

**Bachelorarbeit**

im Studiengang Biotechnologie

**Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf  
die Grünalge *Chlorella vulgaris* im  
Algenschnelltest.**

Christin Liebig

Matrikel-Nr.: XXXXXXXXXX

1. Gutachterin

Prof. Dr. Carolin Floeter  
(HAW Hamburg)

2. Gutachterin

Dr. Susanne Wanner  
(Institut für Hygiene und Umwelt in Hamburg)

Hamburg-Bergedorf 14. Juni 2017

Angefertigt am Institut für Hygiene und Umwelt in Hamburg.

## Danksagung

Diese Abschlussarbeit wurde mit freundlicher Unterstützung der Mitarbeiter des Institutes für Hygiene und Umwelt des Referats Gewässergüte erstellt. Insbesondere gilt mein Dank den Mitarbeitern der Labore, die mich während meiner Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Ing. Michael Lechelt für die Bereitstellung des Themas und die freundliche und immer hilfsbereite Betreuung.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. Susanne Wanner und Frau Prof. Dr. Carolin Floeter für die Annahme dieser Arbeit, die genommene Zeit für Gespräche und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

## Zusammenfassung

Im Institut für Hygiene und Umwelt in Hamburg wird, neben anderen Biotests, ein Algenschnelltest zur Analyse von Gewässer- und Abwasserproben angewendet, da sich verschiedene Schadstoffe wie Herbizide und Schwermetalle messbar auf das Fluoreszenzverhalten von Mikroalgen auswirken (z.B. Brack, et al. 1998; Brayner, et al. 2011; Goldsborough & Robinson, 1984; DeLorenzo, et al. 2001). In Anlehnung an andere Biotestverfahren werden die Proben z.Zt. vor der Testdurchführung auf einen pH-Wert von  $7 \pm 0,2$  neutralisiert. Die Veränderung des pH-Wertes wirkt jedoch auf alle Substanzen in der Probe und kann zu einer Zu- oder Abnahme der messbaren toxischen Wirkung führen. Die Beurteilung, ob eine toxische Wirkung *in situ* bestand hat ist durch die Neutralisierung nicht mehr sichergestellt. Die Untersuchung der Proben unter unveränderten Bedingungen wäre also wünschenswert. Voraussetzung hierfür ist eine Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Fluoreszenzverhalten der Alge *Chlorella vulgaris*, welche Gegenstand dieser Arbeit war.

Aus diesem Hintergrund heraus wurde die Hypothese aufgestellt, dass der pH-Wert für den Algenschnelltest, im für die Anwendung relevanten Bereich, keinen Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität der Alge *Chlorella vulgaris* hat.

In einem Vorversuch wurde das Fluoreszenzverhalten der Alge bei extremen pH-Bedingungen von pH 2 bis pH 12 in Abständen von ca. 2 pH-Stufen untersucht. Vom sauren zum neutralen pH- Bereich wurde ein leichter Anstieg der Fotosyntheseaktivität gemessen. Zwischen pH 10 und pH 12 fiel die Fotosyntheseaktivität stark ab. In drei weiteren Versuchen wurde die Fotosyntheseaktivität von drei Algenkulturen von *Chlorella vulgaris* zwischen pH 5 und pH 11 in Abständen von jeweils ca. einer pH-Stufe gemessen. Zusätzlich wurde eine Messung ohne pH-Modifikationen vorgenommen. Für alle Versuche wurde die Algenaktivität mit Hilfe des Puls-Amplituden-Modulation-Fluoreszenz-Verfahrens im für den Algenschnelltest vorgeschriebenen Testmedium gemessen.

Die Auswertung erfolgte für Unterschiede innerhalb der Versuche je Algenkultur und für jeden pH-Wert im Vergleich zur Referenz einzeln. Um einen Einfluss Unterschiede zwischen den Algenkulturen der Versuche herauszufinden wurde dieser ebenfalls getestet.

Innerhalb der Algenkulturen unterschieden sich die Fotosyntheseaktivitäten bei verschiedenen pH-Werten von ca.5 bis ca.10 signifikant voneinander. Die Einzelauswertung zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität ab pH-Werten von 9. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Algenkulturen wurde statistisch nachgewiesen, hatte jedoch nur im Grenzbereich von pH-Wert 9 einen Einfluss auf das Ergebnis dieser Arbeit. In allen Betrachtungsweisen war der zunehmende Einfluss erkennbar.

Die Hypothese, dass der pH-Wert im für die Anwendung relevanten Bereich keinen Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität der Alge *Chlorella vulgaris* hat muss ab einem pH-Wert von 9 abgelehnt werden. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Fotosyntheseaktivität könnte jedoch weniger bedeutend als die Auswirkung eines neutralen pH-Wertes auf die Toxizität von Herbiziden sein. Mit zusätzlichen Untersuchungen der Auswirkungen des pH-Wertes auf den Prüfstandard und die Kontrolle im Algenschnelltest, könnte die Methode vielleicht dennoch angepasst werden und zu einer besseren Einschätzung der Toxizität von Verbindungen unter realen Umweltbedingungen führen.

## Summary

The Institute for Hygiene and Environment in Hamburg uses a range of bioassays in analysing water and wastewater, including a rapid algal based test (Algentest). Certain substances, such as herbicides and heavy metals, influence the fluorescence characteristics of the algae *Chlorella vulgaris* measurable (z.B. Brack, et al. 1998; Brayner, et al. 2011; Goldsborough & Robinson, 1984; DeLorenzo, et al. 2001). In most bioassay tests the sample is neutralised (pH 7.0±0.2) prior to analysis. However, the change in pH affects all substances in the sample and can result in an increase or decrease of the measured toxicity. This means that it is not possible to accurately estimate the in situ toxicity of samples in ecological systems in pH amended tests. It is therefore desirable to analyse the sample at an environmentally relevant pH level. An analysis of the impact pH on fluorescence behaviour of the algae is therefore required and this is the topic of this dissertation.

Based on this, the hypothesis developed for this study was that pH in the relevant range of application does not influence the photosynthesis activity of *Chlorella vulgaris* during rapid alga testing.

In a preliminary test the fluorescence behaviour of the algae was tested at extreme pH values, between 2 to 12 rising in increments of 2 pH units. Between the acidic and neutral pH range only a small increase of fluorescence activity was observed. However, between pH 10 and 12 the fluorescence activity dropped significantly. Based on these results the hypothesis was established that at the range of pH typically used in rapid algal bioassays (pH 5 to 10) has no influence on the fluorescence activity of *Corella vulgaris*. For all experiments the algae activity was measured by means of the pulse amplitude modulation fluorescence method in the test medium prescribed for the rapid algae test.

The three main tests examined the fluorescence activity of 3 algal cultures where the pH was varied from 5 to almost 11, increasing by approximately 1 pH increment at a

time. A control algal culture test without pH modification was also maintained. The algae activity for all tests was measured by means of the pulse amplitude modulation fluorescence method in the test medium prescribed for the rapid algae test. The evaluation of results was undertaken on each individual algal culture, and for each pH value, in comparison to the control. To evaluate the influence of different algal cultures, the differences between the tested cultures were also analysed.

Inside the algae culture the photosynthesis activities at different pH levels varied significantly between pH of 5 to 10. The analysis of the individual cultures showed a significant difference of fluorescence activity at around pH 9. Statistical analysis showed a difference between the algae cultures, but only above pH 9, this had an effect on the results of the dissertation. In all analyses the influence of the pH became apparent at around pH 9.

The hypothesis that the pH in the relevant range of application does not influence the photosynthesis activity of the algae *Chlorella vulgaris* does not apply for pH 9 and above. The influence of the pH on photosynthesis could be less meaningful than a neutral pH on the toxicity of herbicides. Future testing of the influence of the pH on the test set up and on the rapid algae test control sample could result in adaption of the method, which could allow a better understanding of toxicity in environmentally relevant conditions.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Ziel der Arbeit / Hypothese .....	6
1.2 Theoretische Grundlagen .....	7
1.2.1 Der pH-Wert.....	7
1.2.2 Der Algenschnelltest .....	8
1.2.3 Die Testalge <i>Chlorella vulgaris</i> .....	9
1.2.4 Fotosynthese .....	10
1.2.5 Die Fluoreszenz der Fotosynthese .....	11
1.2.6 Fluoreszenzkinetik .....	12
1.2.7 Puls-Amplituden-Modulation-Fluorometrie.....	13
1.2.8 Effekte des externen pH-Wertes auf die Alge .....	14
2 Material & Methoden .....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Testorganismus <i>Chlorella vulgaris</i> .....	15
2.1.2 Testmedium .....	16
2.1.3 pH-Wert Messgerät.....	16
2.1.4 Lichtmessgerät.....	16
2.1.5 bbe-Fluorometer .....	17
2.1.6 Material- Geräteliste.....	18
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Kontrolle der Lichtintensität.....	19
2.2.2 Ansetzen der Algenstammlösung .....	19
2.2.3 Probenmessung.....	19
2.2.4 Versuchsdurchführung.....	20
2.2.5 Statistische Methoden – Durchführung .....	22
3 Ergebnisse .....	27

3.1	Vorversuch: Fotosyntheseaktivitäten im breiten pH-Bereich .....	27
3.2	Ergebnisse des Hauptversuches .....	29
3.2.1	Messergebnisse .....	29
3.2.2	Hemmung der Fotosyntheseaktivität.....	34
3.3	Statistische Auswertung der Hauptversuche .....	36
3.3.1	Prüfung der Voraussetzungen für statistische Tests.....	36
3.3.2	Unterschiede zwischen den Algenkulturen .....	40
3.3.3	Unterschiede innerhalb der Algenkulturen .....	41
3.3.4	Unterschiede zur Referenz .....	43
3.3.5	Mittlere Standardabweichung mehrerer Algenkulturen .....	45
4	Diskussion.....	47
4.1	Vorversuch .....	47
4.2	Hauptversuche .....	48
4.3	Fazit.....	51
5	Literatur .....	52
	Anhang .....	57
	Selbsterklärung.....	70

## Abkürzungsverzeichnis

AbwV	Abwasserverordnung
ANOVA	Analysis of variance
AK	Algenkultur
ATP	Adenosintriphosphat
bbe	biological, biophysical engineering
CK	Chlorophyllkonzentration
EG	Europäische Gemeinschaft
FA	Fotosyntheseaktivität
HU	Institut für Hygiene und Umwelt
LED	light-emitting diode
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NLWKN	Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz
OGewV	Oberflächengewässerverordnung
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	Photosynthetically Active Radiation
PS	Photosystem
SOP	Standard Operation Procedure
SQI	Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Faktorstufen
SQZ	Summe der Abweichungsquadrate zwischen den Faktorstufen
WHG	Wasserhaushaltsgesetz

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der pH-Wert.....	7
Abbildung 2: <i>Chlorella vulgaris</i> ; <a href="http://botany.natur.cuni.cz">http://botany.natur.cuni.cz</a> .....	9
Abbildung 3: Die Kultivierung der Algenkulturen <i>Chlorella vulgaris</i> .....	15
Abbildung 4: Das Küvetten-Fluorometer.....	17
Abbildung 5: Fotosyntheseaktivitäten des Vorversuches .....	27
Abbildung 6: Fotosyntheseaktivitäten der Hauptversuche.....	29
Abbildung 7: Fotosyntheseaktivitäten der Referenzmessreihen .....	31
Abbildung 8: Chlorophyllkonzentration im Vergleich zur Fotosyntheseaktivität .....	32
Abbildung 9: pH-Wert Änderungen und Fotosyntheseaktivitäten im Vergleich.....	33
Abbildung 10: Hemmung der Fotosyntheseaktivitäten abhängig vom pH-Wert.....	35
Abbildung 11: Ergebnis der einfaktoriellen Varianzanalyse je Algenkultur. ....	42
Abbildung 12: Einfluss der einzelnen pH-Werte auf die Fotosyntheseaktivität .....	44
Abbildung 13: Abweichungen zur neu berechneten Standardabweichung.....	46

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendetes Material und Geräte .....	18
Tabelle 2: pH-Werte und Anzahl der Referenzmessung aller Versuche.....	22
Tabelle 3: pH-Wert Änderungen im M4-Medium des Vorversuches.....	28
Tabelle 4: pH-Wert Änderungen im M4-Medium der Hauptversuche .....	34
Tabelle 5: Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests (Prüfung auf Normalverteilung) .....	36
Tabelle 6: Ergebnisse des Levene-Tests (Prüfung auf Varianzhomogenität).....	38
Tabelle 7: Ergebnisse des Varianzquotiententests (F-Test) .....	39
Tabelle 8: ANOVA Ergebnis zwischen den Algenkulturen.....	40
Tabelle 9: ANOVA Ergebnis innerhalb jeder Algenkultur .....	43
Tabelle 10: Einfluss der einzelnen pH-Werte auf die Fotosyntheseaktivität (t-Test). 45	
Tabelle 11: Messergebnis des Vorversuchs. ....	57
Tabelle 12: Temperaturen der Algenstammlösung im Vorversuch .....	58
Tabelle 13: Temperaturen der Algenstammlösung in den Hauptversuchen .....	58
Tabelle 14: Messergebnisse des Hauptversuches der Algenkultur 1 .....	59
Tabelle 15: Messergebnisse des Hauptversuches der Algenkultur 2 .....	60
Tabelle 16: Messergebnisse des Hauptversuches der Algenkultur 3 .....	61
Tabelle 17: Messergebnisse in der Referenz der Algenkultur 1 .....	63
Tabelle 18: Messergebnisse in der Referenz der Algenkultur 2 .....	63
Tabelle 19: Messergebnisse in der Referenz der Algenkultur 3 .....	64
Tabelle 20: Hemmung der Fotosyntheseaktivität.....	64
Tabelle 21: Abweichungen zum Referenzmittelwert.....	65
Tabelle 22: Referenzdaten aus anderen Versuchen .....	66

# 1 Einleitung

Zum Schutz und Erhalt eines guten ökologischen und chemischen Zustandes von Oberflächengewässern in Europa ist die EG-Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG) Ende 2000 in Kraft getreten. Auf nationaler Ebene wird das Ziel in verschiedenen Gesetzen und Verordnungen umgesetzt (Umweltbundesamt, 2014). Im Wasserhaushaltsgesetz (WHG § 27 bis § 31) finden sich die grundlegenden Bewirtschaftungsziele für Oberflächengewässer. Die umfangreichen und detaillierten Anforderungen zur Bewirtschaftung der Oberflächengewässer sind auf der Verordnungsebene in der Oberflächengewässerverordnung (OGewV) beschrieben. In der Abwasserverordnung (AbwV) sind die Anforderungen an das Einleiten von Abwässern in Gewässer definiert (Umweltbundesamt, 2014).

Um einen Überblick über den Zustand der Gewässer zu erhalten, werden Wasserproben unter anderem auf ausgewählte Schadstoffe unterschiedlicher Herkunft untersucht. Der Eintrag von Schadstoffen in Gewässer kann direkt oder indirekt erfolgen. Ein punktueller Übergang von Abwässern aus Klärwerken oder der Industrie kann direkt dem Verursacher zugeordnet werden. Diffuse Quellen von Schadstoffen sind z.B. Einträge von bewirtschafteten Flächen durch Auswaschung, Abdrift, Erosion und Sickern in Gewässer.

Ein großer Teil der diffusen Einträge kann der Landwirtschaft zugeordnet werden (Umweltbundesamt, 2016). Schadstoffe aus dem Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Landwirtschaft konnte in Oberflächengewässern bereits nachgewiesen werden (NLWKN, 2014). Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit registrierte im Jahre 2015 einen Anstieg des Absatzes von Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland auf einen neuen Höchststand von 46103 Tonnen. Den größten Anteil mit 294 unterschiedlichen Wirkstoffen und einem inländischen Absatz von 16815 Tonnen stellten die Herbizide dar (Umweltbundesamt, 2016).

Im Institut für Hygiene und Umwelt in Hamburg (HU) wird zur Beurteilung der Toxizität von Abwasser- und Gewässerproben ein im Institut selbst entwickelter Algenschnelltest mit der Mikroalge *Chlorella vulgaris* als Biosensor angewendet (Eis 2007). Mit Fluoreszenzmessungen können toxische Wirkungen bestimmter Herbizide und Schwermetalle durch Veränderung des Fluoreszenzverhaltens von Mikroalgen erfasst werden (z.B. Goldsborough & Robinson, 1984; Brack & Frank, 1998; Brayner, et al. 2011; DeLorenzo, et al. 2001). Die Veränderungen im Fluoreszenzverhalten erlauben eine unspezifische Aussage über die Toxizität der Gesamtheit aller Substanzen in der Probe. Eine Einzelparameteranalyse von Umweltproben ist mit Biotests nicht möglich.

Mit der Einführung des Algenschnelltestes wurde in der HU-internen Arbeitsanweisung SOP HU411.120 (2009) festgelegt, dass die zu untersuchenden Abwasser- und Gewässerproben in Anlehnung an den repräsentativen pH-Wert von Oberflächengewässern, wie auch in anderen Biotestverfahren auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt werden.

Die toxische Wirkung von Substanzen auf das Fluoreszenzverhalten von Pflanzen kann nachweislich durch den pH-Wert beeinflusst werden. In Versuchen an Thylakoidmembranen von Erbsen (*Pisum sativum*, L.) konnte eine Veränderung der Wirkung der Herbizide Atrazin, Dinoseb und Diuron auf das Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von pH-Werten im Bereich von 5,5 bis 8 nachgewiesen werden (Lambrev & Goltsev, 2001).

Neben dem Einfluss des pH-Wertes auf die Toxizität von Substanzen ist ein Einfluss auf das natürliche Fluoreszenzverhalten der Alge möglich. Während einer Kultivierung der Alge *Chlorella fusar* konnte ein Einfluss des pH-Wertes auf das Fluoreszenzverhalten durch stufenweises Anheben und Senken des pH-Wertes festgestellt werden (Ihnken, et al. 2014).

Die Beurteilung, ob eine toxische Wirkung im ökologischen System besteht, ist durch die Neutralisierung der Probe somit nicht mehr sichergestellt. Die Untersuchung der Proben unter unveränderten pH-Bedingungen ist wünschenswert.

## 1.1 Ziel der Arbeit / Hypothese

Der Algenschnelltest ist ein Verfahren zur Toxizitätsbestimmung, das auf einem Vergleich der Fotosyntheseaktivität der Alge im Testwasser (negative Referenz) und der Fotosyntheseaktivität im Probenwasser beruht. Mit der Einstellung aller Proben auf einen bestimmten pH-Wert im Algenschnelltest kann die Toxizität der Probe nicht bei ursprünglichen pH-Werten ermittelt werden. Die Einstellung des pH-Wertes ist derzeit erforderlich, um eine Gleichbehandlung der Negativkontrolle mit dem Probenwasser zu gewährleisten. Bei der Beibehaltung des ursprünglichen Proben pH-Wertes kann nicht differenziert werden, ob ein verändertes Fluoreszenzverhalten der Alge aufgrund einer toxisch wirkenden Substanz oder aufgrund der pH-Wert Differenz erfolgt.

Eine potenzielle Einflussnahme des pH-Wertes im Probenwasser auf das Testergebnis des Algenschnelltestes ist daher auszuschließen. Diese Arbeit untersucht die Arbeitshypothese, dass ursprüngliche pH-Werte im Probenwasser keinen Einfluss auf die Testergebnisse des Algenschnelltests haben.

Zur Überprüfung der Hypothese ist die Fotosyntheseaktivität des Testorganismus *Chlorella vulgaris* in zu erwartenden pH-Werten von Abwasser- und Gewässerproben gemessen und ausgewertet worden. Die Versuche wurden und der Algenschnelltest wird mit Algenkulturen aus annähernd gleichbleibenden Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Eine Prüfung, ob die unterschiedlichen Algenkulturen das Testergebnis beeinflussen, ist daher notwendig.

## 1.2 Theoretische Grundlagen

### 1.2.1 Der pH-Wert

Das Verhalten aquatischer Organismen reagiert auf wechselnde Bedingungen in der sie umgebenden flüssigen Phase. Die Zusammensetzung gelöster Stoffe wird u.a. vom pH-Wert beeinflusst und führt zu einer Veränderung der Lebensbedingungen.

Der pH-Wert wird definiert als der negative dekadische Logarithmus der Oxonium-Ionenaktivität ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) in wässrigen Lösungen (Plewinsky, Hennecke & Oppermann, 2014).

$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}_3\text{O}^+}$$

In Abbildung 2 ist die Beziehung zwischen dem pH-Wert und dem Gleichgewicht der **Oxonium-** und Hydroxid-Ionenkonzentration dargestellt.

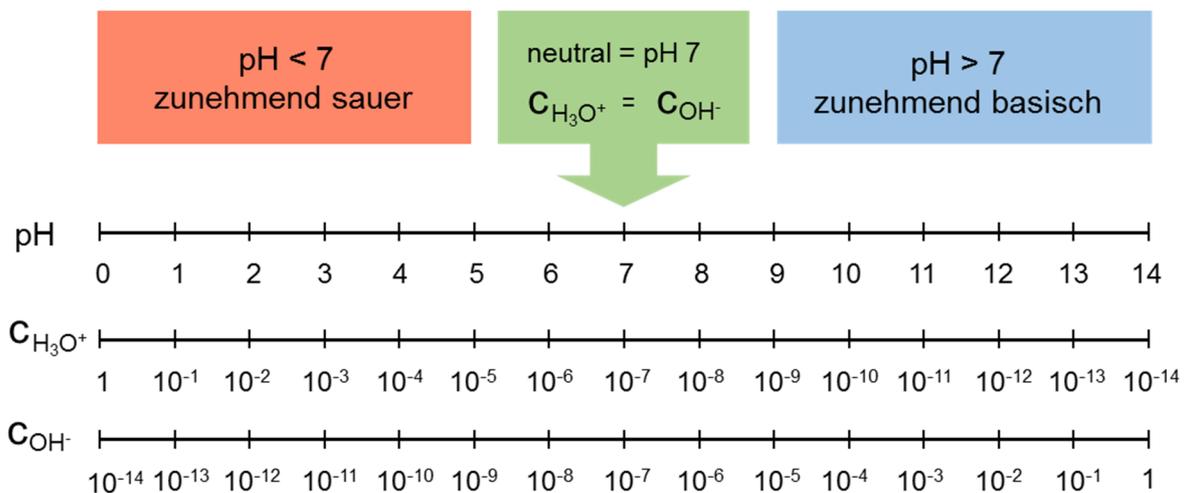


Abbildung 1: pH-Wert in Abhängigkeit der Hydroxidionen- und der Oxonium-Ionenkonzentration.

Durch Zugabe einer Säure verschiebt sich das Gleichgewicht zur Seite der **Oxonium-Ionen**. Die Lösung wird zunehmend saurer und der pH-Wert sinkt. Erhöht sich durch Zugabe einer Base die Hydroxidionen-Konzentration steigt der pH-Wert und der Anteil an **Oxonium-Ionen** sinkt.

Für reines Wasser beträgt der pH-Wert 7 bei 25 °C (Plewinsky, Hennecke & Oppermann, 2014). Je nach Art des Gewässers liegt der pH-Wert in natürlichen Gewässern zwischen 5 und 9. Bezogen auf Fließgewässerlandschaften sind Moore eher leicht sauer mit pH-Werten um 6. Andere Fließgewässer liegen mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 8 im leicht Basischen (Schneider, 2001). Die Existenz der meisten Wasserorganismen liegt etwa zwischen pH-Wert 5 und 9 (Schneider, 2001). Die Löslichkeit von Stoffen ist vom pH-Wert abhängig (Smith & Smith, 2009). Daraus folgt, dass die Stoffkonzentrationen mit dem pH-Wert schwanken. Gelöstes Aluminium ist für viele Wasserorganismen toxisch. Die Konzentration von gelöstem Aluminium aus Aluminiumverbindungen in Gewässern steigt mit sinkenden pH-Werten unter 4,5 (Smith & Smith, 2009). Um die Wasserqualität des aufnehmenden Gewässers zu erhalten, sollten industrielle Abwässer pH-Werte zwischen 6,5 und 9 aufweisen (Pohling, 2015). Für 134 in die HU eingehende industrielle Abwasserproben wurden für den Zeitraum von Januar 2016 bis Juni 2016 pH-Werte von 5,8 bis 9,9 ermittelt.

### 1.2.2 Der Algenschnelltest

Der Algenschnelltest am HU ist ein statisches Testverfahren, bei dem die Wirkung des Testwassers auf die Fotosyntheseaktivität des Testorganismus Alge *Chlorella vulgaris* nach einer Expositionszeit von 15 Minuten ermittelt wird. Das Verfahren zur Toxizitätsbestimmung wird seit 2008 im HU verwendet (Lechelt et al., 2011). Die Messung findet mit dem Küvetten-Fluorometer der Firma bbe Moldaenke statt. Der Algenschnelltest wird zur Untersuchung von Abwasser- und Gewässerproben im Labor eingesetzt.

Als Testparameter dient die messtechnische Fotosyntheseaktivität der Alge *Chlorella vulgaris* im Testwasser und in einer unbelasteten Probe. Basierend auf den ermittelten Fotosyntheseaktivitäten kann die prozentuale Hemmung über das Verhältnis der beiden Messungen ermittelt werden.

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

$H_A$ : Hemmung der Fotosynthese [%]

$A_K$ : gemessene Algenaktivität (Genty-Parameter) in der Kontrolle

$A_G$ : gemessene Algenaktivität im Testansatz

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

### 1.2.3 Die Testalge *Chlorella vulgaris*

Im Algenschnelltest der HU wird die Alge *Chlorella vulgaris* als Testorganismus verwendet. Die einzellige Alge wurde erstmals von M.W.Beijerinick 1898 bei Delft (Niederlande) isoliert und beschrieben.

Sie wird der Klasse der Chlorophyceen in der Abteilung Chlorophyta (Grünalge) zugeordnet. Chlorophyta stellen die größte Gruppe der Algen dar und leben vorwiegend im Süßwasser (Marcinek, Rosenkranz & Saratka, 1996).

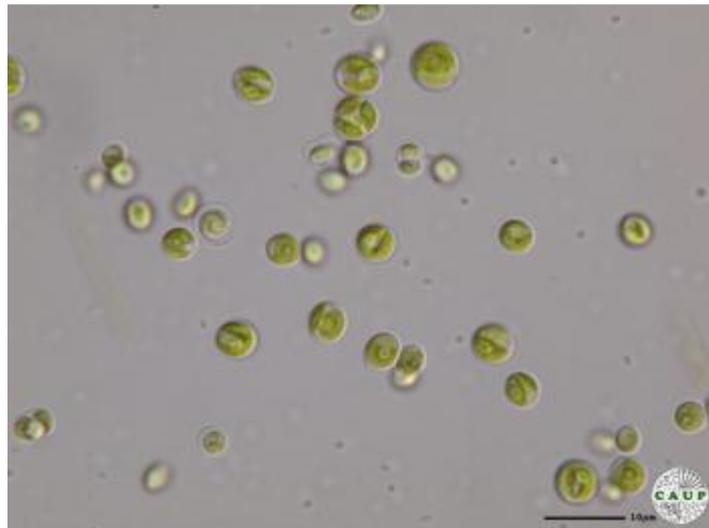


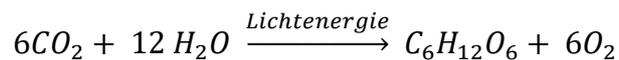
Abbildung 2: *Chlorella vulgaris*; <http://botany.natur.cuni.cz>

Die Zelle *Chlorella vulgaris* hat eine kugelförmige Morphologie mit einem Zelldurchmesser von ca. 2- 10  $\mu\text{m}$  und ist coccal und unbegeißelt. Der optimale pH-Bereich ist sehr abhängig von der Spezies und liegt für viele Algen im Bereich von pH 7 bis pH 9 (z.B. Yongmanitchai & Ward, 1991). Für die Alge *Chlorella vulgaris* konnte Wachstum unter extrem sauren Bedingungen mit einem pH-Wert von 3 (Mayo, 1997) und einem extrem basischen pH-Wert bis zu 11 bereits festgestellt werden (Goldman, Riley & Dennett, 1982). Die höchste Produktivität von Biomasse

für Algen der *Chlorella vulgaris* ist im pH-Bereich von pH 9 bis 10 erzielt worden (Khalil et al., 2010). Die Alge zeichnet sich durch hohe Druckstabilität bis 600 bar im Vergleich zu anderen Einzellern aus (Takeda, 1988). Die hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber rauen Umweltbedingungen und fremden Organismen kann vermutlich auf die starre Zellwand zurückgeführt werden. Die Zellwand aus Polysacchariden beinhaltet den Stoff Sporopollenin, der als besonders resistent gegenüber Säuren und Basen gilt (Safi et al., 2014).

#### 1.2.4 Fotosynthese

Die Fluoreszenz des Testorganismus ist verknüpft mit der Energiegewinnung aus Licht. Die Fotosynthese ist der Prozess, mit dem fotoautotrophe Organismen Lichtenergie in chemische Energie umwandeln. Die Gesamtreaktion lautet:



Der Umwandlungsprozess findet in den Chloroplasten statt und durchläuft vier Stadien, von denen die ersten drei bei Licht erfolgen (Heldt & Piechulla, 2015). Im ersten Stadium wird das Licht durch die an die Thylakoidmembranen gebundenen Chlorophyllmoleküle absorbiert. Die Energie des Lichtes wird zur Elektronengewinnung aus Wasser verwendet. Durch den Abzug der Elektronen wird Sauerstoff freigesetzt. Ein nicht-zyklischer Elektronenfluss baut in einem zweiten Stadium einen pH-Gradienten im Thylakoidinnenraum über der Membran auf und reduziert als letzten Schritt der Elektronentransportkette  $NADP^+$  zu NADPH. Der pH-Gradient wird im dritten Schritt zum Antrieb des Proteinkomplexes ATP-Synthase zur Gewinnung von ATP genutzt. Die ersten drei Stadien sind direkt von Lichtenergie abhängig und werden als Lichtreaktion der Fotosynthese bezeichnet. Im vierten Schritt werden die zuvor entstandenen Moleküle ATP und NADPH zur  $CO_2$ -Fixierung und Synthese von Kohlenhydraten genutzt (Heldt & Piechulla, 2015).

Die Stadien der Lichtreaktion können den Modulen Photosystem 1 (PS1), der Elektronentransportkette und dem Photosystem 2 (PS2) des Fotosyntheseapparates zugeordnet werden. Die Anregungsenergie wird im PS2 absorbiert. Der Aufbau des

pH-Gradienten und der Synthese von ATP erfolgt über die Elektronentransportketten. Das PS 1 übernimmt die Elektronen und nutzt zusätzlich absorbierte Lichtenergie zur Ladungstrennung und Reduktion. Der Produktionsprozess initialisiert die Synthese von NADPH/ H<sup>+</sup> aus NADPH<sup>+</sup> (Heldt & Piechulla, 2015; Bruce et al., 2011).

### **1.2.5 Die Fluoreszenz der Fotosynthese**

Bei Algen, grünen Pflanzen und Cyanobakterien erfolgt die Lichtabsorption in den Photosystemen 1 und 2. Die Photosysteme setzen sich aus einem licht-absorbierenden Antennensystem und einem Reaktionszentrum zusammen. Die Antennensysteme bestehen aus einem Chlorophyll-Molekül-Komplex. Das Absorptionsmaximum der Antennensysteme der beiden Photosysteme ist bei unterschiedlichen Wellenlängen (Heldt & Piechulla 2015; Bruce et al., 2011).

Als Absorption wird die Aufnahme elektromagnetischer Strahlen durch Anregung von delokalisierbaren Elektronen aus einem Grundzustand in einen energetisch höheren Zustand bezeichnet. Chlorophyll-a-Moleküle besitzen viele konjugierte Doppelbindungen und haben daher die Eigenschaft der Lichtabsorption. Der Anregungszustand eines Elektrons durch Licht wird als Singulett bezeichnet. Wird das Licht im Wellenlängenbereich des Absorptionsmaximums absorbiert, so wird das Elektron zuerst in den sehr instabilen zweiten Singulettzustand angehoben (Heldt & Piechulla 2015, Bruce et al., 2011).

Aus dem grundlegenden physikalischen Prinzip, dass physikalische Systeme den möglichst energieärmsten Zustand anstreben, gelangt das Chlorophyllmolekül in zwei Schritten wieder in den entspannten Grundzustand. Über Abwärme oder Absorption eines energieärmeren Photons gelangt das Elektron in den ersten Singulettzustand. Um in den Grundzustand zurückzukehren, kann die absorbierte Energie für die fotochemische Reaktion genutzt werden, oder über andere Wege wieder aus dem Chlorophyllmolekül abgegeben werden. Besteht kein Bedarf an Lichtenergie, ist das Reaktionszentrum nicht aufnahmebereit und somit geschlossen. Die Energie kann alternativ durch Abgabe eines Photons (Fluoreszenz), unspezifische Elektronenweitergabe (Wärmestrahlung) oder Anhebung des Elektrons in einen dritten Singulettzustand abgegeben werden (Heldt & Piechulla, 2015; Consalvey et al., 2005).

Der Regulationsmechanismus, Energie als a-Chlorophyll-Fluoreszenz abzugeben, wird im größeren Anteil vom PS2 als vom PS1 genutzt. (Krause & Weis 1991; Pfündel, 1998; Hall & Rao, 1999).

### 1.2.6 Fluoreszenzkinetik

Die Zuordnung der Fluoreszenzausbeute zu den biologisch fotosynthetischen Prozessen wird durch die Fluoreszenzkinetik beschrieben und ermöglichte die Definition des Parameters Fotosyntheseaktivität.

Die Grundlage der Fluoreszenzkinetik basiert auf der Entdeckung, dass die Fluoreszenzausbeute eines dunkeladaptierten Blattes nach dem Einsetzen von Belichtung mittlerer Intensität eine zeitliche Abhängigkeit hat. Der sog. Kautsky-Effekt zeigt, dass die Fluoreszenzausbeute erst einen maximalen Wert annimmt und anschließend auf einen konstanten Wert absinkt. (Kautsky & Hirsch, 1931).

Der charakteristische Verlauf der Kautsky-Kurve kann nachfolgend erklärten fotosynthetischen Prozessen zugeordnet werden. In der Dunkelphase ist das Reaktionszentrum des PS2 offen ( $f_0$ ). Die fotosynthetische Reaktion wird durch den Elektronentransport vom PS2 zum PS1 nicht angeregt. Durch Bestrahlung mit Licht mittlerer Intensität schließt sich das Reaktionszentrum des PS2 und der Bedarf an Lichtenergie nimmt ab. Ist das Reaktionszentrum des PS2 vollständig mit Lichtenergie gesättigt, so wird die Anregungsenergie bis zu einem maximalen Wert der Fluoreszenz ( $f_m$ ) abgegeben (Vanselow, 1993). An dem Punkt maximaler Fluoreszenz sind die Reaktionszentren des PS 2 geschlossen. Der Aufbau des pH-Gradienten über der Thylakoidmembran und nachfolgende Prozesse der Fotosynthese bewirken den Abfall der Fluoreszenz (Schreiber, Reising & Neubauer, 1991; Dau & Hansen, 1990).

Die Verwendung der Fluoreszenzkinetik zur Beschreibung der verschiedenen Wege der Energieabgabe nach der Absorption der Lichtenergie des PS 2 erfolgte erstmals durch Genty et al. (1992).

$$Genty = \frac{f'_m - f_0}{f'_m}$$

Der Genty-Parameter definiert die effektive Fotosyntheseaktivität der Elektronentransportkette vom PS 2. Berechnet wird die Fotosyntheseaktivität aus dem Verhältnis der variablen Fluoreszenzausbeute ( $f'_m - f_0$ ) zur messtechnisch maximalen Fluoreszenzausbeute ( $f'_m$ ). Die Weiterleitung der Anregungsenergie kann durch fotosynthesehemmende Substanzen der Alge gestört werden und damit zu einer Veränderung der Fluoreszenzausbeute führen (z.B. Brack & Frank, 1998; Brayner, et al. 2011; DeLorenzo et al., 2001).

### 1.2.7 Puls-Amplituden-Modulation-Fluorometrie

Zum Induzieren und Messen der a-Chlorophyll-Fluoreszenz in Fluorometern ist die Puls-Amplituden-Modulation (PAM) entwickelt worden (Schreiber, Schliwa & Bilger, 1986; Schreiber, 2004). Um die Fluoreszenzkinetik zu erzeugen werden drei verschiedene Lichtquellen appliziert. Ein sehr schwach gepulstes Licht erzeugt den Zustand der Dunkeladaption ( $f_0$ ). Die Kombination aus einem pulsierenden modulierten fotosynthetisch aktiven Licht (aktinisch) und Zuschaltung von sehr viel stärkerem nicht-moduliertem Sättigungslicht verstärkt den Effekt der maximalen Fluoreszenzausbeute, so dass die maximale messtechnische Fluoreszenzausbeute ( $f'_m$ ) erfasst werden kann (Schreiber, 2004; Consalvey et al., 2005).

Die mit Hilfe von PAM erzeugten Fluoreszenzparameter lassen Veränderungen der messtechnischen Fotosyntheseaktivität durch mögliche fotosynthesehemmende Substanzen nachweisen (Schreiber, Reising & Neubauer, 1991; Moldaenke, Vanselow & Hansen, 1995). Durch das schwach gepulste Licht zur Dunkeladaption lässt sich bei geschädigten Algen eine höhere Grundfluoreszenz  $f_0$  feststellen, die zur Verringerung der Fotosyntheseaktivität und zur verstärkten Wärmeabgabe der Alge führt (Consalvey et al., 2005; Institut für Hygiene und Umwelt, 2013).

### 1.2.8 Effekte des externen pH-Wertes auf die Alge

Die Verfügbarkeit von Kohlenstoff als gelöstes  $\text{CO}_2$  ist von zentraler Bedeutung für den fotosynthetischen Prozess. Der Kohlenstoff muss von der Alge aus dem externen Medium in die Zelle aufgenommen werden. *Chlorella spp.* können nachweislich Kohlenstoff in Form von gelöstem  $\text{CO}_2$  oder Hydrogencarbonat in die Zelle aufnehmen (Shelp & Calvin, 1980; Beardall, 1981; Beardall & Raven, 1981; Matsuda & Colman 1995). Für die  $\text{CO}_2$ -Fixierung in der Dunkelreaktion der Fotosynthese wird jedoch gelöstes  $\text{CO}_2$  benötigt. Wäre Hydrogencarbonat eine Alternative für gelöstes  $\text{CO}_2$ , so müsste das Hydrogencarbonat erst in einem Dissoziationsschritt in die Form des gelösten  $\text{CO}_2$  überführt werden. Gelöstes  $\text{CO}_2$  kann ohne Energieaufwand durch die Membran in die Zelle diffundieren (Giordano, Beardall & Raven, 2005). Diffusion von unpolaren kleinen Molekülen ist immer konzentrationsabhängig und folgt dem Gefälle. Um den  $\text{CO}_2$  Bedarf der Zelle in Umgebungen mit geringer  $\text{CO}_2$  Konzentrationen zu decken, sind für viele Grünalgen Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen bekannt (Giordano, Beardall & Raven, 2005). Hydrogencarbonat kann unter Einsatz von Energie über aktive Anionentransporter in die Zelle aufgenommen werden (Badger, Hanson & Price, 2002; Young, Beardall & Giordano, 2001). Durch den aktiven Transport von Hydrogencarbonat wird das gelöste  $\text{CO}_2$  trotz niedrigen Gehalts außerhalb der Alge in der Zelle angereichert (Giordano, Beardall & Raven, 2005).

Die zwei möglichen Kohlenstoffquellen stehen miteinander im Gleichgewicht, das stark vom pH-Wert abhängig ist. In geschlossenen Systemen ist der Anteil von gelöstem  $\text{CO}_2$  im wässrigen Medium mit extrem sauren pH-Wert von 0 theoretisch am höchsten, und fällt bis zu einem pH-Wert von ca. 5 nur gering ab (Smith & Smith, 2009; Wisotzky, 2012). Über pH-Werten von ca. 5 nimmt der Anteil an gelöstem  $\text{CO}_2$  stark ab. Zwischen 8 und 10 ist theoretisch kein Anteil an gelöstem  $\text{CO}_2$  mehr im wässrigen Medium vorhanden. Hydrogencarbonat liegt ab einem pH-Wert von ca. 2 bis ca. 14 vor. Hydrogencarbonat hat am Minimum des gelösten  $\text{CO}_2$  Anteils sein Maximum und fällt in beide pH-Wert-Richtungen gleich stark ab (Smith & Smith, 2009; Wisotzky, 2012).

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Testorganismus *Chlorella vulgaris*

Die Kultivierung von *Chlorella vulgaris* erfolgt im Institut für Hygiene und Umwelt. Der Algenstamm, *Chlorella vulgaris*, SAP 211-19, wird aus der Sammlung für Algenkulturen vom Pflanzenphysiologischen Institut Göttingen etwa alle 3 Monate bestellt und auf Schrägagar in Reagenzgläser geliefert. Die Anzucht wird in **steriler** Nährlösung in Reagenzgläsern durchgeführt. Die Dauerkultivierung erfolgt im 2 L Scheidetrichter bei kontinuierlicher Belüftung. Als Kultivierungsmedium dient das Medium nach Chu (Anhang II). Nimmt die Zelldichte merklich zu, wird ein Teil der Algenzellen aus dem Scheidetrichter entfernt und mit frischem Kultivierungsmedium aufgefüllt. Die verwendeten Algen waren 18 (Algenkultur 1), 20 (Algenkultur 2) und 10 (Algenkultur 3) Tage alt.



Abbildung 3: Kultivierung der Algenkulturen *Chlorella vulgaris* in Medium in kontinuierlich beleuchteten und belüfteten 2 L Scheidetrichtern.

### **2.1.2 Testmedium**

Als Testmedium wurde das für die Referenzmessung im Algenschnelltest vorgesehene M4-Medium nach Elendt verwendet (Anhang I). Das M4-Medium wird aus demineralisiertem Wasser und 10 verschiedenen Lösungen gemäß AQS-Merkblatt P-9/2 (2000) hergestellt.

Der pH-Wert des M4-Mediums betrug bei Raumtemperatur nach der Herstellung zwischen 8,2 und 8,6. Für jeden Versuch wurden 5 L M4-Medium neu angesetzt. Das Einstellen des pH-Wertes erfolgte tröpfchenweise durch Zugabe von Natronlauge und Salzsäure in 1 L Glasflaschen auf einem Magnetrührer mit Rührfisch. Blieb der pH-Wert nach 15 minütigem Rühren relativ konstant ( $\pm 0,2$  pH-Stufen), wurde die pH-Einstellung beendet.

### **2.1.3 pH-Wert Messgerät**

Zur Messung des pH-Wertes wurde ein pH 3210 Gerät mit der pH Elektrode SenTix®41 der Firma WTW verwendet. In den Messstab ist ein Temperaturfühler integriert. Das Gerät wurde vor jedem Versuch nach den Vorgaben der Arbeitsanweisung SOP HU411.014 kontrolliert und bei Bedarf kalibriert.

### **2.1.4 Lichtmessgerät**

Zur Überprüfung der Lichtverhältnisse am Standort der Algenstammlösung und der Inkubation wurde die Lichtintensität mit dem LI-185B der Firma LI-COR gemessen. Das Gerät verfügt über einen Sensor, der Messungen im fotosynthetisch aktiven Strahlungsbereich (PAR) ermöglicht. Das Gerät stammte aus dem Biologielabor Hamburg und stand nach Absprache als Leihgabe zeitweise zur Verfügung.

### 2.1.5 bbe-Fluorometer

Das Küvetten-Fluorometer besitzt die Funktionen zur Chlorophyllbestimmung, quantitativen Algenklassifizierung in Gewässerproben und zur Bestimmung der Fotosyntheseaktivität für den Algenschnelltest. Zur Lichterzeugung sind 5 Leuchtdioden (LED) mit den Wellenlängen 470 nm, 525 nm, 590 nm, und 610 nm in der Messkammer installiert. Die Probe wird in einer 25 ml Glasküvette bereitgestellt. Das Gerät ermittelt mit PAM die messtechnische Fotosyntheseaktivität von Algen. Neben der Messung der Fotosyntheseaktivität wird der Chlorophyllgehalt der Alge mit dem Gerät bestimmt. Durch zeitlich nacheinander geschalteten LED-Lichtimpulse wird ohne Hintergrundbeleuchtung die Alge nacheinander mit Licht fünf unterschiedlichen Wellenlängen bestrahlt. Das erzeugte Anregungsspektrum wird mit fünf normierten Anregungsspektren von fünf Algenklassen verglichen. Auf der Grundlage, dass Algenklassen eine ähnliche Zusammensetzung der Fotosynthesepigmente aufweisen und die Wechselwirkung der Pigmente charakteristisch ist, kann über einen Vergleich der erzeugten und normierten Anregungsspektren der Chlorophyllgehalt bestimmt werden (Institut für Hygiene und Umwelt, 2013).



Abbildung 4: Das Küvetten-Fluorometer der Firma bbe moldaenke am Arbeitsplatz

## 2.1.6 Material- Geräteliste

Tabelle 1: In den Versuchen verwendetes Material und Geräte

Bezeichnung	Merkmal	Hersteller / Herkunft
<i>Chlorella vulgaris</i>	SAP 211-19	Pflanzenphysiologisches Institut Göttingen
Fluorometer	Messungen in 25 ml Messküvetten	bbe moldaenke
Softwareprogramm	bbe++, Version 2.3.2	bbe Moldaenke,
M4-Wasser	AQS-Merkblatt P-9/2 (2000)	HU
Laptop	Extensa 5620	Acer
Elektrorührgerät	-	Variomag
Lichtmessgerät	LI-185B	LI-COR
pH-Messgerät	3210	WTW
pH Elektrode	SenTix®41	WTW
25 ml Glasküvetten	-	OG Héllma
Rührfische	-	-
Pipette 1000 µl	-	Gilson
Pipette 100 µl	-	Eppendorf
Pipettenspitzen	100 µl & 1000 µl	Eppendorf
Glaspipette 25 ml	Vollpipette	Hirschmann Laborgeräte
Bechergläser 200 ml	-	-
macro-Pipettierhilfe	-	Brand
Temperaturfühler	-	-
deionisiertes Wasser	-	-
1 l Glasflaschen	-	-
Natriumhydroxid	NaOH	-
Salzsäure	HCl	-

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kontrolle der Lichtintensität**

Tageszeit und wetterbedingte Unterschiede in der Lichtintensität können nachweislich das Ergebnis des Algenschnelltests beeinflussen. Aus diesem Grund war zu vermeiden, dass die Algenstammlösung hohen Lichteinflüssen von PAR über ca.  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt wird (Schott 2015). Der Arbeitsplatz ist durch eine Wand parallel zur Fensterseite abgetrennt. Zur Kontrolle wurden zwei Messungen der Lichtintensität am Arbeitsplatz durchgeführt. Am Nachmittag mit Tageslichteinfluss bei vorherrschendem Sonnenschein und abends bei Dunkelheit. Die Messungen ergaben Lichteinflüsse von PAR über ca.  $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bis  $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Der Einfluss befand sich somit im unbedenklichen Bereich. Aufgrund der geringen Änderung der Lichtintensität trotz stark veränderter Lichteinflüsse ist für die Versuche keine Überschreitung des zulässigen Grenzwertes am Arbeitsplatz zu erwarten gewesen.

### **2.2.2 Ansetzen der Algenstammlösung**

Zum Herstellen der Algenstammlösung wurden 50 ml der Algenkultur mit 50 ml Kultivierungsmedium vorverdünnt. Sonst würde der Messbereich des Fotometers zur Messung der Chlorophyllkonzentration ansonsten überschritten würde.

### **2.2.3 Probenmessung**

Mit einer ersten Messung wurden die Chlorophyllkonzentrationen der Algenstammlösung und die Fotosyntheseaktivität der Algenkultur bestimmt. Als Richtwert für die Chlorophyllkonzentrationen galten die Bestimmungen des Algenschnelltests. dass die Fotosyntheseaktivität mindestens einen Wert von 60% aufweisen muss und im Bereich von  $100 \mu\text{l} \pm 20 \mu\text{l}$  liegt. Lag die Probemessung im Messbereich des Fluorometers, konnte aus der jetzt bekannten Chlorophyllkonzentration der Algensuspension die Zielkonzentration in 25 ml M4-Medium berechnet werden.

$$V_S = \frac{c_{Soll} - V_S}{c_{ist}}$$

$V_S$ : Pipettiertes Volumen der Algensuspension für die Erstmessung

$c_{ist}$ : Gemessene Chlorophyllkonzentration der Algensuspension der Erstmessung

$c_{soll}$ : Zielkonzentration in der Messküvette (zu 25 ml M4-Medium)

Für den Messvorgang wurde eine 25 ml Messküvette mit 25 ml M4-Medium befüllt. Durch Zugabe der Algenstammlösung wurde das Medium beimpft und 15 Minuten unter einem mit Aluminiumfolie umwickelten größeren Becherglas dunkel inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung in einer Küvette mit einer Messdauer ca. zwei Minuten im Fluorometer.

#### 2.2.4 Versuchsdurchführung

Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt. In einem Vorversuch wurde die Fotosyntheseaktivität der Alge über einen breiten Bereich mit extremen pH-Werten ermittelt. In drei Hauptversuchen ist anschließend die Fotosyntheseaktivität im für den Algenschnelltest relevanten pH-Werte Bereich untersucht worden.

Vor Versuchsbeginn wurden die pH-Werte im M4-Medium je pH-Wert in einer 1 l Glasflasche eingestellt. Die eingestellten pH-Werte variierten innerhalb von Stunden bis zum Versuchsbeginn teilweise um bis zu einer pH Stufe. Auch nach nächtlicher Lagerung der eingestellten M4-Medien schwankte der pH-Wert in Zeiträumen von 30 Minuten um  $\pm 0,5$ . Eine eindeutige Temperaturabhängigkeit der Schwankungen konnte nicht festgestellt werden. Ein punktuell eingestellter pH-Wert im M4-Medium konnte aufgrund der Instabilität, vermutlich bedingt durch die komplexen Inhaltsstoffe aus verschiedensten Kationen, Anionen und organischen Verbindungen, in der Lösung für die Versuche nicht dauerhaft hergestellt werden. Um den bei der Zugabe der Alge tatsächlich vorliegenden pH-Wert zu ermitteln, wurde der pH-Wert des jeweiligen M4-Mediums in einem gesonderten Gefäß direkt nach der Beimpfen des M4-Mediums in den Messküvetten mit einer pH-Elektrode gemessen. Änderungen

des pH-Wertes im Medium wurden im Anschluss an die Messung der Fotosyntheseaktivität in der Probe kontrolliert.

Liegt ein Temperaturanstieg von  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  in der Algenstammlösung vor, kann das Messergebnis maßgeblich beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Temperatur der Algenstammlösung nach fünf Messungen im Hauptversuch und drei Messungen im Vorversuch geprüft.

Wegen bekannter Effekte auf die Fotosyntheseaktivität durch die Belichtung der Algensuspension mit Tageslicht ist die Algensuspension mit einem in Aluminiumfolie gewickelten Becherglas abgedunkelt worden (Schott 2015).

#### **2.2.4.1 Vorversuch**

Im Vorversuch sollte festgestellt werden, wie sich die Fotosyntheseaktivität in pH-Werten in und über üblichen pH-Werten von Proben der HU hinaus tendenziell verhält. Zusätzlich diente der Vorversuch zur Überprüfung der experimentellen Versuchsdurchführung. Eine detaillierte statistische Auswertung ist für die höhere Anzahl an Einzelmessung der Hauptversuche vorgenommen worden.

Der untersuchte Bereich umfasste die pH-Werte von 2 bis 12, die in Abständen von ca. zwei pH-Werten gemessen wurden. Je pH-Wert wurden drei Messungen in jeweils einer Messküvette in Abständen von drei Minuten beimpt. Zusätzlich wurden drei Kontrollmessungen am Ende des Versuchszeitraums im M4-Medium mit dem pH-Wert von ca. 8 vorgenommen.

#### **2.2.4.2 Hauptversuch**

Im Hauptversuch wurden die Fotosyntheseaktivitäten bei pH-Werten von 5 bis 11 in Abständen von einem pH-Wert gemessen. Je pH-Wert sind fünf Messungen in je fünf Messküvetten in M4-Medium durchgeführt worden. Um die Fotosyntheseaktivitäten der Algen in den pH-Werten später vergleichen zu können, sind zusätzliche Fluoreszenzmessungen im unveränderten M4-Medium als Referenz gemessen worden. Die Referenzmessungen bestanden aus drei bis fünf Messungen am Anfang, am Ende und in der Mitte des Versuches. Eine Veränderung der Fotosyntheseaktivität aufgrund der Versuchsdauer konnte in den

Referenzmessreihen durch die Messungen am Anfang, Ende und in der Mitte berücksichtigt werden. Die untersuchten pH-Werte und die Anzahl der Messungen jeder Referenzmessreihe sind nachfolgend in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Untersuchte pH-Stufen und Anzahl der Referenzmessung aller Versuche**

	<b>pH-Werte</b>	<b>Anzahl der Referenzmessungen</b>
<b>Vorversuch</b>	2,0; 4,1; 7,1; 7,9; 8,2; 9,8 und 12,4	-
<b>Algenkultur 1</b>	5,6; 6,6; 7,8; 8,9; 9,9 und 11	11
<b>Algenkultur 2</b>	5,4; 6,1; 7,6; 7,9; 9,0; 9,9; und 10,9	13
<b>Algenkultur 3</b>	4,7; 6,8; 7,1; 8,0; 8,8; 9,7 und 10,8	13

### **2.2.5 Statistische Methoden – Durchführung**

Die statistischen Methoden wurden für die experimentell ermittelten Daten der drei Hauptversuche durchgeführt. Vor der Auswertung der Fotosyntheseaktivität in den verschiedenen pH-Werten wurden die Fotosyntheseaktivitäten der drei Algenkulturen miteinander auf Unterschiede hin untersucht. Anschließend erfolgte die Auswertung der Fotosyntheseaktivität über einen Bereich der pH-Werte zwischen 5 und 10 innerhalb einer Algenkultur. Um die einzelnen pH-Werte zu bestimmen, die Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität haben, wurde die Fotosyntheseaktivität im pH-Wert mit der Referenz der jeweiligen Algenkultur verglichen.

In einer Gesamtbetrachtung ist der Einfluss der Kultivierung verschiedener Algenkulturen vom gleichen Kultivierungsort berücksichtigt worden. Algen sind ein biologisches System, so dass die Messwerte abhängig vom physiologischen Zustand einer Algenkultur schwanken können (Myers 1953). Die Kultivierung der Algen für den Algenschnelltest findet immer am gleichen Ort statt. Dennoch sind Schwankungen im Niveau der Fotosyntheseaktivität der Algenkulturen möglich. Der unterschiedliche physiologische Zustand der Algenkulturen durch Einflüsse auf die Kultivierung, wurde mit zusätzlichen Messreihen aus Versuchen von Algenkulturen des gleichen Kultivierungsortes wie die Algenkulturen der eigenen Versuche berücksichtigt.

### 2.2.5.1 Einfaktorielle Varianzanalyse

Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde zur Untersuchung von Unterschieden zwischen den Algenkulturen und zwischen den Messreihen innerhalb einer Algenkultur verwendet. Ein mit dem Test berechneter Wert  $F_{\text{Vers}}$  wird mit einem tabellierten Wert  $F_{\text{Tab}}$  verglichen. Ist die berechnete Testgröße größer als der tabellierte Wert, so sind die Messreihen signifikant verschieden. Für die Untersuchung aller Messreihen innerhalb einer Algenkultur wurde folgende Ausgangshypothese aufgestellt:

- $F_{\text{Vers}} \leq F_{\text{Tab}}$ : Die Fotosyntheseaktivität der Messreihen im für den Algenschnelltest relevanten Bereich der pH-Werte von 5 bis 10 innerhalb der jeder Algenkulturen (AK1, AK2 und AK3) unterschieden sich nicht signifikant.

Die Ausgangshypothese, ob zwischen den Algenkulturen signifikante Unterschiede vorlagen lautete:

- $F_{\text{Vers}} \leq F_{\text{Tab}}$ : Zwischen den Testalgenkulturen treten keine signifikanten Unterschiede auf.

Mit der ANOVA werden Ähnlichkeiten von drei oder mehr Gruppen anhand einer Gesamtvariabilität bewertet. Die Gesamtvariabilität setzt sich zusammen aus der Variabilität innerhalb jeder Messreihe und der Streuung zwischen den Mittelwerten der Messreihen (Reststreuung). Aus den Komponenten wird der Wert  $F_{\text{Vers}}$  berechnet. Der tabellierte  $F_{\text{Tab}}$  Wert wird aus der F-Verteilung des gewählten Signifikanzniveaus mit der Vorschrift  $F_{N-k}^{k-1}$  abgelesen. Die Freiheitsgrade werden aus der Anzahl der Messreihen ( $k$ ) und Messwerte ( $N$ ) bestimmt. Der Wert  $F_{\text{Tab}}$  ist ein Grenzwert für übliche Streuung von Varianzen normalverteilter Messdaten bei gleicher Anzahl von Messwerten und Messreihen. Für die zuverlässige Anwendung des Verfahrens muß gewährleistet sein, dass die Messreihen normalverteilt sind und dass die Varianzen der zu vergleichenden Messreihen homogen sind (Köhler et al 2012). Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde jede Messreihe auf Normalverteilung hin überprüft. Die Homogenität der Varianzen zwischen den Messreihen wurde mit dem Levene-Test durchgeführt.

#### 2.2.5.2 t-Test

Der t-Test wurde zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Fotosyntheseaktivität in der Referenz und im pH-Wert veränderten M4-Medium innerhalb einer Algenkultur angewendet. Ein aus den Messreihen berechneter Wert  $t_{\text{Ver}}$  wird mit einem tabelliertem Wert  $t_{\text{Tab}}$  verglichen. Ist  $t_{\text{Tab}}$  größer oder gleich  $t_{\text{Ver}}$ , besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten. Für den Test wurde folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

- $t_{\text{Ver}} \leq t_{\text{tab}}$ : Die Fotosyntheseaktivität in der Referenz unterscheidet sich nicht signifikant von der Fotosyntheseaktivität in M4-Medium mit verändertem pH-Wert.

Mit dem t-Test für unabhängige Stichproben lassen sich bei Erfüllung der Voraussetzungen zwei Messreihen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Messwerten vergleichen (Köhler et al. 2012). Aus beiden Messreihen wird eine gemeinsame Standardabweichung berechnet. Aus der Differenz der Mittelwerte der

Messreihen, der gemeinsamen Standardabweichung und der Anzahl der Messreihen wird ein  $t_{\text{ver}}$  berechnet. Aus der zweiseitigen t-Tabelle wird in Abhängigkeit vom Signifikanzniveau und der Anzahl der Messwerte der tabellierte Wert  $t_{\text{Tab}}$  abgelesen. Zur zuverlässigen Anwendung im entsprechenden Signifikanzniveau müssen die zu vergleichenden Messreihen normalverteilt sein und gleiche Varianzen aufweisen. Die Prüfung auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Die Gleichheit der Varianzen der zwei Messreihen wurde mit dem Varianzquotiententest (F-Test) geprüft (Köhler et al. 2012).

### **2.2.5.3 Abweichungen aus mehreren Algenkulturen**

Als Grundlage zur Bestimmung einer übergreifenden Standardabweichung sind insgesamt drei Referenzmessreihen aus den eigenen Versuchen und der vier Referenzmessreihen aus vorherigen Versuchen unter annähernd gleichen Bedingungen verwendet worden (Schott 2015). Aus den Standardabweichungen der sieben Referenzmessreihen ist die durchschnittliche Standardabweichung berechnet worden. Die ermittelte neue Standardabweichung galt als Maß für die Abweichungen der Fotosyntheseaktivitäten beruhend auf zufälligen Einflüssen. Eine höhere Abweichung, als die Differenz aus Messwerten einer pH-Stufe und Referenzmessungen der jeweiligen Algenkultur ist als signifikant unterschiedlich bewertet worden.

### **2.2.5.4 Shapiro-Wilk-Test**

Der Shapiro-Wilk-Test ist ein statistischer Test der ausschließlich zur Überprüfung der Normalverteilung geeignet ist. Im Gegensatz zu anderen Tests zeichnet sich der Shapiro-Wilk-Test durch eine besonders hohe Trennschärfe bei kleinerer Anzahl von Stichproben aus. Als Kriterium wird aus der Messreihe die Testgröße  $W$  nach Shapiro und Wilk berechnet. Die errechnete Testgröße  $W$ , wird anschließend mit einem tabellierten kritischen Wert  $W$  verglichen. Der kritische Wert ist von dem Stichprobenumfang  $n$  und dem gewählten Signifikanzniveau  $\alpha$  abhängig. Ist die berechnete Testgröße  $W$  kleiner als der kritische Wert  $W$ , sind die geprüften Daten mit dem angegebenen Signifikanzniveau nicht normalverteilt (Shapiro und Wilk 2009).

Um die Vergleichbarkeit eigener Daten mit Daten aus einer anderen Arbeit (Schott 2015) zu gewährleisten, ist ein Signifikanzniveau von 5% ( $\alpha = 0,05$ ) gewählt worden.

#### **2.2.5.5 Levene-Test**

Als Voraussetzung für den statistischen Test ANOVA ist die Homogenität der Varianzen zwischen mehr als zwei Messreihen mit dem Levene-Test geprüft worden. Mit Hilfe des Gruppenmittelwertes und transformierter absoluter Abweichungen kann die Testgröße F berechnet werden. In Abhängigkeit vom Signifikanzniveau, der Anzahl der Messreihen und Messwerten wird der tabellarische Wert von F abgelesen. Ist der berechnete Testwert F kleiner oder gleich dem tabellarischen Wert  $F_{\text{tab}}$ , so sind die Varianzen homogen (Köhler et al 2012).

#### **2.2.5.6 F-Test**

Der Varianzquotiententests (F-Test) wurde zur Prüfung auf Gleichheit der Varianzen zwischen zwei Messreihen verwendet. Nur Messreihen mit gleichen Varianzen sind für die statistische Auswertung mit dem t-Test für unabhängige Stichproben zugelassen. Der auf der F-Verteilung beruhende Test für Messreihen mit normalverteilter Grundgesamtheit setzt die Varianzen der Messreihen ins Verhältnis zueinander (Köhler et al 2012). Die größere Varianz steht dabei stets im Zähler. Das berechnete Verhältnis ergibt die Testgröße F, die mit dem tabellierten Vergleichswert  $F_{\text{krit}}$  verglichen wird. Die Freiheitsgrade ergeben sich aus der Anzahl der Messreihen minus eins. Die Anzahl der Messreihe der größeren Varianz steht auch in der Ablesevorschrift im Zähler  $F_{n-1}^{n-1}$  (Köhler et al 2012).

Für die Anwendung des Varianzquotiententest gilt für die Prüfung auf die Gleichheit der Varianzen die zweiseitige F-Tabelle des entsprechenden Signifikanzniveaus (Köhler et al 2012).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuch: Fotosyntheseaktivitäten im breiten pH-Bereich

Im Vorversuch ist die Fotosyntheseaktivität der Testalge in sehr saurem pH-Wert von ca. 2 bis zu einem sehr basischen pH-Wert von ca. 12 in Abständen von zwei pH-Werten gemessen worden. Der pH-Wert im M4-Medium veränderte sich über den Zeitraum der Einstellung des pH-Wertes bis zur Zugabe der Alge. Am stärksten veränderte sich der pH-Wert des M4-Mediums, das auf den pH-Wert 6 eingestellt wurde. Die Messung der Fluoreszenzaktivität ist anstatt bei dem voreingestellten pH-Wert 6 bei einem pH-Wert von 7,1 durchgeführt worden.

In Abbildung 5 sind die Mittelwerte der Fotosyntheseaktivität aus jeweils drei Einzelmessungen je pH-Wert in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.

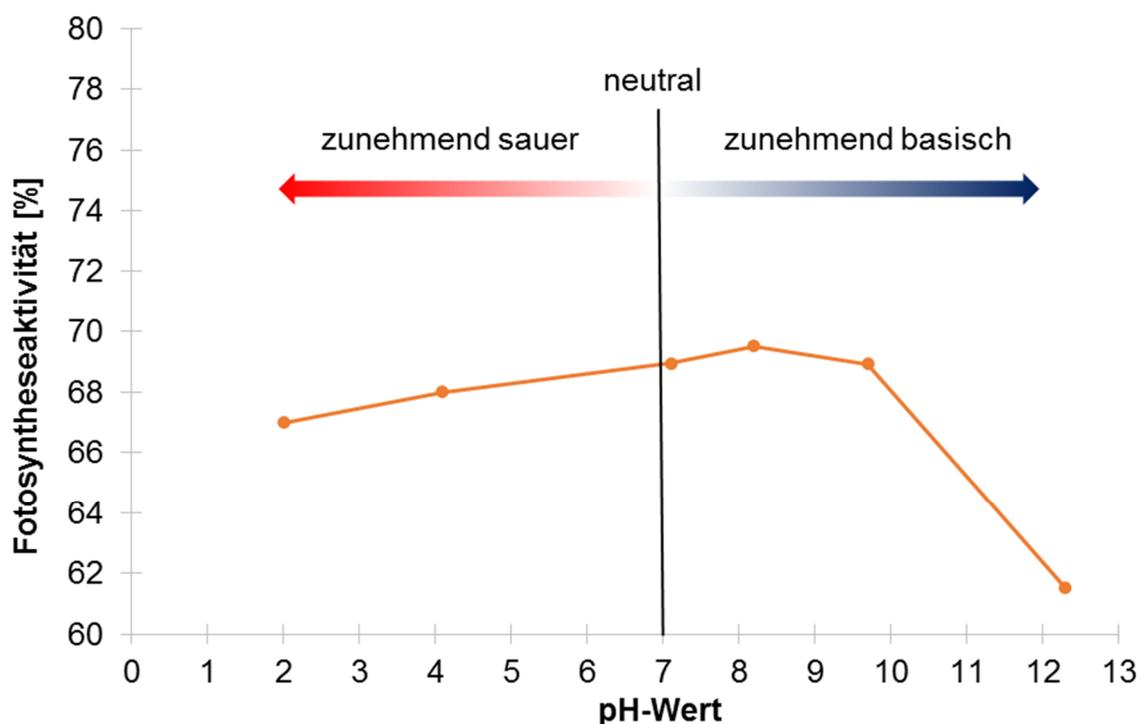


Abbildung 5: Mittelwerte der Fotosyntheseaktivitäten aus drei Einzelmessungen gleicher Chlorophyllkonzentration in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Die Fotosyntheseaktivität stieg im Verlauf der Messungen in den pH-Werten von 2,0 bis 8,2 von 67,0 % bis auf das Maximum von 69,2 % an. Im basischen pH-Wert 9,7 sank die Fotosyntheseaktivität erst leicht auf 68,9 % und fiel bei pH 12,3 deutlich auf

61,5 % ab. Der Bereich in dem die Fotosyntheseaktivität die geringsten Änderungen zeigte, lag zwischen dem neutralen pH-Wert 7,2 bis zum basischen pH 9,8. Die Messungen im M4-Medium mit dem höchsten Wert der Fotosyntheseaktivität sind im Versuchszeitraum von ca. 5 Stunden als erstes erfolgt. Drei Kontrollmessungen am Ende des Versuchszeitraums im M4-Medium mit gleichem pH-Wert haben den höchsten Wert von 69,5 % für die Fotosyntheseaktivität bei einem pH-Wert von 8,0 bestätigt.

Die Messung der pH-Werte im M4-Medium nach der Bestimmung der Fotosyntheseaktivität wurde noch umgehend in der Messküvette vorgenommen. Die Differenzen des pH-Wertes im M4-Medium vor der Algenzugabe bis nach der Messung der Fotosyntheseaktivität schwankten zwischen pH-Werten von 0,2 bis -0,3 (Tabelle 3). Ab pH-Wert 7,2 nahm der pH-Wert im M4-Medium ab. Die größte Differenz wurde im M4-Medium mit pH-Wert 8,0 von pH 0,3 gemessen.

**Tabelle 3: Differenzen der pH-Werte aus dem pH-Wert in der Messküvette nach dem Messvorgang abzüglich des pH-Wertes des M4-Mediums direkt vor dem Beimpfen mit der Alge**

<b>pH-Wert vor Beimpfung</b>	<b>2,0</b>	<b>4,1</b>	<b>7,2</b>	<b>8,0</b>	<b>8,2</b>	<b>9,8</b>	<b>12,4</b>
<b>pH-Wert Differenz</b>	0,0	0,2	-0,1	-0,3	-0,1	-0,1	-0,1
<b>Temperaturdifferenz in °C</b>	2,0	0,9	0,8	1,0	0,7	0,9	0,8

Aufgrund der geringen Veränderungen, in für den Algenschnelltest relevanten Bereich der pH-Werte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein pH-Wert von 5 bis pH 10 keinen signifikanten Einfluss auf das Testverfahren hat.

## 3.2 Ergebnisse des Hauptversuches

### 3.2.1 Messergebnisse

In drei Hauptversuchen sind die Fotosyntheseaktivitäten der *Chlorella vulgaris* in jeweils einer Algenkultur (AK) aus annähernd gleichen Kultivierungsbedingungen im M4-Medium mit pH-Werten zwischen ca. 5 bis ca. 11 in jeweils fünf Einzelmessungen bestimmt worden. Ebenfalls sind die Fotosyntheseaktivitäten der Alge im Referenzmedium (M4-Medium) für jeden Versuch verteilt über Einzelmessungen am Anfang, am Ende und in der Mitte des Versuchszeitraums gemessen worden. Die Ergebnisse der durchschnittlichen Fotosyntheseaktivität mit Standardabweichung je Algenkultur in Abhängigkeit vom pH-Wert sind in Abbildung 6 dargestellt.

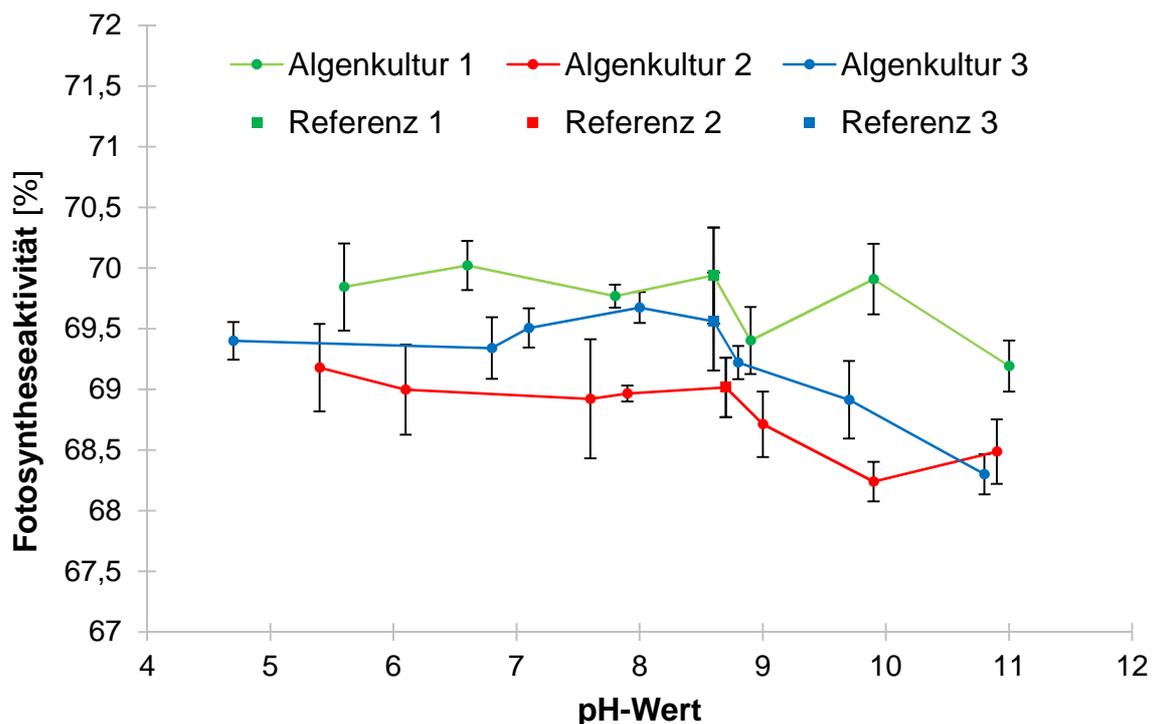


Abbildung 6: Mittelwerte der Fotosyntheseaktivitäten aus fünf Einzelmessungen gleicher Chlorophyllkonzentration in Abhängigkeit vom pH-Wert (runde Markierungen) und Mittelwerte der Fotosyntheseaktivitäten der Referenzmessreihen (eckige Markierung) aus unterschiedlicher Anzahl von Einzelmessungen je Algenkultur.

Die niedrigsten Werte für die Fotosyntheseaktivität sind für die AK1 wurde bei pH-Wert 11, für die AK2 bei pH 9,9 und bei pH 10,8 für die AK 3 gemessen worden. Die

höchsten Fotosyntheseaktivitäten hatten die Algen der AK1 bei pH-Wert 6,6, der AK2 bei pH 5,4 und der AK3 bei pH 8,0. Ausgehend vom pH-Wert der Referenz lagen die Fotosyntheseaktivitäten im basischen Bereich ab etwa pH-Wert 9 in 8 von 9 Fällen unter dem Referenzwert. Die Messung der Fluoreszenzaktivität der AK2 war bei pH-Wert 9,9 war höher als der Referenzwert. Die Messreihe mit dem pH-Wert 9,9 der AK2 hatte eine Standardabweichung von  $\pm 0,3\%$  und befand sich im mittleren Bereich der Standardabweichungen anderer Messreihen. Von 11 Werten im M4-Medium mit einem pH-Wert unterhalb des pH-Wertes der Referenzmessungen, wurden in 6 Fällen höhere Fotosyntheseaktivitäten gemessen. Eine eindeutige Tendenz war in zunehmend niedrigeren pH-Werten unterhalb der Referenz nicht feststellbar. Die relativen Abweichungen der Fotosyntheseaktivität in den eingestellten pH-Werten wich in keiner Algenkultur mehr als 2% vom Referenzwert ab.

Die Temperaturen der Algensuspensionen stiegen im Verlauf der Versuche stetig an, überschritten aber den vorgeschriebenen Temperaturbereich von  $22 \pm 2\text{ °C}$  nicht. Die Temperatur der AK 1 stieg um  $0,9\text{ °C}$  auf  $22,3\text{ °C}$ , die der AK 2 um  $2,3\text{ °C}$  auf  $23\text{ °C}$  und die der AK3 um  $1,3\text{ °C}$  auf  $23,6\text{ °C}$ .

### **3.2.1.1 Messergebnisse im Referenzmedium**

Der pH-Wert im M4-Medium der Referenzmessungen AK1 und AK 2 reduzierte sich von den Messungen zu Versuchsbeginn hin zu den Abschlussmessungen um 0,5 und 0,3. Trotz der größten Temperaturdifferenz im AK3 Referenzmedium von  $0,6\text{ °C}$ , veränderte sich der pH-Wert nicht.

In Abbildung 7 sind die Fotosyntheseaktivitäten in Abhängigkeit von der Messreihenfolge dargestellt.

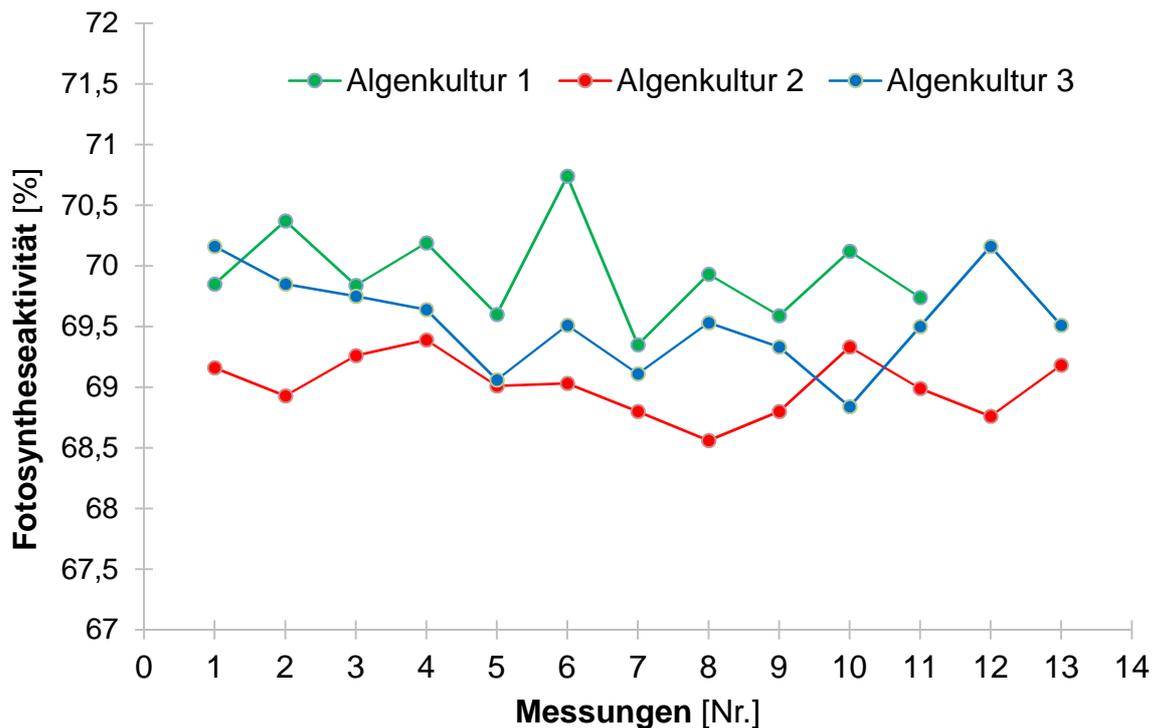


Abbildung 7: Messwerte der Fotosyntheseaktivität der Referenzreihen in Abhängigkeit von der Messreihenfolge jeder AK in M4-Medium. Der durchschnittliche pH-Wert des M4-Mediums für die AK 1 (grün) betrug 8,6, der für die AK 2 (rot) 8,7 und für die AK 3 (blau) 8,6. Innerhalb der Messreihen wurde die gleiche Chlorophyllkonzentration verwendet.

Die Referenzmessreihe bestand aus fünf Einzelmessungen am Anfang, fünf Einzelmessungen am Ende und drei Einzelmessungen in der Mitte jeder Algenkultur. Aus Zeitgründen entfielen zwei Messungen der AK1 am Ende. Die Fotosyntheseaktivitäten im Referenzmedium schwankten im Versuchsverlauf geringfügig. Trotz der Temperaturzunahme in allen Algensuspensionen und der Reduzierung des pH-Wertes der Algensuspension AK1 und AK 2, war keine abnehmende oder zunehmende Tendenz der Fotosyntheseaktivität der Alge erkennbar.

Die Standardabweichungen der Fotosyntheseaktivität der AK1 war 0,4 %, der AK 2 0,25 % und der AK 3 0,4 %.

### 3.2.1.2 Chlorophyllkonzentrationen der pH-Werte

Das Volumen zur Einstellung der Chlorophyllkonzentration in 25 ml M4-Medium aus der AlgenstammLösung wurde ausgehend von der ersten Messung berechnet. Das berechnete Volumen der Algensuspension ist in jeder Messküvette mit der gleichen Pipette und Einstellung übertragen worden. In Abbildung 8 sind die mittleren Messwerte der Chlorophyllkonzentration (CK) und die mittleren Fotosyntheseaktivitäten (FA) je pH-Wert und Algenkultur (AK) dargestellt.

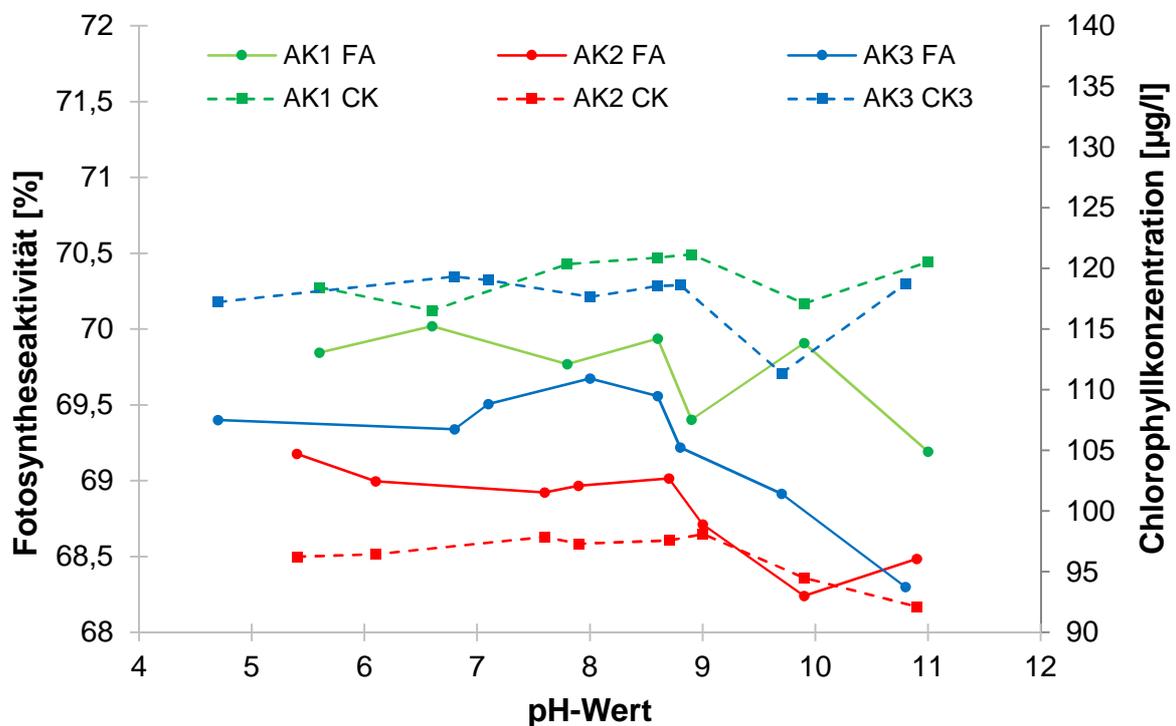


Abbildung 8: Mittlere Messwerte der Chlorophyllkonzentration in µg/l je pH-Wert und Algenkultur (AK CK) im Vergleich zur mittleren Fotosyntheseaktivität der Alge je pH-Wert und Algenkultur (AK FA). Innerhalb jeder Algenkultur wurde das gleiche Volumen zur Konzentrationseinstellung Chlorophyllkonzentration in den Messküvetten auf 25 ml M4-Medium der jeweiligen pH-Stufe verwendet.

Trotz gleichem pipettierten Volumen wiesen die gemessene Chlorophyllkonzentration der pH-Werte nicht die gleichen mittleren Messwerte auf. Die niedrigsten mittleren Fotosyntheseaktivitäten und Chlorophyllkonzentration wurden in der AK2 gemessen. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Fotosyntheseaktivitäten und der unterschiedlichen Chlorophyllkonzentrationen war nicht erkennbar.

### 3.2.1.3 Änderungen der pH-Werte im M4-Medium

Die Start-pH-Werte des M4-Mediums schwankten inneralb von fünf Beimpfungen in Abständen von drei Minuten je M4-Medium in keinem Medium um mehr als maximal pH 0,09.

Um pH-Wert Änderungen im M4-Medium durch die Algen zu bewerten, ist der pH-Wert des M4-Mediums vor der Algenzugabe und nach der Messung der Fotosyntheseaktivität bestimmt worden. Aus den zwei zeitlich versetzten pH-Wert Messungen ist die Differenz ausgehend vom Start-pH-Wert ( $\Delta\text{pH}$ ) bestimmt worden. Zum Vergleich wurde die mittlere Differenz aus den pH-Werten und die mittlere Fotosyntheseaktivität (FA) der Algen je pH-Wert in Abbildung 9 dargestellt.

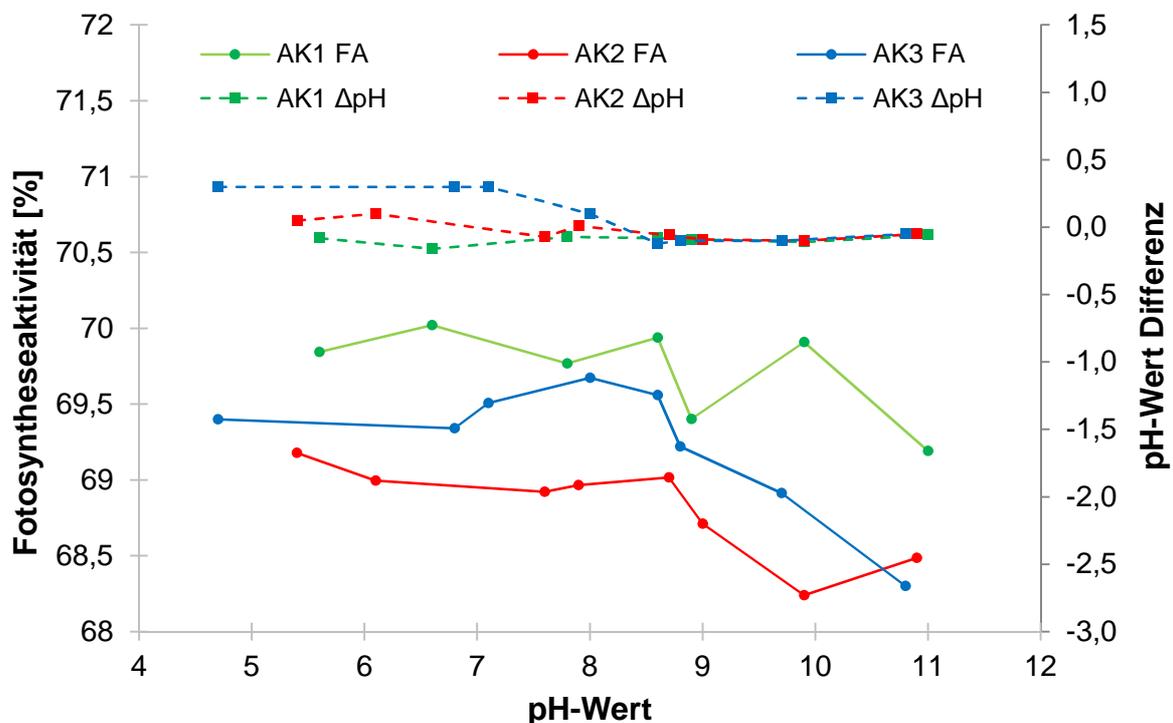


Abbildung 9: Mittlere Differenz des pH-Wertes im M4-Medium vor Algenzugabe bis nach der Messung der Fotosyntheseaktivität im Vergleich zur mittleren Fotosyntheseaktivität (FA) der Alge nach 15 minütiger Dunkelinkubation in Abhängigkeit zum pH-Wert je Algenkultur. Die Verweildauer der Alge im M4-Medium mit entsprechendem pH-Wert betrug ca. 18 Minuten.

Ein Zusammenhang zwischen den pH-Wert-Differenzen im M4-Medium und der Höhe der gemessenen Fotosyntheseaktivität wurde nicht festgestellt. Im basischen pH-Werten ab 9 lagen die Differenzen nahe Null. Änderungen im pH-Wert konnten vorwiegend in sauren und neutralen Bereichen festgestellt werden. Insgesamt fielen

die Differenz mit maximal +0,3 und minimal -0,16 sehr gering aus. Eine Abhängigkeit zur Temperatur konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Mittlere Fotosyntheseaktivität je pH-Wert und Algenkultur, sowie die Temperatur- und pH-Wert-Differenz. Der pH-Wert in der die Alge den höchsten mittleren Fotosyntheseaktivität aufwies ist je AK gelb markiert.**

<b>AK1 Start-pH-Wert</b>	<b>Referenz 8,6</b>	<b>5,6</b>	<b>6,6</b>	<b>7,8</b>	<b>-</b>	<b>8,9</b>	<b>9,9</b>	<b>11</b>
<b>Fotosyntheseaktivität in µg/l</b>	69,94	69,84	70,02	69,77	-	69,40	69,91	69,19
<b>pH-Wert Differenz</b>	-0,08	-0,08	-0,16	-0,07	-	-0,09	-0,11	-0,06
<b>Temperaturdifferenz in °C</b>	+1,5	+1,4	+0,9	+1,1	-	+0,9	0,0	+1,0
<b>AK2 Start-pH-Wert</b>	<b>Referenz 8,6</b>	<b>5,4</b>	<b>6,1</b>	<b>7,6</b>	<b>7,9</b>	<b>9,0</b>	<b>9,9</b>	<b>10,9</b>
<b>Fotosyntheseaktivität in µg/l</b>	69,02	69,18	69,00	68,92	68,97	68,71	68,24	68,49
<b>pH-Wert Differenz</b>	-0,06	0,05	0,10	-0,07	0,01	-0,09	-0,10	-0,05
<b>Temperaturdifferenz</b>	+1,5	+1,5	+1,8	+2,0	+2,0	+2,0	+1,8	+1,1
<b>AK 3 Start-pH-Wert</b>	<b>Referenz 8,6</b>	<b>4,7</b>	<b>6,8</b>	<b>7,1</b>	<b>8,0</b>	<b>8,8</b>	<b>9,7</b>	<b>10,8</b>
<b>Fotosyntheseaktivität in µg/l</b>	69,56	69,40	69,34	69,51	69,67	69,22	68,91	68,30
<b>pH-Wert Differenz</b>	-0,12	0,30	0,30	0,30	0,10	-0,10	-0,10	-0,05
<b>Temperaturdifferenz in °C</b>	+0,5	+2,0	+1,7	+1,8	+1,0	+1,7	+1,6	+1,2

### 3.2.2 Hemmung der Fotosyntheseaktivität

Im Algenschnelltestverfahren wird aus den gemessenen Fotosyntheseaktivitäten in M4-Medium als Referenz und der Wasserprobe die relative Hemmung der Fotosyntheseaktivität berechnet. Um den Einfluss des pH-Wertes auf das Kriterium, Hemmung des Algenschnelltests, bewerten zu können, ist die Hemmung aus der Fotosyntheseaktivität der Referenz und der Fotosyntheseaktivitäten in M4 Medium

mit verändertem pH-Werten berechnet worden. Abbildung 10 zeigt die prozentuale erreichte Hemmung der Fotosyntheseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Algenkultur (AK).

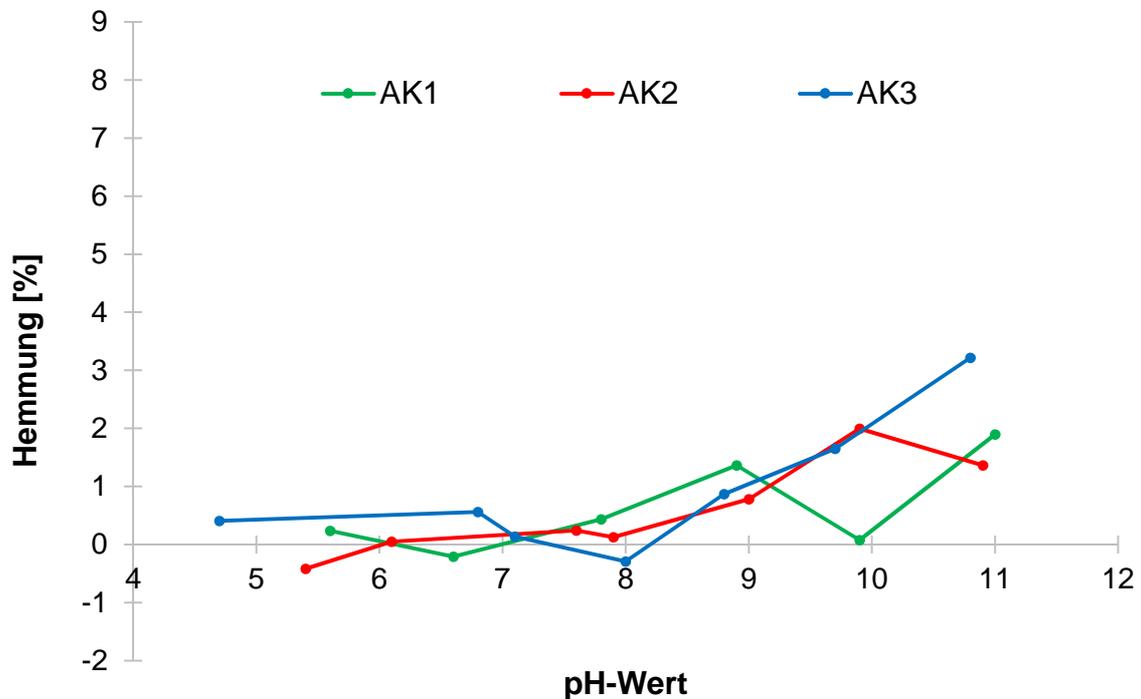


Abbildung 10: Berechnete Hemmung (H) aus der mittleren Fotosyntheseaktivität je pH-Wert und dem Mittelwert der Referenz der Alge *Chlorella vulgaris* jeder Algenkultur.

Mit Ausnahme der geringen Hemmung im pH-Wert 10 der AK1, nahm die Hemmung mit höheren pH-Werten ab ca. 9 zu. Die maximalsten Hemmungen wurden in den pH-Werten 11 und 9,9 erreicht. Bei pH-Wert um 11 betrug die Hemmung der AK 1  $1,90 \pm 0,54$  % und der AK 3  $3,22 \pm 0,15$  %. Die prozentual höchste Hemmung in der AK 2 wurde bei pH-Wert 9,9 mit  $2,00 \pm 0,38$  % gemessen. In den pH-Werten zwischen pH 5 und pH 8 unterlag die Hemmung Schwankungen von  $-0,42$  % bis  $0,56$  %. Die berechneten Hemmungen der Fotosyntheseaktivität zu jedem pH-Wert je Algenkultur können der Tabelle 20 im Anhang entnommen werden.

### 3.3 Statistische Auswertung der Hauptversuche

#### 3.3.1 Prüfung der Voraussetzungen für statistische Tests

##### 3.3.1.1 Shapiro-Wilk-Test (Normalverteilung)

Der Shapiro-Wilk-Tests prüft, ob eine Messreihe normalverteilt ist. Die Messreihe im pH-Wert 9,9 des Versuches der Algenkultur 1 erfüllte nicht die Anforderung der Normalverteilung. Für alle anderen Messreihen lag der berechnete Wert  $W$  über dem, in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen innerhalb einer Messreihe und dem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ermittelten kritischen Wert  $W_{krit}$ . Die einzelnen Ergebnisse je Messreihe des kritische Wertes  $W_{krit}$  und des berechneten Wertes  $W$  sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Ergebnisse der berechneten Größe ( $W=b^2/S^2$ ) und die Auflistung des tabellierten kritischen Wertes  $W_{krit}$  in Abhängigkeit von der Anzahl der Messwerte und dem Signifikanzniveau (5%) jeder pH-Stufe und der Referenzmessreihen.

	Messreihe	Anzahl Messwerte	W	$W_{krit}$
Algenkultur 1	Referenzmessreihe	11	0,865	0,850
	pH-Wert 5,6	5	0,968	0,762
	pH-Wert 6,6	5	0,904	0,762
	pH-Wert 7,8	5	0,849	0,762
	pH-Wert 8,9	5	0,973	0,762
	pH-Wert 9,9	5	0,759	0,762
	pH-Wert 11,0	5	0,881	0,762
Algenkultur 2	Referenzmessreihe	13	0,905	0,866
	pH-Wert 5,4	5,5	0,901	0,762
	pH-Wert 6,1	6	0,972	0,762
	pH-Wert 7,6	5	0,970	0,762
	pH-Wert 7,9	5	0,903	0,762
	pH-Wert 9,0	5	0,855	0,762
	pH-Wert 9,9	5	0,922	0,762
	pH-Wert 10,9	5	0,763	0,762

	Messreihe	Anzahl Messwerte	W	W <sub>krit</sub>
Algenkultur 3	Referenzmessreihe	13	0,964	0,866
	pH-Wert 4,7	5	0,950	0,762
	pH-Wert 6,8	5	0,872	0,762
	pH-Wert 7,1	5	0,898	0,762
	pH-Wert 8,0	5	0,930	0,762
	pH-Wert 8,8	5	0,854	0,762
	pH-Wert 9,7	5	0,902	0,762
	pH-Wert 10,8	5	0,980	0,762

Die vier zusätzlichen Referenzmessreihen aus Versuchen einer anderen Arbeit sind bereits auf eine Normalverteilung getestet worden. Das Ergebnis des Shapiro-Wilk-Tests der vier Referenzmessreihen konnte durch eine Kontrollrechnung bestätigt werden.

### 3.3.1.2 Levene-Test (Varianzhomogenität)

Die Varianzhomogenität zwischen mehr als zwei Messreihen wurde geprüft, indem ein mit dem Levene-Test berechneter Wert F mit dem tabellarischen Wert  $F_{\text{tab}}$  bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  verglichen wurde. Ist der berechnete Testwert F kleiner oder gleich dem tabellarischen Wert F, so sind die Varianzen homogen (Köhler et al 2012).

Homogenität der Varianzen konnte zwischen den Messreihen der Fotosyntheseaktivität in verschiedenen pH-Werten und der Referenzmessreihe innerhalb jeder Algenkultur festgestellt werden. Die Referenzmessreihen der Versuche von AK1 bis AK3 wiesen ebenfalls gleiche Varianzen auf. Der berechnete Testwert F mit 6,7 aus den Referenzmessreihen eigener und zusätzlicher Messreihen überstieg den tabellarischen Wert  $F_{\text{tab}}$  3,7 deutlich. Für diese Messreihen lag keine Varianzhomogenität vor. Die berechneten Werte F aus den Messreihen und der Vergleichswert  $F_{\text{tab}}$  je Algenkultur und tabellierter Prüfgröße sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6: Ergebnisse der berechneten Testgröße F des Levene-Tests und dem tabellierten Vergleichswert  $F_{krit}$  für ein Signifikanzniveau von 5%**

	<b>Gruppen</b>	<b>Anzahl Messreihen</b>	<b>Anzahl Messwerte</b>	<b>F</b>	<b><math>F_{tab}</math></b>
<b>Algenkultur 1</b>	pH-Wert 5,6 bis pH-Wert 8,9	5	30	1,7	2,7
<b>Algenkultur 2</b>	pH-Wert 5,4 bis pH-Wert 9,9	7	42	1,4	2,4
<b>Algenkultur 3</b>	pH-Wert 5,0 bis pH-Wert 9,7	7	42	1,6	2,4
<b>Referenzmessreihen</b>	AK1 bis AK 2	3	36	1,3	3,3
<b>Referenzmessreihen</b>	eigene & zusätzliche	7	142	6,7	1,8

### 3.3.1.3 Varianzquotiententest (Varianzhomogenität)

Die Prüfung auf Varianzhomogenität zwischen zwei Messreihen ist mit Hilfe des Varianzquotiententests durchgeführt worden. Ist die berechnete Testgröße F größer als der tabellierte Vergleichswert  $F_{krit}$  bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$ , sind die Varianzen der zwei Messreihen inhomogen.

Drei Messreihen der pH-Werte 7,8 der AK1, pH 7,9 der AK2 und pH 8,0 der AK3 wiesen inhomogene Varianzen mit der jeweiligen Referenzmessreihe auf. In Tabelle 7 sind alle Ergebnisse des Varianzquotiententests aufgeführt. Die Standardabweichung, der für den t-Test nicht zugelassenen Messreihen, waren auffällig geringer als die Standardabweichungen der anderen Messreihen

Tabelle 7: Ergebnisse der berechneten Testgröße F des Varianzquotiententests und dem tabellierten Vergleichswert  $F_{krit}$  für ein Signifikanzniveau von 5%

	Messreihen	Anzahl Messwerte	F	$F_{krit}$
Algenkultur 1	Referenzmessreihe & pH-Wert 5,4	15	1,2	8,8
	Referenzmessreihe & pH-Wert 6,6	15	3,8	8,8
	Referenzmessreihe & pH-Wert 7,8	15	17,4	8,8
	Referenzmessreihe & pH-Wert 8,9	15	2,1	8,8
	Referenzmessreihe & pH-Wert 11,0	15	3,5	8,8
Algenkultur 2	Referenzmessreihe & pH-Wert 5,4	17	2,2	4,1
	Referenzmessreihe & pH-Wert 6,1	17	2,3	4,1
	Referenzmessreihe & pH-Wert 7,6	17	4,0	4,1
	Referenzmessreihe & pH-Wert 7,9	17	13,9	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 9,0	17	1,2	4,1
	Referenzmessreihe & pH-Wert 9,9	17	2,3	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 10,9	17	1,2	4,1
Algenkultur 3	Referenzmessreihe & pH-Wert 5,0	17	6,5	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 6,8	17	2,4	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 7,1	17	6,0	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 8,0	17	9,6	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 8,8	17	8,4	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 9,7	17	1,5	8,7
	Referenzmessreihe & pH-Wert 10,8	17	5,7	8,7

### 3.3.2 Unterschiede zwischen den Algenkulturen

Anhand der Referenzmessreihen der drei Algenkulturen wurde mit der einfaktoriellen Varianzanalyse geprüft worden, ob die sich die Algenkulturen trotz gleicher Versuchsbedingungen signifikant unterscheiden.

Da der berechnete Wert  $F_{\text{Vers}}$  größer ist als der tabellierte Wert  $F_{\text{Tab}}$  bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Referenzmessreihen der drei Algenkulturen. Die Ausgangshypothese, dass zwischen den Testalgenkulturen keine signifikanten Unterschiede auftreten, muss verworfen werden.

Tabelle 8: Ergebnis der berechneten Testgröße  $F_{\text{Vers}}$  mittels einfaktorieller Varianzanalyse der Referenzmessreihen AK1 bis AK3 und tabellierter Vergleichswert  $F_{\text{Tab}}$  für ein Signifikanzniveau von 5% mit der Ablesevorschrift  $F_{N-k}^{k-1}$ . Ebenso ist der zufällige Fehler als Variabilität zwischen den Messreihen (SQZ) und der Restfehler als die Streuung der Variabilität innerhalb der Messreihen (SQI) aufgelistet.

	$F_{\text{Vers}}$	$F_{\text{Tab}}$	SQZ	SQI	Anzahl Messreihen ( $k$ )	Anzahl Messwerte ( $M$ )
<b>Referenzmessreihen Algenkultur 1 bis 3</b>	<b>20,9</b>	<b>3,28</b>	<b>5,20</b>	<b>4,24</b>	<b>3</b>	<b>36</b>

Die Höhe der Variabilität von Effekte zwischen den Messreihen (SQZ) war mit 5,20 nur gering größer als der Restfehler innerhalb der Messreihen (SQI) mit 4,24. Aus den beiden Komponenten ergab sich eine Gesamtvariabilität für die Fotosyntheseaktivitäten der Referenzmessreihen der Algenkulturen von 9,43.

### 3.3.3 Unterschiede innerhalb der Algenkulturen

Mit der ANOVA wurden mehrere Messreihen innerhalb einer Algenkultur untersucht, um festzustellen ob grundsätzlich ein Unterschied der Fotosyntheseaktivität zwischen den Messreihen vorlag. Aus den Messreihen jeder Algenkultur wurde die Testgröße  $F_{\text{Vers}}$  berechnet und mit dem tabellierten Wert  $F_{\text{Tab}}$  bei einem Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  verglichen. Die Ablesevorschrift für den Wert  $F_{\text{Tab}}$  kann dem Kapitel 5.2.2.1 entnommen werden.

Die Ausgangshypothese zur Untersuchung der Messreihen innerhalb einer Algenkultur lautete:

- $F_{\text{Vers}} \leq F_{\text{Tab}}$ : Die Fotosyntheseaktivitäten der Messreihen im für den Algenschnelltest relevanten Bereich der pH-Werte von 5 bis 10 innerhalb der einer Algenkultur unterscheiden sich nicht signifikant.

Nach der Überprüfung der Voraussetzungen entfiel aus dem Versuch mit der AK1 die Messreihen der Fotosyntheseaktivität im pH-Wert 9,9. Die restlichen Messreihen der AK1 in einem Bereich der pH-Werte von 5,6 bis 8,9 wurden für die ANOVA zugelassen. Aus den Versuchen der AK2 und AK3 konnten die pH-Werte der Bereich von 5,4 bis 9,9 und pH 4,7 bis pH 9,7 für die Auswertung zugelassen werden. Der Bereich der pH-Werte umfasst auch die jeweilige Referenzmessreihe der Algenkulturen. Gründen der Übersichtlichkeit sind die pH-Werte in den Darstellungen und Tabellen dieses Kapitels auf volle und halbe Zahlenwerte gerundet worden.

Das Ergebnis des berechneten Wertes  $F_{\text{Vers}}$  mit der ANOVA und des tabelliertes Wertes  $F_{\text{Tab}}$  für die Fotosyntheseaktivität der Messreihen der pH-Werte zwischen 5 und 10 je Algenkultur sind in Abbildung 11 dargestellt.

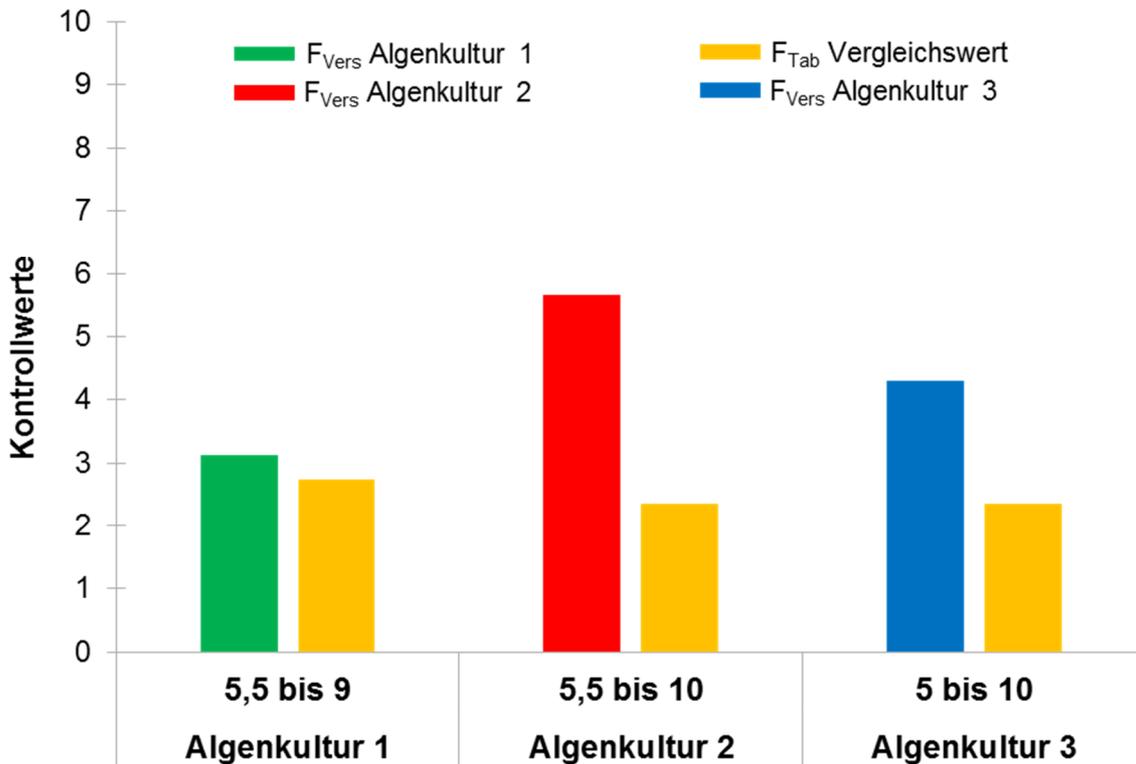


Abbildung 11: Berechnete Werte ( $F_{Vers}$ ) und ermittelte ( $F_{Tab}$ ) Kontrollwerte für die pH-Werte zwischen pH 5 und pH 10 und Referenz jeder Algenkultur. Ist der berechnete Wert  $F_{Vers}$  größer als der tabellierte Wert  $F_{Tab}$  (orange), sind zwischen den Messreihen signifikante Unterschiede.

Der Vergleichswert  $F_{Tab}$  (orange) ist für jede Algenkultur größer als der aus den zugelassenen Messreihen zwischen pH-Werten 5 und 10 berechnete Wert  $F_{Vers}$ . In allen Algenkulturen unterschieden sich die Messreihen der Fotosyntheseaktivität im Bereich der pH-Werte 5 bis 10 signifikant. Die Ausgangshypothese, dass der pH-Wert keinen signifikanten Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität der Alge *Chlorella vulgaris* wurde abgelehnt.

Die zufälligen Fehler, repräsentiert durch die Komponente SQZ, waren in allen Algenkulturen niedriger, als der Restfehler innerhalb der Messreihen (SQI). Die berechneten Werte, der tabellierte Werte, die Ablesekriterien für den tabellierten Wert und die Fehler sind nachfolgend in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Ergebnisse des berechneten Wertes  $F_{\text{Vers}}$  mit ANOVA und Vergleichsgröße  $F_{\text{Tab}}$  für ein Signifikanzniveau von 5% mit der Ablesevorschrift  $F_{N-k}^{k-1}$  je Algenkultur.  $k$  ist die Anzahl der Messreihen und  $N$  ist die Anzahl der Messwerte. Ebenso ist der zufällige Fehler als Variabilität zwischen den Messreihen (SQZ) und der Restfehler als die Streuung der Variabilität innerhalb der Messreihen (SQI) aufgelistet.

	Algenkultur 1	Algenkultur 2	Algenkultur 3
<b>pH-Werte von</b>	<b>5,5 bis 9</b>	<b>5,5 bis 10</b>	<b>5 bis 10</b>
<b><math>F_{\text{Vers}}</math></b>	3,13	5,65	4,30
<b><math>F_{\text{Tab}}</math></b>	2,74	2,36	2,36
<b>k</b>	5	7	7
<b>N</b>	30	42	42
<b>SQZ</b>	1,24	2,98	2,12
<b>SQI</b>	2,58	3,17	2,96

### 3.3.4 Unterschiede zur Referenz

Mit dem t-Test für unabhängige Stichproben wurde Fotosyntheseaktivität in den einzelnen pH-Werten mit der Fotosyntheseaktivität in der Referenz verglichen. Ist der aus den Messreihen berechnete Wert  $t_{\text{Ver}}$  kleiner oder gleich groß wie der tabellierte Vergleichswert  $t_{\text{Tab}}$ , besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Messreihen.

Die Voraussetzungen für diesen Test wurden von den pH-Werten 7,8 und 9,9 der AK1, pH 7,9 der AK2 und pH 8,0 der AK3 nicht erfüllt. Eine Abdeckung über den gesamten Bereich der untersuchten pH-Werte war trotzdem möglich. Die Ergebnisse der berechneten Größe  $t_{\text{Ver}}$  und des Vergleichswert  $t_{\text{Tab}}$  sind in Abbildung 12 dargestellt.

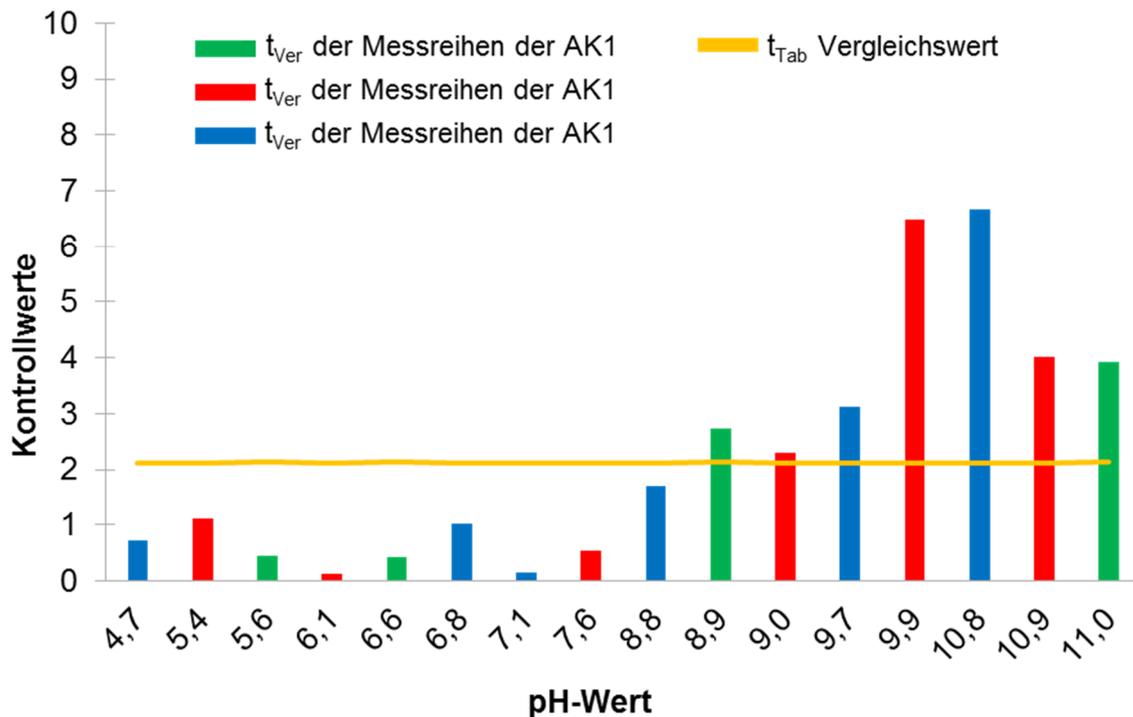


Abbildung 12: Berechnete Werte ( $F_{Vers}$ ) und ermittelte ( $F_{Tab}$ ) Kontrollwerte für die pH-Werte zwischen pH 5 und pH 10 und Referenz jeder Algenkultur. Ist der berechnete Wert  $F_{Vers}$  größer als der tabellierte Wert  $F_{Tab}$  (orange), sind zwischen den Messreihen signifikante Unterschiede.

Insgesamt wurden konnten 16 Messreihen mit pH-Werten von 4,7 bis 11,0 mit der jeweiligen Referenzmessreihe der Algenkultur ausgewertet werden. Die Unterschiede des Vergleichswertes  $t_{Tab}$  nahmen ab pH-Werten von 8,8 in allen Algenkulturen zu. Signifikante Unterschiede durch Überschreitung des Vergleichswert lagen für die Fotosyntheseaktivität der pH-Werte 8,9 und 11 der AK1, pH 9, 9,9 und 10,9 der AK2 und pH 9,7 und 10,8 der AK3 vor. Eine Zunahme der Unterschiede im M4-Medium mit pH-Wert 8,8 der AK3 ist anhand des berechneten Vergleichswertes ersichtlich. Die pH-Werte Referenzmessreihen betragen für AK1 8,6, AK2 8,7 und AK3 8,6. Der Grenzbereich für einen signifikanten Einfluss des pH-Wertes der AK1 und AK3 lag knapp oberhalb des pH-Wertes der Referenz selbst. Die Ausgangshypothese, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität der Alge *Chlorella vulgaris* hat muss für pH-Werte ab ca.9 abgelehnt werden.

Tabelle 10: Ergebnisse des Vergleichs der Fotosyntheseaktivität der Alge in M4-Medium mit eingestelltem pH-Wert zur Fotosyntheseaktivität der Alge in der Referenz mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben. Aufgeführt sind der berechnete Wert  $t_{Ver}$  und die Vergleichsgröße  $t_{Tab}$  für ein Signifikanzniveau von 5%.

	Gruppen	Anzahl Gruppen	Anzahl Messwerte	$t_{Ver}$	$t_{Tab}$
Algenkultur 1	Referenzmessreihe & pH-Wert 5,6	2	15	0,45	2,14
	Referenzmessreihe & pH-Wert 6,6	2	15	0,43	2,14
	Referenzmessreihe & pH-Wert 7,8	2	15	0,93	2,14
	Referenzmessreihe & pH-Wert 8,9	2	15	2,72	2,14
	Referenzmessreihe & pH-Wert 11,0	2	15	3,92	2,14
Algenkultur 2	Referenzmessreihe & pH-Wert 5,4	2	17	1,11	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 6,1	2	17	0,13	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 7,6	2	17	0,55	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 9,0	2	17	2,29	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 9,9	2	17	6,48	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 11,0	2	17	4,02	2,12
Algenkultur 3	Referenzmessreihe & pH-Wert 4,7	2	17	0,73	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 6,8	2	17	1,01	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 7,1	2	17	0,15	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 8,0	2	17	0,76	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 8,8	2	17	1,71	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 9,7	2	17	3,12	2,12
	Referenzmessreihe & pH-Wert 10,8	2	17	6,67	2,12

### 3.3.5 Mittlere Standardabweichung mehrerer Algenkulturen

Die gemittelte Standardabweichung ( $\sigma$ ) aus den Standardabweichungen der sieben Referenzmessreihen betrug  $\pm 0,34$  %. Näherungsweise gilt für normalverteilte Daten, dass sich innerhalb der einfachen Standardabweichung 68,3 % aller Messwerte befinden. In der zweifachen Standardabweichung sind 95,5 % aller Messwerte zu finden und die dreifache Standardabweichung umfasst 99,7 % aller Messwerte. Die Abweichung der mittleren Fotosyntheseaktivität eines pH-Wertes zum Mittelwert der Fotosyntheseaktivität im Referenzmedium ist in Abbildung 13 dargestellt.

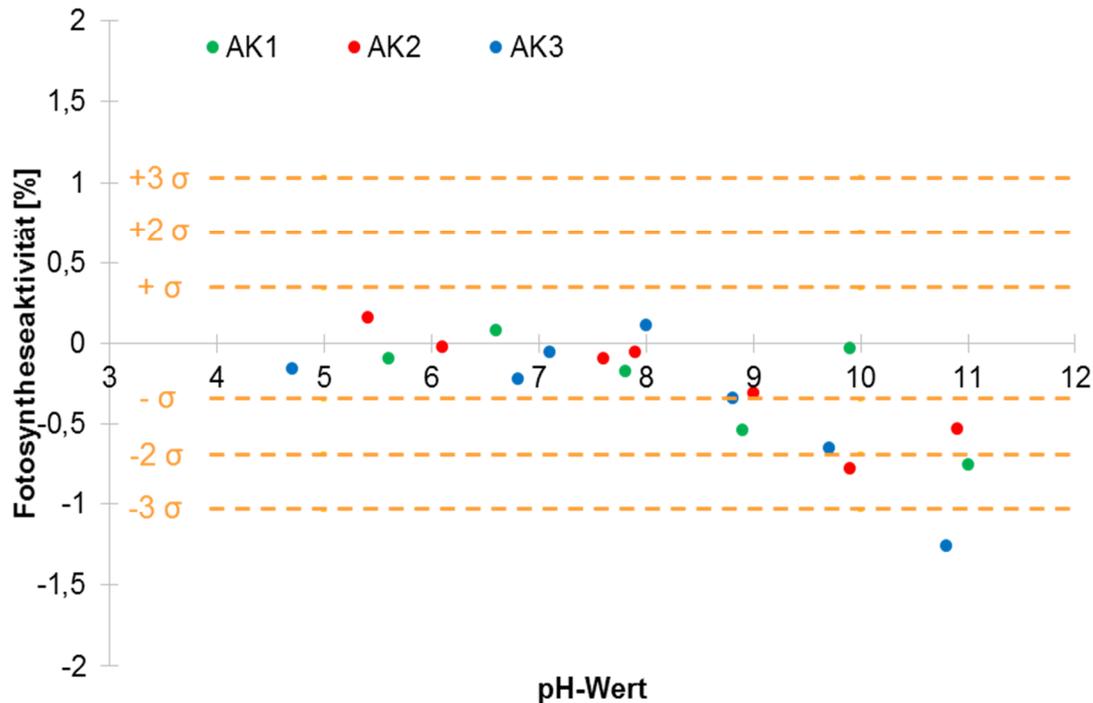


Abbildung 13: In dem Diagramm ist die Abweichung der mittleren Fotosyntheseaktivität jeder pH-Stufe zum Mittelwert der Referenzmessreihe jeder Algenkultur (AK1 grün, AK2 rot, AK3 blau) in Abhängigkeit zum pH-Wert dargestellt. Die orange gestrichelten Linien zeigen die Intervalle der mittleren Standardabweichung berechnet aus sieben Referenzmessreihen an.

Die gestrichelten Linien zeigen die Intervalle der berechneten Standardabweichung aus sieben Referenzreihen. Aus 100 Messwerten in eingestelltem pH-Medium lagen 5% außerhalb des Intervalls der dreifachen Standardabweichung. Die 5 % waren die fünf Einzelmesswerte im M4-Medium mit einem pH-Wert von 11. Die restlichen Messungen der insgesamt 100 Messwerte sind zu 60 % im Intervall der einfachen Standardabweichung, zu 25 % im Intervall der zweifachen Standardabweichung und zu 10 % im Intervall der dreifachen Standardabweichung zu finden.

Die Abweichungen der mittleren Fotosyntheseaktivitäten zur mittleren Fotosyntheseaktivität im Referenzmedium liegen alle bis auf die Messungen der pH-Stufe 11 der AK 3 im Bereich von 99,7 % aller Messwerte ( $\pm 3\sigma$ ). Mit zunehmenden basischen pH-Werten im M4-Medium ab ca. 9 steigen die Abweichungen der Fotosyntheseaktivität zur Fotosyntheseaktivität in der Referenz in allen Algenkulturen tendenziell an.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vorversuch

Im Vorversuch wurde untersucht, wie sich die Fotosyntheseaktivität der Alge tendenziell in pH-Werten von ca. 2 bis ca. 12,5 verhält. Eine detailliertere Analyse der Fotosyntheseaktivität in verschiedenen pH-Werten in Bezug auf einen Referenzwert wurde in den Hauptversuchen vorgenommen.

Im Medium mit extrem basischem pH-Wert von ca. 12,4 fiel die Fotosyntheseaktivität sehr stark ab. In Aufarbeitungsprozessen nach der Kultivierung der Alge *Chlorella vulgaris* wird der zunehmende Effekte auf die Zelloberfläche von Flockungsmitteln mit höheren pH-Werten bis 11 zur Abtrennung aus Medien genutzt (Oh, et al., 2001). Von physiologischen Beeinträchtigung durch die Veränderung der Zelloberfläche der Alge ist in hohen pH-Werten um 12,5 auszugehen. Die Fotosyntheseaktivitäten der Alge in extrem saurem Medium fielen im Vergleich zum extrem basischen deutlich geringer ab. Die Ergebnisse entsprechen Versuchen mit der Alge *Chlorella fusca*, in denen nur pH-Werte im basischen eine Veränderung des Elektronenflusses bewirkten (Ihnken et al., 2014). Der hohe chemische Widerstand gegenüber extrem sauren und basischen pH-Werten wurde für das Wachstum der Alge im pH-Wert 3 und 11 bereits festgestellt (Goldman, Riley & Dennett, 1982; Mayo, 1997). Die in diesem Versuch gemessenen Fotosyntheseaktivitäten zeigen ebenfalls sehr stabile Werte über einen breiten pH-Werte Bereich. Die höchste ermittelte Fotosyntheseaktivität ist bei einem pH-Wert von ca. 8,2 gemessen worden. Neben der maximalen Fotosyntheseaktivität im pH-Wert von 8,2 wurden in den pH-Werten 7,2 und 9,8 die nächst größeren Werte für die Fotosyntheseaktivität gemessen. Diese pH-Werte gehen über den pH-Wert-Bereich von natürlichen Gewässern, die dem Lebensraum der Alge entsprechen, hinaus (Pohling, 2015). In Kultivierungsanalgen ist die höchste Biomassenproduktion in den pH-Werten zwischen 9 bis 10 erzielt worden (Khalil et al. 2010). Die pH-Werte, in denen die höchsten Fotosyntheseaktivitäten gemessen wurden, befanden sich ebenfalls eher im alkalischen Bereich.

Im Medium mit einem pH-Wert von 8 war die Fotosyntheseaktivität und die pH-Wert Differenz vor Algenzugabe und nach dem Messen im Medium mit pH 0,3 am höchsten. Ob die Abnahme des pH-Wertes um 0,3 im Medium durch die Fotosyntheseaktivität der Alge oder in dem üblichen Bereich der Schwankungen des pH-Wertes des M4-Mediums lag, konnte nicht eindeutig zugeordnet werden.

## 4.2 Hauptversuche

Die Betrachtung der Fotosyntheseaktivität in pH-Werten von 5 bis 10 (mit Referenz) innerhalb der Algenkulturen wiesen signifikante Unterschiede auf. Die statistische Einzelbetrachtung der pH-Werte zeigte, dass der Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität mit zunehmenden pH-Werten im Vergleich zur Fotosyntheseaktivität in der Referenz ab ca. 9 signifikant wurde. Einen signifikanten Unterschied zur Fotosyntheseaktivität der Alge in der Referenz hatten die Fotosyntheseaktivitäten nur in den pH-Stufen 9 bis 11. Im Grenzbereich von pH-Wert 9 fiel der Unterschied zur Referenz der AK3 bei pH-Wert 8,8 jedoch nicht signifikant aus. Dass nur kleine Änderungen des pH-Wertes Einfluss auf die Fotosynthese haben kann, wurde für marine Algen festgestellt. Eine Reduzierung des pH-Wertes von 9,0 auf 8,3 ließ die Fotosyntheserate wieder steigen (Chen und Durbin 1994). Ein Einfluss auf das Ergebnis im Grenzbereich könnte auf Unterschiede zwischen den Algenkulturen hinweisen. Die Fotosyntheseaktivitäten im Referenzmedium zwischen den Algenkulturen wiesen signifikante Unterschiede auf. Algen sind ein biologisches System, so dass die Messwerte abhängig vom physiologischen Zustand einer Algenkultur schwanken können (Myers, 1953).

Wegen der deutlichen Tendenz ab pH-Werten von 9 ist ein Einfluss durch die Verfügbarkeit von Kohlenstoff als gelöstes  $\text{CO}_2$  vorstellbar. In geschlossenen Systemen bei pH-Werten zwischen 8 und 10 verringert sich der theoretische Anteil an gelöstem  $\text{CO}_2$  stark bis kein gelöstes  $\text{CO}_2$  mehr im Medium vorhanden ist. In offenen Systemen kann in neutralen und alkalischen wässrigen Lösungen die Löslichkeit von  $\text{CO}_2$  ansteigen, so dass auch über einen pH-Wert von 10 gelöstes  $\text{CO}_2$  im Medium vorhanden ist. Die Aufnahme von  $\text{CO}_2$  aus der Atmosphäre findet ausschließlich über die Oberfläche des Mediums statt. Wird das gelöste  $\text{CO}_2$  von der

Alge schneller verbraucht als aus der Atmosphäre ins Medium aufgenommen, findet eine  $\text{CO}_2$ -Limitation statt. Dementsprechend sanken die mittleren Fotosyntheseaktivitäten bei pH-Werten über 9. Ebenso kostet die Alge der Transport von gelöstem  $\text{CO}_2$  in die Zelle bei niedrigeren Außenkonzentrationen theoretisch mehr Energie und ist mit höherem Aufwand verbunden (Giordano, Beardall & Raven, 2005).

Ein Hinweis auf Entzug von gelöstem  $\text{CO}_2$  aus dem Medium durch die Alge kann ein steigender pH-Wert im Medium sein. Die pH-Wert Differenzen vor der Algenzugabe und nach der Messung schwankten meist nur geringfügig. Die Ergebnisse zeigten jedoch eine pH-Wert Differenz ab pH-Wert 9 in allen Algenkulturen nahe Null. Eine definitive Aussage, ob die Differenz des pH-Wertes im Medium durch die Fotosyntheseaktivität der Alge oder durch pH-Wert Schwankungen des M4-Mediums selbst verursacht wurde, kann nicht eindeutig getroffen werden. Das M4-Medium beinhaltet viele unterschiedliche Substanzen, die vermutlich ebenfalls Auswirkungen auf den pH-Wert der Lösung haben.

Neben dem signifikanten Unterschied der Fotosyntheseaktivität im pH-Wert 8,8 zur Referenz, entsprach die Fotosyntheseaktivität und Hemmung der Fotosyntheseaktivität in pH-Wert 9,9 der AK1 nicht dem Trend, dass der Einfluss in M4-Medium mit höheren pH-Werten zunahm. Die mittlere Fotosyntheseaktivität der AK1 in pH-Wert 9,9 lag auf dem Niveau der mittleren Fotosyntheseaktivität der Referenz. Da die anderen 12 mittleren Fotosyntheseaktivitäten im basischem pH-Wert ab 9 abnahmen und die mittlere Fotosyntheseaktivität im nächst niedrigeren pH-Wert der AK1 von 8,9 dem Trend entsprachen, ist ein Fehler in der Versuchsdurchführung nicht ausgeschlossen. Mögliche Fehler könnten beim Pipettieren vom M4-Medium in die Messküvetten oder bei der Algenzugabe in das M4-Medium eingetragen worden sein. Bei einer Reduzierung der Algenanzahl im Verhältnis zum Volumen des M4-Mediums stünde jeder Zelle mehr gelöstes  $\text{CO}_2$  zur Verfügung.

Ein Vergleich der gemessenen Chlorophyllkonzentrationen mit den Fotosyntheseaktivitäten in den verschiedenen pH-Werten zeigte jedoch keinen direkten Zusammenhang. Die gemessenen Chlorophyllkonzentrationen in den pH-Werten unterschieden sich auffällig. Auch nach nochmaliger Kalibrierung der 100 ml Pipette ist kein unzulässiger Fehler (Grenzwert  $\pm 42 \mu\text{l}$ ) des Gerätes festgestellt worden. Die Messverfahren des Fluorometers zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes und der Fotosyntheseaktivität unterscheiden sich. Da die gemessene Chlorophyllkonzentration jedoch auch auf Wechselwirkungen mit der Fluoreszenz der Alge beruht, könnte ein Einfluss von Umgebungsbedingungen auf die gemessene Fluoreszenzaktivität ebenfalls einen Einfluss auf den Messwert Chlorophyllgehalt haben. Im Algenschnelltest wird und dieser wurde immer das gleiche Volumen zur Einstellung der Algenkonzentration verwendet. Die Fotosyntheseaktivität einer definierten Menge an Algen kann demnach trotzdem bestimmt werden.

Im Algenschnelltest wird im M4-Medium mit einem Herbizid eine Hemmung der Fotosyntheseaktivität der Alge von 10 % und 20 % in zwei Prüfstandards erzeugt und mit der Hemmung der Fotosyntheseaktivität der Alge in der Probe verglichen. Werden Hemmwerte von über 10 % festgestellt, ist eine toxische Wirkung nicht ausgeschlossen. Sinkende Fotosyntheseaktivitäten in pH-Werte führen zu einer Erhöhung der Hemmung und damit schneller zu einem positiven Testergebnis. Die Neutralisierung der Proben im Algenschnelltest führt nach Ergebnissen dieser Arbeit demnach zu einer Grundhemmung in Bereichen von 0,1 % bis 0,6 %.

Für das Herbizids Atrazin sind in einem Konzentrationsbereich von  $0,1 \mu\text{M}$  unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Fotosyntheseaktivitäten an Thylakoidmembranen von Bohnen in pH-Werten von 5,5 bis 8 um mehr als 10 % festgestellt worden (Lambrev und Goltsev 2001). Der toxische Effekt wäre demnach im neutralen Bereich geringer als im saurem. Da einer intakten Algenzelle deutlich mehr Regulationsmechanismen zur Verfügung stehen als in einer solubilisierten Thylakoidmembran, fällt der Effekt des pH-Wertes auf die Toxizität wahrscheinlich geringer aus. Die zusätzliche Hemmung beträgt bei pH-Werten von über 9 jedoch nur 2 %. Sind Toxizität relevanter Herbizide in pH-Werten um 9 wesentlich höher, könnte

der Einfluss toxischer Wirkungen auf die Fotosyntheseaktivität größer sein, als der Einfluss des pH-Wertes auf die Fotosyntheseaktivität der Alge. Der Prüfstandard Isoproturon ist ein Harnstoffderivat, das gegen Licht und Säure relativ stabil ist. Eine Zersetzung in hohen alkalischen pH-Werten mit Wärmezufuhr ist möglich (Bahadir et al., 2000). Hinweise, dass die fotosynthetische Toxizität von Isoproturon vom pH-Wert abhängig ist, wurden nicht gefunden. Experimente mit Herbiziden wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 4.3 Fazit

Alle Betrachtungsweisen ergaben einen größeren Einfluss in höheren pH-Werten als in niedrigeren auf die Fotosyntheseaktivität der Alge *Chlorella vulgaris* ausgehend von der Referenz mit einem pH-Wert von ca. 8,5. Die Hypothese, dass der pH-Wert keinen signifikanten Einfluss auf die Fotosyntheseaktivität im für den Algenschnelltest relevanten Bereich von pH-Wert 5 bis 10 hat, muss abgelehnt werden. Das Entfernen der Neutralisierung der Probe aus dem Verfahren führt wahrscheinlich schneller zu einer Überschreitung der Grenzhemmung. Für Abwässer wird ein pH-Wert von 6,5 bis 9 empfohlen (Pohling 2015). Dem Einsatz bis zum pH-Wert der Referenz (ca. 8,5) steht nichts entgegen. Bei Untersuchung von Proben mit pH-Werten ab ca. 9 sind höhere Fehler bis zur selbst ermittelten dreifachen Standardabweichung möglich.

Bevor der Ablauf des Algenschnelltests umgestellt wird, wäre es sinnvoll das Herbizid des Prüfstandards auf veränderte toxische Wirkungen in relevanten pH-Werten zu testen, um die toxische Wirkung in Abhängigkeit vom pH-Wert festzustellen und zu bewerten.

Zusätzlich ist in dieser Arbeit festgestellt worden, dass bereits durch die Neutralisierung der Probe ein Fehler von in der Spitze um 0,6 % der Hemmung in das Verfahren eingetragen wird. Ebenfalls unterliegt das Referenzmedium pH-Wert Schwankungen, die bis an den ermittelten Grenzbereich von pH 9 heranreichen. Durch den wenig stabilen pH-Wert im Medium konnte der Bereich pH  $7 \pm 0,2$  nicht exakt eingestellt und untersucht werden. Durch die komplexen und sich stark unterscheidenden Matrices in Abwasser und- Gewässerproben könnte der eingestellte pH-Wert ebenso wie das M4-Medium geringe pH-Wert Stabilität besitzen.

## 5 Literatur

Badger, M. R., Hanson, D., & Price, G. D., 2002. Evolution and diversity of CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Functional Plant Biology*, 29(3), Seiten 161-173.

Bahadir M., Parlar H. & Spiteller M., 2013. *Springer-Umweltlexikon*, 2. Auflage, Springer-Verlag.

Beardall, J., 1981. CO<sub>2</sub> accumulation by *Chlorella saccharophila* (Chlorophyceae) at low external pH: evidence for active transport of inorganic carbon at the chloroplast envelope. *Journal of Phycology*, 17(4), Seiten 371-373.

Beardall, J. & Raven, J.A., 1981. Transport of inorganic carbon and the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in *Chlorella emersonii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 17(2), Seiten 134-141.

Brack, W. & Frank, H., 1998. ChlorophyllaFluorescence: A Tool for the Investigation of Toxic Effects in the Fotosynthetic Apparatus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1-2), Seiten 34-41.

Brack, W., Rottler, H. & Frank, H., 1998. Volatile fractions of landfill leachates and their effect on *Chlamydomonas reinhardtii*: In vivo chlorophyll a fluorescence. *Environmental toxicology and chemistry*, 17(10), Seiten 1982-1991.

Brayner, R., Couté, A., Livage, J., Perrette, C., & Sicard, C. 2011. Micro-algal biosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(2), Seiten 581-597.

Bruce A., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Peter Walter P., Wiley-VCH 2011. *Molekularbiologie der Zelle*.

Chen, C. Y., & Durbin, E. G. 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, Seiten 83-94.

Consalvey, M., Perkins, R.G., Paterson, D.M. & Underwood, G.J., 2005. PAM fluorescence: a beginners guide for benthic diatomists. *Diatom Research*, 20(1), Seiten 1-22.

Dau, H., & Hansen, U. P., 1990. A study on the energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of Fotoacoustic measurements. *Fotosynthesis research*, 25(3), Seiten 269-278.

DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), Seiten 84-98.

Eis L., 2009: Schnelltestverfahren für Wasserproben: Bestimmung toxischer Wirkungen von Wasserproben gegenüber Grünalgen, VDM Verlag, Saarbrücken.

Eis, L., 2007. Entwicklung eines Schnelltestverfahrens zur Bestimmung toxischer Wirkungen von Wasserproben gegenüber Grünalgen (Diplomarbeit).

Fent K., 2013: *Ökotoxikologie*. 4.Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.

Genty, B., Briantais, J.-M. & Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990, Seiten 87-92.

Goldman, J. C., Riley, C. B. & Dennett, M. R., 1982. The effect of pH in intensive microalgal cultures. II. Species competition. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 57(1), Seiten 15-24.

Goldsborough, L. G., & Robinson, G.G.C., 1984. A simple bioassay for Photosystem-II inhibitors in water using in vivo chlorophyll fluorescence. *Weed research*, 24(5), Seiten 351-358.

Giordano, M., Beardall, J., & Raven, J. A. 2005. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 56, Seiten 99-131.

Hall D., & Rao K.K., 1999: *Fotosynthesis*. 6. Auflage. Cambridge University Press, Cambridge.

Heldt, H. W., & Piechulla, B. 2015. *Pflanzenbiochemie*. 5.Auflage. Springer-Verlag.

Houtz, R. L., Ries, S. K., & Tolbert, N. E. 1985. Effect of triacontanol on *Chlamydomonas* I. Stimulation of growth and photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. *Plant physiology*, 79(2), Seiten 357-364.

Ihnken, S., Beardall, J., Kromkamp, J. C., Serrano, C. G., Torres, M. A., Masojídek, J., ... & Navarro, E., 2014. Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in *Chlorella* mass culture. *Aquatic Biology*, 22, Seiten 95-110.

Institut für Hygiene und Umwelt, 2013. *Algenschnelltest zur Ermittlung toxischer Wirkungen von Wasserproben gegenüber Grünalgen mit dem BBE-Küvetten-Fluorometer*. SOP HU411.120, Hamburg.

- Khalil, Z. I., Asker, M. M., El-Sayed, S., and Kobbia, I. A., 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), Seiten 1225-1231.
- Kautsky, H., & Hirsch, A., 1931. Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften*, 19, Seite 964.
- Kirk, J.T., 1994. *Light and Fotosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge university press.
- Köhler, W.; Schachtel, G.; Voleske, P., 2012. *Biostatistik. Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler*. 5.Auflage, Springer Verlag, Gießen und Aachen.
- Krause, G. H. & Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and Fotosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology*, 42(1), Seiten 313-349.
- Lambrev, P. and Goltsev, V. 2001. pH dependence of the effects of diuron, atrazine and dinoseb on the luminescent properties of thylakoid membranes. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27(1-2), Seiten 80-95.
- Lechelt, M.; Eis, L.; Baier, B., 2011: *Algenschnelltest – Eine Alternative zum Wachstumshemmtest?* Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg.
- Marcinek, J., Rosenkranz, E., & Saratka, J. 1996. *Das Wasser der Erde: Eine geographische Meeres- und Gewässerkunde*. 2. Auflage, Perthes, Gotha.
- Matsuda, Y., & Colman, B., 1995. Induction of CO<sub>2</sub> and bicarbonate transport in the green alga *Chlorella ellipsoidea* (I. time course of induction of the two systems). *Plant Physiology*, 108(1), Seiten 247-252.
- Mayo, A. W., 1997. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water environment research*, 69(1), Seiten 64-72.
- Moldaenke, C., Vanselow, K. H. and Hansen, U. P., 1995. The 1-Hz fluorometer: a new approach to fast and sensitive long-term studies of active chlorophyll and environmental influences. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 49(1), Seiten 785–796.
- Myers, J., 1953. Growth characteristics of algae in relation to the problems of mass culture. Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Inst. Wash. Publ, 600, Seiten 37-54.

Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz, 2014. *Orientierende Untersuchungen niedersächsischer Oberflächengewässer auf aktuell in Deutschland zugelassener Pflanzenschutzmittel und auf Stoffe der sog. Metaboliten-Liste, 2014.*

Oh, H. M., Lee, S. J., Park, M. H., Kim, H. S., Kim, H. C., Yoon, J. H., ... & Yoon, B. D. 2001. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnology Letters*, 23(15), Seiten 1229-1234.

Pfündel, E., 1998. Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Fotosynthesis Research*, 56(2), Seiten 185-195.

Plewinsky B., Hennecke M., Opermann W., 2014: *Das Ingenieurwesen: Chemie*, Springer Vieweg, Berlin Heidelberg.

Pohling, R., 2015. *Chemische Reaktionen in der Wasseranalyse*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.Y. and Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, Seiten 265-278, France & Saudi Arabia.

Schneider R, P., Neitzel, P. L., Schaffrath, M., & Schlumprecht, H., 2002. Leitbildorientierte physikalisch-chemische Gewässerbewertung-Referenzbedingungen und Qualitätsziele. Abschlussbericht zum F&E-Vorhaben des Umweltbundesamtes (FKZ 200 24 226), Chemnitz.

Schott F., 2015. Optimierung des Algenschnelltestverfahrens zur Gewässerüberwachung hinsichtlich der Parameter Temperatur und Licht, Hamburg.

Schreiber, U., Schliwa, U., & Bilger, W., 1986. Continuous recording of Photochemical and non-Photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Fotosynthesis research*, 10(1-2), Seiten 51-62.

Schreiber, U., Reising, H., & Neubauer, C., 1991. Contrasting pH-optima of light-driven O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reduction in spinach chloroplasts as measured via chlorophyll fluorescence quenching. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 46(7-8), Seiten 635-643.

Schreiber U. 2004: Pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. Papageorgiou, G. C. (ed). *In Chlorophyll a fluorescence: a signature of Fotosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic. Seiten 279-319.

Shapiro, S. S.; Wilk, M. B., 2009: An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *BiometrikaTrust*, Vol. 52, Seiten 591 – 611, Great Britain.

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B., 1965. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, 52(3), Seiten 591-611.

Shelp, B. J., & Canvin, D. T., 1980. Utilization of exogenous inorganic carbon species in photosynthesis by *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant physiology*, 65(5), Seiten 774-779.

Smith, T. M., & Smith, R. L. , 2009. *Ökologie*. Pearson Deutschland GmbH.

Takeda, H., 1988. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry*, 27(12), Seiten 3823-3826.

Umweltbundesamt, Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, 2014. *Bau und Reaktorsicherheit Arbeitshilfe zur Prüfung von Ausnahmen von den Bewirtschaftungszielen der EG-Wasserrahmenrichtlinie bei physischen Veränderungen von Wasserkörpern nach § 31 Absatz 2 WHG aus wasserfachlicher und rechtlicher Sicht*. Kassel Leipzig.

Umweltbundesamt, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittel, 2016: *Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse der Meldungen gemäß § 34 Pflanzenschutzgesetz für das Jahre 2015*. Braunschweig.

Vanselow, K. H., 1993. The effect of N-nutrients on the acceptor pool of PSI and thylakoid energization as measured by chlorophyll fluorescence of *Dunaliella salina*. *Journal of experimental botany*, 44(8), Seiten 1331-1340.

Young, E., Beardall, J. and Giordano, M., 2001. Inorganic carbon acquisition by *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) involves external carbonic anhydrase and direct  $\text{HCO}_3^-$  utilization insensitive to the anion exchange inhibitor DIDS. *European Journal of Phycology*, 36(1), Seiten81-88.

Yongmanitchai, W. & Ward, O.P., 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and environmental microbiology*, 57(2), Seiten 419-425.

Wisotzky, F., 2012. *Angewandte Grundwasserchemie*, Hydrogeologie und hydrogeochemische Modellierung: Grundlagen, Anwendungen und Problemlösungen. Springer-Verlag.

## Anhang

Tabelle 11: Messergebnisse des Vorversuchs am 13.12.2016. Aufgelistet ist die Messreihenfolge, der pH-Wert im M4 Medium beim Beimpfen der Messküvetten  $\text{pH}_{\text{vor}}$ , der pH-Wert nach der Fluoreszenzmessung  $\text{pH}_{\text{nach}}$ , die Gesamtchlorophyllkonzentration  $C_{\text{chl}}$  in  $\mu\text{g/l}$  und die Fotosyntheseaktivität FA in %.

	Nr.	$\text{pH}_{\text{vor}}$	$T_{\text{vor}}$ in °C	$\text{pH}_{\text{nach}}$	$T_{\text{nach}}$ in °C	$C_{\text{chl}}$ in $\mu\text{g/l}$	FA in %
	1	8,21	21,0	7,98	21,7	118,97	69,34
	2	8,21	21,0	7,94	21,8	120,21	69,43
	3	8,21	21,0	7,94	21,7	122,49	69,75
Mittelwert		8,21	21,0	7,95	21,7	120,56	69,51
Standardabweichung		0,00	0,0	0,02	0,1	1,79	0,22
	4	7,18	21,3	7,07	22,0	119,32	68,26
	5	7,18	21,3	7,10	22,2	122,75	69,34
	6	7,18	21,3	7,12	22,0	120,50	69,21
Mittelwert		7,18	21,3	7,10	22,1	120,86	68,94
Standardabweichung		0,00	0,0	0,03	0,1	1,74	0,59
	7	9,83	21,3	9,72	22,1	116,34	69,01
	8	9,80	21,3	9,71	22,2	117,76	68,52
	9	9,83	21,3	9,71	22,3	116,98	69,26
Mittelwert		9,82	21,3	9,71	22,2	117,03	68,93
Standardabweichung		0,02	0,0	0,01	0,1	0,71	0,38
	10	12,36	20,2	12,30	22,1	112,29	61,01
	11	12,42	20,5	12,32	22,2	112,68	61,79
	12	12,42	20,5	12,32	22,2	110,44	61,78
Mittelwert		12,40	20,4	12,31	22,2	111,80	61,53
Standardabweichung		0,03	0,2	0,01	0,1	1,20	0,45
	13	4,10	20,3	4,23	22,2	116,91	67,76
	14	4,09	20,4	4,25	22,3	119,36	68,06
	15	4,10	20,4	4,29	22,5	117,94	68,18
Mittelwert		4,10	20,4	4,26	22,3	118,07	68,00
Standardabweichung		0,01	0,1	0,03	0,2	1,23	0,22
	16	1,99	20,4	2,02	22,1	120,50	67,30
	17	1,99	20,4	2,00	22,3	119,21	66,70
	18	1,99	20,3	2,07	22,9	120,33	66,94
Mittelwert		1,99	20,4	2,03	22,4	120,01	66,98
Standardabweichung		0,00	0,1	0,04	0,4	0,70	0,30
	19	7,91	20,3	7,83	21,4	119,47	68,93
	20	7,91	20,4	7,87	21,4	119,63	69,25
	21	7,90	20,4	7,88	21,4	120,88	69,51
Mittelwert		7,91	20,4	7,86	21,4	119,99	69,23
Standardabweichung		0,01	0,1	0,03	0,0	0,77	0,29

**Tabelle 12: Temperatur der Algenstammlösung im Vorversuch vor der ersten Beimpfung und bei jeder neuen pH-Stufe des Vorversuches am 13.12.2016, sowie die maximal ( $T_{\max}$ ) und minimal ( $T_{\min}$ ) gemessene Temperatur. Die erste Messung erfolgte um 10:59 Uhr die letzte Messung um 15:40 Uhr.**

Nr.	T in °C
1	20,8
2	21,4
3	21,6
4	21,7
5	21,6
6	21,6
7	21,6
8	21,9
$T_{\max}$	21,9
$T_{\min}$	20,8

**Tabelle 13: Temperatur der Algenstammlösung der Hauptversuche vor der ersten Beimpfung und bei jeder neuen pH-Stufe in den Hauptversuchen. 16.12.2016 (AK1), 30.01.2017 (AK2) und 22.02.2017 (AK 3). Erste und Letzte Messung um 10:00 & 15:20 Uhr (AK1), 13:45 & 18:30 Uhr (AK2), 11:15 & 17:00 Uhr (AK3)**

Nr.	T in °C der AK1	T in °C der AK2	T in °C der AK 3
1	21,4	21,0	22,3
2	21,4	21,0	22,3
3	21,8	21,6	22,3
4	21,7	22,0	22,8
5	21,8	22,3	23,0
6	22,0	22,7	23,6
7	22,3	23,0	23,2
8	22,1	23,2	23,5
9	22,3	23,3	23,5
10	22,0	23,3	23,6
11	22,2	23,3	23,6
$T_{\max}$	22,3	23,3	23,6
$T_{\min}$	21,4	21	22,3

**Tabelle 14: Messergebnis des Hauptversuches am 16.12.2016 (Algenkultur 1). Mit dem und der Temperatur im M4 Medium beim Beimpfen der Messküvetten ( $pH_{\text{vor}}$ ,  $T_{\text{vor}}$ ), der pH-Wert nach der Fluoreszenzmessung  $pH_{\text{nach}}$ , die Gesamtchlorophyllkonzentration CK in  $\mu\text{g/l}$  und die Fotosyntheseaktivität FA in %, und die Temperaturen der pH-Wert-Messung in  $^{\circ}\text{C}$ .**

	$pH_{\text{vor}}$	$T_{\text{vor}}$ in $^{\circ}\text{C}$	$pH_{\text{nach}}$	$T_{\text{nach}}$ in $^{\circ}\text{C}$	CK in $\mu\text{g/l}$	FA in %
	5,62	22,4	5,47	22,8	118,60	70,25
	5,53	22,4	5,48	22,9	118,69	69,90
	5,62	22,4	5,51	22,8	119,30	70,04
	5,58	22,4	5,51	23,0	117,81	69,30
	5,49	22,4	5,50	23,0	117,79	69,73
Mittelwert	5,57	22,4	5,49	22,9	118,44	69,84
Standardabweichung	0,06	0,0	0,02	0,1	0,64	0,36
	6,62	21,7	6,58	23,0	112,83	70,22
	6,62	21,7	6,45	23,1	117,21	70,00
	6,62	21,7	6,44	23,2	116,83	70,17
	6,62	21,7	6,41	23,1	117,94	69,70
	6,62	21,7	6,42	23,1	117,88	70,01
Mittelwert	6,62	21,7	6,46	23,1	116,54	70,02
Standardabweichung	0,00	0,0	0,07	0,1	2,12	0,20
	7,82	22,0	7,82	22,4	119,67	69,72
	7,84	22,0	7,75	22,4	119,85	69,80
	7,85	21,9	7,76	23,0	120,55	69,92
	7,85	21,9	7,75	23,1	120,33	69,71
	7,85	21,9	7,75	23,1	121,42	69,69
Mittelwert	7,84	21,9	7,77	22,8	120,36	69,77
Standardabweichung	0,01	0,1	0,03	0,4	0,69	0,09
	8,97	21,9	8,88	23,0	120,45	69,26
	8,92	22,0	8,87	23,0	120,85	69,61
	8,92	22,0	8,85	23,0	122,78	69,04
	8,94	22,0	8,83	22,9	120,94	69,37
	8,94	22,0	8,84	22,8	120,85	69,73
Mittelwert	8,94	22,0	8,85	22,9	121,17	69,40
Standardabweichung	0,02	0,0	0,02	0,1	0,92	0,28
	9,88	23,0	9,83	23,0	116,00	69,70
	9,88	23,0	9,81	23,0	116,85	69,67
	9,88	23,0	9,72	22,8	114,43	69,72
	9,88	23,0	9,72	22,9	119,91	70,20
	9,88	23,0	9,78	23,3	118,35	70,25
Mittelwert	9,88	23,0	9,77	23,0	117,11	69,91
Standardabweichung	0,00	0,0	0,05	0,2	2,11	0,29
	10,97	21,6	10,95	22,6	119,77	68,95
	10,97	21,6	10,94	22,8	118,52	68,99

	pH <sub>vor</sub>	T <sub>vor</sub> in °C	pH <sub>nach</sub>	T <sub>nach</sub> in °C	CK in µg/l	FA in %
	10,97	22,2	10,92	22,9	122,63	69,42
	10,99	22,3	10,92	22,9	120,21	69,33
	10,99	22,3	10,88	23,7	121,69	69,27
Mittelwert	10,98	22,0	10,92	23,0	120,56	69,19
Standardabweichung	0,01	0,4	0,03	0,4	1,62	0,21

Tabelle 15: Messergebnis des Hauptversuches am 30.01.2017 (Algenkultur 2). Mit dem und der Temperatur im M4 Medium beim Beimpfen der Messküvetten (pH<sub>vor</sub>, T<sub>vor</sub>), der pH-Wert nach der Fluoreszenzmessung pH<sub>nach</sub>, die Gesamtchlorophyllkonzentration CK in µg/l und die Fotosyntheseaktivität FA in %, und die Temperaturen der pH-Wert-Messung in °C.

	pH <sub>vor</sub>	T <sub>vor</sub> in °C	pH <sub>nach</sub>	T <sub>nach</sub> in °C	CK in µg/l	FA in %
	5,31	22,0	5,41	23,3	96,31	68,83
	5,36	21,9	5,40	23,5	96,22	69,15
	5,41	21,9	5,43	23,4	94,98	69,76
	5,41	21,9	5,44	23,6	96,32	68,94
	5,39	21,9	5,45	23,7	97,44	69,21
Mittelwert	5,38	21,9	5,43	23,5	96,25	69,18
Standardabweichung	0,04	0,0	0,02	0,2	0,87	0,36
	6,06	22,0	6,18	23,6	96,13	68,94
	6,09	22,0	6,20	23,7	94,92	69,54
	6,10	22,0	6,22	23,6	97,47	68,52
	6,15	21,9	6,23	23,8	96,93	69,10
	6,15	21,9	6,23	23,8	96,80	68,88
Mittelwert	6,11	22,0	6,21	23,7	96,45	69,00
Standardabweichung	0,04	0,1	0,02	0,1	0,98	0,37
	7,60	22,0	7,49	24,0	97,45	69,09
	7,56	22,0	7,50	24,0	96,79	69,58
	7,56	22,0	7,50	24,0	99,72	68,22
	7,56	22,0	7,50	24,0	97,54	68,83
	7,56	22,0	7,50	24,0	97,97	68,89
Mittelwert	7,57	22,0	7,50	24,0	97,89	68,92
Standardabweichung	0,02	0,0	0,00	0,0	1,10	0,49
	7,94	22,1	7,93	24,0	97,35	69,01
	7,95	22,0	7,84	24,0	96,89	68,97
	7,79	22,0	7,85	24,0	96,91	68,96
	7,98	22,0	7,98	24,0	97,35	68,86
	7,89	22,0	7,98	24,0	98,16	69,03
Mittelwert	7,91	22,0	7,92	24,0	97,33	68,97

	pH <sub>vor</sub>	T <sub>vor</sub> in °C	pH <sub>nach</sub>	T <sub>nach</sub> in °C	CK in µg/l	FA in %
Standardabweichung	0,07	0,0	0,07	0,0	0,51	0,07
	8,96	22,0	8,92	23,9	98,46	68,98
	8,95	22,0	8,87	24,0	98,96	68,49
	8,96	22,0	8,88	24,1	98,88	68,44
	8,95	22,0	8,86	24,0	97,19	68,64
	8,97	22,0	8,83	23,6	97,12	69,01
Mittelwert	8,96	22,0	8,87	23,9	98,12	68,71
Standardabweichung	0,01	0,0	0,03	0,2	0,90	0,27
	9,88	22,0	9,80	23,6	94,44	68,30
	9,89	22,0	9,78	23,8	93,24	68,34
	9,88	22,0	9,77	23,8	95,20	68,40
	9,88	22,0	9,76	24,0	95,96	67,99
	9,88	22,0	9,78	23,9	93,72	68,17
Mittelwert	9,88	22,0	9,78	23,8	94,51	68,24
Standardabweichung	0,00	0,0	0,01	0,1	1,10	0,16
	10,92	22,3	10,87	23,2	88,98	68,29
	10,92	22,3	10,87	23,4	93,93	68,45
	10,91	22,3	10,83	23,6	91,52	68,95
	10,89	22,3	10,88	23,5	92,72	68,34
	10,91	22,3	10,84	23,5	93,49	68,40
Mittelwert	10,91	22,3	10,86	23,4	92,13	68,49
Standardabweichung	0,01	0,0	0,02	0,2	1,98	0,27

**Tabelle 16: Messergebnis der pH-Stufen des Hauptversuches am 22.02.2017 (Algenkultur 3). Mit dem und der Temperatur im M4 Medium beim Beimpfen der Messküvetten (pH<sub>vor</sub>, T<sub>vor</sub>), der pH-Wert nach der Fluoreszenzmessung pH<sub>nach</sub>, die Gesamtchlorophyllkonzentration CK in µg/l und die Fotosyntheseaktivität FA in %, und die Temperaturen der pH-Wert-Messung in °C.**

	pH <sub>vor</sub>	T <sub>vor</sub> in °C	pH <sub>nach</sub>	T <sub>nach</sub> in °C	CK in µg/l	FA in %
	4,70	22,8	4,88	24,1	116,82	69,37
	4,68	22,5	5,02	24,1	119,06	69,57
	4,68	22,6	5,02	24,1	116,41	69,41
	4,68	22,7	5,08	24,1	115,99	69,16
	4,70	23,0	5,11	24,0	117,85	69,49
Mittelwert	4,69	22,7	5,02	24,1	117,23	69,40
Standardabweichung	0,01	0,2	0,09	0,0	1,24	0,15
	7,16	22,5	6,87	24,3	116,56	69,50
	7,16	22,5	6,73	24,3	121,59	69,76

	pH <sub>vor</sub>	T <sub>vor</sub> in °C	pH <sub>nach</sub>	T <sub>nach</sub> in °C	CK in µg/l	FA in %
	7,16	22,5	6,77	24,3	118,17	69,31
	7,10	22,5	6,77	24,3	120,54	69,47
	6,97	22,5	6,67	24,3	119,85	69,49
Mittelwert	7,11	22,5	6,76	24,3	119,34	69,51
Standardabweichung	0,08	0,0	0,07	0,0	1,99	0,16
	6,69	22,3	7,10	24	119,44	69,07
	6,69	22,3	7,09	24,2	119,94	69,21
	6,96	22,6	7,12	24,3	119,37	69,20
	6,88	22,6	7,13	24,1	117,59	69,57
	6,98	22,6	7,14	24,5	118,76	69,65
Mittelwert	6,84	22,5	7,12	24,2	119,02	69,34
Standardabweichung	0,14	0,2	0,02	0,2	0,90	0,25
	7,93	22,4	8,06	23,5	118,09	69,78
	7,93	22,4	8,06	23,5	117,66	69,81
	7,97	22,6	8,00	23,4	115,91	69,64
	7,97	22,6	7,98	23,5	119,38	69,49
	7,94	22,7	7,96	23,7	117,33	69,65
Mittelwert	7,95	22,5	8,01	23,5	117,67	69,67
Standardabweichung	0,02	0,1	0,05	0,1	1,26	0,13
	8,83	22,5	8,75	24,2	118,05	69,28
	8,83	22,6	7,75	24,2	118,47	69,34
	8,84	22,7	8,74	24,2	117,47	69,33
	8,83	22,7	8,75	24,4	119,45	69,11
	8,83	22,7	8,75	24,4	119,70	69,04
Mittelwert	8,83	22,6	8,55	24,3	118,63	69,22
Standardabweichung	0,00	0,1	0,45	0,1	0,94	0,14
	9,67	22,4	9,66	24	110,58	69,42
	9,73	22,4	9,48	24,1	111,04	68,67
	9,73	22,5	9,59	24,0	113,93	68,91
	9,73	22,5	9,58	24,3	112,13	68,96
	9,73	22,5	9,58	24,3	109,22	68,61
Mittelwert	9,72	22,5	9,58	24,1	111,38	68,91
Standardabweichung	0,03	0,1	0,06	0,2	1,77	0,32
	10,79	22,7	10,76	23,8	118,31	68,21
	10,79	22,7	10,75	23,8	120,01	68,38
	10,79	22,7	10,73	23,9	118,98	68,34
	10,79	22,8	10,74	23,9	117,13	68,50
	10,78	22,8	10,73	24,2	119,34	68,07
Mittelwert	10,79	22,7	10,74	23,9	118,75	68,30
Standardabweichung	0,00	0,1	0,01	0,2	1,10	0,17

**Tabelle 17: Messergebnis der Referenz des Hauptversuches am 16.12.2016 (Algenkultur 1). Mit dem und der Temperatur im M4 Medium beim Beimpfen der Messküvetten ( $pH_{vor}$ ,  $T_{vor}$ ), der pH-Wert nach der Fluoreszenzmessung  $pH_{nach}$ , die Gesamtchlorophyllkonzentration CK in  $\mu g/l$  und die Fotosyntheseaktivität FA in %**

Nr.	$pH_{vor}$	$T_{vor}$ in °C	$pH_{nach}$	$T_{nach}$ in °C	FA in %	CK in $\mu g/l$	
1	8,73	22,1	8,57	22,6	69,85	121,01	
2	8,73	22,1	8,64	22,6	70,37	122,47	
3	8,73	22,1	8,59	22,8	69,84	120,60	
4	8,73	22,1	8,53	22,4	70,19	123,14	
5	8,73	22,1	8,57	22,6	69,60	120,79	
6	8,56	22,0	8,50	23,1	70,74	120,21	
7	8,56	22,0	8,46	23,1	69,35	120,66	
8	8,56	22,0	8,42	22,8	69,93	119,33	
9	8,22	21,9	8,30	23,1	69,59	120,29	
10	8,22	21,9	8,31	23,1	70,12	120,35	
11	8,23	21,9	8,27	23,2	69,74	120,94	
Mittelwert	-	8,55	22,0	8,47	22,9	69,94	69,94
Standardabweichung	-	0,22	0,1	0,13	0,3	0,40	0,40

**Tabelle 18: Messergebnis der Referenz des Hauptversuches am 30.01.2016 (Algenkultur 2). Mit dem und der Temperatur im M4 Medium beim Beimpfen der Messküvetten ( $pH_{vor}$ ,  $T_{vor}$ ), der pH-Wert nach der Fluoreszenzmessung  $pH_{nach}$ , die Gesamtchlorophyllkonzentration CK in  $\mu g/l$  und die Fotosyntheseaktivität FA in %**

Nr.	$pH_{vor}$	$T_{vor}$ in °C	$pH_{nach}$	$T_{nach}$ in °C	FA in %	CK in $\mu g/l$	
1	8,77	22,2	8,85	22,9	69,16	95,21	
2	8,83	22,2	8,84	23,2	68,93	97,09	
3	8,85	22,2	8,83	23,3	69,26	98,31	
4	8,85	22,2	8,83	23,3	69,39	99,31	
5	8,87	22,2	8,81	23,3	69,01	98,29	
6	8,81	22,0	8,55	23,7	69,03	97,40	
7	8,81	22,0	8,53	23,7	68,80	98,36	
8	8,81	22,0	8,51	24,1	68,56	98,75	
9	8,45	22,0	8,46	23,9	68,80	97,34	
10	8,45	22,0	8,46	23,9	69,33	97,41	
11	8,45	22,0	8,46	24,0	68,99	97,54	
12	8,45	22,0	8,46	23,9	68,76	97,43	
13	8,45	22,0	8,46	24,0	69,18	96,10	
Mittelwert		8,68	22,1	8,62	23,6	69,02	69,02
Standardabweichung		0,19	0,1	0,18	0,4	0,25	0,25

**Tabelle 19: Messergebnis der Referenz des Hauptversuches am 22.02.2016 (Algenkultur 3). Mit dem und der Temperatur im M4 Medium beim Beimpfen der Messküvetten ( $pH_{vor}$ ,  $T_{vor}$ ), der pH-Wert nach der Fluoreszenzmessung  $pH_{nach}$ , die Gesamtchlorophyllkonzentration CK in  $\mu g/l$  und die Fotosyntheseaktivität FA in %**

Nr.	$pH_{vor}$	$T_{vor}$ in °C	$pH_{nach}$	$T_{nach}$ in °C	FA in %	CK in $\mu g/l$	
1	8,64	23,1	8,44	21,7	70,16	115,90	
2	8,64	23,1	8,45	21,7	69,85	116,69	
3	8,64	23,1	8,43	21,7	69,75	116,72	
4	8,64	23,1	8,46	21,8	69,64	117,05	
5	8,64	23,1	8,43	21,8	69,06	119,09	
6	8,63	22,5	8,52	24,4	69,51	118,81	
7	8,63	22,6	8,50	23,3	69,11	121,22	
8	8,62	22,6	8,50	24,6	69,53	118,95	
9	8,62	22,7	8,44	24,6	69,33	117,55	
10	8,40	22,5	8,45	24,3	68,84	119,65	
11	8,41	22,5	8,45	24,3	69,50	121,37	
12	8,49	22,5	8,45	24,3	70,16	117,75	
13	8,49	22,5	8,45	24,3	69,51	120,37	
Mittelwert		8,58	22,8	8,46	23,3	69,53	69,53
Standardabweichung		0,09	0,3	0,03	1,3	0,39	0,39

**Tabelle 20: Berechnete Hemmung der Fotosyntheseaktivität der mittleren Fotosyntheseaktivität je pH-Wert im Vergleich zur mittleren Fotosyntheseaktivität je Algenkultur.**

	pH-Wert	Hemmung in %
Algenkultur 1	5,60	0,24
	6,60	-0,21
	7,80	0,43
	8,90	1,36
	9,90	0,08
	11,00	1,90
Algenkultur 2	5,40	-0,42
	6,10	0,05
	7,60	0,24
	7,90	0,13
	9,00	0,78
	9,90	2,00
	10,90	1,36

	pH-Wert	Hemmung in %
Algenkultur 3	4,70	0,41
	6,80	0,56
	7,10	0,14
	8,00	-0,29
	8,80	0,87
	9,70	1,65
	10,80	3,22

Tabelle 21: Berechnete Abweichung der mittleren Fotosyntheseaktivität je pH-Wert zur mittleren Fotosyntheseaktivität je Algenkultur

	pH-Wert	Abweichungen FA %
Algenkultur 1	5,6	-0,09418182
	6,6	0,08181818
	9,9	-0,03018182
	8,9	-0,53618182
	7,8	-0,17018182
	11	-0,74618182
Algenkultur 2	5,4	0,16261538
	6,1	-0,01938462
	7,6	-0,09338462
	7,9	-0,04938462
	9	-0,30338462
	9,9	-0,77538462
Algenkultur 3	10,9	-0,52938462
	4,7	-0,15923077
	6,8	-0,21923077
	7,1	-0,05323077
	8	0,11476923
	8,8	-0,33923077
	9,7	-0,64523077
10,8	-1,25923077	

**Tabelle 22: Referenzdaten zur Berechnung der durchschnittlichen Standardabweichung. Die Messreihen sind aus anderen Versuchen Referenz 1 (R1) bis Referenz 4 (R4) (Schott 2015), drei aus den eigenen Hauptversuchen**

	FA R1 in %	FA R2 in %	FA R3 in %	FA R4 in %
	65,34	65,87	67,68	66,16
	65,60	66,18	67,30	66,75
	65,69	65,76	67,38	66,43
	65,67	65,88	67,24	66,05
	65,99	65,89	66,87	65,75
	65,96	66,03	67,34	66,16
	65,84	65,97	66,95	65,49
	65,72	65,95	66,84	66,12
	66,14	65,85	66,89	65,60
	66,06	65,92	66,78	65,64
	65,67	66,04	66,83	66,32
	65,72	66,31	66,64	65,64
	65,74	66,05	66,46	65,79
	65,74	66,13	66,88	64,95
	65,84	66,31	66,93	66,48
	65,80	66,02	66,65	66,58
	65,57	66,16	66,90	65,73
	65,32	66,27	66,87	66,64
	65,26	66,00	66,43	66,43
	65,65	66,23	67,01	66,06
	65,94	66,35	66,63	66,85
	65,96	66,16	66,46	66,50
	65,44	66,24	66,78	66,60
	65,48	66,42	66,95	67,12
	65,64	66,18	66,99	67,21
	65,22	66,21	67,19	66,83
	-	-	67,04	67,03
	-	-	-	-
Mittelwert	65,69	66,09	66,92	66,26
Standardabweichung	0,24500298	0,17576558	0,29578569	0,55734439

## ***I. Herstellung des M4-Mediums***

Die Herstellung des M4-Mediums erfolgte gemäß der Empfehlung des AQS-Merkblatt P-9/2, Stand Feb. 2000. Die Lösungen (L) werden in deionisiertem Wasser angesetzt.

### **Makronährstoffe:**

#### **Lösung 1: Calciumchlorid-Lösung**

73,45 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

#### **Lösung 2: Magnesiumsulfatheptahydrat-Lösung**

123,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

#### **Lösung 3: Kaliumchlorid-Lösung**

5,8 g/l KCl

#### **L4: Natriumhydrogencarbonat-Lösung**

64,8 g/l  $\text{NaHCO}_3$

### **Mikronährstoffe:**

#### **Lösung 5: Kationenlösung**

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

6120 mg LiCl

1420 mg RbCl

3040 mg  $\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

335 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

260 mg  $\text{ZnCl}_2$

200 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  in A. deion. Lösen und mit A. deion. Wasser auf 2 Liter auffüllen

#### **Lösung 6: Anionenlösung**

548 mg  $\text{NaNO}_3$

5719 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$

32 mg NaBr

126 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

6,5 mg KJ

6,66 mg  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

1,15 mg  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  in A. deion. Lösen und mit A. deion. auf 1 Liter auffüllen

#### **Lösung 7: Silikatlösung**

21 475 mg/l  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$

#### **Lösung 8: Eisen-/EDTA-Lösung**

500 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Titrplex III)

199,1 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Beide Reagenzien werden einzeln in 500ml A. deion. angesetzt, zusammengegeben und sofort autoklaviert und im Dunkeln verwahrt.

### **L9: Phosphatlösung**

286 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in A. deion. Lösen und mit 368 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  A. deion. Auf 1 Liter auffüllen.

### **L10: Vitaminlösung**

750 mg Thiaminchloridhydrochlorid in A. deion. Wasser Lösen und mit A. deion. Wasser Auf 1 Liter auffüllen

10 mg Cyanocobalamin (B12)

7,5 mg Biotin

### **Herstellung von 10 Litern M4-Medium:**

40 ml der Lösung 1

10 ml der Lösung 2

10 ml der Lösung 3

10 ml der Lösung 4

1 ml der Lösung 5

5 ml der Lösung 6

2 ml der Lösung 7

50 ml der Lösung 8

5 ml der Lösung 9

1 ml der Lösung 10

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

## ***II. Herstellung der Nährlösung nach CHOU***

Die Algenkulturen werden in der Nährlösung nach CHOU kultiviert. In dieser Arbeit wurde die durch die HU bereitgestellte Lösung zum Verdünnen der Algenstammlösung verwendet wurde.

### **Stammlösungen nach CHOU**

#### **Stamm I:**

in 2000 ml Messkolben lösen

50 g  $\text{NaNO}_3$

5 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

15 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

35 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

5 g  $\text{NaCl}$

#### **Stamm II:**

in 2000 ml Messkolben lösen

15 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

**Stamm III:**

in 100 ml Messkolben lösen

1,142 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0,882 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,144 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

0,120 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,157 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

0,049 g  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

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

**Stamm IV:**

in 100 ml Messkolben lösen

4,5 g Titriplex III

3,1 g KOH

**Stamm V:**

in 100 ml Messkolben lösen

0,498 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  + 0,1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$

0,5 g Titriplex III

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

**Herstellung von 5 Litern Nährlösung:**

Stamm I 250 ml

Stamm II 250 ml

Stamm III 5 ml

Stamm IV 5 ml

Stamm V 5 ml

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

## **Selbsterklärung**

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

Hamburg, den 14. Juni 2017