minuten Inkubationszeit sind notwendig, damit sich das Leuchten der Bakterien nach dem Pipettieren wieder stabilisiert.

(2) Bei der Startmessung wird im Prinzip nur das Anfangsleuchten I_0 benötigt. Da es jedoch immer der gleiche Messvorgang ablaufen soll, wird bei jeder Messung sowohl die Lumineszenz als auch die optische Dichte gemessen.

(3) Das Präparieren der Mikrotiterplatte muss besonders zügig durchgeführt werden, um Artefakte aufgrund zu großer zeitlicher Differenzen zu vermeiden.

(4) Die 30 Min. beginnen beim Pipettieren der ersten Probe (VX).

(5) Bei der 2. Messung nach der Probenzugabe wird folglich nur die OD benötigt. Die OD ist abhängig von der Schichtdicke, daher müssen stets 200µl Endvolumen nach Probenzugabe vorliegen.

(6) Die Alufolie soll vor Lichteinflüssen schützen.

(7) Die Plastiktüte soll die Verdunstung der Probe über die 24h vermindern.

Plattenlayout												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B V1	BK	BK	B V1	B V2	B V3	B V4	B V5	B V6	B V7	BK	BK
B	B V2	NK	V6	V4	V2	V1	V7	V5	V3	NK	V6	B V1
C	B V3	V1	V7	V5	V3	V2	NK	V6	V4	V1	V7	B V2
D	B V4	V2	NK	V6	V4	V3	V1	V7	V5	V2	NK	B V3
E	B V5	V3	V1	V7	V5	V4	V2	NK	V6	V3	V1	B V4
F	B V6	V4	V2	NK	V6	V5	V3	V1	V7	V4	V2	B V5
G	B V7	V5	V3	V1	V7	V6	V4	V2	NK	V5	V3	B V6
H	BK	BK	B V1	B V2	B V3	B V4	B V5	B V6	B V7	BK	BK	B V7

Abbildung 17: Schema zur Belegung der Mikrotiterplatte

Tabelle 15: Zusammensetzung der Referenz-, Kontroll-, und Testansätze

Ansatz	Bezeichnung	Zugabe von (jeweils 100µl)					
		1. SSWC - Medium	2. Hauptkultur	3. PK I	4. PK II	5. NaCl-Lsg.	6. Verdünnung bzw. Probe X
BK	Blindwert NK/PK	+	-	-	-	+	-
B VX	Blindwert V X	+	-	-	-	-	+
PK I	Positivkontrolle I	-	+	+	-	-	-
PK II	Positivkontrolle II	-	+	-	+	-	-
NK	Negativkontroll e	-	+	-	-	+	-
V X	Verdünnung bzw. Probe X	-	+	-	-	-	+

AUSWERTUNG

Nach Beendigung der Messung werden die Rohdaten im Excel-Format exportiert und wie im folgenden Abschnitt beschrieben ausgewertet. Die Positionen C6, C7; D5-D8; F6; G1, G2, F4 und H3 sind unbrauchbar für die Auswertung der chronischen Lumineszenzhemmung, sowie bei der chronischen Zellvermehrungshemmung die Wells B4, F3, F4, F6, G2 und G7 und werden aufgrund von zuvor beobachteten Positionseffekten in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die verschiedenen Gültigkeitskriterien für die Zellvermehrungshemmung als auch die akute und chronische Leuchthemmung sind im aufgelistet.

Berechnung der Zellvermehrungshemmung

Zunächst wird von allen Messwerten der zugehörige Leerwert (Blank) abgezogen. Hierbei dient der Mittelwert der Kontroll-Blanks (B K) als Leerwert für die Negativ- und Positivkontrollen. Anschließend wird die prozentuale Hemmung der Zellvermehrung nach 24 h mithilfe von Gleichung 2 berechnet.

$$ZVH_{24h} = 100 \cdot (OD_{NK} - OD_T) / (OD_{NK} - OD_0) \quad (2)$$

ZVH _{24h}	Zellvermehrungshemmung in Prozent nach 24 h Exposition
OD _T	Optische Dichte im Testansatz nach 24 h
OD _{NK}	Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen nach 24 h
OD ₀	Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen nach Probenzugabe

Berechnung der Verdopplungszeit

Die Verdopplungszeit der Negativkontrolle wird wie folgt berechnet:

1. Berechnung der spezifischen Wachstumsrate (3).

$$\mu = (\ln OD_{NK} - \ln OD_0) / 24h \quad (3)$$

μ	spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]
OD _{NK}	Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen nach 24 h
OD ₀	Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen nach Probenzugabe

Berechnung der Verdopplungszeit (4).

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (4)$$

t_d	Verdopplungszeit [h]
μ	spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]

Berechnung der Leuchthemmung

Akute Leuchthemmung

Die akute Leuchthemmung nach 30 min Exposition wird anhand der Gleichungen 5-7 berechnet.

Berechnung des Korrekturfaktors (5).

$$KF = I_{30min} / I_A \quad (5)$$

KF	Korrekturfaktor
I_{30min}	Mittelwert der Leuchtintensität der Negativkontrollen nach 30 min
I_A	Mittelwert der Leuchtintensität der Negativkontrollen vor Probenzugabe

Berechnung der korrigierten Werte für das Anfangsleuchten im Testansatz (6).

$$KI_A = I_A \cdot KF \quad (6)$$

KI_A Korrigierter Wert für I_A
 I_A Leuchtintensität des Testansatzes vor Probenzugabe

Berechnung der Leuchthemmung (7).

$$LH_{30\min} = 100 \cdot (K I_A - I_{30\min}) / K I_A \quad (7)$$

$LH_{30\min}$ Leuchthemmung in Prozent nach 30 min Exposition
 $I_{30\min}$ Leuchtintensität im Testansatz nach 30 min
 KI_A korrigierte Leuchtintensität des Testansatzes vor Probenzugabe

Chronische Leuchthemmung

Die chronische Leuchthemmung nach 24h Exposition wird anhand Gleichung 8 berechnet.

$$LH_{24h} = 100 \cdot (I_{NK} - I_T) / I_{NK} \quad (8)$$

LH_{24h} Leuchthemmung in Prozent nach 24 h Exposition
 I_{NK} Mittelwert der Leuchtintensität der Negativkontrollen nach 24 h
 I_T Leuchtintensität im Testansatz nach 24 h

Die Auswertungen der Rohdaten (Hemmwirkungen, Mittelwert, Standardabweichung) erfolgen mit Microsoft Excel.

Anweisungen zur Auswertung mithilfe der Vorlage in Excel

In der Auswertungsvorlage „Vorlage_Auswertung_LBT_JJJJ.MM.TT“ werden die oben genannten Gleichungen zur Berechnung der Hemmwerte genutzt. Gegebenenfalls müssen bei Abweichungen vom Belegungslayout die Zellbezüge manuell angepasst werden.

1. Vorlage_Auswertung_LBT_JJJJ.MM.TT öffnen und umbenennen, sowie Messdatei mit den Daten aus dem Test öffnen.
2. In Tabellensheet "Ansatz" - wenn nicht schon bei der Testplanung geschehen- in der Spalte "Probenverdünnungen" die Konzentrationen der Verdünnungen und ggf. weitere Informationen eintragen. "Testverdünnung"-spalte wird automatisch berechnet. Vor dem Test müssen geeignete Konzentrationsbereiche gewählt werden.
3. Alle Daten aus dem Messsheet kopieren und in t0, t0nacl, t0,5 sowie t24 einfügen (ACHTUNG: nicht das Sheet über den Reitersheet duplizieren und einfügen, sondern durch alles markieren bzw. Über Tastenkombi Strg + A. Ansonsten werden Zellbezüge nicht aktualisiert/ erkannt).
4. Unter "Layout "ggf. Änderungen der Plattenbelegung eintragen. Auf einheitliche Schreibweise achten, da unter "Hemmungen" ein Abgleich der Bezeichnung stattfindet, um Fehler leichter zu erkennen. Sollten die Namen nicht identisch sein, wird "Fehler" ausgegeben. Dann in diesem Sheet Anpassungen vornehmen.
5. Für EC-50 Werte Berechnung entweder alle Hemmwerte in GraphPad Prism kopiert oder die ausgerechneten Mittelwerte und Standardabweichungen pro Verdünnung. Im zweiten Falle benötigt die Software zusätzlich die Anzahl der Replikate pro Verdünnung (z.B. n=7).

ANHANG I HERSTELLUNG VON STAMMKULTUREN

Herstellung von SSWC-Nährmedium für die Stammkulturen

Die Inhaltsstoffe werden in der angegebenen Konzentration (s. Tabelle 5) vollständig in demineralisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1M NaOH auf $7 \pm 0,2$ eingestellt.

Anschließend werden je 500ml der vorbereiteten Lösung in Laborglasflaschen abgefüllt und durch Autoklavieren (121 °C, 20 min, 2 bar) sterilisiert. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank bei +4 °C für max. 3 Monate.

Tabelle 16: Zusammensetzung des vollwertigen SSWC Nährmediums

Inhaltsstoffe der Nährmedien	Konzentration [g/l]
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
Hefeextrakt	0,5
Glycerin [ml/l]	3
Pepton aus Casein	5
NaCl	30
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	2,1
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,3

Herstellung der Stammkulturen

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung von Stammkulturen erfolgen unter sterilen Bedingungen.

Die flüssiggetrockneten Bakterienzellen *Aliivibrio fischeri* (LCK 480, Hach -Lange) werden im Erlenmeyerkolben mit 50 ml vollwertigem SSWC ankultiviert.

Hierzu werden die Bakterien 2 lang Minuten aufgetaut und 0,5ml Rekonstitutionslösung drauf pipettiert, anschließend wird das gesamte Röhrchen mit den Bakterien in den Erlenmeyerkolben mit dem Nährmedium überführt.

Infobox zur Herstellung von Stammkulturen:

(1) Das Wachstum der flüssiggetrockneten Bakterien im LCK 480 Testset ist nach eigener Erfahrung zunächst sehr viel geringer als es mit den gefriergetrockneten Stammkulturen aus Lüneburg der Fall ist, wo bereits nach ca. 24h eine OD_{587nm} von ca. 1,00 erreicht wird. Deswegen ist ein mehrmaliges Überimpfen und Inkubation notwendig.

Bei 20°C und 200rpm auf dem Schüttler wird die Kultur im Klimaschrank inkubiert. Nach ca. 72h wird die Zelldichte bei einer OD_{610nm} gemessen und 100µl der Kultur in einen neuen sterilen Kolben mit ebenfalls 50ml SSWC überführt und ebenfalls inkubiert⁽¹⁾. Dieser Vorgang sollte solange wiederholt werden bis die Kultur innerhalb von höchstens 48h Tagen eine OD_{610nm} von 1,00 erreicht⁽²⁾.

Diese Kultur werden anschließend für die Vorbereitung der Kryo – Stocks verwendet. Unter sterilen Bedingungen werden 20 ml der Übernachtskultur mit 5 ml Glycerol (steril) versetzt, in Kryoröhrchen aliquotiert (1000 µl/Röhrchen) und möglichst ohne Verzögerung bei -80 °C eingelagert (Südflügel, Arbeitsgruppe Frau Schäfer).

Infobox zur Herstellung von Stammkulturen (2.Teil):

⁽²⁾ In der Bachelorarbeit wurden die Stammkulturen nur so lange kultiviert, bis sie nach max. 3 Tagen eine OD_{610nm} von 1,00 erreichen. Dadurch erreichten die Kulturen aber bislang nicht die im Test geforderte Verdopplungszeit von <4h, weswegen hier empfohlen wird, die Stammkultur noch häufiger zu überimpfen und zu inkubieren bis nach 48h (besser 24h!) die geforderte OD_{610nm} erreicht wird. Entsprechend müsste dann die Vorschrift angepasst werden.

ANHANG II

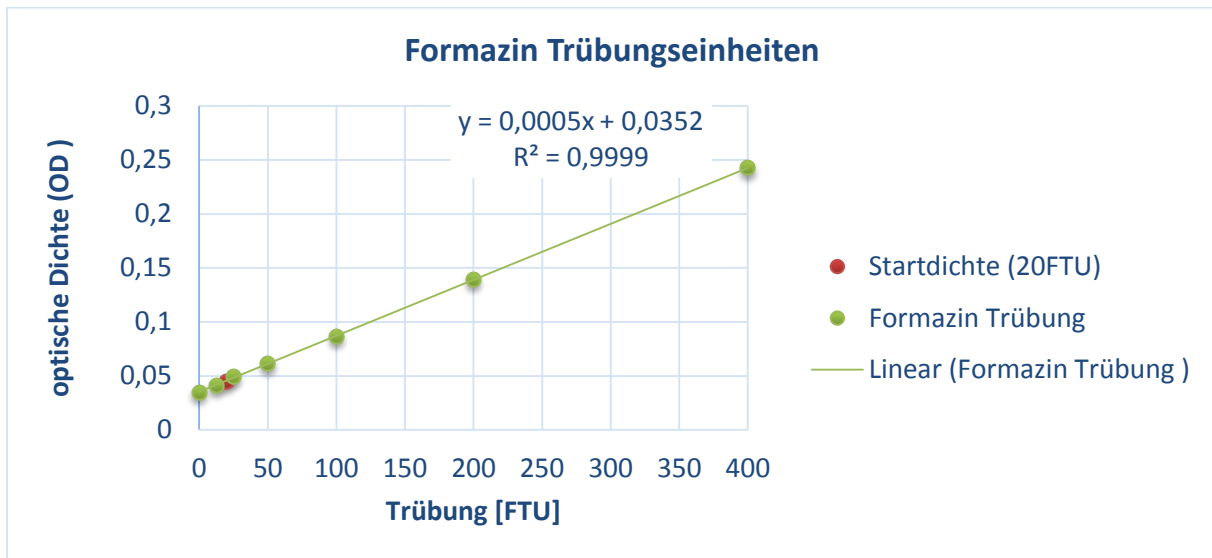


Abbildung 18: Kalibriergerade zur Umrechnung der Trübung in die optische Dichte zur Bestimmung der OD der Hauptkultur zu Testbeginn

ANHANG III

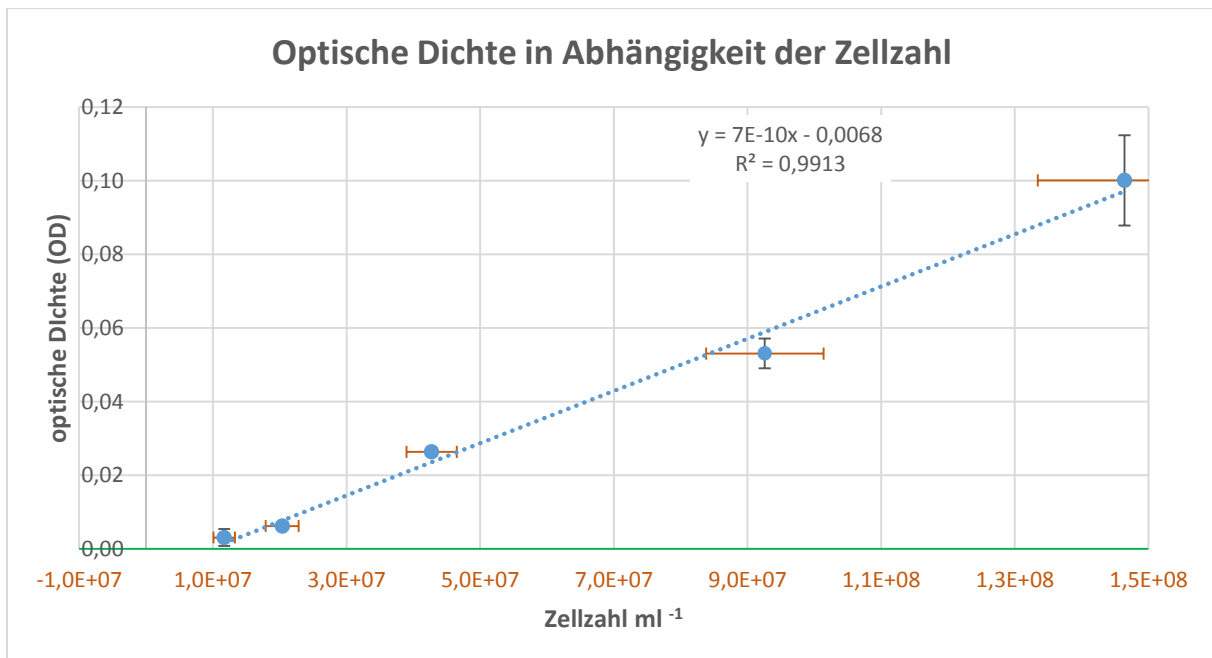


Abbildung 19: Kalibriergerade zur Umrechnung der optischen Dichte in die Zellzahl pro ml

ANHANG IV: GÜLTIGKEITSKRITERIEN

1. Akute Leuchthemmung

- KF muss zwischen 0,6 und 1,3 liegen
- PK I muss eine Hemmung von 20-80% bewirken
- Die relative Abweichung des Korrekturfaktors darf nicht mehr als 3% betragen
- Die Abweichung der Hemmwirkungen aus den replizierten Testansätzen darf nicht mehr als 3%-Punkte betragen

2. Chronische Leuchthemmung

- PK II muss eine Hemmung von 20-80% bewirken
- Die Negativkontrolle darf das Lumineszenzmaximum nicht überschreiten.
- Die relative Abweichung der Leuchtintensität in den Negativkontrollen darf nicht mehr als 5% betragen
- Die Abweichung der Hemmwirkungen aus den replizierten Testansätzen darf nicht mehr als 5%-Punkte betragen

3. Zellvermehrungshemmung

- Die Verdopplungszeit der Negativkontrolle darf nicht mehr als 4 h betragen
- PKII muss eine Hemmung von 15-50% bewirken
- Die relative Abweichung der Optischen Dichte in den Kontrollansätzen darf nicht mehr als 5% betragen
- Die Abweichung der Hemmwirkungen aus den replizierten Testansätzen darf nicht mehr als 5%-Punkte betragen

ANHANG V: MESSPROTOKOLL FÜR DIE MESSUNGEN

Platte
1

Plattendefinition: [GRE96fw_chimney] - Greiner 96 Flat White Details...

Platte mit Deckel [Bereich einer Platte](#)

Bereich der Platte
2

Schütteln
3

Parameter

Dauer: sec Amplitude: mm

Modus: Frequenz: rpm

[Wartezeit nach dem Schütteln](#)

Lumineszenz
4

Parameter

Abschwächung: Integrationszeit: ms Label Name:

Ruhezeit: ms

Schütteln
5

Parameter

Dauer: sec Amplitude: mm

Modus: Frequenz: rpm

[Wartezeit nach dem Schütteln](#)

Absorption
6

Wellenlänge

Messung: Lesen

Referenz Anzahl der Blitze:

Ruhezeit: ms

Mehrfachmessungen pro Well

Mehrfachmessungen pro Well Label Name:

Platte bewegen
7

Platte bewegen

Hinein

Heraus

Danksagung

Ein großes Dankeschön möchte ich meiner Familie aussprechen, die immer für mich da ist, mich geformt hat und mich uneingeschränkt unterstützt, sodass ich zu der Person werden konnte, die ich heute bin. Insbesondere meiner Mutter, Geschwistern und Großeltern möchte ich hierfür danken. Ich habe Euch lieb.

Mein besonderer Dank gilt zudem:

Prof. Dr. Carolin Floeter für das Ermöglichen und Betreuen dieser Arbeit, die langjährige, intensive Förderung meines Werdegangs durch die ich unheimlich viel gelernt habe und für das offene Ohr, auf das ich bei Fragen und Problemen – gleich welcher Natur – zählen konnte.

Dr. Jakob Menz, der mir mit seiner Erfahrung und guten Betreuung mit vielen Denkanstößen und hilfreichen Ratschlägen sehr bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen hat und einige Male Klarheit in das Chaos in meinem Kopf bringen konnte.

Prof. Dr. Klaus Kümmerer dafür, dass ich das Testverfahren am Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie der Leuphana Universität Lüneburg erlernen durfte, durch das ich überhaupt erst zu meinem Bachelorthema gekommen bin.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Freunden Catherina Schlüter und Kristofer Tore Tobschall bedanken, die mir mit viel Herzlichkeit, Witz, Musik sowie guten Ratschlägen und Schokolade geholfen haben weiterzumachen, wenn mir mal wieder die Decke auf den Kopf fiel oder ich auf den Boden der Realität zurückgeholt werden musste.

Erklärung

Erklärung zur Bachelorarbeit

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Hamburg, den _____

(Unterschrift)

Julia Müller